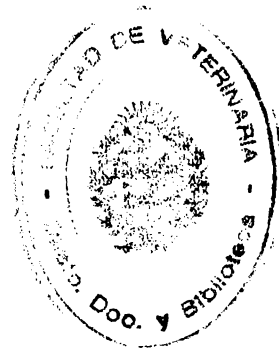


UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA



**MODELO MURINO DE INMUNIDAD CONTRA LA TOXOPLASMOSIS
CONGÉNITA. II) DETECCIÓN DE LA GESTACIÓN POR COLPOCITOLOGÍA,
SU COMBINACIÓN CON TAPÓN MUCOSO; TRANSMISIÓN CONGÉNITA
INICIADA CON QUISTES Y PROTECCIÓN PROTOTÍPICA**

Por

Analía Verónica RODRÍGUEZ PEREYRA

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

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2004**

008 TG

Modelo murino d

Rodríguez Pereyra, Analía Verónica



FV/26130

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:

6 de agosto de 2004.

Autor:

Br. Analía Verónica Rodríguez Pereyra

AGRADECIMIENTOS.

A la Química Farmacéutica Juliana Méndez (Laboratorio de Parasitología, Facultad de Química, Montevideo, Uruguay) por su invaluable colaboración en la preparación de dosis para las inoculaciones necesarias en los distintos experimentos, así como por la realización de la técnica serológica de diagnóstico utilizada en este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	IV
<u>1. RESUMEN</u>	1
<u>2. INTRODUCCIÓN</u>	2
<u>3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	3
3.1.LISTADO DE REFERENCIAS DE LA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
<u>4. MATERIALES Y MÉTODOS</u>	5
<u>4.1. MATERIALES</u>	5
<u>4.2. MÉTODOS</u>	6
<u>4.3. EXPERIMENTOS</u>	7
<u>5. RESULTADOS</u>	8
<u>6. DISCUSIÓN</u>	9
<u>7. CONCLUSIONES</u>	10
<u>8. BIBLIOGRAFÍA</u>	10

Cuadro I.

Experimento N°3. Transmisión congénita de una infección toxoplásmica en ratonas Balb/c, iniciada por inoculación oral con dosis precisas de bradizoítos, 12 días posconcepción.

Resultados.

<u>Ratona</u>	<u>Dosis de bradizoítos</u>	<u>Neonatos vivos</u>	<u>Neonatos muertos</u>	<u>Transmisión congénita⁽¹⁾</u>
1	10 ³	6	0	-
2	10 ³	7	2	+
3	10 ³	2	2	-
4	10 ³	5	0	-
5	10 ³	2	6	+
6	10 ³	6	1	+
7	10 ³	5	0	-
8	10 ³	6	0	-
9	10 ³	7	2	+
10	10 ³	2	6	+
11	10 ⁴	3	0	+
12	10 ⁴	3	3	nr
13	10 ⁴	0	2	+
14	10 ⁴	nr ⁽²⁾	nr	-
15	10 ⁴	nr	nr	-
16	10 ⁴	4	0	-
17	10 ⁴	1	1	-

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

⁽²⁾ No registrado.

Cuadro II.

Experimento N°4: Protección en ratonas Balb/c ByJ inmunizadas 45 días antes de la concepción y desafiadas durante la gestación, con bradizoítos de la cepa Prugnialud de *Toxoplasma*.

<u>Ratona</u>	<u>Dosis de bradizoítos</u> ⁽³⁾	<u>Neonatos</u>		<u>Resultado</u>
		<u>vivos</u>	<u>muertos</u>	⁽¹⁾
1	10 ³	2	1	-
2	10 ³	3	2	-
3	10 ³	nr ⁽²⁾	nr	-
4	10 ³	2	0	-
5	10 ⁴	4	2	-
6	10 ⁴	5	2	-
7	10 ⁴	0	8	-

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

⁽²⁾ nr= no registrado.

⁽³⁾ Para el desafío.

