

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**OPTIMIZACIÓN DEL MODELO RATA PARA EL ESTUDIO DE LA INMUNIDAD
CONTRA LA TOXOPLASMOSIS CONGÉNITA: UMBRAL DE LA TRASMISIÓN
CONGÉNITA**

por

Virginia VITABAR¹



TESIS DE GRADO presentada como
uno de los requisitos para obtener el título
de Doctor en Ciencias Veterinarias

MODALIDAD: Ensayo Experimental

ORIENTACIÓN: Medicina

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2012**



PÁGINA DE APROBACIÓN

TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente de Mesa:




Dr. Rodrigo Puentes

Segundo Miembro (Tutor):



Dr. Jesús Falcón
Prof. Adjto de Parasitología.

Tercer Miembro :

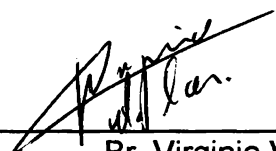


Dr. Alvaro Freyre
Prof. Adjto de Parasitología.

Fecha:

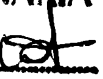
20/04/12

Autor:



Br. Virginia Vitabar

29528₂

FACULTAD DE VETERINARIA
Aprobado con 11 (once) 

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jesús Falcón, tutor de esta tesis, por su apoyo e instrucción.
Al Dr. Álvaro Freyre por su aporte invaluable.
A mi familia y amigos por su apoyo incondicional.

LISTA DE CUADROS:

Cuadro 1: Ensayos de transmisión trasplacentaria de *Toxoplasma* en ratas, por inoculación oral. (página 16)

Cuadro 2: Resultados de la transmisión congénita tras la inoculación de ratas Fischer gestantes con dosis mínimas de bradizoítos y ooquistes de 3 cepas de *Toxoplasma*.(página 20)

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE CUADROS	4
<u>RESUMEN</u>	6
<u>SUMMARY</u>	7
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	8
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	10
3. Cuadro 1.....	16
4. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	17
5. <u>RESULTADOS</u>	20
6. Cuadro 2.....	20
7. <u>DISCUSIÓN</u>	21
8. <u>REFERENCIAS</u>	23

El objetivo de la presente tesis fue contribuir a la optimización del modelo rata para la investigación de la inmunidad contra la toxoplasmosis congénita.

Se inocularon 18 ratas de la raza Fischer con 10^4 bradizoítos y otras 26 ratas con 10^2 ooquistes de las cepas Prugnialud, M3 y M7741 de *Toxoplasma*, hacia el día 12 de gestación. Se inocularon ratones con órganos procedentes de los recién nacidos. Veinticinco días más tarde se determinaron anticuerpos específicos en los ratones receptores. Se verificó la transmisión congénita de la toxoplasmosis en 33 a 83 % de las camadas nacidas. No se comprobó diferencias significativas en la tasa de transmisión de las distintas cepas y estadios de *Toxoplasma*.

Estos hallazgos permiten la detección de antígenos incluso de moderada inmunogenicidad en la futura investigación de vacunas contra *Toxoplasma*, ya que las bajas dosis utilizadas para el desafío en el presente trabajo, representan desafíos moderados. Por lo tanto, los resultados obtenidos representan un aumento en la utilidad del modelo en cuestión.

SUMMARY

The objective was to refine the rat model of congenital toxoplasmosis, by investigating the use of low doses for transmission of congenital toxoplasmosis. Eighteen rats were inoculated with 10^4 bradyzoites of *Toxoplasma*, of the strains Prugniaud, M3 and M7741. Another twenty six rats were inoculated with 10^2 oocysts of the same strains, around day twelve of pregnancy. Samples of organs from newborn rats were inoculated in mice. Twenty five days later, specific antibodies were tested in the recipient mice. Congenital toxoplasmosis was achieved in 33-83 % of the litters. Significant differences in the rate of transmission among the various *Toxoplasma* strains and stages, were not found. These findings allow the detection of antigens of even low immunogenicity in future *T. gondii* vaccine research, since the low doses used here, represent moderate challenges. Results obtained improve the utility of the model.

1. INTRODUCCIÓN

La significación de la toxoplasmosis humana

Los resultados de investigaciones llevadas a cabo por el equipo del Laboratorio de Toxoplasmosis del Departamento de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de Montevideo (LTFVM), indican que en Uruguay nacen cerca de 150 niños toxoplásmicos anualmente (Conti-Diaz y col, 1998; Freyre y col, 1992). 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 Falcón, 1989; Remington and Desmonts, 1990). En algunas regiones del globo, como en una zona del Brasil, cobra trascendencia la toxoplasmosis ocular. (Silveira y col., 2009).

La significación de la toxoplasmosis ovina

Por otra parte, los últimos estudios en el LTFVM sobre toxoplasmosis ovina indican que el aborto ovino toxoplásmico es responsable de pérdidas económicas en la industria ovina del Uruguay por un valor de 10 millones de dólares anuales (solamente la porción medible de dichas pérdidas) (Freyre y col 1999 a; Freyre y col 1996). Asimismo, la prevalencia de la infección del ganado ovino en el Uruguay, que se sitúa en el entorno del 25% (Freyre, 1998), 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 Falcón, 1989).

La prevención vaccinal de la toxoplasmosis.

Los perjuicios explicados se pueden prevenir mediante el uso de una vacuna, tanto en la esfera humana como en la producción ovina, con ventajas sobre otros medios preventivos.

Existe un método de profilaxis medicamentosa del aborto ovino, consistente en el agregado de monensin a la ración (Buxton, 1987). Sin embargo, este método no es aplicable en países como el nuestro, en el que los ovinos son mantenidos en un sistema de pastoreo extensivo, y el suministro de ración es excepcional. Existe asimismo una vacuna que ayuda a disminuir las pérdidas por el aborto ovino toxoplásmico (Buxton, 1993), pero que es altamente perfectible.

Uno de los métodos existentes para la profilaxis de la toxoplasmosis congénita humana que viene siendo aplicado inconsistentemente según las culturas, los países y cada una de sus instituciones de asistencia médica, reside en el seguimiento seroinmunológico de la embarazada para toxoplasmosis, y su eventual medicación para el caso que seroconvierta (Remington, Desmonts, 1990). Este método tiene la desventaja de que en realidad se trata de un método de prevención secundaria, y el tratamiento de la embarazada muchas veces sólo limita las lesiones ya producidas

por *Toxoplasma* en el feto , debido a la demora en el diagnóstico de primoinfección toxoplásmica de la embarazada y la instauración del tratamiento. También es un método cuyo éxito depende de la precocidad del ingreso de la embarazada al sistema asistencial, circunstancia que generalmente se ve demorada en los estratos sociales más pobres (Conti-Diaz y col, 1998).

El otro método es el de la educación sanitaria, cuya instalación adecuada y eficaz no carece de costos importantes (Remington and Desmonts, 1990), al igual que el método anterior.

