

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**MODELO MURINO DE INMUNIDAD CONTRA LA TOXOPLASMOSIS CONGÉNITA  
III) DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN POR PESO CORPORAL Y TRANSMISIÓN  
CONGÉNITA INICIADA POR OOQUISTES**

**Por**

**Fabrizio Augusto Bacci Granaroli**



**TESIS DE GRADO presentando  
como uno de los requisitos  
para obtener el título de Doctor  
en Ciencias Veterinarias  
(Orientación Medicina Veterinaria)**

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2005**

033 TG  
Modelo murino d  
Bacci Granaroli, Fabrizio Augusto



## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN .....	III
AGRADECIMIENTOS .....	IV
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	V
1. <u>RESUMEN</u> .....	1
2. <u>SUMMARY</u> .....	2
3. <u>INTRODUCCIÓN</u> .....	3
4. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> .....	10
5. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	11
4.1. MATERIALES.....	11
4.2. MÉTODOS.....	12
4.3. EXPERIMENTOS.....	14
6. <u>RESULTADOS</u> .....	16
7. <u>DISCUSIÓN</u> .....	21
8. <u>CONCLUSIONES</u> .....	22
9. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	23

**TESIS DE GRADO aprobado por:**

**Presidente de Mesa:**

---

**Dra. Perla Alicia Cabrera Stabile**

**Segundo Miembro (Tutor):**

---

**Dr. Alvaro Freyre Mc Call**

**Tercer Miembro:**

---

**Dr. Jesús Darío Falcón Banegas**

**Fecha:**

\_\_/\_\_/\_\_

**Autor:**

---

**Br. Fabrizio Augusto Bacci Granaroli.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Química Farmacéutica Juliana Méndez por su invaluable colaboración en la preparación de dosis para las inoculaciones de los distintos experimentos y al Departamento de Parasitología de la Facultad de Veterinaria por el apoyo brindado.

**Lista de Cuadros y Figuras**

<b>Cuadro 1. Estimación de la sensibilidad, la especificidad y el valor predictivo positivo del método de diagnóstico de gestación, según Tarabla (2000).....</b>	<b>17</b>
<b>Cuadro 2. Experimento n°2: Transmisión congénita durante la etapa aguda de una infección originada por ooquistes toxoplásmicos de la cepa ME-49 en ratones Balb/c.....</b>	<b>18</b>
<b>Cuadro 3. Experimento n°3 y 4: Transmisión congénita durante la etapa aguda de una infección originada por ooquistes toxoplásmicos de la cepa Prugniaud en ratonas Balb/c y AJ.....</b>	<b>20</b>
<b>Cuadro I. Experimento n°1: Resultados de pesajes corporales de 56 ratonas en cópula.....</b>	<b>29</b>

## **1. RESUMEN**

En Uruguay nacen 150 niños toxoplásmicos anualmente. La porción medible de pérdidas por aborto ovino toxoplásmico es 5 millones de dólares anuales.

Para el ensayo de vacunas contra la toxoplasmosis, conviene contar con varios modelos animales, ya que existen diferentes respuestas frente a iguales inmunógenos. En esta tesis, se continúa refinando el modelo murino de inmunidad contra la toxoplasmosis congénita, como continuación de tesis previas referidas al tema.

Se configuró un método de diagnóstico de la gestación mediante el aumento del peso corporal entre los 9 y 12 días, con 100% de sensibilidad, 37% de especificidad y 80% de valor predictivo positivo. Se determinó que la transmisión congénita durante la etapa aguda de una infección por ooquistes de la cepa ME-49 en ratones Balb/c, no es posible, por lo cual esta cepa no es apropiada para el modelo. En cambio, se demostró por primera vez la transmisión originada por ooquistes de la cepa Prugniaud.

Como conclusión, se reafirma la validez del modelo murino de toxoplasmosis congénita, y se validan un método original de diagnóstico de la gestación útil para el modelo y la extensión del uso de nuevas formas evolutivas infectantes en el mismo.

## **2. SUMMARY**

In Uruguay, 150 babies are annually born with toxoplasmosis. The measurable part of the losses due to sheep *Toxoplasma* abortion, amount to 5 million dollars, annually.

It is important to test *Toxoplasma* vaccines in several animal models, since different immune responses to the same immunogen might occur. This thesis is a continuation of previous work presented by other students, on similar investigations using mice as the experimental animal.

A method for the diagnosis of pregnancy in the mouse was designed, based on the rise of the body weight between days 9 and 12 of pregnancy, with 100% sensitivity, 37% specificity and 80% positive predictive value. It was determined that an infection originated by ME-49 oocysts during pregnancy, is not transmissible to the mouse fetuses. Instead, it was shown for the first time, the congenital transmission originated by Prugniaud oocysts.

In conclusion, the validity of the murine model of congenital toxoplasmosis was re-assessed, an original method for the diagnosis of the mouse pregnancy, useful for the model, was designed, and the use of new sources of infection for the model, were tested.

### **3. INTRODUCCIÓN**

Los resultados de investigaciones llevadas a cabo en la Facultad de Veterinaria, indican que en Uruguay nacen cerca de 150 niños toxoplásmicos anualmente (Freyre y col, 1992; Conti Diaz y col, 1998). Algunos de ellos mueren rápidamente, en tanto que la mayoría desarrolla lesiones de coriorretinitis ocular o sufren retraso intelectual más adelante. Esta situación es similar en todos los países del globo (Freyre y Falcon, 1989).

La prevención de la toxoplasmosis humana congénita se efectúa en el país y en el exterior generalmente en forma eventual, sobre la base de la detección de la infección durante la gestación, y el tratamiento de las madres detectadas infectadas. Este sistema es de moderada eficacia. A ello contribuye que muchas madres comienzan la vigilancia serológica en etapas considerablemente avanzadas de su gestación; a que sólo una parte de ellas regresa para volverse a chequear serológicamente, y a que con frecuencia no se interpretan correctamente los resultados serológicos. También es dable considerar que este método es más paliativo que preventivo, pues con cierta frecuencia, cuando se instaura el tratamiento específico a la embarazada, ya *Toxoplasma* ha causado lesiones que no revierten con el tratamiento, sólo se detienen. Desde luego, este sistema tiene también su costo económico, que no es desdeñable.

Por otra parte, los últimos estudios de la Facultad de Veterinaria sobre toxoplasmosis ovina, indican que el aborto ovino toxoplásmico es responsable de pérdidas económicas en la industria ovina del Uruguay por un valor de 2 a 5 millones de dólares anuales (solamente la porción medible de dichas pérdidas) (Freyre y col, 1997; Freyre y col, 1999). Asimismo, la prevalencia de la infección del ganado ovino en el Uruguay, que se sitúa en el entorno del 25%, es fuente de infección humana, cuando se consume su carne insuficientemente cocida. El consumo de carne ovina es importante, particularmente en el interior del país. La prevalencia de la infección toxoplásmica ovina es de un tenor similar en otros países productores de lana (Freyre y Falcon, 1989).

