



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**Evaluación histopatológica de la infección por
Toxoplasma gondii con la cepa Me49 en un modelo
murino**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga
Parasitóloga

AUTOR

Cristina Rocío MONTOYA HACHA

ASESOR

Juan Atilio JIMÉNEZ CHUNGA

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Montoya, C. (2017). *Evaluación histopatológica de la infección por toxoplasma gondii con la cepa Me49 en un modelo murino*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

892

15 s.m.
69



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS ✓

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA MICROBIÓLOGA PARASITÓLOGA** ✓
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)

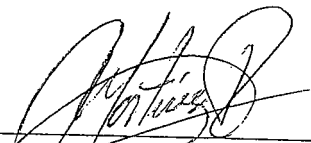
Siendo las 11:10 horas del 19 de julio de 2017 en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga de **CRISTINA ROCIO MONTOYA HACHA**.

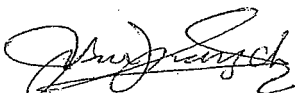
Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 017-EPMP-2017, el titulado expuso su tesis: **"EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA DE LA INFECCIÓN POR *Toxoplasma gondii* CON LA CEPA Me49 EN UN MODELO MURINO"**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 18....., calificativo: Aprobado con mención honorífica.....


Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga a **CRISTINA ROCIO MONTOYA HACHA** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

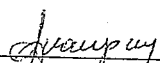
Siendo las 13:15 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 19 de julio de 2017.


Mg. ROSA MARTINEZ ROJAS
(PRESIDENTA)


Dr. JUAN JIMENEZ CHUNGA
(ASESOR)


Blgo. JOSE LOIS PINO GAVIÑO
(MIEMBRO)


Blga. ASUCENA NAUPAY IGREDA
(MIEMBRO)

A mi madre

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi familia mis padres, hermano, por su apoyo incondicional en todo momento sin ustedes no hubiera podido llegar hasta aquí.

A las grandes personas que me acompañaron en esta bonita etapa de mi vida: Carla T., Raúl Y., Diego M., Yaser A., Diego E., Giancarlo O., les agradezco por haberme acompañado y ser un gran apoyo durante todo este tiempo.

A los compañeros y amigos del laboratorio Miguel M., Cristhian H., Eleonora C., Gabriel S., con los que compartimos bonitos momentos y experiencias.

Un agradecimiento especial a mi asesor el Dr. Juan Jiménez Chunga por guiarme en este camino, por permitirme ser parte de grupos de investigación y transmitir sus conocimientos a todos los miembros del laboratorio.

Al Dr. Jaime Cok por su ayuda incondicional en este trabajo de investigación.

Al grupo de investigación en *Toxoplasma gondii* y al Laboratorio de Parasitología de Fauna Silvestre y Zoonosis por su colaboración y apoyo en la realización del presente trabajo de investigación.

Al fondo de investigaciones otorgado por Innóvate Perú a través del proyecto de investigación con contrato N° 137-PNICP-PIAP-2015.

A la Dra. Maritza Calderón y al equipo de investigación del proyecto de “Diagnóstico Inteligente de *Toxoplasma gondii* en pacientes inmunosuprimidos empleando nanopartículas” de la UPCH.

ÍNDICE GENERAL

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	4
2.2 Ciclo Biológico	4
2.2.1 Ciclo Sexual	4
2.2.2 Ciclo Asexual.....	4
2.3 Formas Infectantes de <i>Toxoplasma gondii</i>	5
2.3.1 Ooquistes.....	5
2.3.2 Taquizoítos	5
2.3.3 Bradizoítos.....	5
2.4 Toxoplasmosis.....	6
2.5 Reactivación de la Enfermedad	8
2.6 Modelo Murino	10
2.7 Técnicas de Diagnóstico.....	11
2.7.1 Pruebas Serológicas.....	11
2.7.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa.	12
2.8 Técnicas Histológicas.....	13
2.8.1 Coloración Hematoxilina Eosina.....	13
2.8.2 Inmunohistoquímica.....	14
III. HIPÓTESIS	15

IV.	OBJETIVOS	16
V.	MATERIAL Y MÉTODOS	17
VI.	RESULTADOS	26
VII.	DISCUSIÓN	45
VIII.	CONCLUSIONES.....	49
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
X.	ANEXO.....	60

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Distribución del grupo experimental	19
Tabla 2: Presencia de quistes en cerebros de ratón subgrupos A, B, C, y D	27
Tabla 3: Grado de infección observado en cerebros según el tiempo de infección.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Ratones con sintomatología de toxoplasmosis	26
Figura 2: Quistes con bradizoítos de <i>T. gondii</i> en sustancia gris de tejido cerebral....	28
Figura 3: Cerebro de ratones infectados e inmunosuprimidos sacrificados 15 días post inmunosupresión	30
Figura 4: Cerebro de ratones infectados e inmunosuprimidos sacrificados 30 días post inmunosupresión	32
Figura 5: Cerebro de ratones infectados e inmunosuprimidos sacrificados 45 días post inmunosupresión	34
Figura 6: Cerebro de ratones control: Infectados, no inmunosuprimidos.....	35
Figura 7: Cerebro de ratones control: No infectados, inmunosuprimidos	36
Figura 8: Cerebro de ratones control: No infectados, no inmunosuprimidos	36
Figura 9: A: Corazón de ratón infectado e inmunosuprimido (Grupo 1). B: Corazón de ratón no infectado, inmunosuprimido (Grupo 2). C: Corazón de ratón control, no infectado, no inmunosuprimido (Grupo 2).	37
Figura 10: A: Hígado de ratón infectado e inmunosuprimido (Grupo 2). B: hígado de ratón no infectado, no inmunosuprimido (Grupo 2). C: Inflamación observada en hígado de ratón no infectado, no inmunosuprimido (Grupo 2).	38
Figura 11: A: Pulmón de ratón infectado e inmunosuprimido (septos delgados) (Grupo 1). B: pulmón de ratón control (Grupo 2). C: Pulmón de ratón infectado e inmunosuprimido (septos gruesos) (Grupo 1). D: Pulmón de ratón control (Grupo 2).	39
Figura 12: A: musculo de ratón infectado e inmunosuprimido (Grupo1). B: musculo de ratón sano control. (Grupo 2).	40

Figura 13: A y B: Riñón de ratón infectado e inmunosuprimido. (Grupo 1) C: Riñón de ratón no infectado, inmunosuprimido (Grupo 2). D: Riñón de ratón control, no infectado, no inmunosuprimido (Grupo 2).	41
Figura 14: A: Bazo de ratón infectado e inmunosuprimido (Grupo 1). B: Bazo de ratón infectado, no inmunosuprimido (Grupo 2). C: Bazo de ratón no infectado, no inmunosuprimido (Grupo 2).	42
Figura 15: Equipos de laboratorio utilizados	63
Figura 16: A y B: Distribución de jaulas Bioterio Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM. C y D: Inmunosupresión de ratones aplicando el fármaco Dexametasona. .	64
Figura 17: A: Obtención de órganos de ratones. B: Lavado de órganos con solución salina	65
Figura 18: A: Batería de alcoholes (deshidratación) B: Elaboración de bloques en parafina.....	65
Figura 19: A y B: Realización de cortes histológicos	66
Figura 20: A: Batería de alcoholes (deshidratación) B: Elaboración de bloques en parafina.....	67

ÍNDICE DE GRÁFICAS

	Página
Gráfica 1: Flujograma de trabajo ratones infectados	21
Gráfica 2: Flujograma de trabajo ratones control	21
Gráfica 3: Resumen de metodología aplicada	23

RESUMEN

La toxoplasmosis es una zoonosis de amplia distribución mundial que afecta a un tercio de la población siendo las mujeres embarazadas y pacientes inmunosuprimidos, los más afectados. El hombre es un hospedero intermediario accidental que puede adquirir la infección por *Toxoplasma gondii* al ingerir alimentos o agua contaminada con ooquistes, carne mal cocida con quistes tisulares, y así, darse la conversión de taquizoítos en bradizoítos y la formación de quistes tisulares. El objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar el daño histopatológico producido por la cepa Me49 de *T. gondii*, bajo condiciones de inmunosupresión. Para ello se utilizaron 20 ratones hembras de la cepa Swiss Rockefeller de dos meses de edad los cuales fueron infectados oralmente con 20 quistes de la cepa Me49 de *T. gondii*. Fueron clasificados dos grupos: 1: ratones infectados e inmunosuprimidos ((A), (B), (C)); 2: (D) ratones infectados no inmunosuprimidos, (E) ratones no infectados e inmunosuprimidos y (F) ratones no infectados, no inmunosuprimidos. La inmunosupresión se realizó con dexamentasona (2 mg/ml) para los subgrupos A, B, C, E. Los ratones del grupo 1 (A, B, C), fueron sacrificados a los 15, 30 y 45 días post inmunosupresión respectivamente. Se obtuvieron diferentes tejidos: cerebro, corazón, hígado, pulmón, músculo diafragma, bazo y riñón, los cuales fueron colocados en PBS-formol al 10%, para luego ser procesados aplicando técnicas histológicas de inclusión en parafina, obteniéndose cortes de 3 micras mediante un micrótopo rotativo y coloreados con hematoxilina y eosina. Los resultados muestran que en los ratones del grupo 1 de acuerdo con el tiempo de inmunosupresión se evidenció un aumento del número de quistes en el tejido cerebral siendo las zonas de infección la corteza (sustancia gris). Los quistes tisulares presentaron un tamaño promedio de 10-23 micras, y la reacción inflamatoria se evidenció con la presencia de vasos periféricos con neutrófilos y linfocitos. En los cerebros de los ratones del grupo 2 D se observó quistes en la sustancia gris y vacuolización, con respecto a los cerebros de los ratones del grupo 2 E se evidenció calcificación en la sustancia gris. En los

cerebros del grupo 2F se observó tejido normal sin ningún tipo de alteración. Con respecto a órganos como pulmón e hígado se observó inflamación producto de la inmunosupresión. En conclusión los datos son importantes y comparativos para comprender mejor el daño histopatológico ocurrido por *T. gondii* bajo condiciones de inmunosupresión donde el modelo murino reproduciría la patología que pudiera suceder en el humano.

Palabras clave: *Toxoplasma gondii*, Me49, modelo murino, inmunosupresión, histopatología.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a zoonosis of global distribution which affects one third of the population being pregnant women and immunosuppressed patients, as patients with AIDS, the most affected. Man is an accidental intermediate host and can acquire the parasite by eating food or drinking contaminated water with oocysts, poorly cooked meat with tissue cysts, and begin the conversion of tachyzoites into bradyzoites and the formation of tissue cysts. The aim of this study was to evaluate the tissue damage caused by the Me49 strain of *T. gondii* in immunosuppressed Swiss Rockefeller mice using histopathology. In order to do this, we used twenty female Swiss mice (two-months old) that were orally infected with 20 cysts from Me49 strain of *T. gondii*. They were classified into two work groups: 1: infected and immunosuppressed mice ((A), (B), (C)); 2: (D) infected but not immunosuppressed mice, (E) not infected but immunosuppressed mice, (F) and not infected and not immunosuppressed mice. Immunosuppression was done using Dexamethasone (2 mg/ml) for subgroups A, B, C, E. mice from subgroups A, B, C were sacrificed at 15, 30, and 45 days post immunosuppression. Different tissues were extracted from mice: brain, heart, liver, lung, diaphragm muscle, spleen and kidney. The samples were fixed using 10% formalin-PBS and processed using the standard histology technique with 3 microns cuts and then colored with hematoxylin and eosin. The results showed in mice of group 1 according to the time of immunosuppression an increase in the number of cysts in the cerebral tissue was evidenced being the zones of infection the cortex (gray matter). Tissue cysts had an average size of 10-23 microns, and the inflammatory reaction was evidenced by the presence of peripheral vessels with neutrophils and lymphocytes. In brains of mice in group 2 D cysts were observed in the gray matter and vacuolization, with respect to the brains of the mice of group 2 E showed calcification in the gray matter. In the brains of the 2 F group normal tissue was observed without any alteration. In the other organs as lung and liver, inflammation was seen as a result of immunosuppression

These results are presented as important and comparative information to improve the understanding of the histopathologic damage changes caused by *T. gondii* under immunosuppressive conditions in which the murine model simulates that could happen in human patients.

Key words: *Toxoplasma gondii*, Me49, murine model, immunosuppression, histopathology.

I. INTRODUCCIÓN

La toxoplasmosis es una enfermedad ocasionada por el parásito intracelular obligado *Toxoplasma gondii* cuya distribución es universal siendo los felinos los hospederos definitivos, mientras que el hombre y otros animales de sangre caliente son hospederos intermedios (Hill y Dubey, 2002).

Las infecciones por *T. gondii* son ampliamente prevalente en seres humanos y animales de todo el mundo, encontrándose principalmente en climas templados y húmedos, afectando hasta el 30% de la población (Dubey, 1998; Muñoz y Mondragón, 2009).

La mayoría de las infecciones en humanos son asintomáticas, sin embargo, el parásito puede producir enfermedad grave (Hill y Dubey, 2002) como sucede en pacientes inmunosuprimidos y mujeres embarazadas.

Se puede adquirir *T. gondii* al ingerir ooquistes excretados por el hospedero definitivo por medio de agua contaminada, vegetales mal lavados o el contacto directo con la tierra contaminada con ooquistes. Sin embargo, la infección se puede dar también por la ingesta de quistes tisulares contenida en la carne poco cocida, además, *T. gondii* puede sobrevivir en animales destinados al consumo humano durante años como quistes tisulares (Hill y Dubey, 2002). Otra forma de infección descrita es por transfusión sanguínea (Martín y García, 2003).

Las mujeres embarazadas constituyen el grupo poblacional en el cual la adquisición de la toxoplasmosis repercute en una forma más notoria, debido al riesgo de transmisión para el hijo; constituyéndose en una importante causa de morbilidad y de mortalidad neonatal (Reátegui y Vela, 2011).

También se conoce que la toxoplasmosis se ha convertido en una de las infecciones oportunistas más comunes del sistema nervioso central en pacientes con SIDA, siendo el genotipo Tipo II (cepa Me49) el de mayor frecuencia en el humano (Howe y Sibley, 1995). En este caso es de considerar como resultado de la reactivación de la infección

latente, pero los mecanismos de reactivación son hasta la fecha desconocidos (Dubey *et al.*, 1998).

Entre el 10-50% de los pacientes infectados con VIH/SIDA y con serología positiva para *T. gondii* desarrollan encefalitis toxoplásmica (TE), con casi un 50% de secuelas neurológicas y cuya mortalidad se acerca al 20% (Pérez *et al.*, 2004), sin embargo, también puede involucrar diversos órganos y tejidos como tracto gastrointestinal, pulmones, miocardio, cerebro y ojos. Estos porcentajes la convierten en la segunda infección oportunista más común que afecta a pacientes VIH positivos como describen Martín y García (2003).

El objetivo del presente trabajo fue determinar el daño histopatológico que produce *T. gondii*, bajo condiciones de inmunosupresión siendo necesario e importante aplicar estas herramientas histológicas, ya que nos permite entender de qué manera se evidencia la alteración celular y reacción inflamatoria, en el órgano o tejido blanco, ya que estos no son evidentes a simple vista, donde el modelo murino representaría lo que pudiera suceder en el humano.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado de distribución mundial encontrándose principalmente en climas templados y húmedos, afectando hasta el 30% de la población (Dubey 1998, Muñiz y Mondragón 2009).

T. gondii tiene como hospederos intermediarios a unas 200 especies de vertebrados incluyendo al hombre, lo cual determina su importancia en el ámbito de la medicina. Tiene como hospederos definitivos a los gatos y otros felinos en los que completa su ciclo biológico en el intestino delgado. (Acha y Szyfres, 2003)

De acuerdo con Blader y Saeij (2009) *Toxoplasma* ha sido clasificado en tres linajes clonales (tipo I, II y III). Cada cepa del parásito abarca una línea clonal cuyos miembros poseen una secuencia de ADN idéntica. El de tipo I (cepa RH) es el de mayor virulencia, las de tipo II (cepa Me49) y III (VEG) son de menor virulencia. La mayoría de las cepas aisladas en pacientes con SIDA son de tipo II, mientras que los pacientes que desarrollan enfermedad congénita poseen cepas tipo I y II. El genotipo III se aísla mayormente en animales (MEDICINE, 2010).

Clasificación taxonómica (NCBI):

Filo	Apicomplexa
Clase	Coccidia
Orden	Eucoccidiorida
Suborden	Eimeriorina
Familia	Sarcocystidae
Género	Toxoplasma
Especie	<i>Toxoplasma gondii</i>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5811>

2.2 CICLO BIOLÓGICO

El ciclo biológico del *T. gondii* se divide en dos partes: un ciclo sexual que ocurre solamente en las células epiteliales del intestino delgado del hospedero definitivo (miembros de la familia Felidae) y un ciclo asexual que ocurre en los tejidos extraintestinales de los hospederos intermediarios: animales de sangre caliente (Acha y Szezfres, 2003) (Ver Anexo 10.1).