La vacunación superaría con creces estos inconvenientes, por la certeza de su eficacia, su bajo costo económico y la posibilidad de ser aplicada antes del embarazo (Freyre, Falcón, 1989; Freyre, 1998; Nielsen, 2000; Remington and Desmonts, 1990). Desde distintos países se brega explícitamente por la aplicación de una vacuna para prevenir la toxoplasmosis congénita humana (Freyre, 1998; 06; Nielsen, 2000), incluyendo una reunión de expertos de la OMS (World Health Organization, 1994). El estado actual de los avances sobre una vacuna ha sido descrito recientemente (Kur y col., 2009).

En la presente tesis, se indaga la optimización del modelo de toxoplasmosis congénita en ratas. Tal es el **objetivo general** de la tesis.

El **objetivo particular** es determinar la transmisión de la toxoplasmosis congénita en el modelo rata, con dosis mínimas de quistes y ooquistes del parásito.

La **hipótesis que sustenta al objetivo particular** es que se puede lograr la transmisión congénita de *Toxoplasma*, a partir de una infección originada por dosis extremadamente bajas de bradizoítos y ooquistes de *Toxoplasma*.

Discusión

Estas dosis representan los futuros desafíos que se harán en ensayos vaccinales contra *Toxoplasma* , dentro del esquema: inmunización pre-gestacional de las ratas, desafío intra-gestación, y bioensayo de *Toxoplasma* en las camadas recién nacidas. Dichas dosis deben guardar proporcionalidad con respecto a las dosis infectantes supuestamente ingeridas en condiciones naturales por las personas. Por ejemplo, de acuerdo a Dubey y Thayer (1994) puede haber aproximadamente un quiste tisular por cada 50 g de carne de cerdo. Asimismo, es importante el conocimiento de una dosis 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, Jo, 1970).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Las vacunas existentes

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. Desde el LTFVM se ha contribuido a su refinamiento para la aprobación por el U.S.D.A. (Freyre y col, 1993). Tratándose de una vacuna a *Toxoplasma* vivo, su aplicación está pendiente de que pueda ser elaborada y distribuida en condiciones rentables. Asimismo está patentada la mutante ts-4 de *Toxoplasma* (United States Patent Office, 1982; Patente No. 4,473,549) , para la cual el LTFVM también ha colaborado (Frenkel y col, 1986), pero tampoco se ha llevado a la práctica porque 1) No se ha demostrado su eficacia para proteger contra la toxoplasmosis congénita, sino solamente contra desafíos mortales con *Toxoplasma* , y 2) Se trata de una vacuna viva, y se ha demostrado que tiene carácter persistente en los tejidos de huéspedes inmunodeprimidos (Sayles y Johnson, 1996). No existe una vacuna antitoxoplásmica de uso humano.

Respecto a la inmunización de ovinos contra el aborto toxoplásmico, desde la década de los 70, se sabía que la infección de una oveja con *Toxoplasma* antes de la concepción, la protegía contra el aborto, si era posteriormente desafiada durante la gestación (Beverley y Watson, 1971). Ello daba la pauta que eventualmente sería posible lograr la vacunación de las ovejas. La inmunización con taquizoítos de *Toxoplasma* inactivados por el formol, sin embargo, no protegió a las ovejas contra el aborto toxoplásmico (Beverley y col, 1971).

Diecisiete años luego de estos ensayos se desarrolló una vacuna en Nueva Zelanda contra el aborto ovino toxoplásmico que consiste en generar la inmunidad antitoxoplásmica mediante la inoculación de la cepa acistogénica de *Toxoplasma* S48 antes de la gestación. La cepa desaparece del organismo de los ovinos vacunados 6 semanas luego de la inoculación, y la inmunidad estéril que genera, protege contra desafíos heterólogos efectuados durante la gestación (Buxton, 1993). En 1988 en Nueva Zelanda, de 29 brotes de aborto ovino toxoplásmico, 9 (31%) sucedieron en majadas que habían sido vacunadas contra *Toxoplasma* (McKenzie, 1988). En condiciones controladas la vacuna demostró aproximadamente 72% de protección (corderos viables) en 64 ovejas inmunizadas, por comparación con ovejas no inmunizadas. No obstante, aunque muchos corderos nacieron viables, 2/3 de los fetos de ovejas vacunadas, se infectaron in útero con el inóculo de desafío que recibió la madre. La cepa vaccinal S-48 no puede generar la producción de ooquistes en gatos. Su efecto protector perdura por lo menos durante 18 meses. Tratándose de una vacuna viva, puede originar la infección humana, por lo que las embarazadas y personas inmunodeprimidas no deberían aplicarla. En 1992, se extendió el uso de esta vacuna al Reino Unido (Buxton, 1993).

También se ha ensayado la protección con subunidades antigénicas. Quince ovejas inmunizadas antes de la concepción con antígenos de superficie de *Toxoplasma* de 20, 32, 44 y 50 kDa incorporados a complejos inmunoestimulantes (ISCOMS), y desafiadas a los 90 días de gestación, presentaron una incidencia de mortalidad de sus corderos que no fue estadísticamente diferente a la observada en 13 ovejas no inmunizadas, pero inoculadas durante la gestación (Lunden, 1995).

2.2. Los ensayos vaccinales en el extranjero

2.2.1. Los modelos vaccinales contra la toxoplasmosis

Se han empleado varias especies de laboratorio para estudiar la inmunidad contra la toxoplasmosis congénita. También existen varios modelos, según cómo se mida la protección inmune. Existen modelos de protección contra desafíos mortales de *Toxoplasma*, contra la formación de quistes cerebrales del parásito, y contra la transmisión de la toxoplasmosis congénita. Lo cierto es que esta última situación es por lejos la más importante, tanto en la oveja como en la mujer. El diseño utilizado consiste en inmunizar a las futuras madres (ratonas, ratas, hamsters, cobayas) antes de la concepción, y desafiarlas durante la gestación, para luego intentar la recuperación de *Toxoplasma* a partir de los recién nacidos. Se constata así la transmisión transplacentaria de *Toxoplasma*, o por el contrario su ausencia, como reflejo de la protección inmunitaria alcanzada.

2.2.2. El uso del ratón para el modelo de toxoplasmosis congénita.

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 inmunizaron ratonas Swiss Webster con la mutante ts-4 de *Toxoplasma* por las vías subcutánea e intestinal (mediante laparotomía). Lamentablemente utilizaron una dosis de desafío desproporcionada en relación al peso corporal del ratón. Ello fué posiblemente la causa de la escasa protección obtenida. Pocos años después, Roberts y Alexander (1992) establecen 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 F. Safern (2003) en su tesis ejecutada en el LTFVM, sugieren que en el modelo ratón la transmisión de la infección crónica durante la gestación sucede en una escala muy moderada. Roberts y Alexander (1992) 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, con buenos resultados, aun cuando no han confirmado ni expandido sus resultados al presente. 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 (Roberts y col, 1994).

