

43
24-

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

**“Evaluación de la respuesta inespecífica contra
Toxoplasma gondii en murinos inmunestimulados
con *Lactobacillus casei*”.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ARMANDO RAMIREZ MORALES



MEXICO, D. F.

MAYO, 1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

LA PRESENTE INVESTIGACIÓN SE DESARROLLÓ EN EL LABORATORIO DE
INMUNOPARASITOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA DE LA
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA Q. B. P. OLGA IXTA RODRÍGUEZ Y EL
ASESORAMIENTO DEL

DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA

PROYECTO NO. 964255 FINANCIADO POR DEPI

A la Universidad Nacional Autónoma de México, y en especial a la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza" :

Por acogernos en sus aulas y brindarnos los conocimientos teórico-prácticos que hemos adquirido para nuestra formación profesional.

A quienes conformaron el jurado de tesis :

Dr. Rubén Marmuquín Segura

Q.B.P. Olga Ixta Rodríguez

Q.B.P. María Luisa Delgado Briseño

Q.F.B. Antonino Sáenz Prieto

Q.F.B. Yolanda Flores Cabrera

Por sus valiosos comentarios y sugerencias en la revisión de este escrito.

A los profesores :

M. en C. Carlos Ramón Bautista García

M. en C. Federico Martínez Gómez

Q.B.P. Blanca Rosa Aguilar Figueroa.

Por el apoyo y asesoría que brindaron para la realización de este proyecto.

A la Jefatura de carrera y a la Secretaria Técnica:

Por aceptarme como parte de su equipo de trabajo y ayudarme siempre durante toda la realización de la tesis.

Al Instituto Politécnico Nacional, en particular a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas:

Por albergarnos en sus laboratorios y permitir que se llevara a cabo este trabajo de investigación.

A DIOS :

Por todo lo que hasta ahora me ha dado y no he sabido agradecer.

A MI PADRE:

Por que ahora que estas lejos, me doy cuenta de cuanto me haces falta y cuanto podríamos hacer juntos.

A MI MADRE:

Por enseñarme a ser perseverante y haberme apoyado en las buenas y en las malas.

A MIS HERMANOS :

Por las críticas, a veces tan duras, que me han servido para ser mejor cada día.

A UNAS PERSONAS MUY ESPECIALES :

Enrique, por haberme enseñado a no complicarme la vida y a luchar sin descanso para lograr cada una de mis metas.

Antonina, por enseñarme a tener confianza en mi mismo y compartir conmigo tus experiencias.

Manuel, por ayudarme en todo momento de una manera sincera y desinteresada.

René, por mostrarme el lado alegre de la vida.

Gaby, porque en ti encuentre una razón para realizar todos mis sueños e ilusiones

Chuy, por tu nobleza y comprensión que me dieron fuerza para concluir lo que había empezado.

Sara, por haber estado conmigo en la etapa más dura de mi vida y darme fuerza para levantarme y ver hacia delante.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS :

Por todas las cosas buenas que pasamos juntos y que jamás voy a olvidar.

A TODOS LOS PROFESORES :

Que con sus enseñanzas han forjado en mi el sentido de ética y honestidad de un profesionista.

A TODAS LAS PERSONAS QUE HE CONOCIDO A LOS LARGO DE LA VIDA :

Por que cada una de sus enseñanzas forma parte importante de mi forma de ser.

Este trabajo se lo dedicó a una persona que fue un pilar en mi formación. Él ya no está con nosotros ; sin embargo, mi familia y yo lo recordamos con mucho cariño y respeto. Quisiera que él estuviera aquí para compartir conmigo esta etapa importante de mi vida. Se que esto no es posible pero tengo la esperanza que a donde este, se sienta orgulloso y contento de este logro, porque en mucho es parte de él.

Quisiera agradecer a su esposa *Rebeca Ruiz Esperza* y a sus hijos *Alejandro* y *Daniela*, los cuales al igual que él, me ayudaron mucho para realizar este trabajo.¡ Gracias por todo !.

En memoria de :

Ing. Alejandro Mendoza Morales

**“ Evaluación de la respuesta inespecífica contra
Toxoplasma gondii en murinos inmunoestimulados
con *Lactobacillus casei* “**

	<i>PAGINA</i>
<i>I. INTRODUCCION</i>	<i>1</i>
<i>II. FUNDAMENTACION TEORICA</i>	<i>3</i>
<i>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</i>	<i>40</i>
<i>IV. OBJETIVOS</i>	<i>51</i>
<i>V. HIPOTESIS DE TRABAJO</i>	<i>62</i>
<i>VI. METODOLOGIA GENERAL</i>	<i>63</i>
<i>VII. RESULTADOS</i>	<i>68</i>
<i>VIII. DISCUSION DE RESULTADOS</i>	<i>68</i>
<i>IX. CONCLUSIONES</i>	<i>71</i>
<i>X. ANEXOS</i>	<i>72</i>
<i>XI. REFERENCIAS</i>	<i>75</i>

Número	Cuadro	Página
1	Especies del género <i>Toxoplasma</i> .	4
2	Seroprevalencia de anticuerpos contra <i>T. gondii</i> en humanos.	18
3	Inmunoestimulantes de uso clínico	46
4	Esquema de inmunoestimulación e infección con <i>T. gondii</i> empleado en este estudio.	59
5	Diluciones seriadas de la curva estándar para la determinación de IFN- γ murino.	60
6	Porcentajes de sobrevivencia obtenidos en este experimento.	67
7	Porcentajes de sobrevivencia y niveles de IFN- γ obtenidos en este experimento.	67

Número	Figura	Página
1	Representación esquemática del taquizoito de <i>T. gondii</i> .	6
2	Endodiogenia observada con el microscopio electrónico.	7
3	Ciclo biológico de <i>T. gondii</i>	12
4	Efecto de <i>L. casei</i> contra la infección por <i>T. gondii</i> en murinos NIH (Ensayo 1)	63
5	Efecto de <i>L. casei</i> contra la infección por <i>T. gondii</i> en murinos NIH (Ensayo 2)	64
6	Efecto de <i>L. casei</i> contra la infección por <i>T. gondii</i> en murinos NIH (Ensayo 3)	64
7	Comparación del porcentaje de sobrevivencia y concentración de IFN- γ en murinos inmunoestimulados con <i>L. casei</i> viable y confrontados a <i>T. gondii</i> siete días después.	65
8	Comparación del porcentaje de sobrevivencia y concentración de IFN- γ en murinos inmunoestimulados con <i>L. casei</i> muerto por calor y confrontados a <i>T. gondii</i> siete días después.	65
9	Comparación del porcentaje de sobrevivencia y concentración de IFN- γ en murinos inmunoestimulados con sobrenadante y confrontados a <i>T. gondii</i> siete días después.	66
10	Comparación del porcentaje de sobrevivencia y concentración de IFN- γ en murinos no inmunoestimulados y confrontados a <i>T. gondii</i> siete días después.	66

I. INTRODUCCION.

Toxoplasma gondii es el agente causal de la enfermedad conocida como toxoplasmosis. Esta enfermedad raramente se presenta o cursa asintomática en los individuos inmunocompetentes. Sin embargo, esta situación cambia en los individuos inmunocomprometidos, ya que este parásito oportunista puede causar secuelas tan graves como la coriorretinitis, encefalitis y sobre todo la muerte del paciente.

Però esto no queda aquí, ya que existe otro grupo de alto riesgo que puede ser susceptible a la infección. Este grupo lo conforman los fetos de madres que adquieren la infección durante el embarazo. Las secuelas que pueden producirse dependen de la etapa en que se adquiere la infección. Cuadros como ceguera, microcefalea, hidrocefalea, sordera, retraso mental o la muerte del producto son algunas de las consecuencias que pueden presentarse en estos casos [1].

Desgraciadamente, como sucede con muchas de las enfermedades humanas, no existe todavía una vacuna que pueda ser usada para prevenir la infección por *T. gondii*. Además, los tratamientos terapéuticos contra este parásito no son tan efectivos como se quisiera.

No obstante, en los últimos años se han realizado estudios sobre el efecto protector que tienen algunas sustancias ante diversos agentes patógenos. Estas sustancias se han denominado *Inmunostimulantes*, y tienen la característica de incrementar la respuesta inmune de manera inespecífica. Este tipo de respuesta es suficiente para la eliminación de tales agentes patógenos. El origen de los inmunostimulantes es muy variable, sin embargo, muchos de ellos se han aislado de paredes bacterianas y fúngicas [2].

Algunos investigadores han demostrado que *Lactobacillus casei*, una bacteria que se emplea en la industria láctica como fermentador, tiene un efecto inmunostimulante en el modelo murino. Esta inmunostimulación ha demostrado que puede prevenir la infección de los agentes patógenos: *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Listeria monocytogenes*. [3-5]

En este contexto, el estudio del efecto protector de *Lactobacillus casei* sobre la infección de *Toxoplasma gondii* en el modelo murino resultaba casi una necesidad. Se espera que con este trabajo se

aclaren algunas de las dudas que existen acerca de los mecanismos inespecíficos que se desencadenan durante la inmunestimulación. Además, se pretende promover el uso de los Lactobacilos como agentes terapéuticos ante enfermedades tan graves como la toxoplasmosis.

II. FUNDAMENTACION TEORICA.

A. TOXOPLASMOSIS.

I. GENERALIDADES.

a. Aspectos históricos y etiología.

La toxoplasmosis es una zoonosis muy difundida en todo el mundo. El agente etiológico que la causa es el parásito intracelular obligado *Toxoplasma gondii*. El nombre genérico *Toxoplasma* deriva de las palabras griegas *toxos* = arco y *plasma* = forma, que hace referencia a la forma arqueada o de media luna que tiene el parásito.

T. gondii fue descrito por primera vez en 1908 por Nicolle y Manceaux, quienes lo aislaron del hígado y bazo de un pequeño roedor del Norte de África, *Ctenomys corymbosus*, que se había mantenido durante cierto tiempo en el Instituto Pasteur de Túnez. Casi al mismo tiempo, y de manera independiente, Splendore describe *T. gondii* en un conejo de laboratorio en Sao Paulo, Brasil y probablemente Darling lo aísla de seres humanos en el mismo año en Panamá. Al principio se consideró que el organismo era una especie de *Leishmania*, pero un año después, tras haber sido estudiado en mayor profundidad, se reconoció como un parásito diferente y se creó el nuevo género *Toxoplasma* [1, 6-12]

En 1923, Janku en Checoslovaquia, describe *T. gondii* en la retina de una niña que presumiblemente había muerto de toxoplasmosis generalizada, pero el papel del parásito como patógeno humano no fue establecido hasta que Wolf y Cowen en sus investigaciones realizadas de 1927 a 1942, demostraron progresivamente que *T. gondii* causa meningoencefalitis en el recién nacido y que la vía transplacentaria es el mecanismo de transmisión a través del cual el parásito pasa de la madre al producto [1, 6-11]

b. Taxonomía.

La situación taxonómica de *T. gondii* es confusa. Parece ser un protozoo con características similares a otros encuadrados en los géneros *Besnoitia* y *Hammondia*. Sin embargo, en la actualidad, la taxonomía más aceptada es la siguiente:

Reino: *Protista*
 Phylum: *Apicomplexa*
 Clase: *Sporozoa*
 Subclase: *Coccidia*
 Orden: *Eucoccidida*
 Suborden: *Eimerina*
 Familia: *Eimeridae*
 Género: *Toxoplasma*
 Especie: *gondii*

Se ha aislado *Toxoplasma* de una gran variedad de animales (mamíferos, aves, reptiles, etc.), para nombrarlos inicialmente se empleaba el término *Toxoplasma* seguido del nombre propio del animal donde se había hallado (Por ejemplo, *T. caniculi*, *T. canis*, *T. avium*, etc.). Sin embargo, después de una exhaustiva revisión de los ciclos de vida, estructuras y huéspedes, se reconocieron solamente siete especies de *Toxoplasma*, las cuales se muestran en la Cuadro 1. [9,13,14-16]

Cuadro 1. Especies del género *Toxoplasma*

Especie	Descubridor por	Huéspedes
<i>T. gondii</i>	Nicolle & Manceaux	200 especies de mamíferos y aves. Produce oocistos en felinos
<i>T. alencari</i>	Da Costa & Pereira	Rana (<i>Leptodactylus acellatus</i>)
<i>T. brumpti</i>	Coutelen	Iguana (<i>Iguana tuberculata</i>)
<i>T. colubri</i>	Tibaldi	Serpientes (<i>Coluber melanoleucus</i> y <i>Coluber viridiflavus</i>)
<i>T. hammondi</i>	Frenkel & Dubey	Ratón casero, Produce oocistos en el gato doméstico
<i>T. ranae</i>	Levine & Nye	Rana leopardo (<i>Rana pipiens</i>)
<i>T. serpai</i>	Scorza, Darget & Iturriza Arocha	Sapo (<i>Bufo marinus</i>)

2. MORFOLOGÍA.

T. gondii presenta distintas formas, en razón del huésped donde se encuentra en su ciclo vital. En el huésped intermediario, constituido por mamíferos, aves y el hombre, se presenta bajo las formas de taquizoito o bradizoito. En los huéspedes definitivos, que son los felinos (principalmente gato doméstico), se localizan a nivel intestinal con una morfología que oscila desde las formas esquizogónicas, merozoitos, gametocitos y gametos hasta el ooquiste no esporulado. En el medio externo se encuentran los ooquistes con esporoquistes y los ooquistes que contienen esporozoitos (ooquistes esporulados) [1,6,10,11,14].

a. Taquizoito.

El taquizoito (del griego *tuchos* = rápido), llamado también trofozoito, endozoito o forma proliferativa, tiene morfología oval o arqueada y corresponde a las formas de reproducción rápida dentro de las células. Mide de 4 a 7 µm de ancho por 2 a 4 µm de largo. Suele encontrarse localizado intracelularmente y puede parasitar cualquier tipo de célula, pero sobre todo las de cerebro, sistema retículo endotelial (SRE), retina, músculo cardíaco y músculo estriado. Los eritrocitos también pueden ser blanco de infección pero raramente se completa la invasión, y cuando esta ocurre el parásito no prolifera. Puede presentarse en forma libre, que a través de la linfa y sangre, a veces parasitando los leucocitos migratorios, se distribuye por todo el organismo. Permanece viable por tiempo indeterminado en saliva, leche, orina y líquido peritoneal [1,9-11,14,17-20].

Cuando se tiñen con Giemsa o Wright, se presenta en formaciones ovales o ligeramente arqueadas, con el citoplasma azulado y el núcleo (paracentral) de coloración rosada. Al microscopio electrónico (Figura 1), se observa la presencia de las siguientes estructuras: una doble membrana (cubierta externa), anillo polar, conoide, roptrias, micronemas, mitocondrias, microtúbulos subpelliculares, retículo endoplásmico liso y rugoso, aparato de Golgi, ribosomas, microporo y un núcleo paracentral bien definido con nucléolos centrales [1,6,9,10,17,20].

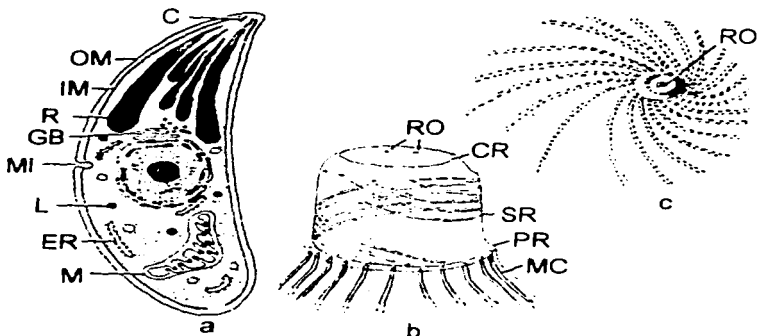


Figura 1. Representación esquemática del taquizoito de *T. gondii*. C, conoide; CR, anillo conoidal; FR, retículo endoplásmico; GB, cuerpo de Golgi; IM, membrana interna; L, lisosomas; M, mitocondria; MC, micronemas; MI, microporo; N, Núcleo; OM, membrana externa; PR, anillo polar; R, roptria; RO, abertura de la roptria; SR, anillo en espiral a) Organismo entero en corte longitudinal, b) Representación en tres dimensiones del polo anterior del taquizoito, c) Vista por encima del polo anterior, que muestra las aperturas de las roptrias

Fuente: Referencia 1.

Cuando el taquizoito penetra en el interior de la célula se multiplica asexualmente por endodiogamia repetida. La endodiogamia es una forma de división especializada, en la que dos células hijas se forman dentro de una célula progenitora, la cual se desintegra cuando se liberan las células jóvenes. Este proceso divisional ha sido estudiado con detalle con la microscopía electrónica (Figura 2). Primero, el núcleo cambia de forma y toma el aspecto de media luna (2). Después se desarrollan dos conoides por delante de los dos polos del núcleo semilunar (3). El núcleo comienza a dividirse y las células hijas siguen creciendo hasta que encierran la superficie de la célula madre (4). La membrana interna de la célula madre desaparece y se observan en el interior dos parásitos totalmente formados (5). El parásito madre se desintegra liberando los parásitos hijos [1,6,19,20]

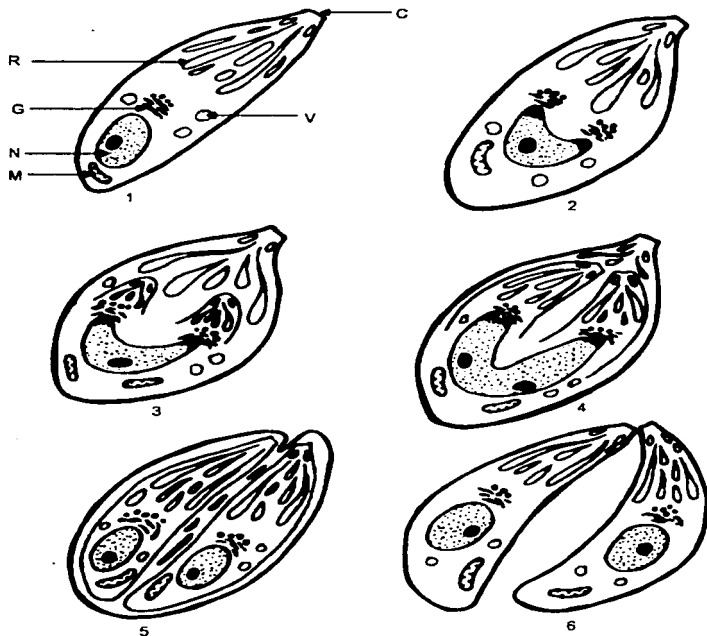


Figura 2. Endodiogenia observada con el microscopio electrónico. 1) Estructura del *Toxoplasma* antes de la división. R: roptrias, G: cuerpo de Golgi, N: núcleo, M: mitocondrias, C: conoide, V: vacuola. 2-6) Proceso de endodiogenia.

b. Quistes.

