

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

"Comparación de las alteraciones anatomopatológicas provocadas por la infección de *Toxoplasma gondii* entre los tercios de la gestación en un modelo murino"

# TESIS

Que para optar por el grado de:

Maestra en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

Presenta:

Mónica Ivonne Aguilar Orozco

Tutor Principal: Carlos Cedillo Peláez Instituto Nacional de Pediatría

Comité Tutoral: Santiago René Anzaldúa Arce Carlos Gerardo Salas Garrido Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

Ciudad Universitaria, CD.MX.

Febrero 2019



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. El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunología de Experimental, de la Subdirección de Medicina Experimental, del Instituto Nacional de Pediatría, Secretaria de Salud; bajo la dirección del Dr. Carlos Cedillo Peláez.

El trabajo de investigación fue financiado por el proyecto "Efecto de las células asesinas naturales uterinas uNK en un modelo murino de toxoplasmosis congénita", con número de registro en el Instituto Nacional de Pediatría (INP) 065/2010.

La alumna fue becaria del CONACYT de agosto del 2015 a julio de 2017 con número de apoyo 3763.

## RESUMEN

La toxoplasmosis congénita se presenta en humanos y animales; causando muerte embrionaria/fetal y aborto. Se ha propuesto que la multiplicación de T. gondii en la placenta y los embriones/fetos provoca efectos adversos en el desarrollo y mantenimiento de la gestación, pero la patogenia no está totalmente comprendida. El objetivo del trabajo fue describir y comparar las alteraciones celulares, tisulares y vasculares de las unidades feto-placentarias (UFP) entre los tercios de la gestación en un modelo murino de toxoplasmosis congénita. Se utilizaron tejidos de ratonas BALB/c inoculadas con taquizoítos Me49 de T. gondii en los días 7, 10 y 15 de la gestación; se les aplicó eutanasia,72 horas post-inoculación se tomó hígado y bazo maternos, así como las UFP procesándose por HE, PAS, PTAH e IHQ para T. gondii. Las alteraciones histopatológicas tuvieron diferente grado y distribución dependiendo del tercio de la gestación. En las placentas del primer tercio predominó la hemorragia, los embriones presentaron degeneración generalizada y hubo más reabsorciones embrionarias que en los otros dos tercios; la presencia del parásito se confirmó en 5% de los embriones. En el segundo tercio, las placentas presentaron congestión, degeneración y necrosis; los embriones se observaron menos celulares, compactos y simétricos; algunos presentaron congestión de moderada a severa; la presencia de T. gondii se confirmó en aproximadamente 20% de los embriones. En el último tercio las placentas presentaron degeneración, disgregación tisular y trombosis, en los fetos se confirmó la transmisión vertical en el 90% y se observaron con degeneración y necrosis leve. Estos resultados sugieren que muerte embrionaria/fetal y el aborto se deben a la disfunción placentantaria generada por múltiples factores distintos a la replicación del parásito in situ y sugieren que las alteraciones en la hemodinamia son provocadas por la presencia de T. gondii y tienen un papel importante el daño embrionario/fetal.

Toxoplasmosis congénita, modelo murino, muerte fetal, histopatología, disfunción placentaria.

## ABSTRACT

Congenital toxoplasmosis occurs in humans and animals; causing embryonic/fetal death and abortion. It has been proposed that the multiplication of T. gondii in the placenta and embryos/fetuses causes adverse effects in the development and maintenance of pregnancy, but the pathogenesis is not fully understood. The objective of the work was to describe and compare the cellular, tissue and vascular alterations of the fetus-placental units (FPU) between the thirds of gestation in a murine model of congenital toxoplasmosis. BALB/c mouse tissues inoculated with T. gondii tachyzoites Me49 were used on days 7, 10 and 15 of gestation; euthanasia was applied, 72 hours post-inoculation, maternal liver and spleen was taken, as well as the PFU processed by HE, PAS, PTAH and IHQ for T. gondii. The histopathological alterations had different degree and distribution depending on the third of the gestation. In the placentas of the first third the hemorrhage predominated, the embryos presented generalized degeneration and there was more embryonic resorption than in the other two thirds: the presence of the parasite was confirmed in 5% of the embryos. In the second third, the placentas presented congestion, degeneration and necrosis; the embryos were observed less cellular, compact and symmetrical; some had moderate to severe congestion; the presence of T. gondii was confirmed in approximately 20% of the embryos. In the last third the placentas presented degeneration, tissue disintegration and thrombosis, in fetuses' vertical transmission was confirmed in 90% and they were observed with degeneration and mild necrosis. These results suggest that embryonic/fetal death and abortion are due to placental dysfunction generated by multiple factors other than in situ replication of the parasite and suggest that alterations in hemodynamics are caused by the presence of T. gondii and have a role important embryonic/fetal damage.

Congenital toxoplasmosis, murine model, fetal death, histopathology, placental dysfunction.

# Abreviatura

# Significado

T. aondii	Toxoplasma gondii
TLR	Receptores tipo Toll (del inglés Toll like receptor)
MAMP´s	Patrones moleculares asociados a microorganismos
GPI	Glicosil-fosfatidil-inositol
CD	Células dendríticas
IL	Interleucina
NK	Natural killer (asesinas naturales)
INF- v	Interferón v
IFN-vR	Receptor de interferón v
CHem	Células hematopovéticas
CNHemn	Células no hematopovéticas
STAT-1	Transductor de señales y el activador de la transcripción 1
NO-	Óxido nítrico
ROS	Especies reactivas de oxigeno
ATG5	Proteína 5 de autofagia
GTPasas	Enzima trifosfatasa de guanosina
IRGs	GTPasas relacionadas con la inmunidad
ADCC	Citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (por sus siglas en inglés)
TNF-α	Factor de necrosis tumoral a
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinasas de matriz
СТВ	Células del trofoblasto, trofoblasto
CGT	Células gigantes del trofoblasto
DDG	Día de gestación
CE	Células epiteliales
CEU	Células epiteliales uterinas
CEn	Células endoteliales
HE	Hematoxilina y eosina
PAS	Ácido peryódico de Schiff
UFP	Unidades feto-placentarias
uNK	Células asesinas naturales uterinas
IV	Vía endovenosa
LIE	Laboratorio de Inmunología Experimental
IHQ	Inmunohistoquímica
PTAH	Hematoxilina acida fosfotungstíca
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
MLAp	Agregado linfocitario mesometrial de la gestación
DB	Decidua basal
LC	Laberinto coriónico
ET	Espongiotrofoblasto
CA	Cavidad amniotica
EMT	Esbozo de los miembros torácicos
TN	lubo neural
UP	Decidua parietal
	Feio Droto inc. O circileo o fibrio é record
FgI2	Proteina 2 similar a fibrinogeno
UNA	ACIAO AESOXIFFIDONUCIEICO

DPC	Día post-coito
PBS-T20	Solución tamponada de fosfatos con Tween 20
HRP	Peroxidasa de rábano
PBS	Solución tamponada de fosfatos

# ÍNDICE

1.0		INTRODUCCIÓN	1
1.1		Generalidades de <i>T. gondii</i>	1
1.2		Estadios y ciclo de vida	1
	1.2.1	Ciclo de vida	3
1.3		Vías de transmisión	5
1.4		Toxoplasmosis	8
1.4.1		Toxoplasmosis congénita	9
1.5		Patogenia	11
1.6		Respuesta inmune	13
1.7		Gestación: establecimiento de la interfaz materno-fetal	14
1.8		Características morfológicas de placenta de humanos y ratones	16
1.9		Modelos murinos de toxoplasmosis congénita	18
2.0		JUSTIFICACIÓN	24
3.0		OBJETIVO GENERAL	25
4. 0		HIPÓTESIS	25
5.0		MATERIAL Y MÉTODOS	26
5.1		Tipo de estudio	26
5.2		Estrategia general	26
5.3		Etapa retrospectiva	27
	5.3.1	Revisión de registros y bitácoras	27
	5.3.2	Selección del material de estudio	27
	5.3.3	Clasificación del material de estudio y registro de datos	28
5.4		Etapa prolectiva	28
	5.4.1	Procesamiento de muestras para histoquímica	28
	5.4.2	Inmunohistoquímica para <i>T. gondii</i>	29
	5.4.3	Evaluación histopatológica	29
	5.4.4	Comparación de resultados: dosis infectante y tercio de gestación	30
6.0		RESULTADOS	33
6.1		Experimentos y muestras seleccionadas para el estudio	33
6.2		Descripción microscópica de tejidos maternos y UFP	33
	6.2.1	Testigos: Tejidos maternos y UFP de ratonas de todos los tercios	33
	6.2.2	Tejidos maternos y UFP de ratonas inoculadas con taquizoítos de <i>T. gondii</i> en el 1 <sup>er</sup> tercio de la gestación	38

	6.2.3	Tejidos maternos y UFP de ratonas inoculadas con taquizoítos de <i>T. gondii</i> en el 2do tercio de la gestación	47
	6.2.4.	Ratonas inoculadas con taquizoítos de <i>T. gondii</i> en el 3er tercio de gestación: tejidos maternos y UFP	57
	6.2.5	Inmunohistoquímica para T. gondii.	64
	6.2.6	Histoquímica para ácido peryódico de Shiff (PAS)	65
	6.2.7	Hematoxilina acida fosfotungstíca: UFP todas las dosis, todos los tercios	67
6.3		Comparación de alteraciones por dosis y tercio de la gestación	69
7.0		DISCUSIÓN	69
7.1		Comparación de alteraciones y lesiones en tejidos maternos	69
7.2		Comparación de alteraciones y lesiones en unidades feto- placentarias	75
	7.2.1	Alteraciones vasculares	75
	7.2.2	Alteraciones celulares y tisulares	80
8.0		CONCLUSIONES	83
9.0		PERSPECTIVAS	84
10.0		Anexo: Metodología con la cual se procesaron las muestras	85
10.1.		Inmunohistoquímica para <i>T. gondii</i>	86
10.2		Tinción de Hematoxilina acida fosfotungstíca de Mallory (PTAH)	88
10.3		Tinción de Ácido Peryódico de Schiff (PAS)	89
11.0		REFERENCIAS	91

# LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Estadios de Toxoplasma gondii.	4
Figura 2.	Ciclo de vida de Toxoplasma gondii.	7
Figura 3.	Gráfico que relaciona el tercio de la gestación y los riesgos de presentar cuadro clínico y de transmisión vertical en la infección congénita en seres humanos.	10
Figura 4.	Esquema y microfotografía de placenta de ratón.	19
Figura 5.	Comparación histológica de placentas de humano y ratón.	22
Figura 6.	Estrategia general del trabajo de investigación.	26
Figura 7.	Secciones histológicas de tejidos maternos y de UFP de ratonas de los grupos testigo.	34
Figura 8.	Secciones de placenta de ratonas del grupo testigo inoculadas en el primer tercio de la gestación.	36
Figura 9.	UFP de ratona del grupo testigo inoculada en el primer tercio de la gestación.	37
Figura 10.	Reabsorción embrionaria de ratona del grupo testigo inoculada en el primer tercio de la gestación.	39
Figura 11.	Tejidos maternos positivos a la infección de T. gondii.	41
Figura 12.	UFP de ratonas inoculadas con diferentes dosis de taquizoítos de <i>T. gondii</i> en el segundo tercio de la gestación.	43
Figura 13.	UFP con reabsorción fetal de ratona inoculada con 5.0 millones de taquizoítos de <i>T. gondii</i> en el primer tercio de la gestación.	44
Figura 14.	Secciones histológicas de UFP de ratonas inoculadas con diferentes dosis de <i>T. gondii</i> en el primer tercio de la gestación.	45
Figura 15.	UFP con reabsorción embrionaria de ratona inoculada con 7.5 millones de taquizoítos de <i>T. gondii</i> en el primer tercio de la gestación.	48
Figura 16.	Secciones histológicas de DB de ratonas inoculadas con diferentes dosis de taquizoítos de <i>T. gondii</i> en el segundo tercio de la gestación.	50

- **Figura 17.** UFP de ratonas inoculadas con diferentes dosis de taquizoítos 51 de *T. gondii* en el segundo tercio de la gestación.
- **Figura 18.** UFP de ratona inoculada con 2.5 millones de taquizoítos de *T.* 52 *gondii* en el segundo tercio de la gestación.
- **Figura 19.** UFP de ratonas inoculadas con diferentes dosis de taquizoítos 54 de *T. gondii* en el segundo tercio de la gestación.
- **Figura 20** Secciones histológicas de embriones de ratonas inoculadas con 55 diferentes dosis de taquizoítos de *T. gondii* en el segundo tercio de la gestación.
- Figura 21. UFP de ratonas inoculadas con diferentes dosis de taquizoítos 56 de *T. gondii* en el segundo tercio de la gestación.
- Figura 22. Placentas de ratonas inoculadas con diferentes dosis de 59 taquizoítos de *T. gondii* en el tercer tercio de la gestación.
- Figura 23. Placentas de ratonas inoculadas con diferentes dosis de 60 taquizoítos de *T. gondii* en el tercer tercio de la gestación.
- **Figura 24.** Secciones histológicas de útero y placenta de ratonas inoculadas 61 con diferentes dosis de taquizoítos de *T. gondii* en el tercer tercio de la gestación.
- **Figura 25.** UFP de ratonas inoculadas con diferentes dosis de taquizoítos 62 de *T. gondii* en el tercer tercio de la gestación.
- Figura 26. Tejidos fetales cuyas madres fueron inoculadas con diferentes 63 dosis de taquizoítos de *T. gondii* en el tercer tercio de la gestación.
- **Figura 27.** Secciones de DB de ratonas inoculadas con diferentes dosis de 66 taquizoítos de *T. gondii* en diferentes tercios de la gestación procesadas con PAS.
- **Figura 28.** Comparación de la gravedad de las alteraciones celulares entre 70 las placentas de los tres tercios de la gestación.
- Figura 29.Comparación de la gravedad de las alteraciones vasculares entre71las placentas de los tres tercios de la gestación.
- Figura 30 Comparación de la gravedad de las alteraciones 72 embrionarias/fetales: entre los tres tercios de la gestación.
- **Figura 31** Comparación de la gravedad de las alteraciones celulares y 73 tisulares placentarias y las alteraciones de los tejidos embrionarios/fetales entre los tres tercios de la gestación.

Figura 32Comparación de la gravedad de las alteraciones vasculares en<br/>placentas y la degeneración de los tejidos embrionarios/fetales<br/>entre los tres tercios de la gestación.74

# LISTA DE CUADROS

# Página

Cuadro 1.	Heterogeneidad de los modelos animales de toxoplasmosis congénita.	23
Cuadro 2.	Grado y distribución de alteraciones microscópicas en tejidos maternos y UFP.	31
Cuadro 3.	Grado y distribución de trombosis microscópica en UFP.	32
Cuadro 4.	Categorización de las alteraciones microscópicas.	31
Cuadro 5.	Material biológico seleccionado para el trabajo de investigación.	33

## 1. INTRODUCCIÓN

#### 1.1 Generalidades de *T. gondii*

*Toxoplasma gondii* es un protozoario intracelular obligado, perteneciente al Philum Apicomplexa, que se caracteriza por presentar un conjunto de organelos especializados en la invasión celular, llamado complejo apical (Dubey, 2010; Cedillo-Peláez, 2015).

Se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, su presencia se ha documentado en más de 30 especies de aves y 300 especies de mamíferos. Se ha descrito que la seroprevalencia en la población humana oscila entre el uno y el 100%, dependiendo de aspectos diversos como, las condiciones ambientales y geográficas (geo-latitud, porcentaje de humedad), socioeconómicas (hábitos alimenticios, niveles de sanidad e higiene) y características propias del hospedador, como el grado de susceptibilidad y su idiosincrasia inmunológica. La frecuencia de la infección es alta en climas cálido-húmedos, puede incrementarse con la edad y variar por género (Dubey, 2010; Flegr *et al.*, 2014; Cedillo-Peláez, 2015).

Se estima alrededor del 30 al 50% de la población humana esta crónicamente infectada; aunque más del 90% de las infecciones son asintomáticas, se considera una parasitosis de importancia médica relevante, ya que puede provocar diversos cuadros clínicos, y afecta a un gran número de vertebrados homeotermos (Tenter *et al.*, 2000; Hill *et al.*, 2005; Gilbert *et al.*, 2008; Dubey, 2010; Shwab *et al.*, 2014; Flegr *et al.*, 2014).

### 1.2 Estadios y ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. gondii* es indirecto, para completar su desarrollo requiere de un hospedero definitivo, (cualquier miembro de la familia *Felidae*) y de un hospedero intermediario, que puede ser cualquier ave o mamífero incluyendo el ser humano (Tenter *et al.*, 2000; Hill *et al.*, 2005; Dubey, 2010). El ciclo de vida

comprende cuatro estadios infecciosos, cada uno con características biológicas y morfológicas distintas (Cedillo-Peláez, 2015):

- Taquizoítos. Son el estadio de replicación rápida, están presentes durante la fase aguda de la infección, provocando lesiones necróticas por su replicación intracelular continua. Cuando están libres, tienen forma de media luna (Figura 1), con su extremo anterior en forma de punta y el extremo posterior de aspecto romo. Los taquizoítos miden de 2.0-3.0 x 6.0 µm (Hill *et al.*, 2005; Dubey, 2010).
- Merozoíto. Estadio propio del ciclo enteroepitelial, exclusivo de los hospederos definitivos (felinos domésticos y silvestres). Conforme se replican los zoítos en el epitelio intestinal, se presenta diferentes fases asexuales morfológicamente distintas (denominadas A, B, C, D y E). Al conjunto de merozoítos se le denomina esquizonte. A partir de los merozoítos tipo E, se inicia la replicación sexual para generar los macro y microgametocitos. Los merozoítos miden 2.9 x 5.8 mm aproximadamente (Dubey, Lindsay y Speer, 1998; Dubey, 2010).
- Esporozoíto. Son el resultado final del ciclo enteroepitelial, con una fase de reproducción sexual (macrogameto fecundado por microgameto), con la generación de ooquistes sin esporular (presentan forma esférica, con paredes bien definidas y miden de 10.0 a 12.0 µm de diámetro. Al esporular los ooquistes (Figura 1), se presentan dos esporoquistes elipsoidales, cada uno con cuatro esporozoítos, los cuales miden 6.0 x 8.0 µm (Dubey, 2010).
- Bradizoítos. Los bradizoítos están presentes en la fase crónica de la enfermedad, con un metabolismo diferente al de los taquizoítos, pero semejantes en su morfología. Los bradizoítos se dividen lentamente y se encuentran contenidos inicialmente por un sistema membranoso (vacuola parasitófora), conforme transcurre el tiempo se depositan diferentes proteínas generando una pared. Al conjunto de bradizoítos delimitados por

esta estructura se le denomina quiste tisular (Figura 1). Los bradizoítos miden 1.5 x 7.0 µm (Hill *et al.*, 2005; Dubey, 2010).

## 1.2.1 Ciclo de vida

T. gondii presenta un ciclo de vida indirecto (Figura 2), que puede iniciar cuando un hospedador definitivo (felinos) ingiere quistes tisulares con bradizoítos u ooquistes con esporozoítos. Al llegar al tracto digestivo, los zoítos (bradizoítos o esporozoítos) son liberados en la luz, por acción de los jugos gástricos y las enzimas proteolíticas del intestino delgado, posteriormente invaden las células epiteliales del intestino. Una vez que están en el interior de los enterocitos, se lleva a cabo una primera multiplicación asexual por endodiogenia, dando origen a los merozoítos; cuyo desarrollo se lleva a cabo en el epitelio intestinal y da origen a cinco tipos morfológicos distintos A, B, C, D y E; similares morfológicamente a los taquizoítos. Los merozoítos del tipo B se dividen por endodiogenia y los merozoítos C, D y E se dividen por endopoligenia. Al final de estas divisiones asexuales, (tipo D o E) se da inicio la fase de replicación sexual, que es exclusiva de los hospederos definitivos, generando macro y microgametos (femenino y masculino, respectivamente). Cuando los microgametocitos fertilizan a microgametocitos se genera un cigoto, que posterior a la división del núcleo y el citoplasma dará origen a dos esporoblastos con dos núcleos cada uno. Conforme continua la maduración, los esporoblastos adquieren forma elongada, formando los esporoquistes. que al madurar forma el ooquiste sin esporular, siendo eliminado al ambiente a través de las heces. El conjunto de las divisiones asexuales y sexuales en los enterocitos, hasta la expulsión de los ooquistes sin esporular, representan el ciclo enteroepitelial. La esporulación del ooquiste se ve favorecida por condiciones ambientales (temperatura y humedad) y se lleva a cabo en un periodo de uno a cinco días. El ooquiste esporulado contiene dos esporoquistes elipsoidales, cada uno con cuatro esporozoítos (Dubey, Lindsay y Speer, 1998; Etheredge et al., 2004;



Figura 1. Estadios de *T. gondii.* A) Taquizoítos con forma de media luna, en frotis de pulmón (flechas) y en replicación (punta de flecha). B) Quiste tisular en una sección de músculo, se observa la pared delgada (flecha) y bradizoítos en su interior (puntas de flecha). C) Quiste tisular obtenido del cerebro de un ratón, se observa la pared del quiste bien definida (flecha) y los bradizoítos al interior (puntas de flecha). D) Ooquiste no esporulado, obtenido de las heces de un gato; se observa una doble pared bien definida (flecha). E) Ooquiste esporulado, se aprecia la pared (flecha grande) y los dos esporoquistes (puntas de flecha), dentro de ellos se aprecian cuatro esporozoítos (flecha pequeña). Tomada y modificada de Hill, Chirukandoth y Dubey, 2005.

Hill *et al.*, 2005; Speer y Dubey, 2005; Dubey *et al.*, 2005; Cedillo-Peláez, 2009; Ferguson y Dubremetz, 2014).

En los hospedadores definitivos, de forma simultánea al ciclo enteroepitelial una proporción de zoítos puede penetrar la lámina propia de la pared intestinal y multiplicarse como taquizoítos, diseminándose a otros tejidos por vía linfática y sanguínea. En los hospedadores intermediarios, tras la ingestión de cualquiera de los estadios infecciosos, ocurre una conversión a taquizoítos en el intestino y posteriormente se diseminan extraintestinalmente de forma similar a lo que ocurre con los hospedadores definitivos. Los taquizoítos se pueden multiplicar rápidamente en células nucleadas de múltiples tejidos (endotelios vasculares, fibroblastos, células mono y polimorfonucleares, no en eritrocitos, aunque si pueden invadirlos). Si el hospedador es un individuo inmunocompetente, generalmente podrá controlar la replicación de los parásitos eliminando gran parte de los mismos, sin embargo, algunos de los taquizoítos que logran evadir la respuesta inmune, pueden alojarse en diferentes tejidos transformándose en bradizoítos, formando quistes tisulares. Los quistes tisulares son considerados el estadio final del ciclo de vida en los hospedadores intermediarios, con capacidad infecciosa inmediata, aunque también pueden persistir de por vida en varios organismos; se pueden encontrar predominantemente en órganos del sistema nervioso central, ojo, músculo estriado esquelético, músculo cardiaco; y en menor cantidad en órganos viscerales como hígado, pulmón y riñón (Dubey, Lindsay y Speer, 1998; Tenter et al., 2000; Hill et al., 2005; Dubey et al., 2005; Cedillo-Peláez, 2009; Dubey, 2010; Ferguson y Dubremetz, 2014).