**MODELO MURINO DE INMUNIDAD CONTRA LA TOXOPLASMOSIS
CONGÉNITA. II) DETECCIÓN DE LA GESTACIÓN POR COLPOCITOLOGÍA,
SU COMBINACIÓN CON TAPÓN MUCOSO; TRANSMISIÓN CONGÉNITA
INICIADA CON QUISTES Y PROTECCIÓN PROTOTÍPICA.**

1. RESUMEN.

En el presente trabajo, se efectuaron diversos experimentos para refinar un modelo murino para el estudio de la inmunidad contra la toxoplasmosis congénita. Primero se intentó hallar un método para la datación de la gestación en las ratonas. Se estudió la colpocitología y su combinación con la visualización del tapón vaginal. Ninguno de los métodos ni su combinación, resultó útil, al contrario de lo afirmado por otros autores. Subsiste la necesidad de encontrar un método eficaz para la datación de la gestación.

Se testó por primera vez en ratones Balb/c ByJ la transmisión congénita de *Toxoplasma* originada por infecciones con números conocidos de bradizoítos. No existían antecedentes publicados. De 10 ratonas inoculadas oralmente con 10^3 bradizoítos de *Toxoplasma*, 5 transmitieron la infección a sus fetos. La transmisión originada por dosis tan bajas permite detectar la protección conferida por antígenos de inmunogenicidad limitada.

En un experimento de protección, todas las camadas resultaron protegidas. Este resultado es acorde con el único resultado publicado previamente. Este fue un experimento crucial para la viabilidad del modelo.



2. INTRODUCCIÓN.

Cuando la toxoplasmosis se contrae durante el embarazo por primera vez puede causar daño fetal en humanos y aborto en ovinos, cabras, cerdos y conejos (Dubey y Beattie 1988; Remington y Desmots, 1990). La incidencia de la toxoplasmosis congénita humana demostró ser de 1-6/1000 nacimientos. Aunque la mayoría de los recién nacidos afectados son asintomáticos al nacimiento, en una gran proporción de los pacientes afectados podrían desarrollarse secuelas adversas más adelante (Remington y Desmots, 1990).

Entre los diversos recursos que pueden utilizarse para prevenir la toxoplasmosis en animales y humanos, se ha invertido un considerable esfuerzo en desarrollar protección experimental mediante la vacunación en modelos animales (Nielsen et al, 2000).

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 et al, 1993, 1999; Freyre et al, 2001, 2003).

Es importante además, contar con más de un modelo para testar inmunógenos, ya que ha sido encontrado repetidamente que diferentes especies animales tienen respuestas inmunes divergentes al mismo inmunógeno (Gupta y Siber, 1995). En este sentido, para este propósito se testaron otras especies, particularmente los ratones Balb/c (Roberts y Alexander, 1992; Roberts et al, 1994; Thouvenin et al, 1997; Elsaid et al, 2001).

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. 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, es necesario continuar las investigaciones para consolidar el modelo murino de la toxoplasmosis.

Para ello, en el presente trabajo, se han ensayado otros métodos para la datación de la concepción. Este es un punto importante en la metodología, ya que la transmisión de una infección toxoplásmica es más frecuente cuando la inoculación con bradizoítos es llevada a cabo dentro de los días 10-15 de gestación (Roberts y Alexander, 1992; Roberts et al, 1994; Elsaid et al, 2001).

Por otra parte, se ensayó aquí por primera vez la transmisión congénita de una infección toxoplásmica, originada por números precisos de bradizoítos. Es importante el conocimiento de una dosis de desafío baja, que permita detectar inmunógenos de inmunogenicidad moderada, que podrían pasar inadvertidos si se usaran desafíos más severos. Por otra parte, el uso de un número preciso de

bradizoítos en el presente estudio se considera una ventaja con referencia a la reproducibilidad de los resultados, ya que se sabe que el número de bradizoítos contenidos en un quiste oscila desde unos pocos cientos a mil o más (Motomoura y Jo, 1970).