2.2.1 CICLO SEXUAL: Cuando los quistes tisulares son ingeridos por los gatos, la pared de éstos sufre proteólisis y los bradizoítos se liberan en el estómago e intestino delgado, algunos penetran la lámina propia y vuelven a su estado de taquizoíto para multiplicarse y luego diseminarse (Barragan y Sibley, 2003); otros penetran la célula epitelial y se transforman en esquizontes (asexuales), que liberarán merozoitos, los que posteriormente darán lugar a gametos femeninos y masculinos, estos últimos penetran en el gameto femenino y lo fertilizan iniciando así la reproducción sexual con la formación de la pared del ooquiste alrededor del gameto fertilizado; al madurar el ooquiste irá a la luz intestinal, rompiendo la membrana celular del enterocito (Dubey 2004) (Pérez *et al.*, 2011). Los gatos pueden arrojar millones de ooquistes después de ingerir sólo un bradizoíto (Dubey, 2009).

2.2.2 CICLO ASEXUAL: se presenta en los hospederos intermediarios al ingerir alimentos o agua contaminada con ooquistes, y carne mal cocida con quistes tisulares. Es en esta etapa que se evidencia la transformación de los taquizoítos en bradizoítos y la formación de los quistes tisulares. Los quistes poseen una pared, compuesta por carbohidratos, resistente a la acción enzimática; en su interior se aloja una cantidad variable de bradizoítos cuya división celular es lenta (Dubey *et al.*, 1998).

2.3 FORMAS INFECTANTES DE *Toxoplasma gondii*:

2.3.1 OOQUISTES

Los ooquistes provienen de la reproducción sexual del parásito, los cuales se forman solamente en el epitelio intestinal de los hospederos definitivos para ser seguidamente expulsados con las heces (Cerro, 2007). Los ooquistes bajo condiciones ambientales como suficiente aireación, humedad y calor esporulan entre los 1-5 días (Tenter *et al.*, 2000). Los ooquistes esporulados poseen dos esporoquistes con cuatro esporozoitos cada uno (Islachin, 2015) y miden de 10 a 12 μm de diámetro (Dubey, 1998).

2.3.2 TAQUIZOÍTOS

Obtiene su nombre del griego *tachos*, que significa “rápido” por su reproducción muy rápida. Se presenta en la fase aguda de la infección, y es intracelular, de localización en diversas células con excepción de los eritrocitos (Romero, 2007). El taquizoíto tiene forma de media luna, aproximadamente 2 por 6 μm , con un extremo anterior conoidal y cuyo extremo posterior es redondeado. El taquizoíto se multiplica asexualmente por divisiones binarias repetidas hasta que la célula hospedera se rompe (Dubey, 2004).

2.3.3 BRADIZOÍTOS

Su nombre proviene del griego *bradis* que significa “lento”. Es la forma de replicación lenta del parásito. Los bradizoítos se encuentran dentro de los quistes tisulares protegidos por una cubierta gruesa de origen extracelular. Su aparición marca la fase crónica de la infección y puede persistir por muchos años. (Gállego, 2006).

Los quistes tisulares presentan tamaños entre los 5 y 70 μm (Hill y Dubey, 2015).

La rotura de los quistes seguida de la liberación de bradizoítos en un hospedador inmunocompetente reactiva la respuesta inmunológica de tal manera que impide el retorno a la fase aguda, manteniendo así la resistencia del hospedador frente a nuevas infecciones (Gállego, 2006). Sin embargo, en un hospedador inmunosuprimido se evidencia la reactivación de la fase aguda.

2.4 TOXOPLASMOSIS

La toxoplasmosis es una zoonosis parasitaria de amplia distribución mundial cuya seroprevalencia varía de 5 al 90% dependiendo de la localización geográfica, hábitos alimenticios, así como hábitos de higiene (Miller, 2009). Es de importancia veterinaria y médica, ya que puede causar aborto o enfermedad congénita en sus hospedadores intermediarios (Tenter *et al.*, 2000) y ser la infección oportunista más común del SNC (Sistema Nervioso Central) en pacientes con SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida) (Pérez, 2004) ocasionando reactivación de la infección crónica (Ver Anexo 10.2).

La infección puede ser adquirida de varias formas, principalmente por vía oral a través del consumo de ooquistes excretados por el gato o quistes tisulares en carne mal cocida. Entre los medios para la ingestión de estos se han identificado los vegetales mal lavados y el contacto directo con tierra; aunque en un alto porcentaje de casos no se identifica la infección (López, 2005). Otra vía de transmisión conocida es por medio de trasplante de órganos (Weiss y Dubey, 2009).

En mujeres embarazadas, existe el riesgo de la toxoplasmosis congénita, que resulta de la transmisión transplacentaria de *T. gondii*, siendo generalmente, la infección asintomática en la madre, pero en el feto, se expresa como una enfermedad con diversos grados de severidad dependiendo del momento de la infección llevando a la mortalidad; en caso del niño infectado se puede evidenciar microcefalia, hidrocefalia y calcificaciones cerebrales (Pérez, 2011).

En pacientes con SIDA se evidencia una disminución continua de linfocitos CD4+, lo que conlleva a un deterioro lentamente progresivo del sistema inmunológico. Una de las consecuencias de este hecho es la aparición de infecciones oportunistas con una importante morbilidad y mortalidad (Martín y García, 2003). La reactivación de la

infección latente producida por *T. gondii* en el SNC se observa con una frecuencia que oscila entre el 3 y 40% en estos pacientes y sus manifestaciones clínicas más frecuentes son cefalea, déficit neurológico focal, cuadros convulsionales entre otros (Dimas y Hernández, 2002).

2.5 REACTIVACIÓN DE LA ENFERMEDAD

En pacientes con SIDA, la toxoplasmosis encefálica es más frecuente debido a la reactivación de la infección latente; sin embargo, el mecanismo que da lugar a la reactivación de la enfermedad en los pacientes inmunocomprometidos no está claro (Khan, 1999). Se estima que un tercio de las personas infectadas por el VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana) con anticuerpos anti-toxoplasma IgG séricos desarrollan encefalitis toxoplasmática (Walker y Zunt, 2005).

La mayoría de los casos de toxoplasmosis en enfermos con SIDA que se han reportado se relacionan con infección del sistema nervioso central, afectando el estado mental, la función neurológica, la visión, la audición y llegando hasta la muerte (Luft *et al.*, 1993). Martin y García (2003) describen que el riesgo de padecer toxoplasmosis cerebral comienza cuando los niveles de linfocitos CD4 descienden por debajo de 200 células/ μ L, haciéndose máximo por debajo de 100 células/ μ L. Por ello, cuando el equilibrio entre las defensas inmunitarias del hospedero y el parásito se interrumpe, la ruptura del quiste y la proliferación del parásito pueden ocurrir llevando a la reactivación clínica (Djurković-Djaković y Milenković, 2001).

Las manifestaciones clínicas de la toxoplasmosis encefálica incluyen cambios en el estado mental, convulsiones, déficits motores focales, trastornos de los nervios craneales, anomalías sensoriales, trastornos del movimiento y hallazgos neuropsiquiátricos (Montoya y Liesenfeld, 2004).

Se ha demostrado que la retinitis toxoplásmica es la segunda localización de la toxoplasmosis en pacientes con SIDA y es la segunda causa de retinitis en esta enfermedad. La retinitis toxoplásmica en los pacientes con SIDA se presenta como una retinitis necrotizante, con uno o varios focos blanquecinos o blanco-amarillentos, de límites borrosos. (Martin y García, 2003).

La infección en individuos inmunocompetentes generalmente no presenta síntomas, sin embargo, existen grupos en riesgo que son susceptibles a reactivar una infección previa

que puede llegar a ser fatal. Dentro de estos grupos de riesgo están los pacientes con SIDA, los que han recibido trasplantes de órganos y las mujeres embarazadas. Por esta razón para comprender mejor los efectos a largo plazo y la patogénesis de esta infección cerebral común y persistente, se han realizado estudios en ratones con diferentes cepas de *T. gondii* y modelos murinos (Hermes *et al.*, 2008).

2.6 MODELO MURINO

El ratón de laboratorio es ampliamente utilizado como organismo modelo en diversos campos de la biología. Su importancia en la investigación de temas relacionados con la salud humana, como modelos espontáneos o inducidos de enfermedades genéticas congénitas o esporádicas y con el mejoramiento animal se encuentra profusamente documentada (Hinrichsen y Di Masso, 2010).

El uso de modelos murinos para el estudio de la toxoplasmosis generó información importante (Soto, 1999) ya que, en la naturaleza, los ratones son hospederos intermediarios de *T. gondii*. Esto sugeriría que la respuesta inmune del ratón está bien adaptada en términos evolutivos, para hacer frente de manera óptima con este parásito en particular. Además, el ciclo de vida del parásito en ratones se parece mucho al de los humanos (Denkers y Gazzinelli, 1998).

Al emplear el modelo murino se opta por utilizar un inóculo de 10 a 20 quistes, ya que un inóculo de este tamaño produce regularmente infección constante sin mortalidad, mientras que los inóculos mayores (> 20) producen mortalidad a menos que se traten con sulfadiazina (Djurković-Djaković y Milenković, 2001). El tiempo de infección varía desde las 4 semanas a 22 meses; así mismo son utilizadas como vía de infección la oral, intraperitoneal e intracerebral (Hofflin *et al.*, 1987; Gatkowska *et al.*, 2011; Hermes, 2008 y Dubey *et al.*, 2016).

Sin embargo, la comparación entre los modelos murinos no siempre es simple y depende de la cepa del parásito y la vía de infección, así como de los factores del hospedero (Szabo *et al.*, 2016).

2.7 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Existen grupos de individuos en los que el diagnóstico de toxoplasmosis es más crítico: mujeres embarazadas que adquieren su infección durante la gestación, fetos y recién nacidos con infección congénita y pacientes inmunocomprometidos (Remington *et al.*, 2004).

2.7.1 PRUEBAS SEROLÓGICAS

El uso de pruebas serológicas para la demostración de anticuerpos específicos contra *T. gondii* es el método inicial y principal de diagnóstico (Ver Anexo 10.3). En diferentes pruebas serológicas a menudo miden anticuerpos que poseen patrones únicos de aumento y disminución con el tiempo después de la infección. Generalmente, se requiere una combinación de pruebas serológicas para establecer si un individuo ha sido infectado recientemente o no (Montoya, 2002).

2.7.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Debido a las limitaciones inherentes de los métodos de diagnóstico tradicionales, se puede utilizar la PCR, además de la serología, para el diagnóstico de *T. gondii*. La PCR es un eficiente método *in vitro* de amplificación enzimática que permite la amplificación específica del ADN de pequeñas cantidades de material de partida en un corto tiempo (Liu *et al.*, 2015), tanto en fluidos corporales y tejidos se ha utilizado con éxito para diagnosticar toxoplasmosis congénita, ocular, cerebral y diseminada.

La PCR ha revolucionado el diagnóstico de infección intrauterina de *T. gondii* al permitir un diagnóstico precoz, evitando así el uso de procedimientos más invasivos en el feto; así mismo, ha permitido la detección en el tejido cerebral, líquido cefalorraquídeo (LCR), líquidos vítreos y acuosos, líquido de lavado broncoalveolar (BAL) y sangre en pacientes con SIDA (Montoya, 2002).

La prueba de PCR en líquido amniótico es definitivamente más sensible que otras técnicas convencionales, ya que estas presentan dificultad en establecer un diagnóstico seguro y oportuno, por esto se ha implementado ésta técnica en la detección de la toxoplasmosis, aportando un progreso indiscutible en aquellos casos donde los exámenes clínicos y serológicos presentan limitaciones (Hortúa *et al.*, 2000).

2.8 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

El primer cuadro histológico fue descrito por primera vez por Piringer-Kuchinka en 1952 sin tener conocimiento de que fue causado por toxoplasmosis. Pero no fue hasta 1955 que fue demostrado por Grtinroos, Ollila y SaxCn (según Miettinen, 1981).

Las técnicas histológicas son utilizadas hasta la fecha debido a que permite entender la alteración celular, reacción inflamatoria, que no son evidentes a simple vista. Como confirman Barreto *et al.* (2015), las técnicas histológicas han sido y son necesarias para buscar lesiones histológicas causadas por la infección de *T. gondii*.

2.8.1 COLORACIÓN CON HEMATOXILINA EOSINA

Se basa en la detección de lesiones causadas por el parásito utilizando técnicas histológicas convencionales mediante la tinción de cortes histológicos con hematoxilina y eosina. Pueden observarse lesiones características de la infección o lesiones compatibles con ella (Valencia, 2006).

Numerosos estudios muestran el daño en el tejido cerebral de los ratones. La evaluación histológica muestra presencia de células inflamatorias como los neutrófilos y células plasmáticas, y vasos sanguíneos rodeados de infiltrados celulares bien desarrollados. Se reporta con frecuencia la meningoencefalitis. El espectro de los hallazgos histológicos observados en el modelo murino es similar al observado en los cerebros de seres humanos con encefalitis toxoplasmática (Hofflin *et al.*, 1987) (Ferguson *et al.*, 1991).

2.8.2 INMUNOHISTOQUIMICA

La inmunohistoquímica es (IHQ) una prueba de laboratorio que usa anticuerpos para detectar antígenos (Ag) específicos en cortes de tejidos observados bajo el microscopio (Laguna *et al.*, 2006).

Andrés *et al.* (1981), describen un método de peroxidasa-antiperoxidasa donde demuestra a *Toxoplasma* libre como en secciones histológicas preparadas rutinariamente. Este estudio se empleó para confirmar la presencia de *T. gondii* en los tejidos infectados de un paciente inmunosuprimido que tenía un examen post mortem.

En el caso del diagnóstico histopatológico de la neurotoxoplasmosis a menudo es difícil evidenciar taquizoítos de *T. gondii* en cortes tisulares teñidos con técnicas de rutina (Laguna *et al.*, 2006), sin embargo, con estas técnicas es posible detectar quistes tisulares, taquizoítos y también restos de antígeno. Pueden utilizarse anticuerpos policlonales o monoclonales específicas frente a *T. gondii*, unidos a un fluorocromo (isotiocianato de fluoresceína), o utilizar la técnica de peroxidasa – antiperoxidasa (Valencia, 2006).

III. HIPÓTESIS

Se evidencia mayor daño en tejidos de ratones infectados e inmunosuprimidos con la cepa Me49 de *T. gondii* frente a ratones infectados no inmunosuprimidos.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar en ratones Swiss el daño histopatológico producido por la cepa Me49 de *T. gondii*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Infectar ratones Swiss con la cepa Me49 de *T. gondii*
- Evaluar la inmunosupresión de ratones Swiss infectados con la cepa Me49 de *T. gondii*.
- Evaluar la presencia del parásito mediante técnicas histológicas (coloración hematoxilina - eosina).
- Analizar la presencia de lesiones histopatológicas en órganos obtenidos de ratones Swiss infectados e inmunosuprimidos con la cepa Me49 de *T. gondii*.
- Evaluar el grado de infección producido en órganos según el tiempo de infección y reacción inflamatoria.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 MATERIAL BIOLÓGICO

-El grupo experimental abarca treinta ratones Swiss hembras de dos meses de edad, adquiridos en el bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. El cuidado y mantenimiento de los ratones fue realizado en el bioterio (S5) de la Facultad de Ciencias Biológicas (UNMSM). Ver Anexo Fig. 16 A y B.

-Cepa Me49 de *Toxoplasma gondii* (cepa donada por la Universidad de Minas Gerais-Brasil).

El proyecto fue sometido a la evaluación del Comité Institucional de Ética para el uso de Animales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, el cual se encuentra registrado en la Oficina de Bienestar de Animales de Laboratorio del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Institutos Nacionales de Salud (NIH – USA) con Assurance Number: A5146-01.

5.2 METODOLOGÍA

5.2.1 EVALUACIÓN EN EL MODELO MURINO

5.2.1.1 INFECCIÓN DE RATONES

Se distribuyeron los ratones en 2 grupos de trabajo. Veinte ratones Swiss hembras (Grupo 1: A, B, C) y (Grupo 2: D) de dos meses de edad y 20 g de peso fueron infectados oralmente con 20 quistes de la cepa Me49 de *T. gondii*, a partir de un machacado de cerebro de ratones previamente infectados con la cepa; al utilizar esta cantidad de quistes se mantiene la cronicidad de la infección en el ratón. Se esperó 2 meses para la realización de la inmunosupresión. En el grupo 2 (E; F) fueron ratones controles. (Ver Tabla 1).

5.2.1.2 INMUNOSUPRESIÓN DE RATONES

Al día 60 post infección, 15 infectados (A, B, C) y 5 controles (E)) fueron inmunosuprimidos con 2 mg/ml de Dexametasona administrado por vía intraperitoneal semanalmente durante cuatro semanas (Hafidh y Saevan 2014) (Tabla 1) (Ver Anexo Fig. 16 C y D).