- Cuando la cepa es poco virulenta o el huésped desarrolla rápidamente una respuesta inmunitaria, los elementos que se encuentran en el interior de la vacuola celular se reproducen muy lentamente y se forma el quiste. El quiste es un etapa de "reposo" del parásito dentro del huésped. Los quistes son formaciones comúnmente subsféricas, aunque a veces, por la presión ejercida por los tejidos vecinos, adoptan formas poligonales, de tamaño variable, entre 10 y 200 μm , se localizan fundamentalmente en sistema nervioso central (SNC), músculo esquelético y cardíaco, y menos a menudo en pulmón, bazo y ganglios linfáticos. La pared del quiste es elástica, argirofílica y contiene hasta 3.000 bradizoitos. El quiste se desarrolla y permanece en el citoplasma de la célula huésped, su pared se encuentra íntimamente relacionada con el retículo endoplásmico y mitocondria. La pared quística está delimitada por material granular, el cual también llena los espacios entre los bradizoitos [1,9-11,15,17,19,21]

El proceso de formación de los quistes es el siguiente: las formas de multiplicación lenta (bradizoitos) secretan una serie de sustancias que se depositan en la membrana de la vacuola y posteriormente precipitan. A medida que los bradizoitos se multiplican, la vacuola aumenta de tamaño hasta que se produce la fusión de las granulaciones de la membrana vacuolar, momento en el que ésta se hace más resistente y ahora se denomina como membrana o pared quística. Este hecho se produce entre los 8 y 10 días de post-infección. La pared quística protege a *T. gondii* de las defensas del organismo [1]

El quiste, que es una formación que se encuentra en los huéspedes intermediarios (incluido el hombre) y en las células no epiteliales del intestino de los huéspedes definitivos, se transmite por vía digestiva. Los quistes dejan de ser infectantes por el calor a 60°C, desecación y la congelación a -20°C, seguida de descongelación [1,9,17,21-22]

c. Bradizoito.

Los bradizoitos (del griego *bradi* = lento) son, por tanto, formas de reproducción lenta que se encuentran en el interior del quiste. También se conocen como cistozoitos, quistozoitos y zoitocistos.

Morfológicamente son similares a los taquizoitos. Sin embargo, estos son más delgados, de menor tamaño y su núcleo está situado más cerca del polo posterior. Contienen varios gránulos de glucógeno, los cuales se tiñen de rojo con el reactivo de Schiff-ácido peryódico (PAS); estos gránulos no existen o son muy discretos en los taquizoitos. Biológicamente, los bradizoitos son menos susceptibles a la destrucción por enzimas proteolíticas que los taquizoitos, y en los gatos, la infección por éstos esta asociada a períodos prepatentes más cortos. Se reproducen igualmente por endodiogenia. [1,9,11,15,16,19,21]

d. Ooquistes.

Los ooquistes son elementos ovoides, de 10-12 µm de diámetro; su pared es gruesa y resistente, y sólo se han encontrado en el gato y otros félidos salvajes. Después de la ingestión de quistes por el gato, la pared quística se disuelve por la acción de enzimas proteolíticas en el estómago e intestino delgado. Los bradizoitos liberados penetran las células de epitelio intestinal e inician la formación de numerosas generaciones de *T. gondii* en etapas genéticamente predeterminadas. Antes de que se originen las gametogonias, se desarrollan cinco tipos asexuales de *T. gondii* estructuralmente distintas en las células de epitelio intestinal. Estas etapas se designan con las letras A, B, C, D y E. [1,6,9,10,14]

El origen de los gametocitos no se ha determinado. Probablemente, los merozoitos se liberan desde los esquizontes tipo D y E iniciándose la formación de los gametos. Los gametos aparecen por todo el intestino delgado, pero más comúnmente en el íleon, a partir del tercer al quinto día postinfección. Estos se encuentran distales al núcleo de la célula epitelial del huésped, cerca de las vellosidades del intestino delgado. El gameto femenino (macrogameto) es subsférico y contiene un núcleo localizado centralmente y varios gránulos PAS-positivos. Ultraestructuralmente, el macrogameto maduro contiene un conoide (conservado desde el merozoito), varios microporos, retículo endoplásmico rugoso y liso, numerosas mitocondrias, vesículas de doble membrana y cuerpos formadores de pared; los dos últimos son típicos de los macrogametos [1,9,19,20,23]

Los gametos masculinos (microgametos) tienen una forma ovoide o elipsoidal. Cuando la microgametogénesis ocurre, da lugar a la división del núcleo de los microgametos y se generan de 10 a 20 núcleos nuevos. Estos núcleos se mueven hacia la periferia del parásito, cerca de las protuberancias formadas en la membrana. Después de la división en microgametos se forman uno o dos cuerpos residuales. Cada microgameto es un organismo biflagelado [1,23]

Ultraestructuralmente, los microgametos están comprimidos lateralmente, constituidos principalmente de material nuclear. El polo anterior es una estructura apuntalada, en el cual están situados los cuerpos basales, los que dan origen a dos flagelos libres y largos. Anterior al núcleo, se localiza una gran mitocondria. De aquí se originan cinco microtúbulos, que posteriormente se extienden a lo largo del núcleo. Estos microtúbulos podrían representar el rudimento del tercer flagelo que se encuentra en otros coccidios. [1]

Los microgametos son pocos en número y constituyen del 2 al 4 % de la población de gametos maduros. Estos viajan para penetrar un macrogameto. Después de la penetración, se forma la pared del ooquiste alrededor del gameto fertilizado. Se forman cinco placas alrededor de la membrana del gameto. Los ooquistes cuando están maduros se descargan al lumen intestinal por la ruptura de las células de epitelio intestinal del gato [1,9,10,20,23]

Los ooquistes no esporulados tienen una forma subsférica o esférica, miden de 10 a 12 μm de diámetro. Su pared presenta dos placas incolores. Dentro de los ooquistes se encuentran los esporontes, los cuales ocupan casi todo el espacio interior. La esporulación ocurre afuera del gato a partir del primer al quinto día después de la defecación, dependiendo de las condiciones de aeración y temperatura.

La forma de los ooquistes esporulados es esférica o elipsoidal y estos miden de 11 a 13 μm de diámetro. Cada ooquiste esporulado contiene dos esporoquistes elipsoidales. Los esporoquistes miden de 6 a 8 μm . Los esporozoitos contenidos en los esporoquistes miden 2 x 6-8 μm , tienen un núcleo central o subterminal y pocos gránulos PAS-positivos en el citoplasma. Tienen cuerpos cristaloides o no refráctiles que comúnmente se encuentran en otros esporozoitos de coccidios. Ultraestructuralmente, el

esporozoito es similar a los taquizoitos, excepto en que en el primero hay una abundancia de micronemas y roptrias [1,9,19,20,23]

3. CICLO BIOLÓGICO.

El ciclo biológico de *T. gondii* (figura 3) se puede dividir en dos fases, una fase asexual que ocurre en los huéspedes intermediarios y definitivos y una fase sexual que sucede exclusivamente en los huéspedes definitivos (felidos) [1,10,12,13,20,24,25]

a. Ciclo asexual.

El ciclo asexual, también conocido como ciclo extraintestinal, inicia con la ingestión de quistes (1a,1b) u ooquistes de *T. gondii* (5b). Los quistes u ooquistes son digeridos en el intestino delgado por la acción de enzimas proteolíticas, liberando a los bradizoitos o esporozoitos, respectivamente (2a). Los bradizoitos o esporozoitos penetran las células de epitelio intestinal y es probable que lleguen al hígado por vía hematogena donde son ingeridos por las células de Kupffer, aunque también pueden infectar células del parenquima (2b). Los macrófagos transportan a *T. gondii* por todo el cuerpo. El parásito sobrevive y se replica dentro de la vacuola parasitófora del macrófago debido a que impide la fusión de esta con el lisosoma (3a). La división es por endodigonia, un proceso de división interna (3b). El ciclo de división produce rosetas de taquizoitos (3c). La replicación continua produce la lisis de la célula infectada, liberando taquizoitos, los cuales invaden a nuevos macrófagos y a otros tipos de células. Este ciclo se repite varias veces (3d). Cuando el huésped desarrolla resistencia, la velocidad de replicación del parásito disminuye, provocando la formación de quistes, dentro de los cuales se replica lentamente *T. gondii*, produciendo cientos o miles de bradizoitos. Estos quistes pueden permanecer latentes en el tejido del huésped por años. El enquistamiento ocurre en el huésped siempre y cuando los mecanismos de defensa de tipo celular estén suprimidos o reducidos significativamente (3e). La infección fetal puede llevarse a cabo por el paso de taquizoitos, vía transplacentaria, provenientes de la madre infectada (4) [13,20,24]

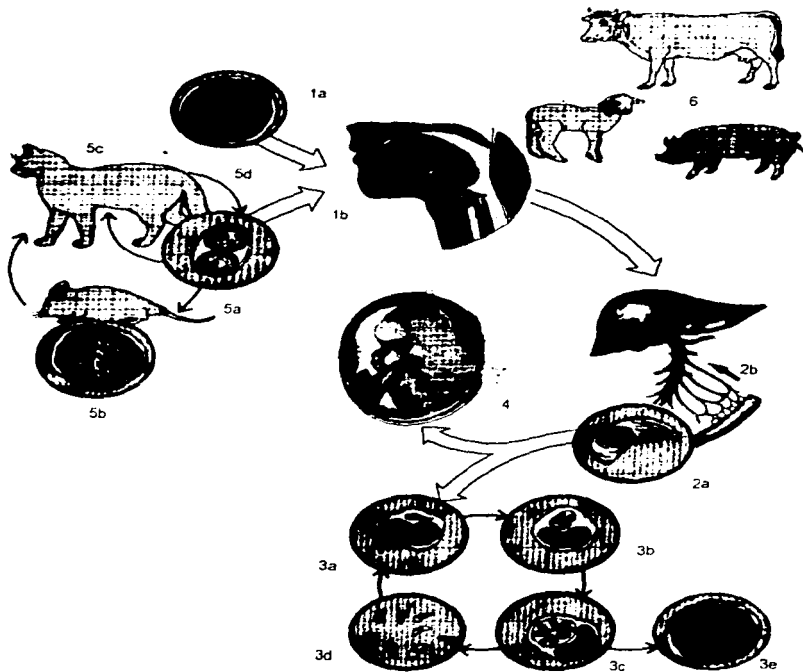


Figura 3. Ciclo biológico de *T. axei*

Fuente: Referencia 13

b. Ciclo sexual.

El ciclo sexual, llamado también ciclo enteroepitelial, ocurre solamente en los felinos. Los huéspedes intermediarios (por ejemplo, el ratón) podrían ser infectados por la ingesta de quistes u oocistos (5a), desarrollando quistes en todos sus tejidos (5b). El gato u otro felino puede infectarse por comer este tejido o ingiriendo oocistos provenientes de otro huésped definitivo. Los bradizoitos o esporozoitos que son liberados por la digestión de enzimas proteolíticas, penetran las células de epitelio columnar y se diferencian en merozoitos. Después de su replicación los merozoitos se liberan por la ruptura de las células epiteliales e infectan otras células adyacentes. Algunos merozoitos se diferencian en células presexuales llamadas macrogametocito y microgametocito (5c).

Los microgametocitos y los macrogametocitos se fusionan, formando cigotos llamados oocistos. Los oocistos entran al lumen intestinal y son defecados. Cada oocisto esporula en el ambiente, produciendo ocho esporozoitos, la etapa infectiva de *T. gondii* para cualquier huésped. El ciclo asexual también puede ocurrir en el huésped felino (5d) [13,20,24].

T. gondii puede infectar a mamíferos, aves y al hombre, inclusive todos los tipos de células dentro de un mismo huésped. Ningún otro parásito, virus, bacteria u hongo puede igualar su diversidad de huéspedes y su inespecificidad hacia algún órgano o tejido (6) [13].

4. RELACIÓN HUÉSPED-PARÁSITO.

El porque algunos individuos desarrollan toxoplasmosis y otros no, no está completamente entendido. La edad, la especie del huésped, la cepa de *T. gondii*, el número de parásitos y la vía de transmisión pueden explicar algunas de estas diferencias. Por ejemplo, los monos del Nuevo Mundo y marsupiales australianos son los animales más susceptibles a la toxoplasmosis, mientras que los monos del Viejo Mundo, ratas; vacas y caballos son altamente resistentes. Quizás la evolución, la genética y la ecología tengan algo que ver con esta susceptibilidad. Debido a que los monos del Nuevo Mundo

viven en los árboles y que pocas veces bajan al suelo, el riesgo al contagio por exposición a ooquistes es muy bajo, por lo que no adquirieron la resistencia a la toxoplasmosis en su proceso evolutivo.

Por otro lado, debido a que en Australia y en Nueva Zelanda no había gatos antes de la llegada del hombre blanco, los marsupiales no habían sido expuestos a ooquistes de *T. gondii* en su proceso evolutivo.

T. gondii fue (y sigue siendo) altamente patógeno para *Ctenodactylus gondii*, una especie que vive en las regiones secas y desérticas, donde la probabilidad de sobrevivencia de los ooquistes es nula, por tanto no existe el riesgo de infección natural.

La patogenicidad de *T. gondii* está estrechamente relacionada a la virulencia de la cepa y especie del huésped. Para el estudio de la toxoplasmosis se prefieren generalmente a los ratones como un modelo experimental debido al costo, conveniencia, disponibilidad, susceptibilidad y extrema rareza de enfermedad natural.

Las cepas de *T. gondii* varían en su patogenicidad en el ratón. Tales diferencias son más marcadas en aislamientos primarios puesto que la patogenicidad se incrementa por pases frecuentes en un huésped dado. Sin embargo, la adaptación a un huésped varía con las distintas cepas de *T. gondii*. Por ejemplo, la cepa RH mata cuatro de cinco ratones infectados en el primer pase en un período de 17 a 24 días, y después de tres pases mata a todos los ratones infectados en sólo 3-5 días. La patogenicidad de esta cepa ha sido estable por los últimos 25 años. Por otro lado, con la cepa M-7741, después de 62 pases, los ratones inoculados con 100,000 taquizoitos sobreviven por más de 9 días [17].

Los ooquistes de todas las cepas de *T. gondii* son virulentas para el ratón. Existen cepas que pierden la capacidad de producir ooquistes y quistes de tejido por su prolongado y repetido paso de ratón en ratón. Este hecho se puede deber a la pérdida del genoma que codifica para la formación de estas estructuras, durante el paso rápido del estadio de taquizoito [26].

Ciertas cepas de ratón son más susceptibles que otras. Generalmente, las cepas singénicas son más resistentes a la toxoplasmosis clínica que las no singénicas, lo que indica, que la resistencia pudiera ser genética. No existen artículos publicados que indiquen una mayor susceptibilidad a la toxoplasmosis en alguna raza de animales superiores o en el hombre.

El sexo puede determinar el daño de *T. gondii* en un huésped. Se ha encontrado que la prevalencia de la linfadenopatía es mayor en hombres que en mujeres menores de 15 años, pero en mujeres mayores de 25 años se revierte este hecho. Estas diferencias relacionadas al sexo se deben probablemente al efecto que tienen la hormonas femeninas en el sistema inmune.

Otros factores desconocidos, como el estrés pueden afectar los resultados de la infección en el huésped. En los ratones lactantes se encuentran infecciones más severas que en los no lactantes. Las infecciones concomitantes pueden hacer más susceptible o resistente a un huésped. La toxoplasmosis clínica en perros está frecuentemente asociada a moquillo canino [17]

5. MECANISMOS DE TRANSMISIÓN.

a. Transmisión por taquizoitos.

El taquizoito es un organismo delicado incapaz de sobrevivir fuera del huésped y es destruido por las secreciones gástricas. Los únicos caminos por los cuales puede ser infectivo son:

- Por transmisión transplacental de la madre al feto, provocada por la placentitis que se produce durante la parasitemia [25,28]
- Por transfusión de paquetes de leucocitos (la transfusión sanguínea ordinaria es virtualmente libre de riesgo) [16,27]

- Por accidentes de laboratorio, a través de la manipulación de animales, agujas y material contaminado [1]
- Por ser receptor de un trasplante de órganos infectados [1]
- Por la ingesta de leche materna de madres infectadas. La leche de vaca o de cabra pueden constituir un vehículo de transmisión cuando no se hierven o se pasteurizan [27]

Aunque se ha encontrado *T. gondii* en el semen de cabras, borregos y humanos, prácticamente no hay riesgo de transmisión venérea. También se ha encontrado en saliva pero no existe evidencia que indique la transmisión por besos [3]

b. Transmisión por quistes de tejido.

La ingestión de carne cruda o mal cocida que contiene quistes de *T. gondii* es el mecanismo más frecuente de transmisión. Los bradizoitos que se encuentran contenidos en los quistes de animales infectados, son los causantes de la infección. La carne puede ser de origen ovino, porcino, bovino, etc. Los quistes de tejido no resisten temperaturas de cocción mayores de 70°C, ni temperaturas de congelación de -20°C. Los procedimientos de salado, curado y salmuerado también destruyen los quistes [29]

c. Transmisión por ooquistes.

Este es el único mecanismo de transmisión para los herbívoros y uno de los mecanismos para omnívoros y carnívoros. Los ooquistes contenidos en las heces de gato no son infectivos inmediatamente después de ser excretados por el gato, se requiere de 3 a 5 días para que se lleve a cabo la esporulación. Los ooquistes esporulados pueden contaminar los alimentos y el agua, y por tanto ser fuente de contaminación para una gran variedad de huéspedes, incluido el hombre. La contaminación de

los alimentos puede llevarse a cabo por vectores biológicos, tales como las moscas, cucarachas o gusanos y por factores climáticos, como son las lluvias y el viento. Los ooquistes son estructuras altamente resistentes que pueden sobrevivir por tiempo indefinido en el ambiente [30-31]

6. EPIDEMIOLOGÍA.

La infección por *T. gondii* en humanos y animales esta muy difundida en todo el mundo (Cuadro 2). Aproximadamente medio billon de la población humana tiene anticuerpos especificos contra este parásito. La prevalencia de la infección varia en diferentes áreas geográficas de un país. Las causas de esta variación todavia se desconocen. Las condiciones ambientales pueden determinar el grado de difusión natural de la infección. La prevalencia es mayor en climas templados y húmedos que en climas frios y secos o en regiones montañosas. Esto esta relacionado probablemente a las condiciones que favorecen la esporulación y sobrevivencia de los ooquistes en el ambiente [32-48]

Los hábitos culturales e higiénicos de la gente juegan un papel muy importante en la prevalencia de la toxoplasmosis. Por ejemplo, los países americanos y europeos, que acostumbran consumir la carne poco cocida o cruda, presentan un mayor riesgo de ser infectados con quistes de tejido, que los países orientales y africanos que cocinan bien la carne antes de comerla. Además, se ha encontrado que las poblaciones que conviven con gatos tienen mayor riesgo de adquirir toxoplasmosis por contagio con ooquistes. [37,38]

Se ha observado que el riesgo de infección es mayor en personas que tienen contacto con tierra y animales, tales como despachadores de carne, granjeros, ganaderos, agricultores, etc. Este hecho pone de manifiesto que la toxoplasmosis tiene un factor ocupacional, donde los laboratoristas e investigadores que trabajan con *T. gondii* tienen un alto riesgo de adquirir la enfermedad. [45]

La prevalencia de la infección aumenta con la edad como resultado de la exposición continua al riesgo de contagio. No obstante, se ha encontrado que en centroamérica y sudamérica la mayor incidencia de toxoplasmosis es durante la infancia. [43,48]

El reservorio para *T. gondii*, entre los mamíferos comprende fundamentalmente los roedores (ratas, ratones, conejos, etc.) Ocasionalmente, también pueden comportarse como tales el mono, el zorro, ciervos, etc. Pero sin duda los más importantes, sobre todo por los hábitos dietéticos humanos, son los animales de abasto (óvidos, bóvidos, súidos, cápridos). Las aves de mayor riesgo son las domésticas (gallina, pollo, paloma, pato). Hay también que considerar a aquellos animales domésticos que están en contacto con el hombre, especialmente el perro y sobre todo el gato [32-36,39,41,43,44,47].