Además, en el presente estudio se investigó la protección conferida por una infección toxoplásmica iniciada antes de la concepción. Este fue un experimento crucial para la viabilidad del modelo de toxoplasmosis congénita en ratones Balb/c, ya que debía probarse que la ratona Balb/c gestante era capaz de montar una respuesta inmune efectiva, contra un desafío toxoplásmico.

De acuerdo a lo expresado, el **objetivo general** del presente trabajo fue optimizar el modelo ratón para el estudio de la inmunidad contra la toxoplasmosis congénita.

Los **objetivos particulares** fueron: 1. Determinar la eficacia del método de colpocitología, para la datación de la gestación en la ratona. 2. Determinar la eficacia de la combinación de los métodos de tapón mucoso y colpocitología para la datación de la concepción en la ratona. 3. Investigar la transmisión congénita durante la etapa aguda de la infección. 4. Indagar la protección mediante inmunidad co-infecciosa (= prototípica).

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

La indagación de la posibilidad del ratón como especie para un modelo murino de toxoplasmosis congénita comienza con las investigaciones de McLeod et al (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 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 muy moderada. Sin embargo, Fux et al (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, Brewer y Alexander (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 et al, 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.

3.1. LISTADO DE REFERENCIAS DE LA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

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.

Fux B, Ferreira AM, Cassali GD, Tafuri, WL, Vitor RWA. (2000). Experimental Toxoplasmosis in Balb/c Mice. Prevention of Vertical Disease Transmission by Treatment and Reproductive Failure in Chronic Infection. Mem Inst Oswaldo Cruz; 95: 121-26.

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: 1632-37.

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.

Roberts CW, Brewer JM, Alexander J. (1994). Congenital toxoplasmosis in the Balb/c mouse: Prevention of vertical disease transmission and fetal death by vaccination. Vaccine; 12: 1389-1394.

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. Parasitologia; 39: 279-283.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. MATERIALES.

4.1.1. Animales.

Se utilizaron ratones Balb/c ByJ de 18 gramos y ratones CF-1 de 20 gramos para el modelo y para los bioensayos respectivamente. Se obtuvieron del Laboratorio Jackson, Main Harbor, Michigan. Los ratones Balb/c ByJ fueron elegidos a causa de resultados favorables en experimentos previos de toxoplasmosis congénita con ellos (Roberts y Alexander, 1992; Roberts et al, 1994; Thouvenin et al, 1997; Fux et al, 2000; Elsaid et al, 2001).

Se enjaularon juntos ratones Balb/c ByJ, hembras y machos (4:1), para aparearse. Cuando se detectaba que una hembra estaba preñada, era enjaulada individualmente en una caja con un piso hecho de alambres de 2 mm de diámetro con una separación de 6 mm, y suspendida a una altura de 3 cm desde el fondo de la caja, para que los recién nacidos fueran automáticamente separados de su madre al momento del parto, previniendo así cualquier transmisión lactogénica de la toxoplasmosis. Estas cajas fueron denominadas "cajas de parición".

Los ratones estaban libres de infección toxoplásmica, lo que fue comprobado con la reacción de aglutinación directa (AD) para toxoplasmosis de Desmonts y Remington (1980).

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

4.1.2. Toxoplasma.

Se utilizó la cepa Prugniaud de *Toxoplasma* en los experimentos para inmunización y para desafío. Elegimos esta cepa porque otros autores (Zenner, 1993, 1999; Freyre et al, 2001, 2003) ya la habían usado en experimentos de transmisión congénita en la rata; además, esta cepa se mostró adecuada en experimentos previos no publicados del Laboratorio de Toxoplasmosis, en ratones Balb/c.