Se producen más recientemente estudios más detallados acerca de la utilización de distintos inmunógenos (todos derivados de la cepa RH) en el modelo congénito, (Thouvenin y col, 1997; Elsaid y col, 2001; Letscher-Brou y col, 2001; Mohamed y col, 2003;), pero la investigación de Roberts y col. en 1994 continúa siendo la única

que ha dado resultados auspiciosos. En los estudios de Mevelec y col. (2005), directamente no se impidió la transmisión vertical del parásito. Letscher-Brou y col. (2001) sólo estudian 3 y 6 camadas, y determinan 50% de reducción de la infección neonatal, ó 50% de aumento de la misma, dependiendo de la cepa de ratones utilizada. Thouvenin y col. (1997) sólo estudiaron 5 ratones, y no desde el punto de vista de la protección, sino de la respuesta inmune humoral y celular . En la investigación de Elsaid y col. (2001) , se obtuvo en el mejor de los casos 39% de infección neonatal . Subsiste la duda si estos resultados negativos se deben al empleo de dosis desproporcionadas de desafío vaccinal, o a la necesidad de utilizar simultáneamente más antígenos como inmunógenos. También se ha ensayado la inmunidad contra la toxoplasmosis adquirida en el modelo murino (Gigley y col., 2009).

2.2.3. Inmunógenos ensayados

Se posee considerable conocimiento acerca de los mecanismos implicados en la respuesta inmune contra la infección toxoplásmica en animales de experimentación (actualizados por Nielsen y col, 2000). Esto permite hacer una selección primaria de los antígenos toxoplásmicos potencialmente protectores, así como también seleccionar los adyuvantes teóricamente más apropiados (Gupta y Siber, 1995). A ello se suma el conocimiento detallado de la proteómica de los antígenos toxoplásmicos (Ma y col., 2009)

Así, estos estudios se han efectuado mediante distintas metodologías: vacunas génicas (o a DNA) (Nielsen y col, 2006), utilizando vectores (Caetano y col, 2006), por aplicación oral (Cong y col, 2005), empleando productos de células dendríticas (Dimier-Poisson y col , 2003), o empleando diversos adyuvantes como hidróxido de aluminio (Martín y col, 2004) u oligodeoxinucleotidos (CPG) (El-Malky y col , 2005) , o utilizando proteínas recombinantes derivadas de distintos organelos de *Toxoplasma* (Dziadek y col., 2009). Los resultados de protección han mostrado tasas bajas o nulas, con la excepción de las inmunizaciones prototípicas, realizadas experimentalmente con *Toxoplasma* totalmente viable, que dejan infección residual en los tejidos de los animales vacunados, y son por lo tanto, inaplicables en la práctica, aunque brindan información provechosa.

Durante cierto período, el uso de la mutante toxoplásmica ts-4 pareció promisorio para conferir protección, al menos contra desafíos letales en especies de laboratorio (Elwell y Frenkel, 1984). Sin embargo, la demostración de que esta mutante puede perdurar en el organismo de ratones medianamente inmunodeprimidos (Sayles y Jonson, 1996) , ha frenado el entusiasmo por efectuar más ensayos con ella.

La inmunización con vacunas génicas, la tecnología más avanzada hasta ahora utilizada, no ha dado sin embargo, tasas de protección superiores, y por lo tanto, no han sido utilizadas en la práctica (Angus y col,2000). En general en el campo de la vaccinología, los convincentes resultados preclínicos impulsaron las vacunas de ADN a la fase de ensayos clínicos para varias enfermedades humanas, a saber, la infección por el VIH, malaria, influenza, hepatitis B y cáncer. Si bien se demostró la inocuidad y la respuesta inmunitaria humoral y celular, en general, la potencia ha sido desalentadora (Liu, 2004).

Sin embargo, la utilización de taquizoítos toxoplásmicos irradiados con rayos gamma ha dado excelentes resultados de protección vaccinal. Existen importantes antecedentes que dan cuenta de las altas tasas de protección que se pueden obtener mediante la inmunización con taquizoítos toxoplásmicos gamma irradiados en ratones, incluso los obtenidos en el LTFVM (Freyre y col, 2006b). También se ha ensayado este inmunógeno con resultados favorables en cerdos (Dubey y col 1998). No obstante, en todas estas investigaciones, la protección se ha demostrado contra desafíos letales, o bien contra la formación de quistes toxoplásmicos cerebrales.

El principio rector de estos ensayos es aplicar una dosis de rayos gamma tal que no mata a *Toxoplasma*, permitiendo su ingreso a la célula huésped, lo cual desencadena una reacción inmune muy similar o idéntica a la suscitada por el parásito por completo viable, pero coartando definitivamente su capacidad de multiplicación, y extinguiéndose rápidamente de los tejidos del huésped, con lo cual no deja infección residual. Al igual que en el caso de la mutante ts-4, la razón que explica la elevada tasa de protección obtenida con *Toxoplasma* irradiado, y cuya aplicación ocasiona una clara diferencia cualitativa con respecto a los demás métodos explicados, es que con ellos dos se exponen todos los antígenos del parásito al sistema inmune del huésped vacunado.

2.3. Los avances a cargo del Laboratorio de toxoplasmosis de la Facultad de Veterinaria de Montevideo.

En materia de inmunidad contra la toxoplasmosis, los avances nacionales han estado representados por las investigaciones llevadas a cabo en el LTFVM, además de importantes aportes locales sobre otros aspectos de la enfermedad, a cargo de otros equipos de investigación nacionales, referidos por Conti-Díaz y col (1998), por ejemplo.

El modelo ratón para el estudio de la inmunidad contra la toxoplasmosis congénita se ha venido perfeccionando en el LTFVM, a través de sucesivas tesis de grado ya defendidas y plasmadas en una publicación (Freyre y col, 2006a). Los resultados de los experimentos llevados a cabo por Safern (2003) sugieren que en el modelo ratón, la transmisión de la infección toxoplásmica crónica durante la gestación sucede en una escala tan moderada que no interfiere mayormente con los resultados finales, lo cual viabiliza el modelo (de lo contrario, no se podría inmunizar previo a la gestación prototípicamente con cepas vivas y desafiar durante la gestación). Por otra parte, se determinó que hubo transmisión congénita de la toxoplasmosis durante la etapa aguda de la enfermedad iniciada con dosis precisas de bradizoítos (datos pasibles de ampliación) (Gonzalez, 2003). También se demostró en la misma tesis, que las ratonas inmunizadas previamente con cepas completas (protección prototípica) antes de la concepción y luego desafiadas con quistes de *Toxoplasma* durante la gestación, no transmitieron la infección a su descendencia. Posteriormente, se diseñó un método para el diagnóstico de la gestación en la ratona, basado en el aumento de peso corporal entre los días 9 y 12 de gestación, con 100% de sensibilidad, 67% de especificidad y alto valor predictivo positivo. También se demostró la transmisión originada por ooquistes de la Prugnialud de *Toxoplasma* (experimento a expandir), pero no con ooquistes de la cepa ME-49 (Bacci, 2005). Actualmente se investiga en el LTFVM sobre la

inmunidad cruzada entre la cepa RH, utilizada para inmunizar ratonas (con terapia sulfonamídica simultánea), y cepas de *Toxoplasma* se utilizan como desafíos gestacionales, en sus formas quísticas y ooquisticas.

