



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SECCIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PROGRAMA DE CIENCIAS QUIMICOBIOLOGICAS

Efecto de la infección materna con *Toxoplasma gondii* en el desarrollo de los órganos linfoides del ratón neonato BALB/c

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS
QUIMICOBIOLOGICAS
PRESENTA:
M en C María Asunción Cabañas Cortes



2009

Este trabajo se realizó en los laboratorios de Inmunología Clínica I e Inmunoquímica I del departamento de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Luis Antonio Jiménez Zamudio. La M en C María Asunción Cabañas Cortes recibió la beca otorgada (registro 18857) por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) para la realización de sus estudios de doctorado y por el Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) durante el periodo 2005-2007.

CONTENIDO

| | |
|---|-----|
| ÌNDICE DE TABLAS Y FIGURAS | i |
| RESUMEN | iii |
| ABSTRACT | iv |
| I. INTRODUCCIÒN | |
| 1. ANTECEDENTES | 1 |
| 1.1 <i>Toxoplasma gondii</i> | 1 |
| 1.2 Toxoplasmosis congénita | 4 |
| 1.3 Toxoplasmosis congénita en el modelo murino | 6 |
| 1.4 Órganos linfoides | 7 |
| 1.4.1 Médula ósea y sangre periférica | 8 |
| 1.4.2 Timo | 14 |
| 1.4.3 Bazo | 21 |
| 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 24 |
| 3. HIPÓTESIS | 25 |
| 4. OBJETIVOS | 25 |
| II. MATERIAL Y MÉTODOS | 27 |
| III. RESULTADOS | 38 |
| IV. DISCUSIÓN | 64 |
| V. CONCLUSIONES | 72 |
| VI. PERSPECTIVAS | 72 |
| VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 73 |
| VIII. ANEXO | 79 |

TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Manifestaciones clínicas de la Toxoplasmosis congénita..... | 5 |
| Tabla 2. Dosis y periodo de gestación en el que se llevó a cabo la infección materna..... | 29 |
| Tabla 3. Número de animales utilizados en cada experimento | 30 |
| Tabla 4. Secuencia de los nucleótidos usados para la detección de <i>Toxoplasma gondii</i> | 37 |
| Tabla 5. Efecto del número de taquizoítos y momento de la infección materna con <i>T. gondii</i> sobre la supervivencia de los ratones BALB/c..... | 38 |
| Tabla 6. Efecto de la infección materna en la línea mieloide en médula ósea del neonato de 7 días de edad..... | 45 |

FIGURAS

| | |
|--|----|
| Fig. 1. Formas infectantes, ciclo de vida y las diferentes formas de transmisión de <i>Toxoplasma gondii</i> | 2 |
| Fig. 2. Tejido hematopoyético..... | 9 |
| Fig. 3. Citocinas en la hematopoyesis..... | 11 |
| Fig. 4. Desarrollo embrionario del timo | 14 |
| Fig. 5. Morfología del timo..... | 16 |
| Fig. 6. Diferenciación y cambios fenotípicos de los linfocitos T en el timo..... | 17 |
| Fig. 7. Morfología del bazo..... | 22 |
| Fig. 8. Grupos de animales de experimentación y momento en el que se llevó a cabo la infección materna | 39 |
| Fig. 9. Apariencia de A) madres infectadas y B) las madres no infectadas..... | 40 |
| Fig. 10. Morfología del útero de A) madre infectada y B) de madre no infectada..... | 40 |

| | |
|---|----|
| Fig. 11. A) Apariencia y tamaño del neonato; B) Número de neonatos sobrevivientes por madre infectada; C) Peso corporal de los neonatos a los 7 días de edad..... | 42 |
| Fig. 12. Frotis de médula ósea..... | 44 |
| Fig. 13. Composición de la línea linfóide de médula ósea de neonato de 7 días de edad... | 45 |
| Fig. 14. Frotis de sangre periférica de neonatos de 7 días de edad..... | 47 |
| Fig. 15. Efecto de la infección materna sobre la composición de las células de sangre periférica de neonato de 7 días de edad | 48 |
| Fig. 16. Efecto de la infección materna con <i>T gondii</i> sobre el desarrollo del timo en neonatos de 7 días de edad | 50 |
| Fig. 17. Porcentaje de células apoptóticas en el timo de neonatos de 7 días de edad..... | 52 |
| Fig. 18 Determinación de las subpoblaciones en el timo de neonatos de 7 días..... | 54 |
| Fig. 19. Distribución de la subpoblación de timocitos seguidos por un periodo de incubación de 6 horas sin estímulo en el timo de los neonatos de 7 días de edad..... | 55 |
| Fig. 20. Aspecto histológico de las secciones del timo teñidas con H&E..... | 57 |
| Fig. 21. Índice esplénico de neonatos de 7 días de edad..... | 58 |
| Fig. 22. Determinación de las subpoblaciones del bazo en neonatos de 7 días..... | 60 |
| Fig. 23 Aspecto histológico de las secciones del bazo teñido con H&E..... | 61 |
| Fig. 24. Detección del DNA de <i>Toxoplasma gondii</i> de madres no infectadas e infectadas | 62 |
| Fig. 25. Detección del DNA de <i>Toxoplasma gondii</i> en el tejido del neonato de madres no infectadas e infectadas..... | 63 |

1. RESUMEN

La toxoplasmosis es una de las zoonosis ampliamente distribuidas en el mundo. La infección con *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) durante la gestación tiene consecuencias graves para el feto; causa el 3% de las malformaciones congénitas en recién nacidos vivos, así como, abortos, desordenes oculares y neurológicos, cuya gravedad se ha relacionado con el momento en el que se produce la infección materna. Se han estudiado varios aspectos de la toxoplasmosis, las alteraciones en el sistema linfopoyético y su participación en la infección neonatal no están del todo claro.

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la infección materna sobre los órganos linfoides del ratón neonato BALB/c. Se realizó la infección materna en el día 19 de gestación por vía i.p. con 30 taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii*. Como controles se utilizaron hembras gestantes sin infectar. Siete días después del nacimiento de las crías se clasificaron como: neonatos de madres infectadas y neonatos de madres no infectadas.

En la médula ósea de los neonatos de madres infectadas, se observó disminución de los linfocitos y monocitos además de incremento de las células plasmáticas. En sangre periférica también se observó disminución de linfocitos, gran cantidad de monocitos vacuolados y aumento de neutrófilos. En el caso del timo, su peso disminuyó considerablemente así como el número de células tímicas, mientras que el porcentaje de células apoptóticas incrementó significativamente en los mismos neonatos. Adicionalmente se observó una disminución de las células T CD4+CD8+ y aumento de las células T CD4+ y CD4+CD25+, no obstante, a pesar de los efectos sobre estas poblaciones tímicas, la estructura del tejido no presentó alteraciones graves; mientras que en la médula se observó un aumento en la infiltración de linfocitos. El índice esplénico disminuyó levemente, también se observó un incremento en las poblaciones de células CD4+CD25+ y CD8+CD25-. El bazo presentó una gran cantidad de megacariocitos, así como una población heterogénea de linfocitos grandes y pequeños, lo que sugiere la presencia de hematopoyesis extramedular y la presencia de un proceso de proliferación normal en esta etapa del desarrollo. No se detectó DNA de *T. gondii* en bazo e hígado de los neonatos de madres infectadas.

Finalmente, los datos obtenidos demuestran que la infección materna en el día 19 de gestación provoca cambios en el desarrollo y celularidad de los órganos linfoides del neonato. Este trabajo provee un modelo murino el cual podría usarse para entender la compleja relación entre la madre y el feto.

2. ABSTRACT

Toxoplasmosis is one of the more common parasitic zoonoses worldwide. Infection with *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) during the gestation has serious consequences for the fetus; it causes 3 % of the congenital malformations in alive newborn children; as well as, abortions, ocular and neurological disorders, which severity has related with the moment is produced the maternal infection. Several aspects of the toxoplasmosis have been studied, the alterations in the lymphopoietic system and them participation in the neonatal infection are not completely clear.

The aim of this work was to evaluate the effect of maternal infection on the lymphoid organs of the neonatal mouse BALB/c. Maternal infection was done on day 19th of gestation, with 30 tachyzoites of strain RH. Normal non infected pregnant females were used as controls. At 7 days after birth, animals were classified as neonates from infected and neonates from non-infected mothers.

In the bone marrow of neonates from infected mothers a decrease in the lymphocytes and monocytes and an increase in the plasma cells were observed. In the peripheral blood a decrease of lymphocytes was observed, however a great quantity of monocytes with large vacuoles was presented and an increase in the neutrophils. In case of the thymus, weight diminished dramatically as well as the number of thymic cells, nevertheless the percentage of apoptosis increase significantly in the same neonates. Was observed a decrease of the cells T CD4+CD8 + and an increase of the cells T CD4 + and CD4+CD25 +. Despite the effects on the thymic populations, the structure of the thymus did not present serious alterations; in the medulla area an increase infiltration of lymphocytes was observed. Splenic index diminished slightly, but an increase in the populations of CD4+CD25 + and CD8+CD25- cells was observed. Spleen presented a high quantity of megakaryocytes, as well as a heterogeneous population between big and small lymphocytes, suggesting the presence of a hematopoiesis out of the bone marrow and a normal process proliferation in this stage of the development. *T. gondii* DNA was not detected in the spleen and liver of the neonates from infected mothers.