Cuadro 2. Seroprevalencia de anticuerpos contra *T. gondii* en humanos

Localización	Número de muestras	Prueba	Título aceptado	Porcentaje de positivos
Egipto	161	DT	1:16	29
Nigeria	90	DT	1:16	72
Somalia	165	DT	1:8	44
Sudán	125	DT	1:16	73
Costa Rica	883	DT	1:2	61
Ecuador	101	DT	1:16	78
Guatemala	100	DT	1:4	94
Canadá	4,136	IFA	1:20	41
México	14,689	DT	1:16	30
Estados Unidos	95,929	HAI	1:64	8
Brasil	6,079	IFA	1:16	79
Chile	415	DT	—	46
Irán	1779	IFA	1:20	56
Austria	48832	IFA	1:16	47
Francia	8612	DT	1:250	81
Alemania	1008	IFA	1:10	74
Holanda	3040	DT	1:16	59
Reino Unido	10677	DT	1:32	13
Grecia	228	DT	1:16	60

DT: *Dye test*, IFA: Inmunofluorescencia indirecta, HAI: Hemaglutinación indirecta.

Fuente: Referencia 1

Un gato infectado puede arrojar millones de ooquistes en sus heces en un intervalo de tiempo de una a tres semanas. Este hecho raramente se repite, a menos que el gato sufra desnutrición, infección por *Isospora felis* o inmunosupresión por administración de cortisona. En muchos países, la proporción de gatos que excretan quistes en un momento dado es sólo del 2% [1].

El gato doméstico (*Felis canis*) no es el único animal que puede producir oocistos, sino que existen otros felidos que pueden ser fuente de infección para el humano y otros animales. Algunos de estos felidos son el Tigre de bengala (*F. Bengalensis*), el ocelote (*F. pardalis*), el jaguar (*F. jagouarondi*), y el león de montaña (*F. concolor*). [24,49]

7. PATOGENIA.

Cuando *T. gondii* penetra las células de epitelio intestinal, se multiplica dentro de ellas, y posteriormente, se disemina a través de la linfa y sangre localmente a nódulos linfoides mesentéricos y a órganos distantes. Antes que otros órganos sean dañados severamente, el huésped puede morir debido a la necrosis del intestino y nódulos linfoides. La necrosis se causa por la replicación intracelular del parásito, ya que *T. gondii* no produce ningún tipo de toxina.[24]

T. gondii llega al organismo en forma de taquizoito, vehiculado por un quiste como bradizoito o por un oociste como esporozoito. Es excepcional la puerta de entrada respiratoria, cutánea o mucosa, pero, cuando así ocurre, las formas clínicas son atípicas y de extraordinaria gravedad [50]

T. gondii penetra en las células, previo contacto de su polo anterior con la membrana celular. La penetración se realiza gracias a los movimientos del parásito y probablemente por la acción de la hialuronidasa, la lisozima y un factor incrementador de la penetración (PEF) [51,52]

Cuando el contacto del parásito y la célula no se realiza mediante el polo anterior, la penetración tiene lugar por un proceso similar a la fagocitosis. Se ha observado que al parásito le toma menos tiempo entrar por penetración activa (15 segundos), que por fagocitosis(120 segundos) [1]

Una vez que ha penetrado en el interior de la célula, queda englobado en una vacuola parasitofóra (PV). Se ha sugerido que la PV se deriva del parásito y del huésped. El plasmalema de la célula del huésped que rodea al parásito se incorpora a la membrana vacuolar que se forma después de la

invasión. La membrana de la vacuola parasitofóra se conectan con la membrana de *T. gondii* a través de numerosos tubulos intravacuolares. De esta manera, la membrana es un híbrido [51]

Dentro de las células se inicia la multiplicación del parásito, incluso en las células del SRE (macrófagos), donde el taquizoito resiste a la muerte celular al impedir la unión fago-lisosoma. Se ha observado que la inhibición requiere que el parásito este viable y el proceso se inicia en el momento mismo que éste entra al macrófago. Es un proceso activo y parece ser el resultado de la exclusión provocada por el parásito de una o varias proteínas de la membrana del fagosoma, las cuales son necesarias para la fusión con el lisosoma [53,54]

La sintomatología obedece a la reacción inflamatoria y a fenómenos de hipersensibilidad consecutivos a la destrucción celular, más videntes en el sistema nervioso central y globo ocular. La persistencia de quistes en estos órganos se atribuye a la escasa difusión de anticuerpos hasta ellos [9,10,24,55]

El hecho de que la infección por *T. gondii*, presente manifestaciones clínicas más severas en niños y que se haya demostrado mayor resistencia en animales adultos cuando se les inocula el parásito, permite afirmar que la edad es uno de los factores importantes en la patogenia [10]

Si se trata de cepas de *T. gondii* muy virulentas, en tanto que aparece una respuesta inmunitaria adecuada, la multiplicación intracelular es intensa con formación de pseudoquistes, que al romperse liberan taquizoitos que parasitan células próximas y por linfa y sangre (a veces en el interior de los leucocitos) llegan a órganos muy distantes, incluida la placenta, en la que originan áreas necróticas. La transmisión placentaria se realiza directamente a través de los vasos, previa inflamación del corion, o provocando una placentitis con multiplicación en las células sincitiales. Posteriormente, pasan a la sangre fetal por un mecanismo de pinocitosis. También se admite el paso a través del líquido amniótico, por deglución fetal.

Si la cepa es poco virulenta o se ponen en marcha los mecanismos de defensa del huésped, lo que acontece a las 2 ó 3 semanas de la infección, *T. gondii* se queda relegado a su hábitat intracelular formando los quistes. En este momento los anticuerpos circulantes y probablemente también los

mecanismos de inmunidad celular protegen al huésped de la diseminación, pero ésta no ocurre si hay inmunodeficiencias, ya sea primaria, consecutivas a otras enfermedades o inducida por quimioterapia. En animales normales se ha visto que la inmunidad no necesariamente protege de reinfecciones, pero en los seres humanos no se ha demostrado este fenómeno.

Ocasionalmente, los quistes pueden romperse y dejar en libertad los bradizoitos. Si son muchos los que se rompen, se produce una reactivación de la enfermedad (localizada o generalizada) [1,9,10,24].

De acuerdo con Frenkel, las lesiones tisulares en la toxoplasmosis son de las siguientes modalidades:

1. Reacción inflamatoria por la destrucción de las células parasitadas. Especialmente intensa durante la fase proliferativa del parásito y en tejidos donde no hay regeneración celular y la especialización funcional es alta como en ojo y cerebro. Esta reacción está constituida por linfocitos, monocitos, polimorfonucleares y a veces células plasmáticas.

2. Necrosis tisular por la ruptura de los quistes durante la fase crónica. Aunque los parásitos liberados son destruidos, hay necrosis de las células adyacentes como resultado de fenómenos de hipersensibilidad. Las lesiones y la sintomatología son mayores mientras más grande es el número de parásitos que se liberan al romperse los quistes, pero en todos los casos la retina es el órgano más afectado.

3. Infarto y necrosis. Se presenta por la afectación de vasos sanguíneos vecinos a una lesión parenquimatosa. Estas lesiones también son de mayor efecto en el cerebro que en otros órganos, tienden a calcificarse y son visibles a los rayos X.

4. Necrosis periacueductal y periventricular. El parásito entra a ventrículos a partir de las lesiones parenquimatosas, afecta las células ependimarias y subependimarias. Hay reacción inflamatoria y formación de pequeñas úlceras que pueden obstruir el acueducto de Silvio. Si esto ocurre, los ventrículos laterales y el 3º se transforman en una cavidad semejante a la de un absceso que contiene

parásitos, material antigénico y células inflamatorias. Este tipo de lesión se presenta solamente en la toxoplasmosis intrauterina debido a la parasitación tan intensa del cerebro [10]

8. CUADRO CLÍNICO.

a. Toxoplasmosis congénita.

Cuando una mujer embarazada adquiere la infección por *T. gondii* puede transmitirlo transplacentalmente a su feto. Para que esto ocurra, se ha visto que es necesario que la infección materna suceda durante el embarazo y presentarse por vez primera [56-59]

Si la infección materna ocurre durante el primer o segundo trimestre del embarazo, el número de niños infectados es menor (entre 17 y 25 por ciento), que durante el tercer trimestre (65 por ciento). Las secuelas son más graves en los niños infectados en etapas tempranas. Afortunadamente, cerca del 60 por ciento de niños de madres infectadas escapan a la infección. El 26 por ciento son infectados subclínicamente al nacer, y solamente el 10 por ciento son afectados clínicamente (6 por ciento medianamente y 4 por ciento severamente). Poco más del 3 por ciento mueren en el período neonatal [50,57,58]

La Toxoplasmosis congénita puede presentarse en varias formas clínicas:

- Padecimiento neonatal
- Padecimiento que ocurre en los primeros meses de vida
- Secuela o recidiva de una infección previa no diagnosticada y que aparece en la infancia o en la adolescencia.
- Infección subclínica [11]

Cuando existe toxoplasmosis con síntomas y signos aparentes en el recién nacido, por lo general se trata de una forma clínica grave, con presencia de cuadro neurológico más o menos prominente y que, en general, conduce a secuelas importantes. En ocasiones el niño nace con apariencia normal y empieza a manifestar su sintomatología algunas semanas o 2 a 3 meses después del nacimiento. Respecto a las

secuelas, la mayor parte de ellas son de naturaleza neurológica, ocular, y aparecen en edades más tardías, en el escolar, se han visto casos de niños con convulsiones aisladas, en quienes la investigación neurológica y clínica conducen al diagnóstico de secuelas de Toxoplasmosis congénita, con calcificación cerebral y coriorretinitis cicatricial. [11,50, 56-59]

Las formas subclínicas de la toxoplasmosis congénita pasan inadvertidas, insospechadas a menos que haya el antecedente de infección materna durante la preñez, en este caso, el diagnóstico de laboratorio podrá identificar un caso prácticamente asintomático u oligosintomático Al respecto Alford y colaboradores, llamaron la atención sobre algunos hechos importantes en la infección congénita, llamada subclínica prematura, alteraciones del líquido cefalorraquídeo, elevación de la IgM sérica y, en ocasiones, anemia, ictericia, hepatoesplenomegalia y coriorretinitis El estudio minucioso de la embarazada podrá facilitar el descubrimiento de estos casos subclínicos, que merecen una atención particular en el diagnóstico, el tratamiento y la vigilancia posterior [11,50]

La enfermedad clínica manifiesta puede aparecer con síntomas obvios desde el nacimiento o, como antes se mencionó, un recién nacido en apariencia normal empieza a mostrar alteraciones en las primeras semanas o a los dos o tres meses de vida [11]

Para fines didácticos es clásico dividir la Toxoplasmosis congénita en dos formas la neurológica y la generalizada. En la forma neurológica o encefálica la infección fetal se produce en el útero y por lo general proviene de una infección materna también precoz en el transcurso del embarazo Los signos y los síntomas de participación neurológica son prominentes: coriorretinitis, alteraciones del líquido cefalorraquídeo, anemia, convulsiones, calcificaciones cerebrales, hidrocefalia y microcefalia. Estas formas son bastantes más frecuentes que la enfermedad generalizada, en la cual la infección fetal suele ocurrir en las últimas semanas de la gravidez, y corresponde a una infección materna que acontece en el último trimestre del embarazo. Los datos más frecuentes son ictericia, hepatoesplenomegalia, linfadenomegalia, fiebre, alteraciones de líquidos y coriorretinitis Con frecuencia se observan anemia, petequias, equimosis, eosinofilia, trombocitopenia, plasmocitosis y síndrome mononucleósico. Muchos de los datos de una forma clínica, también se encuentran en la otra, de tal manera que lo que varía es la proporción con que se observa.

La coriorretinitis es, por lo general, bilateral y puede aparecer en el periodo neonatal o después, su identificación es de importancia extraordinaria, tanto por la elevada frecuencia con que se diagnóstica en ambas formas (94 por ciento en la forma neurológica y 66 por ciento en la generalizada), según Eichenwald, cuanto por su gravedad particular. En el trabajo de Eichenwald, la mortalidad de la toxoplasmosis congénita fue de 12 por ciento, sin existir diferencia entre la forma generalizada y la neurológica, entre los sobrevivientes, alrededor de 85 por ciento tienen retraso mental, además de otras secuelas importantes tales como convulsiones, espasticidad y parálisis, disminución acentuada de la visión, hidrocefalia, microcefalia y sordera. Debe hacerse notar que de cuatro pacientes con enfermedad subclínica hubo secuelas (retraso mental, convulsiones) en la mitad de los casos. En 47 pacientes con la forma subclínica, la frecuencia de las lesiones retinianas fue de 30 por ciento, según Parissi, con manifestaciones clínicas menos frecuentes en los primeros 4 años de vida (23 por ciento) y más a partir del quinto año (40 a 50 por ciento), se considera que la mayoría de las coriorretinitis diagnosticadas en el adulto se deben a toxoplasmosis congénita [11,50,56-58]

b. Toxoplasmosis adquirida.

La infección humana adquirida ocurre la mayor parte de las veces de manera silenciosa, imperceptible a la clínica, son las formas asintomáticas o subclínicas. La enfermedad con sintomatología aparente y que permite su diagnóstico en la práctica diaria es mucho menos frecuente [11,50, 56,59]

El periodo de incubación, determinado principalmente a través de infecciones accidentales ocurridas en el laboratorio, es de 3 a 5 días, aunque se admite que puede ser más prolongado [9,11]

En esencia, la sintomatología consiste en fiebre, exantema maculopapuloso, linfadenitis, signos clínicos de neumonía, miocarditis y encefalitis, que en la práctica se relacionan de manera sumamente *variada*. De acuerdo con el predominio de unas u otras manifestaciones, pueden observarse las siguientes formas clínicas

Formas ganglionares Son las que se observan con más frecuencia y se caracterizan por fiebre, ataque variable al estado general, adinamia, astenia y dolores musculares. Se ha observado algunos casos en los que la fiebre es efimera y en ocasiones no existe.

Los ganglios aumentan de tamaño y alcanzan de 1 a 2 cm, se vuelven un poco duros, sensibles, pero no muy dolorosos, no se adhieren a los planos profundos, no son coalescentes y no se fistulizan. La afección ganglionar puede alcanzar los ganglios occipitales, retroauriculares, submaxilares, cervicales, axilares, inguinales y también los del hilio pulmonar y del mesenterio. Los afectados con más frecuencia son los de la cadena cervical, en forma bilateral. La regresión de la inflamación ganglionar a veces es tardada, puede persistir varios meses y hasta más de un año. Puede haber angina eritematosa.

Morgenfeld menciona que en estas formas se encontró anisocoria en 35 por ciento de los casos. En cuanto a la esplenomegalia, puede descubrirse algunas veces, con un bazo aumentado de 1 a 3 cm, blando e indoloro. Son formas semejantes a la mononucleosis infecciosa con reacción de Paul-Bunell negativa [11,25,19,50,56,59].

La biometría hemática puede mostrar leucocitos en número normal o leucocitosis discreta, linfocitosis y a veces eosinofilia leve. La velocidad de eritrosedimentación, en general, es normal [7].

Formas exantemáticas Se inician con fiebre, adelgazamiento, malestar, mialgias, seguidos por la aparición de un exantema maculopapuloso, rojizo o rosa pálido que afecta el tronco y respeta la cara, cuero cabelludo, palmas de las manos y plantas de los pies. Es de duración efimera, de 2 a 4 días. Muchas veces coexiste con adenitis cervicales, ictericia y hepatoesplenomegalia.

En adultos y pacientes con enfermedades inmunosupresoras (leucemias, linfomas, agamaglobulinemia, SIDA) así como en tratamiento inmunosupresor (antimetabolitos, citostáticos, agentes alquilantes) se han referido cuadros graves de Toxoplasmosis que demuestran el carácter oportunista del parásito; en estas situaciones, el exantema es hemorrágico, profundo, con dolores generalizados, ataque intenso al estado general, cuadro respiratorio sugerente de neumonía intersticial o cardíaco como de miocarditis; además, puede haber trastornos del comportamiento. Son casos

excepcionales que se ven en la infancia y que asemejan una rickettsiasis, la fiebre manchada, y que, en general, llevan a la muerte en 2 a 4 semanas [60-61]

Formas meringoencefálicas Habitualmente son muy graves, muchas veces mortales y se diagnostican pocas veces. Se manifiestan con cefalea, vómito, somnolencia, convulsiones y pueden evolucionar al coma y a la muerte. Algunas veces predomina el cuadro meníngeo y a veces un cuadro encefálico, puede haber cuadros piramidales, cerebelosos, parálisis ocular, con fiebre al principio, durante o en el transcurso de la enfermedad. El examen de líquido cefalorraquídeo es útil por las posibles alteraciones siguientes: hiper celularidad a base de linfomononucleares, presencia de eosinófilos, con glucosa y proteínas generalmente normales. En la sangre periférica hay eosinofilia con reacciones serológicas positivas para toxoplasmosis a títulos bajos.

Formas miocárdicas. No son frecuentes como manifestaciones aisladas y se presentan, en la clínica, como miocarditis agudas, como regla, la afección miocárdica forma parte de los cuadros graves de toxoplasmosis generalizada. La evolución varía de benigna a mortal.

Formas pulmonares. La afección pulmonar, en la toxoplasmosis se presenta bajo la forma de neumonía intersticial; en realidad, es difícil que ocurra este cuadro sin otras manifestaciones clínicas de la enfermedad, tales como linfadenitis, exantema y otras.

Formas oculares: Son muy poco frecuentes como manifestación de toxoplasmosis adquirida, puede ocurrir una coriorretinitis progresiva en virtud de la multiplicación de taquizoitos y también ser de forma circunscrita por la liberación de bradizoitos debida a la ruptura local de un quiste. Se han relacionado uveítis, iridociclitis y conjuntivitis con la forma adquirida de la enfermedad. En general, se diagnostican con títulos bajos en las reacciones serológicas.

Lo que se ha observado en la práctica es una prevalencia elevada en las formas ganglionares que, en ocasiones, coexisten con las otras formas, con exantema, neumonía intersticial o miocarditis. Se ha presentado ictericia leve formando parte del cuadro de toxoplasmosis adquirida y pocas veces, formas

de afección hepática importante, elevación conspicua de bilirrubinas y transaminasas y aumento del tiempo de protrombina [11,25, 49,56,59]

Por excepción se ha descrito toxoplasmosis adquirida asociada a nefritis intersticial, glomerulonefritis aguda difusa y eritema nodoso. Esporádicamente se han descrito otras formas: pancreática, con fibrosis retroperitoneal, amigdalina, pericárdica, poliomiósitica [11,59]

T. gondii debe siempre enfrentarse como un oportunista que afecta con más frecuencia a pacientes con enfermedades malignas, seguramente sujetos inmunodeprimidos (por ejemplo, enfermos de SIDA), quienes desarrollan formas graves con afección importante del sistema nervioso central (encefalitis) [11,60-62]

9. INMUNIDAD.

La infección por *T. gondii* es seguida por el desarrollo de una respuesta inmune humoral y mediada por células. La contribución relativa de estos dos tipos de respuesta inmune a la inmunidad protectora no está todavía aclarada y parece depender del huésped. Sin embargo, es de aceptación general, que la respuesta inmune mediada por células juega un papel predominante en la resistencia del huésped a la infección por *T. gondii* [7]

a. Inmunidad humoral.