Como alternativa ideal, se encuentra el desarrollo de una vacuna antitoxoplásmica. Existe una vacuna con alto nivel de protección contra la emisión de ooquistes toxoplásmicos por los gatos, cuya aplicación contribuiría a disminuir la



prevalencia de la infección toxoplásmica humana y tal vez también la de los animales de consumo (Frenkel y Fishback, 1991; Freyre y col, 1993; Choromanski y col, 1994). Tratándose de una vacuna a *Toxoplasma* vivo, su aplicación está pendiente de que pueda ser elaborada y distribuida en condiciones rentables. Existe asimismo una vacuna (Freyre, 1998) que ayuda a disminuir las pérdidas por el aborto ovino toxoplásmico (Freyre y col, 1996; Freyre y col, 1999), aunque su eficacia es solo del 70%, y no impide la colonización fetal por *Toxoplasma*, de modo que el consumo de la carne así producida continúa siendo fuente de infección para las personas (Duquesne, 1990; Dubey, 1996; Freyre y col, 1996). El hecho de ser una vacuna viva agrega tres inconvenientes más: que su transporte hasta el establecimiento debe hacerse en tanques de nitrógeno, la duración de su viabilidad en almacenamiento es limitada y su manipulación peligrosa para las personas.

No existen actualmente vacunas aplicables a las personas (Freyre, 1998) para prevenir la toxoplasmosis connatal (Freyre y col, 1992; Conti Diaz y col, 1998) o la toxoplasmosis aguda en personas inmunodeficientes (Freyre y Falcon, 1989; Alexander, 1996; Dubey, 1996; Freyre y col, 2001).

Se dispone sin embargo, de modelos animales para el estudio de la inmunidad contra ambas situaciones, que mayormente utilizan la rata (Duquesne, 1990; Dubey y Shen, 1991; Zenner, 1993; Freyre, 1999; Freyre y col, 2001).

La rata ha sido la especie de elección para el modelo de la toxoplasmosis congénita, a consecuencia de la similitud de su resistencia a la toxoplasmosis, con la de los humanos. (Dubey y Shen, 1991; Zenner, 1993; Freyre y col, 2001; Freyre y col, 2003). Se han efectuado experimentos prototípicos con estos modelos, cuyos resultados permiten ser optimistas respecto al logro de una vacuna contra la toxoplasmosis humana connatal así como contra el aborto ovino toxoplásmico y la toxoplasmosis del cerdo (Pinckey, 1994; Dubey, y col, 1996), aún cuando son muy contados los ensayos efectuados con subunidades antigénicas, que se han dado a conocer (Duquesne, 1990; Bulow y Boothroyd, 1991; Khan y col, 1991; Angus y col, 2000; Nielsen y col, 2000; Velge-Roussel y col, 2000; Vercammen y col, 2000), o con organismos irradiados (Song, 1993). Se posee considerable conocimiento acerca de los mecanismos implicados en la respuesta inmune contra la infección toxoplásmica en animales de experimentación (Schoondermark Van de ven, 1993; Alexander, 1996), lo cual permite hacer una selección primaria de los antígenos

toxoplásmicos potencialmente protectores, así como también seleccionar los adyuvantes teóricamente más apropiados (Khan y col, 1991).

Las posibilidades de lograr protección contra la formación de quistes tisulares de *Toxoplasma* han sido menos exploradas, en cambio (Bourgin y col, 1993; Buzoni-Gatel, 1997; Debard y col, 1996).

Los modelos que ha utilizado ratas, han funcionado favorablemente a través de sucesivos proyectos de investigación ya culminados. En estos proyectos se han hecho inmunizaciones prototípicas (con *Toxoplasma* vivo) primeramente, siendo seguidas de inmunizaciones con antígenos a subunidad, acompañados de los necesarios adyuvantes.

Esta transición, natural en todo programa de desarrollo de una vacuna, ha puesto de manifiesto ciertas insuficiencias del modelo rata, que lo hacen impráctico a la hora de poner a prueba numerosas variables de inmunización:

- 1) El modelo rata insume 10 veces más cantidad de antígeno que un eventual modelo ratón. Estos antígenos son siempre obtenidos en pequeñísimas cantidades, luego de un laborioso proceso de separación y purificación.
- 2) Para lograr un buen efecto protector contra *T. gondii*, es necesario obtener una respuesta inmune de tipo Th<sub>1</sub>. Como este tipo de respuesta depende del efecto conjunto de los antígenos y de los adyuvantes que se incorporen, mas allá de las predicciones teóricas que se puedan establecer, se hace siempre conveniente testar más de un adyuvante (Gupta y Siber, 1995). Ello lleva a la multiplicación de los grupos experimentales con animales, y a mayor necesidad de antígeno.
- 3) Aún cuando se piensa que la respuesta inmunológica de la rata y del ser humano frente a la infección toxoplásmica son similares, es conveniente contar con más de un punto de referencia experimental, antes de comprometerse en costosos ensayos finales de vacunación, que involucren a grandes masas poblacionales, ya que diferentes especies animales responden diferente a los mismos inmunógenos (Gupta y Siber, 1995).
- 4) Incluso dentro de una misma especie animal, diferentes cepas se comportan distinto frente a los adyuvantes (Gupta y Siber, 1995). Trabajar con

diversificación de razas de roedores, implica más gasto de antígeno de laboriosa obtención, y como en el caso del punto 2, multiplicar los grupos experimentales de roedores. Cada uno de estos grupos ocupa considerable lugar y requiere mano de obra para su mantenimiento en buenas condiciones.

- 5) Las cepas de ratas ensayadas para los modelos referidos: Wistar, Long Evans, Fischer y Sprague-Dawley han mostrado todas muy notorias variaciones individuales de su resistencia natural a la toxoplasmosis (Freyre y col, 2001a; Freyre y col, 2001b). Ello lleva a utilizar cantidades significativas de ratas por cada grupo experimental que se forma, con el fin de neutralizar las susodichas diferencias individuales. Cada grupo requiere entonces un mayor esfuerzo de producción de antígenos especiales, mayor utilización de costosos adyuvantes experimentales modernos, y utilización de mayor mano de obra para su mantenimiento.
- 6) Finalmente, no es posible, en el modelo rata, ensayar un inmunógeno en una raza susceptible a la toxoplasmosis, pues todas las cepas de ratas disponibles muestran considerable resistencia natural a dicha infección.

Sería importante poder contar con un modelo animal susceptible, para poder ensayar desafíos vaccinales en condiciones de alta exigencia.

Todas estas limitaciones podrán tal vez ser resueltas, utilizando cepas endogámicas de ratones, de reciente desarrollo, que muestran ya sea alta resistencia a ciertas infecciones, o bien alta susceptibilidad (The Jackson Laboratory Catalog), y que han dado respuestas inmunológicas diversificadas frente a los mismos antígenos y adyuvantes (Hardegree y col, 1972; Cooper, 1994). En el caso de la toxoplasmosis, incluso se ha identificado el gen responsable de la resistencia a la formación de quistes toxoplásmicos cerebrales (Brown y col, 1995), aunque no se ha efectuado hasta la fecha ningún ensayo de inmunización con cepas resistentes de ratones, para estos fines.