Finally, results demonstrate that maternal infection in the 19th of gestation provoked changes in the development and cellularity of the lymphoids organs of the neonate. This work provides a murine model that could be used to understand the complex relation between the mother and the fetus.

I. INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES

1.1 *Toxoplasma gondii*.

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) es un parásito intracelular obligado, aislado por primera vez por Charles Nicolle y Manceaux en 1908, de roedores *Ctenodactylus gondi* en el Norte de África. Su nombre se debe a su forma arqueada y proviene del griego *toxon* que significa arco y *plasma* que significa forma (Black et al. 2000).

El parásito existe en tres formas infectantes: taquizoíto o trofozoito de forma semilunar, los bradizoítos contenidos en los quistes intratisulares y el ooquiste u oocisto, es la forma de resistencia en el medio exterior. En la figura 1 se presenta la morfología de cada una de las formas infectantes.

El ciclo de vida de *T. gondii* esta dividido en una fase sexual, que ocurre sólo en el huésped definitivo (gato) y una fase asexual que ocurre tanto en el huésped definitivo como en el huésped intermediario (humano), ver figura 1. El ciclo sexual inicia cuando un miembro de la familia de los félidos ingiere ooquistes o tejidos infectados con bradizoítos, algunos de ellos son liberados en el lumen del intestino, donde se diferencian en microgametos masculinos y femeninos, cuya fecundación da origen a la formación de un ooquiste (10-12 μm) diploide y no esporulado. Millones de ooquistes formados por dos esporoquistes, cada uno de ellos con cuatro esporozoitos, se excretan en el transcurso de las tres semanas siguientes a la primoinfección del gato. Los esporozoitos liberados de los ooquistes infectan el epitelio intestinal y se diferencian a taquizoítos (Dubey et al. 1998; Freij et al. 1991).

El taquizoíto (2-4 μm de ancho y 4-8 μm de largo) se encuentra durante la fase aguda de la infección. Infecta a todas las células nucleadas y forma en el citoplasma una vacuola parasitófora, se replica cada 5 a 7 horas (*in vitro* 6 a 8 horas). Las células

infectadas eventualmente se destruyen después de acumularse de 64 a 128 parásitos por célula, invade las células vecinas o es diseminado vía el torrente sanguíneo. Infecta diferentes tejidos como el SNC, el ojo, el músculo (esquelético y cardíaco) y la placenta. Algunos taquizoítos son transformados en bradizoítos contenidos en quistes. Aparecen a los 7 a 10 días de post infección y persisten indefinidamente en el huésped. El desarrollo de los quistes tisulares en el huésped se define como la fase crónica de la infección, (Dubey et al. 1998; Freij et al. 1991).

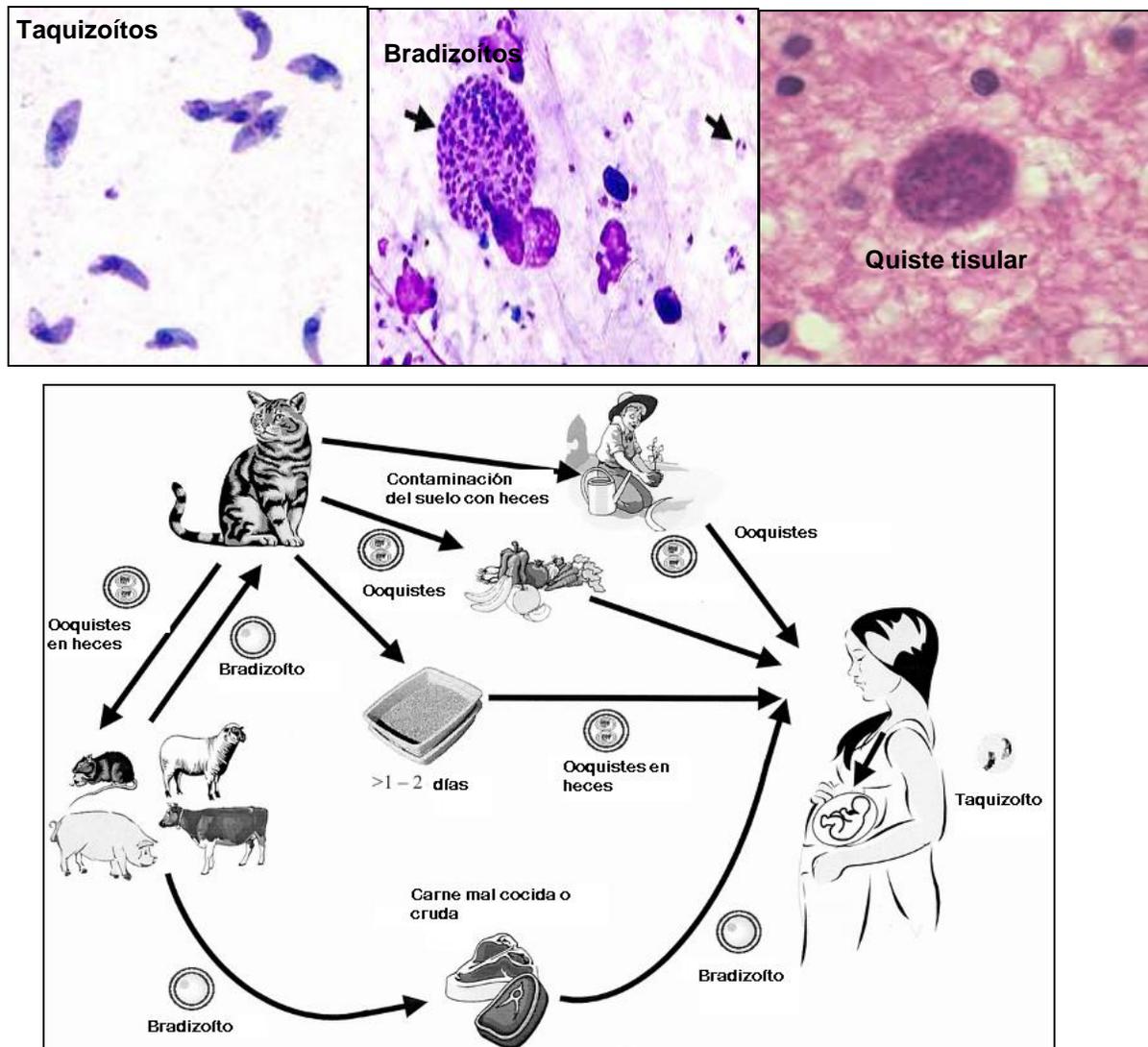


Fig. 1 Formas infectantes, ciclo de vida y las diferentes formas de transmisión de *Toxoplasma gondii* (Jones et al. 2001).

Los quistes son destruidos en el tracto digestivo, se liberan los bradizoítos, entonces infectan el epitelio del lumen intestinal, donde son diferenciados a taquizoítos, los cuales se diseminan a través del cuerpo, completando el ciclo asexual (Dubey et al. 1998; Freij et al. 1991).

T. gondii se transmite al humano por vía oral: al ingerir alimentos o agua contaminada con ooquistes, provenientes de las cajas de arena del gato o del suelo de jardinería, también por consumir carne de cerdo, res y borrego mal cocida que contiene quistes tisulares (bradizoítos). Por vía transplacentaria, la mujer embarazada sufre una primo infección transmite la infección al feto a través de la placenta. La transfusión sanguínea y el transplante de órganos también es una posible ruta de transmisión (de Medeiros et al. 2001; Elsheikha 2008; Jones JL et al. 2001)

La virulencia de la cepa de *T. gondii* es uno de los principales factores que participan en la severidad de la enfermedad (Howe et al. 1995). Aproximadamente el 90% de las cepas de *T. gondii* se dividen como tipo I, II y III; que difieren genéticamente entre el 1-2 % (Saeij et al. 2005).

La cepa del tipo I es altamente virulenta en el ratón, tienen un alto índice de multiplicación *in vitro* y una diferenciación reducida de taquizoíto a bradizoíto. Se asocia con infecciones oculares en pacientes inmunocompetentes, tiene la capacidad de atravesar barreras biológicas (sangre-cerebro, sangre-retina, placenta y mucosa intestinal) tanto *in vitro* como *in vivo* (Barragán et al 2003).

La cepa del tipo II se ha aislado de humanos, borregos y cerdos y no es virulenta para el ratón, tiene una multiplicación lenta, la diferenciación de taquizoíto a bradizoíto se lleva a cabo, así como la formación de quistes. Es responsable del 70 % de las infecciones adquiridas en el humano, se asocia con la reactivación de la infección crónica por la persistencia de quistes tisulares, también causa el 65 % de las infecciones en pacientes con SIDA (Barragán et al. 2003; Montoya et al. 2004).

