



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO



Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

**“Desarrollo de un modelo de toxoplasmosis congénita en  
ratón que simule los cambios en la transmisión y el daño  
fetal en humanos”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

**NOEMÍ JAZMÍN MEJÍA RAFAEL**

DIRECTOR DE TESIS

**DR. JOSÉ ANTONIO VARGAS VILLAVICENCIO**

NOVIEMBRE 2011



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.

TODOS SOMOS ESCLAVOS DE NUESTROS AFECTOS,  
ESCLAVOS DE LOS PREJUICIOS DE QUIENES AMAMOS.

MARIE CURIE

Tan violentos arrebatos tienen un fin violento en medio de su triunfo, como la pólvora y el fuego, que en un mismo instante se une ...n y se separan. La más dulce miel cansa por su delicioso sabor, y con placeres del paladar se pierde el apetito. Amad, pues, con moderación, que sí son largos los amores: el que va demasiado de prisa llega tan tarde como el que camina demasiado lentamente.

(entra Julieta) He aquí la dama. Ho tan ligero pie nunca gastara estas inalterables losas. Creo que una amante se sostendría en las alas de la mariposa que revolotea en verano por los espacios aéreos, por muy ligera que el amor la vuelve.

Romeo y Julieta, acto II, escena VI

El presente trabajo de investigación fue realizado y financiado (Recursos Federales 2010 N° 065/2010) en el Laboratorio de Inmunología Experimental, Subdirección de Medicina Experimental del Instituto Nacional de Pediatría, Torre de Investigación, bajo la dirección del Dr. José Antonio Vargas Villavicencio.

El uso del bioterio y los cuidados de los animales fueron hechos en la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, a cargo de la Dra. Marcela Arteaga Silva.

También, fue financiado por una beca de ayudante de Investigador para Noemí Jazmín Mejía Rafael por parte de la Dra. María Dolores Correa Beltrán como miembro del S. N. I. nivel III y CONACyT.

## **DEDICATORIAS**

### **A MIS PADRES**

Agradezco la fortaleza que me otorgaron para enfrentar las adversidades de este mundo, con tantas bellezas y grandes tempestades; la templanza para dirigirme correctamente por el buen sendero dentro del cielo y del infierno; la justicia con la cual me criaron para discernir lo real de lo ficticio; la inocencia que cuidaron mientras fui niña, la cual he mantenido hasta ahora y que me ha permitido sorprenderme de lo maravilloso que es despertar cada día y estar al lado de todo lo que amo. Y, finalmente, les agradezco por regalarme la vida, darme tanto amor y las armas necesarias para enfrentarme a la vida.

### **A MI PADRE**

Gracias por siempre cumplir tus promesas. Un día prometiste que no irías a ningún lado, que siempre estarías conmigo y los has cumplido, aunque no estés físicamente conmigo, siento que te respiro a cada paso que doy, cuando miro el cielo estrellado, cuando el viento sopla acariciando mi cabello, cuando sueño contigo, cuando río a carcajadas, sé que eres tú tomándome de la mano como cuando era una niña. Tus enseñanzas me hacen caminar firme y segura.

También te doy gracias, por enseñarme el real significado del amor: cuando amas a una persona siempre deseas lo mejor para la persona amada, así signifique no verla nunca más. Así mismo, te agradezco enseñarme la paciencia ante la adversidad porque el tiempo es relativo; por enseñarme a nunca estar peleada con la vida sino a disfrutarla con un corazón limpio y puro; por regalarme madures en tiempos intempestuosos; por todos esos años de dedicación fortaleciendo mis alas; por corregirme y consentirme; por hacerme una persona independiente pero dependiente de ti y de tu recuerdo, al cual me aferro como un naufrago a la orilla; por decirme que mi inteligencia no tiene límites ante nada; por tus historias de juventud con las cuales reí y que me permitieron prever lo difícil de trazar un sendero para seguir el mío de forma más fácil; por enseñarme las gozos de la unión familiar; por hacerme observar más allá de lo cercano y palpable; por regalarme tu don especial; por darme la presencia de Dios en mi camino; por ser el forjador de esta humilde persona que, con tu guía, se convirtió en una mujer de la cual te puedes enorgullecer.

Cómo olvidar esas charlas prolongadas, cuando dormitaba entre tus brazos y entre sabanas. En ellas, me obsequiaste sin reservas tus sueños y metas, que ahora las siento tan propias. Para mí siempre serás el luchador más implacable; mi ejemplo a seguir; el hombre más guapo, delicioso, educado, culto e irresistible que jamás haya percibido; el mejor padre del mundo y mi alma gemela. Te amo con tanto placer que todavía puedo sentir tu inconfundible olor por nuestro hogar, tu incesante andar firme que se inclinaba levemente por una operación de años atrás, tus risas resonando en mis odios como una dulce canción de cuna que me ayuda a superar el insomnio, tus miradas de águila llenas de firmeza y de tanto amor a tus hijos.

Siento que tus manos invisibles acarician mi cabello,  
tocas mis mejillas con las yemas de tus dedos y  
susurras a mi oído: siempre voy a estar contigo.

### **A MI MADRE**

Por ser la mujer más valiente que conozco, por enseñarme la capacidad de perdonar y olvidar, por estar a mi lado aún y llenarme de tantos momentos alegres día a día; por soportar mis cambios de humor, por aquellos años de separación en los que, aunque morías de dolor, te mantuviste fuerte y firme ante la adversidad; por regañarme, por ser tan amorosamente consentidora, por ser tu mariposita, por instruirme a escuchar, por ayudarme a superar el dolor de la pérdida, levantándome de la depresión que me aquejó, por darme tantos abrazos y besos que curan cualquier dolor físico o emocional, por lo delicioso que cocinas, por dejar que yo fuera el hombro en el que lloraste y te apoyaras en mí, por tranquilizar mis enojos, por darme lecciones de vida con tu valioso ejemplo, por apoyarme en mis decisiones buenas y malas, por no dejarme sola, por acudir aquellas noches donde gritaba a causa de pesadillas.

No sabes cuánto tiempo soñé con deleitarme con tu presencia y ahora que te tengo de nuevo a mi lado lo disfrutaré al máximo. Si no fuera por ti, mami, yo estaría anclada en un mar de desilusión y tristeza, tú me haces levantar todos los días de la cama para comenzar un nuevo día y sin ti no podría seguir. Eres el motivo más importante para luchar por nuestro bienestar.

### **A MIS HERMANOS**

Belén, Ezequiel, Vastti y Daniel nosotros fuimos la tripulación del barco donde nuestro padre nos subió aventurados a ese maldito-bendito viaje que zarpó un atardecer de enero, del cual pensé que nunca retornaríamos aunque, después de años de constantes tormentas, lo hicimos; aquel barco en donde madurar no era una elección sino el propósito.

Gracias por soportar a esta persona tan testaruda, necia y grosera; por estar en el momento indicado cuando moría de dolor físico y emocional, a pesar de que renegaba de su ayuda; por tantos recuerdos de infancia, juventud y madures; por ayudarme a volar y al mismo tiempo atarme a mi realidad; por recordarme lo importante que es llorar y que es aún más importante la unión familiar; sin ustedes estaría en un mundo paralelo, ajeno al suyo, lleno de dolor, tristeza, lejanía y remordimiento. Gracias por salvarme de mi misma. Si tuviera la oportunidad de elegir a mis consanguíneos los elegiría a ustedes sin dudarlo.

### **A MI FAMILIA**

Muñequito, gracias por llegar a este mundo en el momento indicado, por aliviar el dolor de mi alma, por llenarme de energía de nueva cuenta, por reír a carcajadas a mi lado, por acurrucarte entre mis brazos, por llevar el nombre de tu abuelo y una parte de su esencia; por mirarme con tanto amor y coquetearme nunca nadie me había hecho sonrojar como tú.

A mis abuelos, tíos, primos, cuñados, sobrinos por su amor y comprensión.

Al Dr. Samuel M. impulsor de mi éxito profesional que Dios lo colme de bendiciones en su vida futura.

## **A MIS AMIGOS**

Gracias:

Cesar L. me haces ver la vida tan fácil, a no arrepentirme de lo que hago, sino de lo que no hice. Lourdes N. y familia por otorgarme calor hogareño, protegerme, acobijarme y alimentarme, siempre seré Jimmy (tu niña genio). Roberto N. mi pepe grillo. Ricardo G., la única persona con la que puedo hablar abiertamente de mi deporte favorito. Juan Manuel L. mi profesor favorito que me educó en mi vida escolar para después convertirme en su compañera de trabajo brindándome seguridad y apoyo. Germán M. eres la persona más inteligente de mi edad que conozco, me enorgullezco en que me consideres tu amiga y gracias por hacerme reír cuando estaba triste, por tocar tu guitarra y cantarme, por la canción y pensamientos que me escribiste. Mixtli R. por esas platicas interminables donde podía sentirte. Oscar G. por siempre confiar en mí. Nayeli S. junto a ti la metamorfosis de la vida fue divertida. Dianita B. más que mi amiga, mi hermana; compartimos tanto, gracias por soportarme. Lety M. me haces creer que la inocencia todavía existe. Nancy V. gracias por escucharme, entenderme y darme los consejos que necesito. Alejandro B., Carlos C., Claudia R., Lizbeth X. por convertirse en mis amigos en los momentos difíciles con un ejemplo a seguir para mí. Karla R. por escuchar mi tristeza y decirme que luche constantemente. Miguel A. gracias por escucharme, por aceptarme como soy y enseñarme tanto. Víctor A. me haces sentir muy especial, a tu lado conocí mi celestial ser. Julio C. no tengo palabras para describir lo que siento por ti, aunque tú ya lo sabes a *grosso modo*, gracias por ampliar mi concepto de placer, por ayudarme a madurar, por soportar mis berrinches y por hacerme tan feliz; mi sangre esta envenenada de tu alma y mi piel está impregnada de tu olor.

Quando mi pestaña revolotea en tus parpados, mi mirada se introduce en tu ser estorbándome tu piel para tocarte el alma, así recorriéndola y reconociéndola de tiempos pasados para anclarse a mi alma sedienta de tanto esperarte.

## **AGRADECIMIENTOS**

### ***DR. JOSE ANTONIO VARGAS VILLAVICENCIO***

La realización de este arduo trabajo no habría sido posible sin su constante ayuda y guía en todo sentido tanto académica, emocional y económicamente.

### ***DRA. MARIA DOLORES CORREA BELTRAN***

Por su apoyo en todo momento académico y económico, por sus comentarios constructivos, que ayudaron a mi formación profesional, por apoyarme a concluir y seguir mis sueños convirtiéndolas en metas, por su alegría y espontaneidad que contagia, por depositar su confianza en mi sin conocerme y por mostrarme lo hermoso que es la investigación.

A todos los ***INTEGRANTES DEL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA EXPERIMENTAL DEL INP***: Alejandro B., Carlos C., Claudia R., Lizbeth X., Laura C., Dra. Rocío C., Esther C., Héctor L., Heriberto C., Jorge R., José Luis H., Belinda O., Rafael L. y Luis V.; por ser tan generosos con su ayuda, por mostrarme siempre una sonrisa, por sus comentarios que me ayudan a crecer profesionalmente, por ser un ejemplo a seguir y por hacer posible este trabajo.

A la ***DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA*** por su dulce carácter, el cual me impulsó a sentirme en confianza, por regalarme conocimiento sin reservas y por su apoyo brindado para la realización de este trabajo.

***A MIS PROFESORES y SINODALES (Q. MA. TERESA MENDOZA MATA, Q.F.B. JOSÉ OSCAR GONZÁLES MORENO, Q.F.B. ROSALBA CERVANTES CRUZ, Q.F.B. BEATRIZ E. ARELLANO PIMENTEL)*** que escudriñaron mi enseñanza.

A la máxima casa de estudios ***UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO*** quien me recibió desde los 14 años, me otorgó un universo de conocimientos de primer nivel, que considero mi hogar y me forjó como una profesionista comprometida por mi país, sin su existencia no habría podido aspirar a estudiar, por alimentar mis sueños convirtiéndolos en metas. Tengo la piel dorada y la sangre azul.

A la ***FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA*** donde conserve mi estancia por 5 años de mi desentonada vida universitaria, por sus excelentes instalaciones y profesores, por ser el refugio de mi tristeza.

A la ***UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA*** por el préstamo de sus instalaciones bioterio y biblioteca.

Al ***INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA, TORRE DE INVESTIGACIÓN, SUBDIRECCIÓN DE MEDICINA EXPERIMENTAL, LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA EXPERIMENTAL***, por permitirme adentrarme en su recinto, por sus extraordinarias instalaciones y personal.

Y a todas aquellas personas que estuvieron a lo largo de mi corta vida por breves momentos que fueron importantes en su justa medida y que de alguna forma repercutieron en mi persona.

# ÍNDICE

DEDICATORIAS .....	4
AGRADECIMIENTOS .....	7
RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN .....	12
1. MARCO TEÓRICO .....	13
1.1. <i>TOXOPLASMA GONDII</i> .....	13
1.1.1. CONCEPTO .....	13
1.1.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	13
1.1.3. MORFOLOGÍA.....	13
1.1.3.1. Taquizoito .....	13
1.1.3.2. Quiste .....	13
1.1.3.3. Bradizoito.....	14
1.1.3.4. Ooquiste .....	14
1.2. CICLO DE VIDA.....	14
1.3. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO .....	16
1.3.1. Aislamiento del parásito .....	16
1.3.2. Identificación histológica .....	17
1.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	17
1.3.4. Inmunodiagnóstico (ELISA) .....	17
1.4. CLASIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>T. gondii</i> .....	18
1.5. PATOGENIA Y MECANISMO DE TRANSMISIÓN .....	19
1.5.1. Transmisión horizontal (infección adquirida) .....	19
1.5.2. Transmisión vertical (infección congénita).....	20
2. JUSTIFICACIÓN.....	22
3. HIPÓTESIS.....	22
4. OBJETIVOS.....	22
4.1. OBJETIVO GENERAL .....	22
4.1.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	22

5. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	23
5.1. TIPO DE ESTUDIO.....	23
5.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO .....	23
5.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN, EXCLUSIÓN Y ELIMINACIÓN.....	23
5.4. VARIABLES .....	23
5.4.1. VARIABLES INDEPENDIENTES.....	23
5.4.2. VARIABLE DEPENDIENTE .....	23
6. METODOLOGÍA .....	24
6.1. SELECCIÓN DE LA CEPA Y ESPECIE DEL HOSPEDERO, VÍA DE ADMINISTRACIÓN, TIPO, CEPA Y ESTADIO DE <i>T. gondii</i> .....	24
6.2. ESTANDARIZACIÓN DEL CICLO ESTRAL EN RATONAS BALB/c...	25
6.3. OBTENCIÓN DE FROTIS VAGINAL.....	25
6.4. TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA (CICLO ESTRAL).....	25
6.5. TINCIÓN DE PAPANICOLAOU (CICLO ESTRAL).....	26
6.6. APAREAMIENTO.....	27
6.7. ESTANDARIZACIÓN DE CANTIDAD DE AZUL DE METILENO COMO UN MECANISMO DE PSEUDOINFECCIÓN .....	27
6.8. ESTANDARIZACIÓN DE LA DOSIS INFECTIVA CON TAQUIZOITOS DE LA CEPA ME49 EN RATONES BALB/c NO GESTANTES .....	28
6.9. ESTANDARIZACIÓN DE LA DOSIS INFECTIVA CON TAQUIZOITOS DE LA CEPA ME49 EN RATONES BALB/c GESTANTES.....	29
7. RESULTADOS .....	30
7.1. ESTANDARIZACIÓN DEL CICLO ESTRAL EN RATONAS BALB/c. OBTENCIÓN DE FROTIS VAGINAL. TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA (CICLO ESTRAL).....	30
7.2. GESTACIÓN .....	31
7.3. ESTANDARIZACIÓN DE CANTIDAD DE AZUL DE METILENO COMO UN MECANISMO DE PSEUDOINFECCIÓN .....	32
7.4. ESTANDARIZACIÓN DE LA DOSIS INFECTIVA CON TAQUIZOITOS DE LA CEPA ME49 EN RATONES BALB/c NO GESTANTES. ....	36
7.5. ESTANDARIZACIÓN DE LA DOSIS INFECTIVA CON TAQUIZOITOS DE LA CEPA ME49 EN RATONES BALB/c GESTANTES.....	38
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	43

9. CONCLUSIONES .....	47
10. PERSPECTIVAS .....	48
11. APENDICE .....	49
12. ANEXOS.....	51
12.1. ANEXO 1.- CICLO ESTRAL EN EL RATÓN.....	51
12.2. ANEXO 2.- SIMILITUDES ENTRE LA PLACENTA HUMANA, MARSUPIAL Y RATÓN .....	52
12.3. ANEXO 3.- OBTENCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE TAQUIZOITOS DE LA CEPA ME49 .....	53
12.4. ANEXO 4.- PRUEBA SEROLÓGICA (ELISA) .....	53
12.5. ANEXO 5.- PCR TIEMPO REAL (CUANTITATIVO).....	54
13. REFERENCIAS .....	57

## **RESUMEN**

Desarrollo de un modelo de toxoplasmosis congénita en ratón que simule los cambios en la transmisión y el daño fetal en los seres humanos.