TABLA 1: DISTRIBUCIÓN DEL GRUPO EXPERIMENTAL

GRUPO	1			2		
RATÓN	Infectados e Inmunosuprimidos			Control		
SUB GRUPO	A	B	C	D	E	F
TRATAMIENTO	15 Días post Inmunosupresión	30 Días post Inmunosupresión	45 Días post Inmunosupresión	Infectados, no inmunosuprimidos	No infectados, inmunosuprimidos	No infectados, no inmunosuprimidos
n	5	5	5	5	5	5

5.2.1.3 OBTENCIÓN DE ÓRGANOS

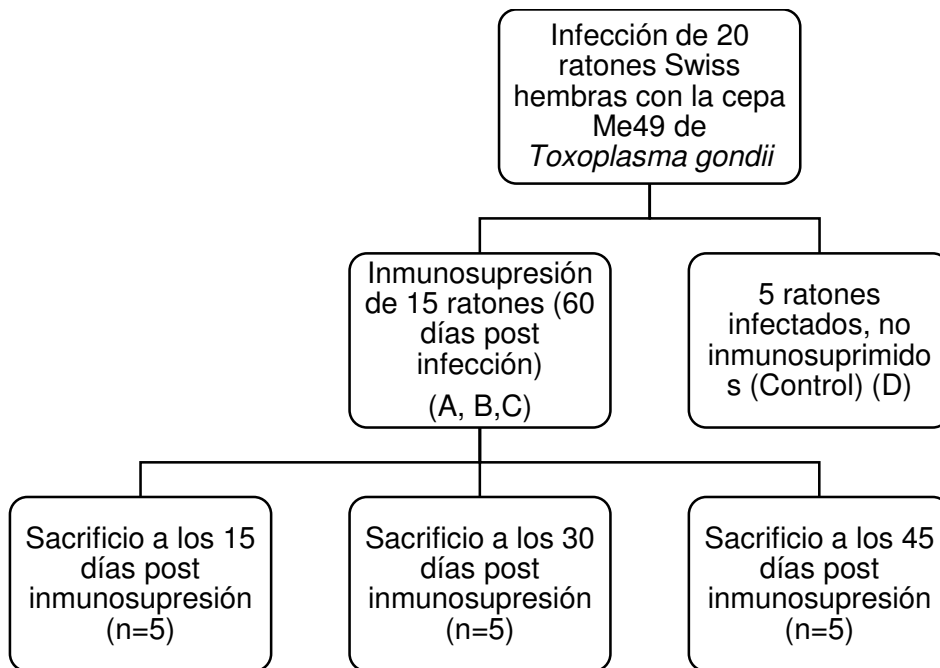
El sacrificio de los ratones infectados e inmunosuprimidos se realizó a los 15, 30 y 45 días post inmunosupresión (Grupo 1: A, B, C) (siguiendo la metodología de Djurković y Milenković, 2001 modificado) en número de 5 ratones por cada grupo (Ver grafica 1 y 2).

Los animales fueron anestesiados con la combinación de Ketamina (ket-a-100R, AgrovvetMarketPeru S.A.) y Xilacina (dormixylR 2, AgrovvetMarket S.A.) a una dosis de 100mg y 10mg /Kg respectivamente.

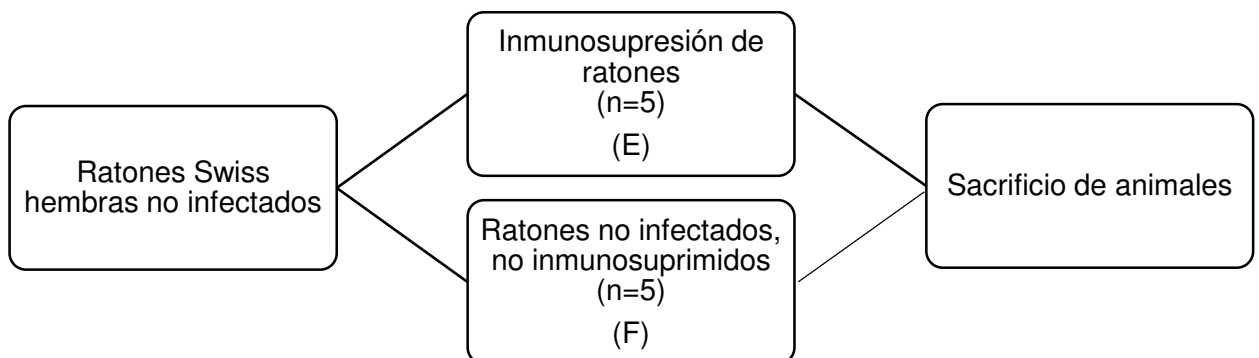
Para la obtención de órganos se procedió de la siguiente manera: primero se realizó un corte en el cráneo del ratón para extraer el cerebro, el cual fue lavado con solución salina antes de ser colocado en el fijador. A continuación, se procedió a cortar la zona abdominal del ratón con precaución, para evitar daño en los tejidos adyacentes, y se procedió a extraer los siguientes órganos: corazón, pulmón, hígado, músculo diafragma, bazo y riñón, los cuales fueron lavados con solución salina, seguidamente cada órgano fue colocado en tubos tapa rosca de 5 mL con PBS formolado al 10% hasta cubrir la muestra. Pasadas 24 horas se retiró el PBS formolado lavando con agua destilada el exceso de fijador y se reemplazó con alcohol al 70% hasta su procesamiento. (Ver Anexo Fig. 17 A y B).

Se obtuvo sangre total por punción cardiaca, la cual fue centrifugada y guardada el suero y coágulo a -20 °C, para posteriores estudios.

GRÁFICA 1: FLUJOGRAMA DE TRABAJO RATONES INFECTADOS



GRÁFICA 2: FLUJOGRAMA DE TRABAJO RATONES CONTROL



5.2.2 TECNICA HISTOLÓGICA

Para el procesamiento de los tejidos, se procedió a cortar segmentos de 0.5 cm de cada órgano para ser incluidos en parafina. Como etapa inicial se trabajó como se indica a continuación:

Para la deshidratación de los tejidos se colocaron las muestras en un gradiente de alcoholes (Merck Millipore):

- Alcohol 70% por 1 hora.
- Alcohol 90% por 1 hora.
- Alcohol 95% por 1 hora.
- Alcohol 100% (1) por 1 hora.
- Alcohol 100% (2) por 1 hora.
- Alcohol 100% (3) por 1 hora.

Para la aclaración de los tejidos se colocaron las muestras en una serie de xilol (Merck) de la siguiente manera:

- Xilol (1) por 1 hora.
- Xilol (2) por 1 hora.
- Xilol (3) por 1 hora.

Para la preinclusión de los tejidos las muestras fueron tratadas en una serie de parafina líquida (Paraplast) entre 56 y 60 °C de la siguiente manera:

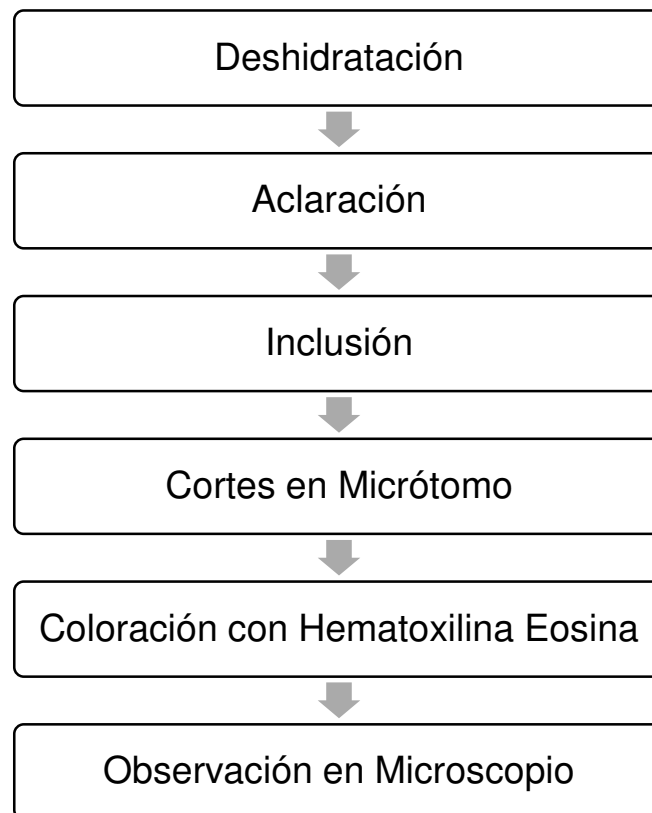
- Parafina (1) por 1 hora.
- Parafina (2) por 1 hora.
- Parafina (3) por 1 hora.

La inclusión consistió en encerrar el tejido en el centro de un bloque sólido de parafina, por lo general se colocó la muestra de tejido en un molde de plástico o metal de forma

rectangular, se vierte la parafina fundida a 60°C y se dejó solidificar a temperatura ambiente (Ver Anexo Fig. 18: A y B).

A continuación, se realizaron los cortes del tejido de un grosor de 3 micras (Sepúlveda 2008), utilizando un micrótopo rotativo en el Laboratorio de Parasitología de Fauna Silvestre y Zoonosis (UNMSM) (Ver Anexo Fig. 19: A y B).

GRÁFICA 3: RESUMEN DE METODOLOGÍA APLICADA.



5.2.3 COLORACIÓN CON HEMATOXILINA / EOSINA

Los cortes de tejido obtenidos fueron coloreados con hematoxilina y eosina (aplicando la metodología de Harris, INS 1997 modificado) (Ver Anexo) de la siguiente manera:

- Xilol (1) por 10 minutos
- Xilol (2) por 5 minutos
- Alcohol 100% (1) por 5 minutos
- Alcohol 100% (2) por 5 minutos
- Alcohol 96% por 5 minutos
- Alcohol 90% por 5 minutos
- Alcohol 70% por 5 minutos
- Agua destilada por 3 minutos

Las láminas portaobjeto se colocaron en el recipiente de hematoxilina (Sigma) por dos minutos, se retiró el exceso con agua de caño. Seguidamente se sumergió por tres segundos en alcohol ácido, se procedió a lavar con agua, posteriormente las láminas fueron sumergidas en eosina amarilla (Sigma) por minuto y medio, finalmente se lavaron con agua de caño por treinta segundos.

Para la deshidratación se realizaron pasajes en gradientes crecientes de alcohol y xilol de la siguiente manera:

- Alcohol 70% por 3 segundos
- Alcohol 90% por 3 segundos
- Alcohol 96% por 3 minutos
- Alcohol 100% (2) por 5 minutos
- Alcohol 100% (1) por 5 minutos
- Xilol (2) por 5 minutos
- Xilol (1) por 5 minutos

Finalmente, se realizó el montaje utilizando entellán y la codificación respectiva por grupo de ratones y se dejó secar a temperatura ambiente por dos días (Ver Gráfica 3). Se guardaron las láminas hasta su observación en el microscopio (Ver Anexo. Fig. 23: A, B y C).

VI. RESULTADOS

6.1 INFECCIÓN DE RATONES SWISS CON LA CEPA Me49 DE *T. gondii* Y EVALUACIÓN DE LA INMUNOSUPRESIÓN.

De 15 ratones infectados en el grupo 1 (A, B, C), dos ratones presentaron sintomatología de la infección a los 45 días post infección, manifestada en el encorvamiento, letargo y erizamiento de pelo. Esto llevó a realizar el sacrificio y obtención del material biológico para su análisis histológico. Los 13 ratones restantes, mantuvieron su estado crónico post inmunosupresión hasta el sacrificio (Ver Fig. 1). Durante la inmunosupresión se observó un decaimiento de los ratones y postración por espacio de 30 a 45 minutos, después del cual nuevamente recuperaban su estado normal.

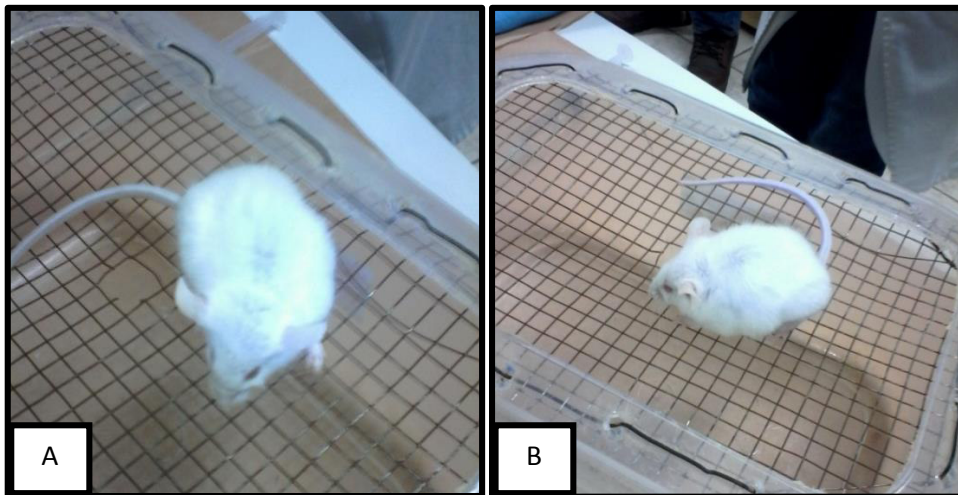


Figura 1: A y B Ratones con sintomatología de toxoplasmosis.

6.2 EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DEL PARÁSITO MEDIANTE TÉCNICAS HISTOLÓGICAS.

Se evidenció la presencia de quistes en tejido cerebral con un diámetro promedio de 6-30 micras, siendo la corteza (sustancia gris) donde se hallaron mayor cantidad de quistes, estando ausentes en el cerebelo (Fig. 2). La cantidad de cerebros con presencia de quistes tisulares en los grupos de ratones infectados (A, B, C y D) se presentan en la Tabla 2.

Al analizar los demás tejidos no se encontraron quistes tisulares.

TABLA 2: PRESENCIA DE QUISTES EN CEREBROS DE RATÓN SUBGRUPOS A, B, C, Y D

GRUPO	1			2
RATÓN	Infectados e inmunosuprimidos			Control
SUB GRUPO	A	B	C	D
TRATAMIENTO	15 Días post Inmunosupresión	30 Días post Inmunosupresión	45 Días post Inmunosupresión	Infectados, no inmunosuprimidos
RATONES CON QUISTES EN CEREBRO	2/5 (20%)	3/5 (60%)	4/5 (80%)	4/5 (80%)
PROMEDIO DE QUISTES POR CEREBRO	4	3	2	6
PROMEDIO DE TAMAÑO DE QUISTE	8.7 - 22 μm	13 - 30 μm	8.5 - 23 μm	6 - 25 μm

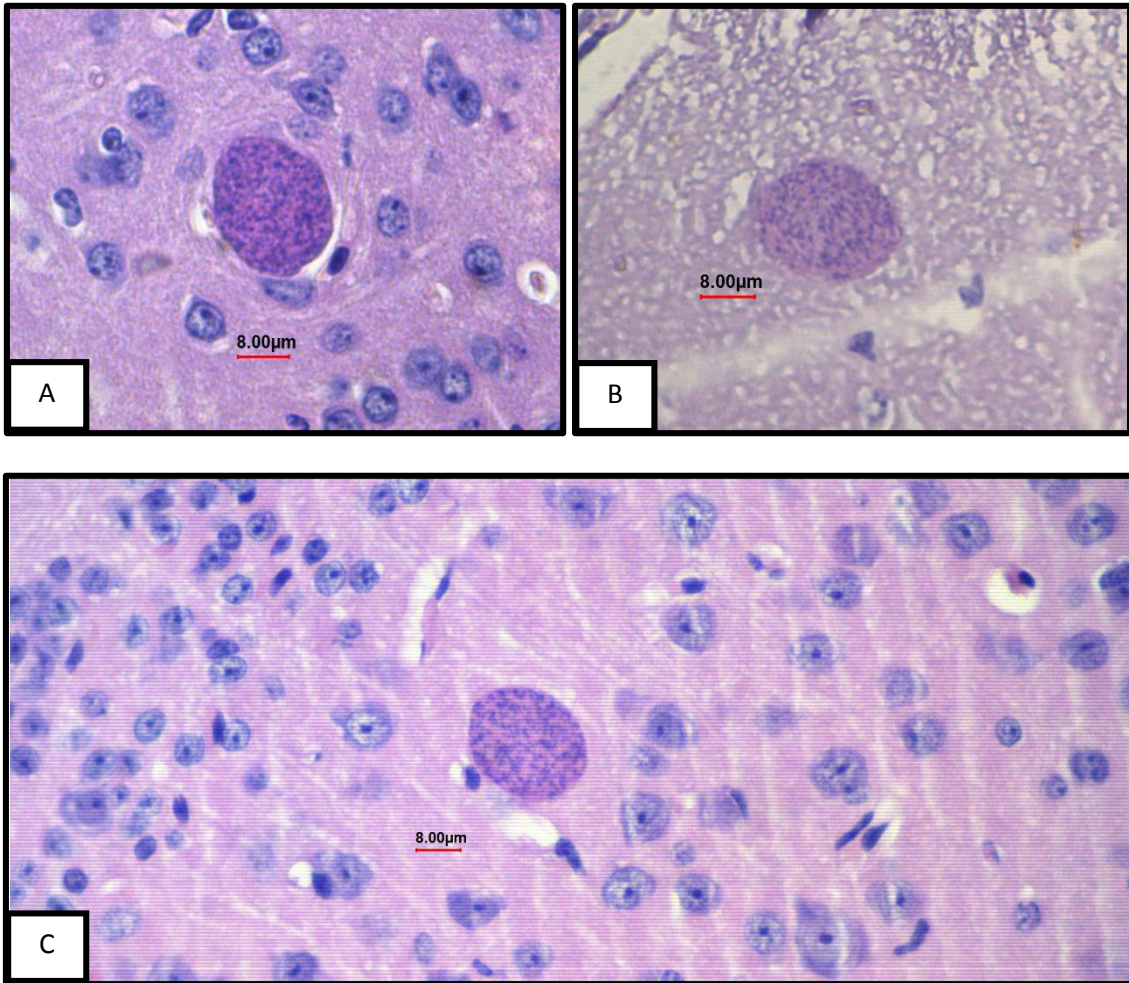


Figura 2: A, B y C: Quistes con bradizoítos de *T. gondii* en sustancia gris de tejido cerebral. Aumento 400X.