La cepa del tipo III se ha aislado de animales salvajes de áreas remotas y es relativamente no virulenta para el ratón. Se presenta en infecciones crónicas tanto en animales como en humanos (Dubey 2004; Montoya et al 2004).

La infección con *T. gondii* ocurre en todo el mundo, en general, la incidencia de la infección varía con el tipo de población y la localización geográfica, sin embargo, la seroprevalencia en Europa es del 54-58 %, en América Latina y en África es del 54-77 %, (Petersen 2007; Rorman et al. 2006).

1.2 Toxoplasmosis congénita.

La toxoplasmosis es una enfermedad de gran impacto en la salud pública, debido al riesgo de transmisión durante el embarazo hacia el feto. El mecanismo de transmisión vertical no es del todo claro. Un mecanismo probable es la parasitemia temporal en la mujer embarazada infectada por primera vez, puede resultar en la invasión de la placenta por taquizoítos, eventualmente algunos de ellos pueden atravesar la placenta y entrar a la circulación fetal (Barragán et. al 2003).

Existen diferentes factores que participan en la infección intrauterina del feto, como son: el momento en el que se lleva a cabo la infección materna, el número y la virulencia del parásito. La severidad de la enfermedad depende de estos factores (Tenter et al. 2000; Rorman et al. 2006).

La probabilidad de transmitir el parásito al feto es sólo del 1 % cuando la infección primaria ocurre durante el periodo de preconcepción, pero se incrementa conforme progresa el embarazo. El riesgo de transmisión fetal es bajo (10-25 %) cuando la primera infección materna ocurre durante el primer trimestre y alto (60-90 %) cuando la madre es infectada durante el tercer trimestre del embarazo. Sin embargo, los efectos sobre el feto son más severos si la transmisión ocurre durante el primer trimestre del embarazo. El riesgo de presentar una infección congénita por infección aguda con *T. gondii* durante el embarazo, es del 20 al 50 %, (Rorman et al. 2006).

La gravedad de las lesiones en el neonato se han relacionado con el momento en que se lleva a cabo la infección materna. Los neonatos con una enfermedad severa sólo comprenden el 10 % de los casos de toxoplasmosis congénita, las manifestaciones sistémicas predominan en algunos de estos infantes, mientras que los daños neurológicos son los más prominentes en otros. La manifestación más significativa en el feto es la encefalomielitis, la cual tiene consecuencias severas. Cerca del 10 % de las infecciones prenatales resultan en aborto o muerte neonatal. Otro 10 al 23 % de los recién nacidos infectados muestran signos clínicos de toxoplasmosis al nacer. Los signos de la triada clásica de la toxoplasmosis como son retinocoroiditis, calcificaciones intracraneales e hidrocefalia, se manifiestan en arriba del 10 % de estos recién nacidos, mientras que otros recién nacidos muestran una variedad de síntomas, que van desde afecciones del sistema nervioso central hasta síntomas no específicos de la infección aguda. Del 12 al 16 % de estos recién nacidos mueren por la enfermedad, (Freij et al. 1991, Tenter et al. 2000, Rorman et al. 2006).

Los infantes sobrevivientes sufren de un retardo mental progresivo u otra deficiencia neurológica la cual requiere una educación especial y cuidado. Un resumen de las anomalías presentes en la toxoplasmosis congénita se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Manifestaciones clínicas de la toxoplasmosis congénita

| Sitio afectado | Anormalidad |
|--------------------------|--|
| General | Retardo en el crecimiento intrauterino, retardo mental y psicomotor, inestabilidad en la temperatura, nacimientos prematuros. |
| Sistema nervioso central | Encefalitis, hemiplegia, hidrocefalia, hipotonía, calcificaciones intracraneales, microcefalia, pleocitosis en el líquido cefalorraquídeo. |
| Oídos | Sordera. |
| Ojos | Ceguera, corioretinitis, iritis, leucocoria, microftalmia, atrofia óptica, cornea pequeña y estrabismo. |
| Tracto gastrointestinal | Diarrea, vomito y dificultades para alimentarse. |
| Corazón | Miocarditis |
| Sistema hematopoyético | Anemia, eosinofilia, trombocitopenia. |
| Riñón | Síndrome nefrótico. |
| Hígado | Calcificaciones, hepatoesplenomegalia, ictericia, |
| Sistema respiratorio | Neumonía intersticial, dificultades para respirar. |
| Piel | Equimosis, petequias, erupciones maculopapulares. |

Tomado de Freij BJ et al 1991.

Sin embargo, sí la transmisión ocurre en el tercer trimestre del embarazo, los efectos sobre el feto son menos severos. Aproximadamente el 67 al 80 % de los infantes infectados en la etapa prenatal no presentan los síntomas de la enfermedad y pueden ser diagnosticados sólo usando pruebas serológicas. Aunque estos infantes pueden ser saludables al nacer, desarrollan deficiencias a lo largo de su vida. Estas deficiencias afectan principalmente los ojos, el SNC y los oídos. Se ha estimado que cerca de un tercio de los niños infectados de manera prenatal podrían desarrollar daño visual a lo largo de su vida, (Tenter AM, et al 2000).

La incidencia de la infección prenatal con *T. gondii* se ha estimado que varía entre 1 a 100 por cada 10,000 nacimientos en diferentes países. En el mundo, de 3-8 infantes por 1000 nacimientos vivos son infectados *in útero* (Rorman et al. 2006).

En México la infección es común y se presenta entre 15 al 65 % de la población. La toxoplasmosis congénita es un problema obstétrico. Existe un programa nacional de trastornos neonatales, pero sólo son incluidas enfermedades no infecciosas, en un estudio realizado por Vela-Amieva et al (2005) sugieren una frecuencia de aproximadamente 2 casos de toxoplasmosis congénita por cada 1000 nacimientos en la Ciudad de México.

1.3 Toxoplasmosis congénita en el modelo murino

El ratón es el animal más susceptible a la infección por *T. gondii* y se utiliza como modelo para el estudio de la infección congénita (Freyre et al. 2006).

Un estudio realizado por Roberts et al (1992), demostró que los ratones BALB/c infectados con quistes (cepa Beverley) de manera crónica no transmiten la infección de la madre al hijo. La infección sólo ocurre cuando la madre se infecta por primera vez durante la gestación y la infección se presenta en el 50 % de los recién nacidos. En otro estudio similar realizado por Fux et al. (2000), observó signos de hipertrofia en el endometrio y miometrio de ratones BALB/c infectados de manera crónica con la cepa P

de *T. gondii*. Sin embargo, Roberts y Alexander (1992) no reportaron ninguna descripción sobre el índice reproductivo en los ratones infectados de manera crónica.

La infección materna en ratones de las cepas NYLAR, C57BL/6J y BALB/c con quistes de *T. gondii* en el día 7 de gestación, provocó en las crías un daño grave en el hígado, se observó necrosis hepatocelular, calcificaciones y granulomas de células gigantes; en el bazo, las áreas de la pulpa roja y blanca no estaban definidas; en el riñón se presentó necrosis túbular y glomerular, así como calcificaciones; en el pulmón se presentaron hemorragias. La patogénesis de la toxoplasmosis congénita en las tres cepas de ratones, se caracterizó por alteración de la homeostasis, debido a la diseminación del parásito por el torrente sanguíneo y a la invasión endotelial, ambas inducen una respuesta inflamatoria sistémica provocando una disfunción vascular, por lo tanto, una disfunción múltiple en los órganos. Además, se observó un índice bajo de sobrevivencia, así como retardo en el crecimiento de las crías (Stahl et al. 2004).

Los estudios realizados por los autores antes mencionados se llevaron a cabo con diferentes dosis de quistes; la variación en el número de quistes, y la cantidad de bradizoítos producidos en el quiste es variable, lo que provoca una diferencia entre la dosis administrada y la que realmente se encuentra en el huésped. Por lo que se presenta diferencia entre los resultados.

1.4 Órganos linfoides

Los órganos linfoides son tejidos organizados, importantes para el desarrollo y maduración de las células que participan en la respuesta inmune. Se clasifican como órganos linfoides primarios o centrales y secundarios o periféricos. Los órganos linfoides primarios son la médula ósea y el timo. Tanto los linfocitos B como los T tienen su origen en la médula ósea, pero sólo los primeros maduran allí; los linfocitos T migran al timo para realizar en él su maduración y selección. Una vez finalizado su selección y diferenciación, ambos tipos de linfocitos entran en la circulación sanguínea, donde migran a los órganos linfoides secundarios, como los ganglios linfáticos, el bazo y el

tejido asociado a mucosas. Los linfocitos presentes en los órganos linfoides secundarios son funcionales o inmunocompetentes y están en constante recirculación, lo cual facilita tanto su encuentro con los antígenos, como su interacción con otras células (Chaplin 2003, Cyter 2003, Crivellato et al. 2004).

1.4.1 Médula ósea y sangre periférica.

La médula ósea es el lugar donde se generan todas las células sanguíneas. Durante el desarrollo fetal, la generación de todas las células sanguíneas, proceso denominado hematopoyesis, tiene lugar inicialmente en los islotes sanguíneos del saco vitelino y del mesénquima paraaórtico, (Tada et al. 2006).