El objetivo de este proyecto, fue desarrollar un modelo de toxoplasmosis congénita en ratón que simulara los cambios en la transmisión y el daño fetal que ocurre en los seres humanos.

Se colaboró en la búsqueda bibliográfica de modelos animales de toxoplasmosis congénita. Se hizo una estandarización del ciclaje de ratonas BALB/c para que todas las ratonas (utilizadas) coincidieran en el ciclo estral susceptible a la gestación (pro-estro/estro). Para esto, se les colocó a las hembras en la cama de los machos y se les tomó frotis vaginales (hematoxilina-eosina). Posteriormente, se les realizó un registro de su masa corporal un día antes de colocarlas con los machos (apareamiento) y 9 días posteriores a este evento. Se llevó a cabo una estandarización de cantidad de azul de metileno como un mecanismo de pseudoinfección por vía intravenosa usando la vena coccígea (vena de la cola), para demostrar experimentalmente que hubiera una adecuada irrigación hacia la unidad feto-placentaria.

Se hicieron experimentos para demostrar la infección de ratones BALB/c no gestantes con taquizoitos de la cepa ME49, por vía intravenosa, verificando la infección sistémica mediante PCR en bazo e hígado; Asimismo, se iniciaron los primeros experimentos de estandarización de dosis infectiva con taquizoitos en ratonas gestantes usando también taquizoitos de la cepa ME49. Se demostró la infección de algunos fetos usando la dosis más alta. Las estandarizaciones realizadas ayudarán a seguir a fin con el modelo de toxoplasmosis congénita en ratón que simulara los cambios en la transmisión y el daño fetal en humanos; con un avance importante en el conocimiento del mismo, además de ampliar la comprensión de la toxoplasmosis congénita.

## INTRODUCCIÓN

*Toxoplasma gondii* es un parásito cosmopolita intracelular obligado que infecta a todos los vertebrados homeotermos, causando problemas clínicos y zootécnicos.

La toxoplasmosis es una zoonosis de distribución mundial y con gran impacto en salud pública. Aproximadamente uno de cada tres individuos alrededor del mundo están infectados, con intervalos de prevalencia entre 12 y 90 por ciento, lo cual se va incrementando con la edad. Causa retraso mental, pérdida de la visión, problemas en mujeres embarazadas, además de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunodeficientes.

La toxoplasmosis congénita es una de las enfermedades parasitarias que afectan a mujeres embarazadas, es causal de abortos, de mal formaciones y de infertilidad. Si una hembra gestante se primo-infecta por vía oral, pueden infectar al embrión o feto y ocasionar toxoplasmosis congénita. El riesgo de que ocurra una transmisión vertical es bajo al principio de la gestación, pero si ocurre, el daño al embrión/feto suele ser grave, y causar problemas clínicos severos e incluso la muerte. Por el contrario, si la infección de la hembra gestante ocurre al final de la gestación, la tasa de transmisión vertical aumenta hasta el 80 por ciento y la probabilidad de daño al feto es mínima. La razón de este fenómeno, no es clara. Debe tomarse en cuenta la virulencia del parásito (ya que solamente las cepas tipo II presentan esta dinámica de transmisión/daño, y no así las tipo I).

El presente trabajo, consiste en desarrollar un modelo animal de toxoplasmosis congénita que simula los cambios que ocurren en el ser humano con respecto a la tasa de transmisión vertical y daño fetal ocurridos en los distintos trimestres de la gestación.

Este modelo, pretende ser utilizado en estudios posteriores que ayude al desarrollo de nuevas estrategias, para favorecer las oportunidades del embrión/feto contra la infección y el daño de *Toxoplasma gondii*.

## **1. MARCO TEÓRICO**

### **1.1. TOXOPLASMA GONDII**

#### **1.1.1. CONCEPTO**

*Toxoplasma gondii* es un protozoario intracelular obligado. Su hospedero definitivo son los felinos, mientras que cualquier animal homeotermo puede ser su hospedero intermediario<sup>1</sup>. Su nombre se deriva de las palabras griegas *toxon*, que significa “arco” y *plasma*, que significa “forma”, refiriéndose a la forma arqueada del citoesqueleto que presenta la fase de taquizoito<sup>2</sup>.

#### **1.1.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA**

*Toxoplasma gondii* pertenece al Phylum Apicomplexa (protozoarios cuyo estadio móvil presenta complejo apical), Clase Sporozoasida, Subclase Coccidiasina, Orden Eucoccidiorida y Familia Sarcocystidae; describiéndose solamente una especie para el género<sup>1</sup>.

#### **1.1.3. MORFOLOGÍA**

##### **1.1.3.1. TAQUIZOITO**

El término “taquizoito” (del griego *Tachos*, rápido), se propuso en 1973 por Frenkel<sup>3</sup>, para describir la multiplicación rápida en cualquier célula del hospedero intermediario y en las células epiteliales no intestinales del hospedero definitivo. Esta forma del parásito se asocia con la fase aguda de la infección. Tiene un tamaño de 2x6 µm. No presenta medios de locomoción; sin embargo, se puede mover por ondulación y rotación. Una característica de su morfología ultra estructural es que el núcleo se localiza al centro. Su reproducción es asexual por un mecanismo semejante a la fisión binaria, llamado endodiogenia, en el que se forman dos células hijas, que al crecer ocupan todo el citoplasma de la célula madre, la cual termina por desaparecer.

##### **1.1.3.2. QUISTE**

Los quistes contienen a los bradizoitos. Estos varían en tamaño, ya que pueden tener 5 µm de diámetro y contener dos bradizoitos, hasta tener 100 µm de diámetro con miles de bradizoitos dentro. Los quistes se pueden encontrar principalmente en tejidos neuronales y musculares<sup>4</sup>.

### **1.1.3.3. BRADIZOITO**

El bradizoito proviene del griego *brady* que significa lento. Estos son semejantes a los taquizoitos pero se dividen lentamente en el interior del quiste, por lo que se asocia con el estado crónico de la infección; no obstante, los bradizoitos se pueden formar desde la fase aguda (a partir de los tres días).

### **1.1.3.4. OOQUISTE**

Los quistes con bradizoitos que son ingeridos por los felinos se liberan a la luz intestinal por las enzimas digestivas e invaden a los enterocitos diferenciándose en un macrogameto (célula femenina) y un microgameto (célula masculina). El microgameto posee un flagelo que le permite desplazarse sobre el epitelio intestinal para fecundar al macrogameto, lo que da origen a un cigoto. Este cigoto se transforma en un ooquiste inmaduro no infeccioso (de forma esférica de 10x12 µm de diámetro), que es liberado al medio a través de las heces. En condiciones de temperatura y humedad adecuadas, los ooquistes maduran a un estado infeccioso (de forma elipsoidal de 11x13 µm de diámetro) conteniendo en su interior ocho esporozoitos, que al ser ingeridos por un hospedero intermediario, inician la infección<sup>5</sup>.

## **1.2. CICLO DE VIDA**

Los seres humanos o cualquier animal homeotermo pueden adquirir toxoplasmosis por el consumo de ooquistes. Después de la ingestión de ooquistes esporulados, las condiciones de pH del estómago favorecen el rompimiento del ooquiste y la liberación de esporozoitos, los cuales penetran a las células del epitelio intestinal donde se multiplican en distintos tipos celulares<sup>6</sup>. Los esporozoitos se convierten en taquizoitos, los cuales se multiplican rápidamente e invaden cualquier tipo celular; posteriormente, se convierten en bradizoitos y se enquistan<sup>7</sup>.

Los quistes persisten durante toda la vida del hospedero, por lo que otra fuente de infección, es el consumo de carne cruda o mal cocida, contaminada con quistes<sup>8</sup> (figura 1).

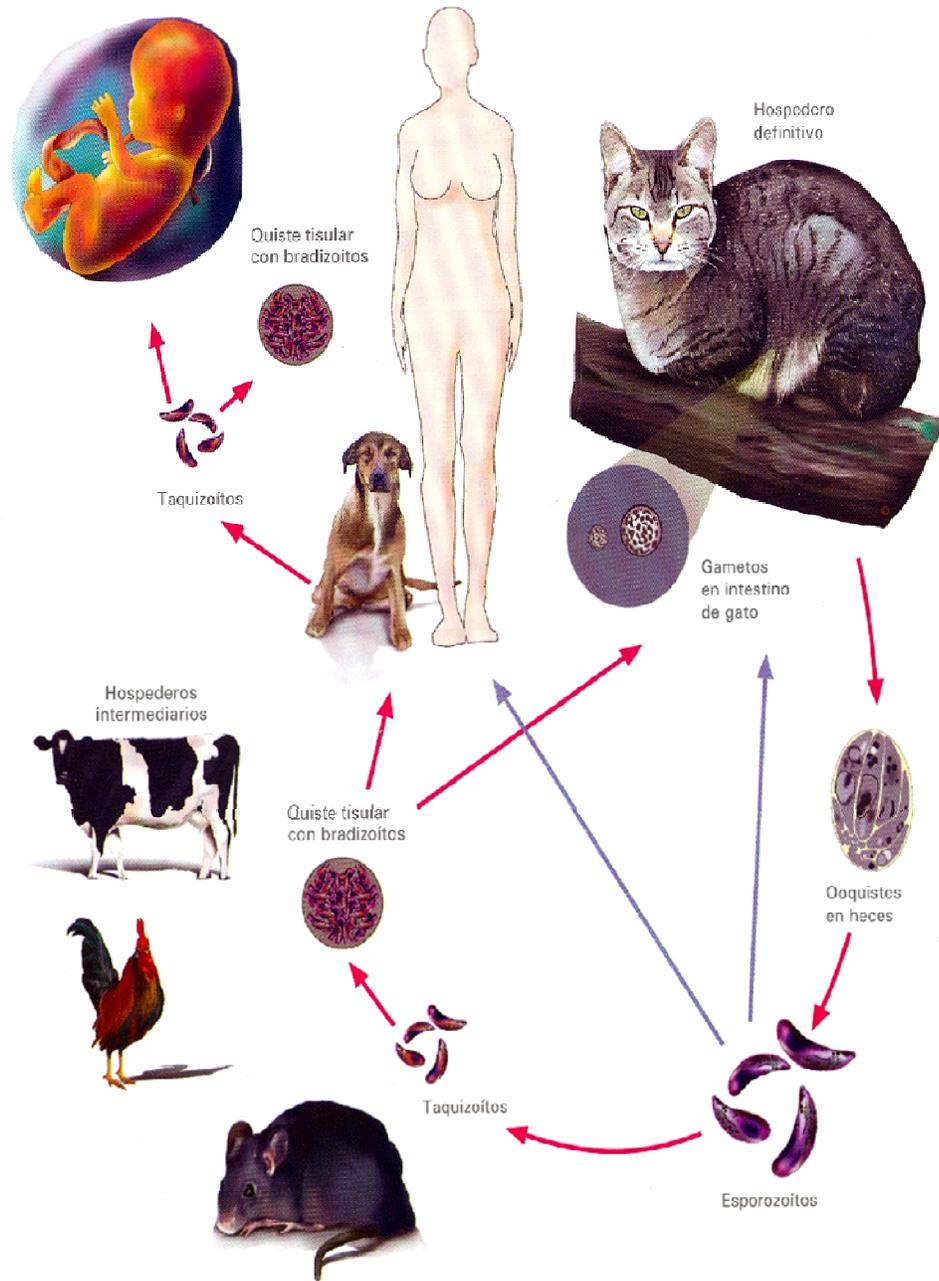


Figura 1. Ciclo biológico de *T. gondii*<sup>9</sup>.

### 1.3. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la infección por *T. gondii* se puede realizar mediante una gran diversidad de técnicas (cuadro 1), en las cuales se emplean diferentes muestras biológicas (sangre, suero, heces, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, tejidos, entre otras); el resultado de dichas técnicas así como la signología clínica ayuda a establecer criterios para tratar la enfermedad.

MÉTODO	DIAGNÓSTICO	TÉCNICA	DETECCIÓN
DIRECTO	Microscópico	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Coproparasitoscópico</li> <li>➤ Tinción:               <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Giemsa</li> <li>✓ Hematoxilina-Eosina</li> </ul> </li> <li>➤ Inmunoquímica</li> <li>➤ Inmuno fluorescencia</li> </ul>	Ooquistes Taquizoitos y quistes tisulares con bradizoitos
	Ultraestructura	➤ Microscopía electrónica	
	Aislamiento del parásito	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Cultivo celular</li> <li>➤ Biensayo</li> </ul>	
	Detección del genoma del parásito	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ PCR convencional</li> <li>➤ PCR en tiempo real</li> </ul>	DNA de <i>T. gondii</i>
INDIRECTOS	Detección de anticuerpos	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Sabin y Feldman (Dye Test)</li> <li>➤ Prueba intradermorreacción a la toxoplasmosis</li> <li>➤ Aglutinación directa e indirecta</li> <li>➤ Fijación del complemento</li> <li>➤ Hemoaglutinación directa e indirecta</li> <li>➤ ELISA</li> <li>➤ DOT-ELISA</li> <li>➤ Western blot</li> </ul>	Anticuerpos anti- <i>T. gondii</i> circulantes en fluidos corporales

Cuadro 1. Técnicas de diagnóstico para la detección de *T. gondii*<sup>9,10</sup>.