6.3 ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE LESIONES HISTOPATOLÓGICAS EN ÓRGANOS OBTENIDOS DE RATONES SWISS INFECTADOS E INMUNOSUPRIMIDOS CON LA CEPA Me49 DE *T. gondii* (TABLA 3).

CEREBRO

6.3.1 Ratones infectados e inmunosuprimidos sacrificados 15 días post inmunosupresión (1A)

Los quistes tisulares fueron observados solo en 20% (2/5) de ratones (Fig. 3 A y B), con un promedio de 4 quistes por individuo, ubicándose en la corteza (sustancia gris), quiste único, el tamaño estuvo entre 8.7 y 22 μm y la pared de los quistes no delimitada y amorfa. En ninguno se observó infiltrado adyacente y solo 1 cerebro presentó manguito perivascular (Fig. 3: C). La vacuolización fue observada en 2 cerebros (Fig. 3: D).

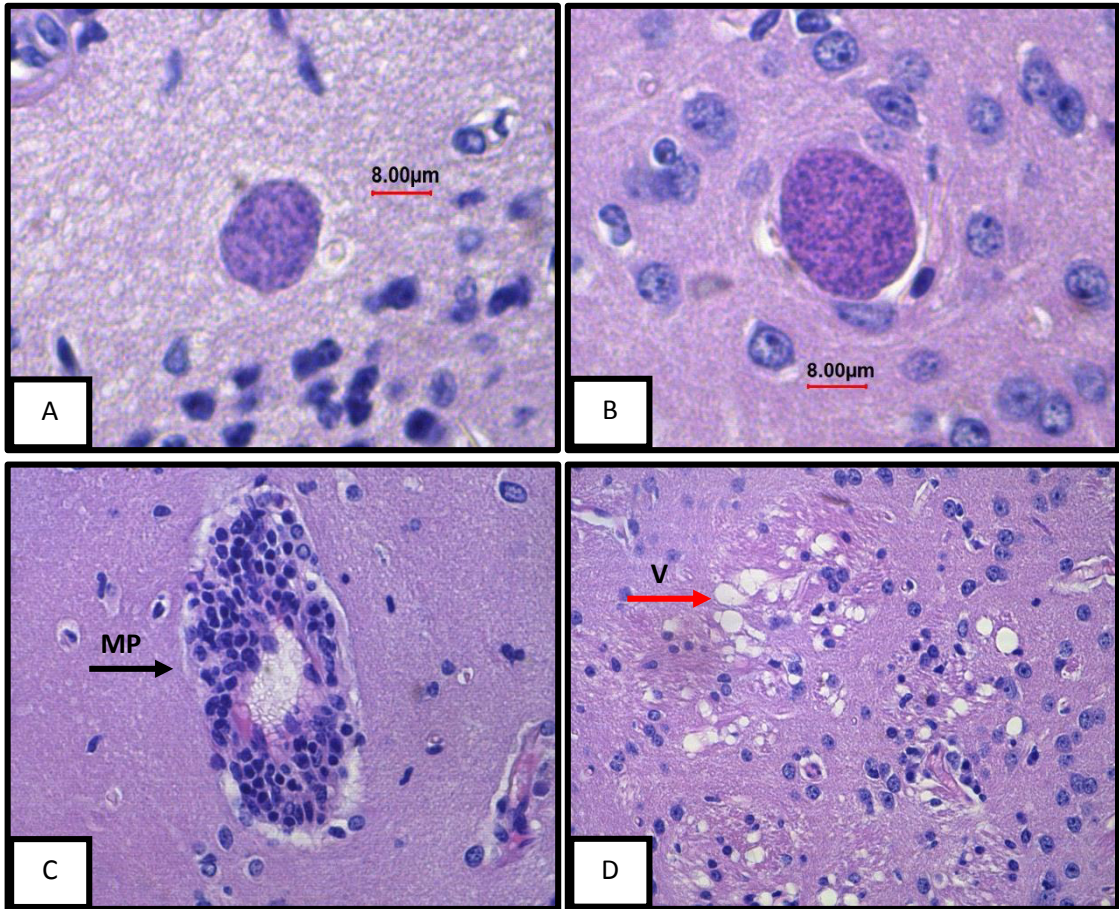


Figura 3: A y B: Quistes con bradizoitos de *T. gondii* en sustancia gris. C: Manguito perivascular, flecha negra (MP). D: Vacuolización, flecha roja (V). Aumento 400X.

6.3.2 Ratones infectados e inmunosuprimidos sacrificados 30 días post inmunosupresión (1B)

En este grupo sólo el 60% (3/5) ratones presentaron quistes con un promedio de 3 quistes por individuo. Los quistes se encontraron en la sustancia gris, presentaron pared no delimitada y amorfa, se hallaron como quiste único y con un tamaño entre 13 y 30 μm (Fig. 4: A y B), solo en un individuo se observó infiltrado adyacente (Fig. 4: C).

En 60% (3/5) de los cerebros se halló manguitos perivascuales (Fig. 4: D y E) y vacuolización (Fig. 4: F).

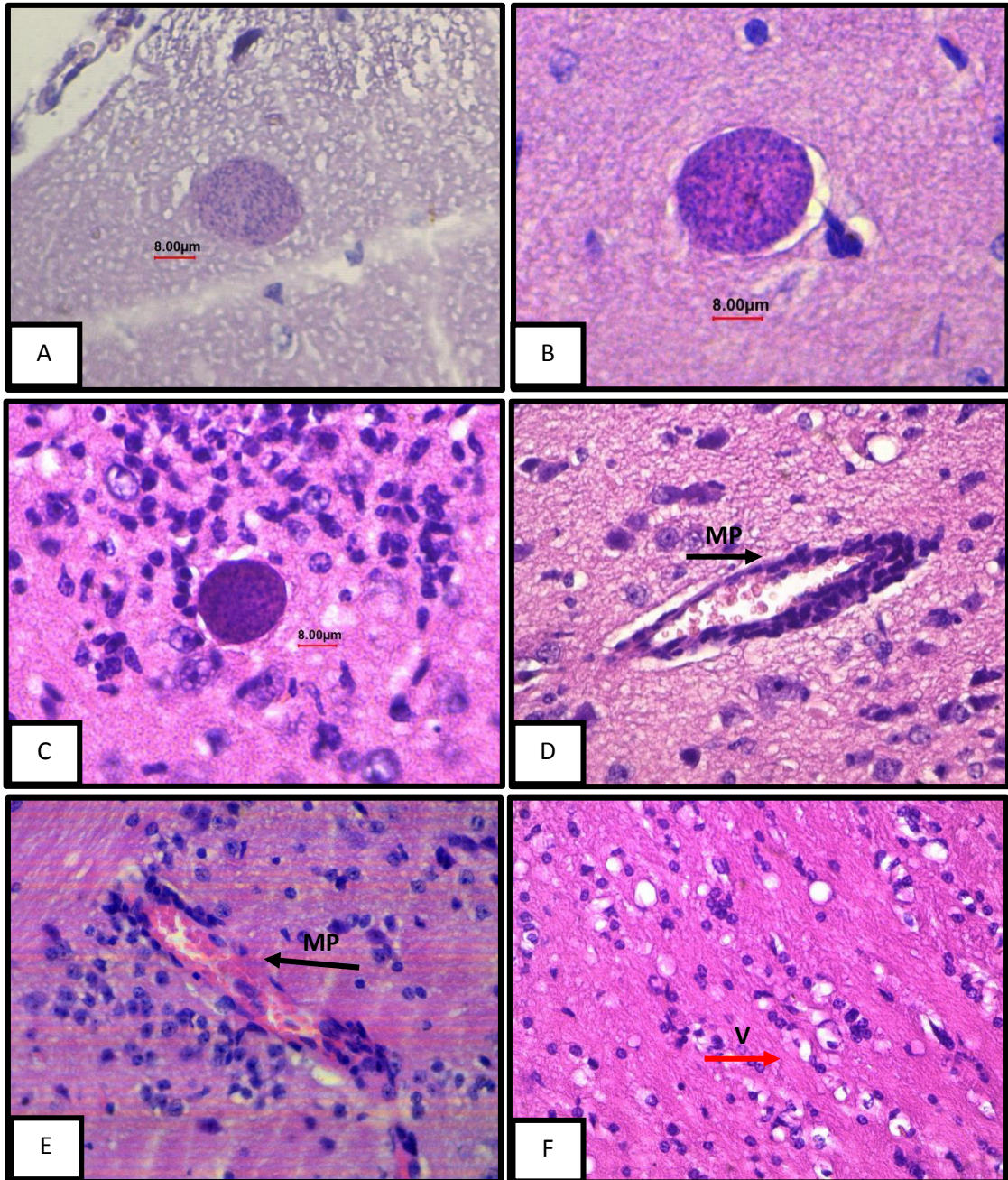


Figura 4: A, B y C: Quistes con bradizoítos de *T. gondii*. D y E: Manguitos perivasculares, flecha negra (MP). F: Vacuolización, flecha roja (V). Aumento 400X.

6.3.3 Ratones infectados e inmunosuprimidos sacrificados 45 días post inmunosupresión (1C)

De un total de 5 ratones, el 80% (4/5) presentaron quistes con un promedio total de 2 quistes por individuo, los quistes median entre 8.5 y 23 μm de diámetro y su pared era no delimitada y amorfa (Fig. 5: A y B). Todos los quistes fueron hallados en la corteza (sustancia gris), en solitario y en ninguno se encontró infiltrado adyacente. En 60% (3/5) de los cerebros se halló manguitos perivasculares penetrando cada vez más en el parénquima (Fig. 5: C y D). Otra evidencia de daño histopatológico fue la presencia de vacuolización en el tejido, observado en 40% (2/5) individuos (Fig. 5: E y F).

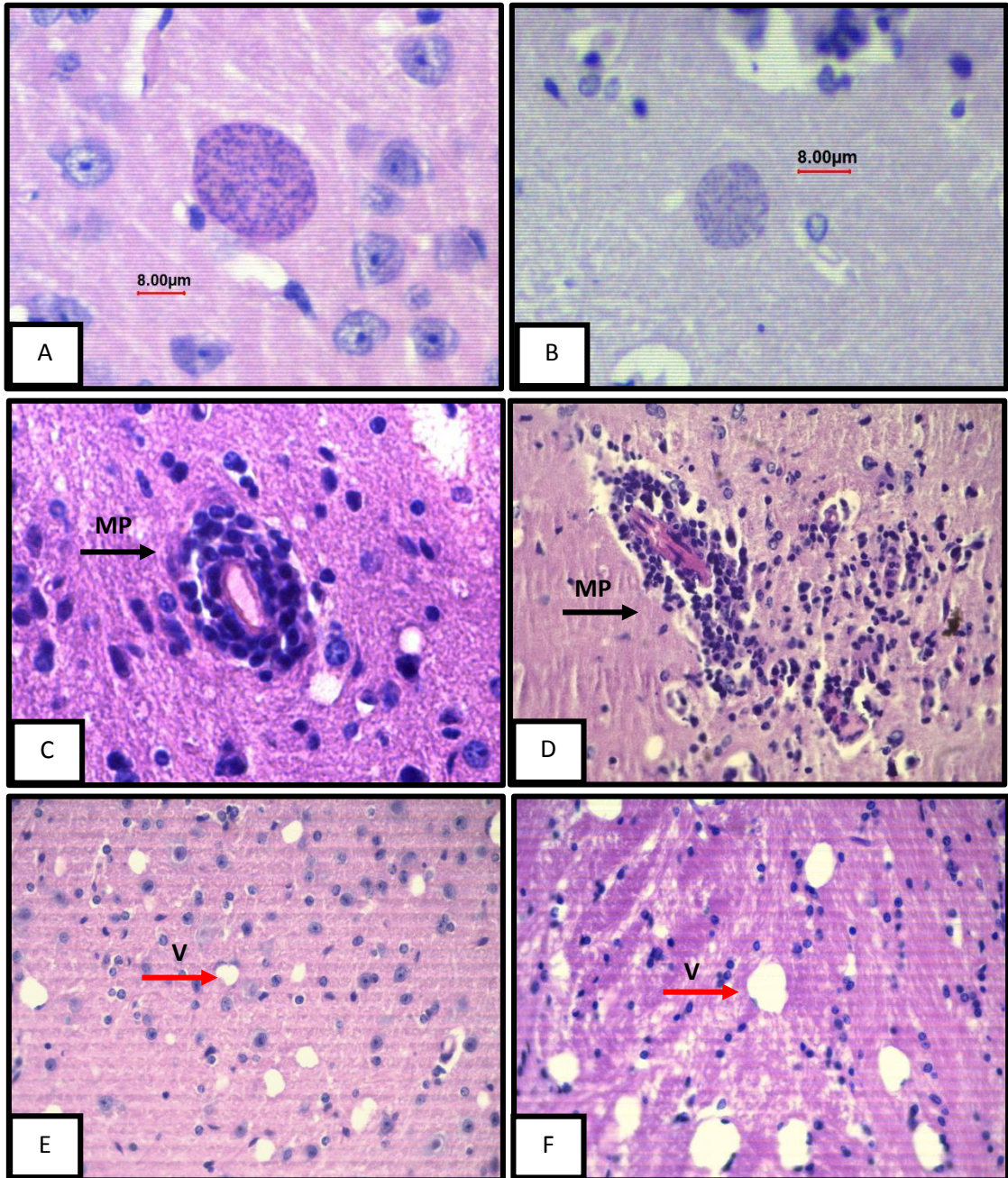


Figura 5: A y B: Quistes con bradizoítos de *T. gondii* en la corteza (sustancia gris). C y D: Manguitos perivasculares, flechas negras (MP). E y F: Vacuolización, flecha roja (V). Aumento 400X.

6.3.4 Ratones control: Infectados, no inmunosuprimidos (2D)

En este grupo, se observó quistes únicos en la sustancia gris en 80% (4/5) individuos con un promedio de 6 quistes por individuo (Fig. 6: A), en un solo caso se observaron 2 quistes juntos (Fig. 6: B), el diámetro se encontraba entre 6 y 25 μm , no se encontró infiltrado vascular adyacente al quiste. Solo un ratón (20%, 1/5) presentó manguito perivascular (Fig. 6: C) y en 80% (4/5), vacuolización (Fig. 6: D).