El método para obtener los quistes cerebrales fue el descrito por Freyre (2001). Los cerebros se homogeneizaron en PBS con pH de 7.2 en una jeringa hipodérmica por pasaje de la emulsión 12 veces a través de una aguja de calibre 19. Partes iguales de la emulsión y del fluido digestivo (Freyre, 1995), se incubaron a 37 ° C durante 5 minutos. Luego la mezcla se neutralizó con Na₂CO₃ al 1%, se centrifugó durante 15 minutos a 2000 rpm, y el sobrenadante se reemplazó por PBS a pH 7.2 con albúmina bovina al 0.6%. Se realizó una dilución 1/10 de la solución precedente, y se contaron los bradizoítos en un hemocitómetro. Las ratonas fueron inoculadas por boca con 10² o 10³ bradizoítos.



4.2. MÉTODOS.

4.2.1. Método para la detección de la infección trasplacentaria (bioensayos).

El bioensayo de los recién nacidos de ratonas Balb/c en ratones CF-1, se realizó como describen Freyre et al (2001, 2003). Una vez nacidas las camadas, los recién nacidos fueron sacrificados por dislocación cervical. Se utilizó los fetos de la mitad de las camadas que tuvieron ocho o más fetos, 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 estreptomina por ml en un homogeneizador de laboratorio, de aspas. Los homogeneizados se inocularon i.p. en 2 a 4 ratones por camada. Al cabo de 30 días, se buscaron anticuerpos antitoxoplásmicos mediante la reacción de aglutinación directa (AD) en el suero de los ratones. Se consideró que los fetos estuvieron protegidos, cuando las subinoculaciones de tejidos de recién nacidos resultaron negativas para *Toxoplasma*.

4.2.2. Método para la obtención de quistes toxoplásmicos, su numeración e infección de nuevos ratones.

El método para obtener los quistes cerebrales fue el descrito por Freyre et al (2001). Se procedió a la apertura de la bóveda craneana de un ratón al que se le indujo previamente una infección toxoplásmica crónica, y se extrajo una pequeña muestra (1/20) de su cerebro. Dicha muestra se colocó sobre una lámina portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos, realizando así un aplastado. Se buscaron quistes toxoplásmicos a 200 x. Si se encontraban suficientes quistes (=5 o más) se procedía a homogeneizar ese cerebro en jeringa con 1 cc de solución de PBS. A partir de ese homogeneizado se tomó una alícuota con pipeta automática de 25 microlitros, y se procedió a contar al microscopio la cantidad de quistes contenidos en ese volumen.

4.2.3. Medidas para la protección biológica de las personas involucradas en el proyecto.

Se aplicaron escrupulosamente las directivas de la Organización Mundial de la Salud para la salvaguardia de las personas involucradas en el presente proyecto de trabajo, contra el riesgo de infección toxoplásmica (Organización Mundial de la Salud. Informe de un comité de expertos de la OMS. Serie de Informes Técnicos 1994), así como las Normas de Bioseguridad del Laboratorio de Toxoplasmosis (Dpto. Parasitología, Fac. de Veterinaria de Montevideo).

4.3. EXPERIMENTOS.

4.3.1. Experimento N°1: Determinación de la eficacia del método de colpocitología para la datación de la concepción.

Se alojaron hembras con machos en relación 4:1. Este método se basó en la citología vaginal del ciclo estral (Allen, 1922). Al día siguiente que las hembras eran colocadas con un macho, se extraía una muestra de su exudado vaginal cada 2-3 días y se estudiaba bajo el microscopio. Se tomó como un indicador de gestación, la existencia de tres exudados consecutivos con una predominancia de leucocitos, en hembras que ciclaban regularmente. Quince días más tarde se verificó si efectivamente los tres exudados leucocíticos consecutivos se correspondieron o no con una gestación, por inspección del grado de dilatación abdominal. Se examinaron en total 98 ratonas.