#### 1.3.1. AISLAMIENTO DEL PARÁSITO

El aislamiento de *T. gondii* a partir de líquidos corporales en el paciente refleja una infección aguda. *Toxoplasma gondii* puede aislarse de sangre, de líquido cefalorraquídeo (LCR) y de otros líquidos o tejidos corporales. Se inocula el líquido corporal en cultivos celulares o en la cavidad peritoneal de ratones. En el último caso debe comprobar la presencia del parásito en el líquido del peritoneo 6-10 días después de la inoculación. Se busca en preparaciones frescas y se distinguen al microscopio una membrana, un citoplasma refringente y un núcleo redondo de mayor condensación. También, puede

realizarse un frotis del exudado peritoneal de ratón; la muestra se fija con metanol, se tiñe con Wright, Giemsa y se observa al microscopio, donde se distingue una membrana a veces granulosa, el citoplasma teñido de azul y el núcleo de rojo en el centro del citoplasma. Si no se encuentran parásitos en el líquido peritoneal del ratón, puede llevarse a cabo una titulación sérica anti-*Toxoplasma gondii* 4 a 6 semanas después de la inoculación. La sensibilidad de este método en el diagnóstico de infección aguda es de aproximadamente 90 por ciento. Este método presenta algunas desventajas, como son el riesgo de contaminación y el que no se obtienen resultados inmediatos, debido al tiempo necesario para que proliferen los parásitos<sup>11</sup>.

#### **1.3.2. IDENTIFICACIÓN HISTOLÓGICA**

En material de biopsia de tejidos corporales, los taquizoitos y los bradizoitos enquistados son demostrables con la tinción de Wright, hematoxilina-eosina y la de Schiff-ácido peryódico, inmunofluorescencia específica y tinción con inmunoperoxidasa. La demostración de quistes con bradizoitos solamente confirma una infección previa, excepto si se encuentran quistes en placentas, fetos o recién nacidos, en los que se indica una infección congénita<sup>11</sup>.

#### **1.3.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

Consiste en efectuar una replicación repetitiva *in vitro* de una secuencia específica de DNA del parásito<sup>12</sup>. Al amplificar o copiar varias veces una misma secuencia, se aumenta en forma proporcional la sensibilidad de la misma. El producto amplificado se analiza en un gel de agarosa y se tiñe con bromuro de etidio. Clínicamente, se ha empleado con buenos resultados para detectar la presencia de *T. gondii* en líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo y muestras de tejidos<sup>13</sup>.

#### **1.3.4. INMUNODIAGNÓSTICO (ELISA)**

El ELISA se emplea para la identificación de las diferentes clases de anticuerpos: IgA, IgE, IgM e IgG (y sus subclases). Es una técnica que utiliza anticuerpos conjugados a una enzima que se unen a anticuerpos presentes en el suero del paciente, que conservan su capacidad de unión específica al

antígeno. En este sistema, se absorbe el antígeno o el anticuerpo a una fase sólida insoluble, y la enzima es capaz de producir una reacción de óxido-reducción, en la cual el sustrato se transforma en un producto colorido.

Existen diversos tipos de ELISA: directo, indirecto, de captura y competitivo. Casi todos permiten la determinación de antígenos en fluidos biológicos a excepción del método indirecto que sólo detecta anticuerpos. En los métodos directos, el anticuerpo dirigido específicamente contra el antígeno es el que lleva unida la enzima. En cambio, en los métodos indirectos, el conjugado enzima-anticuerpo reacciona con un primer anticuerpo, el cual ya reaccionó con el antígeno. En los de captura, el conjugado enzima-anticuerpo se une al antígeno antes fijado a un primer anticuerpo absorbido a la fase sólida. Posteriormente, se agrega el sustrato de la enzima y se mide la intensidad del color desarrollado, la cual es proporcional a la magnitud de la reacción antígeno-anticuerpo. Las enzimas más empleadas son la peroxidasa de rábano (HRP), la fosfatasa alcalina (FA) y la  $\beta$ -D-galactosidasa (BG). Los sustratos para la enzima HRP son el peróxido de hidrógeno o el peróxido de urea, que al ser reducidos dan productos incoloros, por lo que se acompañan de cromógenos que se oxidan y desarrollan color. La más empleada es la *o*-fenilendiamina (OPD), que continúa en forma soluble después de ser oxidada. Los sustratos para la FA son el *p*-nitrofenil fosfato y el 5-bromo-4-cloro-3-indoilo fosfato<sup>14</sup>.

#### **1.4. CLASIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE *T. gondii***

Hace unos años, la mayoría de los aislamientos de *T. gondii* fueron considerados clonas, con una discreta diversidad genética, derivándose la mayor parte de la información a partir de seres humanos y animales, tanto enfermos o aparentemente sanos, dentro de un ciclo doméstico o urbano, provenientes de Europa y Norteamérica, agrupándose en uno de los tres tipos genéticos o linajes predominantes, denominados I, II y III, con base en electroforesis de isoenzimas, el polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP) del gen SAG2 (entre otros marcadores) y la tipificación de microsatélites. Por otro lado, existen cepas recombinantes que son mucho más

anormales, representando sólo el 5-10 por ciento de los linajes clónales y son responsables de más del 40 por ciento de toxoplasmosis atípica grave en humanos<sup>15 y 16</sup>. La cepa con genotipo I es altamente virulenta en ratones, tienen alta tasa de multiplicación *in vitro* y una reducción en la interconversión de taquizoitos a bradizoitos. Se han asociado con infecciones oculares en pacientes inmunocompetentes. Además, tienen una gran capacidad de cruzar barreras en tejidos *in vitro* e *in vivo*. La cepa con genotipo II son aislados frecuentemente en humanos, ovejas y cerdos. No son virulentas para los ratones. Son los responsables del 70 por ciento de todas las infecciones adquiridas en los seres humanos, están asociados a la reactivación de infecciones crónicas por persistencia de los quistes en tejido y son la causa del 65 por ciento de las infecciones en pacientes con VIH. Estas variantes tienen una tasa baja de multiplicación y llevan a cabo una rápida interconversión de taquizoito-bradizoito y la formación de quistes. La cepa con genotipo III se ha obtenido en animales silvestres, es difícil que causen enfermedades en humanos. Son relativamente avirulentas para ratones y se relacionan con infecciones crónicas en animales y seres humanos<sup>17</sup>.

### **1.5. PATOGENIA Y MECANISMO DE TRANSMISIÓN**

La patogenia de la infección por *T. gondii* en humanos y en animales está directamente relacionada con la vía de transmisión, los sitios de multiplicación y la cepa del parásito. Dependiendo de estos factores, se presentarán las lesiones y la signología clínica. La toxoplasmosis se puede transmitir horizontal (infección adquirida) o verticalmente (infección congénita)<sup>15</sup>.

#### **1.5.1. TRANSMISIÓN HORIZONTAL (INFECCIÓN ADQUIRIDA)**

Los hospederos definitivos e intermediarios pueden infectarse mediante 4 rutas principalmente:

- 1) Vía oral-fecal a través de las heces de gatos primo-infectados que contaminan el suelo, depósitos de agua para consumo humano, ríos, mares, pastos, forrajes, jardines, cultivos de frutas y vegetales con ooquistes esporulados.

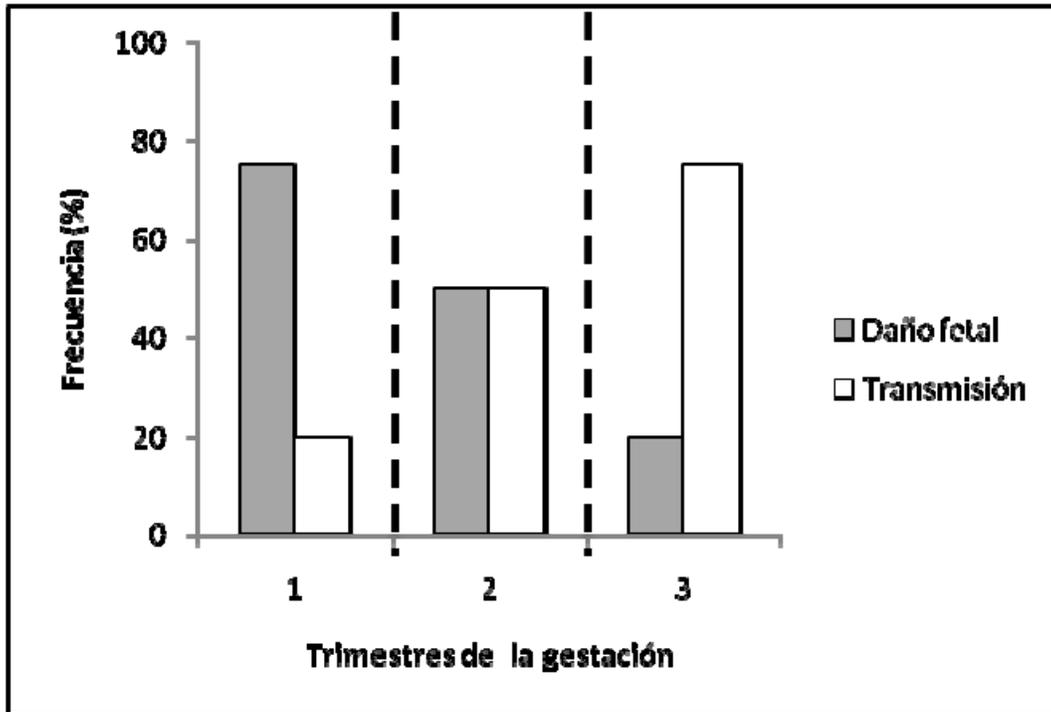
- 2) Consumo de carne cruda o mal cocida contaminada con quistes tisulares.
- 3) Trasplante de diversos órganos<sup>18 y 19</sup>.
- 4) También se ha descrito la transmisión del parásito por consumo de leche cruda de borrega, cabra y vaca contaminada con taquizoitos<sup>20</sup>.

#### **1.5.2. TRANSMISIÓN VERTICAL (INFECCIÓN CONGÉNITA)**

La toxoplasmosis congénita es un fenómeno muy complejo, tiene una estrecha relación entre los trimestres de la gestación, la transmisión del parásito y el daño al embrión/feto. En los seres humanos, se ha demostrado que las cepas con genotipo II son más comunes, aunque los genotipos I y III así como las cepas atípicas, también se han reportado.

En primo-infecciones de mujeres embarazadas, el paso trasplacentario del parásito puede producir infección congénita, con una prevalencia en los recién nacidos de 0,01 a 0,3 por ciento, según; zona geográfica, estilo de vida y nivel socioeconómico<sup>15</sup>.

Una de las observaciones más interesantes en la toxoplasmosis congénita a surgido a partir del estudios de seguimiento de mujeres embarazadas no infectadas, que seroconvertían durante el embarazo, las tasas de transmisión vertical y el daño fetal se relacionan con el momento de la primo-infección, en un sentido contrario (gráfica 1): durante las primeras semanas de gestación, la transmisión vertical no es frecuente, pero si ocurre, causa daños importantes en el embrión, lo que es la razón de que toxoplasmosis causa abortos y muerte fetal. Al final del embarazo, la tasa de transmisión puede aumentar hasta un 80 por ciento, pero la proporción de recién nacidos enfermos disminuye a alrededor del 15 por ciento. Así, la mayoría de casos afectados por la toxoplasmosis congénita son aquellos cuyas madres adquirieron la infección durante el segundo trimestre de la gestación. Aunque la mayoría de los fetos infectados al final del embarazo nacen sin signos clínicos, pueden desarrollar los problemas oculares o cerebrales en, meses e incluso años después.



Gráfica 1. Representación esquemática de la relación entre el momento de la primo-infección de la madre durante el embarazo y la tasa de transmisión/daño fetal<sup>15</sup>.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

En la actualidad, existe una gran cantidad de modelos animales utilizados para el estudio de la toxoplasmosis congénita; en la mayoría de ellos, el objetivo principal es determinar la funcionalidad de los fármacos; en otros, sólo buscan un modelo capaz de transmitir verticalmente la infección; empero, estos estudios no se basan en las distintas frecuencias de transmisión vertical y daño fetal, ocurrido en los seres humanos infectados durante los distintos trimestres de la gestación como se ha discutido anteriormente; por lo que los modelos utilizados no reflejan la infección natural en el ser humano; por tal motivo es importante desarrollar un modelo animal de toxoplasmosis congénita, que verdaderamente simule las distintas frecuencias de transmisión vertical y daño fetal, ocurrido en los seres humanos infectados, durante los distintos trimestres de la gestación.

## **3. HIPÓTESIS**

El modelo de toxoplasmosis congénita en ratón BALB/c simulará los cambios en la transmisión vertical y el daño fetal ocurridos en los seres humanos.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar un modelo de toxoplasmosis congénita en ratón que simule los cambios en la transmisión y el daño fetal en humanos.

#### **4.1.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Determinar el porcentaje de infección en crías BALB/c durante los diferentes tercios de la gestación, de madres infectadas.
- Determinar el porcentaje de daño en las crías BALB/c durante los diferentes tercios de la gestación, de madres infectadas.

## **5. DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **5.1. TIPO DE ESTUDIO**

Comparativo, experimental, prolectivo, transversal

### **5.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO**

Ratones de la cepa BALB/c

### **5.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN, EXCLUSIÓN Y ELIMINACIÓN**

Serán incluidos todos aquellos animales que antes de iniciar los experimentos 1) no estén gestantes, 2) estén clínicamente sanos, 3) presenten una serología negativa para *T. gondii*.

Serán excluidas y sustituidas en los experimentos, todas las hembras que no estén preñadas siendo del grupo gestante, así como aquellas que siendo del grupo de infectadas no lo estén.

Se eliminarán aquellas ratonas gestantes que mueran durante el estudio antes del tiempo estipulado para cada grupo o que presenten signos/síntomas de otra infección a la que fue sometido.

### **5.4. VARIABLES**

#### **5.4.1. VARIABLES INDEPENDIENTES**

Tiempo de gestación (7, 14, 18 días)

Cepa de ratón (BALB/c)

Cepa de *T. gondii* (ME49)

#### **5.4.2. VARIABLE DEPENDIENTE**

Número de crías infectadas

Número de crías con daño, del total de crías infectadas

Número de crías con daño, del total de crías

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. SELECCIÓN DE LA CEPA Y ESPECIE DEL HOSPEDERO, VÍA DE ADMINISTRACIÓN, TIPO, CEPA Y ESTADIO DE *T. gondii*.

Se colaboró con una revisión sistemática (Vargas-Villavicencio et al., 2011, manuscrito en preparación), en el cual fueron resueltas diversas variables a considerar para el desarrollo del modelo, entre ellas fue la elección del hospedero, este fue el ratón, puesto que cumplía con los diferentes aspectos como fue:

- La existencia de transmisión vertical en este hospedero.
- El proceso inmunológico similar al del ser humano.
- Las similitudes (humano-ratón) en el tipo de placentación que presentan (anexo 2).

El siguiente punto fue seleccionar una cepa del hospedero resistente a la toxoplasmosis, ya que en el ser humano es considerado, de igual forma, resistente. Por lo anterior, se utilizó la cepa BALB/c, que describió Roberts y Alexander 1992<sup>21</sup> y posteriormente Fux et al., 2000<sup>22</sup>, en donde mencionan la resistencia hacia la toxoplasmosis.

Como se mencionó en los antecedentes, la cepa del parásito tipo II presenta una relación entre los trimestres de la gestación, la transmisión del parásito y el daño al embrión/feto (grafica 1); por lo que se seleccionó la cepa ME49<sup>23</sup> de *T. gondii* que es de tipo II.