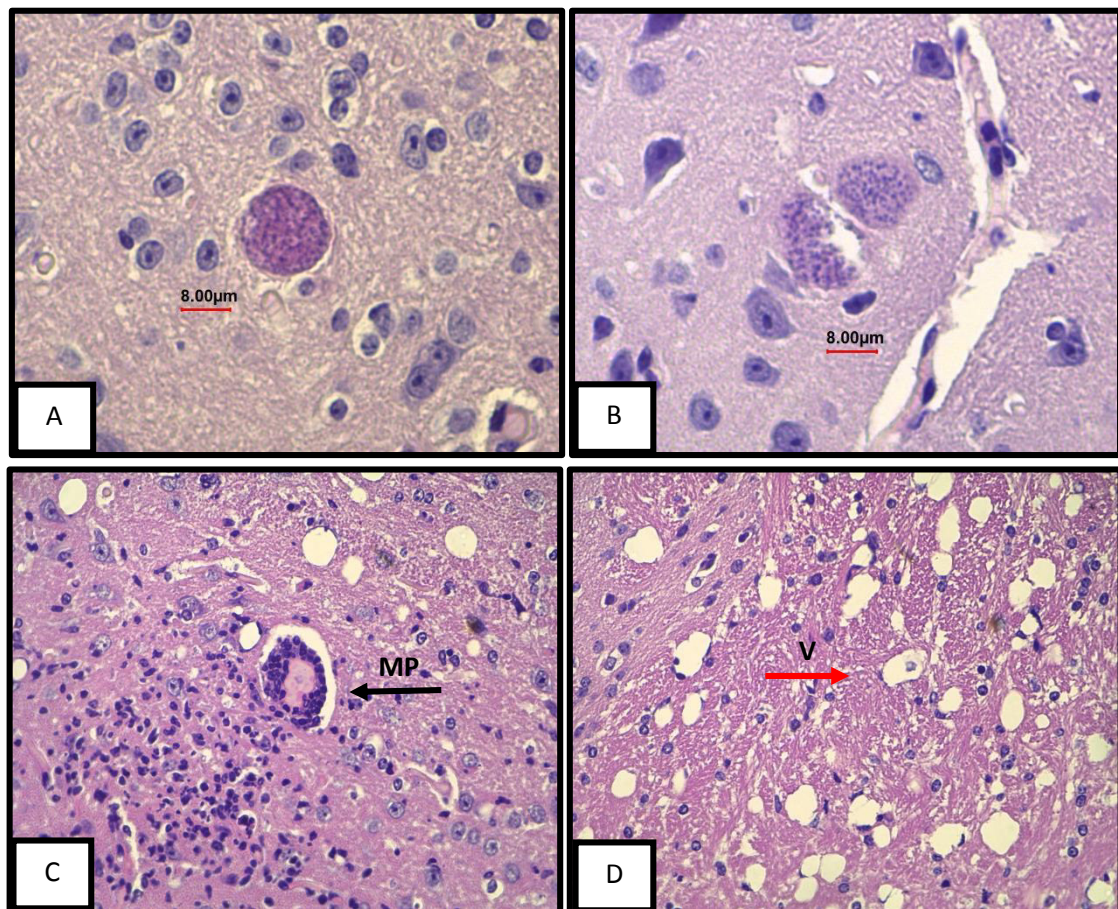


Figura 6: A: Quiste con bradizoítos de *T. gondii*. B: Quiste con bradizoítos de *T. gondii* en pareja. C: Manguito perivascular, flecha negra (MP). D: Vacuolización, flecha roja (V). Aumento 400X.

6.3.5 Ratones control: No infectados, inmunosuprimidos (2E)

Este grupo de ratones se sacrificó a los 15 días post inmunosupresión. Sólo se pudo observar calcificación en el tejido cerebral. Los manguitos perivasculares, vacuolización estaban ausentes (Fig. 7).

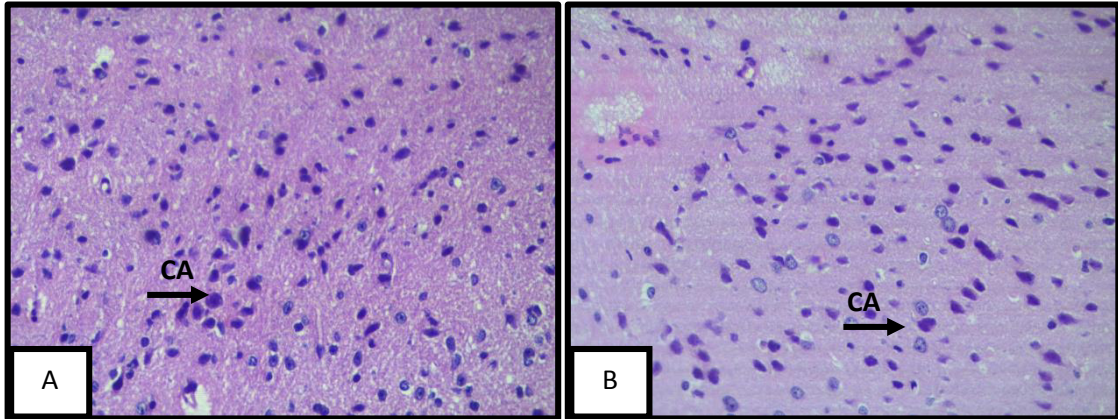


Figura 7: A y B: calcificación (CA) en tejido cerebral. Aumento 400X.

6.3.6 Ratones control: No infectados, no inmunosuprimidos (2F)

Los ratones de este grupo al no estar infectados con la cepa Me49 de *T. gondii* ni haber recibido el tratamiento inmunosupresor presentaron tejido normal sin ningún tipo de alteración (Fig. 8).

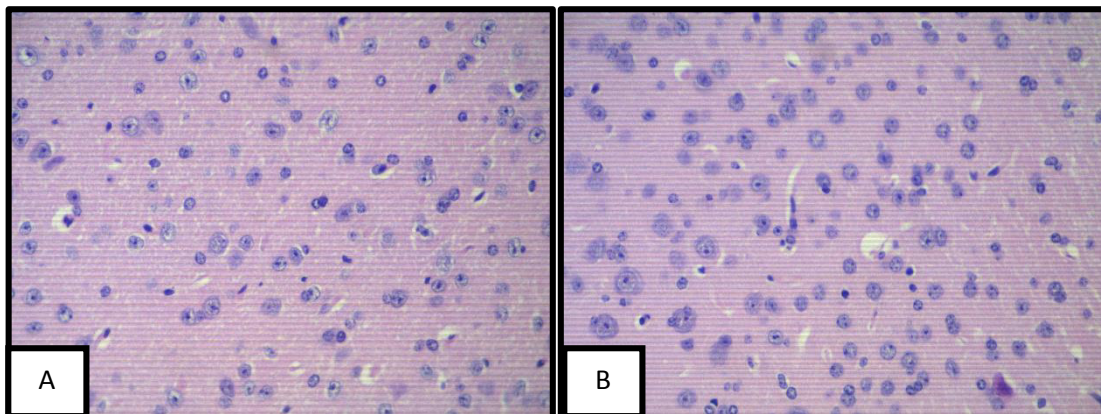


Figura 8: A y B: Cerebro de ratones control sanos. Aumento 400X.

CORAZÓN

En los corazones de todos los grupos de ratones analizados no se encontraron quistes tisulares de *T. gondii* ni se evidenciaron lesiones histopatológicas (Fig. 9).

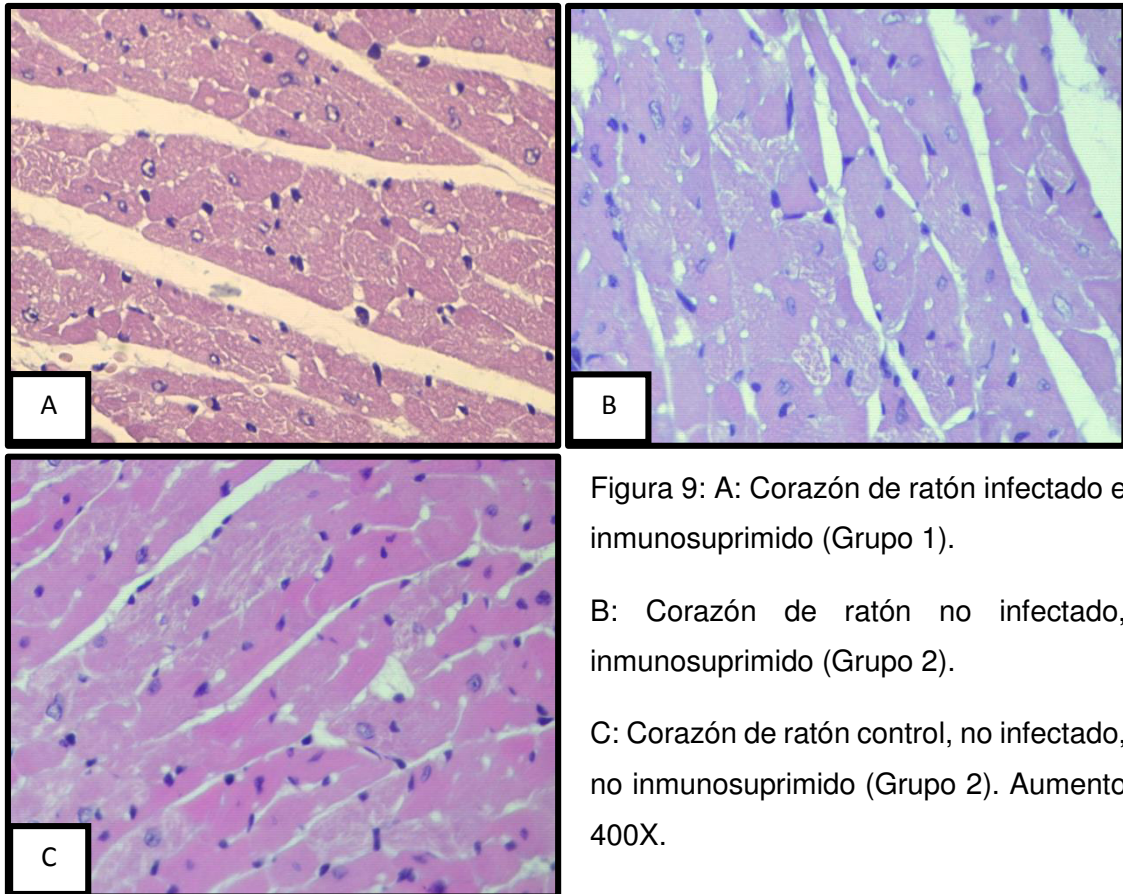


Figura 9: A: Corazón de ratón infectado e inmunosuprimido (Grupo 1).

B: Corazón de ratón no infectado, inmunosuprimido (Grupo 2).

C: Corazón de ratón control, no infectado, no inmunosuprimido (Grupo 2). Aumento 400X.

HÍGADO

Al analizar los hígados de ratones infectados no se encontraron quistes tisulares ni lesiones histopatológicas. Se observó inflamación en la mayoría de los tejidos analizados (incluidos ratones control), sin embargo, no puede atribuirse a la presencia del parásito (Fig. 10).

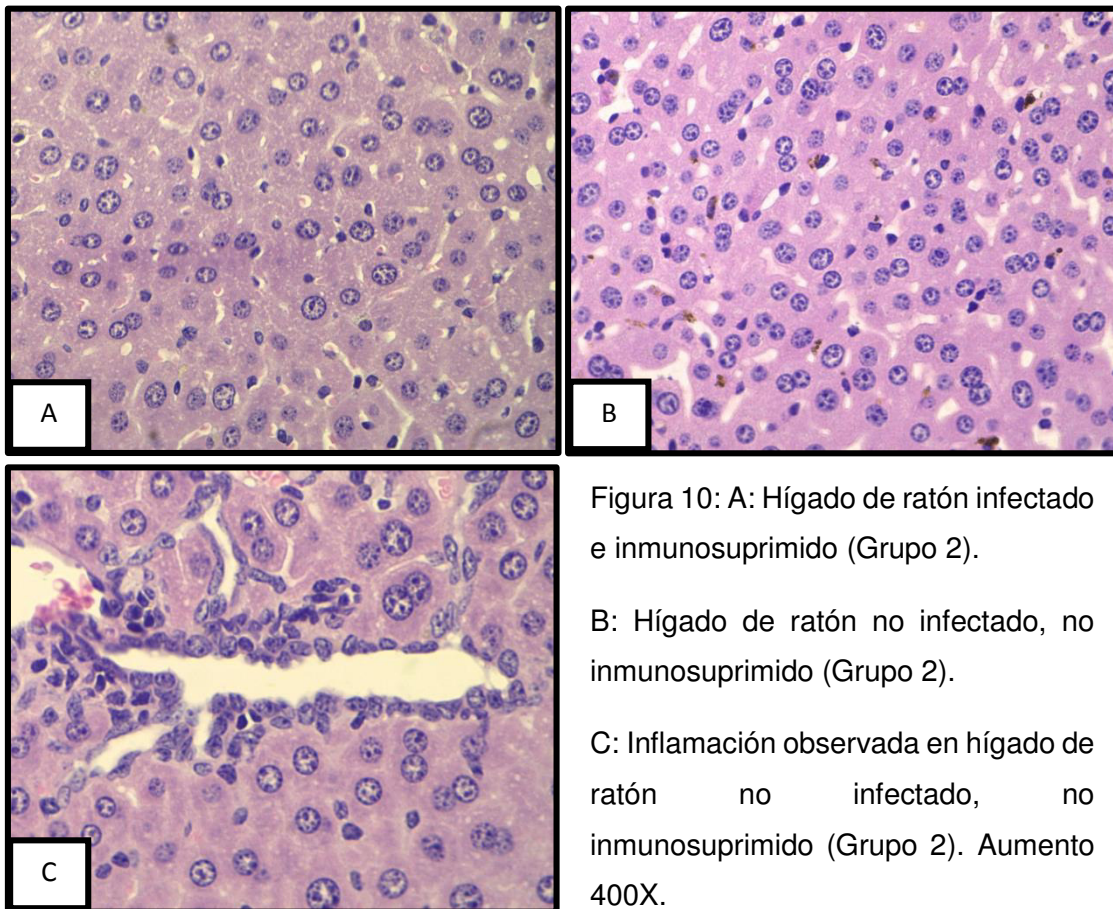


Figura 10: A: Hígado de ratón infectado e inmunosuprimido (Grupo 2).

B: Hígado de ratón no infectado, no inmunosuprimido (Grupo 2).

C: Inflamación observada en hígado de ratón no infectado, no inmunosuprimido (Grupo 2). Aumento 400X.

PULMÓN

No se encontraron quistes tisulares ni lesiones histopatológicas en los pulmones analizados (Fig. 11: A y B). Se observaron septos gruesos (Fig. 11: C y D) debido a inflamación en varios de los tejidos analizados, pero ello no puede atribuirse a la presencia del parásito.

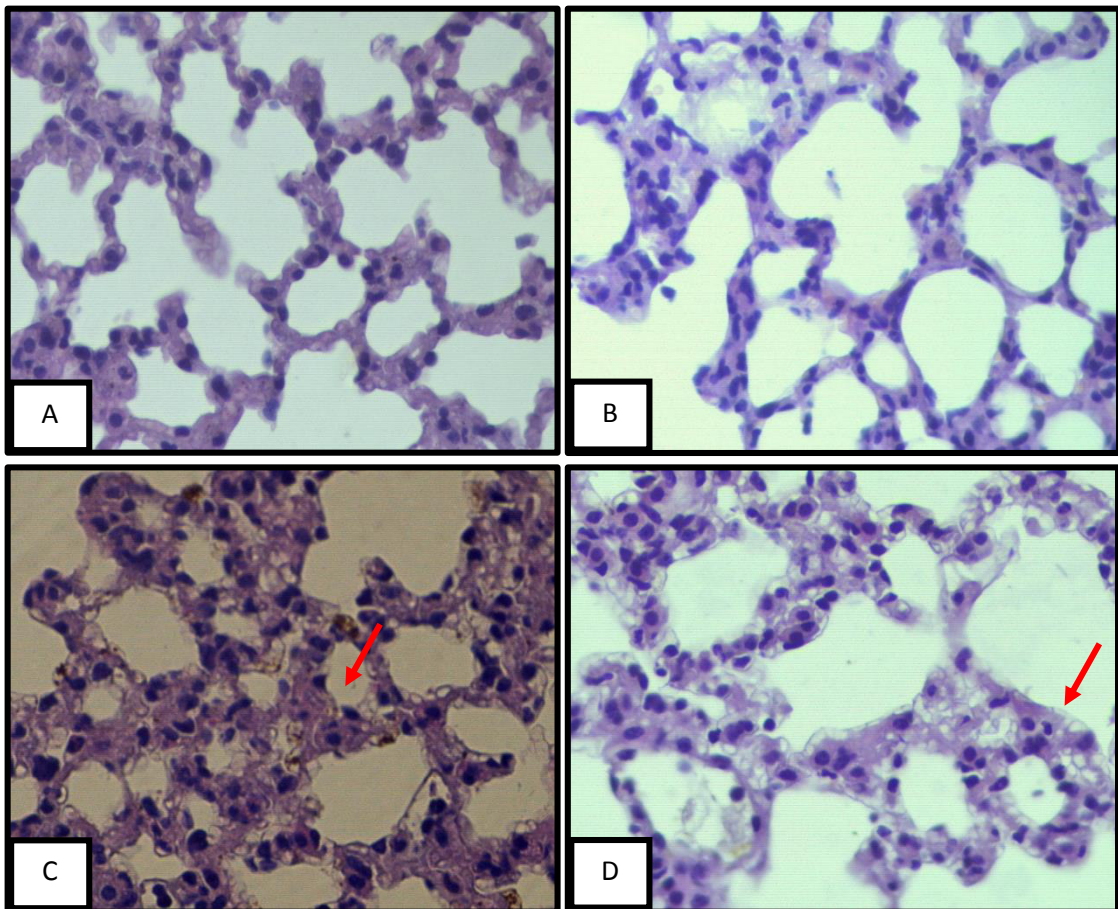


Figura 11: A: Pulmón de ratón infectado e inmunosuprimido (septos delgados) (Grupo 1). B: pulmón de ratón control (Grupo 2). C: Pulmón de ratón infectado e inmunosuprimido (septos gruesos) (Grupo 1). D: Pulmón de ratón control (Grupo 2).