### 1.3 Vías de transmisión

Independientemente de que los hospedadores se puedan infectar al ingerir quistes tisulares presentes en carne o por consumir alimentos contaminados con ooquistes esporulados (transmisión horizontal), la transmisión de *T. gondii* también se puede llevar a cabo de manera transplacentaria (transmisión vertical); cuando una hembra en gestación se infecta y transmite el parásito al feto, documentándose en la literatura diversos mecanismos que favorecen dicha circunstancia (paso materno-fetal de células infectadas, incluyendo células sanguíneas o de la placenta (trofoblastos), entre otras (Flegr, 2014; Cedillo-Peláez, 2015).

Por otra parte, se han descrito otras vías de trasmisión de *T. gondii*, asociadas a diversos factores, incluyendo la exposición al suelo contaminado por ooquistes, la práctica de geofagia y la permanencia de niños que juegan en areneros; el consumo frecuente de moluscos bivalvos como almejas y mejillones, así como la ingesta de leche cruda de diferentes rumiantes. Se ha documentado que *T. gondii* también puede transmitirse por transfusión de sangre, aloinjertos de órganos sólidos, trasplante de médula ósea, alotrasplante de células madre, esputo y semen (Flegr, 2014; Cedillo-Peláez, 2015). Higiene deficiente, un nivel de educación y socioeconómico bajo, así como la exposición a ciertos genotipos de *T. gondii* también pueden contribuir a incrementar la tasa de infección (Flegr, 2014).

Los primeros estudios de genotipificación agruparon a los aislamientos de *T. gondii* en uno de tres genotipos denominados "I, II y III", de forma similar a lo referido a su clasificación biológica. A estos genotipos también se les ha definido como "linajes clásicos o predominantes". La variabilidad genética entre los aislamientos estudiados fue menor o igual al 1%, considerándose relativamente baja, por lo que fueron denominados linajes clonales (Dardé, 2004; Su *et al.*, 2006, 2010, 2012; Pena *et al.*, 2008; Cedillo-Peláez, 2015).

Sin embargo, en estudios más recientes y donde se utiliza una mayor cantidad de marcadores y técnicas (PCR-RFLP, microsatélites y secuenciación), han demostrado la presencia de nuevos genotipos con características particulares en diversas partes del mundo, revelando una mayor variabilidad genética. Estos aislamientos recientes se han referido como recombinantes (por presentar combinación de alelos I y III o I, II y III, etc.) y atípicos (combinación de alelos I, II o



Vertebrados de sangre caliente: Hospedadores intermediarios Reproducción asexual

Figura 2. Ciclo de vida de *T. gondii*. El ciclo puede iniciar con la eliminación de ooquistes no esporulados en las heces del gato, bajo condiciones adecuadas de temperatura y humedad, el ooquiste esporula, posteriormente es ingerido por alguno de los hospedadores intermediarios. El ciclo se cierra cuando un felino consume quistes tisulares de un hospedador intermediario infectado; lo que corresponde a la vía de transmisión horizontal. La vía de transmisión vertical puede presentarse cuando una hembra gestante se infecta, transmitiendo el parásito a su cría, dando lugar a la infección congénita. Cortesía de M en C Alejandro Besné Mérida

III con polimorfismos únicos y nuevos, identificándose los alelos como u-1, u-2, u3, etc.), siendo por lo general más virulentos en ratón que los linajes clásicos II y III (Sibley *et al*, 1992b; Darde, 2004; Switaj, 2005; Su *et al.*, 2006, 2010, 2012; Pena *et al.*, 2008, 2011; Dubey, 2010; Darde, Ajzenberg y Su, 2014; Cedillo-Peláez, 2015).

### 1.4 Toxoplasmosis

El término "toxoplasmosis" se utiliza para describir la enfermedad clínica o anatomopatológica causada por *Toxoplasma gondii*, generando una infección sintomática (enfermedad aguda) o bien, un cuadro persistente con quistes tisulares (enfermedad crónica o infección latente) (Montoya, 2004; Dubey, 2010; Cedillo-Peláez, 2015).

Se considera que el 95% de los casos de toxoplasmosis en el mundo son asintomáticos, debido a que la respuesta inmune es capaz de controlar la replicación del parásito, limitando la presentación de un cuadro clínico. Cuando la respuesta inmune es rebasada y se presenta la infección, un amplio grupo de presentaciones clínicas se han descrito, con afección a diferentes tejidos y con distribución local o generalizada. En pacientes inmunocompetentes se han descrito cuadros agudos con presencia de fiebre, exantema, mononucleosis y linfadenopatía cervical, principalmente, sin embargo, en otros casos, además de presentarse estas alteraciones, el cuadro clínico puede exacerbarse y generar un cuadro sistémico con afectación multiorgánica (cuadro respiratorio y digestivo), comprometiendo la integridad del hospedador afectado (Cedillo-Peláez, 2017).

Dependiendo de diversos factores, también se pueden presentar cuadros clínicos locales, restringidos a regiones anatómicas particulares, como la toxoplasmosis ocular, donde la afección suele ser unilateral con desarrollo de retinocoroiditis de leve a moderada, o bien, se pueden presentar en el fondo del ojo lesiones con mayor extensión y gravedad, con compromiso importante de la visión y riesgo de presentar ceguera total. En estos casos, aparentemente no hay

involucramiento de otros aparatos o tejidos, sin conocerse a la fecha los mecanismos que condiciona esta limitación anatómica (Cedillo-Peláez, 2017). Otras presentaciones clínicas incluyen la toxoplasmosis neurológica o cerebral, la cutánea, digestiva, y otra de suma relevancia clínica, es la toxoplasmosis congénita (Dubey, 2010; Cedillo-Peláez, 2017). Esta última presentación, se describe a detalle a continuación.

#### 1.4.1 Toxoplasmosis congénita

Es provocada por la transmisión transplacentaria de *T. gondii* de la madre hacia el feto, siendo la carga parasitaria, el genotipo y la virulencia del parasito, así como el tercio de la gestación en donde se presenta la primoinfección materna, factores que condicionan el riesgo de la transmisión vertical y la gravedad del cuadro clínico. La infección por *T. gondii* en mujeres embarazadas es relevante, ya que, si el parásito es transmitido al embrión/feto (dependiendo del tercio de gestación donde se infecte la madre), puede provocar muerte embrionaria/fetal y aborto. Un recién nacido expuesto al parásito en el útero durante la gestación, puede desarrollar secuelas neurológicas y oculares.

En seres humanos, se ha descrito que, si la infección materna ocurre durante el primer tercio de la gestación, el riesgo de transmisión al embrión en desarrollo es baja, y aumenta conforme avanza la gestación, siendo mayor en el tercer tercio (Figura 3). Por otro lado, el riesgo de que los productos presenten signos y lesiones disminuye conforme aumenta el trimestre de la gestación (Dunn *et al.*,1999; Remington *et al.*, 2006; Elbez-Rubistein *et al.*, 2009; Dubey, 2010; Cedillo-Peláez, 2017). Si la infección materna ocurre en el primer tercio de la gestación, la tasa de transmisión congénita es del 2-15%, pero si se presenta, generalmente provoca muerte embrionaria y aborto. Durante el segundo trimestre, la tasa de transmisión congénita aumenta hasta llegar al 50% y los fetos infectados suelen nacer prematuramente, o con problemas clínicos severos, incluyendo cuadros neurológicos con secuelas graves (meningoencefalitis



Figura 3. Gráfico que relaciona el tercio de la gestación donde ocurre la infección materna y los riesgos de presentar cuadro clínico y transmisión vertical en la infección congénita en seres humanos. Dependiendo del tercio de la gestación donde se lleve a cabo la primoinfección materna, el riesgo de transmisión vertical aumenta y de manera contraria el riesgo de presentar signos clínicos disminuye conforme avanza la gestación. Tomado y modificado de Dunn *et al.*, 1999.

granulomatosa con hipertensión intracraneana, hidrocefalia secundaria a ependimitis y ventriculitis; así como calcificaciones cerebrales parenquimatosas difusas (Dunn *et al.*,1999; Remington *et al.*, 2006; Elbez-Rubistein *et al.*, 2009; Dubey, 2010; Cedillo-Peláez, 2017).

En el tercer tercio de la gestación, la tasa de transmisión oscila entre el 60 y el 90%, aunque la mayoría de los neonatos parecen ser asintomáticos, pueden desarrollar secuelas neurológicas, oftalmológicas y auditivas en un periodo posnacimiento que va de los tres meses a los 20 años (Dunn *et al.*, 1999).

#### 1.5 Patogenia

El progreso de la infección por *T. gondii* y su patogenia, tanto en humanos como en animales, depende de diversos factores como la virulencia y genotipo del aislamiento, la dosis infectante, el estadio del parásito, el estado inmunológico, la susceptibilidad del hospedador involucrado y la relación parásito-hospedador, entre otros (Montoya y Liesenfeld, 2004; Hill et al., 2005; Dubey, 2010; Cedillo-Peláez, 2015). Clásicamente, la lesión característica e indicativa de infección por T. gondii es la necrosis, que en un principio es de tipo celular, y conforme transcurre el tiempo, afecta a una mayor cantidad de células, generando necrosis tisular. T. gondii usualmente infecta al hospedador, definitivo e intermediario, sin producir enfermedad clínica, siendo poco frecuentes los casos severos. Independientemente del tipo de estadio con el que se infecte, ya sea por la ingestión de carne infectada con quistes tisulares o por alimento contaminado con ooquistes, al alcanzar la luz intestinal tanto los bradizoítos como esporozoítos, penetran las células epiteliales multiplicándose dentro de las primeras 24 horas, generando múltiples taquizoítos, los cuales, al producir la lisis y muerte de las células infectadas, son liberados invadiendo las células adyacentes, provocando zonas de necrosis, cada vez más extensas; conforme se van propagando, pueden invadir el tejido cercano (enterocitos, intersticio y tejido linfoide asociado, incluyendo leucocitos residentes no residentes). Posteriormente, los zoítos se diseminan a linfonodos mesentéricos

y después a través de vasos linfáticos y sanguíneos, alcanzando diferentes órganos y multiplicándose virtualmente en cualquier célula nucleada del cuerpo del hospedero. Recientemente se ha descrito, que la diseminación de T. gondii se ve favorecida por su habilidad de invadir células migratorias del sistema inmune, como las células dendríticas; lo que permite su distribución hacia tejidos linfoides; o bien, invaden macrófagos, neutrófilos y células NK generando un efecto denominado "caballo de Troya", al ser "transportados" en interior de las células inmunes infectadas, evadiendo así la respuesta inmune, alcanzando tejidos distantes como el sistema nervioso central. El cuadro clínico es determinado por la extensión de las lesiones necróticas en los tejidos afectados, por el crecimiento intracelular de los taquizoítos y la presencia de una respuesta inflamatoria franca. El hospedador puede morir por un cuadro de toxoplasmosis aguda debido a las alteraciones en intestino y linfonodos mesentéricos, aunado a las lesiones necróticas en otros tejidos. En la mayoría de los casos, la respuesta inmune del hospedador es capaz de limitar y controlar la diseminación parasitaria, adquiriendo inmunidad con la aparición de anticuerpos, desarrollando toxoplasmosis crónica (Dubey y Beattie, 1988; Ferguson, 2004; Hill et al., 2005; Dubey, 2010; Weidner et al., 2014; Cedillo-Peláez, 2015).

En el caso de la toxoplasmosis congénita, la transmisión transplacentaria ocurre a partir de la infección de los vasos sanguíneos, así mismo, los taquizoítos pueden replicarse dentro de las células del sincitiotrofoblasto y del trofoblasto. Una vez que los taquizoítos han alcanzado la luz de los vasos sanguíneos, pueden llegar a la sangre fetal mediante pinocitosis. Si el parásito está presente en la cavidad amniótica, también es posible su paso a través del líquido amniótico hasta el feto por deglución. De modo similar a lo que ocurre con los hospederos adultos, en los fetos pueden formarse quistes tisulares con bradizoítos, los cuales pueden mantenerse latentes pos-nacimiento (Martin-Hernández, 2003).

#### 1.6 Respuesta inmune

El éxito ante la infección de *T. gondii* implica un equilibrio entre la respuesta inmune del hospedador, que trata de controlar la replicación del parásito y la capacidad de este, para evadir o modular dicha respuesta, permitiendo su sobrevivencia en el hospedador (Buzoni-Gatel y Werts, 2006; Miller *et al.*, 2009; Cedillo-Peláez, 2015).

El reconocimiento inicial del parásito se lleva a cabo por los receptores de macrófagos y otras células de la respuesta inmune que expresen los receptores de tipo Toll 2 y 4 (TLR 2 y TLR 4), en respuesta al reconocimiento de los patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMP's), mediante la detección de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI); aunque los macrófagos no son las únicas células inmunes que pueden reconocer a T. gondii para inducir una respuesta, también las células dendríticas (CD) y otras células de la respuesta inmune capaces de interactuar con el parásito a través del receptor tipo Toll 11 (TLR 11) que detecta la profilina del parásito. Lo que ocurre posterior al reconocimiento de los MAMP's por los TLR's es la presentación de antígenos por las células dendríticas y los macrófagos, además de la producción de la citocina proinflamatoria, interleucina 12 (IL-12), induciendo una respuesta adaptativa mediada por linfocitos T CD4+ y CD8+, los cuales producen un perfil tipo Th1, estimulan a las células NK y favorecen la producción de interferón gamma (IFN-γ) el principal mediador de la respuesta inmune contra T. gondii, siendo crucial para la activación de células hematopoyéticas (CHem) y no hematopoyéticas (CNHem) que limitan la replicación del parásito. El IFN-y a través de su receptor de superficie para IFN-y (IFN-yR), activan al transductor de señalización 1 (STAT-1), un factor de transcripción que, en monocitos y macrófagos, controla la expresión de genes, induciendo la producción de óxido nítrico (NO-) y de especies reactivas de oxigeno (ROS), los cuales contribuyen al control intracelular de los parásitos (Buzoni-Gatel y Werts, 2006; Correa et al., 2007; Cedillo-Peláez, 2009; Miller et al., 2009; Hunter y Sibley, 2012).

Así mismo, en ambos tipos celulares (CHem y CNHem), el IFN- $\gamma$  induce la producción de dos familias de proteínas de defensa, dependientes de la proteína 5 de autofagia (ATG5), llamadas GTPasas relacionadas con la inmunidad (IRGs) y proteínas de unión con guanilato p67 (GBPs), las cuales son reclutadas hacia la vacuola parasitófora, favoreciendo la formación de vesículas y ruptura de la membrana, con subsecuente digestión y eliminación de los parásitos que se encuentren en el citoplasma. El IFN- $\gamma$  también puede alterar el metabolismo celular, el cual favorece la degradación de triptófano en fibroblastos, el consumo de hierro en enterocitos activa a las células efectoras incrementando la fagocitosis, la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) por las mismas NK y la citotoxicidad directa por linfocitos T CD8+. Así mismo, los macrófagos activados producen factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) que induce la apoptosis de las células infectadas (Buzoni-Gatel y Werts, 2006; Correa *et al.*, 2007; Matowicka-Karna *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2009; Hunter y Sibley, 2012).

En el caso de la toxoplasmosis congénita, la respuesta inmune es un evento que puede ocurrir durante la primera semana posterior a la infección materna. En esta etapa existe ausencia de memoria inmune fetal contra la infección por *T. gondii* por lo que los mecanismos de respuesta inmune innata maternos y fetales ocupan un papel central en el control y diseminación del parásito. La producción de IFN- $\gamma$  es indispensable en la respuesta inmune materna, para limitar la multiplicación del parásito. Sin embargo, deben existir mecanismos inmunes que regulen la expresión de IFN- $\gamma$ , ya que la producción excesiva durante la gestación puede generar condiciones patológicas que concluyen en muerte fetal debido a una respuesta inmune exacerbada. (Pfaff *et al.*, 2007).

#### 1.7 Gestación: establecimiento de la interfaz materno-fetal

El establecimiento de la gestación requiere una compleja comunicación entre células endometriales y trofoblásticas, dada a través del desarrollo y mantenimiento de la interfaz materno-fetal. La interacción entre los compartimientos maternoembrionario/fetales genera un microambiente local finamente regulado por hormonas esteroides, factores de crecimiento, mediadores lipídicos, moléculas de adhesión, componentes de matriz extracelular (MEC), y sus receptores; así como metaloproteinasas de matriz (MMP). Los eventos principalmente involucrados en el inicio del desarrollo de la interfaz materno-fetal en roedores y humanos son la implantación de los embriones y la decidualización del endometrio (Abrahamsohn y Zorn, 1993; Dey *et al.*, 2004; Cha *et al.*, 2012).

La implantación es el proceso mediante el cual, el embrión se adhiere a la superficie del endometrio; ocurre exclusivamente durante la "ventana de implantación", un período de tiempo en el que el endometrio es receptivo al embrión (Abrahamsohn y Zorn, 1993; Carson *et al.*, 2000). La receptividad endometrial está dada por las hormonas ováricas (estrógeno y progesterona), asociados con mediadores, como factores de transcripción y factores de crecimiento; para que la implantación tenga éxito, la receptividad endometrial debe coincidir con la etapa de desarrollo y activación del embrión (Dey *et al.*, 2004; Cha *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2003). La invasión del endometrio por las células del trofoblasto (CTB) y la transformación de los vasos sanguíneos deciduales promueven la formación de la placenta (Cross *et al.*, 2002; Georgiades *et al.*, 2002).

En el ratón, la implantación se lleva a cabo durante la noche del cuarto día de gestación (DDG), se considera el hallazgo del tapón vaginal como el día 1 de la gestación (Das *et al.*, 1994; Das *et al.*, 1995). Durante la etapa de aposición de la implantación se favorece una interacción cercana entre el embrión y el endometrio, las microvellosidades de la superficie de las CTB y las células epiteliales uterinas (CEU) se interdigitan, cerrando la luz uterina alrededor del embrión; posteriormente, en la etapa de adhesión, las microvellosidades de las CTB se pierden. La etapa de adhesión es seguida por la invasión de la lámina epitelial por las CTB. Durante este proceso, las CEU sufren apoptosis, desprendiéndose de la membrana basal, para ser fagocitadas por CTB (Bevilacqua y Abrahamsohn, 1988; 1989; Parr *et al.*, 1987). Después de la desaparición de la membrana basal alrededor del embrión

endometriales decidualizadas y con vasos sanguíneos endometriales ya modificados. El endometrio decidualizado propicia un ambiente controlado para la invasión de las CTB (Abrahamsohn y Zorn, 1993; Carson *et al.*, 2000; Das *et al.*, 1994).

Para el sexto DDG, el embrión de ratón está completamente incrustado dentro del endometrio. Desarrollando inicialmente una placenta coriovitelina, que eventualmente es reemplazada por una placenta corioalantoidea definitiva. La placenta coriovitelina está constituida por una red de CGT primarias, el saco vitelino, vasos vitelinos y células deciduales del estroma endometrial; su función es aproximar la circulación materna con la embrionaria y es la fuente principal de nutrición del embrión desde aproximadamente el día 6 hasta los DDG 10 u 11. En consecuencia, la organogénesis del ratón (8-13 DDG) ocurre en gran medida mientras el embrión se nutre de la placenta coriovitelina, lo que demuestra la importancia de esta placenta temprana para el desarrollo de los embriones de ratón. Alrededor del DDG 11 la placenta corioalantoidea definitiva (Figura 4) está suficientemente desarrollada (estructural y funcionalmente) para asumir la nutrición del embrión (Abrahamsohn, *et al.*, 1989; Bevilacqua y Abrahamsohn 1988; 1989; Cross, *et al.*, 2002; Georgiades *et al.*, 2002; Sutherland, 2003; Malassiné *et al.*, 2003).

#### 1.8 Características morfológicas de placenta de humanos y ratones

La clasificación del tipo de placentación se realiza con base en tres aspectos principales: a) origen vascular (la relación vascular entre la madre y el embrión/feto); b) anatómica-morfológica; y c) el histológica (número de barreras histológicas entre la sangre materna y la fetal). Según el origen vascular, al inicio de la gestación, los mamíferos presentan una placenta coriovitelina (la pared del saco vitelino se une con el corion); posteriormente, este tipo de placenta experimenta un proceso de involución dando lugar a la placenta corioalantoidea, que se constituye tardíamente y es la definitiva; estableciéndose con la fusión del alantoides con el corion (Rojas y Rodríguez, 1987). Según la clasificación anatómica-morfológica, los primates

(incluyendo a los humanos) y los roedores presentan placenta discoidal, en donde, las vellosidades coriales (corion frondoso) se distribuyen abarcando un área circular y polarizada. Por último, según la clasificación histológica, la placenta de humanos y ratones es hemocorial; siendo laberíntica en roedores (laberinto coriónico, unidas entre sí) y vellosa en humanos (las vellosidades no se unen "flotan" en la cámara hemática) (Rojas y Rodríguez, 1987; Furuya *et al.*, 2008; Roa, 2012).

En humanos como en ratones, una placenta normal a término se divide principalmente en tres capas: 1) la placa basal (superficie materna) y vellosidades de anclaje (extensiones distales de las vellosidades primarias) que interactúan directamente con el endometrio materno; 2) las unidades vellosas terminales (humanos) o laberinto coriónico (ratón), donde se lleva a cabo el intercambio de gas/nutrientes; y 3) la placa coriónica (superficie fetal) que consisten en tejido conectivo denso que contiene vasos fetales (Figura 5) (Furuya *et al.*, 2008).

El amnios y el corion inferior son membranas que cubren la placa coriónica, y el cordón umbilical recoge arterias y venas coriónicas en la placa coriónica, generalmente en la parte central (Kraus et al., 2004). La estructura fundamental de la placenta se establece durante la primera mitad de la gestación (Reynolds et al., 2005). En la placenta humana, la unidad de vellosidades terminales (vellosidades terciarias que provienen de vellosidades secundarias) está compuesta principalmente de capilares del lado fetal revestidos por células endoteliales (CEn), colágeno mesenquimal y sincitiotrofoblastos perfilados. En etapas más tempranas, los citotrofoblastos se encuentran debajo de los sincitiotrofoblastos. A medida que avanza el embarazo, la capa de citotrofoblastos se vuelve casi indetectable, y los capilares fetales se colocan muy cerca de la circulación intervellosa materna, probablemente con el propósito de un intercambio eficiente de gas/nutrientes (Lewis y Benirschke, 2012; Kraus et al., 2004). Es importante mencionar que el espacio sanguíneo está alineado directamente por sincitiotrofoblastos materno diferenciados terminalmente, no por CEn (interfaz hemocorial) (Rossant y Cross 2001; Kraus et al., 2004).