En el ratón, la hematopoyesis primaria generalmente cambia a una hematopoyesis secundaria en el hígado entre los días 10.5 y 12 de gestación. Las células madre hematopoyéticas se forman en el saco vitelino e hígado fetal, entran a la circulación sanguínea y son atraídas a los órganos hematopoyéticos (Tada et al. 2006).

El tejido hematopoyético consiste en células adiposas, células endoteliales vasculares, células reticulares del estroma, fibroblastos y precursores de las células sanguíneas. La estructura básica de este tejido provee el microambiente necesario para que ocurra la hematopoyesis como resultado de la interacción entre las células reticulares estromales y los precursores de las células hematopoyéticas. Todas las células sanguíneas se originan a partir de una célula madre común que posteriormente se diferencia en elementos comprometidos hacia estirpes celulares específicas (eritroide, megacariocítica, granulocítica, monocítica y linfocítica), como se observa en la figura 6.

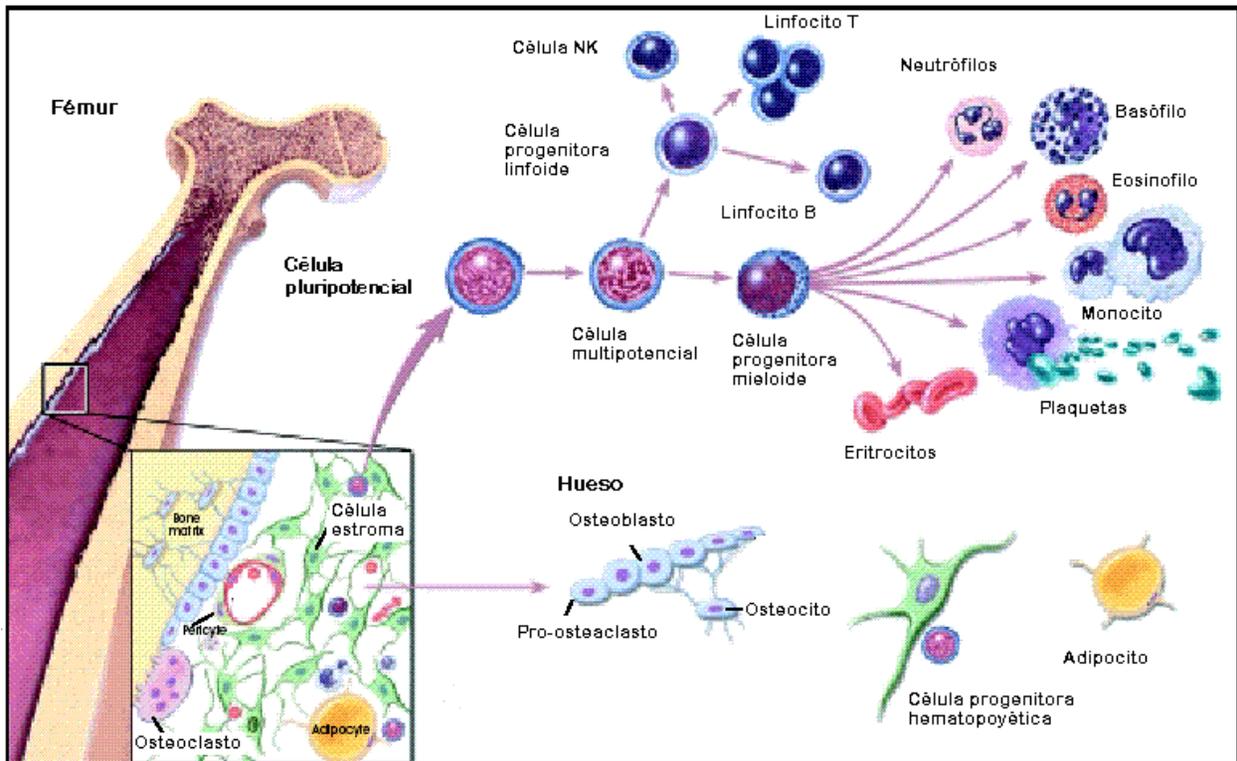


Fig. 2 Tejido hematopoyético. Tomado de www.brown.edu/

Se estima que el porcentaje de celularidad en la médula ósea del ratón varía entre el 70-90 % del espacio de la médula. Las células más grandes en la médula ósea del ratón son los megacariocitos, son células con núcleos multilobulados, se presentan en todos los estados de maduración y se encuentran en una mayor proporción en la médula del ratón que en el humano, (Everds 2004).

La relación mieloide: eritroide es de 2.5:1 en la médula ósea del ratón normal. Los precursores de la línea mieloide varían en su tamaño. El núcleo en forma de anillo es evidente en los metamielocitos; los precursores eritroídes son visibles en todos los estados de maduración, ocasionalmente se presentan binucleados. Las figuras mitóticas representan al menos el 1 % de las células de la médula ósea.

Las células plasmáticas representan el 1-3 % de la población celular y varían en tamaño. Ocasionalmente se observan células plasmáticas binucleadas. En la médula ósea del ratón se encuentran linfocitos pequeños que varían de un 2-8 % del total de células de médula ósea (Sanderson et al. 1981).

La producción, diferenciación y maduración de las células sanguíneas es regulada por algunos factores hematopoyéticos (ej. citocinas). Algunas de ellas actúan sobre células precursoras y tienen una acción general, mientras que otras como por ejemplo la eritropoyetina actúa sobre una línea celular específica. El origen de los factores hematopoyéticos varía. La eritropoyetina es principalmente producida en el riñón y en menor cantidad en el hígado; estimula la proliferación de células progenitoras de la línea eritroide y la liberación de eritrocitos inmaduros. La interleucina-3 (IL-3) es producida por linfocitos T y las células mieloides; los factores estimulantes de colonias (CSF) son producidos por una gran variedad de células incluyendo los macrófagos/monocitos, fibroblastos, células endoteliales, linfocitos y la placenta. El factor de crecimiento de células B y el de diferenciación de células B son derivados del linfocito T. La interleucina-1 (IL-1) es producida por los macrófagos, (Travlos 2006).

El microambiente y los factores de crecimiento de la médula ósea influyen en la diferenciación de la célula madre pluripotencial hacia el precursor mieloide o linfoide, ellas tienen una capacidad limitada de renovarse no de diferenciarse hacia una progenie madura. El precursor mieloide es estimulado por productos solubles denominados unidades formadoras de colonias de eritrocitos, monocitos, granulocitos y megacariocitos, (CFU-GEMM). En la siguiente etapa de maduración participan las unidades formadoras de colonias específicas para cada estirpe celular, por ejemplo, CFU-Meg, CFU-GM y CFU-E (Travlos 2006). En la figura 3 resumen las diferentes citocinas que estimulan el crecimiento y la maduración de las diferentes estirpes de células sanguíneas.