Más recientemente, en el laboratorio citado se ha demostrado la influencia del tamaño de la dosis de desafío para que se haga patente o no, la capacidad protectora por parte de la cepa RH de *Toxoplasma* en el modelo congénito en ratas (Freyre y col, 2006c). También se ha demostrado la protección cruzada de la cepa RH en el modelo congénito en ratas, frente a desafíos con quistes y ooquistes toxoplásmicos de cepas del parásito pertenecientes a linajes genéticos diferentes, y procedentes de distintas áreas geográficas. También se ha contribuido al estudio de la inmunidad contra la toxoplasmosis adquirida en el modelo rata (Freyre y col, 2001,a,b,c; Freyre y col, 2004; Freyre y col, 2006b).

Recientemente, en el LTFVM se demostró prototípicamente la posibilidad de inmunizar corderos contra la formación de quistes tisulares de *Toxoplasma* lo que haría seguro el consumo de carne ovina desde el punto de vista de la toxoplasmosis, de traducirse estos resultados preliminares en un recurso práctico.

Las últimas investigaciones se hicieron en el marco del Proyecto PDT 78/01, intitulado "Ensayos preclínicos sobre una vacuna contra la toxoplasmosis congénita humana y ovina". Se diseñó una vacuna inactivada que demostró protección en los modelos murino BALB/c y cobayo, de toxoplasmosis congénita. La vacuna tiene prolongada vida de almacenamiento. Está diseñada para ser aplicada experimentalmente en tres dosis con quince días de separación entre ellas, y la protección inmune que confiere en el modelo cobayo, es de al menos diez meses. La vacuna fue diseñada de modo que sea farmacéuticamente apta para su aplicación en humanos y ovinos.

2.4. El modelo rata para el estudio de la inmunidad contra la toxoplasmosis connatal

La rata ha sido la especie más utilizada en el modelo de transmisión congénita (resumido en el punto 2.2.1). Dubey y Shen (1991), y Zenner (1999), ampliaron en un número limitado de animales algunos experimentos preexistentes sobre transmisión connatal de *Toxoplasma* en ratas gestantes inmunes y no inmunes, con las cepas Sprague-Dawley y Fischer. Los resultados en conjunto fueron: a) No obtuvieron transmisión connatal de la toxoplasmosis durante el período crónico de la infección, es decir, en ratas infectadas algunas semanas antes del inicio de la gestación; b) obtuvieron transmisión de *Toxoplasma* en todas las ratas infectadas durante la gestación, independientemente de si la inoculación de *Toxoplasma* se hizo del 7º al 15º día y de si se efectuó con 10^4 bradizoítos o con 10^4 ooquistes de *Toxoplasma*; c) la infección durante la gestación de ratas no inmunes, se transmitió cuando menos a 1/3 de la camada, en ocasiones a toda la camada; d) los fetos de las ratas inmunizadas antes de la gestación, quedaron totalmente protegidos contra desafíos efectuados durante la gestación.

En el LTFVM se ha ensayado la transmisión de la toxoplasmosis aguda durante la gestación en ratas no inmunes. Se utilizaron las mismas razas de ratas (Sprague-Dawley y Fischer). Se inoculó en el mismo momento de la gestación y se empleó el mismo bioensayo que los autores mencionados. Se obtuvo transmisión en el 0 al 70% de las ratas madres, empleando 12 cepas de *Toxoplasma* de diferente patogenicidad para el ratón, cada una en 4-14 ratas. Se observaron amplias variaciones individuales en la frecuencia de transmisión en ratas de la misma raza que recibieron inóculos similares. En dichos experimentos, la frecuencia de la transmisión no se vio afectada ni por la cepa, ni por la dosis de *Toxoplasma*, ni tampoco por el momento de la gestación en que fueron inoculadas (6-8 o 15 días) (Freyre y col, 2001a). También se demostró la baja frecuencia de la transmisión congénita de *Toxoplasma* en ratas gestantes portadoras de una infección crónica con el parásito (Freyre y col, 1999b). Estos hallazgos complementan las conclusiones internacionales obtenidas a partir del mismo modelo, ya referidas.

Sin duda, la raza de rata empleada tiene importancia en la tasa de transmisión de *Toxoplasma*. Así, se observó más transmisión en ratas Long Evans que en ratas Wistar. Paulino y col. (1999), obtienen tan sólo 11.4 % y 3 % de transmisión connatal en ratas Wistar y Holzman, respectivamente, inoculadas con 10^2 ooquistes de *Toxoplasma*. En 1999, Zenner y col. dan a conocer nuevas aplicaciones de su modelo en rata. Producen infecciones crónicas en ratas (n=5 a 10) antes de la gestación con las cepas RH, 76 K y Prugniaud. Luego las desafían durante la gestación en forma homóloga y heteróloga (aunque no enfrentan la inmunización con RH y el desafío con las cepas completas 76 K ó Prugniaud). Obtienen, en todos los casos, protección completa de las camadas (ausencia de infección toxoplásmica en ellas).

En ensayos subsiguientes de la misma publicación, inmunizan ratas (n=4 a 8) con extracto de taquizoítos RH en adyuvante de Freund incompleto, con taquizoítos RH viables, con taquizoítos RH irradiados, o bien con antígenos de secreción-excreción. Obtienen casi 100 % de protección, también en estos casos. Cabe destacar, sin embargo, que en esta nueva serie de ensayos, desafiaron con la cepa RH (cepa incompleta) y por una vía que no es la natural (puesto que por vía oral los taquizoítos son inactivados por el jugo gástrico). Este aspecto es muy importante. Así, por ejemplo Wilkins (1988) no consigue evitar la infección connatal (aunque sí evita el aborto) de corderos cuyas madres fueron inmunizadas con una cepa igualmente incompleta y desafiadas oralmente con la cepa completa S89. Ello, a pesar que el ovino es una especie considerablemente resistente a la infección toxoplásmica, como la rata.

Se sostiene que la rata sea también una especie adecuada para un modelo de estudio de inmunidad contra la toxoplasmosis connatal extrapolable a la mujer (Zenner 1993, 1999), porque debido a su resistencia natural contra *Toxoplasma*, es posible inmunizarla inclusive con cepas virulentas, sin necesidad de prevenir su muerte con terapia sulfonamídica.

Según Thiermann (1957) y Freyre y col.(1999-a) la rata también es favorable para el modelo en cuestión, debido a la muy baja transmisión connatal de *Toxoplasma* durante la etapa crónica de la infección en esta especie.