La arquitectura básica de la placenta del ratón es casi similar a la de los humanos, pero existen algunas diferencias a nivel microscópico (Figura 5). En el "laberinto", tanto las ramas coriónicas fetales como los sinusoides que llevan sangre materna son tortuosos y exhiben dimensiones similares. Las vellosidades romas no son detectables. Por lo tanto, es difícil distinguir el flujo sanguíneo microscópico del lado fetal del lado materno sin una ayuda de inmunohistoquímica. Entre la interfaz circulatoria fetal y materna, hay tres capas trofoblásticas (tricoriales); es decir, dos capas de sincitiotrofoblasto que rodean a las CEn del lado fetal y un solo trofoblasto mononuclear dirigido al seno de la sangre materna (Rossant y Cross 2001; Georgiades et al., 2002; Adamson et al., 2002; Furuya et al., 2008). El peso de los fetos aumenta casi dos veces durante la última etapa de la gestación, mientras que, el peso de las placentas no aumenta de forma significativa en etapas posteriores; sin embargo, las redes vasculares en las vellosidades terminales/laberinto se vuelven más diferenciadas y aumentan la capacidad funcional de los capilares del lado fetal, así como de los senos de la sangre materna (Cunningham, 2005; Reynolds et al., 2005; Furuya et al., 2008).

#### 1.9 Modelos murinos de toxoplasmosis congénita

Con el fin de estudiar la relación entre el tercio de gestación donde se lleva a cabo la infección materna, la tasa de transmisión fetal, así como el efecto de la invasión de *T. gondii* en la madre y en el feto; diversos grupos de trabajo han buscado desarrollar un modelo de infección que represente la cinética de infección observada y descrita en los seres humanos (Bresciani *et al.*, 2001).

Sin embargo, los mecanismos por los que *T. gondii* es capaz de infectar los tejidos maternos y diseminarse hasta el feto, esta poco esclarecido, y se pueden



Figura 4. Esquema y microfotografía de placenta de ratón. Sección de placenta, donde se observan los diferentes estratos que conforman el tejido. Tomado y modificado de Croy et al., 2014.

presentar variaciones en el estudio de este tema, debido a las diferencias anatómicas entre especies (Cuadro1), que han sido empleadas para estudiar dicha relación. Diversos modelos animales como ratón, rata, conejillo de indias y el conejo se han desarrollado para investigar diferentes aspectos de la toxoplasmosis congénita (Darcy y Zenner, 1993; Wong y Remington, 1994). Entre ellos, el ratón es el modelo adoptado con mayor frecuencia, debido a las similitudes histológicas con la placenta humana (Darcy y Zenner, 1993). Aunque la arquitectura de ambas placentas difiere en detalles, su estructura general y los mecanismos moleculares subyacentes a la placenta en desarrollo, son similares. La toxoplasmosis congénita en ratón se describió en 1950 (Cowen y Wolf, 1950). Posteriormente, diferentes cepas de ratón han sido ampliamente utilizadas como modelo para estudiar la toxoplasmosis congénita. El modelo murino (Mus musculus) de toxoplasmosis congénita, ha sido empleado para responder aspectos en la patogenia de la muerte fetal y el aborto, por ejemplo, se ha utilizado para analizar la influencia de la multiplicación parasitaria en la muerte fetal, aspectos de la respuesta inmune materna, la transmisión vertical y su control. Por otra parte, el modelo de ratón también se ha utilizado para probar la capacidad de los agentes quimioterapéuticos para limitar la transmisión vertical de *T. gondii* (Fux *et al.*, 2000). Dichos modelos han demostrado ser útiles para el estudio de la toxoplasmosis congénita. Las características del ratón como: el corto período de gestación, la disponibilidad de numerosos reactivos inmunológicos y la construcción de diferentes tipos de ratones transgénicos knock out, facilitan la experimentación con esta especie propiciando su utilidad para proporcionar información que mejore la comprensión de la patogenia de la toxoplasmosis congénita (Mévélec et al., 2005).

Estudios realizados en lauchas (*Calomys callosus*), por Ferro *et al.*, (2002), Barbosa *et al.*, (2007) y Franco *et al.*, (2011); un animal distribuido en el centro de Brasil, observaron que este roedor representa un modelo animal experimental adecuado para estudiar la dinámica de la toxoplasmosis congénita (Ferro *et al.*, 2002; Barbosa *et al.*, 2007; Franco *et al.*, 2011). En estos estudios lograron demostrar que *C. callosus* es susceptible a la infección de *T. gondii*; y en otra investigación realizada posteriormente, observaron que la transmisión vertical de *T. gondii*, se lleva a cabo únicamente en la fase aguda de la infección, pero no en animales crónicamente infectados. (Ferro *et al.*, 2002; Barbosa *et al.*, 2007; Franco *et al.*, 2011 y 2015).

Actualmente en el Laboratorio de Inmunología Experimental (LIE), se ha estudiado la transmisión vertical de *T. gondii* durante los tres tercios de gestación en ratonas BALB/c, observándose que a partir de la dosis de 5.0 millones de 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 (Dunn *et al.*, 1999; Vargas-Villavicencio *et al.*, 2016).

Por ahora se están evaluando los mismos parámetros en el primer y último tercio de la gestación. Sin embargo, aún no se ha realizado una comparación de las alteraciones entre los diferentes tercios, y no se han analizado otros aspectos anatomopatológicos importantes en la presentación de la infección congénita. Por lo tanto, es importante conocer estas observaciones, para proporcionar información que contribuya al mejor entendimiento de la enfermedad.



Figura 5. Comparación histológica de placentas de humano y ratón. Microfotografías de secciones de placentas de humano y de ratón, vista panorámica, apreciándose al lado derecho de cada sección el detalle de los diferentes estratos que las componen respectivamente. HE, panorámicas 100x y amplificaciones 400x. Tomado y modificado de Furuya et al., 2008

Género y especie	pecie Tercios de la gestación		o y especie Tercios de la Vía de Estadio inoculad gestación inoculación		Estadio inoculado	Tipo de cepa	Referencia	
	1	2	3					
Laucha (Calomys callosus)	+	-	-	VO	Quiste tisular	II	Favoreto <i>et al.,</i> 1998; Ferro <i>et al.,</i> 1999; 2002; Barbosa <i>et al.,</i> 2007; Costa <i>et al.,</i> 2009.	
Ratón ( <i>Mus</i> <i>musculus</i> )	+	+	+	VO, SC, IVa, IP	Quiste tisular, ooquiste, bradizoíto, taquizoíto	I, II	Roberts y Alexander, 1992; Fux <i>et al.</i> , 2000; Abou-Bacar <i>et al.</i> , 2004; Ge <i>et al.</i> , 2008; Cabañas-Cortes <i>et al.</i> , 2009 Wang <i>et al.</i> , 2011.	
Rata ( <i>Rattus</i> norvegicus, Rattus rattus)	+	+	-	VO, IP	Quiste tisular, taquizoíto	1, 11, 111	Remington <i>et al.</i> , 1958; Dubey <i>et al.</i> ,1997; Freyre <i>et al.</i> , 2006; 2008.	
Cobayo (Cavia porcellus)	+	+	+	VO, IP, SC	Quiste tisular, taquizoíto	I, II	Fiori <i>et al</i> ., 2002; 2003; Zenner <i>et al</i> 1999; Haumont <i>et al</i> ., 2000.	
Ovino ( <i>Ovis aries</i> )	+	+	-	VO	Ooquiste, taquizoíto	Ш	Buxton et al., 1982; 1986; 1989; 1993; Mévélec <i>et al</i> ., 2010.	
Canino (Canis lupus familiaris)	-	+	+	PO, SC	Taquizoíto, ooquiste	II	Bresciani <i>et al.</i> , 1999; 2001; 2009.	
Primates ( <i>Macaca mulatta</i> )	-	+	-	IV	Taquizoíto	I	Schoondermark-Van de Ven <i>et al.</i> , 1993	
Suino (Sus scrofa domesticus)	-	+	+	IV, VO	Ooquiste, quiste tisular, taquizoíto	I, II, III	Dubey y Urban, 1990; Jungersen <i>et al</i> ., 2001.	
Felino ( <i>Felis catus</i> )	-	-	+	VO	Quiste tisular	П	Powell y Lappin, 2001.	

Cuadro 1. Heterogeneidad de los modelos animales de toxoplasmosis congénita

VO- Vía oral; IP-Intraperitoneal; SC- Subcutáneo; IV- Intravenoso; IVa- Intravaginal Tomado y modificado de Vargas-Villavicencio *et al.*, 2016.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La seroprevalencia de la toxoplasmosis en México se encuentra alrededor del 43%, mientras que la frecuencia anual de toxoplasmosis congénita es de 2 recién nacidos en el valle de México por cada 1,000. Así mismo el 10% de los neonatos infectados congénitamente desarrollarán manifestaciones clínicas; además de presentar otras repercusiones permanentes en distintos órganos y sistemas; factores que pueden influir en su desarrollo.

En el estudio de la toxoplasmosis congénita, existen diferentes modelos animales que permiten el análisis de la interacción madre-feto-parásito; sin embargo, muchos de estos estudios carecen de información relacionada con el mantenimiento de la gestación, las alteraciones en placenta, frecuencia de transmisión o el daño fetal, y de las similitudes que se pudieran llegar a presentar o transpolar con lo descrito en humanos.

Son varios los factores que condicionan la toxoplasmosis congénita, tales como el tercio de la gestación donde ocurre la infección, la dosis infectiva y el genotipo del parásito. Se ha propuesto que la multiplicación parasitaria en la placenta puede generar un efecto nocivo en el desarrollo y preservación de la gestación, favoreciendo la presentación de reabsorciones, muerte fetal y aborto. Sin embargo, los mecanismos que la provocan aun no son comprendidos completamente. Por lo tanto, es importante conocer el mecanismo por el cual *T. gondii* afecta el desarrollo de la gestación y provoca alteraciones en los fetos.

Recientemente, en el Laboratorio de Inmunología Experimental (LIE) se generó un modelo murino de toxoplasmosis congénita, el cual permitió estudiar alteraciones morfológicas en placenta y fetos, reabsorciones, así como el porcentaje de transmisión congénita durante el segundo y tercer tercio de la gestación. El análisis morfológico se ha llevado a cabo de forma general, sin particularizar aspectos relevantes sobre distintas alteraciones y lesiones que se pudieran presentar, favoreciendo la disfunción placentaria y por ende su repercusión en los productos.
# **3. OBJETIVO GENERAL**

Describir y comparar las alteraciones anatomopatológicas causadas por la infección de *T. gondii* en unidades feto-placentarias, de ratonas infectadas durante los tres tercios de la gestación.

# 3.1 Objetivos particulares

- Describir las alteraciones celulares, tisulares y vasculares asociadas a la presencia de *T. gondii* en las unidades feto-placentarias de ratonas infectadas durante los tres tercios de la gestación.
- Comparar las alteraciones celulares, tisulares y vasculares en las unidades feto-placentarias de ratonas infectadas durante los tres tercios de la gestación.

# 4. HIPÓTESIS

# 4.1 Hipótesis nula

El grado de las alteraciones celulares, tisulares y vasculares en las unidades feto-placentarias de ratonas infectadas con *T. gondii* es similar en los tres tercios y está determinada por células de la respuesta inmune innata materna.

# 4.2 Hipótesis alterna

El grado de las alteraciones celulares, tisulares y vasculares en las unidades feto-placentarias de ratonas infectadas con *T. gondii* es dependiente del tercio de la gestación donde se llevó a cabo la transmisión vertical y está determinada por multiplicación de los parásitos en las unidades feto-placentarias.

# 5. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 5.1 Tipo de estudio

El trabajo de investigación fue de tipo retro-prolectivo, transversal, comparativo y descriptivo.

# 5.2 Estrategia general

El trabajo de investigación abarco dos etapas generales: la primera fue retrospectiva, con la revisión y clasificación del material de estudio; y la segunda prolectiva, completando el procesamiento de muestras faltantes, el análisis del material de estudio y la comparación entre los resultados observados en los diferentes grupos inoculados y los tercios de la gestación (Figura 5).



Figura 6. Estrategia general del trabajo de investigación.

#### 5.3 Etapa retrospectiva

#### 5.3.1 Revisión de registros y bitácoras

Las muestras por estudiar en el presente trabajo de investigación fueron seleccionadas del material biológico generado del proyecto de investigación "Efecto de las células asesinas naturales uterinas uNK en un modelo murino de toxoplasmosis congénita", con número de registro en el Instituto Nacional de Pediatría (INP) 065/2010. De dicho proyecto, se revisaron los registros de los experimentos realizados, seleccionándose aquellos donde se emplearon ratonas BALB/c, inoculadas por vía endovenosa (IV) con taquizoítos de la cepa Me49 de *T. gondii* a los días 7, 10 y 15 de la gestación. Los experimentos se dividían en un grupo testigo y cuatro grupos de infección (2.5, 5.0, 7.5 y 10.0 millones de taquizoítos), independientemente del tercio de la gestación; cada grupo estaba constituido por 3 a 5 ratonas en gestación, procesándose para histopatología de cada ratona: tejidos maternos (hígado y bazo) y de una a cuatro unidades fetoplacentarias (UFP) incluyendo útero, placenta y feto. El conjunto de los tejidos para cada caso, habían sido identificados con el año de procesamiento y el número consecutivo.

#### 5.3.2 Selección del material de estudio

De cada experimento seleccionado y contando con los números de identificación del total de tejidos procesados para cada grupo, se buscó el material de estudio en los archivos del LIE, incluyendo bloques de parafina, cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina (HE), ácido peryódico de Schiff (PAS) o de inmunohistoquímica (IHQ) para *T. gondii* o interleucinas (IL); así mismo, se consideró en la búsqueda y selección del material de estudio, los tejidos preservados en formalina amortiguada, por si era necesario repetir o incluir el procesamiento de alguna muestra. Aquellos experimentos que contaban con la totalidad del material antes mencionado se incluyeron en el presente trabajo de

investigación; se excluyeron aquellos experimentos donde no se contaba con los tejidos incluidos en parafina o bien, los tejidos que correspondían a ratonas infectadas en días diferentes al 7, 10 y 15 de la gestación, o que fueron inoculadas con una cepa de *T. gondii* diferente a la Me49; así como aquellas ratonas que no se encontraban gestantes.

#### 5.3.3 Clasificación del material de estudio y registro de datos

El material seleccionado, fue clasificado cronológicamente, posteriormente, de acuerdo con el tercio de la gestación en el que se llevó a cabo el experimento y finalmente con base en los grupos descritos, iniciando por el grupo testigo y posteriormente de menor a mayor dosis de inoculación. El material de estudio de cada experimento se clasificó tomando como base los cortes histológicos teñidos con HE, buscando y adjuntando los cortes de histoquímica e inmunohistoquímicas, registrando en bitácora electrónica la cantidad de laminillas que había en cada caso por cada número de identificación. Los bloques de parafina y tejido en formalina también fueron registrados electrónicamente.

Las laminillas fueron acomodadas en cajas de plástico, con base en el número de identificación, y se colocaron en el siguiente orden: HE, histoquímicas, IHQ para *T. gondii* y para interleucinas (Cuadro 5).

### 5.4 Etapa prolectiva

#### 5.4.1 Procesamiento de muestras para histoquímica

Con el fin de complementar el análisis histopatológico del material de estudio seleccionado, particularmente la placenta, se consideró llevar a cabo dos tinciones especiales.

La primera fue la tinción de PAS, con el fin de resaltar características particulares de una población celular a nivel de la decidua basal, que corresponde

a las células asesinas naturales uterinas (uNK), cuyos gránulos citoplasmáticos tiene afinidad tintorial por dicha tinción (Senegas *et al.*, 2009).

La segunda tinción realizada fue la de hematoxilina acida fosfotungstíca (PTAH), la cual se empleó con el objetivo de evidenciar la presencia de fibrina en trombos asociados a los vasos sanguíneos de las UFP. De los trombos se evaluó su aspecto (homogéneo o fibrilar), forma (redondos), tamaño (compacto o abundante), así como el grado de oclusión provocado en la luz de los vasos (total o parcial) dichos aspectos se evaluaron con la finalidad de sugerir si el evento que desencadeno la formación del trombo fue una lesión en el endotelio, o alteraciones en la hemodinamia, así mismo también brindan información sobre el transcurso de la formación de trombos, es decir, si fue un proceso agudo o crónico (McGavin y Zachary, 2007; Castaño, 2014).

El procedimiento para llevar a cabo ambas pruebas histoquímicas se describe con mayor detalle en el Anexo.

#### 5.4.2 Inmunohistoquímica para T. gondii

El procesamiento de las secciones histológicas para la técnica de IHQ se llevó a cabo según lo descrito por Aguilar-Orozco (2015). El procedimiento se describe se describe con mayor detalle en el Anexo.

#### 5.4.3 Evaluación histopatológica

Una vez que todos los grupos experimentales estuvieron completos y se contaba con los cortes histológicos de cada caso, las secciones histológicas se revisaron por dos observadores y por triplicado, revisando la totalidad de los tejidos de cada laminilla y describiendo los hallazgos microscópicos con base en lo referido por McGavin y Zachary (2007); Cedillo-Peláez (2009, 2015); Benavides *et al.*, (2011) y Castaño *et al.*, (2014), categorizando las alteraciones y lesiones presentes en cada caso.

Los cortes histológicos fueron revisados en un microscopio óptico convencional (Axiostar Plus Carl Zeiss) primeramente, en campo panorámico (5x) y posteriormente en campo seco débil (10x); para cada tejido, se revisó el total de la superficie, empezando en uno de sus extremos hasta alcanzar el otro lado. El detalle de las alteraciones celulares se llevó a cabo en campo seco fuerte (40x), describiendo los cambios celulares (degenerativos y muerte celular), vasculares e inflamatorios, considerando su grado y distribución (Cuadros 2-4). Así mismo, se consideró la presencia de estructuras compatibles con taquizoítos de *T. gondii* (cantidad y su distribución), confirmándose por IHQ para *T. gondii*.

Al ser las alteraciones celulares y vasculares variables cualitativas categóricas; se evaluaron en escala ordinal asignándole un valor numérico de acuerdo al grado y distribución de cada alteración evaluada. Los cambios observados para cada número de caso fueron registrados electrónicamente y se emitió un diagnóstico morfológico como resultado general de la interpretación.

Se obtuvieron imágenes representativas de las diferentes alteraciones y lesiones encontradas a partir de las lentes oculares, empleando una cámara digital Olympus (Stylus Tough 8000) y una cámara de teléfono inteligente (Samsung Galaxy J7 de 13 MP).

#### 5.4.4 Comparación de resultados: dosis infectante y tercio de gestación

Una vez capturados los datos, se determinó la media de cada alteración y se obtuvieron gráficas de columnas para cada dosis de los tres tercios de la gestación (Excel, Microsoft). Así mismo, se compararon las medias de la gravedad de las alteraciones celulares (degeneración y necrosis) y vasculares (congestión, hemorragia, trombos) entre la dosis de inoculación y los tercios de la gestación. Se comparó el grado de severidad de las alteraciones antes mencionadas, en los tejidos maternos (hígado y bazo) así como en las UFP (placentas, embriones/fetos). También se semicuantificó la presencia de taquizoítos de *T. gondii* (ausentes, escasos, abundantes), en tejidos maternos y UFP.

Alteración	Grado	Distribución
Degeneración Necrosis Infiltrado inflamatorio Presencia de taquizoítos Congestión Hemorragia	Sin alteraciones= 0 Incipiente= 0.5 Leve= 1 Leve a moderado= 2 Moderado= 3 Moderado a severo=4 Grave= 5	Sin alteraciones= 0 Focal= 1 Zonal= 2 Multifocal= 3 Multifocal coalescente= 4 Segmentaria= 5 Difusa= 6 Generalizada= 7

Cuadro 2. Grado y distribución de alteraciones microscópicas en tejidos maternos y UFP

# Cuadro 3. Grado y distribución de trombosis microscópica en UFP

Alteración	Grado	Distribución
Trombosis	Sin alteraciones= 0 Incipiente= 0.5 Leve= 1 Leve a moderado= 2 Moderado= 3 Moderado a severo=4 Grave= 5	Sin alteraciones= 0 Arteria uterina= 1 Membranas fetales= 2 Decidua basal= 3 Decidua parietal y capsular= 4 Laberinto coriónico= 5 Presencia en más de una región= 6

Cambio o alteración	Categorización		
Tipo de alteración celular	Sin alteración= 0, degeneración= 1, infiltrado inflamatorio= 2, necrosis= 3, alteración mixta= 4		
Alteraciones en células uNK	Sin alteración= 0, pérdida del citoplasma y disminución del tamaño= 1, gránulos con pérdida de afinidad tintorial (HE, PAS) = 2, gránulos con aumento de afinidad tintorial (PAS), degranulación= 4, alteración mixta= 5		
Infiltrado inflamatorio	Sin alteración= 0, neutrófilos= 1, histiocitos, macrófagos= 2, linfocitos= 3, células plasmáticas= 4, basófilos/mastocitos= 5, eosinófilos= 6, infiltrado mixto= 7		
Daño al endotelio	Sin alteración= 0, daño parcial= 1, daño total= 2		
Forma del trombo	Sin alteración= 0, homogéneo redondo, discreto= 1, homogéneo redondo, abundante= 2, fibrilar compacto= 3, fibrilar abundante= 4		
Recanalización del trombo	Sin alteración= 0, no recanalizado= 1, recanalizado= 2		
Estrato de la placenta mayormente afectado	Ninguno= 0, arteria uterina y MLAp=1, decidua basal= 2, zona de unión= 3, laberinto coriónico= 4, membranas fetales= 5, dos o más zonas= 6		

# Cuadro 4. Categorización de las alteraciones microscópicas

# 6.0 RESULTADOS

#### 6.1 Experimentos y muestras seleccionadas para el estudio

Los experimentos y las muestras seleccionadas para su análisis en el presente trabajo de investigación se describen en el Cuadro 5.

Material biológico	Tercios de la gestación / Cantidad de experimentos		
Material biologico	1ro / 2	2do / 3	3ro / 3
*Muestras conservadas en formol amortiguado al 10%	40	44	48
Secciones histológicas embebidas en parafina	40	63	63
Secciones histológicas teñidas con HE	48	72	84
IHQ para <i>T. gondii</i>	54	87	92
Histoquímica para PAS	28	36	42
Histoquímica para PTAH	28	36	42
Otras IHQ (INF-γ, TGF-β, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, CD19)	124	276	0

#### Cuadro 5. Material biológico seleccionado para el trabajo de investigación

\*Cantidad de tubos con número de identificación, conteniendo tejidos maternos y UFP en solución fijadora.