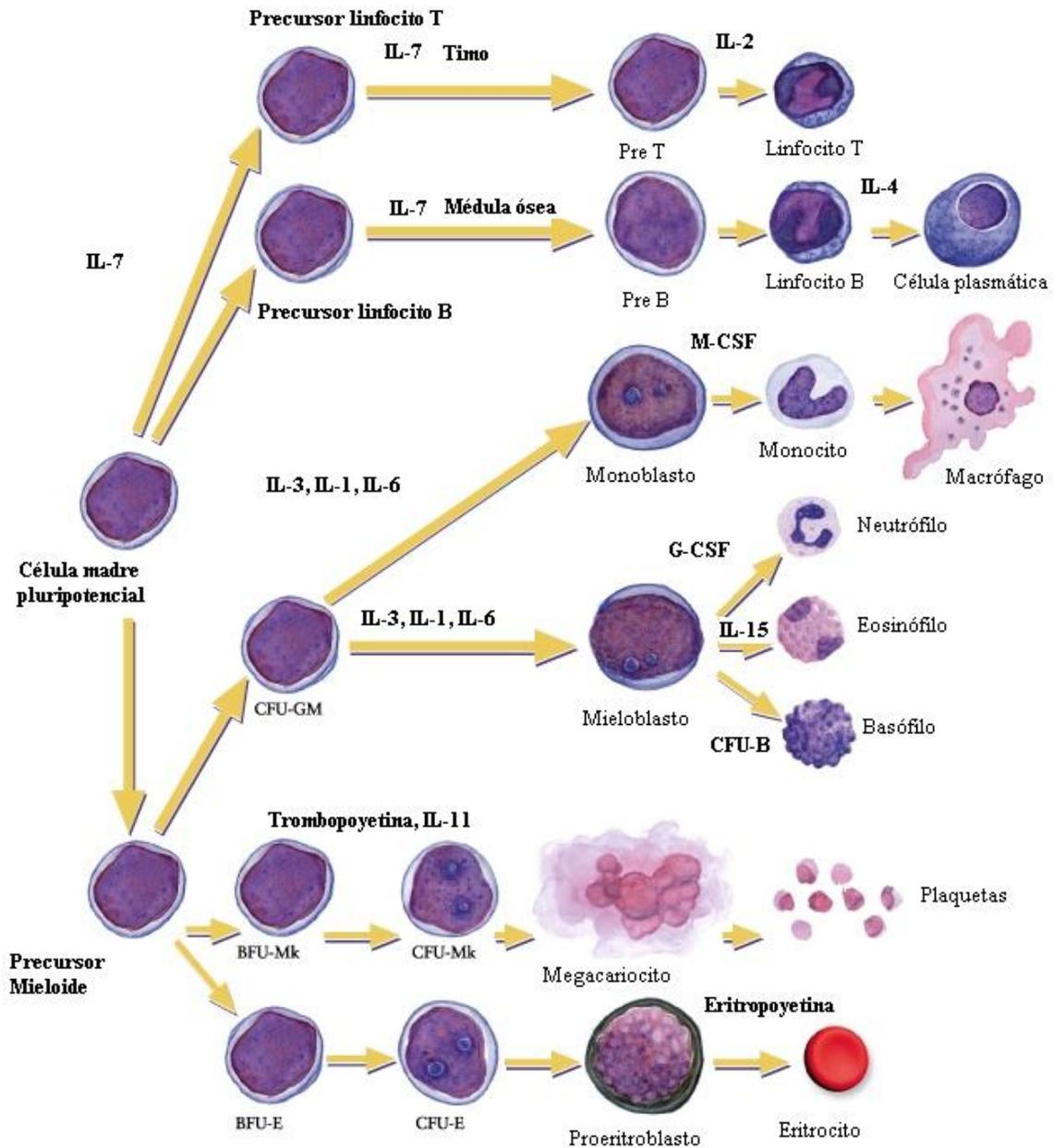


Fig. 3 Citocinas en la hematopoyesis. CFU, unidad formadora de colonias; IL, interleucina; CSF, factor estimulante de colonias (tomado de xxx)

Una vez terminada la hematopoyesis en la médula ósea, las células maduras salen a sangre periférica y son clasificados como leucocitos (linfocitos, monocitos y granulocitos) y eritrocitos. Los leucocitos participan en los procesos de la respuesta inmune e inflamatoria.

La cuenta diferencial de los leucocitos enumera a los diferentes tipos de células presentes en sangre periférica. Los leucocitos que predominan en sangre periférica en el ratón son los linfocitos, seguido por los neutrófilos, monocitos, eosinófilos y finalmente los basófilos. Adicionalmente, otros tipos de células pueden ser observados, éstas pueden ser subcategorías de los cinco tipos celulares principales o quizás otras células que normalmente no se observan en sangre periférica (Everds 2004).

Los linfocitos del ratón son generalmente similares en apariencia a los de otras especies. Estos miden aproximadamente 7-12 μm de diámetro y presentan un núcleo ovalado azul que ocupa casi todo el citoplasma, en el ratón aproximadamente el 60-90 % de los leucocitos en la circulación sanguínea son linfocitos ($2-8 \times 10^9/\text{L}$). El incremento de linfocitos en circulación se presenta en respuesta secundaria a las catecolaminas, a una alteración en el tráfico leucocitario o la diferenciación maligna en médula ósea. El aumento de los linfocitos por las catecolaminas generalmente es transitorio (minuto a horas), mientras que debido a un proceso inflamatorio el incremento persiste (días a semanas). La disminución de los linfocitos puede ser debida al estrés, a la alteración en el tráfico linfocitario o a una inmunodeficiencia. La disminución de los linfocitos debida al estrés ocurre de manera secundaria al efecto provocado por el aumento de corticosteroides, este efecto puede durar horas o el tiempo que dure el estrés y puede persistir de días a semanas (Sanderson et al. 1981, Everds 2004).

En el ratón, los neutrófilos ($0.5-3.0 \times 10^9/\text{L}$) constituyen aproximadamente del 5-20 % de la población de los leucocitos, la apariencia morfológica del neutrófilo es similar a la de otras especies, aunque algunas veces presenta un núcleo en forma de dona y gránulos pálidos; mide 10-25 μm de diámetro. El incremento de los neutrófilos en la circulación, se debe a un aumento en la producción estos en médula ósea, generalmente causado por incremento en los factores estimulantes de colonias como resultado de un proceso inflamatorio. La disminución de los neutrófilos puede resultar por baja en su producción en la médula ósea, a un incremento en la salida hacia los tejidos. Una disminución de la producción en médula ósea se sugiere se deba a un efecto tóxico; el incremento en la salida de los neutrófilos se debe a un proceso inflamatorio. En la etapa inicial de la

inflamación, una gran cantidad de neutrófilos son atraídos por las quimiocinas a los sitios de inflamación (Sanderson et al. 1981, Everds 2004).

Los monocitos y eosinófilos están presentes en menor cantidad, en un rango aproximado de $0.05-0.10 \times 10^9/L$. Generalmente existe una mayor cantidad de monocitos que de eosinófilos en sangre periférica. Los basófilos rara vez se observan en sangre periférica del ratón.

El incremento de los monocitos en la circulación generalmente indica una demanda de macrófagos para tejido y es un indicador de inflamación. Una disminución de monocitos en circulación no es común, pero puede indicar un incremento en la salida hacia el tejido o resultar de un incremento en los corticosteroides.

El aumento de los eosinófilos en la circulación se presenta como resultado de un proceso alérgico o inflamatorio, generalmente acompañado por un incremento de eosinófilos en el tejido. El incremento de la cantidad de basófilos no es común en el ratón (Sanderson et al. 1981, Everds 2004).

La cuenta total de las células de sangre periférica es una medida cruda del estado del sistema linfoide, por lo que es necesario explorar los órganos linfoides como la médula ósea, el timo y el bazo para poder tener un panorama completo del estado del sistema inmune.

1.4.2 Timo

En el ratón, el desarrollo del timo comienza en el día 9 de la gestación y se origina a partir de las capas endodérmicas y ectodérmicas de las estructuras embrionarias conocidas como la tercera bolsa faríngea y la tercera hendidura bronquial. Alrededor del día 11 de gestación, progresivamente las dos capas entran en contacto, éstas invaden el interior del mediastino superior y se fusionan para formar una masa epitelial sólida en forma de V, conocido como timo rudimentario o rudimento tímico, (figura 4).

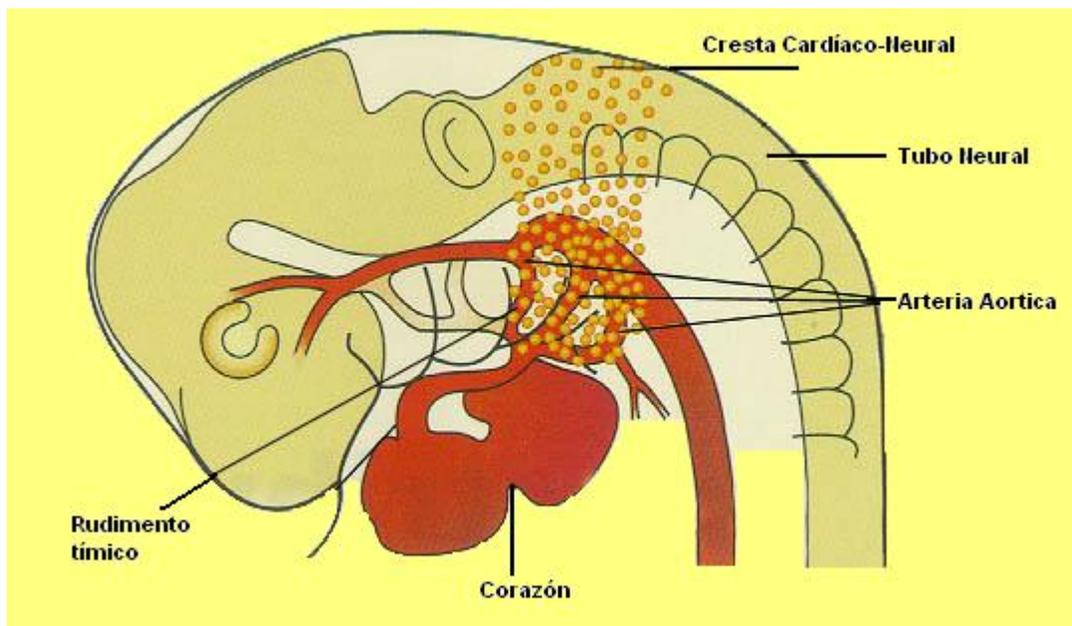


Fig. 4. Desarrollo embrionario del timo. www.embryology.ch

En este periodo de gestación las células precursoras de los linfocitos T provenientes de la médula ósea, llegan al timo vía torrente circulatorio atraídas por factores quimiotácticos producidos por las células epiteliales tímicas. Son células que tienen una amplia proliferación pero una diferenciación limitada. También se encuentran los precursores de las células NK, células dendríticas y macrófagos.

En el día 12 de la gestación aparece el primordio subcapsular, este es cubierto por una membrana separando el tejido epitelial y el mesénquima. El mesénquima juega un papel estructural durante el desarrollo del timo (Verinaud et al. 2004; Pearse 2006).