Como antecedentes en el estudio de la transmisión congénita de la toxoplasmosis, mediante la realización de un modelo murino, existe el trabajo de Roberts y col (Roberts y col, 1994) que básicamente asienta la ausencia de

transmisión congénita durante el período crónico de la toxoplasmosis, la protección inmune prototípica homóloga de cepa y la factibilidad de la transmisión de la toxoplasmosis aguda durante la gestación. Mas cercanamente, contamos con los resultados de los experimentos llevados a cabo por el Br. Fabián Safern (Trabajo Final, Facultad de Veterinaria de Montevideo, 2003) sugieren que en el modelo ratón la transmisión de la infección crónica durante la gestación sucede en una escala tan moderada que no interfiere mayormente en los resultados finales, lo cual viabiliza el modelo. Por otra parte, no se encontró aún un método eficaz para la datación de la gestación de la ratona. Similarmente, no se ha podido demostrar si realmente sucede la infección lactogénica en ratones Balb/c infectados con *Toxoplasma*. Por todos estos motivos, fue necesario continuar las investigaciones para consolidar el modelo murino de la toxoplasmosis. Ello se llevo a cabo con las experimentaciones realizadas por la Br. Analía Rodríguez (Trabajo Final, Facultad de Veterinaria de Montevideo, 2004). Los resultados sugieren que aún no se ha podido hallar un método certero para la datación de la gestación de la ratona. Por otra parte, se determinó que hubo transmisión congénita de la toxoplasmosis hacia los neonatos durante la etapa aguda de la enfermedad iniciada con dosis precisas de bradizoítos, haciendo posible el uso de desafíos poco exigentes, permitiendo detectar la protección conferida por antígenos de inmunogenicidad limitada. Cabe resaltar que fue la primera vez que se realizó la transmisión congénita de una infección toxoplásmica originada por una dosis precisa de bradizoítos. Finalmente, se determinó que ratonas inmunizadas previamente (protección prototípica) antes de la concepción y luego desafiadas con quistes de *Toxoplasma* durante la gestación, no han transmitido la infección a su descendencia, este hallazgo, nos demostró que una ratona Balb/c fue capaz de desarrollar una respuesta inmune efectiva contra la infección. Esto también viabliza el modelo murino.

Luego de la ejecución de los trabajos finales mencionados, quedaban aún los siguientes problemas por resolver para alcanzar la optimización del modelo murino:

- 1- Hallar un método eficaz para el diagnóstico temprano de la gestación en la ratona.
- 2- Ampliar el espectro de realización de experimentos de protección ya logrados mediante infecciones desencadenadas por quistes de *Toxoplasma*.

Para ello era necesario determinar la transmisión congénita de una infección inducida por ooquistes de *Toxoplasma*. En caso de suceso, se podría usar dicho estadio en futuros desafíos homólogos y heterólogos.

El presente trabajo tuvo como **objetivo general** continuar optimizando el modelo murino para el estudio de la inmunidad contra la toxoplasmosis congénita.

Por otra parte, los **objetivos particulares** fueron: a. Ensayar el aumento de peso corporal como método para diagnosticar la gestación tempranamente. Como aspecto preliminar para la puesta a punto de un modelo de toxoplasmosis en la ratona, resulta esencial contar con un método para detectar la concepción tempranamente. Esto es debido a que los desafíos toxoplásmicos experimentales deben hacerse dentro de una determinada "ventana" en la gestación (10 – 12 días de gestación), de modo que el parásito tenga tiempo suficiente de multiplicarse en los órganos internos de la ratona gestante, y pasar a través de una parasitemia hacia la placenta e invadir el feto.

Observaciones previas realizadas en 25 hembras de la raza Balb/c permiten afirmar que por observación de la dilatación abdominal es posible diagnosticar la gestación entre los 8 y 15 días, mayoritariamente hacia los 15 días. La importancia de anticipar el diagnóstico de gestación, antes de los 15 días, es facilitar la transmisión de ooquistes de *Toxoplasma*, que al parecer, requieren más tiempo que la infección con quistes para producir la parasitemia necesaria para el pasaje trasplacentario. Ante la imposibilidad de realizar un diagnóstico ecográfico, dado que en tres ratonas falló totalmente, la determinación por pesaje corporal representó una alternativa que permitió adelantarse unos 3 días al método por dilatación abdominal.

Asimismo, se prefirió descartar inicialmente la determinación de progesterona mediante radioinmunoensayo, dadas las dificultades prácticas de coordinación de un requerimiento que en el futuro sería de necesidad casi diaria; también se descartó por implicar la extracción de sangre, proceso invasivo inconveniente en ratonas gestantes. Esta posibilidad sin embargo, queda abierta para el futuro. Las tentativas de los tesisistas anteriores, de diagnosticar la gestación por tapón mucoso y por colpocitología, no resultaron auspiciosas, como ya se expresó. Quedó entonces por ensayar el aumento de peso corporal, sin antecedentes en la literatura. La **hipótesis** subyacente fue que el desarrollo fetal puede traducirse en un aumento de peso detectable en el momento requerido durante la gestación (antes de los 15 días).

Como **objetivos de fondo** : **b.1-** Determinar la transmisión congénita durante la etapa aguda de una infección originada por ooquistes toxoplásmicos de la cepa ME-49 en ratones Balb/c. y **b.2-** Determinar la transmisión congénita durante la etapa aguda de una infección originada por ooquistes toxoplásmicos de la cepa Prugniaud en ratonas Balb/c y AJ.

Este último objetivo completa la factibilidad del modelo murino de toxoplasmosis congénita, y los ensayos de los tesisistas que antecedieron, al testar la transmisión con el otro estadio infectante de *Toxoplasma* en la naturaleza. La **hipótesis** para ensayar la transmisión de una infección originada por ooquistes en 2 cepas de ratones, es que se sabe de la mayor patogenicidad de este estadio cuando es inoculado por vía oral. Por ello, se utilizaron también ratones de la raza AJ, cuya mayor resistencia a *Toxoplasma* es conocida. En ratones Balb/c, se ensayaron 2 cepas. La **hipótesis** para ensayar 2 cepas de *Toxoplasma*, fue que por su distinto grado de tendencia hacia la cronicidad, podrían transmitirse congénitamente con frecuencias diferentes.

#### **4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

La indagación de la posibilidad del ratón como especie para un modelo murino de toxoplasmosis congénita comienza con las investigaciones de McLeod y col (1988). Estos autores inmunizan ratones Swiss Webster con la mutante TS4 de toxoplasma por las vías subcutánea e intestinal (mediante laparotomía). Lamentablemente utilizan una dosis de desafío desproporcionada en relación al peso corporal del ratón, lo cual es posiblemente la causa de la escasa protección contra la toxoplasmosis congénita obtenida.

Pocos años después, Roberts y Alexander (1992) establecen mediante experimentos sumarios que no hay transmisión congénita de la toxoplasmosis durante la etapa crónica en la ratona Balb/c. Similarmente, los resultados de los experimentos llevados a cabo por el Br. Fabián Saferm (Tesis de grado, Facultad de Veterinaria de Montevideo, 2003, sin publicar.) sugieren que en el modelo ratón la transmisión de la infección crónica durante la gestación sucede en una escala muy moderada. Sin embargo, Fux y col (2000) hallan que las ratonas con infección toxoplásmica crónica presentan infecundidad, con acentuada hipertrofia de endometrio y miometrio, al punto que una escasa proporción de las hembras tienen descendencia. Roberts y Alexander (1992) también demuestran la transmisión de la toxoplasmosis durante la etapa aguda en 5 de 6 ratonas gestantes. Asimismo, establecen la protección contra un desafío homólogo en 9 ratonas. En una publicación posterior, Roberts y col. (1994) ensayan una subunidad antigénica como inmunógeno en este modelo.

Seguidamente, se determina que hay una susceptibilidad aumentada a la toxoplasmosis en la ratona preñada y que la respuesta inmunológica es de tipo 2-dependiente (Thouvenin y col, 1997).

Se producen más recientemente (Elsaid, 2001), estudios más detallados acerca de la utilización de distintos inmunógenos en el modelo referido, sin alcanzar una tasa absoluta de protección.