#### 6.2 Descripción microscópica de tejidos maternos y UFP

Los hallazgos microscópicos observados en los tejidos maternos y las UFP de cada uno de los tres tercios de la gestación se describen a continuación:

#### 6.2.1 Testigos: Tejidos maternos y UFP de ratonas de los de todos los tercios

La totalidad de los tejidos maternos y UFP de los grupos testigo; independientemente del tercio de la gestación en el que se inocularon; presentaron su morfología y arquitectura tisular convencional; sin alteraciones patológicas asociadas a la infección por *T. gondii* (Figura 7).



Figura 7. Secciones histológicas de tejidos maternos y UFP de ratonas de los grupos testigo. A) Sección de parénquima hepático, apreciándose la vena central y los cordones hepáticos con su morfología característica. B) Parénquima esplénico, se observan abundantes linfocitos maduros de un centro germinal. C) Sección de placenta, a nivel de la decidua basal, con presencia de diferentes componentes celulares incluyendo células uNK (círculo), trofoblastos, células estromales, entre otras. D) Sección de placenta a nivel de laberinto coriónico, se aprecian abundantes células del trofoblasto (flecha) cuyas proyecciones del citoplasma delimitan senos que conforman la red vascular ocupada por abundantes eritrocitos. A-D, HE; A y B, 120x; C, 400x y D, 550x.

En las placentas del grupo testigo, los estratos incluidos, el agregado linfocitario mesometrial de la gestación (MLAp), decidua basal (DB) y laberinto coriónico (LC), compuestos principalmente por células uNK, espongiotrofoblasto (ET), estroma, y células gigantes del trofoblasto (CGT), respectivamente; presentaron su morfología sin alteraciones. El miometrio se apreció disminuido de grosor, formando una capa delgada de músculo dispuesta de forma aleatoria; en todas las ratonas de estos grupos (independientemente del tercio de la gestación en el que se inocularon), se observaron cambios vasculares leves, incluyendo congestión multifocal, así como la presencia de material eosinofílico en la luz de los vasos sanguíneos de la decidua parietal (DP) y las membranas fetales (MF); este material podía apreciarse de dos formas; fibrilar en cúmulos semejando una madeja de hilo, o compacto y homogéneo (Figura 8).

Dependiendo del estadio de desarrollo y el tercio de gestación, las uNK presentaban morfología diversa incluyendo células de redondas a ovales, con escaso o abundante citoplasma, presencia de gránulos intracitoplasmáticos de moderada a abundante cantidad y con distinta afinidad tintorial, en algunas células los gránulos fueron de color intenso rojo y magenta, mientras que en otras se apreciaron rosas y morados menos intenso, en ambos casos los gránulos fueron refringentes. Los núcleos podían observarse redondos a ovales, centrales o desplazados a la periferia (Figura 7). Por debajo de la decidua basal, se observaron células de gran tamaño (de 4 a 6 veces más grandes que una célula uNK), fusiformes, con núcleo central, nucléolo evidente, relación núcleo citoplasma 1:2, citoplasma basófilo pálido, correspondientes a las células gigantes del trofoblasto (CGT), dispuestas en una capa única y continua.

En el siguiente estrato de la placenta, las células se observaron con morfología poliédrica a estrellada, las membranas citoplasmáticas presentaban proyecciones que se unían entre sí en algunos puntos, delimitando vasos sanguíneos de bajo calibre, estas células corresponden a los trofoblastos.



Figura 8. Secciones de placenta de ratonas del grupo testigo inoculadas en el primer tercio de la gestación. A) Laberinto coriónico, en la parte superior se observan células gigantes del trofoblasto (CGT, flecha) dispuestas una tras otra; por debajo de las CGT se encuentran los trofoblastos (CTB) formando el laberinto coriónico; en su luz se observan moderada cantidad de eritrocitos nucleados, que corresponden a eritrocitos fetales (\*\*). B) Sección de membranas fetales, dispuestas a lo largo del tejido, apreciándose entre ellas CGT (círculos), vasos sanguíneos con abundantes eritrocitos y presencia de material eosinofílico. C) Sección de membranas fetales, siendo evidente un vaso sanguíneo distendido por la presencia de moderada cantidad de material eosinofílico homogéneo (flecha) entremezclado con eritrocitos. D) Sección de decidua basal, observándose un vaso sanguíneo, que al interior presenta una estructura de material eosinofílico, oval de aspecto compacto y homogéneo (\*\*) ocluyendo de forma parcial el flujo de eritrocitos, el diámetro del vaso no se aprecia alterado; así mismo, el tejido adyacente no presenta cambios patológicos aparentes. A-D, HE; A, 320x; B y C, 400x; D, 550x.



Figura 9. UFP de ratona del grupo testigo inoculada en el primer tercio de la gestación. A) Vista panorámica de UFP, se muestra la decidua basal (DB), el laberinto coriónico (LC), y en la cavidad amniótica (CA) el embrión en desarrollo, la flecha señala el tubo neural. Distal a la cavidad amniótica se encuentra la decidua parietal (\*) rodeada por el miometrio (cabeza de flecha). B) Detalle de UFP descrita anteriormente, se observan las mismas estructuras con mayor aumento; por debajo de la decidua basal (DB) se disponen las células gigantes del trofoblasto (círculo), el laberinto coriónico (LC) y sus sinusoides, en cuyo interior se aprecian eritrocitos maternos (anucleados) y fetales (nucleados). Así mismo, en la decidua basal y en algunas zonas del laberinto coriónico se aprecian zonas de congestión incipiente (\*\*), algunos vasos sanguíneos están dilatados y con abundantes eritrocitos al interior. A y B, HE; A, 50x; B, 150x.

Los embriones del primer tercio de la gestación se observaron compactos, simétricos, celulares y fue posible apreciar el tubo neural (TN) (Figura 9). Así mismo, los embriones del segundo tercio también mostraron simetría, algunos órganos parenquimatosos en formación, observándose celulares y compactos dentro de las cavidades, también se apreciaron esbozos de los miembros torácicos (EMT) y el TN (Figura16). En los fetos del tercer tercio de la gestación, fue posible observar la totalidad de los órganos parenquimatosos y tubulares, así como la columna vertebral (CV), encéfalo (E), y miembros torácicos (MT) y pélvicos (MP) (Figura 25).

Aleatoriamente algunas de las ratonas, presentaron sitios de implantación ocupados por estructuras semi redondas compuestas por tejido propio de la placenta; el primer estrato ocupó aproximadamente el 80% del área total de la placenta y estuvo conformado en su mayoría por uNK cuya morfología era de redonda a oval con núcleo central, abundante citoplasma y gran cantidad de gránulos intracitoplasmáticos de color intenso rosado-magenta. Por debajo del estrato de uNK, se observaron células de gran tamaño (de 4 a 6 veces más grandes que una uNK), fusiformes, con núcleo central, relación núcleo citoplasma 1:2, citoplasma basófilo pálido, correspondientes a las células gigantes del trofoblasto (CGT), la mayoría de estas células presentó cambios degenerativos y en menor porcentaje necrosis.

En el siguiente estrato se apreció un esbozo del laberinto coriónico (LC) compuesto por escasas células del trofoblasto (CTB) formando redes vasculares incipientes con apariencia laxa y generalmente congestionadas. La cavidad amniótica (CA) presentó al interior, material eosinofílico de apariencia proteínacea y/o abundantes eritrocitos, intercalado en este material, se observaron neutrófilos, linfocitos, restos nucleares y citoplasmáticos de células CGT y CTB (Figura 10).



**Figura 10. Reabsorción embrionaria de ratona del grupo testigo inoculada en el primer tercio de la gestación.** A) Vista panorámica de UFP, se muestran las diferentes zonas que la conforman, observándose la decidua basal (DB) que ocupa el 80% del total de la placenta y presenta zonas con congestión moderada (cabezas de flecha), el triángulo metrial (círculo), el laberinto coriónico es poco evidente; la cavidad amniótica (CA) está ocupada por un cúmulo de células del trofoblasto (CTB, flecha), rodeado por abundantes eritrocitos intercalados con células de gran tamaño y núcleo central que corresponden a células gigantes del trofoblasto (CGT, \*), delimitados por la decidua parietal (DP) y más externamente el miometrio (M). B) Sección de decidua basal en la zona del triángulo metrial, se aprecian células de gran tamaño, redondas a ovales con abundante citoplasma vacuolado, núcleo central y nucléolo evidente que corresponden a células asesinas naturales uterinas (uNK, cabeza de flecha), entremezcladas con las uNK se observan otras células con núcleo redondo de cara abierta y de menor tamaño, el contorno celular es poco evidente; adyacente a estas células se observa un zona con congestión y hemorragia leve, entre los eritrocitos se puede observar un material eosinofílico y otras estructuras pequeñas, redondas e hipercromáticas sugerentes de cuerpos apoptóticos. C) Detalle de CA, se observa un cúmulo de trofoblasto (punta de flecha), rodeado por CGT (\*) y abundantes eritrocitos, algunas de estas células percentan cambios degenerativos como contracción, fragmentación y perdida nuclear. A-C, HE; A, 50x; B, 450x; C, 150x.

# 6.2.2 Tejidos maternos y UFP de ratonas inoculadas con taquizoítos de *T. gondii* en el 1<sup>er</sup> tercio de la gestación

Las alteraciones observadas en los órganos, fueron similares entre si, variando en grado y distribución, siendo los principales hallazgos microscópicos los siguientes: En todas las secciones de hígado evaluadas se aprecio degeneración hidrópica y grasa, en grado leve y con distribución generalizada. Por otra parte, se apreciaron focos de infiltrado de células inflamatorias, los cuales fueron variables en su composición dependiendo de la dosis de inoculación; presentándose en mayor cantidad neutrófilos y linfocitos en los tejidos de ratonas inoculadas con la dosis de 2.5 millones, dispuestos en agregados discretos a leves multifocales; mientras que con la dosis más alta (7.5 millones), predominó el infiltrado linfocitario de moderado a severo, con distribución multifocal; así mismo, en aproximadamente la mitad de los casos, se observaron macrófagos en leve a moderada cantidad, entremezclados con el infiltrado linfoide.

Se observaron focos necróticos de leves a moderados en las dosis de 2.5 y 5.0 millones, mientras que en la dosis de 7.5 fueron de moderados a severos, con distribución multifocal. En la dosis de 7.5 millones, asociado a las zonas de necrosis se observó la presencia de estructuras parasitarias de morfología redonda, oval o piriforme, con núcleo basofílico y escaso citoplasma eosinofílico, compatibles con taquizoítos de T. gondii; aleatoriamente, los taquizoítos se distribuían intra y perilesionales, libres o en replicación (conjunto de taquizoítos agrupados en vacuolas parasitóforas, similares a un racimo de uvas o dispuestos en rosetas) (Figura 11).

En las secciones de bazo se apreció pérdida de población linfoide, en grado variable y dependiente de la dosis inoculada, siendo de leve (2.5 millones) a moderada-severa (5.0 y 7.5 millones) con desarreglo de los centros germinales. Así mismo se apreció infiltrado de células inflamatorias no propias del tejido, compuesto por neutrófilos e histiocitos, de grado leve en dosis bajas, a moderado-severo en dosis altas, distribuido multifocalmente y en la periferia de los centros germinales.



**Figura 11. Tejidos maternos positivos a la infección de** *T. gondii.* 1 A) Sección de parénquima hepático, se aprecian estructuras redondas a ovales agrupadas en el citoplasma de algunos hepatocitos (circulo) correspondientes a taquizoítos de *T. gondii.* 1 B) Sección de hígado con presencia de taquizoítos, se aprecian estructuras inmunopositivas de talla y morfología de *T. gondii* dentro de los hepatocitos y en el intersticio. 2) Tejido hepático con de infiltrado inflamatorio focal compuesto por dos tipos celulares. Las células más abundantes son ovales, con el núcleo desplazado a la periferia y el citoplasma con apariencia espumosa, corresponden a macrófagos (punta de flecha). Las células ménos abundantes son redondas a ovales con abundante núcleo hipercromático y escaso citoplasma, entre estas células hay otras células más grandes de forma oval con citoplasma espumoso, así mismo, se observan abundantes estructuras basófilicas redondas a ovales agrupadas, correspondientes a taquizoítos de *T. gondii* (circulo). 3 B) IHQ para *T. gondii*, se aprecian estructuras de talla y morfología similar a la de los taquizoítos de *T. gondii* con marca ocre inmunopositiva. 4) Sección de bazo, se aprecia pérdida de la población de linfoide, observándose el estroma basófilico (\*\*) y algunas células con núcleo grande y redondo. 1 A, 2, 3 A, 4, HE; 450x; 1 B y 3 B, IHQ para *T. gondii*, 450x.

De forma similar al hígado, se apreciaron focos de necrosis de leves a severos multifocales, con presencia de taquizoítos intra y perilesionales, libres y en replicación. En algunos de los bazos se encontraron alteraciones vasculares, incluyendo congestión y hemorragia de leve a severa con distribuciónmultifocal o generalizada (Figura 11). En las placentas de las ratonas inoculadas con las dosis menores se observaron cambios vasculares de leves a moderados; algunos presentaron diferente grado de distención de la pared vascular, debido a la acumulación de eritrocitos en los vasos sanguíneos, observándose la pérdida de la forma redonda y la presencia de abundantes eritrocitos en la luz, así como adelgazamiento de la pared vascular, correspondiendo a congestión. Este cambio se presentó con mayor frecuencia en los vasos sanguíneos de la decidua parietal y las membranas fetales.

En las placentas de las ratonas inoculadas con las dosis de 2.5 millones se observó la presencia de trombos discretos que ocasionalmente comprometían la integridad del tejido adyacente, así mismo, también se apreciaron hemorragias de leves a moderadas entre las membranas fetales y la mucosa uterina, y entre la decidua parietal y las membranas fetales. Las hemorragias eran más graves a medida que la dosis inoculada aumentó, algunas veces estas hemorragias podían estar asociadas a trombos que se disponía de forma oval o redonda semejando una madeja de hilo, entre los eritrocitos. En contraste, las placentas de las ratonas inoculadas con 5.0 y 7.5 millones de taquizoítos, presentaron trombos de mayor tamaño, afectando dos o más zonas, como la decidua basal, la decidua parietal y las membranas fetales; los trombos podían ocluir la luz vascular de manera parcial o total, en los casos en los que la oclusión era total, el tejido adyacente presentó degeneración celular, evidenciándose como pérdida de la afinidad tintorial, las células se observaron pálidas y aumentadas de tamaño. Los núcleos algunas veces se apreciaron contraídos e hipercromáticos. En las placentas de las ratonas inoculadas con la dosis de 7.5 millones de taquizoítos, los trombos fueron de mayor tamaño, y la mayoría de las veces ocluían de forma total la luz vascular, provocando



Figura 12. UFP de ratonas inoculadas con diferentes dosis de taquizoítos de *T. gondii* en el segundo tercio de la gestación. A) UFP de ratona del grupo testigo, se observan la decidua basal (DB), el laberinto coriónico (LC), observa su morfología normal, el embrión (E), dentro de la cavidad amniótica (CA), delimitada por la decidua parietal (DP) y el miometrio (M). La placenta se observa celular y compacta, el E se observa celular, simétrico y compacto; se observan además esbozos de miembros y órganos. B) UFP de ratona inoculada con 2.5 millones de taquizoítos, la DB se aprecia levemente congestionada, el LC es incipiente, en comparación con el del testigo; el E se observa de menor tamaño comparado con el testigo, poco celular, disgregado; el tubo neural se observa sinuoso. El grosor de la DP está aumentado al igual que el miometrio. C y D) UFP de ratonas inoculadas con 5.0 millones de taquizoítos, (C) la DB y el LC presentan congestión de ligera a moderada, el E ha perdido su arquitectura, morfología, además de severamente disgregado; la DP presentó congestión y hemorragia, el M estaba engrosado y pálido. (D) En la DB se observó un cumulo de eritrocitos delimitado por el LC, el E presentó disgregación tisular y asimetría, así mismo el tubo neural se observó sinuoso y asimétrico; la DP presento congestión y hemorragia moderada (\*\*). F) Reabsorción embrionaria de ratona del grupo testigo en el primer tercio de la gestación, la DB ocupa casi la totalidad de la placenta, el LC es incipiente y la CA está ocupada por una abundante cantidad de células y eritrocitos. A-F, HE; 15x.



Figura 13. UFP con reabsorción fetal de ratona inoculada con 5.0 millones de taquizoítos de *T. gondii* en el primer tercio de la gestación. A) Vista panorámica, se observa la decidua basal (DB); por debajo de esta se observa un cúmulo abundante de eritrocitos (flecha) delimitado por CGT (\*\*) y CTB, estas últimas delimitan el laberinto coriónico (LC) que se aprecia laxo e incipiente. La cavidad amniótica (CA) está ocupada por el embrión (E), observándose con apariencia laxa, poco compacto y celular, el tubo neural (TN) se aprecia sinuoso y poco celular (círculo). Los vasos sanguíneos que rodean las membranas fetales, presentan congestión y hemorragia moderadas (flecha), y las células de la decidua parietal (DP) que están más próximas al miometrio (M) presentan una coloración eosinofílica. Rodeando la CA se observa el miometrio (M). B). Área con hemorragia (flecha) entre las membranas fetales, adyacente a la zona con alteraciones vasculares, se observan abundantes células con diferente grado de degeneración y necrosis; apreciándose los nucleos contraídos e hipercromáticos, así como cuerpos apoptóticos (\*\*). C) Acercamiento del tubo neural del embrión, se observa que el tejido es laxo, poco celular y compacto; así mismo, se observa sinuoso y poco celular. A-C) HE; A, 50x; B y C, 450x.



Figura 14. Secciones histológicas de UFP de ratonas inoculadas con diferentes dosis de T. gondii en el primer tercio de la gestación. A) Decidua basal, se observan abundantes células con citoplasma eosinofílico, núcleos contraídos e hipercromáticos, algunas otras células perdieron sus núcleos y solo se observa el contorno celular. correspondiendo a trofoblastos (círculo). Entre estas células se observa una moderada cantidad de eritrocitos (\*\*). B) Zona de transición entre laberinto coriónico y decidua basal, se observa zona con congestión moderada (\*\*) y entre estas hay células con cambios degenerativos observándose con el citoplasma ligeramente eosinofílico (círculo). Entre las zonas congestionadas y las células gigantes del trofoblasto, se observan vasos sanguíneos con eritrocitos y otras estructuras redondas a ovales hipercromáticas; adyacente al vaso sanguíneo se aprecia un material eosinofílico de apariencia fibrilar (flecha). C) Decidua basal, se observan abundantes restos nucleares (círculo) entre células de mediano tamaño, ovales con núcleo y citoplasmas pálidos, en algunas aún se observa la silueta nuclear correspondiendo a CGT con cambios degenerativos y necróticos. D) Células gigantes del trofoblasto, se observan los núcleos con la cromatina plegada a periferia, con escaso citoplasma y entre los restos celulares hay una moderada cantidad de eritrocitos (flechas). A y B) Ratonas inoculadas con 5.0 millones de taquizoítos. C) y D) Ratonas inoculadas con 7.5 millones. A-E, HE; A, 450x; B-D, 500x. 45

degeneración y necrosis por isquemia en los tejidos adyacentes (decidua basal y/o trofoblastos (Figuras 12 y 13). La mayoría de las veces, los trombos se encontraron en la DB, y la DP, observándose el tejido adyacente como un material eosinofílico homogéneo, con restos nucleares intercalados, los contornos celulares eran evidentes, con pérdida de los núcleos. La necrosis fue zonal moderada cuando afectaba solo un área de la decidua basal, o segmentaria severa cuando los trombos ocluyeron vasos sanguíneos de mayor calibre o se distribuyeron a lo largo de la DB.

En las DB de las placentas que presentaron alteraciones vasculares, las uNK, presentaron cambios en su morfología, observándose redondas a ovales, con abundante citoplasma, mayormente vacuolado, con núcleo central y escasos gránulos intracitoplasmáticos rosas y morados pálidos. Por debajo de la decidua se observaron las células gigantes del trofoblasto, formando una capa lineal y continua. Si se encontraban periféricas a una zona con trombosis, se observaron con cambios degenerativos, como lo son, núcleos y citoplasmas pálidos, aumento de tamaño, entre otros.

El laberinto coriónico, se apreció delgado, poco ramificado, ocupando menos de un tercio de la placenta y con pocos eritrocitos nucleados (fetales) al interior. Por otro lado, los fetos de ratonas inoculados con las dosis de 2.5 y 5.0 millones de taquizoítos, se observaron menos compactados y celulares que los del grupo testigo, así mismo; se observó el tubo neural dilatado en algunos embriones; algunos de los embriones provenientes de ratonas inoculadas con 7.5 millones de taquizoítos y con alteraciones vasculares segmentarias severas presentaron degeneración generalizada, caracterizada por fetos de talla menor a la de los testigos, escasamente celulares, de apariencia laxa, con disgregación tisular severa.

Se observó mayor cantidad de reabsorciones embrionarias, comparado con los controles. La mayoría de las reabsorciones presentaron una morfología diferente a la observada en las reabsorciones de los grupos testigo. La decidua parietal, se observó aumentada de grosor, y era posible observar (desde el endometrio hasta la cavidad amniótica) una capa de tejido en degeneración, apreciándose algunos contornos celulares y núcleos contraídos, seguida de una zona con moderados a abundantes eritrocitos células gigantes del trofoblasto con degeneración y necrosis; esta última capa de tejido, al igual que las membranas fetales presentaron disgregación tisular. La cavidad amniótica, generalmente se encontró ocupada por eritrocitos y restos celulares entre un material proteínaceo. Las reabsorciones de las ratonas inoculadas con 2.5 y 5.0 millones presentaron hemorragias moderadas en las deciduas basal y parietal, y otras más discretas entre las membranas fetales, acompañadas de trombos, el tejido adyacente a las alteraciones vasculares, la decidua basal (DB) aún conservaba su arquitectura tisular y fue posible observar las uNK, redondas, grandes, con abundante citoplasma vacuolado y moderada cantidad de gránulos intracitoplasmáticos rosados y rojos, núcleo central, pálido; en contraste con las reabsorciones encontradas en las ratonas inoculadas con 7.5 millones, que presentaron hemorragias severas en DB, DP, así como entre las MF y la DP. El tejido adyacente a las alteraciones vasculares presentó generación, necrosis y en la cavidad amniótica abundantes eritrocitos acompañados de células CGT con cambios degenerativos y necróticos (Figura 14).