Por el día 14 y 15 de la gestación el timo muestra cambios histogénéticos y orgánicos, toma su posición en la cavidad pericardial y la superficie del primordio tímico toma una forma ondulada, la trabécula invade y divide el órgano en lóbulos. Los linfocitos se encuentran con un fenotipo de CD3-CD4-CD8-. El rearrreglo de los genes del TCR β es detectable. La expresión de los marcadores de superficie CD4 y CD8 en los linfocitos aparecen entre los días 15 y 16 de la gestación, en los próximos días la población CD4+CD8+ (dobles positivos) es mayor.

En este momento el órgano no se ha diferenciado en las zonas subcapsular, cortical y medular. La funcionalidad total de las células CD4+ o CD8+ (simples positivas) se observó en el día 18 y 19 de gestación. La funcionalidad de la subpoblación de las células CD8+ se retrasa cerca de un día en comparación con las células CD4+. En el nacimiento o en el día 20 de la gestación el timo asume la estructura de timo adulto (Seymour et al. 2006).

El timo está localizado en la parte superior de la cavidad torácica, detrás del esternón, esta constituido por dos lóbulos unidos mediante tejido conectivo en la parte media. Los lóbulos están rodeados por una cápsula de tejido conectivo delgada que emite numerosas trabéculas que se extienden desde la cápsula hasta el interior del órgano. Cada lóbulo contiene una zona central más clara con densidad linfocítica menor denominada médula y una zona periférica más oscura con una densidad linfocítica mayor denominada corteza. Entre la corteza y la médula se encuentra una zona córtico medular, reconocida por ser un área rica en vasos sanguíneos. La corteza y la médula poseen los mismos tipos de células pero en diferentes proporciones de acuerdo a su estructura y fenotipo (figura 5).

El timo integra células epiteliales tímicas, células dendríticas y macrófagos, los cuales se hallan rodeados de una red de proteínas propias de la matriz extracelular. Estas células no sólo actúan como sostén, producen numerosos factores de crecimiento y mediadores quimiotácticos, como IL-7, SCF-1 α y TECK (Pearse 2006).

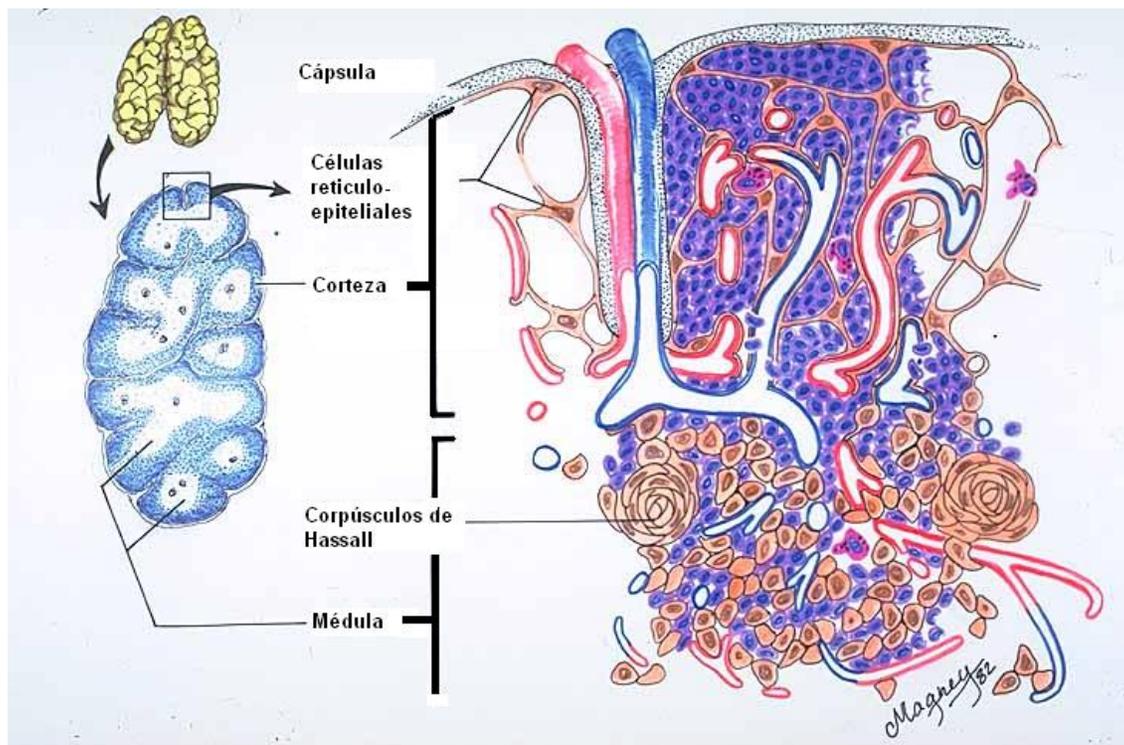


Fig. 5. Morfología del timo. (www.javeriana.edu.co)

La maduración de los linfocitos progresa a medida que migran en el timo e interaccionan con distintas poblaciones celulares. Los estados de maduración del timocito están caracterizados por la expresión del complejo TCR-CD3 y los correceptores CD4 y CD8. Los estados de maduración se resumen en la figura 6.

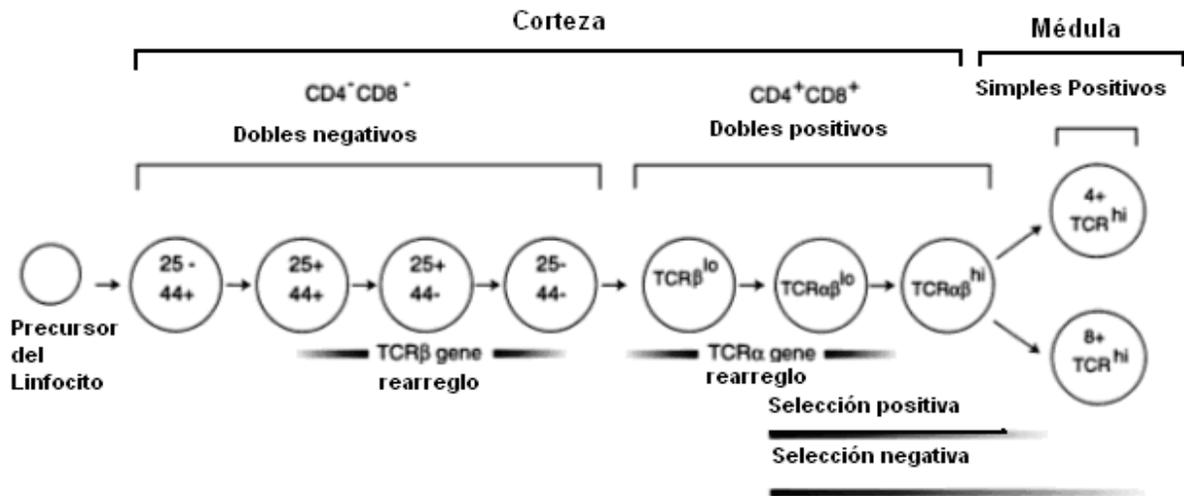


Fig. 6. Diferenciación y cambios fenotípicos de los linfocitos T en el **timo (referencia)**.

Las células CD4⁻CD8⁻ (dobles negativas) representan el 5 % del total de los timocitos y las células CD4⁺CD8⁺ (dobles positivas) constituyen el 80 % de la población, se ubican preferentemente en el área de la corteza, las células CD4⁺ o CD8⁺ (simples positivas) se encuentran en la región de la médula. Distintas quimiocinas y proteínas de la matriz extracelular, guían la trayectoria de los timocitos en el timo a medida que progresa su maduración (Verinaud et al. 2004, Pearse 2006, Savino 2006).

Los timocitos que no tiene un rearreglo de los genes de TCR productivo mueren por apoptosis, cerca del 96 % de los timocitos mueren en esta etapa; mientras que aquellos que expresan un TCR productivo e interactúan con péptidos presentados por las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) expresadas en células epiteliales tímicas, células dendríticas y macrófagos, continúan su maduración. Esta interacción determina los eventos de la selección positiva y negativa cruciales para una diferenciación normal. La selección positiva involucra la expansión clonal de aquellas células capaces de reconocer MHC I o II. Este mecanismo asegura que continúen madurando los timocitos capaces de interactuar en forma apropiada con el MHC del individuo. La selección positiva también coincide con la decisión de diferenciarse a CD4⁺ o CD8⁺ (simples positivos) (Verinaud et al. 2004; Pearse 2006; Savino 2006).

Los linfocitos que tienen una alta afinidad hacia los auto-antígenos presentados por el MHC sufren la selección negativa, que ocurre en la zona córtico medular y en la médula. De este modo, se eliminan por apoptosis los timocitos cuyos TCR poseen una gran capacidad de unión a los autoantígenos presentes en el MHC propio. Se logra así la tolerancia. Como resultado sólo se permite que los timocitos poseedores de TCR específicos para la combinación del antígeno extraño más moléculas del MHC propio, terminen el proceso de maduración a linfocito T cooperador (CD4+) y linfocito T citotóxico (CD8+). El proceso de selección negativa previene que emigren del timo células que al reconocer moléculas propias con alta afinidad, podrían activarse en la periferia y generar respuestas autoinmunes (Verinaud et al. 2004, Pearse 2006, Savino 2006).