Asimismo, se buscó en la literatura qué estadio del parásito puede infectar la placenta-feto. El estadio de *T. gondii* que se utilizó fue el de taquizoito, puesto que se han encontrado antígenos de este estadio (y no de otros) en abortos de seres humanos, estos antecedentes apuntan a que los taquizoitos son el único estadio que atraviesan la placenta<sup>24 y 25</sup>.

Por último, se buscó en la literatura qué vía de inoculación está reportada como la ruta utilizada por el parásito para llegar al embrión-feto (infección vertical), en este caso se escogió la vía intravenosa<sup>26 y 27</sup>.

## **6.2. ESTANDARIZACIÓN DEL CICLO ESTRAL EN RATONAS BALB/c**

Para que todas las ratonas BALB/c estuvieran en el mismo ciclo estral, se utilizaron las siguientes estrategias reportadas por Arteaga et al., 2009<sup>28</sup>. Se colocaron a todas las ratonas BALB/c en una sola jaula y se le cambió el aserrín por el de los machos reportado en Letscher-Bru et al., 2003<sup>29</sup>, para que de esta forma todas las ratonas estuvieran cicladas.

## **6.3. OBTENCIÓN DE FROTIS VAGINAL**

Las ratonas se identificaron por numeración ascendente marcándolas en la cola con un plumón de tinta indeleble. Después se esterilizó el asa bacteriológica; lavándola con agua corriente, colocándola a la flama al rojo vivo y lavándola con solución salina isotónica, este procedimiento se realizó cada vez que se tomó un frotis vaginal en cada ratona, para evitar contaminación.

Para obtener los frotis vaginales se tomó a cada ratona por la cola, sacándola y colocándola en la tapa de la jaula, se levantó la cola de la ratona para agregar una gota de solución salina isotónica en el orificio vaginal; posteriormente, se introdujo el asa previamente esterilizada en el orificio vaginal realizando suaves raspados en las paredes vaginales y de esta manera obtener células descamadas e identificando la fase del ciclo estral donde se encontraba cada ratona; la muestra obtenida se colocó en un portaobjetos identificado con el número de la ratona y el día de toma de muestra correspondiente.

## **6.4. TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA (CICLO ESTRAL)**

Después de obtener los frotis vaginales, los portaobjetos se secaron; se prosiguió a teñirlos con hematoxilina-eosina; 10 min con hematoxilina, 5 min con eosina y 5 min con alcohol absoluto, entre cada cambio de solución se lavó con agua destilada el portaobjetos, ya teñido el frotis vaginal se observaron al microscopio (anexo 1)<sup>30</sup>.

### 6.5. TINCIÓN DE PAPANICOLAOU (CICLO ESTRAL)

Después de obtener los frotis vaginales, los portaobjetos se secaron, se siguió el procedimiento del cuadro 2 para la tinción de Papanicolaou.

Pasos de la tinción	Agente	Tiempos
1	Fijación con etanol 96%	15min.
2	Etanol 80%	Baños
3	Etanol 70%	Baños
4	Etanol 50%	Baños
5	Agua corriente	Baños
6	Hematoxilina	5min
7	Agua corriente	Baños
8	Etanol 50%	Baños
9	Etanol 70%	Baños
10	Etanol 80%	Baños
11	Etanol 96%	Baños
12	Colorante Orange G-6	10min.
13	Etanol 96%	Baños
14	Colorante Eosina-Alcohol 50	10min.
15	Etanol 96%	Baños
16	Etanol absoluto	Baños
17	Etanol absoluto	Baños
18	Xilol	Baños
19	Xilol	Baños
20	Montar en resina	Baños

Cuadro 2. Descripción de los pasos a seguir de la tinción de Papanicolaou<sup>31</sup>

Los frotis vaginales teñidos con las dos tinciones se observaron al microscopio (anexo 1)<sup>30</sup>. Se realizó un comparativo de ambas técnicas para predecir el ciclo estral de las ratonas y así ocupar la técnica más factible para los intereses del desarrollo experimental, la cual fue la hematoxilina-eosina.

## **6.6. APAREAMIENTO**

Para realizar el apareamiento, las ratonas BALB/c, tenían que ser de diferentes camadas y sólo estar emparentados por padre o abuelo. Después de que se obtuvieron a las ratonas cicladas, se pronosticó el día en que las ratonas se encontrarán en la fase del ciclo estral del proestro o proestro-estro. Todas las ratonas se pesaron en una balanza granataria. Posteriormente, se colocaron a dos hembras con un macho sexualmente experto, después de 48 horas se apartaron los machos de las hembras. Se revisaron las ratonas para observar la presencia de tapón vaginal<sup>21 y 32</sup>, el cual puede identificarse levantando la cola de las ratonas y observando en el orificio vaginal un tapón que a la luz es brillante. La presencia de éste es considerado como tiempo cero o inicio de la gestación. Además, se volvieron a pesar todas las ratonas con la balanza granataria por 9 días posteriores al tiempo cero, de esta manera se pronosticó, por peso, cuales ratonas estuvieran preñadas (procedimiento modificado de Freyre 2009<sup>33</sup>). Aquellas ratonas que no estuvieron gestantes, fueron eliminadas del estudio.

## **6.7. ESTANDARIZACIÓN DE CANTIDAD DE AZUL DE METILENO COMO UN MECANISMO DE PSEUDOINFECCIÓN**

Antes de iniciar la infección experimental, se adiestró para el manejo de ratones y la inoculación por vía intravenosa del colorante como un mecanismo de pseudoinfección. Se utilizaron ratonas BALB/c, las cuales, se les inyectó azul de metileno 0.1 por ciento vía intravenosa (vena de la coccígea). Se realizaron dos experimentos.

Primer experimento. Se utilizaron 6 ratonas de 7 días de preñes. Se dividieron en tres grupos de dos ratonas cada uno y se les dosificó una cantidad diferente de azul de metileno: (A) 200  $\mu$ L, (B) 300  $\mu$ L, (C) 400  $\mu$ L.

Segundo experimento. Se utilizaron 9 ratonas dosificándoles 400  $\mu$ L de azul de metileno. Se dividieron en tres grupos, con tres ratonas cada uno: (D) 7 días de gestación, (E) 14 días de gestación, (F) 18 días de gestación.

Transcurridos 5 min de administrar el azul de metileno se sacrificaron por dislocación cervical. Se les diseccionó y se observaron macroscópicamente los órganos de cada animal.

#### **6.8. ESTANDARIZACIÓN DE LA DOSIS INFECTIVA CON TAQUIZOITOS DE LA CEPA ME49 EN RATONES BALB/c NO GESTANTES**

Una vez estandarizada la vía de inoculación con el azul de metileno, se llevó a cabo una infección con taquizoitos de la cepa tipo II no virulenta ME49 (anexo 3) a tres dosis diferentes en ratones BALB/c no gestantes. Se utilizaron 10 ratonas BALB/c seronegativas (anexo 4) a *T. gondii*, se dividieron en 5 grupos cada uno con 2 ratonas:

Grupo A (grupo control): Se les inoculó 100  $\mu$ L de solución inyectable a cada ratona.

Grupo B: Se les inoculó a cada ratona 2,500 taquizoitos de la cepa ME49 en 120  $\mu$ L de medio de cultivo.

Grupo C: Se les inoculó a cada ratona 25,000 taquizoitos de la cepa ME49 en 120  $\mu$ L de medio de cultivo.

Grupo D: Se les inoculó a cada ratona 250,000 taquizoitos de la cepa ME49 en 120  $\mu$ L de medio de cultivo.

Grupo E: Se les inoculó a cada ratona 2,500,000 taquizoitos de la cepa ME49 en 120  $\mu$ L de medio de cultivo.

Se sacrificaron a las 48 h después de la inoculación y se extrajeron los bazo de cada animal, ya que es uno de los órganos blanco para encontrar la infección y/o daño<sup>34</sup>. En los tejidos extraídos, se cuantificó el gen B1 de *T. gondii* por PCR en tiempo real (anexo 5) para determinar si hubo o no infección.

## 6.9. ESTANDARIZACIÓN DE LA DOSIS INFECTIVA CON TAQUIZOITOS DE LA CEPA ME49 EN RATONES BALB/c GESTANTES

Una vez estandarizada la dosis infectiva en ratonas no gestantes, se llevó a cabo una infección con taquizoitos de la cepa tipo II no virulenta ME49 (anexo 3) a tres dosis diferentes, en ratones BALB/c de 8 días de gestación. Se utilizaron 10 ratonas BALB/c seronegativas (anexo 4) a *T. gondii*, se dividieron en 5 grupos cada uno con 2 ratonas:

Grupo A (grupo control): Se les inoculó 100  $\mu$ L de solución inyectable a cada ratona.

Grupo B: Se les inoculó a cada ratona 2,100,000 taquizoitos de la cepa ME49 en 120  $\mu$ L de medio de cultivo.

Grupo C: Se les inoculó a cada ratona 4,300,000 taquizoitos de la cepa ME49 en 120  $\mu$ L de medio de cultivo.

Grupo D: Se les inoculó a cada ratona 8,600,000 taquizoitos de la cepa ME49 en 120  $\mu$ L de medio de cultivo.

Grupo E: Se les inoculó a cada ratona 17,300,000 taquizoitos de la cepa ME49 en 120  $\mu$ L de medio de cultivo.

Se sacrificaron a las 48 h después de la inoculación y se extrajeron tejido materno (hígado-bazo) y tejido fetal: feto 1' y 6' o último (figura 2); se cuantificó el gen B1 de *T. gondii* por PCR en tiempo real (anexo 5), para determinar si hubo o no infección. Se escogieron fetos 1 y 6 o último (figura 2) para histología.

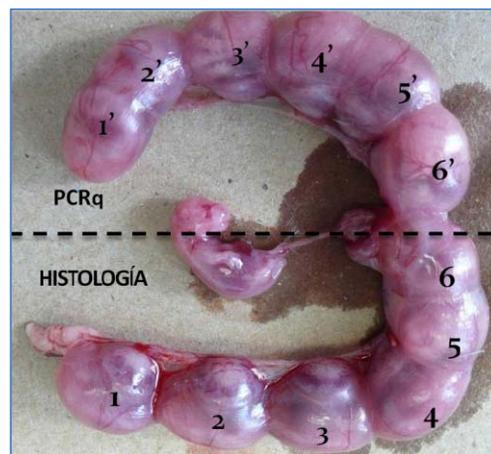


FIGURA 2. Elección fetal para histología y PCR en tiempo real para la estandarización de la dosis infectiva con taquizoitos de la cepa ME49 en ratones BALB/c gestantes.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. ESTANDARIZACIÓN DEL CICLO ESTRAL EN RATONAS BALB/c. OBTENCIÓN DE FROTIS VAGINAL. TINCIÓN HEMATOXILINA- EOSINA (CICLO ESTRAL)

Los frotis vaginales fueron teñidos con hematoxilina-eosina para identificar los diferentes tipos celulares, y por ende, la etapa del ciclo estral en que se encontraran. Este procedimiento se llevó a cabo durante 15 días (figura 3-6). Teniendo completo el ciclo para cada ratona, se predijo el día en que estuvieran en la etapa del proestro-estro y así colocarlas con un macho para el apareamiento.

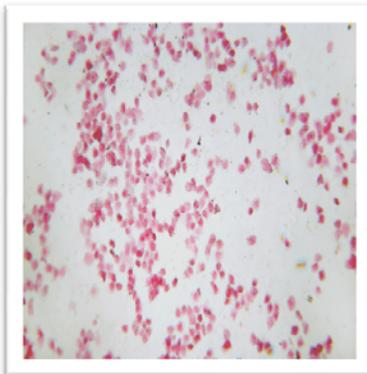


Figura 3. ESTRO: Gran cantidad de células epiteliales cornificadas teñidas de color rosa. Ausencia de células nucleadas. Teñidas con hematoxilina-eosina (40x).

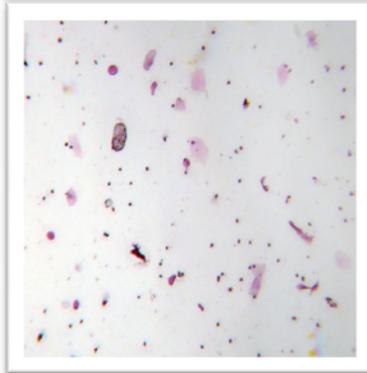


Figura 4. METAESTRO: Gran cantidad de leucocitos teñidos de morado de forma redondeada. Ausencia de células epiteliales. Teñidas con hematoxilina-eosina (40x).

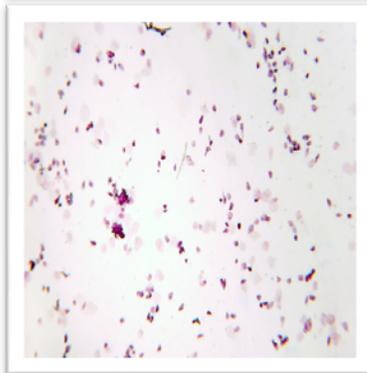


Figura 5. DIESTRO: Leucocitos teñidos de morado de forma redondeada. Células nucleadas teñidas de morado amorfas. Teñidas con hematoxilina-eosina (40x).

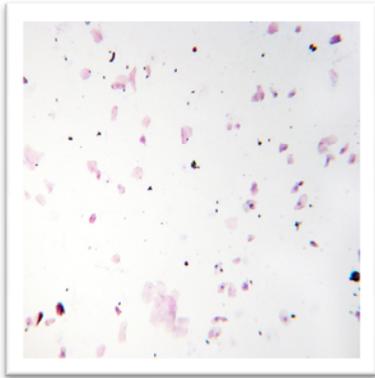
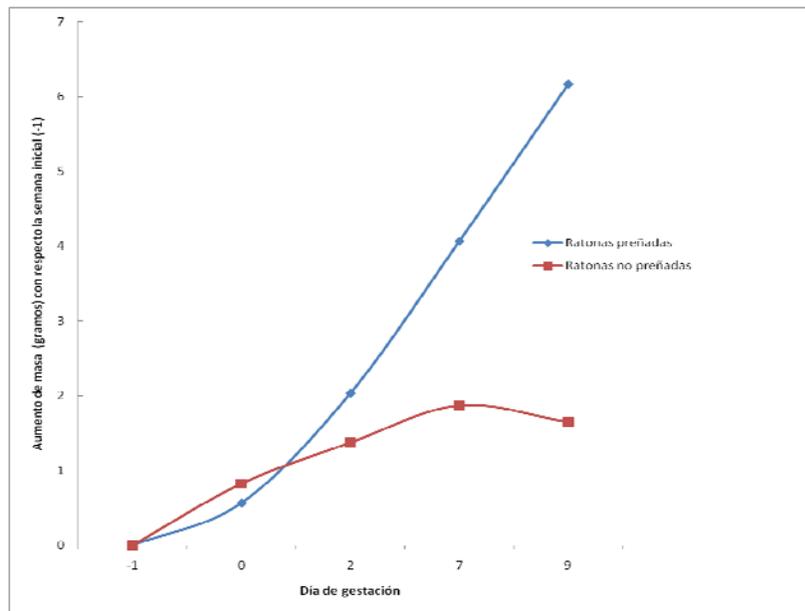


Figura 6. Proestro: Gran cantidad de células nucleadas teñidas de morado amorfas y con el núcleo de un morado más intenso. Teñidas con hematoxilina-eosina (40x).