# 6.2.3 Tejidos maternos y UFP de ratonas inoculadas con taquizoítos de *T. gondii* en el 2do tercio de la gestación

En todas las secciones de hígado se aprecio degeneración hidrópica y grasa leve generalizada. Así mismo, se apreciaron focos de infiltrado inflamatorio, variando su composición según la dosis inoculada; se observó una mayor cantidad de linfocitos y neutrófilos en las dosis de 2.5 millones de taquizoítos, dispuestos en agregados multifocales incipientes a leves; las dosis de 5.0 y 7.5 millones, presentaron mayormente infiltrado linfocitario moderado multifocal a severo multifocal, en las ratonas inoculadas con la mayor dosis (10.0 millones); así mismo, en la mitad de los casos, se observaron macrófagos en moderada cantidad, entremezclados con el infiltrado linfoide. La necrosis observada en estos tejidos fue



Figura 15. UFP con reabsorción embrionaria de ratona inoculada con 7.5 millones de taquizoítos de *T. gondii* en el primer tercio de la gestación. A) Vista panorámica, se observa la decidua basal (DB) con congestión moderada (\*\*); por debajo de esta se observan secciones de tejido pálido y menos celular. La cavidad amniótica (CA) se encuentra ocupada por una abundante cantidad de eritrocitos, delimitados por una capa gruesa de tejido aparentemente más celular que la DB. Los vasos sanguíneos que rodean las membranas fetales, presentan congestión y hemorragias moderadas. B) Ampliación de la DB con abundantes células uNK (círculo) que se aprecian eosinofílicas, sin gránulos intracitoplasmáticos, núcleo arriñonado y desplazado a la periferia, así mismo se observan contraídas dejando un halo alrededor de ellas. C) Ampliación de CA, se aprecian abundantes restos nucleares (flechas) entremezclados con eritrocitos (\*\*). A-C, HE; A, 50x; B, 450x; C, 500x.

dependiente de la dosis inoculada. En las dosis bajas (2.5 y 5.0 millones) se observaron focos necróticos de leves a moderados, mientras que en las dosis de 7.5 y 10.0 millones, estos fueron de moderados a severos, con distribución multifocal. En las dosis de 5.0 a 10.0 millones, asociado a las zonas de necrosis se observó la presencia de taquizoítos de *T. gondii*; que estaban distribuidos en la periferia o al interior de las lesiones. Los taquizoítos podían estar libres o en replicación (conjunto de taquizoitos agrupados en vacuolas parasitóforas, similares a un racimo de uvas o dispuestos en rosetas) (Figura 11) en vacuolas parasitóforas, similares no de uvas o dispuestos en rosetas) (Figura 11).

El bazo presentó pérdida de la población linfoide, leve en los individuos inoculados con las dosis bajas (2.5 y 5.0 millones) y de moderada a severa en las dosis altas (7.5 y 10.0 millones) además también se apreciarón zonas de hemorragia leve con cambios congestivos de leves a moderados. En los bazos de las ratonas inoculadas con 7.5 y 10.0 millones de taquizoítos, la pérdida de la población linfoide fue severa, dejando los centros germinales con escasos linfocitos rodeados por zonas de necrosis y abundantes taquizoítos libres y dentro de vacuolas parasitóforas replicándose (Figura 11).

Las placentas del grupo inoculado con las dosis de 2.5 millones, presentaron focos incipientes de infiltrado inflamatorio conformado por linfocitos y en menor número por neutrófilos, conforme la dosis de inoculación aumentó (7.5 y 10.0 millones), el infiltrado inflamatorio también se modificó, observándose mayor cantidad de neutrófilos (Figura 16). Así mismo, se observaron alteraciones vasculares; las arterias espirales (AE) en la DB presentaron dilatación de la luz, adelgazamiento de la pared vascular, el endotelio perdió su morfología convencional de núcleos planos y alargados, observándose de forma cubica, además, también se pudo observar la presencia de material eosinofílico fibrilar que formaba estructuras de redondas a ovales, de diferentes tamaños, que podían o no ocupar la totalidad de la luz de los vasos sanguíneos, compatibles con trombos de fibrina. Algunos otros vasos sanguíneos se encontraron congestionados, al igual



Figura 16. Secciones histológicas de DB de ratonas inoculadas con diferentes dosis de taquizoítos de *T. gondii* en el segundo tercio de la gestación. A) Se observan células con abundante citoplasma, vacuolado que corresponden a uNK, en el centro un vaso sanguíneo y adyacente a este un foco de infiltrado compuesto por neutrófilos (flecha). B) Pavimentación de vaso sanguíneo por neutrófilos (flechas), el vaso sanguíneo se encuentra rodeado por células uNK. C) Arteria espiral, se observa la capa muscular que la compone (\*), asi como una uNK en la luz (flecha). Las uNK en esta sección de DB presentaron una mayor cantidad de gránulos intracitoplasmáticos de color fucsia. D) Aparente transmigración de uNK a través de dos arterias espirales; en esta sección de DB las uNK presentaron gránulos intracitoplasmáticos con apariencia granular, no se logra observar la forma de los gránulos, además de que las células parecen contraídas, dejando un halo alrededor de ellas (punta de flecha). E) Histoquímica de PAS, se observan las diversas morfologías de las uNK y de sus gránulos intracitoplasmáticos, así como abundante citoplasma y gránulos de menor tamaño y de color menos intenso (\*\*). F) Arterias espirales con abundante capa muscular (\*) y alrededor de las AE, se observan uNK con abundante citoplasma, núcleo central y abundantes gránulos fucsia intenso. A-D y F, HE; E, PAS; A-F, 550x. A y B) Ratonas inoculadas con 2.5 millones; D-F) Ratonas inoculadas con 7.5 millones.



**Figura 17. UFP de ratonas inoculadas con diferentes dosis de taquizoítos de** *T. gondii* en el segundo tercio de la gestación. 1) Sección de UFP, se observa la decidua basal (DB), con vasos sanguíneos dilatados con moderada cantidad de eritrocitos (\*\*) y con un material eosinofílico (flecha) al interior. Por debajo se observan células de gran tamaño y núcleo evidente, que corresponden a las células gigantes del trofoblasto (punta de flecha); por debajo se aprecia el laberinto coriónico (LC) conformado por células del trofoblasto formando los sinusoides y en su interior se observan eritrocitos maternos (anucleados) y fetales (nucleados). 2A) Sección de embrión rodeado por membranas fetales. Entre las membranas fetales se observa un vaso sanguíneo congestionado (flecha) y en otro vaso sanguíneo se aprecia al interior un material eosinofílico de apariencia fibrilar (flecha); y por debajo de estas estructuras se aprecia una sección de tubo neural (circulo), disgregado y poco celular. 2B y 2C) Ampliación de los vasos sanguíneos que se observan entre las membranas fetales de 2A). 3 A) Sección de laberinto coriónico, se observan las células del trofoblasto y en el citoplasma de una de ellas, se aprecia un cúmulo de estructuras pequeñas redondas a ovales que corresponden a taquizoítos de *Toxoplasma gondii.* 4 A) Zona de placenta con congestión severa (punta de flecha), por debajo se aprecia una sección de embrión a nivel del tubo neural (circulo), observándose poco celular y asimétrico; también se aprecia nórganos en formación congestionados (\*\*). 1 A-4 A, HE; 1 A, 100x; 2 A, 200x; 2 B y 2 C, 350x; 3 A, 450x; 4 A, 200x. 1 A) UFP de ratona inoculada con 5.0 millones. 3 A y 4 A) Embriones de ratona inoculada con 7.5 millones.



Figura 18. UFP de ratona inoculada con 2.5 millones de taquizoítos de *T. gondii* en el segundo tercio de la gestación. A) Vista panorámica, se observa el miometrio (M), el agregado linfoide mesometrial de la gestación (MLAp), la decidua basal (DB) con algunas zonas con congestión moderada (\*\*), adyacente a la congestión, se observan zonas pálidas, con menos celularidad (círculos). Por debajo de la DB se observa el laberinto coriónico (LC) que también esta congestionado (\*\*). B) Acercamiento de DB en las zonas adyacentes a la congestión, se aprecian células con citoplasma pálido y núcleo contraído e hipercromático, y entre estas células un cúmulo de estructuras basófilicas redondas a ovales que corresponden a taquizoítos de *T. gondii*. A y B, HE; A, 50x, B) 450x.

que el espacio entre las membranas fetales La distribución y la gravedad de la congestión, aumentó con la dosis inoculada; siendo leve en las ratonas inoculadas con 2.5 millones de taquizoítos, localizándose en decidua basal y membranas fetales; en las dosis de 5.0 y 7.5 millones, la congestión se observó en la decidua parietal, además de la decidua basal y las membranas fetales, así mismo podía estar acompañada de trombos (Figura 17).

El tejido adyacente a los cambios vasculares generalmente se observó alterado; si la congestión y los trombos estaban localizados en la DB, las CGT se observaron con el núcleo contraído y el citoplasma pálido; así mismo las células uNK se observaron contraídas, con el citoplasma ligeramente eosinofílico, con escasos o sin gránulos intracitoplasmáticos; el citoplasma presentaba aspecto granular grueso y con un halo alrededor de ellas, sugerente de contracción celular, el núcleo era poco aparente, desplazado a la periferia y con forma de alubia (Figura 16).

Las placentas del grupo inoculado con la dosis de 10.0 millones presentaron taquizoítos dentro de focos necróticos, predominantemente en las zonas del laberinto coriónico (LC), y también en la interfaz decidual (Figuras 18 y 19).

La distribución y la gravedad de los trombos fue dependiente de la cantidad de taquizoítos inoculados, en las dosis de 2.5 y 5.0 millones, la trombosis fue de leve a moderada, afectando principalmente la zona de la decidua basal y en menor medida el espacio entre las membranas fetales, en algunas placentas intercalado en el material fibrilar se observaron neutrófilos (Figura 18). En las placentas de las ratonas inoculadas con 7.5 y 10.0 millones de taquizoítos, los trombos fueron de mayor tamaño, distribuyéndose a lo largo de los vasos sanguíneos; en la mayoría de las placentas que presentaron trombosis severa el tejido adyacente presentó cambios degenerativos y necrosis por isquemia.

Las lesiones fetales fueron de dos tipos: focos necróticos discretos y disgregación general del tejido. Ejemplos de estos tipos se muestran en el corazón, médula espinal y tubo neural (Figuras. 20 y 21). En la mayor parte de fetos, no fue



Figura 19. UFP de ratonas inoculadas con diferentes dosis de taquizoítos de *T. gondii* en el segundo tercio de la gestación. 1A) Sección de laberinto coriónico con congestión y hemorragia severas (\*\*), se observa un segmento del mismo, compuesto por células del trofoblasto con necrosis (flecha). 1B) Ampliación de 1A), apreciándose los trofoblastos con los núcleos contraídos y el citoplasma eosinofílico (flecha) rodeados por abundantes eritrocitos. 2A) Arteria espiral con dilatación moderada y abundantes eritrocitos, entre ellos se aprecia un material eosinofílico fibrilar con restos celulares intercalados. 3 A) Sección de laberinto coriónico, con cambios degenerativos y necróticos. Se observan las células del trofoblasto con el citoplasma pálido, vacuolado, así mismo se observa un conjunto de estructuras pequeñas redondas a ovales semejando una roseta (círculo) que corresponden a taquizoítos de *T. gondii*. 3 B) IHQ positiva para *T. gondii*. 4 A) Laberinto coriónico, los trofoblastos presentan el citoplasma pálido; los núcleos hipercromáticos y contraídos (flecha), no se aprecia el contorno celular y el tejido tiene apariencia disgregada, entre los sinusoides formados por los trofoblastos se observa neritrocitos. 1 A-3 A y 4 A, HE; 1 A, 100x; 1 B, 200x; 2 A, 150x; 3 A y 3 B, 450x; 4 A, 350x. 1 A y 1 B) UFP de ratona inoculada con 7.5 millones de taquizoítos. 2 A) UFP de ratona inoculada con 5.0 millones. 3 A, 3 B y 4 A) UFP de ratona inoculadas con 10.0 millones.



**Figura 20.** Secciones histológicas de embriones de ratonas inoculadas con diferentes dosis de taquizoítos de *T. gondii* en el segundo tercio de la gestación. 1 A) Embrión de ratona del grupo testigo. Se observa el tubo neural (círculos); esbozo de miembros torácicos (EMT), así como algunos órganos parenquimatosos en formación (flecha). 2A-2C) Tubo neural de embriones cuyas madres fueron inoculadas con diferentes dosis. 2 A) El tejido se observa simétrico, con abundante celularidad y compactación (\*). 2 B) El tejido que conforma el tubo neural, se aprecia disgregado y menos celular con respecto al testigo (\*). 2 C) El tubo neural se aprecia con disgregación severa y sin cerrarse (\*). 3A y 3B) Órganos parenquimatosos de embrión proveniente de ratona del grupo testigo 3 A); 3B) de ratona inoculada con 5.0 millones de taquizoítos. 3 A) El tejido se observa compacto y celular (círculo). 3 B) El tejido se observa menos celular (circulo) y con áreas con congestión leve (punta de flecha). 4 A) Sección histológica de órgano parenquimatoso de embrión cuya madre pertenece al grupo inoculado con 5.0 millones de taquizoítos. Se observa una moderada cantidad células de redondas a ovales, de escaso citoplasma, con núcleo hipercomático, correspondiendo a infiltrado inflamatorio (círculo). 1 A-4 A, HE; 1 A 50x; 2 A-2 C, 150x; 3 A y 3 B, 250x; 4 A, 400x. 2 A) Embrión de ratona del grupo testigo. 2 B) Tubo neural de embrión proveniente de ratona del grupo inoculado con 5.0 millones de taquizoítos. 2 C) Embrión de ratona inoculada con 10.0 millones de taquizoítos.



Figura 21. UFP de ratonas inoculadas con diferentes dosis de taquizoítos de *T. gondii* en el segundo tercio de la gestación. A) UFP de ratona del grupo testigo, se observan diferentes estructuras, como la decidua basal (DB), el embrión (E), al interior de la cavidad amniótica (CA), delimitada por la decidua parietal (DP) y el miometrio (M). La placenta se observa celular y compacta, al igual que el embrión, además este último se observa simétrico. B) UFP de ratona inoculada con 5.0 millones de taquizoítos, la DB presenta congestión moderada y poco celularidad, el E, se observa poco celular y compacto, ligeramente asimétrico y eosinofílico; la DP también se aprecia congestionada. C) UFP de ratona inoculada con 7.5 millones de taquizoítos, la DB presenta congestión severa, en el E, se aprecian dos estructuras de apariencia tubular, sugerentes del tubo neural en desarrollo. La DP y el M están aumentados de grosor en comparación con los de las otras UFP. E) Reabsorción embrionaria de ratona inoculada con 7.5 millones de taquizoítos, la CA está ocupada por un material eosinofílico con células intercaladas en dicho material, así como escasos eritrocitos, el M presenta prolongaciones del epitelio, observándose con apariencia de pliegues. A-E, HE; 15x.

posible observar estructuras sugerentes de taquizoítos de *T. gondii,* sin embargo, hubo fetos que no presentaron alteraciones y en los que se observaron estructuras de forma oval a redonda, piriforme sugerentes de taquizoítos de *T. gondii.* Las placentas del grupo inoculado con la dosis más baja tenían necrosis discreta e infiltrado de células inflamatorias en la decidua basal, sin embargo, histopatológicamente, solo se observaron parásitos en los fetos de ratonas infectadas con la dosis más alta (10.0 millones).

# 6.2.4 Ratonas inoculadas con taquizoítos de *T. gondii* en el 3er tercio de gestación: tejidos maternos y UFP

Las secciones histológicas de hígado presentaron necrosis en grado y distribución variable, dependiendo de la dosis de inoculación. En las ratonas inoculadas con la dosis de 2.5 millones de taquizoitos, prevalecieron las lesiones leves, observandose como focos de necrosis de discreta a leve, en los tejidos de las ratonas inoculadas con las dosis de 5.0 millones la necrosis presentó distribución multifocal y fue moderada, en contraste con las ratonas de los grupos inoculados con 7.5 y 10.0 millones de parásitos, donde la necrosis fue de moderada difusa a severa zonal. En los focos y las zonas de necrosis, se observó la presencia de taquizoítos intra y perilesionales; en la dosis de 2.5 y 5.0 millones la cantidad de taquizoitos observados fue de escasos a moderados, y en las dosis mayores se observaron parásitos en abundante cantidad. Así mismo, se encontraron focos de infiltrado linfocitario en grado variable, siendo leve en las dosis bajas (2.5 y 5. millones) y de moderado a severo en las dosis de 7.5 y 10.0 millones. Así mismo el infiltrado linfocitario estaba compuesto principalmente por linfocitos y en menor grado por neutrófilos. El bazo presentó pérdida de la población linfoide en diferente grado, dependiendo de la dosis inoculada, siendo de leve a moderado en las dosis de 2.5 y 5.0 millones de taquizoítos, y severo en las dosis altas (7.5 y 10.0 millones). Los centros germinales con despoblación linfoide podían presentar además necrosis, así como la presencia de taquizoitos libres y en replicación. También se observaron cambios congestivos de leves a moderados y hemorragias leves en el tejido que rodea a los foliculos esplénicos (Figura 7).

Las UFP de las ratonas inoculadas con las dosis de 2.5 y 5.0 millones presentaron degeneración y disgregación tisular en la zona de la DB y algunos de los vasos sanguíneos de esta zona se observaron con congestión leve, así como la presencia de material eosinofílico fibrilar al interior. Dicho material se observó en los capilares del LC, MF, y la DB; en algunas secciones, los trombos ocluían de forma parcial la luz, mientras que en otras secciones se presentaban en varios puntos a lo largo del vaso sanguíneo; en otros casos (5-10%), los trombos ocluían totalmente la luz, en estos casos, el tejido adyacente presentó cambios degenerativos y necrosis por isquemia en diferente grado y distribución, presentándose desde zonas delimitadas hasta segmentos que abarcaban más del 80% de la placenta. Aunado a la presencia de trombos, también se apreciaron zonas de congestión de leve a moderada en los grupos de ratonas inoculados con las dosis de 2.5 y 5.0 millones. Las UFP de las ratonas inoculadas con la dosis de 7.5 millones presentaron congestión de moderada a severa, trombosis moderada más frecuentemente observada en los vasos sanguíneos de la DB; mientras que algunas de UFP de las ratonas inoculadas con 10.0 millones de taquizoítos presentaron congestión severa que abarcaba casi la totalidad de la placenta afectando desde la DB hasta el LC. Así mismo, en estas placentas también se observó trombosis severa en la decidua basal, ocupando más del 70% de su área. El tejido adyacente a la congestión y a la trombosis presentó cambios degenerativos y necrosis por isquemia (Figuras 22 y 23).

En la totalidad de las secciones de placenta se observaron estructuras de talla y morfología compatible con taquizoítos de *T. gondii*, libres o agrupados en rosetas y racimos dentro de vacuolas parasitóforas en las células estromales de la DB y las CTB en el LC (Figura 24).

Los fetos de las ratonas inoculadas con las dosis bajas (2.5 y 5.0 millones), presentaron alteraciones leves como áreas con poca densidad de células,



Figura 22. Placentas de ratonas inoculadas con diferentes dosis de taquizoítos de *T. gondii* en el tercer tercio de la gestación. 1 A y 1 B) Vista panorámica de placentas, con cambios congestivos (1A) y con zonas extensas de necrosis coagulativa (1B) por isquemia; 1 C y 1 D) Ampliaciones de secciones de laberinto coriónico con congestión severa difusa (cuadrados), apreciándose en el tejido adyacente cambios iniciales degenerativos por hipoxia-isquemia. 1 E) Detalle de la zona extensa de necrosis coagulativa (rectángulo), delimitada por tejido con cambios degenerativos avanzados. 1 A-1 E, HE; 1 A y 1 B 15x; 1 C-1 E 300x.



**Figura 23. Placentas de ratonas inoculadas con diferentes dosis de taquizoítos de** *T. gondii* **en el tercer tercio de la gestación.** 1 A-1 C) Placenta con extensas zonas de trombosis, tiñéndose con HE (2 A), PAS (2 B) y PTAH (2 C), se observan trombos evidentes (flechas) intercalados con zonas de congestión; confirmándose la presencia de material proteínaceo con PAS y la presencia de fibrina con PTAH, lo que sugiere que diversos componentes se combinan durante la formación de los trombos. 2 A) Ampliación de la placenta (1 A), se aprecian los trombos intercalados (flechas) con áreas de congestión (puntas de flecha) a lo largo del vaso sanguíneo. 3 A) Trombo de gran tamaño que abarca la decidua basal, observándose capas de células y material fibrilar eosinofílico intercaladas una a una (flechas), adyacente al trombo se aprecian zonas con congestión (puntas de flecha). 3 B) Trombo teñido con PTAH, se observa la disposición del material proteínaceo y la fibrina en forma de espiral. 4 A-4 C) Trombos con diferente conformación (4 A) Fibrilar, ligeramente heterogéneo con escasos eritrocitos intercalados en el material fibrilar (flechas). (4 B) Fibrilar, pequeño, en las áreas del vaso sanguíneo adyacentes al trombo se aprecia congestión (puntas de flecha). 4 C) Fibrilar, homogéneo y compacto con presencia de una moderada cantidad de células intercaladas en el material fibrilar (flechas), además, los vasos sanguíneos adyacentes al trombo se aprecian congestionados y con un material eosinofílico (puntas de flecha). 1 A-1 C y 2 A) Placenta de ratonas inoculadas con 7.5 millones de taquizoítos de *T. gondii.* 3 A y 3 B) Placentas de ratonas inoculadas con 7. 5 millones. 4 A-4 C) Placentas de ratonas inoculadas con 2.5 (4 A), 5.0 (4 B) y 7.5 (4 C) millones de taquizoítos. 1 A, 2 A, 3 A, 4 A-4 C, HE; 1 B, PAS; 1 C y 3 B, PTAH. 1 A-1 C, 15x; 2 A, 40x; 3 A, 80x; 3 B, 200x; 4 A-4 C, 450x.


**Figura 24.** Secciones histológicas de útero y placenta de ratonas inoculadas con diferentes dosis de taquizoítos de *T. gondii* en el tercer tercio de la gestación. 1 A) sección histológica de útero de ratona no gestante, inoculada con 7.5 millones de taquizoítos, se observa el epitelio uterino y por debajo de este, en la mucosa y la muscular de la mucosa se observan estructuras redondas a ovales de talla y morfología similar a la de taquizoítos de *T. gondii* (circulo y flechas). B) Sección de ovario, en el centro, se aprecia un cúmulo de estructuras agrupadas, sugerentes de taquizoítos de *T. gondii* dentro de una vacuola parasitófora. 2 A-2 D) Secciones de laberinto coriónico de ratonas del grupo testigo (2 A), se observa la morfología de los trofoblastos (punta de flecha) y los vasos sanguíneos (flechas) sin cambios patológicos. (2 B y 2 C) LC de ratonas inoculadas con 5.0 millones, en (2 B) las células del trofoblasto presentan apariencia deshilachada, están pálidas y eosinofílicos, algunas otras con degeneración y necrosis, adyacente a una célula se observan varias estructuras ovaladas de talla y morfología de taquizoítos de *T. gondii* (círculo). La morfología del laberinto coriónico en (2 C) se observa sin cambios patológicos, sin embargo, en el citoplasma de un trofoblasto, se aprecia un cumulo de estructuras ovales sugerentes de taquizoítos. Laberinto coriónico de ratona inoculada con 7.5 millones de parásitos (2 D), presenta degeneración y necrosis, así como estructuras sugerentes de taquizoítos de *T. gondii* intralesionales. 3 A-3 C) IHQ para *T. gondii* de secciones de placenta de ratonas inoculadas con 7.5 (3 A), 5.0 (3 B) y 2.5 millones de taquizoítos (3 C). En todas se observan estructuras de talla y morfología de taquizoítos de T. gondii. 1 A y 1 B, 400x; 2 A-2 D, 450x, 3 A-3 C, 500x.