En conjunto se puede decir que hasta la última fecha referida existen pruebas (insuficientes) de la transmisión de la toxoplasmosis durante la etapa crónica en la ratona gestante; no hay ninguna evaluación del efecto de la magnitud de la dosis de

desafío sobre la tasa de transmisión congénita de la toxoplasmosis en el modelo murino; y las pruebas de desafío homólogo son francamente insuficientes en número de animales utilizados, no existiendo ningún ensayo de desafíos heterólogos. La metodología también parece susceptible de ser optimizada en lo que se refiere al método de detección de la gestación en la ratona.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. MATERIALES**

#### **5.1.1. Animales**

Se utilizaron ratones de las cepas Balb/c y AJ para el modelo de toxoplasmosis congénita, por ser considerablemente resistentes a la infección toxoplásmica, particularmente la raza AJ (McLeod y col, 1988). Procedieron de The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA.

En la experimentación con ratones Balb/c como con AJ, se enjaularon juntos hembras y machos en una relación 4:1 para aparearse. Cuando se detectaba que una hembra estaba preñada, ésta era ubicada individualmente en una jaula con un piso de alambre de 2 mm de diámetro con una separación de 6 mm y suspendida a un altura de 3 cm desde el fondo de la caja ("cajas de parición"), para que los neonatos fueran automáticamente separados de su madre luego del parto, previniendo cualquier posible transmisión lactogénica.

Los ratones se alojaron en condiciones de aislamiento que permitieron asegurar una mínima carga microbiana, a lo que se agrupó la esterilización de jaulas, tapas de jaulas, bebederos, camas y ración así como la utilización de agua corriente hervida para los bebederos. También se contó con condiciones de humedad (50-60%) y temperatura (20°C) controladas. Fueron alojados en un recinto separado del bioterio general. Se empleó cambio de calzado y túnica para el ingreso al mismo.

Solo se utilizaron ratones inicialmente libres de infección toxoplásmica, lo que fue comprobado con la reacción de aglutinación directa (AD) para toxoplasmosis de



Desmots y Remington (Desmots y Remington, 1980). La misma reacción se utilizó para comprobar la infección toxoplásmica (o su ausencia) en ratones subinoculados con tejidos de neonatos. La reacción de AD para toxoplasmosis ha demostrado alta sensibilidad y especificidad en ratas, ratones y ovinos con infección natural y experimental a *Toxoplasma*, en las investigaciones del laboratorio de toxoplasmosis de la Facultad de Veterinaria.

En cuanto al cumplimiento con la ética de experimentación animal se cumplió con los preceptos de la Comisión de Vigilancia de la Etica en Experimentación Animal de la Facultad de Veterinaria, con la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la UDELAR, con el Decreto de Protección Animal del 29.2.2000 y con la Ordenanza sobre Uso de Animales de Experimentación, Docencia e Investigación Universitaria del 21.12.99.

### **5.1.2. Toxoplasma**

Se utilizaron las cepas Prugniaud y ME-49 de *Toxoplasma*, que son cepas completas (formadoras de quistes y ooquistes). Esta característica se consideró importante para que intervinieran más antígenos en la inmunización. Muchas otras cepas podrían cumplir este papel, además de las cepas mencionadas. La vía de inoculación fue la oral, que es la vía usual en la infección toxoplásmica natural.

## **5.2. MÉTODOS**

### **5.2.1. Método para lograr la concepción de las ratonas**

Las ratonas fueron alojadas con los machos en proporción 4:1, atendiendo a la existencia de una buena intensidad lumínica, regulada a 12 horas de duración mediante un temporizador.

### **5.2.2. Método para el diagnóstico de gestación**

No existe hasta el momento un método eficaz para el diagnóstico de la gestación de la ratona al día +12 ( que es cuando se hará su infección con *Toxoplasma*). Por lo

tanto, el diagnóstico de gestación se hizo provisionalmente mediante: - el pesaje corporal de la hembra. Al mismo tiempo, se determinó el grado de eficacia de este método.

**Pesaje corporal:** para pesar a las ratonas, se utilizó una balanza electrónica (Precisa, Zürich, Suiza) con precisión a la centésima de gramo (redondeando a la décima de gramo). Para pesarlas, las ratonas fueron alojadas momentáneamente dentro de una caja de plástico de tamaño apropiada. Los pesajes se realizaron a partir del día 9° de haber sido alojadas las hembras con los machos. Se consideró como indicio de gestación, tres aumentos de peso sucesivos, no menores de 1.5 gramos en total con respecto al mayor peso que haya tenido cada ratona diariamente, hasta ese momento.

#### **5.2.3. Método para el cálculo de sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo del método de diagnóstico de gestación mediante pesaje corporal**

Se registran los aumentos de peso corporal de 56 ratonas, los diagnósticos de gestación y la ocurrencia o ausencia ulterior del parto (Cuadro I). Con estos datos, se calculó la sensibilidad, la especificidad y el valor predictivo positivo del método (Tarabla, 2000).

Para el cálculo de los días de gestación que tenían las ratonas cuando se hizo cada diagnóstico de gestación, se restó a 21 días, la cantidad de días transcurridos entre parto y desafío.

#### **5.2.4. Método para la detección de la infección trasplacentaria (Bioensayos)**

Una vez nacidas las camadas, los neonatos fueron sacrificados por dislocación cervical y se subinocularon de inmediato en ratones. Se inocularon los neonatos completos. Se utilizó los neonatos de la mitad de las camadas que tuvieron ocho o más neonatos, y de toda la camada si tuvieron menos de ocho fetos. Se homogeneizaron en PBS y 1000 UI de penicilina y 0.1 mg de estreptomocina en un homogeneizador de laboratorio, de aspas. Se utilizaron 2 a 4 ratones como receptores de los tejidos. Al

cabo de 30 días, se buscaron anticuerpos antitoxoplásmicos mediante la reacción de AD en el suero de los ratones. Una reacción de AD positiva, indica la transmisión congénita. La negatividad indica la ausencia de transmisión.

#### **5.2.5. Método para la obtención de ooquistes de *Toxoplasma***

Para la obtención de ooquistes del parásito, se usaron gatitos recientemente destetados (de aproximadamente 45 días de edad), de la raza europea, negativos a la AD para toxoplasmosis a la dilución de 1:64. Procedieron del criadero del Laboratorio de Toxoplasmosis de la Facultad de Veterinaria. Se les suministró el cerebro de un ratón con infección toxoplásmica crónica. Se colectaron las heces de los días 4 a 7 posinfección, las que se concentró por el método de Sheather modificado a densidad 1.15, y se incubaron con agitación en 2% de ácido sulfúrico durante 96 hs a 20°C, hasta completar la esporulación. Previa neutralización y enumeración, los ooquistes fueron inoculados por boca en ratones.

#### **5.2.6. Medidas para la protección biológica de las personas involucradas en el proyecto de trabajo**

Se aplicaron las normas de Bioseguridad del Laboratorio de toxoplasmosis, aprobadas por la Facultad de Veterinaria de Montevideo en abril del 2003 por el Consejo.

### **5.3. EXPERIMENTOS**

#### **5.3.1. Experimento N°1: Determinación de la eficacia de diagnóstico de la concepción por aumento del peso corporal**

Se utilizó el método de pesaje corporal para la datación de la concepción, no descrito en la literatura, ya que los métodos de detección utilizados por los tesisistas anteriores no resultaron auspiciosos. Este método no invasivo, se basó en la hipótesis de que el desarrollo fetal puede traducirse en un aumento de peso

detectable en el momento requerido durante la gestación (antes de los 15 días). Esto nos permitió poder hacer el desafío toxoplásmico de modo que el parásito tuvo tiempo suficiente para multiplicarse en los órganos de la ratona gestante y a través de la sangre llegar a la placenta e invadir al feto.