La infección por *T. gondii* induce la formación de anticuerpos específicos en el huésped. Estos anticuerpos, en presencia de complemento o del factor "accesorio" inactivan los parásitos extracelulares haciendo que su membrana se altere y se libere el contenido citoplásmico. De tal forma que los anticuerpos específicos juegan un papel muy importante en la destrucción de los taquizoitos por los macrófagos. [17,63]

En los individuos no inmunes los parásitos entran activamente a los macrófagos, donde se multiplican dentro de la vacuola parasitófora. Estas vacuolas no se fusionan con los lisosomas

secundarios, y en consecuencia el parásito no se elimina. En contraste, los parásitos incubados previamente con suero inactivado por calor proveniente de ratones inmunes o con anticuerpos monoclonales dirigidos a antígenos de superficie de *T. gondii*, no interfieren en la fusión de la vacuola parasitofora y lisosomas, lo que resulta en la destrucción de los taquizoitos [7,64]

El papel de la inmunidad humoral en la protección de ratones contra *T. gondii*, ha sido estudiada en experimentos de transferencia pasiva, mostrando discrepancias en los resultados obtenidos. Mientras algunos investigadores han reportado que no existe protección contra la infección con cepas virulentas, otros han encontrado que la transferencia pasiva de suero inmune o anticuerpos monoclonales a ratones infectados con cepas moderadamente virulentas resulta en una protección significativa [7,17,63]

Por otro lado, los animales que sobreviven a una infección por *T. gondii* resisten una reinfección aún con cepas muy virulentas. Los anticuerpos formados en estas condiciones por lo general permanecen con títulos elevados por uno o dos años después de un ataque inicial, e incluso pueden mantenerse de por vida aunque a títulos bajos. El parásito, a su vez, puede permanecer viable intracelularmente por varios años.

Al estudiar la relación entre el título de anticuerpos y las modificaciones que estos pueden causar en la morfología de los toxoplasmas, se encontró que cuando los títulos son bajos, entre 1:4 y 1:128, el parásito puede aún reproducirse; cuando el título se eleva a 1:4,000, el número de parásitos disminuye sensiblemente y la división endodigénica es incompleta, quedando los parásitos unidos sin poder separarse; cuando el título llega a cifras de 1:16,000 o más, se lisa la mayoría de los parásitos y sólo un pequeño grupo se mantiene en el interior de las células iniciándose la formación del quiste [63]

b. Inmunidad celular.

El papel de los linfocitos T en la inmunidad protectora contra *T. gondii* fue demostrada por primera vez por Frenkel (1967), quien mostró que los hámsters receptores de células esplénicas y linfoides provenientes de donadores similares infectados con *T. gondii* fueron protegidos de una dosis

letal subsecuente. Se obtuvieron resultados similares cuando se emplearon otros animales, por ejemplo, ratones, ratas y cobayos [7,63]

Se ha reportado que, en ratones infectados, la eliminacion de linfocitos T CD4⁺ con anticuerpos monoclonales GK 1.5 dirigidos contra celulas L3T4(CD4⁺), reactiva la toxoplasmosis en el sistema nervioso central. Ademas, se encontro que durante el tratamiento con GK 1.5 la respuesta inflamatoria en los cerebros de ratones infectados cronicamente, no se incrementa sino, todo lo contrario, disminuye [7,17]

Los linfocitos T CD4⁺ participan en el desarrollo de la resistencia y en el control de los quistes de cerebro. Sin embargo, se ha encontrado que las celulas CD8⁺ son la principal subpoblacion involucrada en la inmunidad protectora y en la inhibicion de la formacion quistica. Datos recientes resolvieron esta aparente discrepancia, demostrando el papel sinérgico de los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ en inmunidad protectora inducida por el mutante ts-4. Despues de la infeccion, el tratamiento con anticuerpos anti-CD4 mas anti-CD8 abolen completamente la resistencia a *T. gondii*, mientras que los anti-CD8 parcialmente disminuyen la resistencia inducida por la vacuna. Por tanto, celulas CD8⁺ aparecen ser efectores importantes de inmunidad *in vivo*, mientras que los linfocitos CD4⁺ podrian jugar un papel como celulas cooperadoras en la induccion de inmunidad protectora y modulacion de la actividad de las celulas CD8⁺ por la produccion de citocinas TH1 [Interferon gamma (IFN- γ) e interleucina-2 (IL2)] [7,17,65-69]

Esta hipótesis esta en acuerdo con la observación que, cuando se da durante la vacunacion, y no antes del reto, los anticuerpos anti-CD4 son capaces de bloquear la inmunidad protectora. Probablemente, la inmunidad protectora en la toxoplasmosis murina esta mediada por el sinergismo entre las subespecies de celulas T CD4⁺ y CD8⁺; los linfocitos CD4⁺ podrian participar en el desarrollo de la resistencia durante la vacunacion o toxoplasmosis aguda, y las celulas CD8⁺ podrian estar involucradas en el mantenimiento de una respuesta inmune protectora, asi como, en la inhibición de la formación de quistes [7,65-69]

c. Citocinas.

En el modelo murino, el IFN- γ aparece como el principal mediador de la resistencia durante la toxoplasmosis aguda y crónica. Los animales que reciben anticuerpos monoclonales anti-IFN- γ un día antes de la infección intraperitoneal, mueren de toxoplasmosis, mientras que los ratones infectados que reciben IgG de hamster normal, sobreviven y desarrollan una infección crónica [69-75]

Se han sugerido varios mecanismos que involucran al IFN- γ en la resistencia a la toxoplasmosis. El IFN- γ puede actuar como un activador potente del metabolismo oxidativo y actividad antimicrobiana de los macrófagos. La actividad anti-toxoplasma inducida por el IFN- γ en los macrófagos está asociada con la liberación de intermediarios de nitrógeno (RNI) y oxígeno (ROI) reactivos. Sin embargo, la capacidad del IFN- γ para causar estos efectos en los macrófagos explica, en parte, su papel principal en la toxoplasmosis, ya que *T. gondii* infecta a una gran variedad de células que no son consideradas "profesionalmente" fagocíticas [7,70]

El IFN- γ humano inhibe el crecimiento de *T. gondii* en fibroblastos humanos vía la inducción de una indoleamina 2,3 dioxigenasa de la célula huésped, la cual degrada el triptófano e induce inanición de los parásitos intracelulares por falta del aminoácido esencial. No obstante, este efecto parece ser dependiente de la especie ya que el IFN- γ murino no inhibe el crecimiento de *T. gondii* en los fibroblastos murinos. Un estudio reciente ha mostrado que el IFN- γ también activa células endoteliales humanas que inhiben la replicación de *T. gondii* [7,70,76]

Otro posible mecanismo protector inducido por el IFN- γ se sugiere que sea debido al papel sinérgico de los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺. Las células CD8⁺ pueden proveer IFN- γ involucrado en la muerte de parásito, pero la generación de IFN- γ maduro requiere de probablemente de factores cooperadores producidos por células CD4⁺ [7,17,70]

Otros estudios han demostrado que la interleucina 2 recombinante (rIL-2) disminuye la mortalidad y el número de quistes de cerebro en ratones infectados con una dosis letal de *T. gondii*. Este efecto correlaciona con el incremento de la actividad de células asesinas naturales (NK). Usando ratones

infectados oralmente, se ha encontrado que la rIL-2 administrada profilácticamente en dosis de 1000 unidades en los días -2, -1 y 0 protege al 50% de los animales [7,70,74].

La rIL-2 es menos efectiva en ratas atímicas, ya que sólo protege al 25% de los animales con el tratamiento de 5000 unidades de rIL-2 administrada en los días -2, -1 y 0. Posiblemente, en las ratas atímicas el efecto protector de la IL-2 puede estar ligado a la activación de células asesinas activadas por linfocinas (LAK). También, se ha evidenciado que es posible que en los pacientes inmunosuprimidos la IL-2 activa otros tipos de células con receptores de IL-2 (por ejemplo, linfocitos B) [7,17,70,74].

El factor estimulante de colonias macrófago-granulocíticas (GM-CSF) no incrementa la actividad anti-*T. gondii* de los macrófagos, y el factor de necrosis tumoral recombinante (rTNF) no afecta el crecimiento de *T. gondii* en los macrófagos peritoneales de ratón o fibroblastos humanos. En contraste, estudios *in vivo* han demostrado que existe protección significativa en ratones infectados letalmente y tratados con TNF murino purificado, interleucina 1 humana recombinante (rIL-1) y (rIL-1B), o una combinación de TNF y rIL-1a o rIL-1B [7,70,74].

d. Células que presentan citotoxicidad sobre *Toxoplasma gondii*.

Los macrófagos activados son formidables células microbicidas. Existe una mejor eficiencia fagocítica en el estado activado que en el basal. Los macrófagos activados pueden generar un estallido metabólico que produce intermediarios de oxígeno reactivos tales como peróxido de hidrógeno, anión superóxido o radical hidroxilo, e intermediarios de nitrógeno reactivos, especialmente óxido nítrico. Estos productos metabólicos son capaces de matar al parásito [54,77].

Se ha sugerido en numerosos reportes, el papel efector de la células T citotóxicas (CTL) en la toxoplasmosis, demostrando la implicación de las células CD8⁺ en la protección. Khan y colaboradores (1988) describieron por primera vez la capacidad del antígeno de superficie principal de *T. gondii*, P30, para inducir las células T citotóxicas antígeno-específicas en el ratón. Estas células fueron citotóxicas

infectados oralmente, se ha encontrado que la rIL-2 administrada profilácticamente en dosis de 1000 unidades en los días -2, -1 y 0 protege al 50% de los animales [7,70,74]

La rIL-2 es menos efectiva en ratas atímicas, ya que sólo protege al 25% de los animales con el tratamiento de 5000 unidades de rIL-2 administrada en los días +2, +6 y +9. Posiblemente, en las ratas atímicas el efecto protector de la IL-2 puede estar ligado a la activación de células asesinas activadas por linfocinas (LAK). También, se ha evidenciado que es posible que en los pacientes inmunosuprimidos la IL-2 activa otros tipos de células con receptores de IL-2 (por ejemplo, linfocitos B) [7,17,70,74]

El factor estimulante de colonias macrófago-granulocíticas (GM-CSF) no incrementa la actividad anti-*T. gondii* de los macrófagos, y el factor de necrosis tumoral recombinante (rTNF) no afecta el crecimiento de *T. gondii* en los macrófagos peritoneales de ratón o fibroblastos humanos. En contraste, estudios *in vivo* han demostrado que existe protección significativa en ratones infectados letalmente y tratados con TNF murino purificado, interleucina 1 humana recombinante (rIL-1a y rIL-1B), o una combinación de TNF y rIL-1a o rIL-1B [7,70,74]

d. Células que presentan citotoxicidad sobre *Toxoplasma gondii*.

Los macrófagos activados son formidables células microbicidas. Existe una mejor eficiencia fagocítica en el estado activado que en el basal. Los macrófagos activados pueden generar un estallido metabólico que produce intermediarios de oxígeno reactivos, tales como peróxido de hidrógeno, anión superóxido o radical hidroxilo, e intermediarios de nitrógeno reactivos, especialmente óxido nítrico. Estos productos metabólicos son capaces de matar al parásito [54,77]

Se ha sugerido en numerosos reportes, el papel efector de la células T citotóxicas (CTL) en la toxoplasmosis, demostrando la implicación de las células CD8⁺ en la protección. Khan y colaboradoras (1988) describieron por primera vez la capacidad del antígeno de superficie principal de *T. gondii*, P30, para inducir las células T citotóxicas antígeno-específicas en el ratón. Estas células fueron citotóxicas

directamente para los taquizoitos extracelulares de la cepa RH. Estos investigadores también reportaron la inducción por la infección de *T. gondii* de CTL humanas antígeno-específicas capaces de matar al parásito extracelular. Estos resultados están en desacuerdo con los de Yano y colaboradores (1989), quienes observaron que las CTL específicas estaban presentes en la sangre de un paciente con toxoplasmosis aguda o inducidos en linfocitos de sangre periférica (PBL) de un paciente con toxoplasmosis crónica. Estas CTL fueron citotóxicas para las células tumorales infectadas con *T. gondii* que presentaban restricción de HLA tipo II. [7,78]

Ha sido demostrada por ensayos citotóxicos contra células de linfoma YAC-1, la activación de las células NK durante la toxoplasmosis aguda o crónica en los ratones. Esta actividad también puede ser inducida en los ratones y humanos por fracciones subcelulares de *T. gondii*. Las células NK de un ratón previamente infectado (3 días) por la cepa RH de *T. gondii* muestra citotoxicidad *in vitro* sobre los taquizoitos extracelulares; esta muerte involucra el contacto directo de la célula NK con el parásito [7]

Existe evidencia sobre el papel efector de la plaquetas contra *T. gondii*. Ridel y colaboradores (1988) demostraron que la infección de *T. gondii* o la inmunización con antígenos de expresión - secreción (ESA) inducen altos niveles de anticuerpos IgE específicos en las ratas. Las plaquetas de ratas eutímicas (+/+) infectadas o inmunizadas con ESA mostraron un incremento de cuatro a cinco veces en la cantidad de anticuerpos IgE ligados a la superficie, y estas fueron citotóxicas *in vitro* para los taquizoitos.

La transferencia de plaquetas que contienen IgE en su superficie confiere protección significativa a ratas atímicas infectadas con taquizoitos de la cepa RH. Además, Yong y colaboradores (1991) demostraron que en la ausencia de anticuerpos, las plaquetas humanas son citotóxicas para los taquizoitos cuando se establece el contacto directo célula-célula. Este resultado sugiere que el tromboxano, y no el ROI, está involucrado en la citotoxicidad mediada por plaquetas. Estos resultados sugieren que las plaquetas pueden jugar un papel muy importante en la resistencia del huésped contra la infección de *T. gondii*. [7,79]

10. DIAGNÓSTICO.

a. Diagnóstico directo.

El diagnóstico directo es poco empleado, ya que proporciona resultados muy pobres y la mayor parte de las veces se utilizan técnicas y procedimientos laboriosos y lentos

Examen microscópico.

Los cortes histológicos o el sedimento de líquidos orgánicos se tiñen con el método de Giemsa o la técnica de Wright para ser observados al microscopio y detectar la presencia de taquizoitos o quistes tisulares. Para la tinción de los quistes puede emplearse también el reactivo de Schiff. Los resultados del estudio casi nunca son concluyentes, ya que incluso en las formas graves existen pocos parásitos. Además, en los cortes histológicos con frecuencia se altera la morfología del toxoplasma, disminuye de tamaño y puede confundirse con artefactos u otros parásitos (*Leishmania sp.*, *Trypanosoma sp.*, *Histoplasma sp.* ó *Candida albicans*). Puede recurrirse al microscopio electrónico y, mejor aún, a técnicas de inmunofluorescencia, directa o indirecta, que son las que proporcionan mejores resultados [9].

Cultivo.

Es el procedimiento más fiable, pero es lento, oneroso y no está al alcance de todos los laboratorios. Aunque puede recurrirse a la inoculación en embrión de pollo o cultivos celulares, lo mejor es la inoculación en el animal de experimentación. Se emplean ratones o ratas blancas, que inoculados por vía subcutánea, intracerebral o mejor intraperitoneal, padecen una toxoplasmosis generalizada y se detecta el parásito en líquido peritoneal a las dos semanas; cuatro o seis semanas más tarde pueden observarse quistes de cerebro y anticuerpos específicos circulantes. Las positividadades, que se obtienen a partir de líquidos orgánicos o sangre inoculados, suelen ser exponentes de las fases agudas de la enfermedad, en tanto que las obtenidas por inoculación de tejidos reflejan una infección aguda o bien una infección latente (existencia de quistes tisulares) [1,9].

b. Diagnóstico indirecto.

El diagnóstico clásico de la toxoplasmosis humana esta basado en la detección de inmunoglobulinas específicas de tipo IgG e IgM. En los humanos infectados, la IgM específica se detecta usualmente a las dos semanas después de la infección. Los anticuerpos IgG aparecen más tarde y presentan sus niveles más altos aproximadamente a los dos meses. Posteriormente, los niveles de IgG disminuyen gradualmente a un título relativamente bajo, el cual persiste por toda la vida. Por lo tanto, la presencia de IgG específica proporciona una prueba de una infección adquirida previamente. El uso de métodos más sensibles para la detección de anticuerpos IgM ha complicado la interpretación de los resultados serológicos. Desde luego los anticuerpos IgM - considerados característicos de la fase aguda de la toxoplasmosis - ahora pueden ser detectados por estos ensayos en periodos de tiempo más largos después de la infección (de meses a años).

Durante la última década, ha emergido subitamente el interés diagnóstico de los anticuerpos de tipo IgA. Los anticuerpos específicos IgA puede ser evidenciados tempranamente en la infección, y éstos generalmente desaparecen entre los 3 y 9 meses. La detección simultánea de IgM e IgA señala la fase aguda de la toxoplasmosis y permite una mejor evaluación del riesgo en una mujer embarazada. Los anticuerpos IgE específicos son demostrables en humanos y animales infectados con *T. gondii*.

Pinon y colaboradores (1990) demostraron la presencia de IgE específico en 86% de pacientes infectados. Debido a que este anticuerpo aparece tempranamente en la infección y es transitorio, también podria representar un buen marcador para toxoplasmosis aguda [7].

Reacción de Sabin y Feldman ("dye test").

El *dye test* (DT) es una prueba sensible y específica, aunque compleja y peligrosa por utilizar toxoplasmas vivos. Por estas razones no está al alcance de todos los laboratorios. Produce escasas falsas negatividades y no da falsos positivos, salvo en personas que han recibido anticuerpos por transfusión.

Se basa en la pérdida de la afinidad que tienen los toxoplasmas por el azul de metileno, como resultado de la lisis parcial de la membrana del parásito más un "factor accesorio" del suero no caracterizado. Dado que el suero problema puede contener algún componente inespecífico, termolábil, que destruya la membrana parasitaria, ha de calentarse aquel a 60°C durante 30 minutos antes de realizar la prueba.

En definitiva, si un exudado peritoneal, rico en toxoplasmas, se le añade suero sanguíneo normal y azul de metileno, los toxoplasmas se colorean en azul, si el suero contiene anticuerpos específicos, aquéllos pierden su afinidad por el colorante. El título de la reacción viene dado por la máxima dilución del suero que deja sin teñir al 50 por ciento o más de los toxoplasmas [56,80-82].

Hemaglutinación indirecta (HAI).

La HAI fue el primer método introducido para el diagnóstico serológico de la toxoplasmosis en reemplazo de la DT. Esta técnica emplea toxoplasmas muertos como antígeno, el cual es preparado a partir de exudado peritoneal de ratones infectados con dosis altas de toxoplasmas virulentos, utilizándose el extracto lisado del parásito, que se conserva en estado congelado o liofilizado. Esta sustancia es mezclada con eritrocitos de camero o eritrocitos humanos de grupo O, previamente tratados con ácido tánico. Los hemátios sensibilizados con el antígeno, aglutinan en contacto con un suero que contenga anticuerpos anti-toxoplasma.

Es un método sensible y específico que proporciona resultados equivalentes al DT, excepto durante la fase inicial de la infección. Este hecho se explica por que ambas técnicas buscan diferentes tipos de anticuerpos, apareciendo los anticuerpos de la HAI más tarde y a niveles inferiores que los de DT. De modo que la HAI no sustituye totalmente a la DT y no debe emplearse, como único método, en el diagnóstico de la toxoplasmosis congénita, ni en aquellas formas adquiridas en que se sospecha infección reciente. En cambio, la HAI constituye una ayuda útil para el diagnóstico, si se aplica conjuntamente con la DT durante las fases más tardías de la infección. El método es empleado,

fundamentalmente, en el control de la toxoplasmosis crónica y en estudios seroepidemiológicos [56,80-82]

Inmunofluorescencia indirecta (IFA).

Tiene la misma sensibilidad y especificidad que el DT, pero es más simple, económica y no precisa el empleo de toxoplasmas vivos. Detecta los mismos anticuerpos que aquel y, por esto, ambos se comportan de forma similar [56,80,82,83]

Se han descrito algunos falsos positivos por existencia de anticuerpos antinucleares. También pueden presentarse reacciones cruzadas con *Sarcocystis* y *Besnoitia*.

Una variante son las pruebas de IFA-IgM, como el test de Remington, que utilizan un conjugado anti-IgM. Por detectar IgM, son extraordinariamente útiles para el diagnóstico de infección adquirida reciente e infección congénita. El factor reumatoide puede dar falsos positivos en este tipo de estudios [9]

Reacción de fijación de complemento (CF).