Las investigaciones de toxoplasmosis congénita experimental se resumen en el cuadro 1

3. Cuadro1.

Ensayos de transmisión trasplacentaria de *Toxoplasma* en ratas, por inoculación oral.

<u>Referencia</u>	<u>Cepa y estadio</u> ⁽¹⁾	<u>Camadas</u> ⁽²⁾	<u>recién nacidos</u> ⁽²⁾
Dubey y Shen, 1991 ⁽³⁾	ooq. CT-1	9/9	23/29
Zenner, 1993 ⁽⁴⁾	q. 76K q. Prugniaud	6/6 22/22	19/54 142/203
Dubey y col, 1997	ooq. VEG	4/4	
Kempf y col, 1999	q. NED	0/11 (ratas Lewis) 8/8 (ratas Fischer)	
Zenner y col, 1999	q. 76K q. Prugniaud	12/15 22/27	37/128 116/250
Freyre y col, 2001	q. de 13 cepas	97/221 (0 a 90% de transmisión)	

(1) q. = quistes ooq. = ooquistes

(2) N° de camadas o de recién nacidos infectados/N° total de camadas o recién nacidos investigados.

(3) También usaron la vía s.c. en experimentos similares.

(4) También usó la vía i.p. en otros experimentos.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Experimento N°1

Determinación de la transmisión congénita de *Toxoplasma* iniciada por dosis mínimas de bradizoítos y ooquistes.

En este experimento, 44 ratas gestantes fueron inoculadas con 10^2 ooquistes (26 ratas) y con 10^4 bradizoítos (18 ratas) de las cepas Prugnialud, M3 y M7741 de *Toxoplasma*, al día 12 de gestación. Al nacimiento, el hígado y los pulmones de los neonatos fueron bioensayados en ratones. Veinticinco días mas tarde, los ratones receptores fueron sangrados, y se investigaron anticuerpos específicos para *Toxoplasma* en sus sueros.

4.2. MATERIALES.

4.2.1. Animales

Se utilizaron ratas de la raza Fischer. Se trata de una raza endogámica que teóricamente daría resultados considerablemente homogéneos. Se utilizaron ratones de la cepa CF-1, de 20 gr de peso corporal, para obtener taquizoítos y bradizoítos de *Toxoplasma*, así como para los bioensayos. Se utilizaron gatos de la raza europea, obtenidos por donación.

Sólo se utilizaron ratas , ratones y gatos inicialmente libres de infección toxoplásmica. Se testaron muestras de suero de los animales mediante la reacción de aglutinación directa (AD) de Desmonts y Remington (1980), con el uso de 2-ME . Se interpretó como reactivo, un animal cuyo suero fuera positivo a la dilución 1:64 o mayor. 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 manos de los investigadores de esta línea (Freyre y col, 2006, a,b,c ; Freyre y col., 2001a,b; Freyre y col., 1999 a,b,).

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.

4.2.2. Cepas de *Toxoplasma*

Se utilizaron las cepas M-7741, aislada de un caso de aborto ovino toxoplásmico en Estados Unidos; la cepa M3, aislada de un caso de aborto ovino en Escocia, y la

cepa Prugniaud, aislada de un caso de toxoplasmosis congénita mortal en Limoges. Fueron caracterizadas por Freyre y col (2006 a,b,c,d). Se seleccionaron estas cepas sobre la base de su diversidad de origen geográfico y huésped, lo que puede asegurar la heterogeneidad del desafío.

4.3. MÉTODOS

4.3.1. Método para el diagnóstico de gestación de la rata

Para lograr la concepción de las ratas, se alojaron a razón de 1 macho cada 4 hembras. Al día siguiente se inspeccionaron las hembras mediante hisopado vaginal embebiendo el hisopo en NaCl 0.9%, y observando a 100 x el exudado vaginal recogido sobre un portaobjetos. Este método permite evidenciar los espermatozoides depositados en la vagina. Se repitió este procedimiento hasta que todas las ratas quedaron cubiertas. Este método fue posible porque las ratas no copulan durante las horas de luz, y en el bioterio del Laboratorio de Toxoplasmosis se mantiene un régimen de luz de 7 a 19 horas. Por lo tanto, el esperma eyaculado en la vagina por la noche, pudo ser puesto de manifiesto cada mañana siguiente. Si las ratas copularan con luz, no se podría garantizar que fuera posible observar el esperma, a veces hasta 24 horas más tarde de sucedida la cópula. Nueve días luego de la observación de esperma en cada rata, se pesaron las ratas presuntamente concebidas al día 9 y luego al día 12 de la supuesta gestación. Aquellos animales con una diferencia de peso mayor de 6g, fueron considerados como efectivamente gestantes. La gestación fue confirmada con el nacimiento de la descendencia. Ese método fue puesto a punto por C. Telechea (2012), en una tesis anterior.

4.3.2. Método para la detección de la infección trasplacentaria (Bioensayos).

Una vez nacidas las camadas, se subinocularon de inmediato en ratones. Para ello se utilizaron los hígados y pulmones de los neonatos. Se utilizaron los órganos de la mitad de las camadas que tuvieron ocho o más neonatos, y de toda la camada si ésta tuvo menos de ocho neonatos. El hígado y el pulmón de cada recién nacido fueron homogeneizados por pasaje 10 veces en una jeringa de 3cc., provista de una aguja 19 G, con 2 cc de NaCl 0.9% en agua. Cada homogeneizado fue inoculado i.p. en 2 ratones. Al cabo de 30 días, se buscaron anticuerpos antitoxoplásmicos mediante la reacción de AD en el suero de los ratones receptores. Se consideró que los neonatos estuvieron protegidos, cuando las subinoculaciones de sus tejidos resultaron negativas para *Toxoplasma*.

4.3.3. Obtención de quistes de *Toxoplasma*

Para la obtención de quistes de *Toxoplasma*, se inocularon ratones intraperitonealmente con quistes de cada una de las cepas mencionadas. Se

utilizaron estos ratones luego de 30-60 días de la infección, como dadores de quistes cerebrales. Los cerebros se homogeneizaron mediante pasaje en una jeringa con aguja 19G, con 1 cc de PBS por cerebro.

4.3.5. Liberación de bradizoítos viables.

Para este propósito, se utilizó el método de Freyre (1995). Los quistes fueron separados del tejido nervioso mediante 10 minutos de centrifugación a 3.500 rpm en solución 20% de dextran, y luego digeridos con pepsina. Los bradizoítos resultantes fueron neutralizados con bicarbonato 5% y enumerados en una cámara de Neubauer. Fueron inoculados a la dosis de 10^4 bradizoítos por animal.

4.3.6 Obtención de ooquistes de *Toxoplasma*.

Para la obtención de ooquistes del parásito, se inocularon gatitos recientemente destetados, negativos a la AD para toxoplasmosis a la dilución de 1:63. Procedieron del criadero del Laboratorio de Toxoplasmosis de la Fac. 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 concentraron por el método de Sheather modificado, y se incubaron con agitación en 2% de ácido sulfúrico durante 96 hs. hasta completar la esporulación. Previa neutralización y enumeración, los ooquistes fueron inoculados por boca en ratas, a la dosis de 100 bradizoítos por animal.