## 7.2. GESTACIÓN

Para aumentar la probabilidad de utilizar ratonas gestantes, se analizó el incremento de masa de cada una de ellas. En la siguiente gráfica se muestra en azul el registro de la masa corporal un día antes (-1) y 1, 2, 7 y 9 días después de que se preñaron. En rojo se muestran el registro de masa corporal en ratonas no preñadas:



Gráfica 2. Aumento de la masa corporal con respecto al tiempo en ratonas preñadas y no preñadas

### 7.3. ESTANDARIZACIÓN DE CANTIDAD DE AZUL DE METILENO COMO UN MECANISMO DE PSEUDOINFECCIÓN

En el primer experimento se inocularon diferentes cantidades de azul de metileno, se sacrificaron y se realizaron observaciones macroscópicas a los órganos que tuvieran tonalidades azules debido al colorante, uno de los órganos que más interesaban, fue la unidad feto-placentaria (cuadro 3). Con la observación macroscópica se aseguró que existiera una correcta irrigación hacia los diferentes órganos de una ratona, por medio de la vena coccígea (figuras 7-14).

Cantidad (μL)	Tiempo (inoculación-eutanasia)	Órganos con presencia de azul de metileno	Presencia de azul de metileno en unidad feto-placentaria
200	5min	Boca, nariz	No
300	5min	Cara, hígado, ciego,	No
400	5min	Boca, lengua, nariz, ojos, patas, hígado, ciego, cola, intestinos, cerebro y unidad feto-placentaria	Sí

Cuadro 3. Observaciones macroscópicas en órganos con diferentes cantidades de azul de metileno a tiempo constante.



Figura 7. Observación macroscópica de ratona BALB/c. Dosis administrada 200 μl de azul de metileno, con presencia significativa en boca y nariz, sin presencia en órganos principales.



Figura 8. Observación macroscópica de ratona BALB/c. Dosis administrada 300  $\mu$ l de azul de metileno, presencia en ciego e hígado.

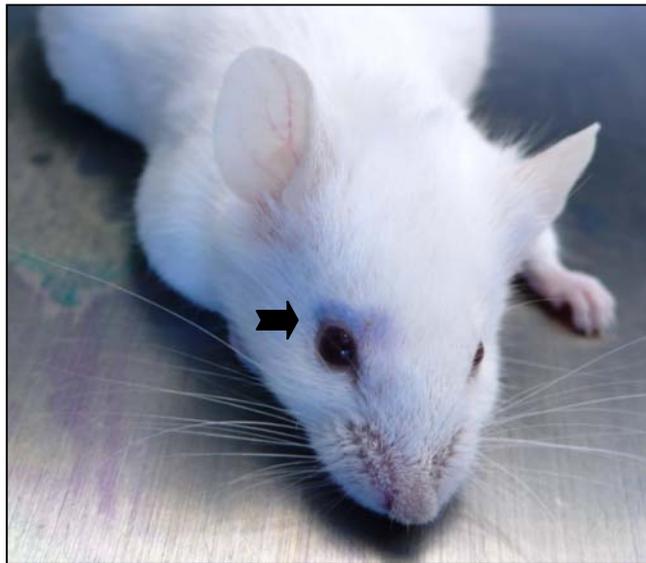


Figura 9. Observación macroscópica de ratona BALB/c. Dosis administrada 300  $\mu$ l de azul de metileno, presencia en cara.



Figura 10. Observación macroscópica de ratona BALB/c. Dosis administrada 400  $\mu$ l de azul de metileno, en órganos principales.

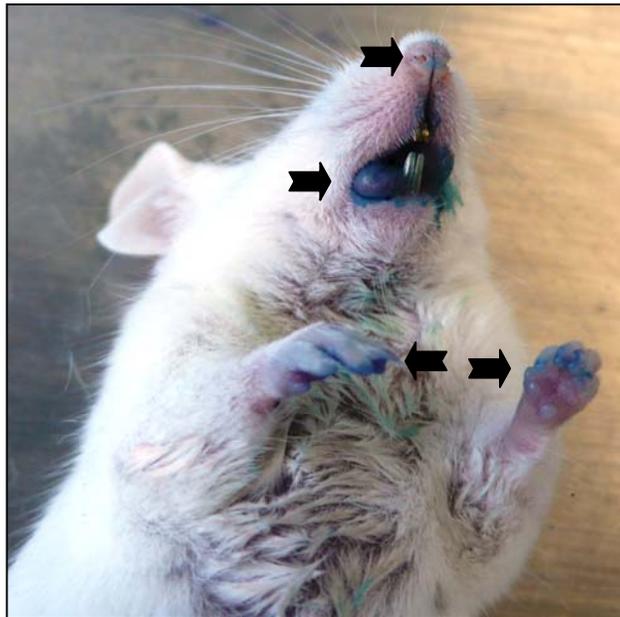


Figura 11. Observación macroscópica de ratona BALB/c. Dosis administrada 400  $\mu$ l de azul de metileno, presencia en boca, lengua, nariz y patas.

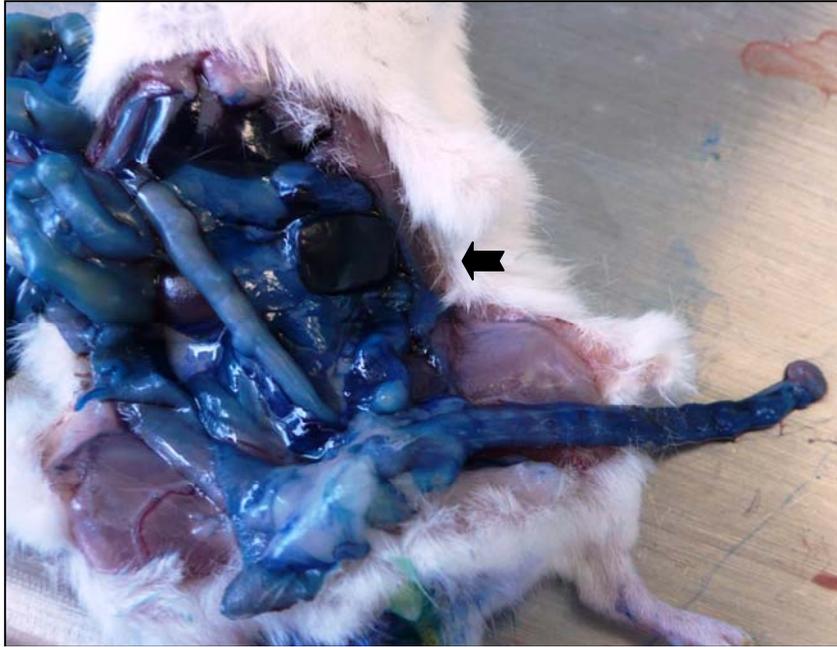


Figura 12. Observación macroscópica de ratona BALB/c. Dosis administrada 400  $\mu$ l de azul de metileno, presencia en unidad feto-placentaria.



Figura 13. Observación macroscópica de ratona BALB/c. Dosis administrada 400  $\mu$ l de azul de metileno, presencia en cerebro.



Figura 14. Observación macroscópica de ratona BALB/c. Dosis administrada 400  $\mu$ l de azul de metileno, presencia en cola.

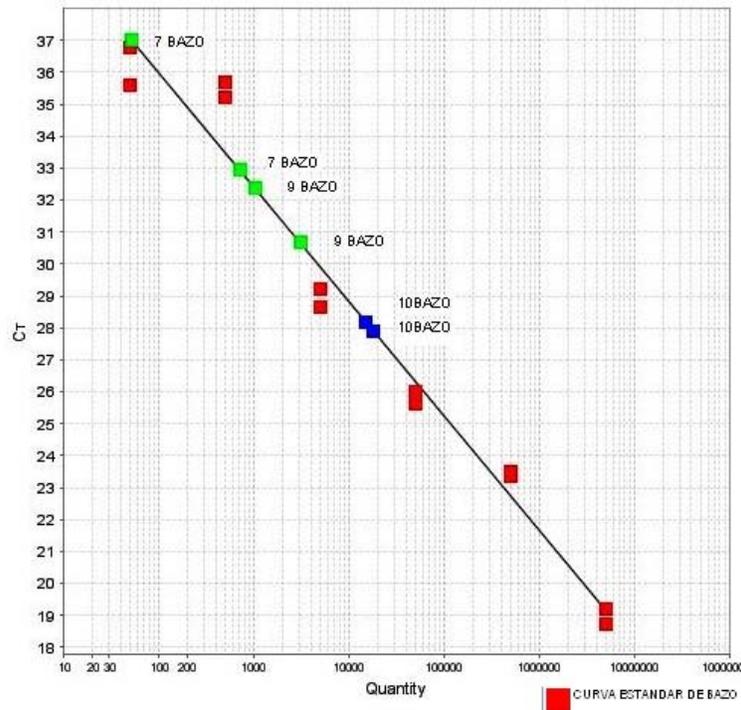
Se llevó a cabo un segundo experimento en donde se utilizó la dosis de 400  $\mu$ L de azul de metileno, debido a que en el primer experimento fue la dosis donde se observó teñida la unidad feto-placentaria con el colorante; posteriormente, se inoculó el colorante a las ratonas BALB/c preñadas en los diferentes tercios de la gestación. En el cuadro 4 se muestran los resultados obtenidos.

Jaula	Eutanasia (Post-gestación)	Órganos con presencia de azul de metileno	Presencia de azul de metileno en unidad feto-placentaria
A	7 días	Boca, lengua, nariz, ojos, patas, hígado, ciego, unidad feto-placentaria	Sí
B	14 días	Boca, lengua, nariz, ojos, patas, hígado, ciego, unidad feto-placentaria	Sí
C	19 días	Boca, lengua, nariz, ojos, patas, hígado, ciego, unidad feto-placentaria	Sí

Cuadro 4. Inoculación de 400  $\mu$ L de azul de metileno en tiempos diferentes de la gestación y sus observaciones macroscópicas.

#### 7.4. ESTANDARIZACIÓN DE LA DOSIS INFECTIVA CON TAQUIZOITOS DE LA CEPA ME49 EN RATONES BALB/c NO GESTANTES.

Obteniendo la vía de administración para el modelo, por la irrigación y su presencia en la unidad feto-placentaria. Se realizó la inoculación con diferentes cantidades de taquizoitos por vía sanguínea en ratonas no gestantes, se sacrificaron a las 48 h, se les extrajeron los bazos, se realizaron PCRq. La gráfica 3 muestra en el eje de las abscisas, la cuantificación de taquizoitos y en el eje de las ordenas, el número de ciclos (Ct). Se muestra en color rojo la curva estándar de bazo, en color verde y azul, las muestras positivas obtenidas. Las muestras con mayor carga parasitaria inoculada experimentalmente resultaron positivas (9 y 10 bazo). Los valores obtenidos se encuentran en el cuadro 5.



Gráfica 3. Representación gráfica de PCRq con el gen B1 para la detección de *T. gondii* en bazo.

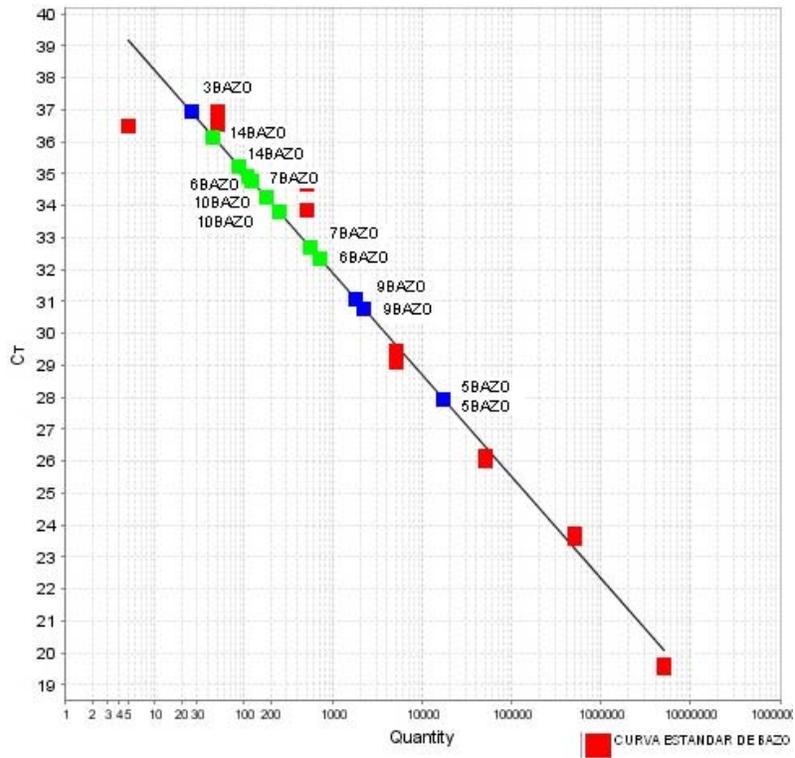
Nº DE LA RATONA	CANTIDAD DE TAQUIZOITOS INOCULADOS	MUESTRA	RESULTADO POR	Ct	CUANTIFICACIÓN
			DUPLICADO		
1	0	1 BAZO	NEGATIVO		
			NEGATIVO		
2	0	2 BAZO	NEGATIVO		
			NEGATIVO		
3	2,500	3 BAZO	NEGATIVO		
			NEGATIVO		
4	2,500	4 BAZO	NEGATIVO		
			NEGATIVO		
5	25,000	5 BAZO	NEGATIVO		
			NEGATIVO		
6	25,000	6 BAZO	NEGATIVO		
			NEGATIVO		
7	250,000	7 BAZO	POSITIVO	32.9	712.5
			POSITIVO	37.0	51.6
8	250,000	8 BAZO	NEGATIVO		
			NEGATIVO		
9	2,500,000	9 BAZO	POSITIVO	32.4	1026.1
			POSITIVO	30.7	3083.2
10	2,500,000	10 BAZO	POSITIVO	28.2	15089.0
			POSITIVO	27.9	18254.5

Cuadro 5. Resultados de PCRq con el gen B1 para la detección de *T. gondii* en bazo.

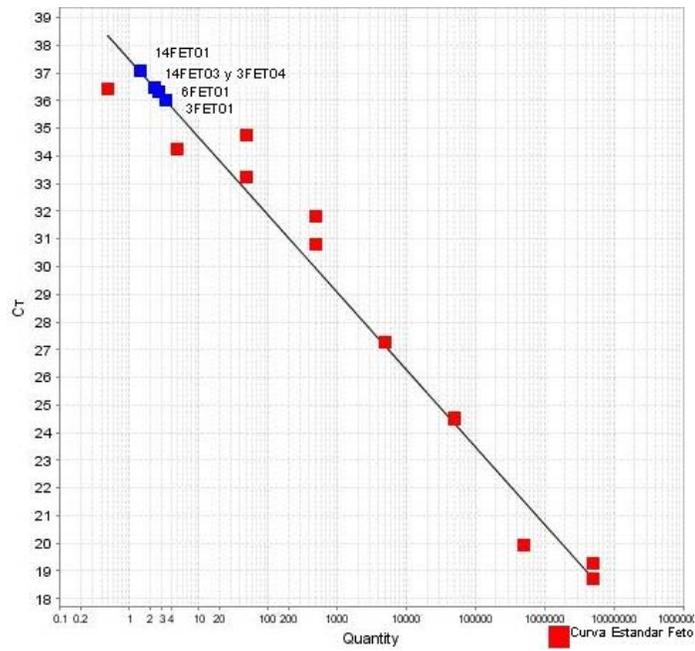
## **7.5. ESTANDARIZACIÓN DE LA DOSIS INFECTIVA CON TAQUIZOITOS DE LA CEPA ME49 EN RATONES BALB/c GESTANTES**

Después de obtener resultados positivos por PCRq en la estandarización de la dosis infectiva con taquizoitos de la cepa ME49 en ratones BALB/c no gestantes, se realizó un segundo experimento con ratonas gestantes y con diferentes dosis de taquizoitos, utilizando como dosis inicial, la dosis mayor del experimento anterior; posteriormente, las ratonas gestantes se sacrificaron a las 48 h y se les extrajo el bazo, así como los fetos, según la metodología descrita anteriormente; todas las muestras se analizaron por PCRq.