El CF es el método serológico más antiguo aplicado al diagnóstico de la toxoplasmosis. Los antígenos se preparan a partir de emulsiones de toxoplasmas obtenidos, preferentemente, de membrana corioalantoide de embrión de pollo o exudado peritoneal de ratón, siendo el primero más específico y el segundo más potente. Las emulsiones de los parásitos contienen diferentes componentes antígenicos que puede ser separados, mediante centrifugación fraccionada, en antígenos ligeros o solubles, y antígenos pesados o de membrana. En la mayoría de los laboratorios se emplea el antígeno ligero, que se obtiene del sobrenadante del extracto de parásitos, centrifugado a alta velocidad. Este antígeno es poco sensible y al emplearlo en la CF, sólo permite buscar anticuerpos durante la fase de mayor actividad biológica del proceso infeccioso. De lo anterior deriva la hipótesis de que los anticuerpos de la CF aparecen tardíamente, no alcanzan niveles altos y desaparecen en forma precoz. [56,80-82]

La CF practicada con el antígeno ligero, obviamente no encuentra la totalidad de las infecciones toxoplásmicas y no sustituye las reacciones de DT e HAI. Sin embargo, utilizando el mismo procedimiento, conjuntamente con otras técnicas serológicas, la CF permite distinguir entre proceso activo e infección crónica latente y, en esta forma, puede constituir una ayuda útil para el médico [81].

Aglutinación directa (DA).

Esta técnica, descrita por Fulton y Turk (1959), inicialmente carecía de especificidad y sensibilidad, hasta que Desmonts y Remington (1980), sugirieron ciertas modificaciones. En la DA el suero problema es tratado con 2-mercaptoetanol para reducir los anticuerpos IgM y luego son incubados con los organismos tratados con formalina. La aglutinación del parásito ocurre si el paciente tiene anticuerpos contra *T. gondii*. Los resultados obtenidos correlacionan bien con los resultados obtenidos con las técnicas DT e IFA. La DA es simple en su elaboración, no es especie-específica y puede probarse con suero humano o animal [56,80-82].

Aglutinación en látex (LA).

En la prueba de aglutinación en látex, el suero del paciente sin tratamiento reacciona con partículas de látex sensibilizadas. Si están presentes los anticuerpos específicos anti-toxoplasma, la aglutinación se lleva a cabo. Los títulos obtenidos con LA son muy semejantes con los obtenidos con DT e IFA, y por lo tanto, se emplea comúnmente para el *screening* de IgG. Tiene un pequeño porcentaje de falsos positivos debido a reacciones de IgM no específicas. La prueba de LA también es simple, fácil de hacer, económica y pueden emplearse sueros humanos o animales. [56,80-82].

Inmunoensayos enzimáticos (EIA).

Los inmunoensayos enzimáticos o ELISA son probablemente las pruebas diagnósticas más usadas en todo el mundo para el *screening* de la toxoplasmosis en los seres humanos. El antígeno soluble es

absorbido a una matriz, el suero del paciente se incuba con el antígeno, luego con el anticuerpo conjugado marcado con la enzima y posteriormente, con el sustrato. La coloración desarrollada se lee visualmente o espectrofotométricamente. La ELISA tiene ventajas sobre los demás inmunoensayos enzimáticos, ya que es objetiva, cuantitativa y puede ser automatizada. Los resultados de EIA comparados con los obtenidos con DT y IFA son muy semejantes en su sensibilidad, pero se han reportado algunos falsos positivos. La inactivación por calor de suero puede causar reacciones falsopositivas y los anticuerpos específicos IgM pueden causar una reducción muy grande de los títulos de IgG. Las pruebas de IFA y EIA tienen una gran desventaja, ya que requieren antisueros marcados con fluoresceína o enzimas para cada especie de animal analizado.

Otro tipo de EIA es el inmunoblot. El antígeno se somete a una electroforesis en gel de poliacrilamida para separar sus componentes de acuerdo a su tamaño y cargas eléctricas, posteriormente se transfieren los componentes a una matriz de papel, la cual puede ser procesada en un EIA para visualizar la reacción. Esta técnica es usada para determinar los antígenos involucrados en diferentes etapas de una infección (antígenos de etapa-específicos) pero esto no se hace de manera rutinaria [56,80-82,84-89].

Resultados e interpretación.

Los anticuerpos que se detectan por DT e IFA aparecen entre la 1ª y 3ª semanas, se elevan rápidamente y alcanzan el máximo a las 4-6 semanas (títulos superiores a 1:1,000). Comienzan a descender a las 6-12 semanas, pero pueden quedar títulos de 1:8 a 1:64 durante varios años o incluso toda la vida. Las pruebas de IFA-IgM se positivizan antes (1 semana) y alcanzan su máxima cota 4-6 semanas (títulos de 1:80). Lógicamente, los anticuerpos que detectan (IgM) comienzan a descender antes (4-5 meses) y se negativizan al cabo de 1 año o incluso más precozmente. A veces, títulos bajos (1:16) persisten algunos meses.

La reacción de HAI se positiviza a las 2-4 semanas. Su título aumenta rápidamente y a las 8-10 semanas se encuentran las cifras más elevadas (superiores a 1:1,000). A partir de este momento, los anticuerpos que detecta tienen una evolución muy parecida a los de DT e IFA. Es una reacción que, como ya se ha señalado, puede ser negativa en la toxoplasmosis congénita.

Los anticuerpos detectados por FC son los de aparición más tardía (3-4 semanas), con títulos máximos de 1:32 ó 1:64 a las 10-12 semanas. Descienden precozmente (3-4 meses) y se negativiza en un periodo comprendido entre 1 y 2 años.

La interpretación es a veces difícil. El resultado de un prueba aislada no tiene valor, a no ser que los títulos sean elevados. Si son válidas las seroconversiones o la comprobación de un aumento significativo en el título, en una segunda prueba. Como existen problemas de interpretación, se tiende a expresar los resultados en unidades internacionales (UI) en relación con sueros patrón, pero, salvo en el caso de las IFA, no existe una estandarización. En la toxoplasmosis adquirida, los títulos de 1:64 en las pruebas de DT, IFA y HAI suelen aceptarse como exponentes de infección y los de 1:256, como índices de infección reciente. En el caso de la CF son significativos los títulos de 1:8. Títulos de 1:80 en la prueba IFA-IgM indican infección reciente. Si la IFA se refleja en UI, tienen valor los títulos superiores a 300 UI, mientras que los comprendidos entre 100 y 300 UI son dudosos.

Para el diagnóstico de la toxoplasmosis congénita hay que estudiar las tasas de IgM, pues éstas no atraviesan la placenta, a no ser que existan dehiscencias placentarias (en este caso, las IgM desaparecen en pocas semanas). Las pruebas que hay que emplear son IFA-IgM, DA y ELISA-IgM. Cualquier valor de IgM específica en el momento del parto indica infección congénita. La ausencia de IgM no excluye una toxoplasmosis congénita, pues puede tratarse de infecciones intrauterinas muy precoces o de niños con déficit inmunitario. [9,81]

11. TRATAMIENTO.

Son indicaciones para el tratamiento la enfermedad clínica diagnosticada, toxoplasmosis ocular activa, infecciones congénitas ya sea subclínicas o no y en manifestaciones compatibles a la

toxoplasmosis en pacientes inmunosuprimidos El tratamiento de la toxoplasmosis aguda en la preñez es controversial, esto es debido a que sólo una tercera parte de los niños pueden llegar a ser infectados y se corre el riesgo de que los fármacos tengan efectos tóxicos sobre éstos. No necesitan tratamiento las formas de linfadenopatía en personas sin inmunodeficiencias, que cursan sin fiebre y otros síntomas reveladores de la afectación de otros órganos (cerebro, miocardio, etc.)

Existen varios fármacos que han probado ser eficaces, aunque de alguno de ellos se tiene poca experiencia en casos humanos. Los más importantes son la pirimetamina, sulfamidas, cotrimoxazol y espiramicina. Su actividad queda limitada a los taquizoitos. No atraviesan la membrana del quiste y, por lo tanto no actúan sobre los bradizoitos. No obstante algunos autores han señalado que la espiramicina puede penetrar en el interior de los quistes. El tratamiento de elección es la combinación de pirimetamina y sulfamidas [1,9,50,56]

La pirimetamina se absorbe por vía oral, penetra bien en el LCR y bloquea el paso de ácido fólico o folínico. Se administra 1 mg/Kg. vía oral en los primeros tres días, posteriormente la dosis baja a 0.3 mg/Kg. vía oral. Es supresor de la médula ósea y puede ocasionar trombocitopenia y a veces anemia y leucopenia, por lo que en el transcurso del tratamiento deben realizarse controles de sangre periférica dos veces por semana. Para evitar su efecto tóxico, puede asociarse ácido fólico por vía oral o intramuscular. La pirimetamina no debe emplearse en el primer trimestre de la gestación.

Las sulfamidas impiden la síntesis de ácido fólico. Las más activas son la sulfadiazina y la sulfamida triple (sulfadiazina, sulfamerazina y sulfametazina). La dosis administrada es 100 mg/kg. vía oral, sin sobrepasar los 4 g., dividida en cuatro dosis. Se comportan de forma sinérgica con la pirimetamina.

El cotrimoxazol (trimetoprim + sulfametoxazol) ha probado ser eficaz en animales e *in vitro*, pero resulta poco eficaz en toxoplasmosis humanas. En todo caso, su actividad es inferior a la de la asociación de pirimetamina y sulfadiazina o pirimetamina y triple sulfamida.

La espiramicina es menos tóxica, aunque menos activa, que la pirimetamina. Puede emplearse asociada a ésta o a las sulfamidas y es el fármaco de elección para el tratamiento de la toxoplasmosis en el embarazo.

Los corticoides no están recomendados, pues pueden favorecer la diseminación de taquizoitos o reactivar focos latentes. Sin embargo, en los casos de retinocoroiditis, en los que los fenómenos de hipersensibilidad son importantes en el desarrollo de las lesiones, está justificado su empleo [1,9,50,56]

La duración del tratamiento es difícil de precisar. Normalmente son suficientes 4 semanas, excepto cuando se trata de personas inmunodeprimidas, en las cuales el tratamiento deberá prolongarse de 2 a 3 semanas más [9]

12. PREVENCIÓN Y CONTROL.

a. Medidas preventivas.

Para prevenir la infección por *T. gondii* en humanos y animales se deben de seguir la siguientes recomendaciones:

- Lavarse las manos con agua y jabón después de manejar carne cruda. Así como, las tablas de corte, cuchillos y otros utensilios que estén en contacto con la carne cruda, ya que los quistes de tejido no se eliminan sólo con agua.
- La carne de cualquier origen debe ser cocida a no menos de 70°C antes del consumo humano y animal.
- Los vegetales deben lavarse bien antes de consumirse debido a que pueden estar contaminados con heces de gato.
- Beber solamente leche pasteurizada o hervida, especialmente la de cabra.

- Las mujeres embarazadas deben evitar el contacto con gatos, tierra y carne cruda.
- Los gatos domésticos deben ser alimentados con comida enlatada o bien cocida. Nunca deben alimentarse con carne cruda, vísceras o huesos. Evitar que los gatos coman aves, ratones u otros animales silvestres.
- La caja de arena del gato debe cambiarse diariamente y no debe hacerlo las mujeres embarazadas.
- Deben usarse guantes cuando se hace jardinería.
- Los puercos u otros animales muertos deben ser removidos del corral para evitar el canibalismo.
- Los fetos y las placentas de abortos de animales ocasionados por la toxoplasmosis, deben ser enterrados o incinerados. Además, de manipularse con equipo de protección (guantes, lentes, etc.).
- Los granos para el consumo humano o animal deben ser conservados bien tapados para evitar contaminación con oocistos.
- Es importante prevenir la infección en animales de zoológico, sobre todo en los felinos, ya que éstos pueden ser fuente potencial de infección para los niños y adultos que los visitan. [1,9,27,50,56,89]

b. Vacunas.

Sin duda, el desarrollo de una vacuna efectiva contra *T. gondii* es la meta de muchos laboratorios de investigación. En los humanos, esta vacuna proporcionaría una protección efectiva contra la infección congénita, así como, en la infección de pacientes inmunosuprimidos. En los animales domésticos (por ejemplo, borregos y cerdos) esta vacuna podría prevenir los abortos espontáneos, y sobre todo, reducir

los vectores biológicos principales para la infección humana, los quistes de tejido (en carne cruda) y los oquistes (en las heces de gato) [17,89-91]

En la búsqueda de posibles vacunas, se han investigado el uso de parásitos atenuados o muertos. El empleo de la radiación para atenuar cepas de *T. gondii* ya sea virulentas o avirulentas ha dado como resultado una protección parcial contra la infección aguda. La administración del parásito muerto con adyuvante completo de Freund ha mostrado que ofrece protección significativa en ratones [17,92]

El uso de un mutante de *T. gondii* sensible a la temperatura denominado ts4 ha sido otro de los prospectos de la vacuna. Esta cepa no coloniza el tejido de los mamíferos ni forma quistes, debido a que no tiene la capacidad de sobrevivir y multiplicarse a la temperatura de 37°C. El mutante ts4 tiene la capacidad de inmunizar a los ratones y prevenir o reducir significativamente la transmisión en estos animales. De esta manera, la inoculación o deposición de los organismos dentro en el duodeno y yeyuno resulta en el desarrollo de la resistencia al reto con cepas letales de *T. gondii*. Sin embargo, esta inmunización no previene la formación de los quistes en posteriores infecciones. En los ratones inmunizados intrainestinalmente se reduce la transmisión congénita, lo que no sucede con la inmunización subcutánea. Este ensayo demostró que existe la posibilidad de que los procedimientos de inmunización reduzcan la transmisión congénita. Aunque estos resultados fueron interesantes, no se puede aplicar esta vacuna a los humanos [17,93-95]

Otro mutante de *T. gondii* (S48), el cual ha perdido la capacidad para formar quistes de tejido y por lo tanto para persistir como una infección latente en los huéspedes mamíferos, se emplea ahora como una vacuna para reducir los abortos y la mortalidad neonatal en los borregos. [90,91]

En los Estados Unidos, los cerdos aparecen como la principal fuente de la infección humana. Por esto, esta siendo probada como vacuna la cepa RH de *T. gondii* para la prevención de la formación de quistes en los cerdos. Los parásitos de esta cepa son altamente virulentos para los ratones pero en los cerdos sólo producen una enfermedad leve. Además, los parásitos inoculados no persisten como quistes de tejido en los animales. Cuando los cerdos que se han recuperado de una infección con esta cepa son

reinfectados con cepas que sí forman quistes, estos no muestran signos de enfermedad y tienen muy pocos quistes en sus tejidos

El mutante T-263, es también de interés para el desarrollo de una vacuna. En contraste a los mutantes ts-4 y S-48 y la cepa RH, el mutante T-263 forma quistes de tejido en los huéspedes intermediarios. Sin embargo, cuando estos quistes son ingeridos por los gatos, estos llevan a cabo un desarrollo parcial en el intestino, fallando en la formación de los ooquistes. Este hecho sugiere el uso del mutante T-263 como una vacuna para prevenir la enfermedad en los gatos y para minimizar la liberación de ooquistes [90]

Se ha reportado el uso de antígenos del parásito como inmunógenos efectivos. Capron y colaboradores han demostrado que las ratas inmunizadas con antígeno de excreción-secreción (ESA) son capaces de conferir pasivamente la inmunidad a la cepa nu/nu altamente sensible. Después del reto, los receptores transferidos pasivamente fueron capaces de sobrevivir 30 días, más del doble de tiempo que el grupo control [17,90,96]

Se ha investigado el antígeno específico P30 para observar su potencial como un modulador efectivo de la inmunidad protectora contra la toxoplasmosis aguda y crónica. Cuando esta proteína se administró en la presencia de adyuvantes de saponina, Quil A o liposomas se ha obtenido casi el 100% de protección contra la infección aguda en ratones. Seis semanas después del reto, ninguno de los ratones sobrevivientes desarrollaron quistes de tejido, sugiriendo una protección similar contra la infección crónica. [17,90]

Se han encontrado resultados similares en ratones de las cepas singénicas A/J y C57BL. Los análisis del fenotipo inducido por la inmunización muestran un incremento en el número absoluto de células T CD8⁺, así como en la razón CD4⁺/CD8⁺. La transferencia adoptiva de células T CD8⁺ confieren protección en los huéspedes no inmunizados. Además, se ha encontrado que estas células efectoras CD8⁺ son parasiticidas *in vitro*. Por lo tanto, todos estos datos indican que P30 es un antígeno potencialmente efectivo para la inmunización contra la toxoplasmosis aguda y crónica. [17,90,97]

Muchas de las vacunas humanas más usadas están compuestas de agentes patógenos vivos atenuados sin ningún adyuvante. Actualmente las vacunas anti-parasitarias producidas son de este tipo. El campo para la obtención de la nueva vacuna anti-parasitaria se ha extendido con el advenimiento de la ingeniería genética. Esta ha provisto de un método conveniente para la manufacturación de antígenos de organismos, en los cuales es imposible la obtención de una cantidad suficiente. Además, la ingeniería genética ha abierto la posibilidad de obtener vacunas que contengan uno o varios antígenos purificados del parásito [98]

Con esto se tiene la ventaja de que la vacuna contiene solamente los componentes del parásito que necesita para generar la inmunidad protectora. Sin embargo, ahora surge un problema muy importante, ya que los antígenos aislados son comúnmente mucho menos inmunogénicos que cuando estos se incluyen con el parásito vivo. Este problema se puede disminuir por la adición de inmunoestimulantes. [2,98-99]

B. INMUNOESTIMULANTES.

El uso de los inmunoestimulantes en el tratamiento de la enfermedad humana se originó a principios de este siglo en los Estados Unidos con el uso experimental, por William B. Coley, de una mezcla de toxinas bacterianas para el tratamiento del cáncer. Muchos de estos derivados microbianos se han utilizado contra el cáncer de vejiga, cáncer gástrico y otros cánceres, así como en infecciones recurrentes [2,98-102]

Los inmunoestimulantes actualmente autorizados para su uso clínico se muestran en la Cuadro 3. Los inmunoestimulantes representan un número de compuestos separados con una gran variedad de conformaciones y diferentes vías de acción. Ahora se reconoce que sus propiedades biológicas dependen de su capacidad para activar selectivamente una de las dos subpoblaciones de las células T CD4⁺, T_H1 o T_H2, que controlan la respuesta inmune específica. Esto ha sido examinado por la comparación de dos muy diferentes preparaciones de adyuvantes, alum y adyuvante completo de

Freund (FCA), usando el mismo antígeno en ratón FCA activa al células T_{H1} y alum activa a la células T_{H2} .