Figura 25. UFP de ratonas inoculadas con diferentes dosis de taquizoítos de *T. gondii* en el tercer tercio de la gestación. A) y B) Vista panorámica de placenta y su feto. A) UFP de ratona del grupo testigo, la placenta y el feto presentan la morfología de ambos tejidos sin cambios patológicos aparentes, observándose estructuras como el encéfalo (E), la cavidad torácica (CT), la columna vertebral (CV), la cavidad abdominal (CA) y un miembro pélvico (MP). B) UFP de ratona inoculada con 7.5 millones de taquizoítos, la placenta presenta cambios congestivos, así como presencia de trombos por debajo de la decidua basal (puntas de flecha), el laberinto coriónico se aprecia menos compacto y celular en comparación con el testigo. Así mismo, adyacente a los trombos se observa necrosis coagulativa segmentaria por hipoxia. El feto presenta necrosis generalizada. A y B, HE; 15x.



**Figura 26. Tejidos fetales cuyas madres fueron inoculadas con diferentes dosis de taquizoítos de** *T. gondii* en el tercer tercio de la gestación. 1 A) Corazón de feto de ratona del grupo testigo, se observa compacto y celular. 1 B) Acercamiento de (1 A) el tejido esta compacto y las fibras musculares presentan su arquitectura tisular convencional (círculo). 2 A) Corazón de feto cuya madre pertenece al grupo inoculado con 5.0 millones, se observa poco compacto y celular. 2 B) Acercamiento de (2 A) el tejido presenta poca celularidad, dejando amplios espacios entre las fibras musculares (círculo). 2 C) IHQ para *T. gondii*, sección de (2 A) se observan estructuras de talla y morfología de taquizoítos con marca inmunopositiva (puntas de flecha). 3 A) Corazón de feto cuya madre fue inoculada con 7.5 millones de taquizoítos, se observa con disgregación tisular severa y pérdida de la arquitectura tisular. 3 B) Ampliación de (3 A) el tejido esta disgregado, poco compacto y las fibras musculares están heterogéneas y sin dirección. 4 A y 4 B) Médula espinal de fetos de ratonas del grupo testigo (4 A) y de ratonas inoculadas con 7.5 millones (4 B), este último se observa menos compacto, celular y asimétrico con respecto al testigo (flecha). 5 A y 5 B) Órganos parenquimatosos de fetos de ratonas del grupo inoculado con 5.0 millones, de ratona inoculada con 7.5 millones, al centro se observa poco celular, dejando espacios entre las células (flecha) y (5 B) IHQ para *T. gondii* de órgano parenquimatoso de feto de ratona inoculada con 7.5 millones, al centro se observa poco celular, dejando espacios entre las células (flecha) y (5 B) IHQ para *T. gondii* con marca inmunopositiva. 1 A-3 A, 1 B. 2 B, 3 B, 4 A, 4 B y 5 A, HE; 2 C y 5 B IHQ para *T. gondii*. 1 A-3 A, 150x; 1 B-3 B, 450x; 4 A y 4 B, 150x; 5 A y 5 B, 400x.

disgregación tisular; en contraste con los fetos de las ratonas inoculadas con las dosis mayores (7.5 y 10.0 millones), que presentaron menor talla, así como órganos con menor cantidad de células resultando en pérdida de la arquitectura tisular de órganos fetales como el corazón, hígado, bazo y pulmones (Figuras 25 y 26). Un hallazgo relevante fue que los fetos cuyas placentas presentaron mayor grado de congestión y trombosis, tambien fueron los que presentaron mayor grado de alteraciones.

## 6.2.5 Inmunohistoquímica para T. gondii

Se evaluaron la totalidad de las laminillas con los órganos maternos y unidades feto-placentarias por inmunohistoquímica.

La totalidad de los tejidos maternos (hígado y bazo) fueron positivos a la IHQ para *T. gondii,* variando en la cantidad de parásitos observados según la dosis inoculada (Figura 7).

Por otro lado, solo se observaron estructuras inmunopositivas en el 20 % de las placentas inoculadas en el primer tercio de la gestación, y estas placentas generalmente provenían de ratonas inoculadas con la dosis de 10.0 millones de taquizoítos. Así mismo, solo se observó inmunopositividad en algunos fetos (aproximadamente 5%).

En las UFP de las ratonas inoculadas en el segundo tercio de la gestación, la presencia de los parásitos fue más evidente en comparación con las UFP del primer tercio, sin embargo, también se observaron pocos fetos con marcaje inmunopositivo (aproximadamente 15% de los fetos y placentas, presentaron IHQ positiva).

Por último, en el 90% de las placentas de ratonas inoculadas en el tercer tercio de la gestación se confirmó la presencia de *T. gondii*. Los taquizoítos se observaron con más frecuencia en la zona del LC dentro de las CTB. Así mismo el 90% de los fetos presentaron marcaje inmunopositivo en diferentes órganos como el corazón, pulmones, hígado, bazo, páncreas e intestino (Figura 26). En ninguno

de los fetos se observaron taquizoítos en replicación, los parásitos fueron observados libres, entre las células de los diferentes órganos a los que se diseminó, así como en la luz de los vasos sanguíneos fetales.

Otro hallazgo relevante, fue la presencia de reabsorciones en dos hembras inoculadas durante el tercer tercio de la gestación; confirmándose la presencia del parásito mediante IHQ para *T. gondii*. Los taquizoítos con marca positiva fueron observados dentro de la reabsorción, asi como en la mucosa y submucosa del útero (Figura 24).

## 6.2.6 Histoquímica para ácido peryódico de Shiff (PAS)

Las uNK presentaron diferencias según el tercio de la gestación y la dosis de inoculación. En el primer tercio de la gestación las uNK de las ratonas del grupo testigo fueron pequeñas y con moderada cantidad de gránulos de color rosa mexicano intenso. Por otro lado, las uNK de las ratonas inoculadas con las diferentes dosis de taquizoítos, se observaron ligeramente aumentadas de tamaño, con el citoplasma vacuolado, menor cantidad de gránulos intracitoplasmáticos con afinidad tintorial similar a la de los testigos, sin embargo, algunas uNK que estaban más alejadas del triángulo metrial presentaron cambios en la afinidad tintorial de sus gránulos observándose de rosa mexicano a magenta violáceo (Figura 27).

En el segundo tercio de la gestación las uNK del grupo testigo, se observaron ligeramente aumentadas de tamaño, con abundante cantidad de gránulos intracitoplasmáticos de color rosa mexicano intenso; a diferencia de las uNK del primer tercio de la gestación, algunas células no presentaban núcleo, así mismo, algunas células estaban degranuladas y otras presentaban el citoplasma vacuolado, así como el núcleo desplazado a la periferia. En contraste, las uNK de las ratonas inoculadas con taquizoítos de *T. gondii*, modificaron la afinidad tintorial de los gránulos intracitoplasmáticos, observándose de color rosa mexicano a morado. Algunas de estas células mostraron además diferencias en el tamaño de los gránulos y el núcleo también modificó su afinidad tintorial apreciándose ligeramente basófilicos y pálidos.



Figura 27. Secciones de DB de ratonas inoculadas con diferentes dosis de taquizoítos de *T. gondii* en diferentes tercios de la gestación procesadas con PAS. A) uNK de ratona del grupo testigo inoculada en el primer tercio de la gestación, se observa una abundante cantidad de células de morfología homogénea, con abundantes gránulos intracitoplasmáticos de color fucsia intenso, citoplasma moderadamente vacuolado y núcleo central basófilico. 1 B) uNK de ratona del grupo inoculado con 5.0 millones de taquizoítos en el primer tercio de la gestación; las células se aprecian de mayor tamaño respecto al control, y con vacuolas citoplasmáticas de mayor tamaño, así mismo se aprecian tamaños y afinidades tintoriales diferentes en los gránulos intracitoplasmáticos (punta de flecha). 1 C) uNK de ratona del grupo inoculado con 7.5 millones de taquizoítos en el tercer tercio de la gestación, las células son de mayor tamaño, con más vacuolas intracitoplasmáticas; la cantidad y el tamaño de los gránulos intracitoplasmáticos ha disminuido hasta observarse como un puntilleo fino en el citoplasma (círculo). 1 D) uNK de ratona del grupo inoculado con 5.0 millones en el segundo tercio de la gestación; se aprecian de diferentes tamaños y con pocos gránulos de color menos intenso que el control. 1 A-1 D, PAS; 450x.

Las uNK adyacentes a zonas de necrosis o con degeneración, también mostraron modificaciones morfológicas evidentes, por ejemplo, los gránulos intracitoplasmáticos se observaron de color morado y con aspecto granular denso. Así mismo, algunas células uNK se apreciaron disminuidas de tamaño, en comparación con las uNK de los grupos testigo. Los núcleos también modificaron su afinidad tintorial, dificultándose su observación entre los gránulos (Figura 27). Por último, las uNK presentes en las UFP de las ratonas del grupo testigo del tercer tercio de la gestación, se observaron de gran talla, con abundante citoplasma ligeramente vacuolado, abundantes gránulos intracitoplasmáticos de color fucsia intenso y de tamaño homogéneo, los núcleos generalmente se observaron centrales basófilicos.

En contraste, las uNK presentes en las UFP de las ratonas inoculadas con las diferentes dosis, presentaron modificaciones en la afinidad tintorial de los gránulos intracitoplasmáticos, así como en el tamaño de los mismos, los núcleos también se observaron ligeramente eosinofílicos; se duplicó el tamaño del citoplasma debido a que aumentó el número de vacuolas en su interior. En algunas uNK presentes en las UFP de las ratonas inoculadas con 10.0 millones de taquizoítos, los gránulos intracitoplasmáticos fueron escasos (menos de 5), con poca afinidad tintorial para PAS y de menor tamaño observándose como puntos violáceos intracitoplasmáticos, así mismo, en estas uNK el número de vacuolas intracitoplasmáticas aumento, generando que el citoplasma se apreciara del doble de tamaño aproximadamente (Figura 24).

## 6.2.7 Hematoxilina acida fosfotungstíca: UFP todas las dosis, todos los tercios

Las UFP de las ratonas pertenecientes al grupo testigo de cada tercio de gestación presentaron trombos que fueron confirmados mediante la histoquímica de PTAH, siendo estos homogéneos en tamaño, forma y distribución. Los trombos observados en estos grupos generalmente fueron compactos, más frecuentemente de apariencia homogénea que fibrilar; se distribuyeron principalmente en el laberinto

coriónico, la decidua basal y entre las membranas fetales; raramente ocluyeron la luz de los vasos sanguíneos de forma total.

En contraste, los trombos observados en las ratonas inoculadas con las diferentes dosis; presentaron diversas morfologías raramente homogéneas, predominando las fibrilares. En las UFP inoculadas con las dosis de 2.5 y 5.0 millones de taquizoítos, los trombos ocluyeron parcialmente los vasos sanguíneos, mientras que en las UFP inoculadas con las dosis de 7.5 y 10.0 millones, los trombos frecuentemente ocluyeron totalmente los vasos sanguíneos, incluso se encontraron en varios puntos del mismo vaso, provocando degeneración y necrosis por isquemia en el tejido adyacente.

Estos trombos presentaron una afinidad tintorial heterogénea, el color se dispuso en capas, siendo azul intenso en la periferia, y de color morado pálido al interior. Otros trombos presentaron una coloración que semejaba una espiral, presentando líneas moradas pálidas y azul intenso intercaladas una a una.

Las UFP de los primeros dos tercios de la gestación, presentaron trombos pequeños y homogéneos, únicamente en las ratonas inoculadas en el segundo tercio de la gestación con las dosis de 7.5 y 10.0 millones de taquizoítos se observaron trombos de mayor tamaño ocluyendo la luz de los vasos sanguíneos de la decidua basal (DB) y entre las membranas fetales. La morfología de estos trombos generalmente fue fibrilar. Por otro lado, las UFP de las ratonas inoculadas en el último tercio de la gestación con las dosis de 7.5 y 10.0 millones de taquizoítos, presentaron trombosis extensa en la decidua basal, así como en las membranas fetales; estos trombos presentaban morfología fibrilar y eran abundantes ocluyendo la mayor parte de las ocasiones la totalidad de la luz de los vasos sanguíneos.

# 6.3 Comparación de alteraciones por dosis y tercio de la gestación

Se calcularon las medias de cada una de las alteraciones (vasculares y celulares) observadas en las UFP con los datos obtenidos a partir del análisis

histopatológico y se graficaron para su comparación por dosis y por tercio (Figuras 28-32).

# 7. DISCUSIÓN

## 7.1 Comparación de alteraciones y lesiones en tejidos maternos

Las alteraciones observadas en hígado y bazo maternos, son similares a lo descrito en la literatura en infecciones de curso agudo en animales o humanos; las lesiones microscópicas se caracterizan por focos necróticos con taquizoítos perilesionales, acompañados o no de infiltrado inflamatorio, dependiendo de la vía de transmisión y el curso de la infección; en este modelo de estudio, las lesiones observadas corresponden al patrón característico provocado por la infección aguda de *T. gondii*, encontrándose infiltrado inflamatorio compuesto mayormente por neutrófilos y linfocitos (Hill *et al.*, 2005; McGavin y Zacahary, 2007; Dubey, 2010; Cedillo-Peláez, 2015).

La presencia de taquizoítos en hígado y bazo, fue confirmada por inmunohistoquímica; y aumentó conforme la dosis inoculada. Sin embargo dos hallazgos llamaron la atención: 1) en la dosis de 2.5 millones, los parásitos fueron poco visibles por HE, y solo se apreciaban asociados a lesiones y focos de infiltrado inflamatorio conformado principalmente por neutrófilos y en menor grado por linfocitos, con escasos macrófagos (siendo más evidentes en parénquima hepático), con discreto daño en el tejido residente; 2) en contraste, en la dosis de 10.0 millones, predominó la replicación parasitaria sobre la respuesta inflamatoria, así mismo se observó mayor daño tisular (incluyendo en el bazo la disminución de la población linfoide).



### Alteraciones celulares y tisulares en placenta: Tres tercios de la gestación

Figura 28. Comparación de la gravedad de las alteraciones celulares entre las placentas de los tres tercios de la gestación. En el primer tercio de la gestación, la necrosis es ligeramente más grave la necrosis que el infiltrado inflamatorio. Esta misma tendencia se observó en el segundo tercio; siendo más grave la necrosis que el infiltrado de células inflamatorias en la dosis de 10.0 millones de taquizoítos. En la mayoría de las placentas del tercer tercio de la gestación, el infiltrado inflamatorio presentó una tendencia similar a la de la necrosis, sin embargo, la necrosis fue más severa que el infiltrado inflamatorio en las placentas inoculadas con la dosis de 10.0 millones.

1er tercio: grupo de ratonas infectado en el día de gestación DDG. 10; 2o tercio 15 DDG; 3er tercio 18 DDG. \*\* Dosis sin ratonas sobrevivientes



Alteraciones vasculares en placenta: Tres tercios de la gestación

Figura 29. Comparación de la gravedad de las alteraciones vasculares entre las placentas de los tres tercios de la gestación. Según el tercio de la gestación en el que las ratonas fueron inoculadas, la alteración vascular que predomino es diferente, aunque, la gravedad depende de la dosis inoculada. En el primer tercio de la gestación, la alteración más común es la hemorragia, siendo de moderada a grave según la dosis. En el segundo tercio, la congestión fue la alteración más común, siendo de moderada a grave. Por otro lado, la presentación de trombos fue la alteración más común y más grave en el tercer tercio de la gestación.

1er tercio: grupo de ratonas infectado en el día de gestación DDG. 10; 2o tercio 15 DDG; 3er tercio 18 DDG \*\* Dosis sin ratonas sobrevivientes



#### Alteraciones embrionarias y fetales: Tres tercios de la gestación



Figura 30. Comparación de la gravedad de las alteraciones embrionarias/fetales: entre los tres tercios de la gestación. Los dos primeros tercios de la gestación la alteración embrionaria más grave, fue la degeneración, siendo severa desde la dosis de inoculación de 5.0 millones de taquizoítos. En el segundo tercio de la gestación, la degeneración fetal es de menor gravedad, sin embargo, en las dosis de 7.5 y 10.0 millones hay necrosis de leve a moderada. En el último tercio de la gestación solo los fetos cuyas madres fueron inoculadas con la dosis de 10.0 millones de taquizoítos, presentaron necrosis; los demás fetos de este tercio, solo presentaron degeneración tisular.

1er tercio: grupo de ratonas infectado en el día de gestación ddg. 10; 2o tercio 15 ddg; 3er tercio 18 ddg. \*\* Dosis sin ratonas sobrevivientes



### Alteraciones celulares y tisulares en placenta, degeneración de tejidos embrionarios/fetales, presencia del parásito: Tres tercios de la gestación

Figura 31. Comparación de la gravedad de las alteraciones celulares y tisulares placentarias y las alteraciones de los tejidos embrionarios/fetales entre los tres tercios de la gestación. En el primer tercio de la gestación, la degeneración fetal es más grave que las alteraciones tisulares en la placenta. En el segundo tercio de la gestación, la degeneración de los tejidos embrionarios y las alteraciones tisulares en la placenta presentan una tendencia similar. Por otro lado, en el tercer tercio de la gestación, la degeneración del tejido fetal, parece tener más relación con la necrosis placentaria que con el infiltrado inflamatorio.

1er tercio: grupo de ratonas infectado en el día de gestación DDG. 10; 2o tercio 15 DDG; 3er tercio 18 DDG. \*\* Dosis sin ratonas sobrevivientes



Alteraciones vasculares en placenta, degeneración de tejidos embrionarios/fetales y presencia del parásito: Tres tercios de la gestación

Figura 32. Comparación de la gravedad de las alteraciones vasculares en placentas y la degeneración de los tejidos embrionarios/fetales entre los tres tercios de la gestación. En el primer tercio la gestación se observa que la hemorragia es la alteración vascular de la placenta que más se relaciona con la degeneración de los tejidos embrionarios; en el segundo tercio de la gestación la gravedad de la congestión parece ser la que tiene mayor similitud con las alteraciones en los tejidos embrionarios. Por último, en el tercer tercio de la gestación, la trombosis y la degeneración del tejido fetal, son las alteraciones que presentan tendencias similares

1er tercio: grupo de ratonas infectado en el día de gestación DDG. 10; 2o tercio 15 DDG; 3er tercio 18 DDG.

\*\* Dosis sin ratonas sobrevivientes

Estos hallazgos demuestran un rango de alteraciones tisulares y sugieren que la cantidad de taquizoítos inoculados afecta el grado y el tipo de respuesta inflamatoria estimulada en un lapso corto (3 días post-inoculación). Es importante, que dependiendo de lo que se pretenda establecer como siguiente nivel de estudio, aplicando este modelo murino, se considere la dosis a inocular como una variable particular que puede generar alteraciones *per-se* en cada tejido a estudiar.

# 7.2 Comparación de alteraciones y lesiones en unidades feto-placentarias

Los cambios microscópicos observados, tanto a nivel de la placenta como en los fetos en diferente etapa de desarrollo, son de menor grado, extensión y frecuencia, al compararlos con los hallazgos descritos en hígado y bazo maternos.

Por otra parte, las alteraciones y lesiones observadas en las UFP, sugieren estar relacionadas con el grado de desarrollo (tercio de gestación en el que se llevó a cabo la inoculación materna) y condicionados por la dosis de inoculación administrada (similar tendencia a los tejidos maternos), siendo más graves los cambios conforme se incrementa la dosis de inoculación.

### 7.2.1 Alteraciones vasculares

Los cambios vasculares se apreciaron de forma similar en los tres tercios de gestación, con tendencias particulares. Si bien la congestión se observó en grado y distribución homogénea entre los tercios, fue mayor en los dos primeros, predominando en el segundo; mientras que la hemorragia fue más grave en las placentas del primero. Hallazgos similares fueron documentados por Senegas *et al.*, (2009), en un modelo murino de toxoplasmosis congénita con ratonas Swiss Webster, donde observaron que los niveles de IFN-γ uterino y sérico aumentan durante la infección por *T. gondii*, generando hemorragias locales, entre otras alteraciones.

Por otra parte, una alteración relevante e independiente del tercio de la gestación y la dosis de inoculación, fue la presencia de trombos, la cual fue más

grave en el último tercio de la gestación. Este cambio se presentó en los animales testigo, de forma discreta y localizada, sin causar compromiso aparentemente en tejidos adyacentes; la presentación de trombos es considerada por algunos autores como una alteración común en ratonas gestantes y está asociada a la proteína producida por los trofoblastos de las ratonas (proteína 2 similar a fibrinógeno, fgl2) en respuesta a citocinas proinflamatorias (IFN-y o TNF- $\alpha$ ), que actúa como factor protrombótico favoreciendo la deposición de fibrina y por ende la formación de trombos (Clark et al., 2001). En los grupos con infección, desde las dosis más bajas la presencia de trombos se incrementó con respecto a los grupos testigo (de leve a moderada), con formación de estructuras de diferente tamaño, aspecto y arreglo (trombos bien organizados con o sin material fibrilar), que conforme se incrementaba la dosis, estos se apreciaban con mayor extensión, con diferente arreglo (de aspecto fibrilar o arreglados en múltiples capas de proteína fibrilar y eritrocitos/leucocitos atrapados), escasos detritus celulares asociados, mayor severidad, distribución multifocal o segmentaría y con afección secundaria de tejidos adyacentes, asociándose con cambios de hipoxia-isquemia en zonas extensas de la placenta, y con diferentes grado de repercusión en los fetos relacionados.

Alteraciones similares a las descritas en el presente trabajo, han sido documentadas por Castaño *et al.*, (2014) y Benavides *et al.*, (2017), en un modelo ovino de toxoplasmosis congénita, donde observaron en la fase aguda de la enfermedad inducida (borregas inoculadas con ooquistes de *T. gondii*), la presencia de trombos en vasos maternos de los placentomas, sin aparente lesión en la pared vascular, con diferente grado de infiltrado inflamatorio y necrosis isquémica en el tejido placentario adyacente, y sin detección de DNA de *T. gondii*. Así mismo, los autores describen que las lesiones placentarias y fetales, fueron más graves en las ovejas infectadas durante el segundo tercio de la gestación, en comparación con las infectadas en el primer tercio. En estos estudios, la presencia de trombos se

relacionó con episodios de isquemia y consiguientes infartos, repercutiendo en la disfunción del placentoma.