El experimento consistió en colocar en jaulas ratones Balb/c ByJ, hembras y machos en una relación de 4:1 para aparearse. Las ratonas se pesaron diariamente a partir del día 9º de haber sido alojadas con los machos. Se consideró como indicio de gestación, tres aumentos de peso sucesivos, no menores de 1.5 gramos en total con respecto al mayor peso que hubiera tenido cada ratona diariamente, hasta ese momento.

Cuando una hembra era detectada como preñada, se alojaba en una jaula de parición. Se registraron los pesos iniciales y finales, se calculó el aumento de peso así como los días de gestación que tenía cada ratona cuando se hizo el diagnóstico de gestación. Finalmente, se registró la ocurrencia del parto o su ausencia, y la fecha en que este sucedió (Cuadro I).

### **5.3.2. Experimento N° 2: Transmisión congénita durante la etapa aguda de una infección originada por ooquistes toxoplásmicos de la cepa ME-49, en ratones Balb/c**

En este experimento se buscó ensayar la transmisión congénita de la toxoplasmosis durante la etapa aguda de una infección originada por ooquistes de una cepa diferente a las que se ha utilizado en experimentos anteriores. La cepa a la que hacemos referencia es la ME-49 de *Toxoplasma*. Para realizar este experimento, 8 ratonas Balb/c de 20 g de peso fueron alojadas con machos de la misma raza en proporción de 4:1. A los 12 días de gestación, recibieron  $10^2$  a  $10^3$  ooquistes de la cepa ME-49 de *Toxoplasma* por boca. Luego, las hembras fueron colocadas individualmente en cajas de parición. Los neonatos fueron bioensayados inmediatamente luego de su nacimiento.



### **5.3.3. Experimento N°3: Transmisión congénita durante la etapa aguda de una infección originada por ooquistes toxoplásmicos de la cepa Prugniaud en ratonas Balb/c**

En el presente experimento, se realizó la transmisión de *Toxoplasma* durante el período agudo de la infección en ratonas Balb/c gestantes, originada por inoculaciones con dosis de ooquistes de la cepa Prugniaud. Se alojaron ratonas Balb/c con un macho (4:1). A los 12 días de gestación, fueron inoculadas por boca con  $10^2$  o  $10^3$  ooquistes de la cepa Prugniaud. Luego, las ratonas fueron alojadas individualmente en cajas de parición. Los neonatos fueron bioensayados inmediatamente luego del nacimiento.

### **5.3.4. Experimento N° 4: Transmisión congénita durante la etapa aguda de una infección originada por ooquistes toxoplásmicos de la cepa Prugniaud en ratonas AJ**

En el presente experimento, se realizó la transmisión de *Toxoplasma* durante el período agudo de la infección Toxoplásmica en ratonas AJ gestantes, según el mismo diseño del Experimento N° 3. Se utilizó esta raza de ratón ya que se piensa que esta tiene una mayor resistencia a la enfermedad. Se ensayaron dosis crecientes de ooquistes de la cepa Prugniaud.

## **6. RESULTADOS**

### **6.1. EXPERIMENTO N°1**

Se pesaron repetidamente 56 ratonas. Un 96.4% de ellas experimentaron un aumento de peso superior a 1.5grs, con un promedio de 4.6grs, con extremos de 0.2 a 9.6grs, y fueron diagnosticadas como gestantes.

Un 71.4% de estas últimas, tuvieron el parto. Otro 10.7% de ratonas nunca concibieron, ni fueron diagnosticadas como gestantes (Cuadro I). Con estos datos, la sensibilidad del método fue de 100%, su especificidad 37%, y su valor predictivo positivo de 80% (Cuadro 1). El diagnóstico de gestación se hizo entre los días 6 y 20, con un promedio de 12.5 días de gestación.

## Cuadro 1

**Estimación de la sensibilidad, la especificidad y el valor predictivo positivo del método de diagnóstico de gestación por pesaje corporal, según Tarabla(2000)**

	Parto	No parto
Positivo a la prueba diagnóstica	40	10
Negativo a la prueba diagnóstica	0	6

Parto =  $(40+0) = 40$ .

No parto =  $(10+6) = 16$ .

Positivo a la prueba diagnóstica =  $(40+10) = 50$ .

Negativo a la prueba diagnóstica =  $(6+0) = 6$ .

Sensibilidad =  $40:40 = 1 = 100\%$  de sensibilidad.

Especificidad =  $6:16 = 0.37 = 37\%$  de especificidad.

Valor Predictivo Positivo =  $40:50 = 0.8 = 80\%$  valor predictivo positivo.

## 6.2. EXPERIMENTO N° 2

Se desafiaron 8 ratonas Balb/c, 6 de ellas con dosis de  $10^2$  y las 2 restantes con dosis de  $10^3$  ooquistes de la cepa ME-49. Ninguna de las ratonas transmitió la infección a su descendencia (Cuadro 2).

### Cuadro 2

**Experimento No. 2: Transmisión congénita durante la etapa aguda de una infección originada por ooquistes toxoplásmicos de la cepa ME-49 en ratones Balb/c**

Identificación de la ratona	Días concep./desaf <sup>(1)</sup>	Dosis de ooquistes o de bradizoítos	Neonatos <sup>(3)</sup>		Resultado <sup>(2)</sup>
			Vivos	Mortinatos	
<u>C - s/m</u>	15	$10^2$ ooq.	3	3	AD <sup>(5)</sup> (-)
B - CADO	19	$10^2$ ooq.	1	0	AD (-)
B - s/m	15	$10^2$ ooq.	1	2	AD (-)
C - CA	15	$10^2$ ooq.	1	7	AD (-)
C - DOCO	13	$10^2$ ooq.	3	6	AD (-)
B - CO	14	$10^2$ ooq.	0	5	AD (-)
A- CA	15	$10^3$ ooq.	0	6	AD (-)
B- CA	15	$10^3$ ooq.	1	0	AD (-)

(1) Días transcurridos desde la concepción al desafío.

(2) Resultado de la transmisión congénita.

(3) N° de cachorros paridos vivos ("vivos") y mortinatos.

(4) No registrado.

(5) AD = Reacción de Aglutinación Directa para toxoplasmosis. La positividad de esta reacción indica infección fetal.

### **6.3. EXPERIMENTO N° 3**

Se apreció transmisión en 3 de 7 ratonas desafiadas con  $10^2$  ooquistes, y en 2 de 7 ratonas desafiadas con  $10^3$  ooquistes (Cuadro 3).

### **6.4. EXPERIMENTO N°4**

De los resultados obtenidos de los ensayos con ratonas AJ, surgió que, 2 de 4 ratonas que recibieron  $10^3$  ooquistes, 2 de 3 ratonas que recibieron  $10^4$  ooquistes, y 2 de 2 ratonas que recibieron  $10^5$  ooquistes, transmitieron la infección a sus camadas. Otras 5 ratonas que recibieron  $10^3$  ooquistes, y 2 ratonas más que recibieron  $10^4$  ooquistes, murieron de toxoplasmosis antes del parto (datos no mostrados).