Debido a la selección positiva y negativa que ocurre en el timo, sólo una pequeña proporción del gran número de linfocitos T dobles positivos generados en la corteza del timo llegan a ser CD4+ o CD8+, estas poblaciones de linfocitos maduros (inmunocompetentes), abandonan la médula del timo y circulan por la periferia para establecerse en los órganos linfoides secundarios y recirculan continuamente entre la sangre y la linfa.

Durante el proceso de maduración un alto porcentaje de timocitos muere por apoptosis. La apoptosis se lleva a cabo por dos vías diferentes: la vía extrínseca y la vía intrínseca. El mecanismo iniciador de estas vías es diferente pero ambas convergen en el resultado final. La vía extrínseca involucra a los receptores de muerte (DRs) presentes en la superficie celular, son activados por la unión receptor ligando. Los receptores de muerte son Fas (Apo1 o CD95) y TNFR, (Gravilescu y Denkers, 2003; Xu y Shi, 2007).

Los timocitos expresan niveles altos de Fas, es el principal responsable de la eliminación de las células tanto en la selección positiva como en la selección negativa de los linfocitos T. Los receptores de muerte contienen un dominio extracelular rico en cisteínas y una secuencia homóloga citoplásmica llamada dominio de muerte (DD). La unión del ligando con su receptor promueve la oligomerización del receptor, e

inmediatamente después la proteína adaptadora FADD (dominio de muerte asociado a Fas), se une a través de su propio dominio efector de muerte a la pro-caspasa que conduce a su activación. La caspasa-8 es la responsable de activar otras caspasas como la caspasa-9, e involucran el complejo de señalización inductor de muerte celular (DISC). (Sainz et al. 2003)

Los receptores de muerte a través de sus moléculas adaptadoras incorporan a las caspasa iniciadoras como lo son las 2, 8 o 10, son capaces de activar a las caspasas efectoras, 3, 6 y 7. Las caspasas efectoras tiene la función de inactivar a las proteínas que protegen a la célula de morir por apoptosis, involucradas en la reparación de DNA; participan en la destrucción de la lámina nuclear, en la activación de CAD (DNAsa activada por la caspasa) e inducen a la célula a expresar señales que las identifican para ser fagocitadas.

Los glucocorticoides endógenos, producidos por las células del estroma tímico participan en la inducción de apoptosis en los timocitos incapaces de interactuar con las moléculas del MHC. La sensibilidad de los timocitos a los glucocorticoides varía durante su desarrollo y es mayor en los linfocitos CD4+CD8+ (Claesson et al. 1976).

El estrés celular trae como consecuencia un aumento en los niveles de glucocorticoides responsables de la muerte celular del linfocito T *in vivo*. El mecanismo por el cual los glucocorticoides inducen apoptosis en el timo involucra la regulación transcripcional de genes pro-apoptóticos o anti-apoptóticos. Los receptores de los glucocorticoides están distribuidos de manera ubicua en las diferentes subpoblaciones del timo (Sainz et al. 2003).

La tolerancia inmunológica es una característica esencial del sistema inmune para la discriminación de lo propio y no propio. Datos recientes sugieren que las células T reguladoras (Treg) participan en la generación y mantenimiento de la tolerancia. El término de Treg es usado en una variedad de células inmunoreguladoras que están subdivididas basándose en la expresión de proteínas de superficie y en la producción

de citocinas (Suto et al. 2002, Darrasse-Jèze et al. 2005). Las células Treg se identifican por la expresión de altos niveles de CD25 (CD25^{high}), el factor de transcripción *Foxp3*, el antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA-4) y del receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides (GITR). Las células Treg CD4+CD25+ pueden subdividirse por la expresión de CD45RB^{high} o CD45RB^{low}, CD38+ o CD38-, CD69+ o CD69- o CD62L^{high} o CD62L^{low}, estos hallazgos sugieren una población heterogénea y compuesta por una mezcla de células Treg y células T activadas (Suto et al. 2002).

Las células CD4+CD25+ maduran y migran en el timo y constituyen del 5-10 % de las células T CD4+. La producción en el timo de las células Treg se realiza de manera programada y ocurre a los 3 días de edad en el ratón. Se les denomina células Treg naturales, desempeñan un papel central en la fisiología del sistema inmune y en el mantenimiento de la tolerancia a lo propio. Su depleción se asocia con la inducción de autoinmunidad, (Darrasse-Jèze et al. 2005)

Otra población de las células T reguladoras pueden ser inducidas de CD4+CD25- o CD8+CD25- y adquieren el perfil supresor luego de activarse por el antígeno en los órganos linfoides secundarios. Se les denomina células T reguladoras 1 (Tr1) las cuales secretan altos niveles de interleucina-10 (IL-10) y también el factor transformante de crecimiento β (TGF- β), no secretan interleucina-4 (IL-4) e interleucina-12 (IL-12), (Mills 2004).

Las células T reguladoras tienen un papel crucial en la supresión de la respuesta inmune a los antígenos propios y en la prevención de enfermedades autoinmunes. También participan en el control de la respuesta inmune hacia las bacterias, virus, hongos y parásitos, (Mills 2004).

1.4.3 Bazo

En el día 12 de la gestación en el ratón, el evento inicial en el desarrollo del bazo es la formación de una placa mesodérmica esplénica (SMP). A los 13 días de la gestación el primordio esplénico se localiza justo en el dorso del estómago, esta suspendido por el mesogastro dentro de la cavidad peritoneal. Las células hematopoyéticas colonizan el bazo después de los 15.5 días de gestación. En el día 17 de la gestación el órgano se alarga, no se observan definidas las áreas típicas, pulpa roja y pulpa blanca (Mebius y Kraal. 2005; Seymour et al. 2006; Brendolan et al. 2007).

El bazo es un órgano de color rojo oscuro localizado en el cuadrante superior izquierdo del abdomen, adyacente al estómago. Es un órgano elongado, se observa en las secciones de tejido de forma triangular. El peso del bazo puede ser importante en su evaluación. La relación peso del bazo y el peso corporal (índice esplénico) permanece constante a pesar de la edad, (Mebius y Kraal 2005, Cesta 2006).

En la figura 7 se representa esquemáticamente su estructura. El bazo está irrigado por una arteria esplénica que perfora la cápsula en el hilio y se divide en ramas más pequeñas que permanecen rodeadas por una trabécula fibrosa que sirve de soporte y protección. Es rodeado por una cápsula constituida por tejido fibroso y músculo liso. Las trabéculas están espaciadas de manera irregular, el músculo liso y el tejido fibroelástico emanan de la cápsula hacia dentro del parénquima esplénico y contienen vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios. Los vasos linfáticos, son eferentes a través de los cuales los linfocitos migran a los nódulos linfáticos esplénicos. Los sinusoides terminan en vénulas que drenan en la vena esplénica, la cual lleva la sangre desde el bazo hasta la circulación corporal (Mebius y Kraal 2005, Cesta 2006).

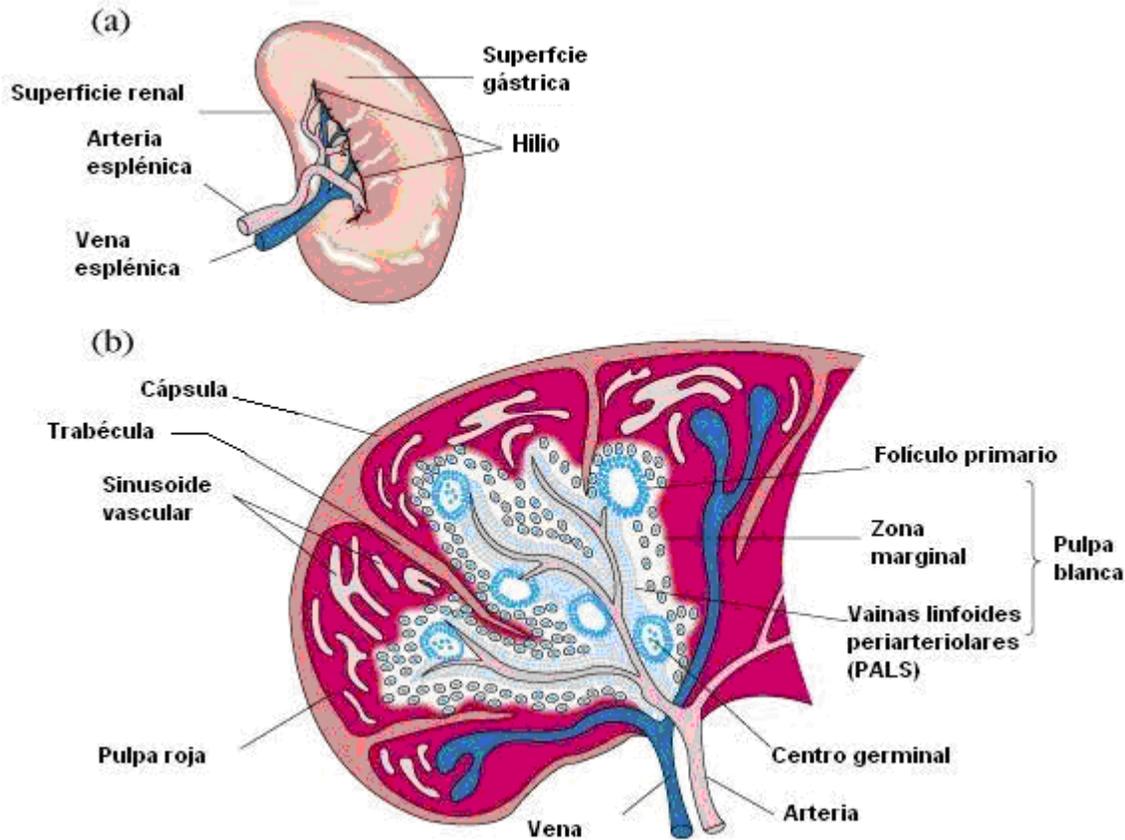


Fig. 7. Morfología del bazo (Referencia.)