4.3.7. Análisis estadístico de los resultados

Las comparaciones de las tasas de transmisión entre cepas dentro de dosis y viceversa, se hicieron mediante el test exacto de Fisher o el test X^2 de homogeneidad, según el tamaño de las respectivas tablas de contingencia. En todos los casos el nivel de significación utilizado fué $\alpha = 0.05$.

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

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). Se aplicaron asimismo las "Normas de Bioseguridad del Laboratorio de Toxoplasmosis de la Facultad de Veterinaria," del 30 de abril del 2002.

5. RESULTADOS

Experimento N° 1:

Transmisión congénita con dosis mínimas de bradizoítos y ooquistes de *Toxoplasma*.

resultados del experimento sobre el uso de dosis mínimas (umbral) para la transmisión congénita de *Toxoplasma* en ratas, se exponen en el cuadro No.2. Cuatro de nueve, seis de ocho y seis de nueve ratas Fischer transmitieron la infección a sus fetos, tras la inoculación oral de 10^2 ooquistes de las cepas Prugniaud, M3 y M7741, respectivamente. Dos de seis, cinco de seis y cuatro de seis ratas Fischer transmitieron la infección a su descendencia, cuando recibieron 10^4 bradizoítos de las cepas Prugniaud, M3 y M7741, respectivamente. No hubieron diferencias de transmisión entre cepas, dentro de dosis, que fueran estadísticamente significativas ($P= 0.1$ a 0.8 , según los grupos). Tampoco existieron diferencias de transmisión entre dosis según estadios, dentro de cepas, que fueran estadísticamente significativas ($P=0.1$ a 1 , según los grupos).

6. Cuadro 2

Resultados de la transmisión congénita tras la inoculación de ratas Fischer gestantes con dosis mínimas de bradizoítos y ooquistes de 3 cepas de *Toxoplasma*.

<u>Dosis</u>	<u>CEPAS DE TOXOPLASMA</u> ⁽¹⁾					
	<u>Bradizoítos</u>			<u>Ooquistes</u>		
	<u>Prugniaud</u>	<u>M3</u>	<u>M7741</u>	<u>Prugniaud</u>	<u>M3</u>	<u>M7741</u>
10^2				4/9	6/8	6/9
10^4	2/6	5/6	4/6			

(1) Numerador: No. de ratas que transmitieron la infección congénita

Denominador: No. total de ratas inoculadas.

7. DISCUSIÓN

Una dosis de 10^4 brazidoítos de *Toxoplasma* fué suficiente como para que entre 1/3 y algo más de 2/3 (dependiendo de la cepa de *Toxoplasma*) de las madres inoculadas hicieran la transmisión congénita (cuadro 2). La dosis de 10^2 ooquistes de *Toxoplasma* fue suficiente para que, al menos con las cepas de *Toxoplasma* investigadas, se produjeran tasas de transmisión de casi 50% y superiores (cuadro 2), que se consideran suficientes a los fines experimentales en los grupos control de transmisión. No es confiable desde el punto de vista de la repetibilidad de los experimentos, ensayar dosis menores de 10^2 ooquistes. De modo que estas dosis mencionadas para bradizoítos y para ooquistes, pueden considerarse las dosis mínimas (o "dosis umbral") que aseguran un diseño experimental eficiente para el futuro ensayo de inmunógenos en el modelo de inmunidad contra la toxoplasmosis congénita.

En cuanto a unificar la transmisión congénita en la camada (globalmente) o desagregarla por cada recién nacido, es nuestra opinión que primariamente es suficiente con expresar los resultados por camada. Los resultados individuales por neonato, pueden dar una idea más aproximada de la potencia de la protección materna. En nuestra opinión, la expresión de los resultados por camada revela si la protección materna alcanzó o no para impedir la parasitemia o una intensidad tal de parasitemia que conduce a la invasión fetal. Que los fetos resulten efectivamente colonizados por *Toxoplasma*, dependería de factores ajenos a la respuesta inmune, tal como la integridad de la barrera mecánica que se interpone entre la circulación materna y la fetal. También puede depender de factores relacionados con la resistencia innata de los recién nacidos a *Toxoplasma*. En este sentido, cabe mencionar el experimento de Guerrero y col. (1995), en el que sólo se vieron quistes toxoplásmicos en el 20 al 80% de los frotis por aposición de ratas de la cepa Wistar de 1 día de nacidas, cuyas madres habían sido inoculadas con 10^5 a 10^7 ooquistes de *Toxoplasma*. Queda pendiente la pregunta, si los fetos en sus últimos días de gestación, serán diferentes en este respecto, a los neonatos.

Finalmente, cabe mencionar que no se investigó la influencia del día de inoculación durante la gestación de la rata, puesto que Dubey y Shen (1991) ya determinaron que no hay diferencias en la tasa de transmisión entre 7 y 13 días con 10^4 ooquistes de la cepa CT-1 por vía oral.

Como conclusión, puede afirmarse que se han cumplido los objetivos de la tesis, al haber identificado la magnitud de dosis umbral para la transmisión de la toxoplasmosis en el modelo toxoplasmosis rata.

En otras tesis realizada en la Facultad de Veterinaria de Montevideo (Lopez L 2007; Telechea,C..) , se ha tratado un aspecto complementario de los objetivos indagados en esta tesis, al determinar que las ratas de la raza Fischer, son capaces de montar una respuesta inmune que brinda protección considerablemente homogénea contra el desafío con varias cepas de *Toxoplasma*. , tras su inmunización prototípica con la cepa RH virulenta. Entre estas tesis, más los trabajos internacionales reseñados, se puede decir que el modelo rata Fischer para el estudio de la inmunidad contra la toxoplasmosis congénita, se encuentra casi totalmente configurado. Resta estudiar la eventual significación de la transmisión lactogénica en el modelo, así como los órganos de elección para realizar el bioensayo.