### Cuadro 3

**Experimentos N°. 3 y 4 : Transmisión congénita durante la etapa aguda de una infección originada por ooquistes toxoplásmicos de la cepa Prugniaud en ratonas Balb/c y AJ**

<u>Ratonas</u>	<u>Dosis de ooquistes</u>	<u>Neonatos</u>		<u>Resultado</u> (1)
		<u>vivos</u>	<u>muertos</u>	
AJ 1	10 <sup>3</sup>	3	1	-
AJ 2	10 <sup>3</sup>	2	0	-
AJ 3	10 <sup>3</sup>	0	1	+
AJ 4	10 <sup>3</sup>	0	4	+
AJ 5	10 <sup>4</sup>	0	1	-
AJ 6	10 <sup>4</sup>	3	0	+
AJ 7	10 <sup>4</sup>	0	2	+
AJ 8	10 <sup>5</sup>	4	0	+
AJ 9	10 <sup>5</sup>	2	0	+
BALB/C	10 <sup>2</sup>			3/7 (2)
BALB/C	10 <sup>3</sup>			2/7

(1) Resultados de aglutinación directa de ratones utilizados para el bioensayo de neonatos.

(2) Numerador: n° de ratonas que transmitieron la infección congénitamente a su descendencia; denominador: n° total de ratonas inoculadas.

## **7. DISCUSIÓN**

El método de pesaje corporal fue el de elección para la detección de la concepción, por comparación al hisopado vaginal o al de la observación del tapón mucoso (tesis anteriores de Rodríguez y Safern, respectivamente). Este método no solo permitió la mayor cantidad de detecciones de gestaciones tempranas, sino que además fue mucho más eficiente que los métodos de colpocitología o detección del tapón vaginal utilizados por tesis anteriores (Safern y Rodríguez). Hemos descubierto que este método, del cual no hay antecedentes bibliográficos, tiene muchas ventajas con respecto a otros utilizados anteriormente. Es un método no complicado, fácil de realizar y fundamentalmente es un método no invasivo, una característica importante cuando se manejan cepas endogámicas de ratones con una futura gestación, en especial la raza Balb/c la cual es muy susceptible. Es también económico, si lo comparamos con por ejemplo con técnicas que utilizan radioisótopos, las cuales son caras, requieren equipos especiales y son invasivas, ya que se requiere sangrar a la ratona. Por último hemos calculado que este método tiene una sensibilidad de un 100%, una especificidad del 37% y un valor predictivo positivo de un 80%. A pesar de tener una excelente sensibilidad tiene una muy baja especificidad, o sea, de un número de 16 ratonas que no parieron, solo identificamos 6 ratonas como no preñadas, las 10 restantes habían sido mal diagnosticadas como preñadas.

Por otra parte, al tener un alto valor predictivo positivo, nos indica que existe una elevada probabilidad que un animal positivo al diagnóstico, este realmente preñado. Con este método se ha resuelto el gran problema que se ha enfrentado para lograr infectar la hembra a tiempo, para que el parásito tenga tiempo suficiente para multiplicarse e infectar a los fetos y así lograr la transmisión de la toxoplasmosis.

Con respecto a la **transmisión congénita durante la etapa aguda de una infección originada por ooquistes toxoplásmicos de la cepa Prugnialud**, pudimos observar que dicha transmisión ocurrió en proporción apreciable con tan solo una dosis de  $10^2$  ooquistes. Es importante el conocimiento de una dosis moderada de desafío, que permita detectar inmunógenos de inmunogenicidad limitada, que podrían pasar inadvertidos si se usaran desafíos mas severos. Por otra parte se logró determinar que la frecuencia de la infección congénita no parece ser

dependiente de la dosis de ooquistes, en el rango de  $10^2$  a  $10^3$  ooquistes de la cepa Prugniaud por ratona. Por otro lado, los experimentos de transmisión de una infección toxoplásmica iniciada por ooquistes en ratonas AJ, merece una ampliación experimental, ya que la experimentación hecha con esta raza, nos ha mostrado que fue posible transmitir la toxoplasmosis a su descendencia, a pesar de que se han producido algunas muertes. En estos experimentos, con el estadio ooquistico más patogénico, se vuelve evidente la susceptibilidad aumentada de las ratonas preñadas a la toxoplasmosis. Cabe resaltar, que esta fué la primera vez que se realizó la transmisión de la enfermedad mediante la utilización de ooquistes.

Con respecto a la **transmisión congénita durante la etapa aguda de una infección originada por ooquistes toxoplásmicos de la cepa ME-49**, los resultados parecen indicar que no es posible la transmisión de la infección, si utilizamos dosis desafiantes de  $10^2$  y  $10^3$  ooquistes. Independientemente de la dosis de la cepa utilizada para infectar a la ratona preñada, se ha producido un elevado porcentaje de mortinatos con respecto a los nacidos vivos. Este efecto ya fue descrito por Roberts y col (Roberts y col, 1994). Se sabe que los antígenos de *Toxoplasma gondii* son potentes estimulantes de la producción del factor de necrosis tumoral, una citoquina que puede inducir aborto.

## **8. CONCLUSIONES**

En conclusión, en el presente trabajo, hemos determinado en el modelo murino, que el método de pesaje corporal ha detectado con eficiencia a las ratonas gestantes antes del día 15 de gestación (12.5 días de gestación promedio) y además resulta económico y sin complicaciones para realizarlo. Además, se demostró que es posible la transmisión congénita de la toxoplasmosis con ooquistes de *Toxoplasma* de la cepa Prugniaud en ratones de las razas Balb/c y AJ. Es necesario continuar las investigaciones con el objetivo primordial de consolidar el modelo murino de inmunidad contra la toxoplasmosis, por ejemplo, investigando si alguno de los 3 estadios principales del parásito es más conveniente para conferir inmunidad protectora.

## **9. BIBLIOGRAFÍA**

- 1- Alexander J. (1996). Immunological Control of *Toxoplasma gondii* and Appropriate Vaccine Design. In: Current Topics in Microbiology and Immunology, Vol. 219. *Toxoplasma gondii* pp. 183-195. Ed: V. Gross. Springer-Verlag Berlin Heidelberg Alemania.
- 2- Angus C.W.; Klivington-Evans D.; Dubey J.P.; Kovacs J. (2000). Immunization with a DNA Plasmid Encoding the SAG1 (P30) Protein of *Toxoplasma gondii* Is Immunogenic and Protective in Rodents ; 181: 317-324.
- 3- Bourguin I.; Chardes T.; Bout D. (1993). Oral Immunization with *Toxoplasma gondii* Antigens in Association with Cholera Toxin Induces Enhanced Protective and Cell - Mediated Immunity in C57BL/6 Mice. Infect. Immun, 61; 2082-2088.
- 4- Brown CR.; Hunter CA.; Estes RG.; Beckmann E.; Forman J.; David C.; Remington JS.; McLeod R. (1995). Definitive identification of a gene that confers resistance against *Toxoplasma* cyst burden and encephalitis. Immunology ; 85: 419-428.
- 5- Büllow R.; Boothroyd J.C. (1991). Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigen in liposomes. J Immunol ; 147: 3496.
- 6- Buzoni-Gatel D. (1997). Adoptive transfer of gut interepithelial lymphocytes protects against murine infection with *Toxoplasma gondii*. J. Immunol ; 158: 5883-5889.
- 7- Choromanski L.; Freyre A.; Poquié I.; Brown K. (1994). Safety aspects of a vaccine for cats containing a *Toxoplasma gondii* mutant strain. J Euk Microbiol; 4: 8s.
- 8- Cooper P.D. The selective induction of different immune responses by vaccine adjuvants. In: Strategies in Vaccine Design (ed. Ada, G.L.). R.G. Landes Company, Austin, Texas, U.S., 1994, pp. 125-158.