4.3.2. Experimento N° 2: Combinación de los métodos de tapón mucoso y colpocitología para la datación de la concepción.

Se colocaron ratones con hembras en relación 1:1, para acelerar las montas. A partir de ese momento se realizó la revisión del tapón vaginal 2 veces al día. Una vez observada la presencia del tapón en la hembra, ésta se identificó a tal efecto y se dejó en compañía del macho, en una serie. En otra serie, se alojó a la hembra sola en una jaula. Se tomó como día 0 el correspondiente a la cópula y como día 1 el correspondiente a la presencia del tapón. Al 8º día posterior a la cópula, se realizó el hisopado vaginal de la hembra en busca de células leucocíticas. A la hembra que presentó este tipo celular en el exudado, se la continuó hisopando durante los días 9º y 10º posteriores a la cópula. La hembra que presentó 3 exudados vaginales leucocíticos consecutivos se consideró como gestante. Quince días más tarde se verificó por inspección del grado de dilatación abdominal, si efectivamente el tapón vaginal seguido de tres exudados leucocíticos consecutivos se correspondió o no con una gestación. Las hembras que presentaron células epiteliales en alguno de los tres hisopados se separaron del experimento para observar al día 15º posterior al diagnóstico del tapón si hicieron o no dilatación abdominal. Se estudiaron en total 47 ratonas.

4.3.3. Experimento N°3: Transmisión congénita durante la etapa aguda de la toxoplasmosis iniciada con dosis precisas de bradizoítos.

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 bradizoítos de la cepa Prugnialud de *Toxoplasma*, y alojadas individualmente en cajas de parición. Los ratones recién nacidos fueron bioensayados inmediatamente luego del nacimiento.

4.3.4. Experimento N° 4: Protección contra la toxoplasmosis congénita, inmunidad co-infecciosa (= prototípica).

Las ratonas Balb/c fueron inoculadas por boca con 10^4 bradizoítos de la cepa Prugniaud de *Toxoplasma*. Se alojaron cuarenta y cinco días después, en una caja con el macho (1:4). A los 12 días de gestación, recibieron 10^3 o 10^4 bradizoítos de la cepa Prugniaud por boca, y se enjaularon individualmente. Los ratones recién nacidos se bioensayaron inmediatamente luego del nacimiento. El experimento 3 se realizó simultáneamente, para servir como control.

5. RESULTADOS.

5.1. EXPERIMENTO N°1.

Colpocitología. Noventa y ocho ratonas Balb/c se examinaron por este método. La colpocitología permitió la detección temprana de la gestación en el 32% de ellas. En el 68% de las ratonas, (a) en el momento que se observaron 3 exudados con predominancia de leucocitos, las hembras tenían una gestación de más de 12 días de duración, y (b) algunas hembras con 3 exudados con predominancia de leucocitos no estaban preñadas.

5.2. EXPERIMENTO N° 2.

Combinación de detección del tapón vaginal y colpocitología. Cuarenta y siete ratonas Balb/c se examinaron por la combinación de estos dos métodos. Dicha combinación, permitió la detección temprana de la gestación en un 25% de ellas. En un grupo con un total de 27 ratonas que presentaron tapón mucoso, solamente el 39% tuvo 3 exudados vaginales consecutivos con presencia predominante de leucocitos (L), y al día 15° sólo el 22% de las hembras resultaron efectivamente preñadas. En otro grupo, de un total de 20 hembras que presentaron tapón mucoso, solamente el 60% tuvo 3 exudados vaginales consecutivos con predominio leucocítico, y al día 15° sólo el 30% resultaron efectivamente preñadas.

5.3. EXPERIMENTO N° 3.

Los resultados del Experimento 3 están resumidos en el Cuadro I. Se puede apreciar que de 10 ratonas inoculadas con 10^3 bradizoítos de la cepa Prugniaud de *Toxoplasma*, 5 transmitieron el parásito a sus fetos. En cambio, de 6 ratonas inoculadas con 10^4 bradizoítos, solo 2 transmitieron el parásito a sus fetos. En otra ratona más, no se registró el resultado.