8.REFERENCIAS



1. Angus CW, Klivington-Evans D, Dubey JP, Kovacs J (2000) Immunization with a DNA Plasmid Encoding the SAG1 (P30) Protein of *Toxoplasma gondii* Is Immunogenic and Protective in Rodents. *J Inf Dis*; 181: 317-324.
2. Auletta FJ, Agins J, Scomegna A. (1978) Prostaglandin F mediation of the inhibitory effect of estrogen on the corpus luteum of the rhesus monkey. *Endocrinology* 103:1183-1189.
3. Bacci, F. (2005). Modelo murino de inmunidad contra la toxoplasmosis congénita. III) Diagnóstico de gestación por peso corporal y transmisión congénita iniciada por ooquistes. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria de Montevideo 30 p.
4. Beverley JKA, Archer JF, Watson WA, Fawcett AR. (1971). Trial of a killed vaccine in the prevention of ovine abortion due to toxoplasmosis. *Br Vet J*; 127:529-535.
5. Beverley JKA, Watson WA. (1971). Prevention of Experimental and of Naturally Occurring Ovine Abortion due to Toxoplasmosis. *Vet Rec*; 88: 39-41.
6. Büllow R, Boothroyd JC (1991) Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigen in liposomes. *J Immunol*; 147: 3496-3500.
7. Buxton D, Donald KM, Finlayson J. (1987). Monensin and the control of experimental ovine toxoplasmosis: a systemic effect. *Vet Rec*; 120:618-9.
8. Buxton, D. (1993). Toxoplasmosis: the First Commercial Vaccine. *Parasitol Today*, 9: 335-337.
9. Caetano BC, Bruna-Romero O, Fux B, Mendes EA, Gazzinelli RT. (2006). Vaccination with replication-deficient recombinant adenoviruses encoding the main surface antigens of *Toxoplasma gondii* induces immune response and protection against infection in mice. *Hum Gene Ther*; 17:415-2
10. Cong H, Gu QM, Jiang Y, He SY, Zhou HY, Yang TT, Li Y, Zhao QL. (2005). Oral immunization with a live recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* protects mice against *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol*. 27: 29-35.
11. Conti Díaz IA, 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.
12. Dimier-Poisson I, Aline F, Mevelec MN, Beauvillain C, Buzoni-Gatel D, Bout D. (2003). Protective mucosal Th2 immune response against *Toxoplasma gondii* by murine mesenteric lymph node dendritic cells. *Infect Immun*; 71: 5254-65.
13. Dubey JP, Lunn JK, Shen SK, Kwok OCH. (1998). Immunity to toxoplasmosis in pigs fed irradiated *Toxoplasma gondii* oocysts. *J Parasitol*; 84: 749-752.
14. Dubey JP, Shen SK, Kwok OCH, Thuilliez P (1997) Toxoplasmosis in rats (*Rattus norvegicus*): congenital transmission to first and second generation offspring and isolation of *Toxoplasma gondii* from seronegative rats. *Parasitol*; 115: 9-14.
15. Dubey JP, Thayer DW (1994). Killing of different strains of *Toxoplasma gondii* tissue cysts by irradiation under defined conditions. *J Parasitol*; 80: 764-767.
16. Dubey JP, Shen SK (1991) Rat Model of Congenital Toxoplasmosis. *Inf Immun*; 59:3301-3302.

17. Dziadek B, Gatkowska J, Brzostek A, Dziadek J, Dzitko K, Dlugonska H. (2009) *Toxoplasma gondii*: the immunogenic and protective efficacy of recombinant ROP2 and ROP4 rhoptry proteins in murine experimental toxoplasmosis. *Exp Parasitol.*; 123(1):81-9.
18. El-Malky M, Shaohong L, Kumagai T, Yabu Y, Noureldin MS, Saady N, Maruyama H, Ohta N. (2005). Protective effect of vaccination with *Toxoplasma* lysate antigen and CpG as an adjuvant against *Toxoplasma gondii* in susceptible C57BL/6 mice. *Microbiol Immunol*; 49: 646.
19. Elsaid MA, Martins MS, Frézard F, Braga E, Vitor R. (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.
20. Elwell MR, Frenkel JK. (1984). Immunity to toxoplasmosis in hamsters. *Am J Vet Res*; 45: 2668.
21. Falcón J, Freyre A. (2009). *Toxoplasma gondii*: prototype immunization of lambs against formation of muscle and brain cysts. *Vet Parasitol*; 166: 15-20.
22. Frenkel JK, Freyre A, Smith DD. (1986). Tests of non persistent *Toxoplasma* ts-4 vaccine in mice and hamsters: Appearance of immunity, vaccine persistence, and protection against transplacental infection: Program and Abstracts of the 61st Annual Meeting of the American Society of Parasitologists 55: Abstract Nr.88.
23. Freyre A, Falcón J, Méndez J, González M. (2006a). Refinement of the mouse model of congenital toxoplasmosis. *Exp Parasitol*; 113:154-60
24. Freyre A, Falcón J, Méndez J, González M, Lanzzeri S. (2006b). Susceptibility of Artificially Released Zoiters of *Toxoplasma gondii*, to Gamma Irradiation. *Res J Parasitol*; 1: 42-47.
25. Freyre A, Falcón J, Méndez J, Rodriguez A, Correa L, Gonzalez M. (2006c). Partial cross-protection among 4 strains of *Toxoplasma* against congenital transmission in a rat model. *Exp Parasitol*; 112: 8-12
26. Freyre A, Falcón J, Mendez J, González M. (2004). An investigation of sterile immunity against toxoplasmosis in rats. *Exp Parasitol*; 107:14-9.
27. Freyre A, Falcón J, Correa O, Mendez J, Gonzalez M, Venzal J. (2001a). 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. (2001b). Residual infection in the brains of rats fed cysts of 15 strains of *Toxoplasma*. *Parasitol Res*; 87: 915 – 918.
29. Freyre A, Bonino J, Falcón J, Castells D, Correa O, Casaretto A. (1999a). The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. *Vet Parasitol*; 81: 85-88.
30. Freyre A, Falcón J, Correa O, Mendez J, Gedda C. (1999b). Congenital transmission of experimental chronic toxoplasmosis in rats. *J Parasitol*; 85: 746-748.
31. Freyre, A.(1998) Vacunas contra *Toxoplasma*. Segundo Congreso Internacional de Toxoplasmosis. Santa Fé de Bogotá, Colombia, 1998. p. 1-5.
32. Freyre A, Bonino J, Falcón J (1997) Aborto ovino toxoplásmico: su significación económica en el Uruguay. *Prod. Ov.* 10:29-42.
33. Freyre A, Falcón J, Mendez J, Gedda C, D'Angelo JM (1996) Evaluación de las pérdidas económicas debidas a toxoplasmosis en ovinos en el Uruguay. *Parasitol Día*; 20:100-108.