La gráfica 4 y 5 muestra en el eje de las abscisas la cuantificación de taquizoitos y en el eje de las ordenadas, el número de ciclos (Ct). Se muestra en color rojo la curva estándar de bazo y de feto respectivamente, en color verde y azul las muestras positivas obtenidas en la placa de PCRq.

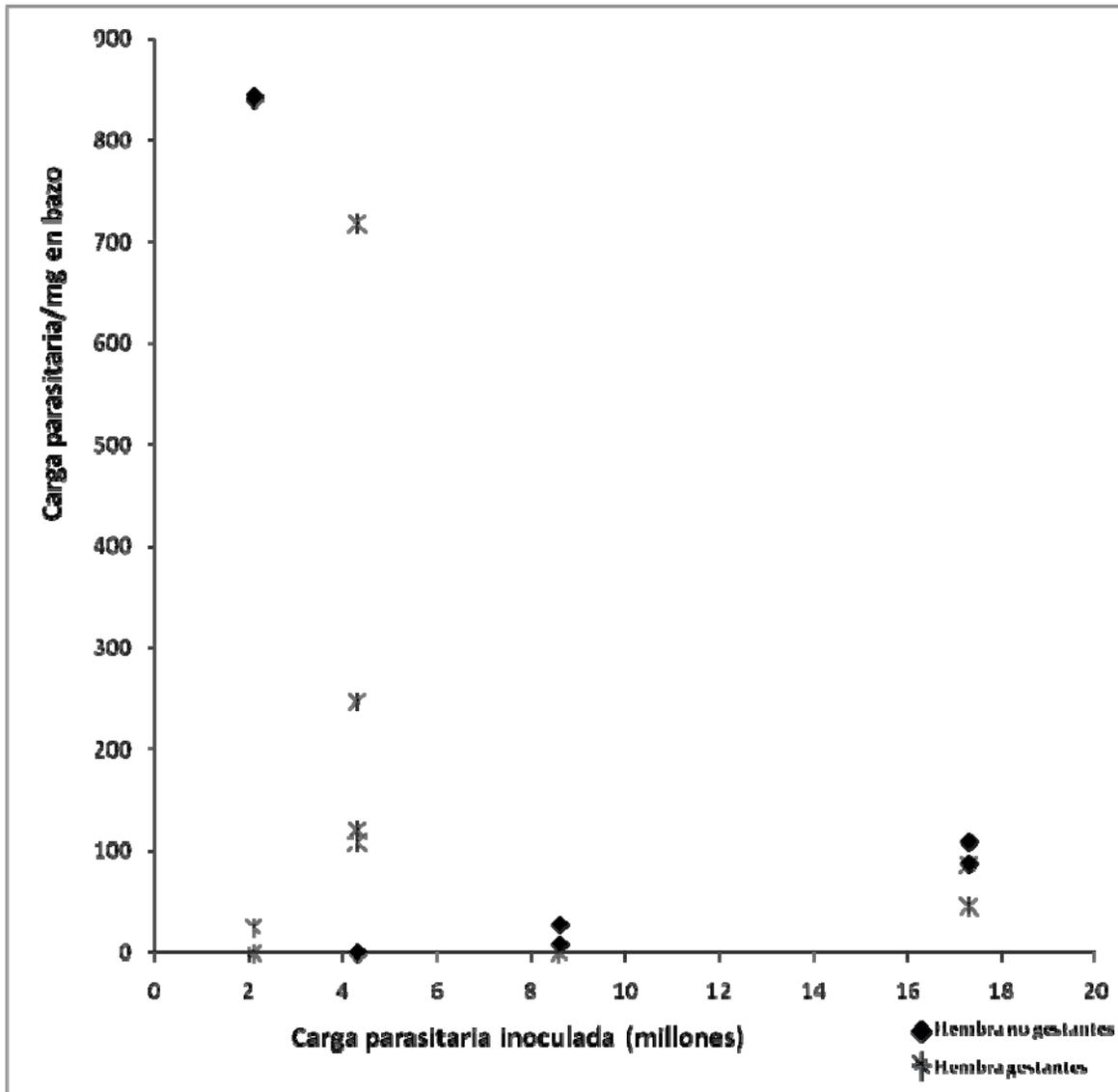


Gráfica 4. Representación gráfica de PCRq en tiempo real con el gen B1 para la detección de *T. gondii* en bazo de ratonas BALB/c gestantes y no gestantes.



Gráfica 5. Representación gráfica de PCRq en tiempo real con el gen B1 para la detección de *T. gondii* en fetos

En el experimento hubo ratonas gestantes y otras que no se gestaron (estando en el grupo de las gestantes), en ambos casos se extrajeron los bazo de cada ratona, y se les cuantificó la carga parasitaria (gráfica y cuadro 6). Las ratonas no gestantes, infectadas con la misma dosis, presentaron un aumento en la carga parasitaria con respecto a las ratonas gestantes.



Gráfica 6. Comparación de la carga parasitaria en hembras gestantes y no gestantes.

Nº DE LA RATONA	CANTIDAD DE TAQUIZOITOS INOCULADOS	PREÑADA	Nº DE CRÍAS	MUESTRAS	ENSAYO 1			ENSAYO 2		
					RESULTADO POR DUPLICADO	Ct	CUANTIFICACIÓN	RESULTADO POR DUPLICADO	Ct	CUANTIFICACIÓN
1	0	NO	0	1BAZO	NEGATIVO			NEGATIVO		
					NEGATIVO			NEGATIVO		
3	2,100,000	SI	8	3FETO1	NEGATIVO			NEGATIVO		
					POSITIVO	36.0	3.5	NEGATIVO		
				3FETO4	POSITIVO	36.5	2.3	NEGATIVO		
					NEGATIVO			NEGATIVO		
				3BAZO	POSITIVO	36.9	25.6	POSITIVO	34.9	11.3
					NEGATIVO			POSITIVO	33.4	40.7
5	2,100,000	NO	0	5BAZO	POSITIVO	28.0	16791.8	POSITIVO	25.7	24223.8
					POSITIVO	28.0	16872.4	POSITIVO	25.7	23915.0
6	4,300,000	SI	6	6FETO1	NEGATIVO			NEGATIVO		
					POSITIVO	36.3	2.6	NEGATIVO		
				6FETO3	NEGATIVO			NEGATIVO		
					NEGATIVO			NEGATIVO		
				6BAZO	POSITIVO	32.3	717.7	POSITIVO	30.5	447.0
					POSITIVO	34.9	108.7	NEGATIVO		
10	4,300,000	SI	10	10FETO 1 y 5	NEGATIVO			NEGATIVO		
					NEGATIVO			NEGATIVO		
				10BAZO	POSITIVO	33.8	247.3	POSITIVO	38.9	0.4
					POSITIVO	34.8	121.1	POSITIVO	37.0	1.9
7	8,600,000	NO	0	7BAZO	POSITIVO	34.3	175.1	POSITIVO	36.0	4.6
					POSITIVO	32.7	554.4	POSITIVO	31.0	288.8
11	8,600,000	SI	11	11FETO1	NEGATIVO			NEGATIVO		
					NEGATIVO			NEGATIVO		
				11FETO4	NEGATIVO			NEGATIVO		
					NEGATIVO			NEGATIVO		
11BAZO	NEGATIVO			NEGATIVO						
	NEGATIVO			NEGATIVO						
9	17,300,000	NO	0	9BAZO	POSITIVO	30.8	2183.9	POSITIVO	28.5	2386.1
					POSITIVO	31.1	1751.8	POSITIVO	27.9	3728.2
14	17,300,000	SI	9	14FETO1	POSITIVO	37.1	1.5	NEGATIVO		
					NEGATIVO			NEGATIVO		
				14FETO3	NEGATIVO			NEGATIVO		
					POSITIVO	36.5	2.3	NEGATIVO		
				14BAZO	POSITIVO	35.2	86.7	POSITIVO	30.3	511.2
					POSITIVO	36.1	45.6	POSITIVO	32.7	72.1

Cuadro 6. Resultados de PCRq en tiempo real con el gen B1 para la detección de *T. gondii* en bazo de ratonas gestantes y sus fetos.

Por otra parte, al momento de extraer los órganos se observaron macroscópicamente signos de daño ocasionado por el parásito; en las ratonas gestantes se observó una esplenomegalia, así como una pigmentación no común en el hígado (flechas blancas); en el feto, se observaron reabsorciones en las dosis experimental de 2,100,000, y 8,600,000 taquizoitos (figura 15).

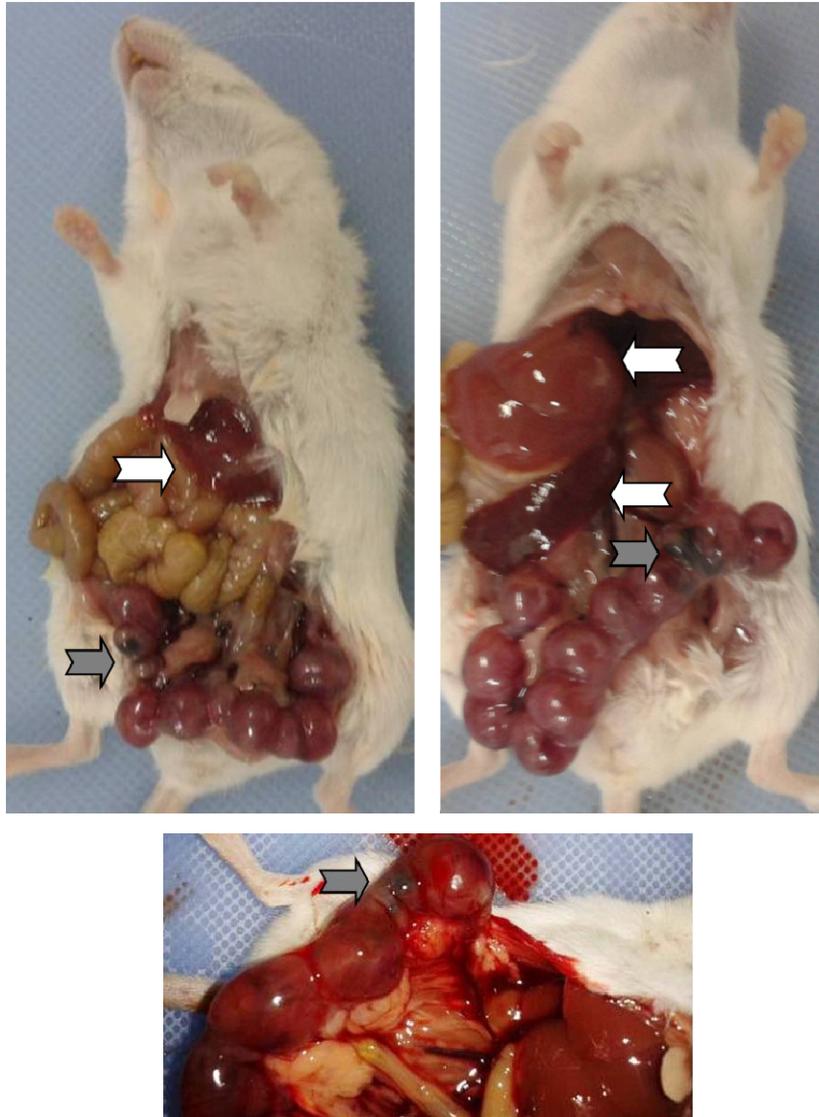


Figura 15. Bazo e hígado de ratonas gestantes infectadas con *T. gondii* (flechas blancas) y feto de ratona BALB/c preñada de 12 días de gestación con reabsorciones (flechas grises). Izquierda superior: ratona N° 3 inoculada con 2,100,000 taquizoitos. Derecha superior: ratona N° 11 inoculada con 8,600,000 taquizoitos. Inferior central: ratona N° 11 inoculada con 8,600,000 (acercamiento).

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente proyecto se llevaron a cabo estandarizaciones para desarrollar un modelo, en ratón, de toxoplasmosis congénita que simulara los cambios en la transmisión y el daño fetal en los seres humanos, las cuales servirán posteriormente para la finalización del modelo.

La colaboración en la revisión sistemática dio como resultados, la elección de diversas variables como fueron la elección del hospedero y su cepa; por parte del parásito, la elección de la cepa, su estadio y la vía de inoculación, esto fue muy importante, ya que de esta manera se realizó más rápido el inicio de la parte experimental de la tesis, utilizando estas variables independientes.

En el presente trabajo solo se abordó un tercio de la gestación (segundo) en lugar de los tres, se eligió empezar por el segundo tercio de la gestación debido a la factibilidad de encontrar transmisión vertical y daño embrionario al mismo tiempo (50 por ciento para ambas, ver gráfica 1 que describe Correa et al., 2007<sup>15</sup>). Desde este tercio se puede iniciar los otros dos tercios de la gestación.

Se realizaron dos tinciones (Papanicolaou y tinción hematoxilina-eosina) de los frotis vaginales para decidir cuál de ellas diagnosticará mejor la etapa del ciclo estral. Se optó por utilizar, la tinción hematoxilina-eosina, ya que es la técnica menos costosa, más rápida y sencilla.

Cuando se aparearon los ratones se colocaron ratonas que solamente estuvieran en la etapa del ciclo estral proestro, proestro-estro y estro; se observó que en la etapa de proestro se obtuvieron más ratonas gestantes, mientras que cuando se colocaban en estro o proestro-estro el número fue menor. Por lo que se recomienda utilizar la fase del ciclo estral del proestro.

Según la metodología descrita por Abou-bacar et al., 2004<sup>32</sup> y Robert y Alexander, 1992<sup>21</sup>, se debe introducir al macho por un día en la jaula de las hembras y así obtener hembras gestantes; sin embargo, se obtuvieron mejores resultados (50 por ciento vs 90 por ciento de ratonas gestantes) si las

manteníamos por un día más; por lo anterior sugerimos se dejaran dos días el macho con la hembras en lugar de uno.

Para asegurar que las ratonas estuvieran gestantes (después del apareamiento), se realizó un registro de su masa corporal y de determinar, por el incremento del peso, la gestación<sup>23</sup>. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede asegurar que una ratona esté gestante a los 7 días pos-apareamiento cuando hay un incremento de 4 gramos.

Existen otras técnicas en la literatura para poder detectar y asegurar la mayor cantidad de ratonas gestantes e incluirlas en los experimentos posteriores; A) citología vaginal del ciclo estral descrito en Allen 1922<sup>35</sup>, en donde se realizan exudados vaginales post-apareamiento cada 2-3 días; tres muestras de exudado consecutivos con un predominio de leucocitos serán tomadas como una indicación de preñez; B) observación de dilatación abdominal, se inspeccionan ratonas de 12 días de gestación descrito en Freyre et al 2006<sup>23</sup>; C) palpación abdominal, ultrasonido y ELISA descrita en la tesis doctoral de Pallarés-García<sup>36</sup>. Cabe resaltar que cada una de las técnicas mencionadas presentan ciertos inconvenientes como: capacitación mayor, altos costos de los equipos utilizados, y para el ELISA una técnica invasiva para el animal.