- 9- Conti Díaz I.A.; Freyre A.; Queiruga G.; Noya C.; Mendez J.; Gedda C.; Reig B.; Acosta M.; López Jordi J.; González Banfi A. (1998). Estudio de la toxoplasmosis en la Unidad de Perinatología del BPS en el período 1991-1996. *Rev. Med. Uruguay*; 14: 226-235.
- 10- Debard N.; Buzoni-Gatel D.; Bout D. (1996). Intranasal immunization with the SAG1 protein of *Toxoplasma gondii* in association with cholera toxin dramatically reduces development of cerebral cysts after oral infection. *Infect Immun*; 64: 2158 - 2166.
- 11- Desmots G.; Remington J.S. (1980). Direct agglutination test for diagnosis of *T. gondii* infection. *J Clin Microbiol* ; 11: 562-568.
- 12- Dubey J.P.; Urban J.FJr and S.W. Davis (1996). Protective immunity to toxoplasmosis in pigs vaccinated with a non persistent strain of *Toxoplasma gondii*. *Am J Vet Res*; 52: 1316-1319.
- 13- Dubey J.P.; Shen S.K. (1991). Rat Model of Congenital Toxoplasmosis. *Infection and Immunity*; 59 : 3301-3302.
- 14- Dubey J.P. (1996). Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. *Vet. Parasitol.*, 64 (1-2): 65-70.
- 15- Duquesne V. (1990). Protection of Nude Rats against *Toxoplasma* Infection by Excreted-Secreted Antigen-Specific Helper T Cells *Inmun*; 58: 2120-2126.
- 16- Elsaid M.; Martins M.; Frézard F.; Braga EM.; Vitor RWA. (2001). Vertical Toxoplasmosis in a Murine Model. Protection after Immunization with Antigens of *Toxoplasma gondii* Incorporated into Liposomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 96: 99-104.

- 17- Frenkel J.K. ; Fishback J. (1991). Prospective vaccine prepared from a new mutant of *Toxoplasma gondii* for use in cats. *Am J Vet Res*; 52: 759-763.
- 18- Freyre A.; Falcón J. (1989). Toxoplasmosis en las especies domésticas y como zoonosis. Departamento de Publicaciones de la Universidad (Ed.) (Uruguay), 338 pp.
- 19- Freyre A.; Queiruga G.; Méndez J.; Lavarello L. (1992). Riesgo de infección toxoplásmica del feto humano en Montevideo. *An Clínicos (España)*; 4: 122 -127.
- 20- Freyre A.; Fisback J.; Popiel I.; Karen B. (1993). Immunization of cats with tissue cysts, bradyzoites, and tachyzoites of the t-263 strain of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol*; 79: 716-719.
- 21- Freyre A.; Falcón J.; Mendez J.; Gedda C.; D'Angelo J.M. (1996). Evaluación de las pérdidas económicas debidas a toxoplasmosis en ovinos en el Uruguay. *Parasitología al Día (Chile)*; 20: 100-108.
- 22- Freyre A.; Bonino J.; Falcón J. (1997). Aborto ovino toxoplásmico: su significación económica en el Uruguay. *Producción ovina*; 10: 29-42.
- 23- Freyre A. (1998). Vacunas contra *Toxoplasma*. Segundo Congreso Internacional de Toxoplasmosis. Santa Fé de Bogotá, Colombia.
- 24- Freyre A.; Bonino J.; Falcón J.; Castells D.; Correa O.; Casaretto A. (1999). The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay.; 81: 85-88.
- 25- Freyre A. (1999). Congenital transmission of experimental chronic toxoplasmosis in rats. *J Parasitol*; 85: 746- 48.

- 26- Freyre A.; Falcón J.; Correa O.; Mendez J.; Gonzalez M.; Venzal J.(2001 a). Residual infection in the brains of rats fed cysts of 15 strains of *Toxoplasma*. Parasitol Res; 87: 915-944.
- 27- Freyre A.; Falcón J.; Correa O.; Mendez J.; Gonzalez M.; Venzal J. (2001 b). Some factors influencing transmission of *Toxoplasma* in pregnant rats fed cysts. Parasitol Res; 87: 941-944.
- 28- Freyre A.; Falcón J.; Correa O.; Mendez J.; Gonzalez M.; Venzal J. (2003). Fetal *Toxoplasma* infection after oocyst inoculation of pregnant rats. Parasitology Res; 89: 352-3.
- 29- Fux B.; Ferreira AM.; Cassali GD.; Tafuri WL.; Vitor RWA. (2000). Experimental Toxoplasmosis in Balb/c Mice. Prevention of Vertical Disease Transmisión by Treatment and Reproductive Failure in Chronic Infection. Mem Inst . Oswaldo Cruz; 95: 121-126.
- 30- Gupta R.K; Siber G.R (1995). Adjuvants for human vaccines - current status, problems and future prospects. Vaccine; 13: 1263 - 1276.
- 31- Hardegree MC; Pittman M.; Maloney C.J. (1972). Influence of mouse strain on the assayed potency (unitage) of tetanus toxoid. Appl Microbiol; 24, 120-126.
- 32- Khan I.A.; Ely K.; Kasper H. (1991). A purified parasite antigen (p 30) mediates CD8+ T cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice. J Immunology; 147: 3501-3506.
- 33- Matsuhasi T. (1991). Influence of mouse strain of the results of potency testing for diphtheria and tetanus toxoid components of D, T, DT and DTP vaccines. In: Proceedings of an Informal Consultation on the World Health Organization Requirements for Diphtheria, Tetanus, Pertussis and Combined Vaccines (Ed Manclark, C.R.) Department of Health and Human Services, United States Public Health Service, Bethesda. DHHS Publication No. (FDA) 91-1174, pp. 55-58.

- 34- McLeod R.; Frenkel J.; Estes R.; Mack DG.; Eisenhower PB.; Gibori G. (1988). Subcutaneous and intestinal vaccination with tachyzoites of *Toxoplasma gondii* and acquisition of immunity to peroral and congenital *Toxoplasma* challenge. *J Immunol*; 140: 1632-1637.
- 35- McLeod R.; Eisenhauer P.; Mack D.; Brown C.; Filice G.; Spitaluy G. (1989,1989). Immune responses associated with early survival after oral infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol*; 142: 3247-3255.
- 36- Nielsen H.V.; Innes E.A.; Petersen E.; Buxton D.(2000). Strategies for development of vaccines against *Toxoplasma gondii*. In: *Congenital toxoplasmosis*. P.A. Thomas, E. Petersen (eds.) Springer, New York, U.S. 2000 pp. 314-322.
- 37- Pinckey R.D. (1994). Evaluation on the safety and efficacy of vaccination of nursing pigs with living tachyzoites of two strains of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol*; 80: 438-448.
- 38- Roberts CW.; Alexander J. (1992). Studies on a murine model of congenital toxoplasmosis: vertical disease transmission only occurs in Balb/c mice infected for the first time during pregnancy. *Parasitology*; 104: 19-23.
- 39-Roberts C.W.; Brewer J.M.; Alexander J. (1994). Congenital toxoplasmosis in the Balb/c mouse: prevention of vertical disease transmission and fetal death by vaccination. *Vaccine*; 12: 1389-1394.
- 40- Rodríguez A. (2004). Trabajo Final, Facultad de Veterinaria de Montevideo. Uruguay.
- 41- Safern F. (2003). Trabajo Final, Facultad de Veterinaria de Montevideo. Uruguay.
- 42-Schoondermark Van de Ven E. (1993) Congenital Toxoplasmosis; an Experimental Study in rhesus monkeys for transmisión and prenatal dignosis. *Exp Parasitol* 77: 200-211.