Cuadro 3. Inmunoestimulantes de uso clínico

Agente	Origen	Uso clínico
BCG	Micobacteria viva	Cáncer de vejiga
Picibanil	Extracto de <i>Streptococcus pyogenes</i>	Cáncer gástrico / otros cánceres
Krestin	Polisacárido fúngico	Cáncer gástrico / otros cánceres
Lentinan	Polisacárido fúngico	Cáncer gástrico / otros cánceres
Biostim	Extracto <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Infecciones crónicas o recurrentes
Broncho-Vaxom	Extracto de otras bacterias	Infecciones crónicas o recurrentes
Thymostimulin	Extracto de péptido tímico	Cáncer e infección
T-activin	Extracto de péptido tímico	Cáncer e infección
Thym-uvoval	Extracto de péptido tímico	Cáncer e infección
Thymomodulin	Extracto de péptido tímico	Cáncer e infección
Romurtide	[Lys ¹⁸ muramid] dipeptido	BMR
Thymopentin TP5	Pentapéptido	Artritis reumatoide, infección y cáncer
Levamisole	fenilimidotiazol	Cáncer

Fuente: Referencia (10)

Las estructuras bacterianas proveen la principal fuente de inmunoestimulantes. Existen muchas copias sintéticas de estructuras de bajo peso molecular, tales como los peptidoglicanos de pared celular o lípido A de bacterias gram negativas que son capaces de alterar el sistema inmune sin ser por sí mismas inmunogénicas. Estas sustancias tienen esta propiedad debido a que se asemejan a estructuras microbianas que han provisto de signos de peligro de infección desde el inicio de la historia evolutiva de las defensas del huésped. Un concepto similar ha sido desarrollado recientemente por Rook, quien postula que las bases de la adyuvancia podría ser sustentadas en el reconocimiento de componentes microbianos definidos por receptores filogenéticamente antiguos presentes en las células accesorias. Este reconocimiento induce a estas células a producir citocinas que determinan la activación de subpoblaciones T_{H1} o T_{H2} . Las estructuras microbianas conservadas podrían también inducir directamente células B o macrófagos para expresar una actividad co-estimuladora potente para la expansión clonal de células $T CD4^+$, como lo sugiere Janeway. [2,98-102]

C. USO DE LACTOBACILOS COMO INMUNOESTIMULANTES.

Se han reportado varios estudios donde los *Lactobacillus* presentan un efecto inmunoestimulante. Perdígón y colaboradores (1991) demostraron que el *L. casei* administrado a ratones por vía oral, los protege contra la infección por *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*. Además, se observó que este efecto se debe al incremento de la IgA secretora en el lumen del intestino. Concluyendo que esta bacteria juega un papel muy importante en la prevención de las infecciones entéricas. En investigaciones anteriores (1986, 1988), estos autores indicaron la importancia de incluir en la dieta los productos manufacturados y fermentados que contienen lactobacilos. Así como, la posible aplicación clínica de leches fermentadas como inmunoestimulantes [3,103-104]

Miake y colaboradores (1985) reportaron el efecto protector de la inoculación por vía intraperitoneal de *L. casei* (muerto por calor) a ratones, que posteriormente fueron retados con *Pseudomonas aeruginosa*. Estos autores demostraron que la inducción de los macrófagos activados es el principal mecanismo involucrado en la inmunidad protectora. [4]

Sato (1984) estudió el papel de los macrófagos en la respuesta del huésped cuando se inmunoestimula con *L. casei* y después se reta con *Listeria monocytogenes*. Encontrando que la resistencia es mediada por los macrófagos migratorios y que esta depende de la dosis administrada de *L. casei* (10^4 ó 10^6) [5]

Hashimoto y colaboradores (1984) inocularon por vía intraperitoneal (IP) e intravenosa (IV) *L. casei* a ratones BALB/c y encontraron que aumentaba la producción de radicales de oxígeno (OR) en los macrófagos peritoneales (PM) y se suprimía la producción de prostaglandina E_2 . También observaron que se inhibía el crecimiento del fibrosarcoma Meth A inoculado por vía IP y de *Listeria monocytogenes* en el hígado. Finalmente, el aumento de la producción de OR por *L. casei* fue marcadamente mayor y duró más tiempo que con otros inmunoestimulantes bacterianos [105]

Isolauri y colaboradores (1995) encontraron cuando se administra a infantes *L. casei* por vía oral junto con la vacuna *D x RRV' reassortant rotavirus* se incrementa las células secretoras de IgM

rotavirus específicas. Estos resultados mostraron que *L. casei* es un inmunoestimulante efectivo en la vacunación contra rotavirus. [106]

Otro de los *Lactobacillus* que tienen efecto inmunoestimulante es el *L. acidophilus*. Hay reportes que indican que esta bacteria tiene propiedades inmunoestimulantes contra agentes patógenos (*Trichomonas vaginalis* y *Candida albicans*). [107-109]

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La toxoplasmosis dada su distribución cosmopolita es un problema de salud en todo el mundo. Se estima que la mitad de la población mundial tiene anticuerpos específicos contra *T. gondii*. Aunque, si bien es cierto que la toxoplasmosis es asintomática en los individuos inmunocompetentes, existen dos grupos de alto riesgo en los cuales pueden desarrollarse secuelas muy importantes. Estos grupos los constituyen los fetos de mujeres infectadas durante el embarazo, en los cuales pueden producirse graves secuelas como son: retraso mental, convulsiones, hidrocefalia, microcefalia, sordera y hasta la muerte del producto, y los pacientes con enfermedades inmunosupresoras (leucemias, linfomas, agamaglobulinemia, SIDA, etc.) que desarrollan cuadros graves de toxoplasmosis: exantema hemorrágico, ataque intenso al estado general, miocarditis agudas, coriorretinitis progresiva y, sobre todo, la muerte.

Sin duda, la búsqueda de alternativas para el control de la toxoplasmosis es la premisa de muchos investigadores. Se ha intentado disminuir este problema con diversas vacunas sin obtener buenos resultados. Lo más que se ha logrado es una vacuna para animales, en la que se emplea la cepa S48 de *T. gondii*. Esta vacuna no se puede utilizar en el humano.

El antígeno específico P30, extraído de la pared celular del parásito, ha demostrado que puede ser un buen prospecto para desarrollar una vacuna. Sin embargo, todavía no existen reportes definitivos que favorezcan el empleo de este antígeno para fines profilácticos.

Una de las alternativas que han surgido en los últimos años para la prevención de algunas infecciones microbianas, es el uso de inmunostimulantes. Por lo que, la disponibilidad de inmunostimulantes para uso clínico es crucial. Una de las principales fuentes de inmunostimulantes son las paredes celulares de origen bacteriano.

En la actualidad, se ha reportado el uso de las bacterias género *Lactobacillus* para la prevención de algunas infecciones experimentales. Las especies de *Lactobacillus* que han sido más utilizados son *L. casei* y *L. acidophilus*. Las principales ventajas que ofrecen los *Lactobacillus* como posibles agentes inmunostimulantes son que forman parte de la flora normal intestinal, no son patógenas, no producen

toxinas, tradicionalmente se usan como agentes fermentadores en la industria láctica y presentan propiedades antitumorales.

Por todo esto, la presente investigación pretende demostrar que *Lactobacillus casei* administrado via intraperitoneal, siete días antes de la infección por *Toxoplasma gondii*, protege al modelo murino.

IV. OBJETIVOS.

A. OBJETIVO GENERAL.

- Evaluar el efecto de la administración de *Lactobacillus casei* en murinos expuestos a *Toxoplasma gondii*.

B. OBJETIVOS PARTICULARES.

- Determinar el posible efecto inmunoestimulador del *Lactobacillus casei* en murinos.
- Determinar la sobrevivencia de ratones infectados con *Toxoplasma gondii*, los cuales son previamente tratados con *Lactobacillus casei*.
- Determinar los niveles de interferón gamma (IFN- γ) en ratones inmunoestimulados con *Lactobacillus casei* e infectados con *Toxoplasma gondii*.
- Comparar el efecto inmunoestimulante del *L. casei* (viable) y *L. casei* (muerto por calor).

**V. HIPOTESIS DE
TRABAJO.**

HIPÓTESIS 1.

Se ha observado que la inoculación de *Lactobacillus casei* via intraperitoneal tiene un efecto inmunoestimulante en el modelo murino y que *Toxoplasma gondii* cepa RH es 100 por ciento letal a dosis muy bajas para la especie murina. Por lo tanto, si se inoculan lotes de ratones por via intraperitoneal con *Lactobacillus casei* y posteriormente se infectan con *Toxoplasma gondii*, se observará una disminución en la mortalidad de la población murina.

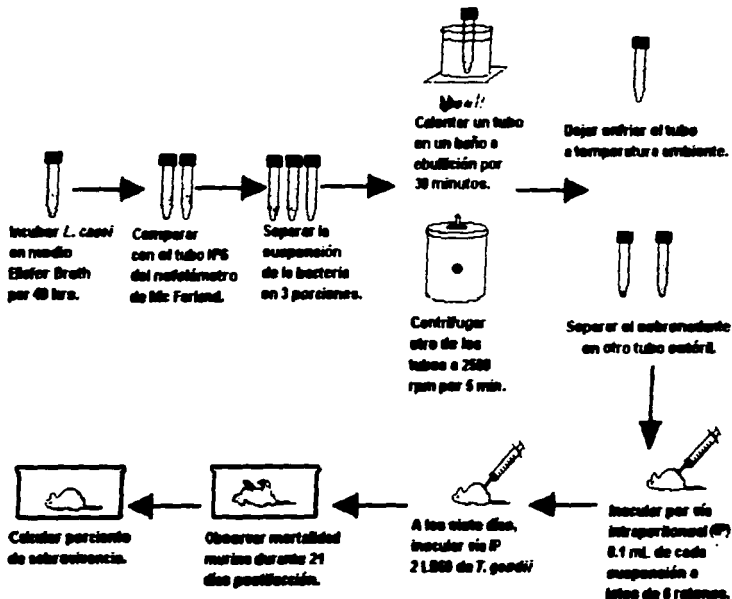
HIPÓTESIS 2.

Basandose en el hecho de que los linfocitos T estimulados producen Interferón gamma (IFN- γ), el cual es el principal mediador de la resistencia contra la toxoplasmosis, siendo su principal mecanismo de acción la activación de los macrófagos. Por lo tanto, si se determinan los niveles de IFN- γ en los murinos inmunoestimulados con *Lactobacillus casei* e infectados con *Toxoplasma gondii* se encontraran elevados significativamente los valores en los ratones que sobrevivan a la infección.

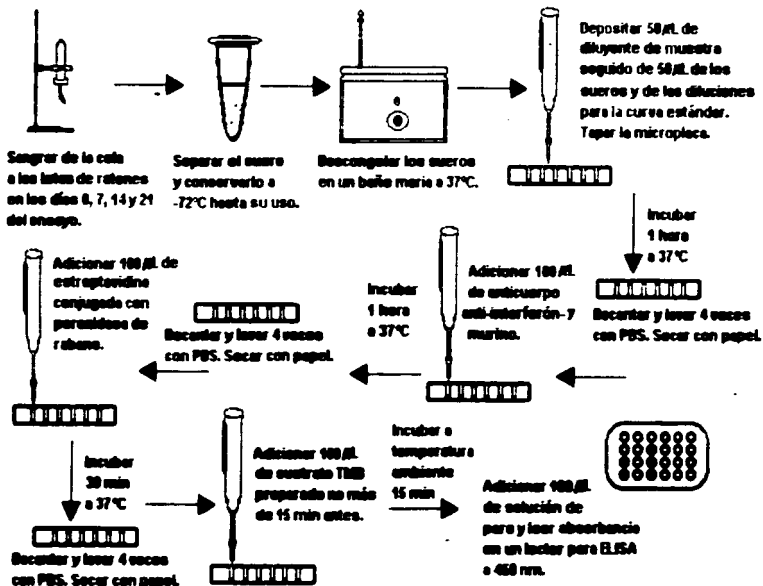
VI. METODOLOGIA GENERAL.

A. DIAGRAMAS DE FLUJO.

1. INMUNOESTIMULACION CON *L. casei* E INFECCION CON *T. gondii*.



2. DETERMINACION DE IFN- γ POR EL METODO DE ELISA.



B. MATERIALES.

1. MATERIAL BIOLÓGICO.

- *Lactobacillus casei* ATCC 7469
- Ratonas hembras de la cepa NIH
- *Toxoplasma gondii* cepa RH

2. EQUIPO E INSTRUMENTOS.

- Balanza Semianalitica modelo P100 METTLER.
- Baño Maria
- Cámara de Neubauer BOECO
- Cajas de Petri estériles desechables 100x15 mm TECHNICAPE.
- Centrifuga para Eppendorf modelo 5415C.
- Centrifuga para tubos de ensayo modelo J-12 SOL.-BAT.
- Congelador 20°C FRIGIDAIRE
- Congelador 70°C modelo 8416 FORM SCIENTIFIC.
- Contador de laboratorio Clay Adams BECTONDICKINSON.
- Estuche de disección
- Estufa de cultivo modelo EC33 RIOS ROCHA.
- Estufa modelo casero MABE.
- Gradillas para tubo de ensayo (varios tamaños).
- Jeringas 5 mL con aguja 22x32 mm PLASTIPAK BD.
- Jeringas 1 mL con aguja 25x16 mm PLASTIPAK BD.
- Lector de microplacas para ELISA.
- Mangueras de hule (varios tamaños).
- Masking tape 18mm x 50m TUK.
- Matraces con tapón de rosca 250 y 500 mL No.26505 KIMAX.

- Mechero Fischer.
- Mezclador de laboratorio de velocidad constante Mod. 1195 LAB-LINE
- Microscopio óptico modelo 470801-9099 CARL ZEISS.
- Olla de presión modelo Presto de 20 L STEELE de México
- Parrilla de agitación y calentamiento Mod.502P PMC.
- Pipeta semiautomática 0-100 mL No. 623662A GILSON
- Probeta 1000 mL No 20024 KIMAX.
- Refrigerador modelo Casero MABE.
- Tubos con tapón de rosca 13x100 No 45066 P.K.
- Tubos con tapón de rosca 15x180 No 9825 PYREX.
- Tubos de ensayo 13*100 No 45048 KIMAX.
- Vasos de precipitado 100, 250, 5000 y 1000 mL No. 1000 PYREX.

3. REACTIVOS.

- Acetato de sodio cristales 500g Cat. 1190 P.Q. MONTERREY.
- L-Acido ascórbico 25 g EASTMAN KODAK.
- Bacto Triptona 454g Cat. 123-01 DIFCO.
- Cloruro de sodio 500g Cat. 2440 P.Q. MONTERREY.
- Colorante de Gram para frotis sanguíneos 25g Cat. 328 SIGMA.
- Dextrosa anhidra 500g Cat. 840 P.Q. MONTERREY.
- Extracto de levadura 300g Cat. 155-3 BIOXON.
- Gelatina Bacto 100g Cat. 4073 MERCK.
- Kit de ELISA para la determinación de Interferón Gamma Murino GENZYME.
- D(+)- Lactosa monohidratada 500g Cat. 7657 MERCK
- Penicilina G sódica cristalina 1,000,000 U Clave 1921 SECTOR SALUD.
- Sacarosa granular 500g Cat. 764 P.Q. MONTERREY.
- Sangre de carnero desfibrinada 50 ml. ERIKAR

C. PROCEDIMIENTOS.

1. MANTENIMIENTO DE MATERIAL BIOLÓGICO.

a. Mantenimiento del parásito.

Se utilizó la cepa RH de *Toxoplasma gondii* que se ha mantenido por pases seriados de ratones en el Departamento de Parasitología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional (IPN). Para llevar a cabo este experimento, se inoculó el parásito por vía intraperitoneal a tres ratones de la cepa NIH, los cuales se conservaron en el laboratorio de Inmunoparasitología de este mismo Departamento. Cuando los ratones presentaban signos de enfermedad (enconchamiento y erizamiento del pelo) se obtenía su exudado peritoneal y se inoculaba a otros tres ratones. Estos pases se realizaban, por lo regular tres veces por semana.

b. Mantenimiento de la bacteria.

Se utilizó *Lactobacillus casei* ATCC 7469, que fue donado por el Departamento de Microbiología de la ENCB. Para mantener esta bacteria en el laboratorio de Inmunoparasitología, se sembraba en el medio líquido Bacto Ellefer Broth [ANEXO I] cada tercer día y se incubaba a 37°C.

2. DETERMINACIÓN DE DOSIS LETAL MEDIA (LD₅₀) DE *Toxoplasma gondii*.

Debido a que ya se tenían reportes de la dosis letal media (LD₅₀) de *T. gondii*, se procedió a comprobarla. Para lo cual, se inocularon por vía intraperitoneal tres lotes de 6 ratones con diferentes dosis de *T. gondii* (30,50 Y 100 parásitos) y se observó la mortandad de los mismos en un periodo de 30 días. La dosis letal media que se obtuvo fue de 50.

3. INMUNOESTIMULACIÓN.

La inmunoestimulación se realizó de acuerdo a la Cuadro 4. La bacteria se resembró en el medio Bacto Ellefer Broth dos días antes del ensayo. Después de la incubación, se preparó una suspensión viable de *Lactobacillus casei* fijada y ajustada al tubo número 6 del nefelómetro de Mac Farland (1.8×10^9 unidades formadoras de colonias) [ANEXO II]. El volumen de esta suspensión no debía ser menor a 12 mL, puesto que de este tubo se obtenían tres porciones de 4 mL aproximadamente. Cada porción correspondía a cada uno de los tratamientos presentados a continuación.

a. Inmunostimulación con *Lactobacillus casei* (viable).

Se inocularon por vía intraperitoneal a los lotes de ratones Ay E con 0.1 mL de la suspensión de *L. casei* viable. Cada lote estaba formado por seis ratones hembras de la cepa NIH.

b. Inmunostimulación con *Lactobacillus casei* (muerto por calor).

De la suspensión de *Lactobacillus casei* se separó 3 mL aproximadamente en un tubo estéril y se calentó en un baño de agua a ebullición durante 30 minutos. Se dejó enfriar y se inoculó por vía intraperitoneal 0.1 mL de esta suspensión a los lotes B y F.

c. Inmunostimulación con sobrenadante de *Lactobacillus casei*.

De la suspensión de *Lactobacillus casei* se tomó 4 mL y se centrifugó a 2500 r.p.m. durante 5 minutos. Se separó el sobrenadante y se depositó en otro tubo. Se inoculó por vía intraperitoneal 0.1 mL de este sobrenadante a los lotes C y G.

Cuadro 4. Esquema de inmunestimulación e infección con *T. gondii* empleado en este estudio.

Clave del Lote	Inmunestimulación	Infección con 2 LD ₅₀ de <i>T. gondii</i>
A	0.1 mL de L. casei (viable)	A los 7 días postestimulación
B	0.1 mL de L. casei (muerto por calor)	A los 7 días postestimulación
C	0.1 mL de sobrenadante	A los 7 días postestimulación
D	Sin tratamiento	A los 7 días postestimulación
E	0.1 mL de L. casei (viable)	Sin tratamiento
F	0.1 mL de L. casei (muerto por calor)	Sin tratamiento
G	0.1 mL de sobrenadante	Sin tratamiento
H	Sin tratamiento	Sin tratamiento

4. INFECCION CON *Toxoplasma gondii*

A los siete días se obtuvo el exudado peritoneal de un ratón infectado con *T. gondii* dos días antes. Se contó el número de parásitos por mililitro, con la ayuda de una cámara de Neubauer y una pipeta de Thoma para glóbulos blancos. Posteriormente, se diluyó con solución salina estéril a una concentración de 20 LD₅₀ del parásito por mililitro. Se inocularon por vía intraperitoneal 0.1 mL de la solución diluida a los lotes A, B, C y D (Esta dosis correspondía a 2 LD₅₀). Se observó la mortandad de los ratones durante 21 días y se calcularon los porcentajes de sobrevivencia para cada lote.