Aumento 400X.

MÚSCULO

No se hallaron quistes tisulares ni daño histopatológico en las láminas de músculo (diafragma) analizados (Fig. 12).

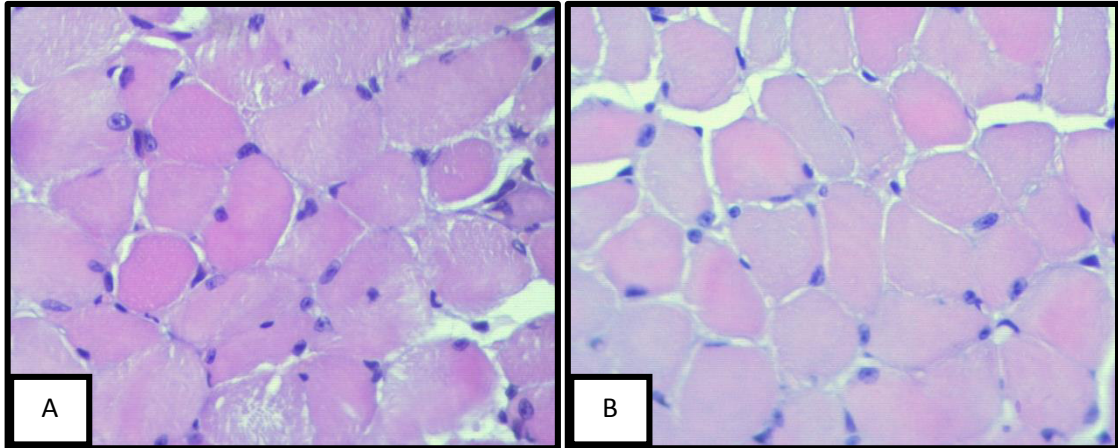


Figura 12: A: músculo de ratón infectado e inmunosuprimido (Grupo 1). B: músculo de ratón sano control. (Grupo 2). Aumento 400X.

RIÑÓN

No se hallaron quistes tisulares de *T. gondii* en ninguna de las muestras de riñón analizado, la inflamación y daño histopatológico también estuvieron ausentes en este tejido (Fig. 13).

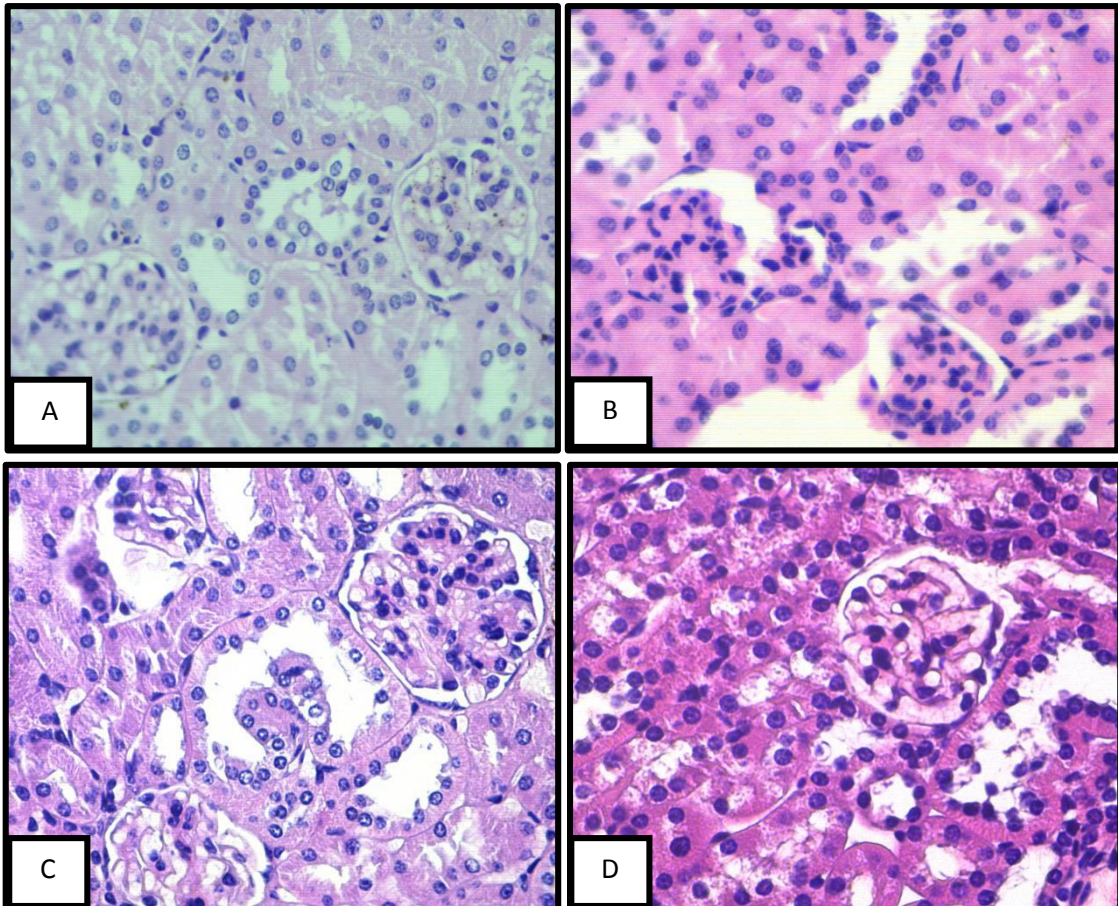


Fig. 13: A y B: Riñón de ratón infectado e inmunosuprimido. (Grupo 1) C: Riñón de ratón no infectado, inmunosuprimido (Grupo 2). D: Riñón de ratón control, no infectado, no inmunosuprimido (Grupo 2). Aumento 400X.

BAZO

No se hallaron quistes tisulares de *T gondii* en ninguna de las muestras de bazo analizadas, la inflamación y daño histopatológico estuvieron ausentes en este tejido (Fig. 14).

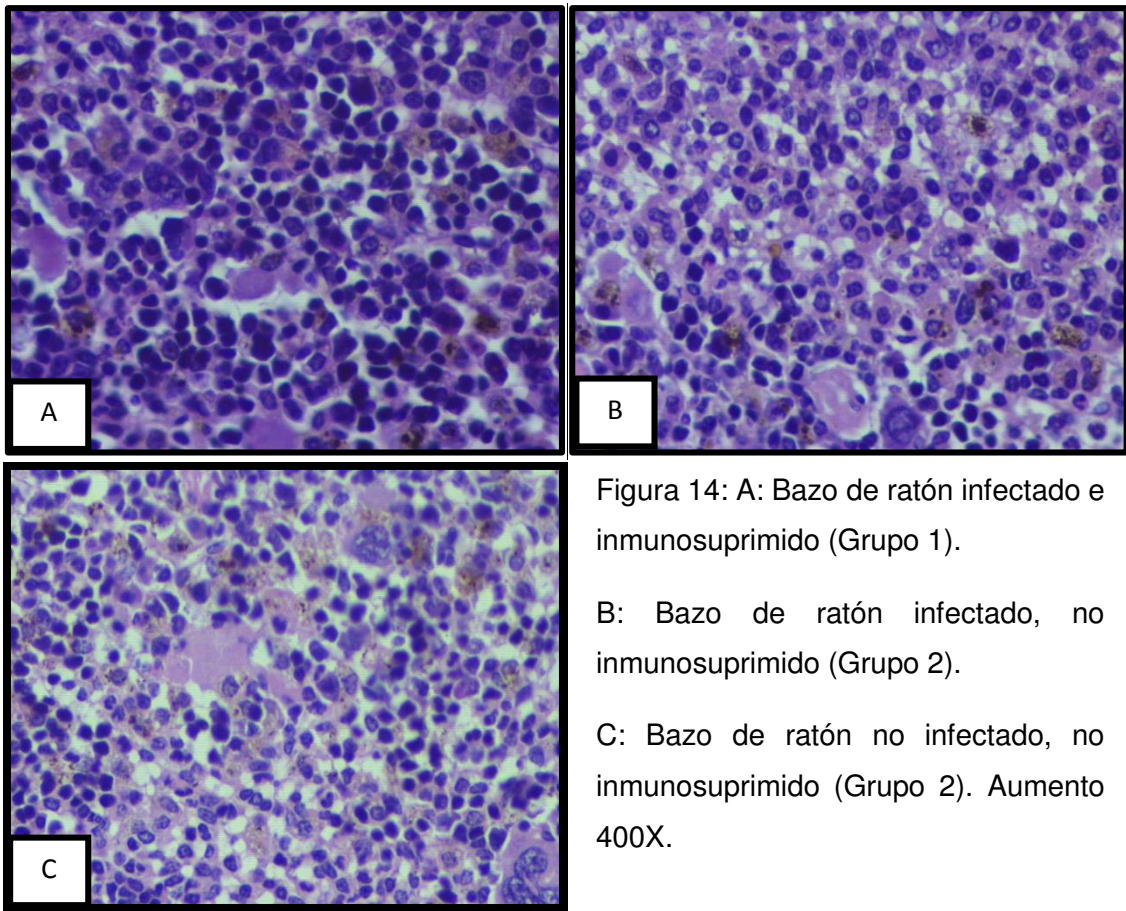


Figura 14: A: Bazo de ratón infectado e inmunosuprimido (Grupo 1).

B: Bazo de ratón infectado, no inmunosuprimido (Grupo 2).

C: Bazo de ratón no infectado, no inmunosuprimido (Grupo 2). Aumento 400X.

6.4 EVALUACIÓN DEL GRADO DE INFECCIÓN PRODUCIDO EN ÓRGANOS SEGÚN EL TIEMPO DE INFECCIÓN

Solamente el tejido cerebral evidenció la presencia de *T. gondii*, en su estadio de quistes.

El grado de infección observado en los ratones del grupo 1, se evidenció de acuerdo con el tiempo de inmunosupresión, apreciándose un aumento del número de quistes, así como daño celular el cual consistía en la presencia de reacciones de inflamación (manguitos perivasculares), vacuolización del tejido e infiltrado vascular.

La presencia de calcificaciones en cerebro fue lo más evidente en el subgrupo E, podría atribuirse a la acción de la dexametasona.

Tabla 3 GRADO DE INFECCIÓN OBSERVADO EN CEREBROS SEGÚN EL TIEMPO DE INFECCIÓN

GRUPO	RATÓN	SUBGRUPO	TRATAMIENTO	RATONES CON QUISTES EN CEREBRO	NÚMERO DE QUISTES (PROMEDIO)	INFLAMACIÓN	VACUOLIZACIÓN	CALCIFICACIÓN
1	INFECTADOS E INMUNOSUPRIMIDOS	A	15 Días post Inmunosupresión	2/5 (40%)	4	1/5 (20%)	2/5 (40%)	Negativo
		B	30 Días post Inmunosupresión	3/5 (60%)	3	3/5 (60%)	3/5 (60%)	Negativo
		C	45 Días post Inmunosupresión	4/5 (80%)	2	3/5 (60%)	2/5 (40%)	Negativo
2	CONTROL	D	Infectados, no inmunosuprimidos	4/5 (80%)	6	1/5 (20%)	4/5 (80%)	Negativo
		E	No infectados, inmunosuprimidos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Abundante
		F	No infectados, no inmunosuprimidos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

VII. DISCUSIÓN

En el presente estudio, el análisis de lesiones histopatológicas en órganos obtenidos de ratones infectados e inmunosuprimidos con la cepa Me49 de *T. gondii*, solo fue evidenciada en cerebro. Es así que el número de quistes, la presencia de infiltrados celulares y vacuolización del tejido estuvo presente según el tiempo de inmunosupresión al que fueron sometidos los ratones. Se puede atribuir la ausencia de quistes en cerebelo a la alta mielinización que se presenta en esta estructura la cual funciona como una barrera natural contra el parásito (Berenreiterová *et al.*, 2011). Sin embargo, Dellacasa-Lindberg *et al.* (2007) trabajaron con la cepa CTG de tipo III y encontraron quistes tisulares en la corteza cerebral y en menor cantidad en el cerebelo coincidiendo con los trabajos realizados por Melzer *et al.* (2010) y Kittas *et al.* (1984).

En el caso de los ratones no infectados e inmunosuprimidos las calcificaciones fueron más evidentes en el tejido cerebral. Se observó calcificación dentro de los cerebros examinados (infectados y controles) en menor grado casi imperceptible, pero no hubo evidencia de que esto estuviera relacionado con el daño causado por la infección por *T. gondii* más bien se podría atribuir quizás al uso de la Dexametasona. En nuestro protocolo se administró el fármaco durante 4 semanas por vía intraperitoneal. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el uso prolongado de Dexametasona causaría toxicidad considerable, y la administración por más tiempo ocasionaría la muerte de los ratones (Djurković y Milenković, 2001).

En un estudio experimental en ratas, con ooquistes de *T. gondii* (11 cepas y 7 genotipos), por vía oral y después de dos meses post infección, demostró el tropismo al cerebro, ojo, y lengua, pero no al músculo y corazón. La ubicación de los quistes en el cerebro fue en la corteza, cerebelo, tálamo, y bulbo olfatorio. No se evidenció si la ruptura de quistes tenía que ver con la reactivación de la infección (Dubey *et al.*, 2016).

Al analizar los cerebros de los ratones infectados con la cepa Me49 de *T. gondii*, sólo se encontró quistes en el cerebro, esto coincide con los resultados de Dubey (1998) en el que indica que en ratones y ratas se encuentran más quistes tisulares en el cerebro que en tejidos viscerales. Sin embargo, en ganado, gatos, ovejas, cabras, los quistes predominan en el tejido muscular.

Carruthers y Suzuki (2007) hallaron quistes en el tejido cerebral con una morfología irregular y ausencia de pared quística. Los quistes fueron reportados en neuronas, astrocitos y microglia. Sin embargo, no está claro cuál es la célula predominante en la formación de quistes tisulares (Weiss y Kim, 2000).

En los resultados obtenidos no se observó la presencia de células inflamatorias adyacentes a los quistes tisulares, esto se debe, probablemente, a la ubicación del quiste dentro de las células del hospedero, es posible que no haya respuesta inmune frente a los quistes. Se asume que la respuesta inmune o inflamatoria se deba a la presencia de formas extraquísticas en el cerebro (Ferguson *et al.*, 1994; Melzer *et al.*, 2010).

Los hepatocitos de los ratones utilizados en esta investigación no presentaban alteración morfológica coincidiendo con Scudamore (2013) donde indica que los hepatocitos de ratones normales presentan abundante citoplasma debido a la presencia de glucógeno, sin embargo, estas pueden agotarse rápidamente si los animales se encuentran en condiciones de estrés.

Scudamore (2013) atribuye que en ciertos casos se puede producir inflamación en el hígado manifestada en pequeños focos de células inflamatorias, lo cual no es muy relevante puesto que la absorción del antígeno del parásito es muy pobre en este tejido, coincidiendo con lo observado en nuestras láminas.

La presencia de células inflamatorias en el tejido pulmonar no es ocasionada necesariamente por el parásito debido a que las acumulaciones focales de macrófagos

son un hallazgo incidental frecuente en los pulmones incluso de ratones sanos producto de la inhalación del ratón (McInnes, 2013).

Los estudios histológicos con técnicas de coloración como hematoxilina eosina brindan una información básica al patólogo acerca de la naturaleza del proceso infeccioso, etc., lo que permite su aplicación y contribución para elevar la calidad diagnóstica en casos de infiltrado inflamatorio agudo, inflamación aguda, etc. e informar el agente causal de infección, por la morfología, forma de agrupación y características clínicas e histología, de ahí la importancia de introducir y aplicar estas técnicas histológicas con una nueva visión de calidad diagnóstica, lo que suple la falta de recursos de costosas técnicas como es la PCR (Walwyn *et al.*, 2004).

Gatkowska *et al.* (2011) indican que la alteración en el comportamiento natural de los ratones infectados con *T. gondii*, aumenta la posibilidad de depredación por el hospedero definitivo (felinos) y de este modo mantener el ciclo biológico. Las estructuras del cerebro involucradas en estos cambios en la conducta de los ratones como letargo y pérdida de miedo hacia los gatos, son el hipocampo y la amígdala (Berenreiterová *et al.*, 2011). Sin embargo, McConkey *et al.* (2013) señalan que no está demostrado que *T. gondii* tenga tropismo por regiones específicas del cerebro.

En nuestro estudio observamos la sintomatología como letargo, erizamiento de pelo, encorvamiento (fase aguda) coincidiendo con estudios previos (Djurković y Milenković, 2001).