5.4. EXPERIMENTO N°4.

Los resultados del experimento de protección están resumidos en el Cuadro II. Se puede apreciar que ninguna de 7 ratonas Balb/c ByJ inmunizadas 45 días antes de la concepción y desafiadas durante la gestación, transmitieron la infección a su descendencia. Sin embargo, ocurrieron mortinatos.

6. DISCUSIÓN.

El método de colpocitología para la detección de la concepción no fue útil. Este método no permitió una cantidad apreciable de detecciones de gestaciones de 12 días de duración, sino que además condujo a errores diagnósticos de gestación, como los ocurridos con la **combinación con el método de detección del tapón vaginal**. Estos son además métodos invasivos, una característica importante cuando se manejan cepas endogámicas de ratones. Es necesario continuar investigando para resolver este diagnóstico eficientemente.

Fue importante testar la transmisión de *Toxoplasma* en el modelo ratón, durante la etapa crónica de la infección (Br. Safern), para que se pudieran ejecutar ensayos de protección prototípica usando *Toxoplasma* vivo como inmunógeno. **En el experimento de protección**, todas las camadas estaban protegidas, aún contra dosis de 10^4 bradizoítos. Este resultado es acorde con el único resultado publicado previamente, excepto que no se comunicaron mortinatos con la cepa Beverley de *Toxoplasma* (Roberts y Alexander, 1992). Se quiso repetir el experimento de protección de Roberts y Alexander, 1992, porque los resultados pudieran haber sido diferentes con la cepa Prugniaud.

En el presente trabajo, el porcentaje de **transmisión congénita durante la etapa aguda** con un inóculo de 10^3 bradizoítos fue del 50%. 10^3 bradizoítos parece ser una dosis umbral. La menor frecuencia de transmisión observada en nuestro experimento, con el empleo de una dosis más alta, se debió sin duda a un número bajo de animales utilizados. Roberts y Alexander (1992) encontraron 20% de transmisión con un inóculo de 2×10^1 quistes (aproximadamente, 10^4 bradizoítos), Fux et al (2000), 87% con un inóculo de 2 quistes (aproximadamente, 10^3 bradizoítos) y McLeod et al (1988), 83% utilizando ratones Swiss Webster con un inóculo de 2×10^2 quistes (aproximadamente, 10^5 bradizoítos). Por consiguiente, al menos en 2 de los estudios referidos, los niveles más altos de transmisión son atribuibles al uso de dosis más altas de *Toxoplasma*.

Hubo un marcado efecto sobre la viabilidad de los fetos en los Experimentos 3 y 4 en los que ocurrieron mortinatos. Roberts et al (1994) comunicaron 46 % de mortinatos en ratonas inoculadas con *Toxoplasma* durante la gestación; la ocurrencia de mortinatos fue nula, en ratonas previamente inmunizadas. Elsaid et



al (2001) (un equipo con la misma afiliación de Fux et al, 2000) comunicaron 37-52% de mortinatos en madres inoculadas con *Toxoplasma* durante la gestación, con una reducción de 5% de mortinatos en el grupo de madres que recibieron el inmunógeno que resultó más protector. Este efecto es ejercido probablemente sobre la placenta, interrumpiendo el aporte de oxígeno y nutrientes al feto, y causando su muerte. Es posible además que otros mecanismos sean los responsables de los mortinatos. Los antígenos de *T. gondii* son potentes estimulantes de la producción del factor de necrosis tumoral - α (TNF- α) (Johnson, 1992), una citoquina que puede inducir aborto (Gendron et al, 1990). Además, los antígenos de *T. gondii* inoculados en hembras durante la gestación, son suficientes para inducir el aborto (Grimwood, 1983).