5. DETERMINACIÓN DE INTERFERÓN GAMMA POR EL MÉTODO DE ELISA.

Se obtuvo el suero de los 8 lotes de ratones, durante los días 0, 7, 14 y 21 del ensayo. Se conservaron a una temperatura de -72°C hasta su uso. Se determinó IFN- γ por el método de ELISA a las muestras obtenidas anteriormente, de acuerdo a la siguiente metodología:

a. Se retiró el Kit de ELISA para la determinación IFN- γ murino Interstest- γ TM del refrigerador 30 minutos antes de usarse.

b. Se determinó el tamaño del ensayo y el diseño de la placa, considerando que se necesitaban 12 pozos para la curva estándar. Esta curva debía realizarse una vez en cada ensayo.

c. Se preparó el buffer de lavado, adicionando 50 mL de la solución concentrada a 950 mL de agua desionizada. Se mezcló fuertemente.

d. La curva estándar se construyó de acuerdo a la Cuadro 5

Cuadro 5. Diluciones seriadas de la curva estándar para la determinación de IFN- γ

Concentración de IFN- γ	Diluyente de muestra	Estándar
1620 pg/mL	400 mL	200 μ L de la solución concentrada
540 pg/mL	400 mL	200 μ L de la solución de 1620 pg/mL
180 pg/mL	400 mL	200 μ L de la solución de 540 pg/mL
60 pg/mL	400 mL	200 μ L de la solución de 180 pg/mL
20 pg/mL	400 mL	200 μ L de la solución de 60 pg/mL
0 pg/mL	250 mL	—

e. Se sacó la placa de su bolsa protectora. Los pozos que no se iban a utilizar se regresaron a la bolsa y se almacenaron a una temperatura de 2-8°C.

f. Se adicionó las muestras y los seis estándares (por duplicado) a la placa de acuerdo al esquema del ensayo. Para la curva estándar, se adicionaron 100 μ L/pozo de cada dilución del estándar. Para las muestras problema, se adicionó 50 μ L del diluyente de muestras a cada pozo seguido por 50 μ L del suero. Se tapó la placa con la cubierta adhesiva y se incubó 1 hora \pm 5 minutos a 37°C.

g. Se removió el líquido de los pozos por inversión de la placa y se sacudió, teniendo cuidado de no tirar los pozos. Se lavó la placa 4 veces dispersando fuertemente el buffer de lavado en cada pozo. Se llenaron bien los pozos y luego se decantaron completamente. Se sacó la placa sobre toallas de papel. Se adicionó 100 μ L del anticuerpo anti-Interferon- γ murino con biotina a cada pozo. Se tapó la placa y se incubó por 1 hora \pm 5 minutos a 37°C.

h. Se removió el líquido de los pozos y se sacudió la placa. Se lavó cuatro veces y se decantó completamente. Se secó la placa y se adicionaron 100 μ L de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) a cada pozo. Se tapó e se incubó 30 ± 2 minutos a 37°C .

i. Se preparó el sustrato no más de 15 minutos antes de que se usara. Se adicionaron volúmenes iguales de sustrato A y B. Se removió el líquido de los pozos y se sacudió la placa. Se lavó cuatro veces y se decantó completamente. Se secó la placa y se adicionó 100 μ L de sustrato TMB preparado a cada pozo. Se incubó 15 ± 1 minutos a temperatura ambiente ($18-24^\circ\text{C}$). Se paró el desarrollo de color con la adición a cada pozo de 100 μ L de solución de paro. El color azul en los pozos se cambió a amarillo. Se determinó la absorbancia de los pozos con un lector de ELISA a 450 nm.

D. DISEÑO DE INVESTIGACION.

El presente estudio fue de tipo prospectivo, comparativo, longitudinal y observacional.

1. POBLACION.

Ratones hembras de 7 a 8 semanas de edad, de la cepa NIH.

2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

- Cepa: NIH.
- Sexo: Femenino
- Peso: 20-25g.
- Edad: 7-8 semanas.
- No preñadas.
- Sin tratamiento con medicamentos (antimicrobianos, antiparasitarios, inmunosupresores, etc.).
- Sin daño físico aparente (mordeduras en cola, infecciones de la piel y ojos, etc.).

- Sin acaros u otros parásitos.

2. CRITERIOS DE ELIMINACION.

- Preñez.
- Dosis insuficiente de inmunoestimulante o de parásito

3. VARIABLES.

Variable independiente: Inmunoestimulación con *Lactobacillus casei*.

Variable dependiente: Porcentaje de supervivencia en murinos.

D. DISEÑO ESTADISTICO.

Para determinar las significancias estadísticas de los datos obtenidos en los ensayos, se aplicó el análisis de varianza de un factor por rangos o prueba de H de Kruskal-Wallis y la prueba del rango para muestras independientes o prueba de U de Mann-Whitney. El primer estudio determinaba si existían o no diferencias significativas entre los todos los tratamientos aplicados a los grupos de ratones. Si se encontraban diferencias, se aplicaba el segundo estudio, para identificar cual o cuales eran los grupos que presentaban esta diferencia. El nivel de significación empleado fue de 5%. [ANEXO III y IV].

VII. RESULTADOS.

En el presente estudio, se efectuaron tres confrontaciones de *T. gondii* cepa RH con murinos NIH inmunestimulados con *L. casei*. Los porcentajes de supervivencia murina de estas tres confrontaciones fueron de 33, 67, 0, 0 (figura 4), 67, 50, 0, 0 (figura 5) y 33, 33, 0, 0 (figura 6) para los grupos A, B, C y D en los ensayos 1, 2 y 3, respectivamente (Cuadro 6). No hubo muertes de animales en los grupos E, F, G y H durante los tres ensayos. Los animales que no recibieron inmunestimulación murieron aproximadamente entre el séptimo y décimo día postinfección.

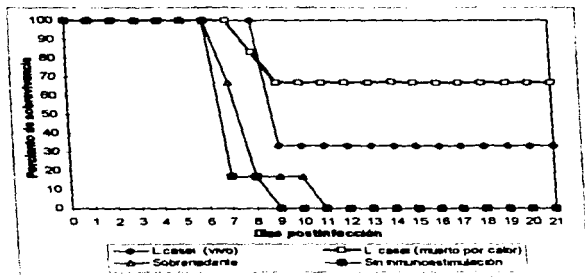


Figura 4. Efecto de *L. casei* contra la infección por *T. gondii* en murinos NIH (Ensayo 1). La dosis de *L. casei* fue de 1.8×10^8 UFC administrada por vía intraperitoneal siete días antes de la confrontación con $2LD_{50}$ de *T. gondii* cepa RH.

Durante el ensayo 2, se determinaron los niveles de IFN- γ por el método de ELISA (Cuadro 7). Esta linfocina se determinó en los días 0, 7 y 14 postinfección. Los valores encontrados de IFN- γ fueron 94, 711, 57 (figura 7), 132, 1322, 80 (figura 8), 90, 1127 (figura 9), 92.6 y 1112 pg/mL (figura 10) en los días 0, 7 y 14 de los grupos A, B, C y D, respectivamente.

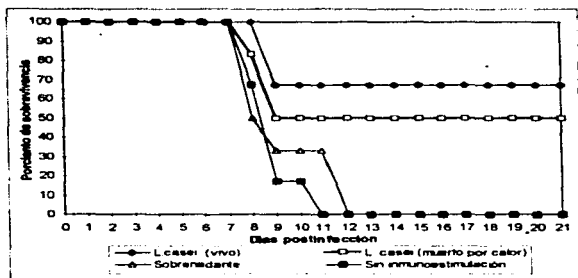


Figura 5. Efecto de *L. casei* contra la infección por *T. gondii* en murinos NIH (Ensayo 2). La dosis de *L. casei* fue de 1.8×10^8 UFC administrada por vía intraperitoneal siete días antes de la confrontación con $2LD_{50}$ de *T. gondii* cepa RH.

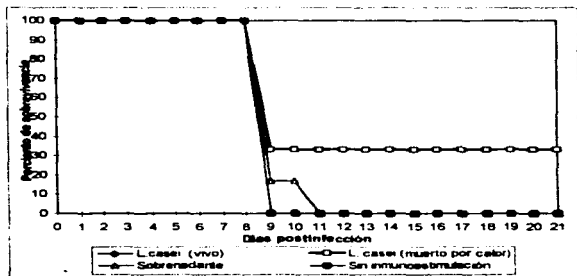


Figura 6. Efecto de *L. casei* contra la infección por *T. gondii* en murinos NIH (Ensayo 3). La dosis de *L. casei* fue de 1.8×10^8 UFC administrada por vía intraperitoneal siete días antes de la confrontación con $2LD_{50}$ de *T. gondii* cepa RH.

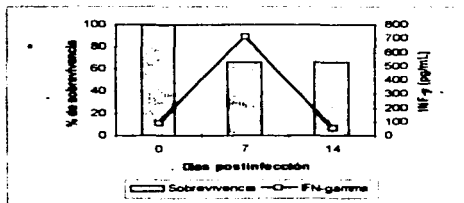


Figura 7. Comparación del porcentaje de supervivencia y concentración de IFN- γ en murinos inmunostimulados con *L. casei* viable y confrontados a *T. gondii* siete días después. Las tomas de muestra sérica se efectuaron en los días 0, 7 y 14 postinfección.

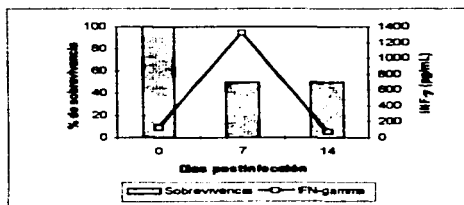


Figura 8. Comparación del porcentaje de supervivencia y concentración de IFN- γ en murinos inmunostimulados con *L. casei* muerto por calor y confrontados a *T. gondii* siete días después. Las tomas de muestra sérica se efectuaron en los días 0, 7 y 14 postinfección.

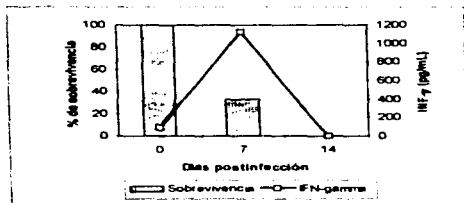


Figura 9. Comparación del porcentaje de supervivencia y concentración de IFN- γ en murinos inmunostimulados con sobrenadante y confrontados a *T. gondii* siete días después. Las tomas de muestra sérica se efectuaron en los días 0, 7 y 14 postinfección.

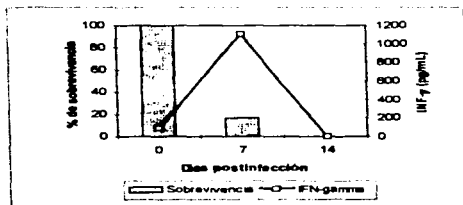


Figura 10. Comparación del porcentaje de supervivencia y concentración de IFN- γ en murinos no inmunostimulados y confrontados a *T. gondii* siete días después. Las tomas de muestra sérica se efectuaron en los días 0, 7 y 14 postinfección.

Cuadro 6. Porcentajes de sobrevivencia obtenidos en este experimento

Tratamiento	Ensayo 1 Porcentaje de sobrevivencia	Ensayo 2 Porcentaje de sobrevivencia	Ensayo 3 Porcentaje de sobrevivencia
<i>L. casei</i> (viable) + <i>T. gondii</i>	33	67	33
<i>L. casei</i> (muerto) + <i>T. gondii</i>	67	50	33
Sobrenadante + <i>T. gondii</i>	--- ¹	--- ¹	--- ¹
Unicamente <i>T. gondii</i>	--- ¹	--- ¹	--- ¹

Cuadro 7. Porcentajes de sobrevivencia y niveles de IFN- γ obtenidos en este experimento.

Tratamiento	Día 0 postinfección		Día 7 postinfección		Día 14 postinfección	
	Porcentaje de sobrevivencia	IFN- γ (pg/mL)	Porcentaje de sobrevivencia	IFN- γ (pg/mL)	Porcentaje de sobrevivencia	IFN- γ (pg/mL)
<i>L. casei</i> (viable) + <i>T. gondii</i>	100	94	67	711	67	57
<i>L. casei</i> (muerto) + <i>T. gondii</i>	100	132	50	1322	50	80
Sobrenadante + <i>T. gondii</i>	100	90	33	1127	--- ¹	--- ²
Unicamente <i>T. gondii</i>	100	92.6 ³	17	1112	--- ¹	--- ²

¹ Todos los ratones murieron.² Este valor no se determinó por que todos los ratones habían muerto.³ Este valor es el promedio de las determinaciones realizadas a los grupos de ratones antes de la inmunestimulación.

VIII. ANALISIS DE RESULTADOS.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la inoculación de *Lactobacillus casei* ATCC 7469 por vía intraperitoneal (IP) induce una protección parcial inespecífica contra *Toxoplasma gondii*. A este respecto, Bautista y colaboradores (1995) observaron un efecto similar usando Concanavalina A (Con A) como inmunostimulante. Estos autores encontraron que la administración de 20 µg de Con A por vía IP protegía hasta un 50% al modelo murino de la infección por *T. gondii* [119].

Los porcentajes de sobrevivencia obtenidos en este estudio fueron semejantes a los reportados por Bautista y colaboradores, sin embargo, no se pudo obtener la misma uniformidad de resultados. Ya que como se observa en la tabla 6, los porcentajes de sobrevivencia que se obtuvieron en los ensayos 1, 2 y 3 variaban desde 33 hasta 67% para los tratamientos con *L. casei* vivo y *L. casei* muerto por calor. No obstante, estos datos indican que la protección obtenida con la inmunostimulación, ya sea con la bacteria viva o muerta, puede ser como mínimo de 33%, pudiendo alcanzar valores de hasta 67%.

El porque de tanta variación en la sobrevivencia murina, puede ser explicada en términos de la variabilidad biológica. Dado que la cepa de los ratones que se utilizó no era singénica, la posibilidad de variación debida a aspectos genéticos no pudo ser controlada. Además, es de aceptación general que las condiciones ambientales, alimentación, estado inmunológico, infecciones recurrentes, entre otros factores, pueden afectar notablemente a un estudio experimental de este tipo.

Con respecto, a los mecanismos inmunológicos que se desencadenan durante la inmunostimulación con *L. casei*, se ha reportado que la administración de esta bacteria por vía IP o por vía intravenosa (IV) a ratones BALB/c incrementa la producción de radicales oxígeno (OR) por los macrófagos peritoneales y células de Kupffer, evitando con esto la infección por *Listeria monocytogenes* y el crecimiento del fibrosarcoma Meth A. [5,105]. Además, otros investigadores han observado que la administración de *L. casei* por vía oral (PO) y por vía IP incrementa la actividad enzimática y fagocítica de los macrófagos peritoneales [103].

Estos hechos hacen suponer que la administración de *L. casei* por vía IP incrementa los mecanismos inespecíficos que intervienen en la resistencia de agentes patógenos intracelulares como *T. gondii*.

Actualmente, se sabe que la inmunidad mediada por células es el principal mecanismo de resistencia contra *T. gondii*. Esta resistencia está mediada por el IFN- γ , una citocina que es secretada principalmente por los linfocitos T CD4⁺ (cooperadores) estimulados. También son productores de IFN- γ los linfocitos T CD8⁺ (citotóxicos) y las células asesinas naturales (NK). En humanos, la secreción de IFN- γ inicia a las seis horas después de la estimulación, teniendo su pico máximo de las 48 a las 72 horas. La producción *in vitro* puede continuar durante ocho días. [72]

Los valores de IFN- γ encontrados durante este estudio, señalan que a los siete días de la inmuoestimulación (Día 0 postinfección) no existe un incremento considerable de esta citocina. No obstante, en el día 7 postinfección se elevaron los valores hasta 10 veces más en todos los grupos de ratones. Estos valores disminuyeron en el día 14 postinfección, ubicándose por debajo del valor basal. Desgraciadamente, estos datos sólo indican que existe una regulación en la producción de IFN- γ , tal vez debida a la disminución de células T cooperadoras 1 (TH1) y sus citocinas ocasionada por la proliferación de células T cooperadoras 2 (TH2). Las células TH1 producen IFN- γ e IL-2 responsables de la activación de macrófagos, y por lo tanto, de la protección contra *T. gondii*. Las células TH2 producen citocinas que están relacionadas con la respuesta inmunitaria de las células B, que a su vez tienen efecto inhibitorio sobre citocinas producidas por las células TH1 [54].

No se pudo observar si existe o no relación entre la inmuoestimulación con *L. casei* y la producción de IFN- γ . Para lograr esto es necesario, que en futuras investigaciones se determinen día a día los valores de IFN- γ durante todo el ensayo. Además, sería conveniente que se determinaran, por lo menos, una de las citocinas producidas por las células TH2 (por ejemplo, IL-4 ó IL-5).

Aunque no se pudo comprobar si el IFN- γ se eleva o no por la inestimulación con *L. casei*, hay que hacer notar que no era el objetivo principal de este estudio. El objetivo prioritario era determinar si esta bacteria es capaz de despertar los mecanismos inespecíficos necesarios para eliminar a *T. gondii* de un huésped que es altamente sensible. En este orden, se supone que la introducción de una bacteria no patógena por vía IP, desencadena una respuesta inflamatoria, en donde las células presentadoras de antígeno juegan un papel muy importante. Este proceso inflamatorio limita y elimina a las bacterias inocuas, quedando activados algunos de los mecanismos inmunitarios. En tales mecanismos, están incluidos la producción de IFN- γ , TNF- α e IL-2 por parte de las células TH1. En conjunto estas citocinas activan a los macrófagos peritoneales (PM), los cuales sufren cambios metabólicos importantes, como son: producción de intermediarios oxígeno (peróxido de hidrógeno, anión superóxido y radicales hidroxilo) y nitrógeno reactivos (especialmente óxido nítrico), aumento en la producción de enzimas lisosomales y no lisosomales, así como aumento en la expresión de MHC tipo II [54, 103].

Estos cambios en el macrófago son suficientes para limitar parcialmente la infección por *T. gondii*, logrando con esto un aumento considerable en los porcentajes de supervivencia murina. Este hecho coincide con lo afirmado por algunos investigadores, que han observado los efectos benéficos que tienen los Lactobacilos, y en especial, *Lactobacillus casei*. [3-5, 103-109]

IX. CONCLUSIONES.

- *Lactobacillus casei* es un buen inmunoestimulante que previene la infección por *Toxoplasma gondii* hasta un 67% en el modelo murino.
- Los valores de IFN- γ determinados en este estudio no son suficiente evidencia, para afirmar que existe un efecto inmunoestimulante de *L. casei* sobre células TH1.
- No se observaron diferencias entre usar como inmunoestimulante a *L. casei* viable y *L. casei* muerto por calor.
- Los productos de excreción de *L. casei* (sobrenadante) parecen no tener efecto protector alguno
- Se requiere realizar más estudios para identificar la naturaleza de los componentes y los mecanismos involucrados en la inmunoestimulación por *L. casei*.

X. ANEXOS.

ANEXO I. Protocolo de los tubos para el nefetómetro de Mc Farland.

Número de tubo	Cloruro de bario (gramos)	Acido sulfúrico 0.1N (mL)	Suspensión de bacterias / mL
1	0.1	9.9	3.0×10^8
2	0.2	9.8	6.0×10^8
3	0.3	9.7	9.0×10^8
4	0.4	9.6	1.2×10^9
5	0.5	9.5	1.5×10^9
6	0.6	9.4	1.8×10^9
7	0.7	9.3	2.1×10^9
8	0.8	9.2	2.4×10^9
9	0.9	9.1	2.7×10^9
10	1.0	9.0	3.0×10^9

Fuente: Referencia 111

ANEXO II. Preparación del medio Bacto Effer Broth.

Fórmula	Cantidad
Bacto Triptona	2.0 g
Bacto Extracto de levadura	5.0 g
Gelatina Bacto	2.5 g
Dextrosa	5.0 g
Sacarosa Bacto	5.0 g
Lactosa	5.0 g
Cloruro de sodio	4.0 g
Acetato de sodio	1.5 g
Acido ascórbico	0.5 g

pH 6.8 ± 0.2 a 25°C

Suspender en un litro de agua destilada o desionizada y calentar a ebullición para disolver completamente. Distribuir y esterilizar a 15 lb de presión por 15 minutos.

ANEXO III. Análisis de varianza de un factor por rangos o prueba de H de Kruskal-Wallis.