La infección de ratones Swiss con la cepa Me49 de *T. gondii* con quistes tisulares por vía oral, constituye un modelo adecuado en el que podemos replicar la infección producida por el parásito y conocer en qué medida se produce el daño y la alteración histopatológica de los tejidos en un ratón crónico y sobre todo, si es sometido a inmunosupresión, modelo que puede reproducir lo que ocurriría en el humano inmunosuprimido (HIV-SIDA). El modelo descrito imita el curso natural de reactivación

de la infección por *T. gondii* en el hombre en que los ratones fueron infectados con quistes de una cepa tipo II responsable de la mayoría de los casos de toxoplasmosis encefálica utilizando la ruta oral que es la principal vía de infección humana (Djurković y Milenković, 2001).

Los resultados obtenidos como parte de este trabajo de investigación demuestran que el manejo adecuado de animales de experimentación, así como herramientas histológicas, nos permite replicar y demostrar el daño histopatológico producidos en modelo murino bajo inmunosupresión y extrapolarlos en casos humanos, para de esta manera mejorar tratamientos y dar calidad de vida a aquellos que contraigan esta parasitosis.

VIII. CONCLUSIONES

- Mediante la inmunosupresión se logró observar el daño histopatológico provocado por la cepa Me49 de *T. gondii*.
- El cerebro fue el único órgano en el que se evidenció daño histopatológico provocado por la presencia del parásito.
- La inflamación observada en hígado y pulmón no se atribuiría necesariamente a la presencia del parásito.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA Pedro, SZYFRES Boris. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Publicación Científica N° 580. Tercera Edición. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. 2003. 398 pp.

ANDRES Terry, DORMAN Sandy, WINN Washington, TRAINER Thomas, PERL Daniel. Immunohistochemical Demonstration of *Toxoplasma gondii*. *American Society of Clinical Pathologists*. 1981, Vol. 75, n°3, p 431-434.

BARRAGAN Antonio, SIBLEY David. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *TRENDS in Microbiology*. 2003, Vol. 11, n° 9, p. 426-430.

BARRETO Annelise, VIEIRA Edna, AELSON José, MYUKI Elise, DE CASSIA Pomy, CAMPOS Jonatas, BARROS Kleber, APARECIDO Rinaldo. Application of different techniques to detect *Toxoplasma gondii* in slaughtered sheep for human consumption. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 2015, Vol. 24, n°4, p. 416-421.

BERENREITEROVÁ Miroslava, FLEGR Jaroslav, KUBENA Ales, NEMEC Pavel. The Distribution of *Toxoplasma gondii* Cysts in the Brain of a Mouse with latent Toxoplasmosis: Implications for the Behavioral Manipulation Hypothesis. *PLoS ONE*. 2011, vol. 6.

BLADER Ira, SAEIJ Jeroen. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *The Authors Journal Compilation*. 2009, p. 458-476.

CARRUTHERS Vern, SUZUKI Yasuhiro. Effects of *Toxoplasma gondii* Infection on the brain. *Schizophrenia Bulletin*. 2007, Vol. 33, nº 3, p. 745-751.

CERRO TEMOCHE, Luis Fernando. "Frecuencia de *Toxoplasma gondii* en gatos en Lima Metropolitana y concordancia entre las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y hemaglutinación indirecta". Asesor: Amanda Chávez. Tesis Título Profesional. UNMSM, EAP Medicina Veterinaria, Lima, 2007. 67 pp.

DELLACASA-LINDBERG Isabel, HITZIGER Niclas, BARRAGAN Antonio. Localized recrudescence of *Toxoplasma* infections in the central nervous system of immunocompromised mice assessed by in vivo bioluminescence imaging. *Microbes and infection*. 2007, Vol. 9, p. 1291-1298.

DENKERS Eric, GAZZINELLI Ricardo. Regulation and Function of T-Cell-Mediated Immunity during *Toxoplasma gondii* Infection. *American Society of Microbiology*. 1998, vol. 11, nº4. p 569 – 588.

DIMAS E, HERNÁNDEZ M. *La infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH): estudio descriptivo y experimental del compromiso de órganos y sistemas, infecciones y neoplasias*. 1ª Edición. Caracas, Venezuela: Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, 2002. 243p. ISBN. 980-00-1936-7.

DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ Olgica, MILENKOVIĆ Vladimir. Murine Model of Drug-induced Reactivation of *Toxoplasma gondii*. *Acta Protozoológica*. 2001, Vol. 40, p. 99-106.

DUBEY J. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*. 1998, n. 28, p. 1019-1024.

DUBEY J. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*. 2009, p. 877-882.

DUBEY J. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. *Veterinary Parasitology*. 2004, Vol. 126, p. 57-72.

DUBEY Jitender, FERREIRA Leandra, ALSAAD Mohammad, VERMA Shiv, ALVES Derron, HOLLAND Gary, McCONKEY Glenn. Experimental Toxoplasmosis in Rats Induced Orally with Eleven Strains of *Toxoplasma gondii* of Seven Genotypes: Tissue Tropism, Tissue Cyst Size, Neural Lesions, Tissue Cyst Rupture without Reactivation, and Ocular Lesions. *PLoS One*. 2016, Vol. 11, n° 5, p. 1-26.

DUBEY J, LINDSAY D, SPEER C. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clinical Microbiology reviews* 1998. Vol. 11, No. 2, p. 267-299.

FERGUSON D, GRAHAM D, HUTCHISON W. Pathological changes in the brains of mice infected with *Toxoplasma gondii*: a histological, immunocytochemical and ultrastructural study. *Int J Exp Pathol*. 1991, Vol. 72 n° 4, p. 463-474.

FERGUSON David, HUSKINSON-MARK Jayne, ARAUJO Fausto, REMINGTON Jack. A morphological study of chronic cerebral toxoplasmosis in mice: comparison of four different strains of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology Research*. 1994, Vol. 80, p. 493-501.

GÁLLEGO Jaime. Manual de Parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. 1ª Edición. Barcelona, España: Publicacions I Edicions de la Universitat de Barcelona, 2006. 518 p. ISBN 84-475-3141-4.

GATKOWSKA Justyna, WIECZOREK Marek, DZIADEK Bozena, DZITKO Katarzyna, DLUGONSKA Henryka. Behavioral changes in mice caused by *Toxoplasma gondii* invasion of brain. *Parasitol Res*. 2011. Vol. 111, p. 53-58.

HAFIDH Al-Sadi, SAEVAN Al-Mahmood. Pathology of Experimental *Encephalitozoon cuniculi* Infection in Immunocompetent and Immunosuppressed Mice in Iraq. *Pathology Research International*. 2014, Vol. 2014. p. 6.

HERMES Gretchen, AJIOKA James, KELLY Krystyna, MUI Ernest, ROBERTS Fiona, KASZA Kristen, MAYR Thomas, KIRISITS Michael, WOLLMANN Robert, FERGUSON David, ROBERTS Craig, HWANG Jong-Hee, TRENDLER Toria, KENNAN Richard, SUZUKI Yasuhiro, REARDON Catherine, HICKEY William, CHEN Lieping, McLEOD Rima. Neurological and behavioral abnormalities, ventricular dilatation, altered cellular functions, inflammation, and neuronal injury in brains of mice due to common, persistent, parasitic infection. *Journal of Neuroinflammation*. 2008, Vol 5, nº 48, p. 1-37.

HILL D, DUBEY J. *Toxoplasma gondii*. En: XIAO Lihua, RYAN Una, FENG Yaoyu. (Edit.). *Biology of Foodborne Parasites*. CRC Press, 2015, p. 209-222.

HILL D, DUBEY J. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect*. 2002, Vol 8, p.634–640.

HINRICHSEN L, DI MASSO R. Empleo de un modelo murino original de Argentina en la caracterización de fenotipos complejos. *Journal of Basic & Applied Genetics*. 2010, Vol. 21, nº 2.

HOFFLIN Jesse, CONLEY Frances, REMINGTON Jack. Murine Model of Intracerebral Toxoplasmosis. *The Journal of Infectious Diseases*. 1987, Vol. 155, nº 3, p. 550-557.

HORTÚA A, BELTRÁN S, OSSA H. Detección de toxoplasmosis congénita en líquido amniótico humano mediante la técnica de nested-pcr. *Acta Biológica Colombiana*. 2000, Vol. 5, nº2, p. 15-17.

HOWE D, SIBLEY L. *Toxoplasma gondii* is comprised of three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis*. 1995. p.1561-1566.

ISLACHIN HUAYRA, Jhon Paul. “Cuantificación de cerdos reactivos a *Toxoplasma gondii* provenientes de granjas no tecnificadas destinados a consumo humano”. Asesor: Francisco Suárez Aranda. Tesis Título Profesional. UNMSM. EAP Medicina Veterinaria, Lima, 2015. 60 pp.

KHAN Imtiaz, GREEN William, KASPER Lloyd, GREEN Kathy, SCHWARTZMAN Joseph. Immune CD81 T Cells Prevent Reactivation of *Toxoplasma gondii* Infection in the Immunocompromised Host. *Infection and Immunity*. 1999, vol. 67, n 11, p. 5869-5876.

KITTAS S, KITTAS C, PAIZI-BIZA P, HENRY L. A histological and immunohistochemical study of the changes induced in the brains of white mice by infection with *Toxoplasma gondii*. *Br J Exp Pathol* 1984, vol. 65, p. 67-74.

LAGUNA Liem, CAPÓ Virginia, RODRIGUEZ Marta, TORRES Griselda, SALAZAR Daniel, LIMONTA Daniel, CARIDAD María. Utilización de la inmunohistoquímica en el diagnóstico anatomopatológico de la neurotoxoplasmosis en pacientes VIH/SIDA. *Actas Hispanoamericanas de Patología*. 2006, p. 1-3.

LÓPEZ Christian, DÍAZ Julieth, GÓMEZ Jorge. Factores de Riesgo en mujeres embarazadas, infectadas por *Toxoplasma gondii* en Armenia-Colombia. *Rev. Salud pública*. 2005, Vol.7, nº2, p.180-190.

LUFT Benjamin., HAFNER Richard, KORZUN Ann, LEPORT Catherine, ANTONISKIS Diana, BOSLER Elizabeth, BOURLAND David, UTTAMCHANDANI Raj, FÜHRER Jack, JACOBSON Jeffrey, MORLAT Philippe, VILDE Jean-Louis, REMINGTON Jack, and Member of the ACTG 077p / ANRS 009 Study Team. Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *The New England Journal of Medicine*. 1993, Vol. 329, p. 995-1000.

LIU Quan, WANG Ze-Dong, HUANG Si-Yang, ZHU Xing-Quan. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. *Parasites & Vectors*. 2015, Vol. 292, nº 8, p. 1-14.

MARTÍN Ivonne, GARCÍA Susana. Toxoplasmosis: infección oportunista en pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida. *Revista Biomédica*. 2003, Vol. 14, nº2, p. 101-111.

McCONKEY Glenn, MARTIN Heather, BRISTOW Greg, WEBSTER Joan. *Toxoplasma gondii* infection and behavior – location, location, location? *The Journal of Experimental Biology*. 2013, Vol. 216, p. 113 – 119.

McINNES, Elizabeth. The Respiratory System. En: SCUDAMORE Cheryl (Edit). *A Practical Guide to the Histology of the Mouse*. Estados Unidos, 2013, p. 179-194.

MEDICINE. *Enfermedades Infecciosas: Parasitosis*. Santa Cruz, España. Universidad de La Laguna. 2010. 185 pp.

MELZER T, CRANSTON H, WEISS L, HALONEN S. Host Cell Preference of *Toxoplasma gondii* Cysts in Murine Brain: A Confocal Study. *Journal of Neuroparasitology*. 2010, Vol. 1, p. 1-6.

MIETTINEN M. Histological differential diagnosis between lymph node toxoplasmosis and other benign lymph node hiperplasias. *Histopathology*. 1981, Vol. 5, p. 205-216.

MILLER Catherine, SMITH Nicholas, IKIN Rowan, BOULTER Nicola, DALTON John, DONNELLY Sheila. Immunological interactions between 2 common pathogens, Th1-

inducing protozoan *Toxoplasma gondii* and the Th2-inducing helminth *Fasciola hepatica*. *PLoS One*. 2009, Vol. 4, nº5, p. 10.

MINISTERIO DE SALUD, INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: Ratón. Lima: MINSA-INS, 2008. 54 pp.

MINISTERIO DE SALUD, INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico histopatológico. Lima: MINSA-INS, 1997. 50 pp.

MONTOYA José. Laboratory Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection and Toxoplasmosis. *The Journal of Infectious Diseases*. 2002, Vol. 185, nº 1, p. S73-82.

MONTOYA J, LIESENFELD O. Toxoplasmosis. *The Lancet*. 2004, Vol. 363, p. 1965-1976.

MUÑIZ S, MONDRAGÓN R. *Toxoplasma gondii*, un patógeno asesino re-emergente. *Revista de Educación Bioquímica*. 2009, Vol. 28, nº 2 p.52-58.

PÉREZ José, CARO Luis. Toxoplasmosis Cerebral como manifestación de Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). *Neuroeje*. 2004, Vol. 18, nº 3, p. 52-55.

PÉREZ Jorge, VILLADA Johan, NARANJO Oscar, CASTAÑO Sandra. Formas alternas de transmisión de *Toxoplasma gondii*. *Biosalud*. 2011, Vol. 10, nº 2, p. 123 – 137.

REÁTEGUI Carmen, VELA, Luz. Factores socioeconómicos-epidemiológicos y su relación con la seroprevalencia de toxoplasmosis en gestantes atendidas en los hospitales “Felipe Arriola” y “César Garayar”, Iquitos, Perú, 2009. *Neotrop. Helminthol.* 2011, Vol. 5, nº 1, p. 31-40.

REMINGTON Jack, THULLIEZ Philippe, MONTOYA José. Recent Developments for Diagnosis of Toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology.* 2004, Vol. 42, nº 43, p. 941-945.

ROMERO Raúl. *Microbiología y Parasitología Humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias.* 3ª Edición. México: Editorial Medica Panamericana, 2007. 1720 p. ISBN. 978-968-7988-48-1.

SCUDAMORE Cheryl. *A Practical Guide to the Histology of the Mouse.* 1ª Edición. Estados Unidos: Wiley Blackwell, 2013. 248 p. ISBN. 978-1118789476.

SEPÚLVEDA Julio. *Histología Biología celular y tisular, Instructivo de Laboratorio.* 5ª Edición. México: Ed McGraw Hill, 2011. 150 p. ISBN. 978-1456236045.

SOTO José. Toxoplasmosis cerebral en pacientes con infección por HIV-SIDA. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología.* 1999, Vol. 19, nº1, p. 10-17.

SZABO Edina, FINNEY Constance. Toxoplasma gondii: One Organism, Multiple Models. *Trends in Parasitology.* 2016, Vol. 33, nº 2, p. 113-127.

TENTER Astrid, HECKEROTH Anja, WEISS Louis. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*. 2000, Vol. 30, p. 1217-1258.

VALENCIA MAMANI, Nicasio. "Toxoplasmosis como agente causal de abortos en alpacas". Tesis Magister en Salud Pública. UNMSM. Unidad de Postgrado Medicina Veterinaria, Lima 2006. 103 pp.

WALKER Melanie, ZUNT Joseph. Parasitic Central Nervous System Infections in Immunocompromised Hosts. Department of Neurology, University of Washington School of Medicine, Seattle. 2005, Vol 40, p. 1005-1015.

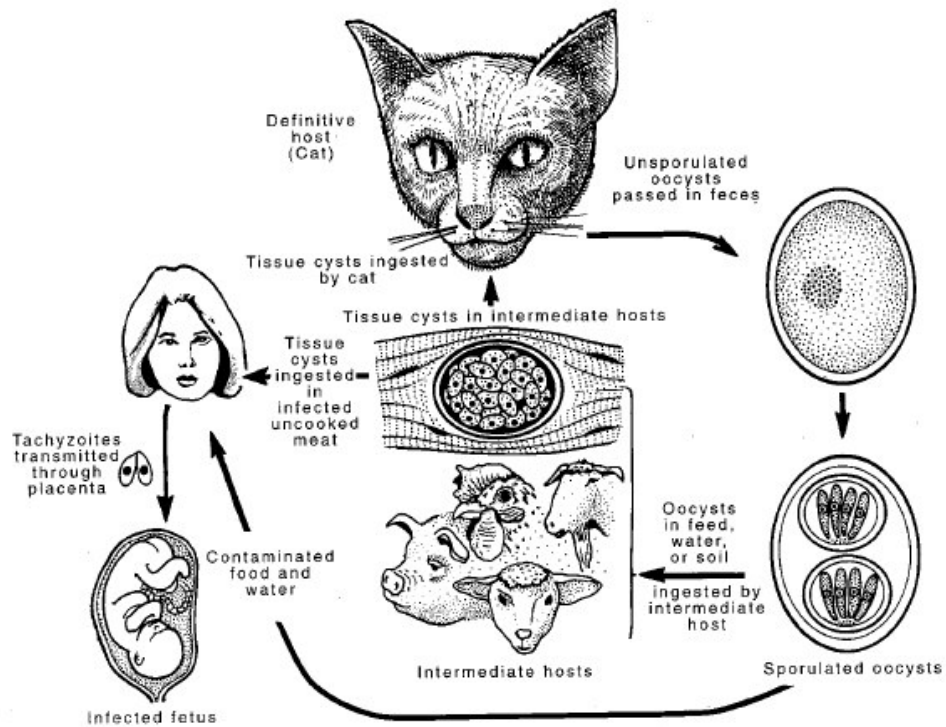
WALWYN Verónica, IGLESIAS María, ALMARALES María, ACOSTA Néstor, MERA Ana, CABREJAS María. Utilidad de técnicas histológicas para el diagnóstico de infección en piezas anatómicas. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 2004, Vol. 33, nº2.