34. Freyre A. (1995) Separation of *Toxoplasma* Cysts from Brain Tissue and liberation of Viable Bradyzoites. *J Parasitol*; 81: 1008-1010.
35. Freyre A, Choromanski L, Fishback J, Popiel R. (1993). Immunization of cats with tissue cysts, bradyzoites, and tachyzoites of the t-263 strain of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol*; 79: 716-719.
36. Freyre A, Queiruga G, Méndez J, Lavarello L. (1992). Riesgo de infección toxoplásmica del feto humano en Montevideo. *An Clínicos (España)*; 4: 122-127.
37. Freyre A, Falcón J. (1989). *Toxoplasmosis en las especies domésticas y como zoonosis*. Departamento de Publicaciones de la Universidad (Ed.) (Montevideo), 338 p.
38. Gigley JP, Fox BA, Bzik DJ. (2009). *Toxoplasma gondii* infection is effectively induced in genetically susceptible C57BL/6 mice by immunization with an attenuated type I vaccine strain. *Infect Immun*; 77: 5388
39. González, A. (2003). Modelo murino de toxoplasmosis congénita. II diagnóstico de gestación por colpocitología, colpocitología y tapón vaginal y dilatación abdominal; transmisión aguda de la toxoplasmosis congénita (infección con quistes). Tesis. Facultad de Veterinaria de Montevideo 12 p.
40. Guerrero OM, Chinchilla M, Castro A, Abrahams E. (1995) Age influence in the natural resistance of White rat and mice to the protozoan *Toxoplasma gondii*. *Rev Biol Trop*; 43:27-33.
41. Gupta RK, Siber GR. (1995). Adjuvants for human vaccines - current status, problems and future prospects. *Vaccine*; 13: 1263-1276.
42. Kempf MC, Cesbron MF, Deslee D, Hermann T (1999) Different manifestations of *Toxoplasma gondii* infection in F344 and LEW rats. *Med Microbiol Immunol*; 187: 137-142.
43. Kur J, Holec-Gasior L, Hiszczynska-Sawicka E. (2009). *Toxoplasma gondii*: the immunogenic and protective Current status of toxoplasmosis vaccine development. *Expert Rev Vaccines*; 8(6):791-808.
44. Letscher-Bru V, Pfaff AW, Abou-Bacar A, Filisetti D, Antoni E, Villard O, Klein JP, Candolfi E, Leyva R, Herion P, Saavedra R. (2001). Genetic immunization with plasmid DNA coding for the ROP2 protein of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res*; 87: 79.
45. Liu, MA. (2004). Vacunas de ADN: una revisión. *En: de Cuadros, C.A, vacunas. Publicación científica y Técnica No. 596. OPS, 437 pp.*
46. Lopez L, (2007) Protección contra la toxoplasmosis congénita en el modelo rata, mediante inmunidad estéril obtenida por dos métodos diferentes. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria de Montevideo; 21p.
47. Lunden A. (1995). Immune responses in sheep after immunization with *Toxoplasma gondii* antigens incorporated into iscoms. *Vet Parasitol*; 56: 23-35.
48. Ma GY, Zhang JZ, Yin GR, Zhang JH, Meng XL, Zhao F. (2009). *Toxoplasma gondii*: proteomic analysis of antigenicity of soluble tachyzoite antigen. *Exp Parasitol.*; 122(1):46.
49. Martin V, Supanitsky A, Echeverria PC, Litwin S, Tanos T, De Roodt AR, Guarnera EA, Angel SO. (2004). Recombinant GRA4 or ROP2 protein combined with alum or the gra4 gene provides partial protection in chronic murine models of toxoplasmosis. *Clin Diagn Lab Immunol*; 11: 704-10.
50. Mc Kenzie, J. (1988). Sheep abortions-Invermay 1988. *Surveillance*, 16 : 24.

51. McLeod R, Frenkel J, Estes R, Mack D, Eisenhauer P, Gibori G. (1988). Subcutaneous and intestinal vaccination with tachyzoites of *Toxoplasma gondii* and acquisition of immunity to peroral and congenital *Toxoplasma* challenge. *J Immunol*; 140:1632-1636.
52. Mevelec MN, Bout D, Desolme B, Marchand H, Magne R, Bruneel O, Buzoni-Gatel D. (2005). Evaluation of protective effect of DNA vaccination with genes encoding antigens GRA4 and SAG1 associated with GM-CSF plasmid, against acute, chronic and congenital Toxoplasmosis in mice. *Vaccine*; 23: 4499.
53. Mohamed RM, Aosai F, Chen M, Mun HS, Norose K, Belal US, Piao LX, Yano A. (2003). Induction of protective immunity by DNA vaccination with *Toxoplasma gondii* HSP70, HSP30 and SAG1 genes. *Vaccine*; 21: 2861
54. 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 (Nagasaki)*: 12:41-50.
55. Nielsen HV, D Cristina M, Beghetto E, Spadoni A, Petersen E, Gargano N. (2006). *Toxoplasma gondii*: DNA vaccination with bradyzoite antigens induces protective immunity in mice against oral infection with parasite cysts. *Exp Parasitol*; 112: 279.
56. Nielsen HV, Innes E A, Petersen E, Buxton D. (2000). Strategies for development of vaccines against *Toxoplasma gondii*. *In*: Thomas P.A., Petersen E. (eds.) *Congenital toxoplasmosis*. Springer, Berlin p 314-322.
57. Paulino JP, Vitor R (1999) Experimental congenital toxoplasmosis in Wistar and Holzman rats. *Parasite*; 6:63-66.
58. Remington JS, Desmonts G. (1990). Toxoplasmosis. *En*: Remington, JS, Klein JO. (Eds.) *Infectious Diseases of the Fetus and newborn Infant*. Saunders, Philadelphia, pp. 90-195
59. 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. *Parasitol* 104: 19-23.
60. 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.
61. Safern, B. (2003). Modelo murino de toxoplasmosis congénita. I. Diagnóstico de gestación por tapón vaginal, transmisión crónica de la toxoplasmosis congénita y protección prototípica. Tesis. Facultad de Veterinaria de Montevideo. 15 p.
62. Sayles PC, Johnson LL. (1996). Intact Immune Defenses Are Required for Mice To Resist the ts-4 Vaccine Strain of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*; 64: 3088-3092.
63. Silveira C, Gargano N, Kijlstra A, Petersen E. (2009). *Toxoplasma* vaccines: appropriate end points and sample size in future human clinical trials. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 7:905-8.
64. Telechea, C. (2012) Optimización del modelo rata para el estudio de la inmunidad contra la toxoplasmosis congénita: método para el diagnóstico de la gestación de la rata y frecuencia de la transmisión congénita. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria de Montevideo. Montevideo, Uruguay. 27 p.
65. Thiermann E. (1957) Transmisión congénita del *Toxoplasma gondii* en ratas con infección leve. *Biológica*; 23: 59-67.
66. Thouvenin M, Candolfi E, Villard O, Klein JP, Kien 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. *Parassitol*; 39: 279-83.

67. Wilkins M F, O'Connell E, Tepunga WA. Toxoplasmosis in sheep III. (1988) Further evaluation of the ability of a live *Toxoplasma gondii* vaccine to prevent lamb losses and reduce congenital infection following experimental oral challenge. *N Zeal Vet J*; 36 :86-89.
68. World Health Organization. Report on the Who Working group Meeting on Toxoplasmosis Vaccine Development and Technology. *Who/CDS/VPH/93.114*.
69. 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. *Inf Immun*; 61: 360-363.
70. Zenner L, Estaquier J, Darcy F, Maes P, Capron A, Cesbron-Delaw M (1999) Protective immunity in the rat model of congenital toxoplasmosis and the potential of excreted-secreted antigens as vaccine components. *Par Immun*; 21: 261-72.