La prueba de H de Kruskal-Wallis o análisis de varianza por rangos considera la magnitud de cada observación con relación a las otras observaciones. Esta prueba es una extensión de la prueba de Mann-Whitney y los pasos a seguir son:

- 1) Las observaciones n_1, n_2, \dots, n_k de las muestras k se combinan en una sola muestra de tamaño $n = n_1 + n_2 + \dots + n_k$ y se arreglan en orden de magnitud (considerando su identidad dentro de cada muestra) desde la más pequeña a la más grande. Las observaciones tienen el mismo valor (están empatas) se les asigna la media aritmética de los rangos correspondientes a las observaciones empatadas.
- 2) Se suman los rangos correspondientes a las observaciones de cada muestra por separado, dando origen a k sumas.
- 3) Se calcula el estadígrafo H por la fórmula:

$$H = \frac{12}{n(n+1)} \sum_{i=1}^k \frac{R_i^2}{n_i} - 3(n+1)$$

donde: k = es el número de muestras o tratamientos.

n_i = es el número de observaciones de la muestra i .

n = es el número total de observaciones.

R_i = es la suma de los rangos en la muestra i .

- 4) Cuando hay tres muestras con 5 ó menos observaciones cada una, la significación de H se determina usando la tabla de valores críticos para la prueba de Kruskal-Wallis. Cuando hay más de 5 observaciones en cada muestra o más de 3 muestras se sabe que H está distribuida aproximadamente como χ^2 con $k-1$ grados de libertad. [112]

ANEXO IV. Prueba del rango para muestras independientes o prueba de U de Mann-Whitney.

La prueba de U de Mann-Whitney sirve para probar hipótesis acerca de dos medias de dos muestras independientes cuando los datos no alcanzan a ser de tipo cuantitativo sino ordinales

En esta prueba, se arreglan primero los valores de las muestras en orden creciente desde 1 a n_1+n_2 (donde n_1 es el tamaño de la muestra 1 y n_2 es tamaño de la muestra 2), conservando cada valor dentro de su propia muestra. La suma de los rangos de la muestra 1 se denomina R_1 y la suma de los rangos de la muestra 2, R_2 .

Luego, se aplica una de las siguientes fórmulas :

$$U_1 = n_1 n_2 + \frac{n_1(n_1+1)}{2} - R_1$$

$$U_2 = n_1 n_2 + \frac{n_2(n_2+1)}{2} - R_2$$

Una vez calculado cualquiera de los dos U_1 ó U_2 , se obtiene otro valor

$$U' = n_1 n_2 - U$$

donde U es U_1 ó U_2 calculado anteriormente.

Luego, se compara el menor de los valores calculados U ó U' con el menor de los valores críticos de para los tamaños de muestras n_1 y n_2 correspondientes y el nivel de significación α . Si el valor calculado es menor que el valor crítico (de la tabla) se rechaza $H_0 : \mu_1 = \mu_2$ [112]

XI. REFERENCIAS.

1. Dubey J P Beattie C P. Toxoplasmosis of animals and man. Florida: Editorial CRC Press, 1988. 1-60
2. Hadden J W. Immunostimulants. Immunol Today 1993;14:275-80
3. Perdigon G Alvarez S Pesce de Ruiz Holgado A. Immunoadjuvant activity of oral *Lactobacillus casei*. J Dairy Res 1991;58:485-96
4. Miaske S Nomoto K Yokokura T Yoshikai Y Muati M Nomoto K. Protective effect of *Lactobacillus casei* on *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. Infect Immun 1985;48:480-5
5. Sato K. Enhancement of host resistance against *Listeria* infection by *Lactobacillus casei*: role of macrophages. Infect Immun 1984;44:445-51
6. Chester P. Clifton R. Wayne E. Parasitología clínica. 2ª ed. Barcelona: Editorial Salvat, 1986:179-84
7. Darcy F. Santoro F. Toxoplasmosis. En Kierszenbaum F. Parasitic infections and the immune system. San Diego: Academic Press, 1994:163-201
8. Feldman H A. Epidemiology of Toxoplasma infections. Epidem Rev 1982;4:204-13
9. García-Rodríguez J A. Toxoplasma, Pneumocystis, Isospora, Sarcocystis y Cryptosporidium. En: Pumarola, A. Rodríguez-Torres A. García-Rodríguez J A. Microbiología y parasitología médica. Barcelona: Editorial Salvat, 1984:844-52
10. Gutiérrez M. Lara R. Tay J. Velasco O. Parasitología médica. México: Editorial Méndez Cervantes, 1991:173-89
11. Kairalla C. Falleiros L H. Toxoplasmosis. Infectol 1981;2:129-33
12. Romero C R. Microbiología y parasitología humana. México: Editorial Médica Panamericana, 1993:561-567
13. Despommier D. Karapetou J W. Parasite life cycles. Nueva York: Editorial Springer-Verlag, 1987:24-5
14. Levine N D. Taxonomy of Toxoplasma. J Protozol 1977;24:36-41
15. Mehlhorn H. Estudio comparativo de la ultraestructura de quistes de Toxoplasma, Hammondia y Besnoitia, y quistes de Sarcocistis. ABCLDL 1980;14:153-60
16. Ortega J L. Vaca M A. Evolución y epidemiología de la toxoplasmosis. Infectol 1985;6:146-52

17. Kasper L H, Boothroyd J C. *Toxoplasma gondii* and toxoplasmosis. En: Warren K.S. Immunology and molecular biology of parasitic infections. Michigan: Blackwell Scientific Publications, 1993:269-301
18. Markell E K, Voge M, John D T. Parasitología médica. 6ª ed. Barcelona: Editorial Interamericana - Mc Graw Hill, 1990:133-41
19. Zaman V. Atlas a color de parasitología clínica. 2ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1988:115-35
20. Olsen O W. Animal parasites. Their life cycles and ecology. 3ª ed. Baltimore: University Park Press, 1974:168-73
21. Jacobs L, Remington J S, Melton M L. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. J Parasitol 1960;46:11-21
22. Sheffield H G, Melton M L. *Toxoplasma gondii*: The oocyst, sporozoite, and infection of cultured cells. Science 1970;167:892-3
23. Frenkel J K, Dubey J P, Miller N L. *Toxoplasma gondii* in cats: Fecal stages indentified as coccidian oocyst. Science 1970:167:893-896
24. Dubey J P. Toxoplasmosis. Vet Clin of North Amr: Small Animal Practice 1987;17:1389-404
25. Biagi F. Enfermedades parasitarias. 2ª ed. México: Ediciones Científicas La Prensa Médica Mexicana, 1988:171-82
26. Sarte Y, Moreno E, Scorza J V. Incapacidad de una cepa de *Toxoplasma gondii* para producir quistes y oocistas. Bol Dir San Malariol y San Amb 1991;31:53-4
27. Lautenslager J P. Toxoplasmosis as a significant disease in man and animals with special reference to preventive measures by the farm community. Can Vet J 1987;28:261-4
28. Sacks J J, Roberto R R, Brooks N F. Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. JAMA 1982;249:1728-32
29. Dubey J P. Isolation of *Toxoplasma gondii* from a naturally infected beef cow. J Parasitol 1992;78:151-3
30. Ruiz A, Frenkel J K. Intermediate and transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. Am J Trop Med Hyg 1980;29:1161-6
31. Wallace G D. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii* by cockroaches. J Exp Dis 1972;126:545-7

32. Dubey J P. Status of toxoplasmosis in cattle in the United States. JAVMA 1990,196:257-8
33. Dubey J P. Status of toxoplasmosis in sheep and goats in the United States. JAVMA 1990,196:259-62
34. Dubey J P. Status of toxoplasmosis in pigs in the United States. JAVMA 1990,196:270-274
35. Dubey J P, Adams D S. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in dairy goats from 1982 to 1984. JAVMA 1990,196:295-6
36. Dreesen W D. *Toxoplasma gondii* infections in wildlife. JAVMA 1990,196:274-6
37. Frenkel J K, Ruiz A. Human toxoplasmosis and cat contact in Costa Rica. Am J Trop Med Hyg 1980,29:1167-80
38. Frenkel J K, Ruiz A. *Toxoplasma gondii* in Costa Rican cats. Am J Trop Med Hyg 1980,29:1150-60
39. García-Vázquez Z, Rosario-Cruz R, Solorzano-Salgado M. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in sheep and goats in three states of Mexico. Prev Vet Med 1990,10:25-9
40. Goldsmith R S, Kagan I G, Zarate R, Reyes-González M, A. Cedeno-Ferreira J. Low *Toxoplasma* antibody prevalence in serologic surveys of human in southern Mexico. Arch Invest Med 1991,22:63-73
41. Kirkpatrick C E, Colvin B A, Dubey J P. *Toxoplasma gondii* antibodies in common barn-owls (*Tyto alba*) and pigeons (*Columba livia*) in New Jersey. Vet Parasitol 1990,36:177-80
42. Malik M A, Dreesen D W, De la Cruz A. Toxoplasmosis in sheep in northeastern United States. JAVMA 1990,196:263-5
43. Sousa O E, Saenz R E, Frenkel J K. Toxoplasmosis in Panama: a 10-year study. Am J Trop Med Hyg 1988,38:315-22
44. Zimmerman J J, Dreesen D W, Owen W J, Beran G W. Prevalence of toxoplasmosis in swine from Iowa. JAVMA 1990,196:266-70
45. Carrillo T, Urdaneta H, De Ramirez A D, Muñoz J F. Estudio de la presencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* en beneficiadores de carnes de Trujillo, Venezuela. Bol Dir Malariol y San Amb 1991,31:1-8
46. Machin R, Martínez R, Fachado A, Pividal J, Bravo J R. Encuesta nacional de toxoplasma I. Prevalencia por sexos y edades. Cuba, 1987. Rev Cubana Med Trop 1993,45:146-51

47. Martínez F, Ixta O, Cantun H, A. Castillo M. Prevalencia de anticuerpos anti-toxoplasma en bovinos del estado de Tabasco, México. *Vet Mex* 1992;23:337-8
48. Urdaneta H, De Ramírez A, D. Muñoz J, F. Toxoplasmosis. Evaluación seroepidemiológica realizada en Trujillo, Venezuela. *Bol Dir Malarinol y San Amb* 1990; 30:39-47
49. Frenkel J, K. Transmission of toxoplasmosis and the role of immunity in limiting transmission and illness. *JAVMA* 1990;196:233-40
50. Jones T, C. Hirsch J, G. The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. *J Exp Med* 1972;136:1173-94
51. Kasper L, H. Mineo J, R. Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Today* 1994;10:184-7
52. Frenkel J, K. Toxoplasmosis in human beings. *JAVMA* 1990;196:233-40
53. Lycke E, Carlberg K, Norrby R. Interactions between *Toxoplasma gondii* and its host cells: function of the penetration-enhancing factor of *Toxoplasma*. *Infect Immun* 1975;11:853-61
54. Sadick M, D. Macrophages in parasitic infection. En: Lewis C, E. McGree J, O. The natural immune system. The macrophage. Great Britain: Oxford University Press, 1992:265-84
55. Wyler D, J. Blackman H, J. Lunde M, N. Celular hypersensitivity to toxoplasma and retinal antigens in patients with toxoplasma retinochoroiditis. *Am J Trop Med Hyg* 1980; 29:1181-86
56. Frenkel J, K. Toxoplasmosis. *Rev Asoc Guat Parasitol Med Trop* 1989;4:4-12
57. Hirt J. Toxoplasmosis en tocoginecología. *ABCLDL* 1980;14:217-26
58. Thalhammer O. Infección toxoplasmótica prenatal. *ABCLDL* 1980;14:161-8
59. Apt W. Toxoplasmosis adquirida. Clínica y tratamiento. *ABCLDL* 1980;14:199-215
60. Luft B, J. Remington J, S. Toxoplasma encefalitis. *J Infect Dis* 1988;157:1-6
61. Preciado J, H. Romo J, Higuera F, J. Encefalitis por toxoplasma en SIDA. *Infectol* 1989;1:11-5
62. Suzuki Y, Conley F, K. Remington J, S. Differences in virulence and development of encephalitis during chronic infection vary with the strain of *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis* 1989;159:790-4
63. Isita-Sánchez L., Sosa-Martínez J., Sosa R, M. Respuesta inmune en la toxoplasmosis. *Infectol* 1984;2:37-40

64. Hauser W Remington J S Effect of monoclonal antibodies on phagocytosis and killing of *Toxoplasma gondii* by normal macrophages Infect Immun 1981;32:637-40
65. Johnson W D. Chronological development of cellular immunity in human toxoplasmosis. Infect Immun 1981;33:948-9
66. Luft B J, Kansas G, Engleman E G, Remington J S. Functional and quantitative alterations in T lymphocyte subpopulations in acute toxoplasmosis. J Infect Dis 1984;150:761-7
67. Macario A J L, Stahl W, Miller R. Lymphocyte subpopulations and function in chronic murine toxoplasmosis. Clin. Exp Immunol 1980;41:415-22
68. McLeod R, Estes R G, Mack D G, Cohen H. Immune response of mice to ingested toxoplasma infection acquired by ingestion. J Infect Dis 1984;149:234-44
69. Brown C, McLeod R. Mechanisms of survival of mice during acute and chronic *Toxoplasma gondii* infection. Parasitol Today 1994;10:290-2
70. Beaman M H, Wong S Y, Remington J S. Cytokines, toxoplasma and intracellular parasitism. Immunol Rev 1992;127:95-117
71. McCabe R E, Luft B J, Remington J S. Effect of murine interferon gamma on murine toxoplasmosis. J Infect Dis 1984;150:961-2
72. Murray H W. Interferon-gamma, the activated macrophage, and host defense against microbial challenge. Ann Med Int 1988;108:595-608
73. Murray H W, Spitalny G L, Nathan C F. Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon- γ . J Immunol 1985;134:1619-22
74. Nathan C F, Prendergast T J, Wiebe M E, et al. Activation of human macrophages. Comparison of other cytokines with interferon- γ . J Exp Med 1984;160:600-5
75. Suzuki Y, Orellana M A, Schreiber R D, Remington J S. Interferon- γ : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. Science 1988;240:516-8
76. Schwartzman J D, Gonias S L, Pfefferkorn E R. Murine gamma interferon fails to inhibit *Toxoplasma gondii* growth in murine fibroblasts. Infect Immun 1990;58:833-4
77. Murray H W, Rubin B Y, Carriero S M, Harris A M, Jaffee E A. Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. J Immunol 1985;134:1982-8
78. Khan I A, Smith K A, Kasper L H. Induction of antigen-specific human cytotoxic T cells by *Toxoplasma gondii*. J Clin Invest 1990;85:1879-86

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

79. Yong E C, Chi E Y, Fritsche R, Henderson W R. Human platelet-mediated cytotoxicity against *Toxoplasma gondii*: role of thromboxane. *J Exp Med* 1991;173 65-78
80. Calderón E, León G. Interpretación de las pruebas inmunoserológicas para diagnóstico de toxoplasmosis. *Infectol* 1985;10:258-64
81. Thiermann E. Serología de la toxoplasmosis: reacciones de Sabin y Feldman, hemaglutinación indirecta, fijación del complemento y aglutinación directa. *ABCLDL* 1980;14 191-8
82. Wilson M, Ware D A, Juraneck D D. Serologic aspects of toxoplasmosis. *JAVMA* 1990;196:277-81
83. Camargo M E. El diagnóstico serológico de la toxoplasmosis con anticuerpos marcados. *ABCLDL* 1980;14:183-9
84. Ambroise-Thomas P, Desgeorges P T. Las posibilidades del test ELISA en el diagnóstico serológico de la Toxoplasmosis. *ABCLDL* 1980;14 169-77
85. Araujo F G, Handman E, Remington J S. Use of monoclonal antibodies to detect antigens of *Toxoplasma gondii* in serum and other body fluids. *Infect Immun* 1980;30 12-6
86. Mineo J R, Carrargo M E, Ferreira A W. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. *Infect Immun* 1980;27:283-287
87. Naot Y, Remington J S. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii*: use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. *J Infect Dis* 1980;142:757-66
88. Piekarski G. Para la estandarización de las reacciones serológicas aplicadas al diagnóstico de la Toxoplasmosis. *ABCLDL* 1980;14 179-83
89. Leighty J C. Strategies for control of toxoplasmosis. *JAVMA* 1990;196:281-6
90. Araujo, F G. Immunization against *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Today* 1994:358-60
91. Buxton D. Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. *Parasitol Today* 1993;9:335-7
92. Krahenbuhl J L, Ruskin J, Remington J S. The use of killed vaccines in immunization against an intracellular parasite: *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 1972;108 425-430
93. Gazzinelli R T, Hakim F T, Hieny S, Shearer G M, Sher A. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN- γ production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J Immunol* 1991;146:286-92

94. McLeod R, Frenkel J K, Estes R G, Mack D G, Eisenhauer P B, Gibori G. Subcutaneous and intestinal vaccination with tachyzoites of *Toxoplasma gondii* and acquisition of immunity to peroral and congenital toxoplasma challenge. *J Immunol* 1988;5:1632-7
95. Waldeland H, Frenkel J K. Live and killed vaccines against toxoplasmosis in mice. *J Parasitol* 1983;69:60-5
96. Araujo F G, Remington J S. Partially purified antigen preparations of *Toxoplasma gondii* protect against lethal infection in mice. *Infect Immun* 1984;45:122-6
97. Pavia C S. Protection against experimental toxoplasmosis by adoptive immunotherapy. *J Immunol* 1986;137:2985-90
98. Bomford R. Adjuvants for anti-parasite vaccines. *Parasitol Today* 1989;5:41-6
99. Audibert F M, Lise L D. Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. *Immunol Today* 1993;14:281-4
100. Fauci A S, Rosenberg S A, Sherwin S A, Dinarello C A, Longo A L, Lane H C. Immunomodulators in clinical medicine. *Ann Int Med* 1987;106:421-33
101. Maslhi K N. Cytokines and immunomodulators promising therapeutic agents. *Parasitol Today* 1994;10:1-2
102. Lederer E. Immunostimulation: recent progress in the study of natural and synthetic immunomodulators derived from the bacterial cell wall. En Fougereau M, Dausset J. *Immunology* 80. Vol 3 London: Academic Press, 1980:1194-211
103. Perdigón G, Nader de Macías M E, Álvarez S, Oliver G, Pesce de Ruiz Holgado A. Effect of perorally administered *Lactobacilli* on macrophage activation in mice. *Infect Immun* 1986;53:404-10
104. Perdigón G, Nader de Macías M E, Álvarez S, Oliver G, Pesce de Ruiz Holgado A. Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Immunol* 1988;63:17-23
105. Hashimoto S, Nomoto K, Matsuzaki, Yokomura T, Mutai M. Oxygen radical production by peritoneal macrophages and Kupffer cells elicited with *Lactobacillus casei*. *Infect Immun* 1984;44:61-7
106. Isolauri E, Joensuu J, Suomalainen H, Luomala M, Vesikari T. Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. *Vaccine* 1995;13:310-2
107. McGrory T., Garber G E. Mouse intravaginal infection with *Trichomonas vaginalis* and role of *Lactobacillus acidophilus* in sustaining infection. *Infect Immun* 1992;60:2375-9

108. Drutz D J. Lactobacillus prophylaxis for *Candida* vaginitis. Ann Int Med 1992;116:419-20
109. Hilton F, Isenberg H D, Alperstein P, France K, Borenstein M T. Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* as prophylaxis for candidal vaginitis. Ann Int Med 1992;116:353-7
110. Bautista-Garfias C R, Fragoso-Daza H, Ixta-Rodríguez O, Martínez-Gómez F. Inducción de resistencia contra *Toxoplasma gondii* en ratones NIH tratados con concanavalina A. Vet Mex 1995; 26 :113-6
111. Lennette E A. Manual de microbiología clínica. 4ª ed Buenos Aires: Médica Panamericana; 1987: 1356
112. Marqués-De Cantu M J. Probabilidad y estadística para ciencias químico-biológicas. México: UNAM; 1988:503-11