Si bien se aprecian similitudes con lo documentado en ovinos, se observan trombos con características morfológicas particulares, aparentemente no descritas previamente en la literatura científica revisada.

El mecanismo por el cual se desencadena la formación de trombos en la placenta de las ratonas estudiadas sugiere un origen multifactorial, con alteración del flujo sanguíneo y su composición, la afección del desarrollo de la red vascular placentaria, la replicación parasitaria localizada y el inicio de una consiguiente respuesta inmune; retroalimentándose conforme se desarrolla cada alteración.

Las muestras estudiadas del modelo murino establecido en nuestro laboratorio, pretendía en un inicio reproducir la transmisión del parásito a los diferentes productos, por lo que se consideró evaluar cuatros dosis infectivas (2.5 a 10.0 millones de taquizoítos, IV). La presencia de trombos con diferentes aspectos morfológicos, siendo más graves conforme se aumentaba la dosis de inoculación y sin un aparente daño endotelial, sugiere una alteración súbita en la composición de la sangre, al aumentar los elementos sanguíneos por la cantidad de parásitos inoculados, favoreciendo un incremento en la viscosidad de la sangre, como se llega a presentar en otras entidades (ejemplos: síndrome nefrótico, enfermedad hepática, amiloidosis, etc), descritas en la literatura (McGavin y Zacahary, 2007); así mismo, el flujo sanguíneo también fue alterado debido a la congestión local o generalizada en los diferentes estratos de la placenta. La hipercoagulabilidad de la sangre y los cambios congestivos son dos elementos que favorecen la activación de la cascada de la coagulación, retroalimentándose de los demás factores relacionados (McGavin y Zacahary, 2007).

Por otra parte, varios autores han documentado en diferentes modelos murinos, que la infección por *T. gondii* incrementa la secreción de IFN- $\gamma$  uterino y sérico en ratones (Ge *et al.*, 2008; Senegas *et al.*, 2009); se ha descrito también que el TNF- $\alpha$  puede causar contracción del músculo liso, favoreciendo la trombosis y en

conjunto con el IFN-y, rechazo o aborto de los productos y prematurez (Arck et al., 1995; Krishnan et al., 1996; Saini et al., 2011; Bimal et al., 2012). Estos datos hacen evidente el papel de la respuesta inmune, que favorece el desarrollo de las alteraciones vasculares, aunado a lo anteriormente descrito, sobre la capacidad de los trofoblastos murinos de secretar la proteína fgl2 (en respuesta a citocinas proinflamatorias, Clark et al., 2001), la cual favorece la deposición de fibrina y la trombosis. Además, diversos estudios han sugerido que la infección por T. gondii provoca un desequilibrio en la expresión de citocinas y factores de crecimiento necesarios para la diferenciación de células involucradas en el mantenimiento de la gestación. Tal es el caso de Zhao y colaboradores (2017), quienes documentaron que el tratamiento con TGF-β disminuyo los efectos adversos inducidos por T. gondii durante la infección congénita. En este estudio, además de ELISA para la cuantificación de citocinas y citometría de flujo, también se realizó el análisis histopatológico de las placentas de las ratonas de los diferentes grupos experimentales; encontrando que las placentas de las ratonas infectadas con T. gondii, mostraron hemorragia grave y dilatación de las arterias espirales; contrario a lo observado en las placentas de las ratonas tratadas con TGF-β, donde la morfología de las AE se restauró parcialmente y no se apreciaron hemorragias; por otra parte, la neutralización de TGF-β generó hemorragias graves y dilatación evidente de las AE. Así mismo, las ratonas tratadas con TGF-β presentaron un mayor número de células T reguladoras (T reg).

Aunque en el presente trabajo no se cuantificaron citocinas, las observaciones histopatológicas reportadas por Zhao et al., (2017) son similares; sin embargo, en esta investigación además de las alteraciones vasculares (hemorragia, congestión, trombosis), también se describieron las alteraciones celulares (infiltrado inflamatorio, degeneración y necrosis) no solo de las placentas, sino de las UFP y en los tres tercios de la gestación. Con el análisis de esta información pudimos observar que la hemorragia es más severa en el primer tercio, y es en este tercio que encontramos una mayor proporción de reabsorciones embrionarias. Este

hallazgo también es similar a lo reportado por Wang *et al.*, (2011) cuyos resultados indican que la infección por *T. gondii* puede causar una desregulación inmunitaria materna, particularmente en el embarazo temprano (primer tercio), generando efectos adversos en la gestación como muerte embrionaria, teratogénesis y aborto involuntario; estos datos apoyan nuestras observaciones de las alteraciones celulares y tisulares de los embriones del primer tercio de la gestación, así como la presentación de reabsorciones y la falla en la implantación. Nuestros datos sugieren que los efectos adversos de la toxoplasmosis congénita en el proceso de implantación, organogénesis y desarrollo embrionario/fetal, está asociado con los cambios vasculares y celulares provocados por la presencia del parásito en la placenta.

Por otro lado, la evidencia indica que para que la gestación sea exitosa se requiere de múltiples factores, entre ellos la presencia de células T reg, y que la disminución de esta población celular genera efectos adversos en la gestación. Las células T reg son vitales para la tolerancia materno-fetal (Aluvihare et al., 2004). Estudios anteriores realizados por Zhang et al., (2012) y Liu et al., (2014) demostraron que tanto el nivel de TGF-β placentario como el número de células T reg disminuyen en las ratonas infectadas con *T. gondii,* y se ha documentado que el TGF- $\beta$  es una citocina clave en el desarrollo de las células T reg. Los resultados embrionaria y produjo que el peso de los embriones aumentara. Estos datos ayudan a explicar nuestros resultados, aunque no cuantificamos las células T reg, ni el TGFβ, si observamos que la presencia del parásito se relaciona con una menor cantidad de sitios de implantación, esto podría deberse a la disminución de TGF- $\beta$ , que afecta el desarrollo de células T reg, y al haber disminución de esta población celular también hay disminución de la tolerancia inmunológica de la madre al embrión, generando una posible implantación inadecuada, o muerte embrionaria.

Investigaciones anteriores han reportado que las anormalidades en la gestación provocadas por la infección de *T. gondii*, se asocian con un

microambiente inmunológico local anormal (Zhang *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014). Asi mismo en los trabajos de Sasaki *et al.*, 2004; Prins *et al.*, 2009 se ha reportado que el tratamiento con TGF- $\beta$  puede disminuir los niveles de respuesta inflamatoria en la interfaz materno-fetal provocados por la infección de *T. gondii*, beneficiando el desarrollo del embrión/feto. Estas observaciones contrastan con las del presente trabajo, pues, aunque había placentas que presentaron una moderada cantidad de taquizoítos de *T. gondii*, el infiltrado inflamatorio en las UFP raras veces fue severo. Sin embargo, también es importante destacar que, aunque no se haya observado una gran cantidad de células inflamatorias, el desequilibrio en la expresión de citocinas que promueven la microambiente local proinflamatorio generado por la presencia del parásito.

Para generar información concluyente de los efectos provocados por los diferentes perfiles inmunológicos en las placentas y su repercusión en los embriones/fetos, es necesario determinar además el nivel de expresión de las citocinas, las poblaciones celulares involucradas en su expresión y regulación.

## 7.2.2 Alteraciones celulares y tisulares

En los tejidos estudiados, las características morfológicas de los cambios celulares y tisulares descritos previamente indican dos patrones de lesión, de diferente origen, pero relacionados a la presencia, transmisión y replicación de *T. gondii* en las UFP.

El primer patrón, se asocia con las alteraciones vasculares, en donde la congestión y la presencia de trombos (con diferente grado y distribución) a nivel de la placenta, favorecieron inicialmente cambios degenerativos por hipoxia y/o isquemia (dosis más bajas), afectando las diferentes capas de la placenta, incluyendo las CTB y sus precursores, las CGT, células uNK, células mesenquimales, y demás componentes. En las dosis más altas, las alteraciones

fueron más graves, exacerbándose los cambios hipóxicos, apreciándose incluso en algunas de las ratonas zonas de necrosis coagulativa asociadas a isquemia.

Castaño et al. (2014, 2016) describen en su modelo ovino, lesiones en los placentomas consistentes con áreas de necrosis coagulativa y congestión, compatibles con infartos (asociados a trombosis), con distribución multifocal o coalescentes de forma triangular, delimitadas por tejido sin alteraciones, dichas zonas se presentaban principalmente en la región media del placentoma o con extensión a la región coriónica. En las áreas de infarto, el estroma de la carúncula y las vellosidades carunculares presentaron citoplasma de aspecto eosinofílico amorfo y los núcleos con escasa cantidad de cromatina; además de perdida de células epiteliales y descamación, apreciándose como restos celulares eosinófilicos entre los restos de las vellosidades carunculares y cotiledonarias. En borregas de cambios degenerativos-necróticos tuvieron mayor cronicidad, los mayor variabilidad, que van desde el citoplasma eosinofílico, contracción celular, picnosis y cariorrexis nuclear, hasta el completo desprendimiento del laberinto coriónico, formando islas de restos necróticos junto con los restos de epitelio del lado materno.

Por una parte, las alteraciones descritas en ratonas son similares a las descritas en ovinos, con respecto al patrón morfológico de degeneración-necrosis asociada a cambios de hipoxia-isquemia, pero difieren con respecto al grado, presentaron menos componentes y detritus celulares, así como células inflamatorias, y las áreas de afección fueron principalmente del lado materno de la placenta. Estas diferencias podrían deberse a la cronicidad, ya que todas las alteraciones descritas, independiente del tercio de gestación y la dosis, fueron al tercer día post-infección.

El segundo patrón de lesión tisular se asoció con la invasión y replicación de *T. gondii* en la placenta, y la respuesta inmune que se montó para limitar el efecto del parásito. Si bien una proporción considerable de las lesiones descritas previamente, están relacionadas con el conjunto de cambios vasculares, fue posible evidenciar la transmisión del parásito al tejido placentario (HE e IHQ), apreciándose

focos de replicación en el lado materno, interfase y en el laberinto coriónico; en algunos de los casos, los taquizoítos se encontraban en una fase inicial de replicación, dado que las células infectadas no presentaban alteraciones morfológicas evidentes, mientras que en otra proporción de los casos, los parásitos se observaron asociados a necrosis unicelular con presencia de abundante cantidad de zoítos. La presencia de parásitos también estuvo relacionada, como otras lesiones, a la dosis infectiva, y se observó o no la presencia de células inflamatorias en las placentas infectadas. Los resultados obtenidos contrastan con lo documentado en la literatura científica.

En estudios llevados a cabo utilizando lauchas (*C. callosus*), se ha demostrado alta susceptibilidad a la infección por *T. gondii*, detectando la presencia del parásito en varios tejidos (particularmente hígado, bazo, pulmón y cerebro; también se demostró que este tipo de roedor es un modelo experimental adecuado para estudiar la dinámica de la toxoplasmosis congénita, debido a la capacidad de una cepa (RH) altamente virulenta, para infectar las células de trofoblasto en su desarrollo temprano; en otro estudio se demostró la transmisión vertical de *T. gondii* infectando agudamente con la cepa ME49 durante la gestación, pero no en animales crónicamente infectados; en esta especie, considerando la secuencia de eventos que conducen a la infección de los diversos órganos, las células del trofoblasto placentario se infectan tardíamente durante la gestación, pero no limitan por completo la progresión de la infección por *T. gondii* hacia los tejidos fetales (Favoreto *et al.*, 1998; Ferro *et al.*, 1999; 2002)

Franco *et al.*, (2011) demostraron en un modelo con lauchas (*C. callosus*), la presencia de parásitos mediante IHQ de los tejidos placentarios, a nivel de la capa decidual y en el laberinto, por el contrario, no se observaron parásitos en la zona de unión de la placenta; aunque el parásito fue capaz de alcanzar las placentas en todos los grupos experimentales, no hubo evidencia de infección de los tejidos embrionarios en ningún momento, lo que indica el papel putativo de la placenta como una barrera eficaz.

Barbosa *et al.* (2007) detectaron *T. gondii*, mediante bioensayo y PCR, en placentas y embriones de *C. callosus* infectado alrededor de 10 días antes de la concepción; sin embargo, en hembras infectadas alrededor de 30 y 50 días antes de la concepción, solo hubo detección en placentas.

Finalmente, la degeneración tisular de la placenta fue dependiente de la dosis de infección, apreciándose las alteraciones y lesiones más graves en las dosis más altas; al comprometerse la integridad de la placenta y afectar la capacidad regulatoria de las células que la llevan a cabo, se observó diferente grado de afección de los fetos, en los tres trimestres de gestación, incluyendo congestión local y generalizada, falta de compactación tisular, disgregación de órganos parenquimatosos, alteración en la morfología del tubo neural, así como necrosis coagulativa de la totalidad del feto.

El grado de afección fetal, fue en gran parte relacionado con el grado de alteraciones presentes en la placenta, dependiente de la dosis de infección, y observándose la pérdida de la mayoría de los productos por reabsorciones (con o sin presencia de *T. gondii*). Sin embargo, también se visualizaron fetos con diferente grado de alteración, sin una afectación considerable de la placenta.

Senegas, *et al.*, (2009), encontraron en un modelo murino, que una respuesta Th1 mantenida (IFN-γ uterino y sérico aumentado) por la infección por *T. gondii*, favorece el desarrollo de reabsorciones, observándose como la reducción en los sitios de implantación y cambios vasculares; siendo la tasa de reabsorción al 8º día post-coito (DPC) del 8%.

## 8. CONCLUSIONES

La aplicación de este modelo de estudio permite concluir que el grado y la distribución de las alteraciones celulares y vasculares difiere entre los tercios de la gestación y está condicionado por la dosis inoculada.

El análisis morfológico llevado a cabo en este modelo de estudio en un corto periodo de infección permitió evaluar las alteraciones agudas en la hemodinamia placentaria; evidenciando la presentación de alteraciones vasculares como la hemorragia, congestión y trombosis; que predominaron sobre las alteraciones celulares provocadas por la replicación del parásito en la placenta y el feto como se pensó en un inicio.

Así mismo, los resultados obtenidos nos permiten sugerir distintos mecanismos asociados al desarrollo de la patogenia de la toxoplasmosis congénita, independientes de la replicación del parásito en la UFP; observándose distintos patrones de lesión en los tejidos estudiados, reforzando la hipótesis de origen multifactorial.

La disfunción placentaria asociada a las alteraciones vasculares y el diferente grado de cambios hipóxicos e isquémicos, causando la denegación y/o necrosis, se asociaron en gran parte al daño observado en los fetos, más que la condición de la transmisión y replicación de *T. gondii* en ellos.

El uso del presente modelo murino de toxoplasmosis congénita, permite reproducir alteraciones morfológicas similares a las descritas en humanos, el desarrollo de lesiones de curso agudo de la toxoplasmosis congénita; cambios en la morfología de la placenta y su desarrollo, procesos de implantación, decidualización, vasculogénesis, poblaciones celulares y su desarrollo, aspectos de la respuesta inmune materna y fetal, así como regulación inmunoendocrina.

# 9. PERSPECTIVAS

Para determinar los efectos provocados por la infección de *T. gondii* sobre la gestación y el desarrollo embrionario/fetal; es necesario llevar a cabo otro tipo de análisis además de realizar estudios histopatológicos.

En estudios posteriores se pretende establecer la relación que existe entre los cambios morfológicos y funcionales de las diferentes poblaciones celulares placentarias, así como el papel de las células de la respuesta inmune en los diferentes procesos de la dinámica y el desarrollo placentario y si estos cambios son determinantes en la presentación de daño fetal y embrionario. La cuantificación de las poblaciones celulares en las UFP, así como del perfil de citocinas que predomina en los diferentes tercios de la gestación puede generar información que ayude a explicar los efectos de la infección de *T. gondii* en la gestación. Es por esta razón que se pretende realizar un análisis de las uNK, cuantificarlas, describir su morfología, realizar inmunohistoquímicas y microscopia confocal, con la finalidad de relacionar la expresión de citocinas en cada tercio de la gestación y su relación con la transformación de las AE, el desarrollo de la placenta y el mantenimiento de la gestación. Aunado a esto, también se realizara la medición del diámetro de las AE e histoquímicas para actina musculo liso, con el objetivo de determinar si hay cambios en la dinámica vascular directamente relacionados a la presencia del parásito.

# Anexo 1. Metodología con la cual se procesaron las muestras

Los tejidos recolectados fueron fijados 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 embriones/fetos, se cortaron tanto secciones longitudinales como transversales, incluyendo las placentas.

Las muestras fueron remitidas 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, sumergiéndose en soluciones de etanol a concentraciones ascendentes (80, 95 y 100%). Posterior a la deshidratación, los tejidos fueron sumergidos en una solución de alcohol absoluto-xileno (relación 1:1), al terminar, se realizaron dos lavados con xilol absoluto, cada uno de 3 minutos y finalmente fueron embebidos en parafina.

Después de la primera exposición con la parafina, los tejidos fueron retirados

del casete y se incluyeron en un molde metálico y fueron embebidos una segunda ocasión con parafina liquida, dejando solidificar a temperatura ambiente o a 4 °C durante 15 a 40 minutos. Una vez solidificada la parafina, se cortaron secciones con un micrótomo estándar (Microm Carl Zeiss HM35), de 5 a 7 µm de grosor. Los cortes se extendieron en el baño de flotación y se recuperaron en portaobjetos convencionales y en laminillas electrocargadas.

Una vez que los cortes histológicos estuvieron montados en las laminillas se procesaron según la técnica. Los cortes recuperados en portaobjetos convencionales fueron teñidos con HE (hematoxilina y eosina) y PAS (ácido peryódico de Schiff). Por otro lado, los cortes recuperados en laminillas electrocargadas fueron procesadas para IHQ (inmunohistoquímica) de *T. gondii*, e histoquímica PTAH (hematoxilina ácida fosfotungstíca); para su posterior revisión por microscopia óptica

# 1. Inmunohistoquímica para T. gondii

## 1.1 Soluciones y su preparación

La formalina amortiguada al 10%, se preparó mezclando 4 g de fosfato de potasio monobásico anhidro, 6.5 g de fosfato de potasio dibásico anhidro, 100 ml de formaldehído 37-40% y cbp 1000 ml de agua bidestilada. La solución amortiguadora de fosfatos (PBS) se preparó pesando 2.62 g de (NaH<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O) fosfato de sodio monobásico monohidratado, más 11.5 g de (NaH<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>) fosfato de sodio dibásico anhidro. Posteriormente se disolvieron ambas sales en aproximadamente 200 ml de agua bidestilada caliente y en agitación; y por último se aforo a 1000 ml con agua bidestilada.

El PBS Tween 20 al 0.05%, se preparó agregando 500 µl de Tween 20 a 1000 ml de PBS. Se almaceno a 4° C hasta su utilización.

Para preparar 100 ml de la dilución 1/8 de metanol con peróxido de hidrogeno, se mezclaron 12.5 ml de peróxido de hidrogeno con 87.5 ml de metanol absoluto.

### **1.2 Procedimiento**

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 al 5%.

De cada tejido a evaluar, se realizaron cortes 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 lavados con soluciones de etanol y agua destilada a concentraciones decrecientes (90, 80 y 70%). La acción de la peroxidasa endógena (de los tejidos) fue inhibida con lavados de 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%, posteriormente se bloqueó la avidina y biotina endógena (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 al 5%, durante 5 minutos y pasado este tiempo, a cada sección de tejido se aplicó una solución de bloqueo de unión sitios inespecíficos (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 con PBS (1:200) 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 en PBS (1:200), 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 la reacción fue detenida, 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).

# 2. Tinción de Hematoxilina acida fosfotungstíca de Mallory (PTAH)

## 2.1 Soluciones y su preparación

Para la solución de Zenker, se disolvieron 2.5 ml de ácido acético en 47.5 ml de Zenker. La hematoxilina ácida fosfotungstíca (PTAH) se preparó pesando 1.0 g de hematoxilina y 20.0 g de ácido fosfotungstíco, se mezclaron con un agitador magnético en cbp 1000 ml de agua destilada. La hematoxilina y el ácido fosfotungstíco se disolvieron de manera independiente en agua destilada, la solución de hematoxilina se calentó suavemente hasta su disolución completa; posteriormente la solución de hematoxilina se dejó enfriar a temperatura ambiente, una vez fría se mezcló con la solución de ácido fosfotungstíco. Finalmente, la solución se dejó reposar durante un mes (para permitir su maduración mediante reacciones de oxidación), en un recipiente de vidrio opaco y se almaceno a temperatura ambiente hasta su utilización.

Nota: En caso de no contar con el tiempo suficiente para dejar madurar la solución por oxidación, se le pueden adicionar de permanganato de potasio (0.117 g) a la mezcla de hematoxilina y ácido fosfotungstíco para madurarla rápidamente.

Para preparar la solución yodada de Langeron, se pesaron 1.0 g yodo metálico, 2.0 g de yoduro potásico; y se disolvieron en cbp 200.0 ml de agua destilada. La solución de tiosulfato de sodio al 5%, se realizó disolviendo acido oxálico al 5% y sulfato férrico al 4%. en agua destilada.

Ambas soluciones fueron almacenadas en recipientes de vidrio hasta su utilización.

## 2.2 Técnica de tinción

Una vez que las laminillas fueron desparafinadas, e hidratadas con alcoholes, se lavaron con agua destilada durante 3 a 5 minutos, transcurrido ese tiempo las laminillas fueron sumergidas en solución de dicromato de potasio durante toda la noche, con la finalidad de oxidar el tejido. A continuación, se lavaron los cortes con agua corriente durante 15-30 segundos para eliminar el exceso de solución de dicromato de potasio, posteriormente se les agrego solución yodada de lugol (lo suficiente para cubrir el tejido), durante 15 minutos; después de este paso, los tejidos fueron blanqueados con ácido oxálico hasta que disminuyo la coloración (aproximadamente 5 minutos). Posteriormente los tejidos fueron sumergidos en agua destilada (tres lavados) de 3 minutos cada uno.

Finalmente, a las laminillas se les agregó la mezcla de ácido fosfotungstíco y hematoxilina, durante toda la noche. Transcurrido eses tiempo, se enjuagaron con alcohol al 95% para eliminar el exceso de colorante, se deshidrataron con xileno y se montaron con resina.