WEISS Louis, DUBEY Jitender. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *International Journal for Parasitology*. 2009, Vol. 39, p. 895-901.

WEISS Louis, KIM Kami. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 2000, p. 391-405.

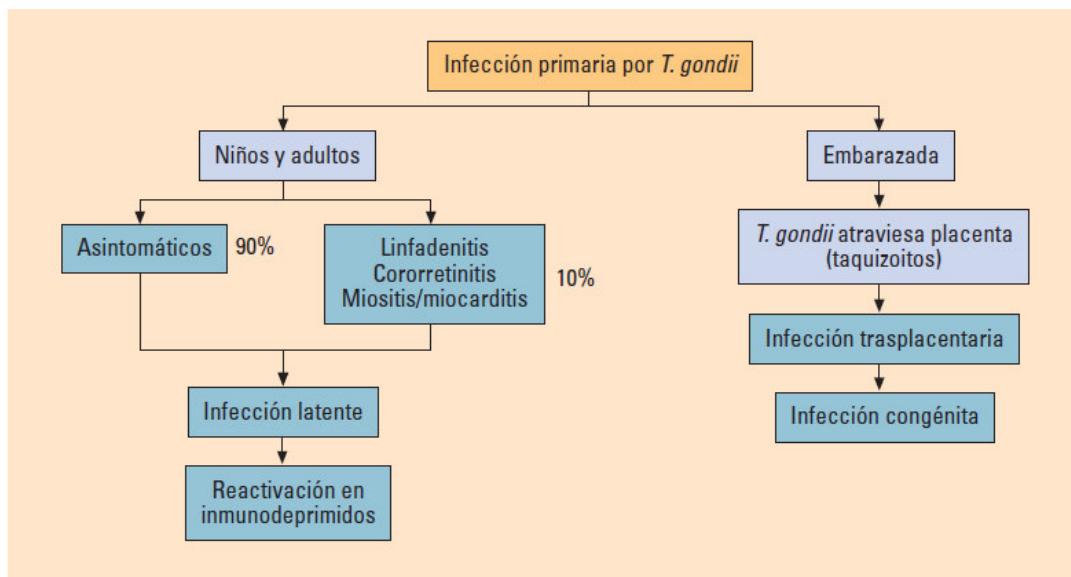
X. ANEXO

10.1 CICLO BIOLÓGICO



Tomado de Dubey et al. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts.

10.2 ESQUEMA PATOCRÓNICO BÁSICO DE LA INFECCIÓN POR *T. gondii*



Tomado de MEDICINE (2010). Enfermedades Infecciosas: Parasitosis. p. 56.

10.3 RESUMEN DE LOS MÉTODOS SEROLÓGICOS PARA LA DETECCIÓN DE INFECCIÓN POR *T. gondii*

Serological methods	Antigens or antibodies used	Antibody/antigen type tested
DT	Live tachyzoite	IgG, IgM, IgA
MAT	Formalin-fixed tachyzoite	IgG
IFAT	Killed whole tachyzoite	IgG, IgM
IHA	Tanned red blood cells sensitized with soluble antigens	IgG
ELISA	Tachyzoite lysate antigen, recombinant antigens, specific antibodies	IgG, IgM, IgA, antigens
ISAGA	anti-human IgM antibodies	IgM
LAT	Soluble antigen coated latex particles	IgG, IgM
PIA	Antigen coated gold nanoparticles	IgG
WB	Tachyzoite lysate antigen, recombinant antigens	IgG, IgM
ICT	Antigens or antibodies labeled with colloidal gold	IgG, ESA
Avidity test	tachyzoite lysate antigen, recombinant antigens	IgG, IgA, IgE

Tomado de Liu *et al* (2015) Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. p.3

EQUIPOS DE LABORATORIO

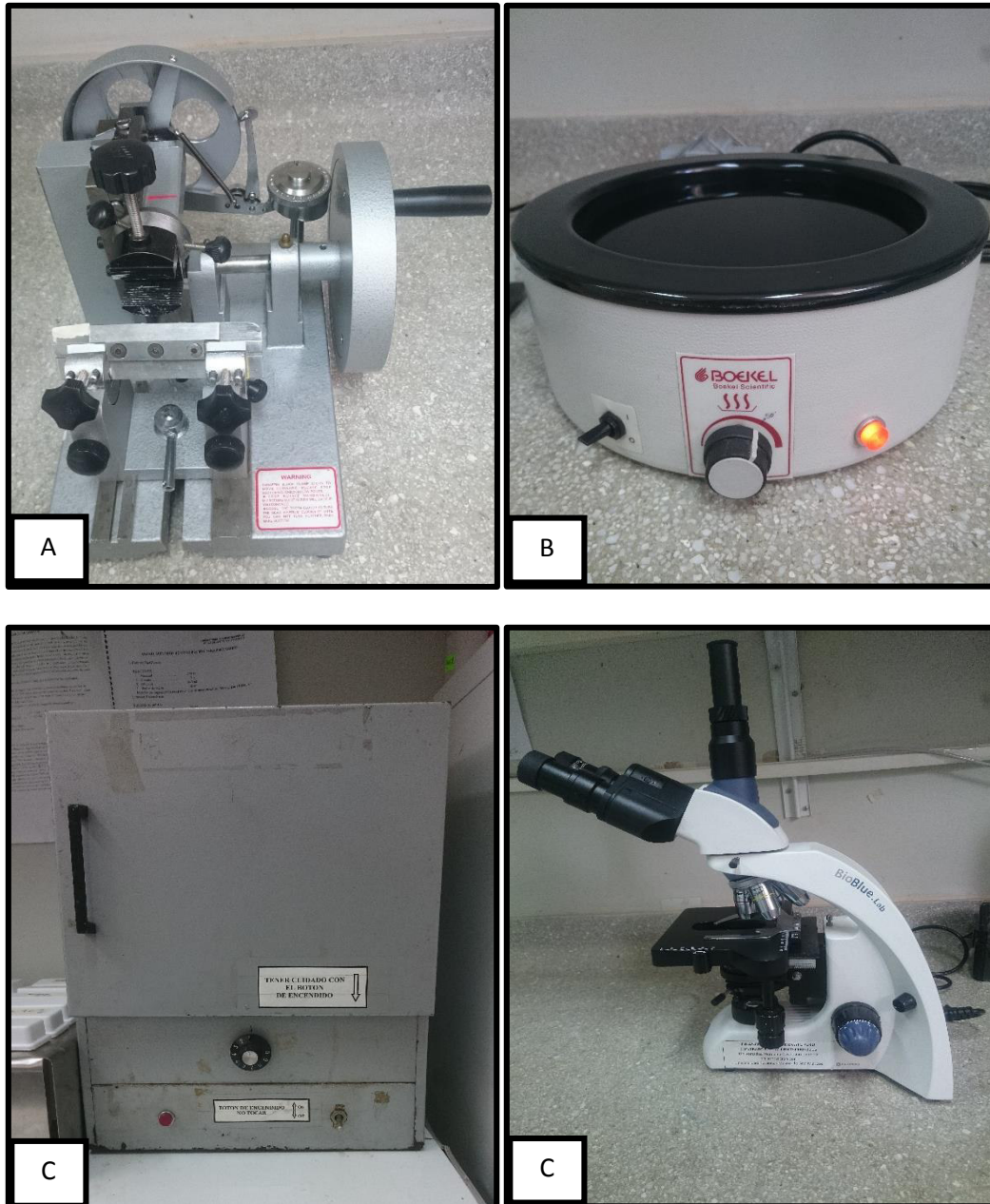


Figura 15: Equipos de laboratorio utilizados. A: Micrótopo. B: Flotador. C: Estufa. D: Microscopio con cámara.

METODOLOGÍA

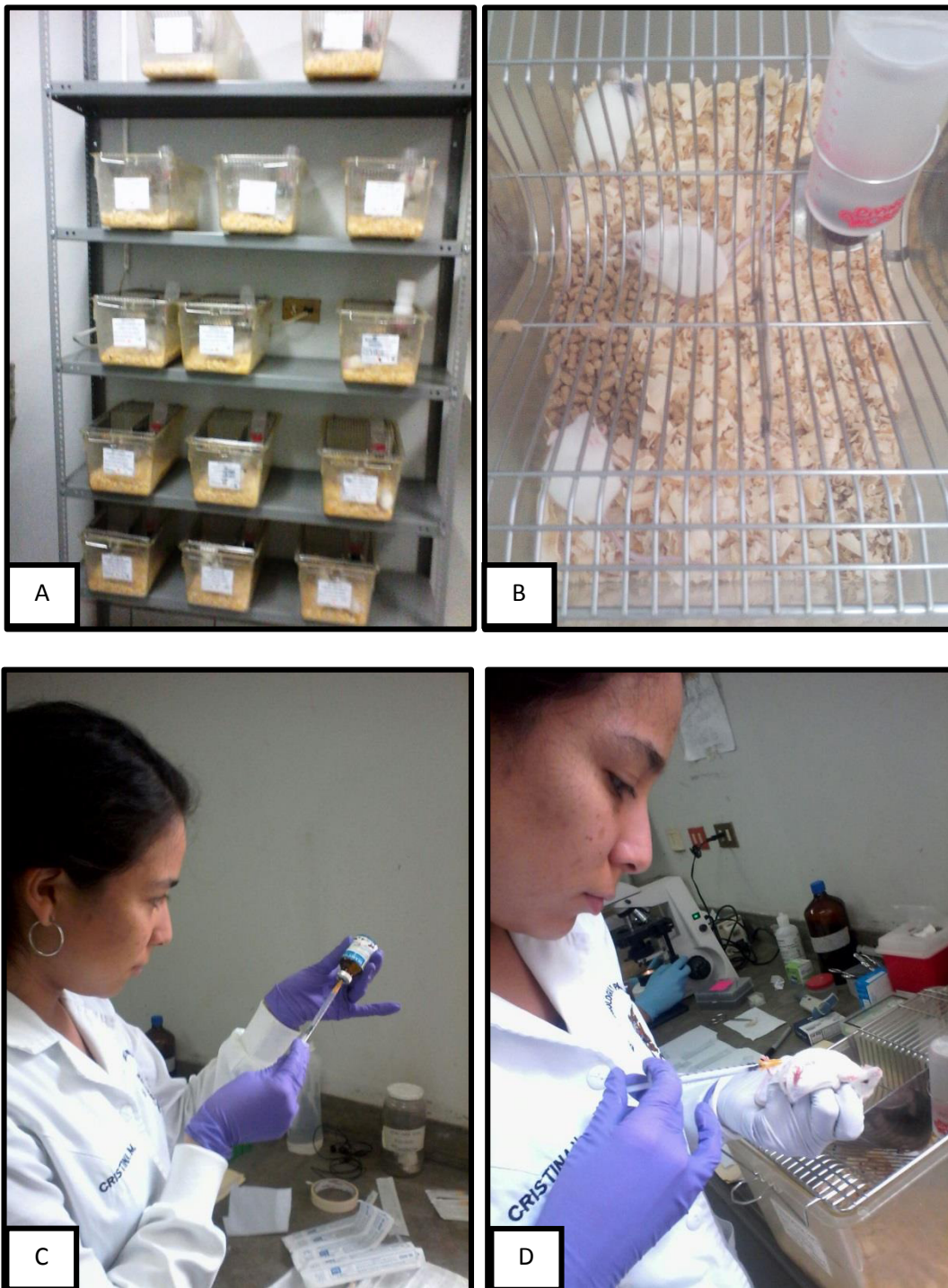


Figura 16: A y B: Distribución de jaulas Bioterio Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM. C y D: Inmunosupresión de ratones aplicando el fármaco Dexametasona.

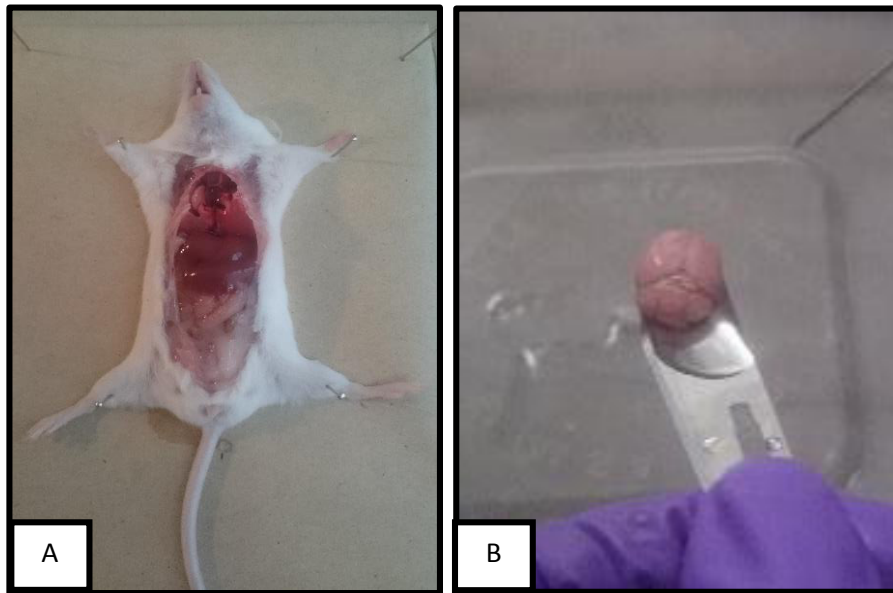


Figura 17: A: Obtención de órganos de ratones. B: Lavado de órganos con solución salina.

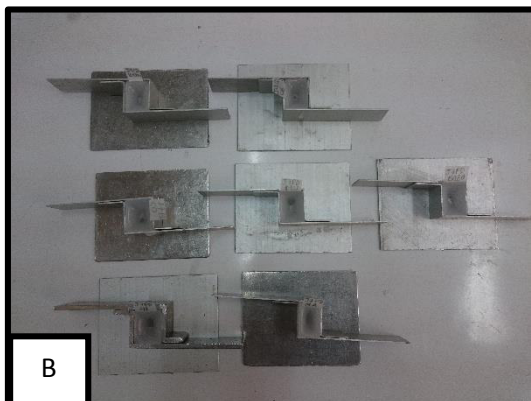


Figura 18: A: Batería de alcoholes (deshidratación)
B: Elaboración de bloques en parafina



Figura 19: A y B: Realización de cortes histológicos



Figura 20: A: Batería de alcoholes y colorantes para la tinción con Hematoxilina – Eosina.

B: Laminas coloreadas con Hematoxilina – Eosina.

C: Observación al microscopio de las láminas histológicas.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

HEMATOXILINA DE HARRIS

Cristales de Hematoxilina	5 gramos
Alcohol etanol al 100%	50 mL
Alumbre de Potasio	100 mL
Agua destilada	1000 mL
Oxido rojo de mercurio	2.5 gramos

Procedimiento:

1. Disolver la hematoxilina en el alcohol absoluto a temperatura de ambiente.
2. Disolver el alumbre en el agua destilada con la ayuda de calor.
3. Mezclar las dos soluciones despacio.
4. Llevar a punto de ebullición rápidamente, un minuto aproximadamente. Continuar mezclando.
5. Retirar del calor, añadir el óxido de mercurio lentamente. Recalentar hasta que se oscurezca.
6. Enfriar la solución antes de usarse.
7. Guardar la solución en un contenedor oscuro a temperatura de ambiente.
8. Filtrar la solución antes de usarse.

-Fecha de vencimiento: 6 meses.

EOSINA (SOLUCIÓN MADRE)

Eosina Y	1 gramos
Agua destilada	100 mL

Procedimiento:

1. Disolver la eosina en agua destilada.
2. Guardar la solución en un contenedor oscuro a temperatura de ambiente.
3. Filtrar la solución antes de usarse.

-Fecha de vencimiento: 6 meses

SOLUCIÓN ALCOHOL ÁCIDO AL 1%

Alcohol etanol al 70%	1000 mL
Ácido clorhídrico	10 mL

Procedimiento:

1. Mezclar ambas soluciones.
2. Guardar la solución en un contenedor oscuro a temperatura de ambiente.

-Fecha de vencimiento: 6 meses.