- 43- Song C. (1993). The effect of Cobalt - 60 irradiation on the infectivity of *Toxoplasma gondii*; Int J Parasit, 23: 89-93.
- 44 - Tarabla, H. (2000). Epidemiología Diagnóstica. Ed. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, (Argentina). Sensibilidad y Especificidad pp 37-53 y Valor Predictivo Positivo pp 59-79.
- 45 - Thouvenin M.; Candolfi E.; Villard O.; Klein JP.; Kient T. (1997). Immune response in a murine model of congenital toxoplasmosis: increased susceptibility of pregnant mice and transplacental passage of *Toxoplasma gondii* are Type-2 dependent. Parasitology; 39: 279-283.
- 46 - Velge-Roussel F.; Marcelo P.; Lepage A.C.; Buzoni-Gatel D.; Bout. D.T. (2000). Intranasal Immunization with *Toxoplasma gondii* SAG1 Induces Protective Cells into Both NALT and GALT Compartments. Inf. Immun; 2: 969-972.
- 47- Vercammen M.; Scorza T.; Huygen K.; De Braekeleer J.; Diet R.; Jacobs D.; Saman E.; Verschueren H. (2000). DNA Vaccination with Genes Encoding *Toxoplasma gondii* Antigens GRA1, GRA7, and ROP2 Induces Partially Protective Immunity against Lethal Challenge in Mice. Inf Immun ; 68: 38-45.
- 48 - Zenner L. (1993). Rat Model of Congenital Toxoplasmosis: Rate of Transmission of Three *Toxoplasma gondii* Strains to Fetuses and Protective Effect of a Chronic Infection. Immun; 61: 360-363.

## Cuadro I

### Resultados de pesajes corporales de 56 ratonas en cópula

RATONA	PESO INICIAL		PESO MAYOR O IGUAL A 1.5 GRS (DÍA DESAFÍO)			DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN	RESULTADOS	
	FECHA	PESO (GRS)	FECHA	PESO (GRS)	DIFERENCIA PESO(GRS)		FECHA PARTO	DIAS GESTACION
1	04-Ago	17.3	22-Ago	21.6	4.3	+	29-Ago	14
2	04-Ago	22.3	12-Ago	25.3	3	+	23-Ago	10
3	04-Ago	22.6	26-Ago	25.7	3.1	+	06-Sep	10
4	10-May	21.8	06-Jun	23.5	1.7	+	20-Jun	7
5	15-Jun	23	27-Jun	25.5	2.7	+	11-Jul	7
6	08-Abr	17.7	17-May	23.3	5.6	+	26-May	12
7	08-Abr	17.4	23-May	23.2	5.8	+	30-May	14
8	08-Abr	20	25-May	23.3	5.9	+	(*)	
9	08-Abr	20.7	25-Abr	26	5.3	+	03-May	13
10	08-Abr	19.5	20-Abr	27	7.5	+	22-Abr	19
11	08-Abr	20	17-May	25.2	5.2	+	(*)	
12	27-May	22.2	27-Jun	23.6	1.4	+	11-Jul	7
13	08-Abr	17.7	23-May	24.3	6.6	+	01-Jun	12
14	08-Abr	19.2	29-Abr	26.2	7	+	04-May	16
15	08-Abr	19.5	29-Abr	23.6	4.1	+	05-May	15
16	08-Abr	16.6	11-May	25.8	9.2	+	19-May	13
17	08-Abr	13.6	30-May	20.1	6.5	+	(*)	
18	08-Abr	18.1	23-May	23.2	5.1	+	(*)	
19	08-Abr	19.1	29-Abr	28.7	9.6	+	04-May	16
20	08-Abr	19.7	30-May	23.4	3.7	+	13-Jun	7
21	08-Abr	17.6	18-May	22.2	4.6	+	26-Jun	13
22	20-Abr	21.9	17-May	26.1	4.2	+	23-May	15
23	20-Abr	18.2	23-May	22.9	4.7	+	07-Jun	6
24	20-Abr	21.2	18-May	24.1	2.9	+	(*)	
25	20-Abr	23.5	11-May	25.1	1.6	+	23-May	9
26	20-Abr	21.1	11-May	23.1	2	+	23-May	9
27	20-Abr	20.4	26-Abr	24.1	3.7	+	04-May	13
28	20-Abr	21.5	03-May	21.7	0.2	+	13-May	11
29	20-Abr	19.8	20-May	24.2	4.4	+	27-May	14

30	20-Abr	18.6	03-May	22.3	3.7	+	(*)	
31	20-Abr	20.3	03-May	23.5	3.2	+	12-May	12
32	20-Abr	20.7	18-May	23.7	3	+	(*)	
33	20-Abr	18.1	03-May	21.7	3.6	+	13-May	11
34	20-Abr	19.8	17-May	26	6.2	+	23-May	15
35	20-Abr	19.9	15-Jun	24	4.1	+	27-Jun	9
36	20-Abr	18.5	20-Jun	22.7	4.2	+	(*)	
37	15-Mar	22.4	28-Mar	31	8.6	+	07-Abr	11
38	15-Mar	21.9	28-Mar	28	6.1	+	30-Mar	19
39	15-Mar	22.3	25-Abr	30	7.7	+	27-Abr	19
40	15-Mar	25.1	29-Mar	27.7	2.6	+	30-Mar	20
41	15-Mar	25	21-Mar	29.4	4.4	+	30-Mar	12
42	15-Mar	21.9	21-Mar	25	3.1	+	31-Mar	11
43	15-Mar	24.6	21-Mar	26.9	2.3	+	13-Abr	11
44	15-Mar	23.3	04-Abr	30.4	7.1	+	13-Abr	12
45	15-Mar	23.7	26-Abr	27.7	4	+	(*)	
46	15-Mar	21.2	29-Mar	24.5	3.3	+	07-Abr	12
47	15-Mar	17.4	29-Mar	25.7	8.3	+	01-Abr	18
48	15-Mar	23.7	04-Abr	28.4	4.7	+	(*)	
49	15-Mar	22.7	11-Abr	30	7.3	+	18-Abr	14
50	15-Mar	23.5	04-Abr	28.5	5	+	13-Abr	12
51	08-Abr	15.3	05-Jul	20	4.7		(#)	
52	08-Abr	19.2	05-Jul	22	2.8		(#)	
53	08-Abr	16	05-Jul	22	6		(#)	
54	08-Abr	20.1	05-Jul	22.5	2.4		(#)	
55	08-Abr	18.2	05-Jul	22.4	4.2		(#)	
56	20-Abr	18.4	05-Jul	21	2.6		(#)	

(\*) Ratonas diagnosticadas preñadas, que no parieron.

(#) Ratonas que no concibieron, ni fueron diagnosticadas como preñadas.

Promedio de los días de gestación al momento de hacer el diagnóstico del mismo: 12.5 días.

Extremos de los días de gestación al momento de hacer el diagnóstico del mismo: 6 a 20 días.

Promedio de la diferencia de peso (al peso al momento de desafío se le resta el peso inicial de la ratona) de las ratonas: 4.6 gramos.

Extremos de la diferencia de peso: 0.2 a 9.6 gramos.