# 3. Tinción de Ácido Peryódico de Schiff PAS

# 3.1 Soluciones y su preparación

Para preparar la solución acuosa de ácido peryódico al 0.5 %, se disolvieron 2.5 ml de ácido acético en 47.5 ml de Zenker. La solución de ácido clorhídrico 1 N se realizó mezclando 4.2 ml de ácido clorhídrico concentrado en 45.8 ml de agua destilada. Para preparar el reactivo de Schiff, se disolvieron 1 g de fucsina básica en 200 ml de agua destilada hirviendo; posteriormente la mezcla se dejó enfriar

hasta aproximadamente 50° C. y se le añadieron 0.5 g de carbón activado, se agito durante 1 minuto y se filtró. Se le añadieron 20 ml de solución sulfurosa que se preparó mezclando 6 ml de metabisulfito de sodio acuoso al 10% y 5 ml de ácido clorhídrico 1 N en 100 ml de agua destilada. Finalmente, la solución se guardó en un recipiente de vidrio en refrigeración y protegido de la luz; se dejó madurar por 24h (hasta que se tornó de color amarillo, lo que indica que está lista para su uso). Nota: para corroborar el funcionamiento del reactivo de Shiff, se colocan unas gotas en un vidrio de reloj y se agregan 10 ml de formol comercial (37-40%), si se torna magenta rápidamente, la solución no funcional, de ponerse morado-azuloso y/o retardarse la reacción, la solución no funciona y deberá desecharse.

## 3.2 Técnica de Tinción

Las laminillas se desparafinaron en platina, u horno; posteriormente se hidrataron con (xilol y concentraciones decrecientes alcoholes 95%, 80%, 70%); se lavaron con agua destilada durante 3 a 5 minutos. Transcurrido este tiempo, las laminillas se sumergieron en la solución de ácido peryódico de Schiff (0.5 %); durante 15 a 30 minutos. Después se realizaron 3 lavados de 3 minutos cada uno, con solución sulfurosa y posteriormente para eliminar los restos de solución sulfurosa, las laminillas se lavaron con agua corriente durante 10 minutos. Finalmente, las laminillas son teñidas con hematoxilina (colorante de contraste) para teñir los núcleos. Finalmente se lavaron con agua corriente para eliminar el exceso de colorante, se aclararon y montaron con resina.

# 7. Referencias

- 1. Abou-Bacar A, Pfaff AW, Letscher-Bru V, Filisetti D, Rajapakse R, Antoni E, Villard O, Klein JP, Candolfi E. Role of gamma interferon and T cells in congenital Toxoplasma transmission. Parasite Immunol. 2004; 26,315–318.
- 2. Abrahamsohn PA, Zorn TM. Implantation and decidualization in rodents. J Exp Zool 1993; 266(6): 603–28.
- 3. Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C, *et al.* Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. Dev Biol. 2002; 250(2): 358–73.
- Aguilar–Orozco Mónica. Transmisión vertical de *Toxoplasma gondii* en un modelo de ratonas Balb/c durante el tercer tercio de la gestación (Tesis de Licenciatura). 2015; México, D.F., México. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 5. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate materna Itolerance to the fetus. Nat.Immunol. 2004; 5,266–271. DOI: 10.1038/ ni1037
- Barbosa BF, Silva DA, Costa, IN, Pena JD, Mineo JR, Ferro EA. Susceptibility to vertical transmission of *Toxoplasma gondii* is temporally dependent on the preconceptional infection in *Calomys callosus*. Placenta. 2007; 28, 624–630. DOI: 10.1016/j.placenta.2006.10.011
- Benirschke K, Burton GJ, Baergen RN. Early development of the human placenta. Pathology of the human placenta San Diego, CA: Springer, Berlin Heidelberg. 41–53. 2012.
- 8. Benavides J, Maley S, Pang Y, Palarea J, Eaton S, Katzer F *et al.* Development of lesions and tissue distribution of parasite in lambs orally infected with sporulated oocysts of *Toxoplasma gondii*. Vet Parasitol. 2011; 179 (1-3): 209-215.
- Bevilacqua EM, Abrahamsohn PA. Ultrastructure of trophoblast giant cell transformation during the invasive stage of implantation of the mouse embryo. J Morphol. 1988;198(3):341 51.
- 10. Bevilacqua EM, Abrahamsohn PA. Trophoblast invasion during implantation of the mouse embryo. Arch Biol Med Exp (Santiago). 1989; 22(2): 107–18.
- 11. Buxton D, Gilmour JS, Angus KW, Blewett DA, Miller JK. Perinatal changes in toxoplasma infected lambs. Res Vet Sci. 1982; 32, 170-176.
- Buxton D, Finlayson J. Experimental infection of pregnant sheep with *Toxoplasma* gondii: pathological and immunological observations on the placenta and foetus J Comp Pathol. 1986; 96: 319-333.

- Buxton D, Thomson KM, Maley S, Wright S, Bos HJ. Experimental challenge of sheep 18 months after vaccination with a live (S48) *Toxoplasma gondii* vaccine. Vet Rec. 1986a; 133: 310-312.
- Buxton D, Uggla A, Lövgren K, Thomson K, Lundén A, Morein B, Blewett DA. Trial of a novel experimental *Toxoplasma gondii* vaccine in pregnant sheep. Br Vet J. 1989; 145,451–457.
- Bresciani KD, Costa AJ, Toniollo GH, Sabatini GA, Moraes FR, Paulillo AC, Ferraudo AS. Experimental toxoplasmosis in pregnant bitches. Vet. Parasitol. 1999; 86,143– 145.
- Bresciani KD, Toniollo GH, Costa AJ, Sabatini GA, Moraes FR. Clinical, parasitological and obstetric observations in pregnant bitches with experimental toxoplasmosis. Ciênc. Rural. 2001; 31,1039–1043.
- Bresciani KD, Costa AJ, Toniollo GH, Luvizzoto MC, Kanamura CT, Moraes FR, Perri SH, Gennari SM.Transplacental transmission of *Toxoplasma gondii* in reinfected pregnant female canines. Parasitol Res. 2009; 104,1213–1217.
- Bresciani KD, Galvão ALV, de Vasconcellos AL, Soares JA, de Matos LVS, Pierucci JC *et al.* Relevant aspects of human toxoplasmosis. Research Journal of Infectious Diseases. 2013; 1:7.
- 19. Buzoni-Gatel D, Werts C. *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system. Trends in Parasitol. 2006; 22 (10): 448-452.
- Cabañas-Cortés MA, Reyes-Maldonado E, Montiel-Cervantes L, Domínguez-López ML, Jiménez-Zamudio L, García-Latorre E. *Toxoplasma gondii*: effect of maternal infection in the development of lymphoid organs of BALB/c neonates. Exp Parasitol. 2009; 121,279–287.
- 21. Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, *et al.* Embryo implantation. Dev Biol. 2000; 223(2): 217–37.
- 22. Castaño P, Fuertes M, Ferre I, Fernández M, Ferreras M del C, Moreno Gonzalo J *et al.* Placental thrombosis in acute phase abortions during experimental *Toxoplasma gondii* infection in sheep. Vet Res. 2014; 45:49.
- Cedillo-Peláez Carlos. Determinación de genotipos de *Toxoplasma gondii* en fauna silvestre en México (Tesis de Maestría). 2009; México, D.F., México. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 24. Cedillo-Peláez Carlos. Diversidad genética de *Toxoplasma gondii* en animales domésticos y fauna silvestre en México y correlación de su patogenicidad en casos clínicos (Tesis de Doctorado). México, D.F., México. Universidad Nacional Autónoma de México. 2015.

- 25. Cedillo-Peláez Carlos. *Toxoplasma gondii*: Diversidad genética y su relación con las presentaciones clínicas en diferentes hospedadores. Simposio de actualidad en zoonosis. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México D.F, 2017.
- 26. Cha J, Sun X, Dey SK. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. Nat Med 2012; 18(12): 1754–68.
- Clark DA, Ding JW, Yu G, Levy GA, Gorczynski RM: Fgl2 prothrombinase expression in mouse trophoblast and decidua triggers abortion but may be countered by OX-2. Mol Hum Reprod. 2001; 7: 185–194.
- Costa IN, Angeloni MB, Santana LA, Barbosa BF, Silva MC, Rodrigues AA, Rostkowsa C, Magalhães PM, Pena JD, Silva DA, Mineo JR, Ferro EA. Azithromycin inhibits vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae). Placenta. 2009; 30,884–890.
- 29. Cross JC, Werb Z, Fisher SJ. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. Science. 1994; 266 (5190): 1508–18.
- 30. Croy A, Yamada A, DeMayo FJ, Adamson LS. The guide to investigation of mouse pregnancy. Elsevier. 2014.
- Cunningham FG, Hauth JCH, Leveno KJ, Gilstrap III L, Bloom SL, Wenstrom KD. Fetal growth disorders (Chapter 38). In: McGraw-Hill. Williams obstetrics, New York, 2nd ed; 2005 p.893.
- 32. Darde ML. Genetic analysis of diversity in *Toxoplasma gondii*. Annali dell'Istituto Superiore di Sanitá. 2004; 40 (1): 57-63
- 33. Darcy F, Zenner L. Experimental models of toxoplasmosis. Research in Immunology. 1993; 144, 16–23.
- 34. Das SK, Wang XN, Paria BC, Damm D, Abraham JA, Klagsbrun M, et al. Heparinbinding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. Development. 1994; 120(5): 1071–83.
- 35. Das SK, Chakraborty I, Paria BC, Wang XN, Plowman G, Dey SK. Amphiregulin is an implantation-specific and progesterone-regulated gene in the mouse uterus. Mol Endocrinol. 1995; 9(6): 691–705.
- 36. Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, *et al.* Molecular cues to implantation. Endocr Rev. 2004; 25(3): 341–73.
- 37. Dubey JP, UrbanJr FR. Diagnosis of transplacentally induced toxoplasmosis in pigs. Am J Vet Res. 1990; 51,1295–1299.
- 38. Dubey JP, Shen SK, Kwok OC, Thulliez P. Toxoplasmosis in rats (Rattus norvegicus):

congenital transmission to first and second generation offspring and isolation of *Toxoplasma gondii* from seronegative rats. Parasitology. 1997; 115, 9-14.

- Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clinical Microbiology Reviews. 1998; 11 (2): 267-99.
- 40. Dubey JR, Bhaiyat MI, de Allie C, Macpherson CNL, Sharma RN, Sreekumar C, *et al.* Isolation, tissue distribution, and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens in Grenada, West Indies. J Parasitol. 2005; 91, pp. 557-560.
- 41. Dubey JP. Toxoplasmosis of animals and man. 2nd ed. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA. 2010.
- Dunn D, Wallon M, Peyron F, Petersen E, Peckham C, Gilbert R. Mother to child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. Lancet. 1999; 353, 1829-33.
- 43. Etheredge GD, Michael G, Muehlenbein MP, Frenkel JK. The roles of cats and dogs in the transmission of toxoplasma infection in kuna and embera children in eastern panama. Rev PanamerSalud Pub/Pan Amer JPub Health. 2004; 16(3), 176-186.
- 44. Elbez-Rubinstein A, Ajzenberg D, Dardé ML, Cohen R, Dumétre A, Yera H *et al.* Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. J Infect Dis. 2009; 199 (2): 280-285
- 45. Freyre A, Falcón J, Méndez J, González M. *Toxoplasma gondii*: an improved rat model of congenital infection. Exp Parasitol. 2008; 120, 142–146.
- 46. Flori P, Hafid J, Bourlet T, Raberin H, Genin C, Sung RT. Experimental model of congenital toxoplasmosis in guinea-pigs: use of quantitative and qualitative PCR for the study of materno-fetal transmission. J Med Microbiol. 2002; 51, 871–878.
- 47. Flori P, Hafid J, Thonier V, Bellete B, Raberin H, Tran Manh Sung R. Parasite load in guinea pig foetus with real time PCR after materno-foetal transmission of *Toxoplasma gondii*. Parasite. 2003; 10, 133–140.
- Favoreto Jr S, Ferro EAV, Clemente D, Silva DAO, Mineo JR. Experimental infection of *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae) by *Toxoplasma gondii*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998; 93(1), 103-107. DOI: 10.1590/S0074-02761998000100018
- 49. Ferguson DJ. Use of molecular and ultraestructural markers to evaluate stage conversión of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. Int J Parasitol. 2004; 34 (3): 347-360.
- 50. Ferguson DJP, Dubremetz JF. The Ultrastructure of Toxoplasma gondii. En: Weiss LM, Kim K. Editor. Toxoplasma gondii, the model Apicomplexan: perspectives and

methods. 2nd ed. Academic Press. China. 2014: 19-59.

- 51. Ferro EAV, Bevilacqua E, Favoreto Jr S, Silva DAO, Mortara RA, Mineo JR. *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae) trophoblast cells as host cells to *Toxoplasma gondii* in early pregnancy. Parasitol Res. 1999; 85: 647-654.
- Ferro EAV, Silva DAO, Bevilacqua E, Mineo JR. Effect of *Toxoplasma gondii* infection kinetics on trophoblast cell population in *Calomys callosus*, a model of congenital toxoplasmosis. Infect Immun. 2002; 70: 7089-7094
- 53. Flegr J, Príplatova L, Hampl R, Bicikovíá M, Ripova D, Mohr P. Difference of neuroand immunomodulatory steroids and selected hormone and lipid concentrations between *Toxoplasma*-free and *Toxoplasma*-infected but not CMV-free and CMVinfected schizophrenia patients. Neuro Endocrinol Letters. 2014; 35 (1): 20-27.
- 54. Franco, PS, Silva, DA, Costa, IN, Gomes AO, Silva AL, Pena JD, et al. Evaluation of vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in *Calomys callosus* model after reinfection with heterologous and virulent strain. Placenta. 2011; 32, 116–120. DOI: 10.1016/j.placenta.2010.11.012
- 55. Furuya M, Ishida J, Inaba S, Kasuya Y, Kimura S, Nemori R, *et al.* Impaired placental neovascularization in mice with pregnancy-associated hypertension. Lab Invest 2008; 88: 416–29.
- 56. Freyre, A, Falcon J, Mendez J, Rodriguez A, Correa L, Gonzalez M. *Toxoplasma gondii*: partial cross-protection among several strains of the parasite against congenital transmission in a rat model. Exp Parasitol. 2006; 112,8–12.
- 57. Fux, B, Ferreira AM, Cassali GD, Tafuri WL, Vitor RWA. Experimental toxoplasmosis in BALB/c mice. Prevention of vertical disease transmission by treatment and reproductive failure in chronic infection. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000; 95, 121–126.
- 58. Georgiades P, Ferguson-Smith AC, Burton GJ. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. Placenta. 2002; 23(1): 3–19.
- 59. Ge YY, Zhang L, Zhang G, Wu JP, Tan MJ, Hu W, Liang YJ., Wang Y. In pregnant mice: the infection of *Toxoplasma gondii* causes the decrease of CD4+ CD25+ regulatory T cells. Parasite Immunol. 2008; 30,471–481.
- Haumont M, Delhaye L, Garcia L, Jurado M, Mazzu P, Daminet V, Verlant V, Bollen A, Biemans R, Jacquet A. Protective immunity against congenital toxoplasmosis with recombinant SAG1 protein in a Guinea pig model. Infect Immunol. 2000; 68,4948– 4953.
- 61. Heffess CS, Mullick FG. Métodos histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América. Washington, D.C., EU. 1995.
- 62. Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. Biology and epidemiology of Toxoplasma gondii

in man and animals. An Health Res Rev. 2005; 6(1): 41-61.

- 63. Hunter CA, Sibley LD. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. Nature Rev Microbiol. 2012; 10(11): 766-778.
- 64. Jungersen G, Bille-Hansen V, Jensen L, Lind P.Transplacental transmission of *Toxoplasma gondii* in minipigs infected with strains of different virulence. J Parasitol. 2001; 87,108–113.
- Kraus FT, Sobin LH, Tocker JT, et al. Anatomy, structure and function. En: Kraus FT, Sobin LH, Tocker JT, et al. (eds). Placental Pathology. Washington, DC: AFIP. pp. 1–22. 2004.
- Liu X, Zhao M, Yang X, Han M, Xu X, Jiang Y, et al. Toxoplasma gondii infection of decidual CD1c+ dendritic cells enhances cytotoxicity of decidual natural killer cells. Inflammation. 2014; 37,1261–1270. DOI: 10.1007/s107530149853
- Liu X, Zhao M, Xu X, Liu X, Zhang H, Jiang Y, et al. Adoptive transfer of Treg cells counters adverse effects of *Toxoplasma gondii* infection onpregnancy. J Infect Dis 2014a; 210,1435–1443. DOI: 10.1093/infdis/jiu265
- Ma WG, Song H, Das SK, Paria BC, Dey SK. Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100(5): 2963–8.
- Malassiné A, Frendo JL, Evain-Brion D. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. Hum Reprod Update. 2003; 9(6): 531–9.
- Matowicka-Karna J, Dymicka-Piekarska V, Kemona H. Does *Toxoplasma gondii* infection affect the levels of IgE and cytokines (IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, and TNF-alpha) Clin Dev Immunol. 2009; 2009:374696. DOI: 10.1155/2009/374696.
- 71. McGavin MD, Zachary JF. Pathologic basis of veterinary disease. 4th ed. Mosby Elsevier. China. 2007.
- 72. Mévélec MN, Bout D, Desolme B, Marchand H, Magné R, Bruneel O, BuzoniGatel, D. Evaluation of protective effect of DNA vaccination with genes encoding antigens GRA4 and SAG1 associated with GM-CSF plasmid, against acute, chronical and congenital toxoplasmosis in mice. Vaccine. 2005; 23, 4489–4499.
- 73. Mévélec MN, Ducournau C, Bassuny Ismael A, Olivier M, Sèche E, Lebrun M, Bout D, Dimier-Poisson I. Mic1-3 knockout *Toxoplasma gondii* is a good candidate for a vaccine against *T. gondii*-induced abortion in sheep. Vet Res. 2010; 41,49.
- 74. Miller CM, Boulter NR, Ikin RJ, Smith NC. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. 2009; 39 (1): 23-39.
- Maenz M, Schlüter D, Liesenfeld O, Schares G, Gross U, Pleyer U. Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. Progress in Retinal and Eye Research. 2014; 39:77-106.
- 76. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet. 2004; 363 (9425): 19651976
- 77. Parr EL, Tung HN, Parr MB. Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats. Biol Reprod. 1987; 36(1): 211–25.
- 78. Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, Su C. Population structure and mousevirulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. International Journal for Parasitology. 2008; 38 (5): 561-569.
- 79. Pfaff AW, Abou-Bacar A, Letscher-Bru V, Villard O, Senegas A, Mousli M, *et al.* Cellular and molecular physiopathology of congenital toxoplasmosis: the dual role of IFN-gamma. Parasitol. 2007; 134(Pt 13): 1895–902.
- 80. Powell CC, Lappin MR. Clinical ocular toxoplasmosis in neonatal kittens. Vet Ophthalmol. 2001; 4,87–92.
- 81. Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. Veterinary Pathology. 2005; 42: 405-426.
- Ribeiro M, Lopes-Maria JB, Costa LF, Silva DA, De Freitas Barbosa B, *et al.* Experimental infection of *Calomys callosus* with atypical strains of *Toxoplasma gondii* shows gender differences in severity of infection. Parasitol Res. 2014; 113, 2655– 2664. DOI: 10.1007/s00436-014-3920-y
- Remington JS, Jacobs L, Kaufman HE. Studies on chronic toxoplasmosis; the relation of infective dose to residual infection and to the possibility of congenital transmission. Am J Ophtalmol. 1958; 46, 261-267.
- 84. Remington J, McLeod SR, Thulliez P, Desmonts G. Toxoplasmosis. In Infectious diseases of the fetus and newborn infant, ed. Elsevier Saunders. 2006; 947–1091.
- 85. Reynolds LP, Borowicz PP, Vonnahme KA, *et al.* Animal models of placental angiogenesis. Placenta. 2005; 26: 689–708.
- 86. Roa I, Smok SC, Prieto GR. Placenta: Anatomía e Histología Comparada. Int J of Morphology. 2012; 30, 1490–1496.
- Roberts CW, Alexander, J. 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. 1992; 104,19–23.
- 88. Rojas M, Rodríguez A. Placenta. Embriología para Medicina Veterinaria. Facultad de Medicina, Universidad de Chile, 1987.
- 89. Rossant J, Cross JC. Placental development: lessons from mouse mutants. Nat Rev

Genet. 2001; 2(7): 538–48.

- 90. Schoondermark-Van de Ven E, Mechers W, Galama J, Camps W, Eskes T, Meuwissen J. Congenital toxoplasmosis: an experimental study in rhesus monkeys for transmission and prenatal diagnosis. Exp Parasitol. 1993; 77,200–211.
- 91. Su C, Zhang X, Dubey JP. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites. International Journal for Parasitology. 2006; 36(7): 841-848.
- 92. Su C, Shwab EK, Zhou P, Zhu XQ, Dubey JP. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. Parasitology. 2010; 137(1): 1-11.
- 93. Su C, Khan A, Zhou P, Majumdar D, Ajzenberg D et al. 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. 2012; 109(15): 5844-5849. 230
- 94. Sutherland A. Mechanisms of implantation in the mouse: differentiation and functional importance of trophoblast giant cell behavior. Dev Biol. 2003; 258 (2): 241–51.
- 95. Senegas A, Villard O, Neuville A, Marcellin L, Pfaff AW, Steinmetz T, Mousli M, Klein JP, Candolfi E. *Toxoplasma gondii*-induced foetal resorption in mice involves interferon-gamma-induced apoptosis and spiral artery dilation at the maternofoetal interface. Int J Parasitol. 2009; 39, 481–487.
- 96. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol. 2000; 30(12-13): 1217-1258.
- 97. Vargas-Villavicencio JA, Cedillo-Peláez C, Rico-Torres CP, Besné-Mérida A, García-Vázquez F, Saldaña JI, Correa D. Mouse model of congenital infection with a nonvirulent *Toxoplasma gondii* strain: Vertical transmission "sterile" fetal damage, or both? Exp Parasitol. 2016; 166: 116–123. DOI: 10.1016/j.exppara.2016.04.002
- 98. Weidner JM, Barragan A. Tightly regulated migratory subversion of immune cells promotes the dissemination of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. 2014; 44(2): 85-90.
- 99. Wong SY, Remington JS, Toxoplasmosis in pregnancy. Clin Infect Dis. 1994; 18, 853–86.
- 100. Wong SY, Remington JS, Toxoplasmosis in pregnancy. Clin Infect Dis. 1994; 18, 853–86.
- 101. Xu X, Zhao M, Liu X, Jiang Y, Zhang H, Zhai X, et al. Toxoplasma gondii infection regulates the balance of activating and inhibitory receptors on decidual natural killer cells. PLoS ONE. 2013; 8: 55432. DOI: 10.1371/journal.pone. 0055432.

- 102. Zenner L, Foulet A, Caudrelier Y, Darcy F, Gosselin B, Capron A, Cesaron Delauw FM. Infection with *Toxoplasma gondii* RH and Prugniaud strains in mice, rats and nude rats: kinetics of infection in blood and tissues related to pathology in acute and chronic infection. Pathol Res Pract. 1999; 195,475–485.
- 103. Zhang H, Hu H, Liu X, Zhang R, Fu Q, Xu X. The Treg/Th17 imbalance in *Toxoplasma gondii*-infected pregnant mice. Am J Reprod Immunol. 2012; 67,112–121. DOI:10.1111/j.1600-0897.201101065.