7. CONCLUSIONES.

En conclusión, en el presente trabajo, hemos encontrado en el modelo ratón, que la transmisión de la infección aguda durante la gestación ocurre con una frecuencia considerable. Esta es una condición favorable para la viabilidad del modelo murino de toxoplasmosis congénita. Asimismo, se pudo demostrar que la inmunización de las hembras con *Toxoplasma* vivo 45 días previos a la gestación y posterior desafío, ejerció un efecto protector en el 100% de los casos. Por otra parte, todavía no hemos podido definir un método eficaz para la datación de la gestación de la ratona. En conclusión, es necesario continuar las investigaciones para consolidar el modelo murino de toxoplasmosis congénita.

8. BIBLIOGRAFÍA.

- Allen, E. (1922). The oestrus cycle in the mouse. *Am J Anat*; 30(3): 297-348.
- Desmonts G, Remington JJ. (1980). Direct agglutination test for diagnosis of toxoplasma infection. Methods for increasing sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol*; 11: 562-568.
- Dubey JP, Beattie CP. (1988). *Toxoplasmosis of animals and man*. CRC Press, Boca Raton.
- Dubey JP, Shen K. (1991). Rat model of congenital toxoplasmosis. *Infect Immun*; 59: 3301-3302.
- 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.
- Freyre A. (1995). Separation of *Toxoplasma* cysts from brain tissue and liberation of viable bradyzoites. *J Parasitol*; 81: 1008-1010.

- Freyre A, Falcón J, Correa O, Mendez J, González M, Venzal J. (2001). Some factors influencing transmission of *Toxoplasma* in pregnant rats fed cysts. *Parasitology Res*; 87: 915-918.
- Freyre A, Falcón J, Correa O, Mendez J, González M, Venzal J. (2003). Fetal *Toxoplasma* infection after oocysts inoculation of pregnant rats. *Parasitology Res*, 89 (5): 352-3.
- Fux B, Ferreira AM, Cassali GD, Tafuri, WL, Vitor RWA. (2000). Experimental Toxoplasmosis in Balb/c Mice. Prevention of Vertical Disease Transmission by Treatment and Reproductive Failure in Chronic Infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 95: 121-26.
- Gendron RL, Nestel FP, Lapp WS, Baines MG. (1990). Lypopolysaccharide induced fetal resorption in mice is associated with the intrauterine production of tumor necrosis factor-alpha. *Reprod. Fertility*; 90: 395-402.
- Grimwood B, O'Connor G, Gasfar HA. (1983). Toxofactor associated with *Toxoplasma gondii* infection is toxic and teratogenic to mice. *Infect Immun*; 42: 1126-1135.
- Gupta RK, Siber GR. (1995). Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects. *Vaccine*; 13: 1263-1276.
- 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: 1632-37.
- Motomoura I, Jo K. (1970). Estimation of the Number of Parasites contained within a Cyst, and Growth and Distribution of Cysts in the Brains of Mice infected with *Toxoplasma gondii*. *Trop Med Nettai Igaku*; 12: 41-50.
- Nielsen HV, Innes EA, Petersen E, Buxton D. (2000). Strategies for development of vaccines against *Toxoplasma gondii*. In: Thomas PA, Petersen E (eds) *Congenital toxoplasmosis*. Springer, Berlin Heidelberg New York; 314-322.
- Remington JS, Desmonts G. (1990). Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO (eds) *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. Saunders, Philadelphia; 90-195.
- 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.

Roberts CW, Brewer JM, Alexander J. (1994). Congenital toxoplasmosis in the Balb/c mouse: Prevention of vertical disease transmission and fetal death by vaccination. *Vaccine*; 12: 1389-1394.

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. *Parassitologia*; 39: 279-283.

Zenner L, Darcy F, Cesbron- Delaw M, Capron A. (1993). Rat model of congenital toxoplasmosis: rate of transmission of three *Toxoplasma* strains to fetuses and protective effects of a chronic infection. *Infect Immun*; 61: 360-363.

Zenner L, Estaquier J, Darcy F, Maes P, Capron A, Cesbron-Delaw M. (1999). Protective immunity on the rat model of congenital toxoplasmosis and the potential of excreted-secreted antigens as vaccine components. *Parasit Immunol*; 21: 261-272.