Se estandarizó el azul de metileno para poder observar macroscópicamente la irrigación hacia los diferentes órganos blanco de una ratona. Se les administró: 200 µL, 300 µL y 400 µL de azul de metileno para que fuera una dosis no letal y visible macroscópicamente<sup>26 y 27</sup>. Con lo realizado experimentalmente, se obtuvo el adiestramiento para la inoculación de los parásitos por vena coccígea; al principio se inoculó con una aguja de insulina, pero esta no permitió la administración de todo el colorante, por lo que se aumentó el calibre de la aguja a una de 21G\*1 ¼.

En la estandarización de la dosis infectiva con taquizoitos de la cepa ME49 en ratonas BALB/c no gestantes y gestantes, se extrajo el bazo según Khan et al., 1996<sup>34</sup>, debido a que en este órgano, se observa una respuesta inmunológica exacerbada durante la infección por *T. gondii*, tanto en ratones como en otras

especies infectadas de manera natural<sup>37</sup>. Asimismo, se corroboró en este trabajo que el bazo es un órgano que se puede utilizar como un marcador importante para detectar *T. gondii*.

En la estandarización de la dosis infectiva con taquizoitos de la cepa ME49 en ratones BALB/c no gestantes, se realizó este experimento para saber que dosis inoculada con taquizoitos infectaría a la madre. En la literatura consultada<sup>38 y 39</sup> existe una gran discrepancia ya que reportan, una dosis que va desde 30-10,000 taquizoitos, utilizando una cepa virulenta (RH) y una vía de administración intraperitoneal; por lo cual no nos fue útil estos datos y por ello se decidió utilizar un rango de dosis de 2,500-2,500,000 en múltiplos de 100 infectados de manera intravenosa. Sólo en la dosis más alta infectó al bazo de la ratona, probablemente fueron eliminados de inmediato por la inmunidad innata después de la inoculación de los parásitos y no llegaron a tejidos periféricos<sup>40</sup>. La literatura describe que *T. gondii* circulan en sangre sólo por 1 h después de la infección; posteriormente, los parásitos sólo existen intracelularmente infectando leucocitos según Chinchilla et al., 1993<sup>41</sup>, Guerrero et al., 1997<sup>42</sup> y Courret et al., 2006<sup>43</sup>.

En la estandarización de la dosis infectiva con taquizoitos de la cepa ME49 en ratones BALB/c gestantes; lo relevante del experimento fue haber encontrado resultados positivos (o dudosos o no infectado) por PCRq en fetos, lo cual indica -bajo las condiciones establecidas- que existe un paso trasplacentario de taquizoitos de la cepa ME49 tipo II administrados por vía sanguínea. Se sugiere que para los próximos experimentos donde se utilice PCRq, se realice por triplicado como en el presente trabajo, de esta manera se podrá discernir, si es positivo o negativo. El equipo de PCRq que se utilizó tiene exactitud para detectar el ADN de un taquizoito. No obstante, la cantidad de dicho DNA puede ser tan pequeña, al grado que no lo detecte, o en su defecto detectar falsos positivos.

Las cargas parasitarias de ratonas gestantes fueron menores a las no gestantes. Aparentemente debido a su estado de preñez, no importando la cantidad inoculada de taquizoitos; siempre se mantuvo constante este aumento. Lo anterior nunca ha sido documentado.

Al momento de extraer los órganos de las ratonas gestantes, se identificó algunos signos de daño tanto en las madres como en las crías. En las primeras se encontró esplenomegalia y pigmentaciones en el hígado<sup>37</sup>; en los fetos, se encontró reabsorciones o menor tamaño y aspecto necrótico, hemorrágico, en comparación con los normales. Esto hace suponer que la presencia de *T. gondii* pudo haber causado tales cosas. Asimismo, concuerda con lo descrito por GE et al., 2008<sup>39</sup>; posiblemente, la infección pudo alterar el equilibrio entre la madre y el feto lo que trajo por consecuencia, la pérdida o daño del feto.

## 9. CONCLUSIONES

- ❖ Se desarrolló parcialmente el modelo de toxoplasmosis congénita en ratón que simule los cambios en la transmisión.
  - Se determinó el uso del ratón como hospedero para el modelo y la cepa ME49 en el estadio de taquizoito, para la infección, infectado de manera intravenosa.
  - Se optó por utilizar la prueba de tinción de la hematoxilina eosina para los frotis vaginales.
  - Las ratonas apareadas con el ciclo estral del proestro presentaron mayor probabilidad de gestación.
  - Un aumento en la masa de la ratona mayor a 4 g en 7 días, presenta mayor probabilidad de gestación.
  - La dosis mínima para lograr una infección en ratonas preñadas es de 2.5 millones de taquizoitos.
- ❖ No fue posible desarrollar la estandarización para determinar el daño de los fetos en los distintos tercios de la gestación.

## **10.PERSPECTIVAS**

- ❖ Se sugiere un próximo experimento a realizar que considere la estandarización de la dosis infectiva con taquizoitos de la cepa ME49 en ratones BALB/c gestantes con tiempo inoculación-eutanasia 48 h y 96 h, para aumentar la probabilidad de que los taquizoitos se repliquen en las células parasitadas dentro de la unidad feto-placentaria.
  
- ❖ Realizar la estandarización del 1<sup>er</sup> y 3<sup>o</sup> tercio de la gestación.
  
- ❖ Realizar la estandarización para determinar el daño de los fetos en los distintos tercios de la gestación.

## 11. APENDICE

### SOLUCIONES Y REACTIVOS UTILIZADOS

**ALBUMINA 1 por ciento:** Se pesan 0.2 g de albúmina y se le agregó PBS-Tween 0.05 por ciento hasta obtener 20 mL.

**AMORTIGUADOR DE CARBONATOS 0.15 M pH 9.6:** Pesar 1.59 g de carbonato de sodio y 1.26 g de bicarbonato de sodio, disolver los carbonatos en 800 mL de agua bidestilada, ajustar a pH 9.6 y aforar a 1000 mL mantener a 4° C.

**ANTÍGENO TOTAL DE *T. gondii* 2 mg/mL:** Medir 10 µL de antígeno total de *T. gondii* y se colocan con 10 mL de amortiguador de carbonatos.

**CONJUGADO DILUCIÓN 1:5000:** Medir 1 µL de Anti IgG de ratón y se agrega 5000 µL de PBS-Tween

**CROMÓGENO PARA UNA PLACA:** Medir 5 mL de ácido cítrico 0.1 M, 5 mL de citrato de sodio 0.1 M, 5 µL de peróxido y media tableta de OPD (OrtoFenilDiamina). Homogenizar. La preparación del cromógeno debe ser al momento y no se puede guardar.

**DILUCIÓN PARA EL CONTEO DE TAQUIZOITOS DE LA CEPA ME49:** Medir 10 µL de azul tripan mezclar con 90 µL de PBS. Homogeniza; de esta dilución se toman 90 µL y se mezclan con 10 µL del lavado peritoneal. Homogeniza.

**DILUCIÓN PARA IgG 1:250:** Medir 1000 µL de PBS-tween y se agregó 4 µL de suero, se mezcló. Esto se realiza para cada muestra por separado.

**PARAFORMALDEHIDO:** Medir 40 g de paraformaldehído, disolver en 50 mL de agua, calentar 50-60° C y agitar, agregar NaOH para aclarar la disolución, enfriar, disolver con 500 mL de PBS y ajustar a pH 7.4.

**PB 10x:** Medir 2.62 g de fosfato de sodio monobásico monohidratado y 11.5 g de fosfato de sodio dibásico anhídrido disolver en 200 mL de agua bidestilada (calentar un poco hasta disolver cristales) y aforar a 1000 mL con agua bidestilada.

**PBS (SOLUCIÓN SALINA DE FOSFATOS) 0.001 M NaCl 0.15 M pH 7.2:** Medir 800 mL de agua destilada agregar 100 mL de PB 10x y 8.75 g de NaCl disolver las sales y ajustar a pH 7.2 aforar a 1000 mL con agua bidestilada guardar a 4° C.

**PBS-TWEEN 0.05 POR CIENTO:** A un litro de PBS pH 7.2, se le añade 500 µL de Tween 20.

**PENTOBARBITAL  $6.3 \times 10^{-3}$  g/mL:** Medir 1 mL de pentobarbital 6.3 g/mL (fórmula comercial) y se diluye con solución salina isotónica hasta llegar a un volumen total de 10 mL.

**PROTEINASA K SIGMA® 20 µL/mL:** Medir 100 µL de Proteinasa K SIGMA®, ajustar hasta 5 mL con agua inyectable.

**PURE gene™ SOLUCIÓN DE HIDRATACIÓN DE ADN:** Tris [hydroximetil], aminometano y etilen diamina tetra ácido acético.

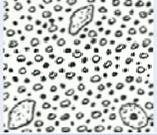
**PURE gene™ SOLUCIÓN DE PRECIPITACIÓN DE PROTEINAS:** Acetato de amonio.

**PURE gene™ SOLUCIÓN DE LISIS CELULAR:** Tris [hydroximetil] aminometano, etilen diamina tetra ácido acético y dodecil sulfato de sodio.

## 12. ANEXOS

### 12.1. ANEXO 1. CICLO ESTRAL EN EL RATÓN

La pared vaginal presenta cambios cíclicos que corresponden con los cambios del ciclo del endometrio. Estos cambios se hallan bajo la influencia de las hormonas ováricas. Las fases del ciclo estral pueden identificarse a través de las células descamadas obtenidas de la vagina (Cuadro 7 y 8)<sup>28</sup>.

FASE DEL CICLO	GENITALES EXTERNOS	DESCRIPCIÓN	CUADRO HISTOLÓGICO	COMPORTAMIENTO	DURACIÓN (HORAS)
ESTRO	Labios hinchados/Vagina seca	Gran cantidad de células epiteliales queratinizadas (placas o escamas cornificadas sin núcleo visible) y muy pocas células nucleadas		Aceptación del macho/Cópula/Lordosis	12
METAESTRO	Labios ligeramente hinchados/Masa caseinosa en la vagina	Gran cantidad de leucocitos y pocas células epiteliales		No hay aceptación del macho	21
DIESTRO	Labios normales/Mucosa vaginal (húmeda)	Gran cantidad de leucocitos muy pocas células queratinizadas y algunas veces células nucleadas		No hay aceptación del macho/Ovulación	65
PROESTRO	Labios ligeramente hinchados/Vagina seca	Gran cantidad de células epiteliales nucleadas y pocos leucocitos		Puede ocurrir la aceptación del macho	12

Cuadro 7. Tipos celulares del ciclo estral del ratón (frotis vaginal)

Ciclo	CARACTERÍSTICAS
Estro	80% células cornificadas
Metaestro	50% células cornificado-50% leucocitos
Proestro-estro	50% células cornificadas-50% células nucleadas
Estro-metaestro	70% células cornificadas-30% leucocitos
Diestro	80%-100% leucocitos
Diestro-proestro	50% leucocitos-50% células nucleadas

Cuadro 8. Características del ciclo estral en ratón.

## 12.2. ANEXO 2. SIMILITUDES ENTRE LA PLACENTA HUMANA, MARSUPIAL Y RATÓN

	<b>MARSUPIALES</b>	<b>ROEDORES</b>	<b>HUMANO</b>
Tipo de placenta	Metatheria: Tienen un corto desarrollo en el útero materno y completar gran parte del crecimiento en el interior de la bolsa marsupial.	Eutheria: Se caracterizan porque las crías son retenidas en el útero materno durante largo tiempo donde son alimentadas por una placenta alantoica.	Eutheria: Se caracterizan porque las crías son retenidas en el útero materno durante largo tiempo donde son alimentadas por una placenta alantoica.
IGF2 (factor de crecimiento)	Presencia	Presencia	Presencia
Insulina (factor de crecimiento)	Presencia	Ausencia	Presencia
Intercambio alimentación entre embrión y madre	Ausencia (no posee una placenta verdadera).	Placentaria: Las vellosidades del corión se bañan en las lagunas de sangre materna, asegurando así todos los intercambios.	Placentaria: Las vellosidades del corión se bañan en las lagunas de sangre materna, asegurando así todos los intercambios.
Hematopoyesis	Se desconoce	Se lleva a cabo en el saco vitelino.	Se lleva a cabo en el saco vitelino.
Función de alantoides con respecto a los residuos nitrogenados	los residuos nitrogenados que se depositen en el saco alantoideo no son transferidos a la circulación materna permanecen en el saco alantoideo.	los residuos nitrogenados que se depositen en el saco alantoideo son transferidos a la circulación materna para su posterior desecho.	los residuos nitrogenados que se depositen en el saco alantoideo son transferidos a la circulación materna para su posterior desecho.
Paso por regulación glucogénica	No posee una placenta verdadera.	La placenta almacena glucógeno.	La placenta almacena glucógeno.
Relación entre el embrión y el saco vitelino	Se desconoce.	El embrión está completamente envuelto por el saco vitelino.	El embrión está completamente envuelto por el saco vitelino.
Comportamiento del trofoblasto	No posee una placenta verdadera.	Invade y destruye parcialmente el endometrio.	Invade y destruye parcialmente el endometrio.
Existe respuesta inmune en contra T. gondii.	Si	Si	Si

### **12.3. ANEXO 3. OBTENCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE TAQUIZOITOS DE LA CEPA ME49**

Se ocuparon muestras de tejido o sangre infectada por *T. gondii* de ratón, estos se maceraron con PBS (solución salina de fosfatos), después se inoculó peritonealmente 1 mL del macerado a un ratón C57BL/6 transcurridos seis días; se realizó un lavado peritoneal al ratón “STOCK” de parásitos, introduciendo 3 mL de PBS en condiciones estériles. Se introduce una aguja 21G x 1¼” recolectándose el lavado peritoneal en un tubo. La última gota de la recolección del lavado peritoneal se colocó en un portaobjetos y se observó al microscopio para asegurar la presencia de taquizoitos.

Para realizar el conteo de taquizoitos; Se tomaron 10 µL de la dilución para el conteo de taquizoitos de la cepa ME49, colocándose en una cámara de Neubauer, se realizó el conteo al microscopio. El número total de taquizoitos obtenidos en el conteo en la cámara de Neubauer, se multiplica por 2500, y por el volumen obtenido del lavado peritoneal (este valor es variable en cada lavado); así se obtiene el total de taquizoitos en el lavado peritoneal.

### **12.4. ANEXO 4. PRUEBA SEROLÓGICA (ELISA)**

A todas las ratonas BALB/c se les realizó una prueba serológica para asegurar que no estuvieran infectadas con *T. gondii* y se incluyeran dentro del experimento.

#### **FORRADO DE PLACA CON ANTÍGENO TOTAL DE *T. gondii*.**

Se utilizó una placa para ELISA de 96 pozos. La placa se revisó que no estuviera rayada o rota a contra luz. Se lavó con agua destilada.

Se agregaron 100 µL de amortiguador de carbonatos a los pozos marcados como blancos (B); Se agregaron 100 µL de antígeno total de *T. gondii* (2 mg/mL) a los pozos marcados como controles negativos (C-); y a los pozos marcados como control positivo directo (C+D) se le agregó 100 µL, de una solución de 1 µL de control positivo directo /100 µL de amortiguador de carbonatos.

Se incubó por 24 h a 7° C para que el antígeno total de *T. gondii* quedara adherido completamente.

#### **BLOQUEO CON ALBUMINA 1 por ciento**

Se lavó la placa agregándole 300 µL de PBS-Tween a cada pozo se hacen 4 cambios, y por último se hace un cambio con PBS pH 7.2. Siempre que se lavaba una placa se realizó de la manera anteriormente mencionada. Se colocaron 200 µL de albúmina 1 por ciento por pozo, se incubó por 30 min a 37° C, transcurrido el tiempo se lavó la placa.

#### **ADICIÓN DE MUESTRAS**

Las muestras sanguíneas de los ratones se centrifugaron 3500 rpm/ 7 min. Se separó el suero y se diluyó de la siguiente manera: se lavó la placa. Se colocaron 100 µL de IgG diluido 1:250 por pozo. Esto se realizó para cada muestra por separado.

#### **CONJUGADO**

Se lavó la placa. Se agregó 100 µL por pozo, del conjugado en una dilución 1:1000. Se incubó por dos horas a 37° C.

#### **CROMÓGENO**

Se lavó la placa. Se agregó 100 µL / pozo del cromógeno. Se observó la placa hasta que la reacción a simple vista este coloreada, se le agregó 50 µL/pozo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 N para detener la reacción.

#### **LECTURA**

Los valores de absorbancia de la placa se obtuvieron mediante un lector de ELISA (Turner Biosystems 9300-010) a una longitud de onda de 490 nm capturados a través del programa Modulus™ Microplate Reader.

### **12.5. ANEXO 5. PCR TIEMPO REAL (CUANTITATIVO)**

#### **CURVA ESTANDAR DE TAQUIZOITOS ME49 EN TEJIDO FETAL BALB/c**

Se homogenizaron los fetos con un embolo, se pesaron 20 mg de cada feto, se colocaron en tubos eppendorf de 1 mL, se numeraron del 0-7. Se les adicionó una cantidad de taquizoitos conocida (cuadro 9).

Nº de tubo	Taquizoitos
0	0
1	$5 \times 10^6$
2	$5 \times 10^5$
3	$5 \times 10^4$
4	$5 \times 10^3$
5	$5 \times 10^2$
6	$5 \times 10^1$
7	$5 \times 10^0$

Cuadro 9. Cantidad de taquizoitos ME49 para curva estándar en tejido fetal

Se realizó la extracción de DNA agregándole inmediatamente 1 mL de solución de lisis celular a las muestras siguiendo con el procedimiento descrito.

#### **EXTRACCIÓN DE ADN**

Se homogenizó el tejido con un embolo, se pesaron 20 mg de cada tejido, inmediato se agregó 1 mL de PURE gene™ solución de lisis celular, se incubó por una hora a 65° C, se adicionó 10 µL de solución de Proteinasa K SIGMA® a una concentración de 20 µL/mL, se incubó a 55° C 24 h. Transcurrido las 24 h se pasaron a tubos Falcón de 15 mL, se colocaron 5 min a -4° C, se adicionó 1 mL de PURE gene™ solución de precipitado de proteínas y se homogenizó en un Vortex, después se centrifugó a 3000 rpm por 5 min a 9° C.

El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo que contenía 2 mL de alcohol isopropílico 99.5 por ciento para biología molecular se invirtió el tubo de forma manual observándose las hebras de DNA, se centrifugó a 3000 rpm por 5 min a 9° C. Se decantó el sobrenadante y al botón de ADN se le adición 2 mL de etanol 70 por ciento, se centrifugó a 3000 rpm por 5 min a 9° C. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el botón colocando los tubos invertidos por 15 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se adicionó a cada tubo 100 µL de PURE gene™ solución de hidratación. Se cuantificó la concentración de cada muestra en un nanodrop a una longitud de onda 260 nm y 280 nm y se almacenó el ADN a -20° C.

#### **CUANTIFICACIÓN PARASITARIA POR PCR CUANTITATIVO EN TIEMPO REAL**

La infección por *T. gondii* fue confirmada por la amplificación de los genes B1 de *T. gondii* mediante la técnica de PCR en Tiempo Real.

Se utilizó un par de oligonucleótidos y una sonda TaqMan (Applied Biosystems) para la amplificación específica de un fragmento de 62 pb del gen B1 (cuadro 10). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ L, conteniendo la mezcla universal de reacción (Universal PCR Master Mix 1 $\times$ ), con una concentración de MgCl<sub>2</sub> de 5 mM, 0.90  $\mu$ M de ambos oligonucleótidos, 0.25  $\mu$ M de la sonda marcada y 2.5  $\mu$ l de la muestra de ADN ajustado a una concentración de 50ng/ $\mu$ L (ADN extraído de bazo y feto). Cada muestra se hizo por duplicado.

Para la eliminación de contaminantes se utilizó la enzima Uracil-N-glicosilasa UNG (AmpErase® UNG), la cual estuvo incluida en la mezcla universal de reacción.

Cada reacción se incubó inicialmente a 50° C durante 2 minutos (activación de la enzima UNG), seguido de 95° C por 10 minutos (inactivación de UNG y activación de la enzima AmpliTaq Gold Polimerasa), posteriormente la amplificación se desarrolló en 40 ciclos y cada ciclo estuvo conformado por una incubación de 95°C durante 15 segundos y 60° C por 1 minuto en un equipo Step One de 48 pozos (Applied Biosystems). En cada reacción se incluyó otro par de oligonucleótidos y una sonda TaqMan para la amplificación de un control interno (Exogenous Internal Positive Control), el cual nos permitió monitorear la reacción y detectar la presencia de inhibidores potenciales en las muestras analizadas que puedan inhibir la PCR. Cada corrida de PCR incluirá dos controles sin DNA (agua libre de nucleasas). La interpretación de los datos se analizó mediante el software Step One 2.0 (Applied Biosystems). Cada resultado se interpretó por el valor de Ct (número de ciclo en el cual la fluorescencia alcanza el umbral de detección) que será observado en una muestra positiva.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia	Posición	Tm
<b>Sentido</b> GENE_B1_TG-TX2F	5'CTAGTATCGTGC GGCAATGTG 3'	531-551	64°C
<b>Antisentido</b> GENE_B1_TG-TX2R	5'GGCAGCGTCTCTTCTCTTTT 3'	571-592	64°C
<b>Sonda</b> GENE_B1_TG-TX2M1	5'(6-FAM)-CCACCTCGCCTCTTGG-(NFQ-GB) 3'	552-567	54°C

Cuadro 10. Oligonucleótidos y sonda para el gen B1 de *T. gondii*

### 13. REFERENCIAS

1. Montoya, J.G., Liesenfeld O., Toxoplasmosis. Lancet. 2004. 363: 1965-1976.
2. Black M. W., Boothroyd J.C., Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2000; 64: 607-623.
3. Frenkel, J.K., Pathophysiology of toxoplasmosis. Parasitol. Today 1988. 4: 273-278.
4. Dubey, J.P., Lindsay, D.S., and Speer, C.A., Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin.Microbiol.Rev.* 1998. 11:267-299.
5. Kohler, S., Delwiche, C.F., Denny, P.W., Tilney, L.G., Webster, P., Wilson, R.J., Palmer, J.D., and Roos, D.S., A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. Science 1997. 275: 1485-1489.
6. Darde, M. L., Bouteille, B., Pestre-Alexandre, M., Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. J. Parasitol. 1992. 78:786-794.
7. Sibley, L.D. and Boothroyd, J.C., Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. Nature 1992. 359: 82-85
8. Khan, A., Fux, B., Su, C., Dubey, J.P., Darde, M.L., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., and Sibley, L.D., Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2007. 104: 14872-14877.
9. Correa D., Caballase UE, Cañedo SI, Rico TC. Toxoplasmosis. En: Flisser A., Pérez TR, editores. Aprendizaje de la parasitología basado en problemas. Editores de textos mexicanos. México, DF, 2006: 355-367.
10. Tizard IR. Veterinary Immunology an Introduction. 7º ed. EUA : Saunders Elsevier, 2004 : 145-153.
11. Galván-Ramírez ML, Mondragón-Flores R. Toxoplasmosis humana. Ediciones Cuellar. México. 2001; 196.
12. Mandujano-Martínez A. En: Memorias del Curso de Inmunología y Biología Molecular de parásitos. Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 2004.

13. Robert-Gangneux F. Contribution of new techniques for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Clin Lab*. 2001; 47: 135-141.
14. Correa D, Mandujano A, Medina Y, Medina E, Mata O, Carpio JC, Zavala A, Ruiz A, Gavilondo J, Ayala M, Vázquez J, Bell H, Dueñas M, Tamplin M. Manual de técnicas modernas en inmunología. Teoría y Práctica. México. INDRE. 2000; 95.
15. Correa D, Caballero-Ortega H, Rico-Torres CP, Cañedo-Solares I, Ortiz Alegría LB, Becerra-Torres E, Olmedo-Hernández M, Medina-Escutia ME, Murrieta S, Hernández-Islas JL. Immunobiology of congenital toxoplasmosis. In 17 Advances in the Immunobiology of Parasitic Diseases. Terrazas. Research Signpost, Kerala India. 2007; 199-224.
16. Ajzenberg, D., A.L. Bañuls, M. Tibayrenc, and M.L. Dardé. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int. J. Parasitol.* 2002; 32: 27-38.
17. Ajzenberg D, Bañuls AL, Su C, Dumetre A, Demar M, Carme B *et al.* Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*. 2004; 34(10): 1185-1196.
18. Hill DE., Chirukandoth S., Dubey JP. Biology and Epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Animal Health Research Reviews* 2005; 6(1): 41-61.
19. Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis of animals and a man. EUA: CRC Press, Inc, 1988.
20. Powell CC, Brewer M, Lappin MR. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentally infected lactating cats. *Veterinary Parasitology* 2001; 102 (1-2): 29-33.
21. Roberts CW, Alexander J. Studies on a murine model of congenital toxoplasmosis: vertical disease transmission only occurs in BALB/c mice infected for the first time during pregnancy. *Parasitology*. 1992; 104(Pt 1):19-23.
22. Fux B, Ferreira A, Cassali G, Tafuri WL, Vitor RW. Experimental toxoplasmosis in BALB/c mice. Prevention of vertical disease transmission

- by treatment and reproductive failure in chronic infection. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000; 95(1):121-126.
23. Freyre A., Falcón J., Méndez J., Rodríguez A., Correa L., González M., Refinement of the mouse model of congenital toxoplasmosis. Parasitology Experimental. 2006; 113 (5):154-160.
  24. Elsaid, M., Martins M., Frezard F., Braga E., Vitor R. Vertical toxoplasmosis in a murine model. Protection after immunization with antigens of *Toxoplasma gondii* incorporated into liposomes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2001. 96:99–104.
  25. Roberts C., Brewer J., Alexander J. Congenital toxoplasmosis in the BALB/c mouse: prevention of vertical disease transmission and fetal death by vaccination. Vaccine. 1994. 12:1389–1394.
  26. Fox J., Anderson L., Loen F., Fred W. Laboratory animal medicine. American College of Laboratory Animal Medicine. Academic press an Imprint of Elsevier Science. U.S.A. 2° ed. 1984; 35-52, 100.
  27. Holmes D. Clinical laboratory Animal Medicine an Introduction. The low a State University Press. U.S.A. 4° ed. 1990; 33-40.
  28. Arteaga-Silva M, Vargas-Villavicencio JA, Viguera-Villaseñor RM, Rodríguez-Dorantes M, Morales-Montor J. *Taenia crassiceps* infection disrupts estrous cycle and reproductive behavior in BALB/c female mice. Acta Trop. 2009; 109(2):141-145.
  29. Letscher-Bru V., Pfaff A., Abou-Bacar A., Filisetti D., Antoni E., Villard O., Klein J., Candolfi E., Vaccination with *Toxoplasma gondii* SAG-1 protein is protective against congenital toxoplasmosis in BALB/c mice but not in CBA/J mice. Infection and immunity, 2003; 71 (11): 6615–6619.
  30. Aguilar M., Coutiño B., Salinas P., Manual de técnicas histológicas y citológicas, México, Facultad de ciencias UNAM, 1996.
  31. Hernández Pichardo, E., Fernández Reyes, F. y Cortés Suárez S. Fundamentos teórico prácticos de la citología exfoliativa en medicina veterinaria. CBS, Manual 5. UAM Unidad Xochimilco.
  32. Abou-Bacar A, Pfaff AW, Georges S, Letscher-Bru V, Filisetti D, Villard O, Antoni E, Klein JP, Candolfi E. Role of NK cells and gamma interferon in

- transplacental passage of *Toxoplasma gondii* in a mouse model of primary infection. *Infect Immun.* 2004; 72(3):1397-1401.
33. Freyer C., Marilyn B. R. The mammalian yolk sac placenta. *J Exp Zool.* 2009; 312(6):545-554.
  34. Khan I., Matsuura T., Kaspar L. Activation-mediated CD4+ T cell unresponsiveness during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Int Immunol* 1996; 30(8): 887–896.
  35. Allen, E., 1922. The oestrus cycle in the mouse. *American Journal of Anatomy.* 30, 297–348.
  36. Pallarés-García María del Pilar. Valoración no invasiva de la gestión y la embriogénesis en ratón mediante técnicas de imagen ultrasonográfica. Tesis de doctorado en Ciencias, Universidad Complutense de Madrid, 2008.
  37. Cedillo-Peláez Carlos. Determinación de genotipos de *Toxoplasma gondii* en fauna silvestre en México. Tesis de maestría en Ciencias de la producción y de la salud animal, UNAM. 2009.
  38. Cabañas-Cortés MA, Reyes-Maldonado E, Montiel-Cervantes L, Domínguez-López ML, Jiménez- Zamudio L, García-Latorre E. 2009. *Toxoplasma gondii*: Effect of maternal infection in the development of lymphoid organs of BALB/c neonates. *Exp Parasitol* 121;279–287.
  39. Ge Y., Zhang L., Zhang G., Wu J., Tan M., Hu W, Liang Y., Wang Y. In pregnant mice, the infection of *Toxoplasma gondii* causes the decrease of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Parasite Immunology.* 2008; 30: 471–481.
  40. Unno A., Suzuki K., Xuan X., Nishikawa Y., Kitoh K., Takashima Y. Dissemination of extracellular and intracellular *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the blood flow. *Parasitology International.* 2008; 57: 515–518.
  41. Chinchilla M, Guerrero OM, Catarinella G, Reyes L. Natural and induced dissemination of *Toxoplasma gondii*: experimental model in white mice and hamsters. *Rev Biol Trop* 1993;41(2):197–202.
  42. Guerrero OM, Chinchilla M. *Toxoplasma gondii* (Eucoccidia: Sarcocystidae) dissemination pattern in rats after oral infection with oocysts of an avirulent strain. *Rev Biol Trop* 1997;44–45:131–5.

43. Courret N, Darche S, Sonigo P, Milon G, Buzoni-Gâtel D, Tardieux I. CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. *Blood* 2006;107(1):309–16.
44. Bullock G., Petrusz P. *The laboratory mouse*. EE.UU: Hans Hedrich; 2004. 174-191.
45. Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K., Behringer R. *Manipulating the mouse embryo a laboratory manual*. 3<sup>a</sup>.Canada: Cold spring harbor laboratory press; 2003. 111-114.
46. Botella J., *La placenta fisiología y patología*, Ediciones Díaz de Santos: Madrid; 1993. 27-50.