Las funciones del bazo son dependientes del sistema circulatorio. En el se lleva a cabo la interacción de los linfocitos con los antígenos transportados por la sangre. En el ratón es el sitio donde se lleva a cabo la hematopoyesis, particularmente en la etapa fetal y neonatal.

El bazo está constituido por dos compartimientos funcional y morfológicamente distintos: la pulpa roja y la pulpa blanca. La pulpa roja tiene como función remover eritrocitos viejos de la sangre, también es un sitio de almacenamiento del hierro, eritrocitos, plaquetas, macrófagos, células dendríticas; escasos linfocitos y células plasmáticas. La pulpa roja esta constituida por cordones esplénicos y sinusoides venosos, los cordones esplénicos están compuestos por fibras reticulares, células reticulares y macrófagos. Las células reticulares son consideradas miofibroblastos y juegan un papel importante en la contracción esplénica. Las fibras reticulares están compuestas por fibras de colágena y elastina, miofibrillas, forman una lamina basal de

las células reticulares. Los macrófagos de la pulpa roja son activamente fagocíticos y remueven eritrocitos dañados o viejos y materia que transporte el torrente circulatorio. La mayor parte del bazo está constituido por pulpa roja (Mebius y Kraal 2005, Cesta 2006).

La pulpa blanca esta formada por: vainas linfoides periarteriolas (PALS), folículos y la zona marginal. Las PALS y los folículos están rodeados por un borde de linfocitos y macrófagos que recibe el nombre de zona marginal (Mebius y Kraal 2005, Cesta 2006). Las PALS contienen principalmente linfocitos T, de los cuales aproximadamente las dos terceras partes corresponden a linfocitos T CD4+ y una tercera parte a los linfocitos T CD8+. Los folículos y los centros germinales contienen predominantemente linfocitos B. En los centros germinales se lleva a cabo la estimulación antigénica. Los folículos tienen células dendríticas foliculares (FDCs), ellas retienen a los antígenos y los presentan, (Mebius y Kraal 2005, Cesta 2006).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La infección primaria con *Toxoplasma gondii* durante el embarazo en el humano, provoca aborto espontáneo, muerte neonatal o defectos congénitos severos que reducen significativamente la calidad de vida del niño que sobrevive a la infección. Las consecuencias en el feto o neonato se han relacionado con el momento en el que ocurre la infección materna. El 10-23 % de los recién nacidos infectados durante el embarazo manifiestan los signos clínicos de la toxoplasmosis (hidrocefalia, corioretinitis, ceguera y retraso mental). Los infantes que sobreviven sufren un retardo mental progresivo u otras deficiencias neurológicas que requieren educación y cuidados especiales (Tenter et al. 2000, Montoya et al. 2004).

Debido al gran impacto en la salud pública, varios aspectos de la toxoplasmosis han sido estudiados por diferentes autores. Numerosos modelos murinos se han utilizado para el estudio de la patología de la infección, en el diseño de vacunas y de nuevas drogas para el tratamiento de la toxoplasmosis (Roberts et al 1994, Roberts 1992, Fux et al 2000, Gravilescu et al 2001, Stahl et al 2004).

Sin embargo, aún no existe evidencia acerca del efecto de la infección materna sobre los órganos linfoides en el neonato. Los órganos linfoides son tejidos organizados, importantes para el desarrollo y maduración de las células que participan en la respuesta inmune. Por tal motivo, se diseñó un modelo experimental murino que permita ampliar el conocimiento actual sobre el efecto de la infección materna sobre los órganos linfoides del neonato.

Para observar este efecto, en el presente trabajo, se infectaron ratones BALB/c en el día 19 de la gestación con 30 taquizoítos de la cepa RH de *Toxoplasma gondii*, la infección materna permitió el nacimiento de las crías y la sobrevivencia de las mismas. Se determinaron los posibles cambios en el desarrollo y en las poblaciones celulares de la médula ósea, el timo, el bazo y en la sangre periférica de los neonatos de madres infectadas con *Toxoplasma gondii*.

3. HIPÓTESIS

La infección materna por *Toxoplasma gondii* durante los últimos días de la gestación, afectará el desarrollo y la celularidad de los órganos linfoides del neonato BALB/c.

4. OBJETIVOS

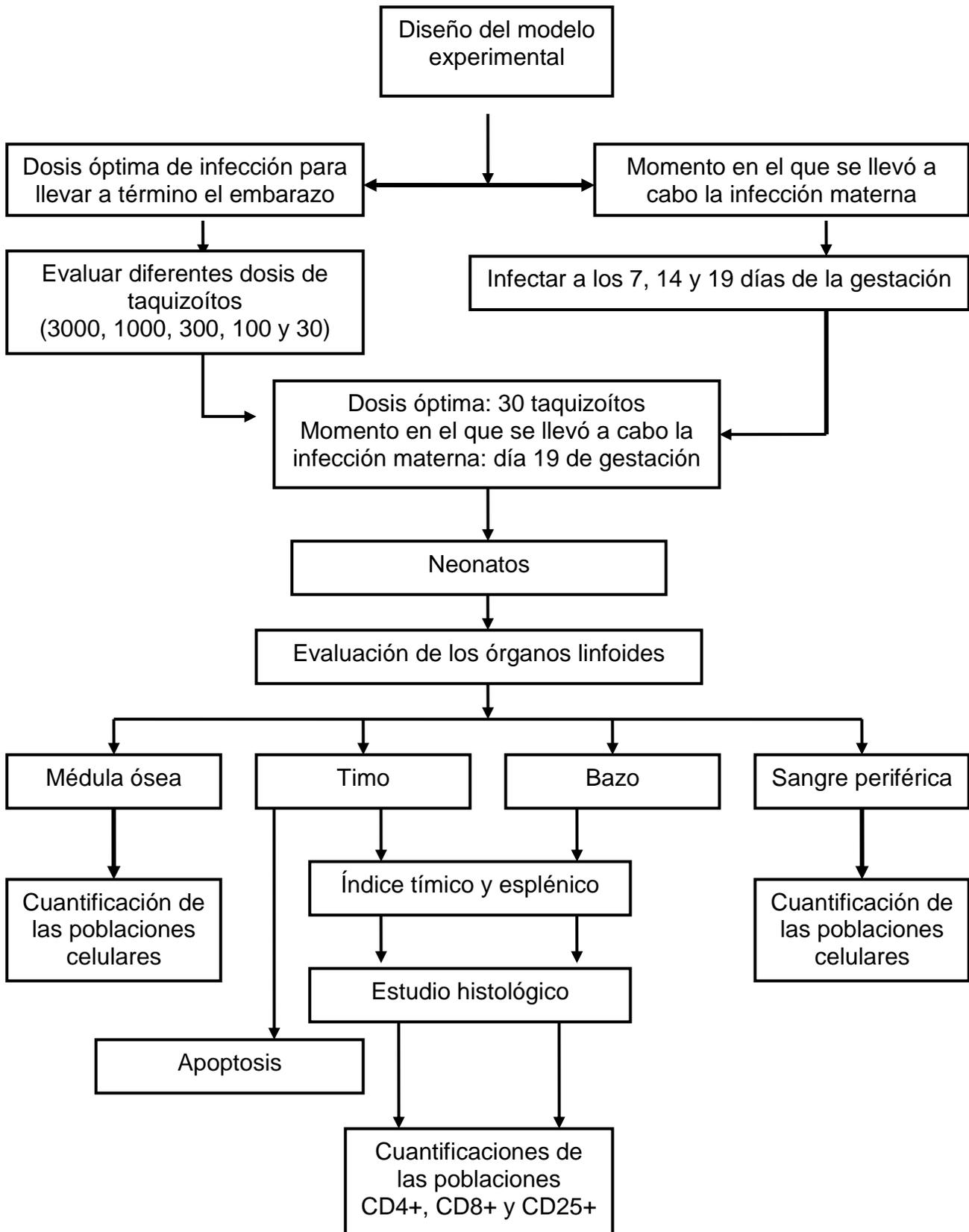
OBJETIVO GENERAL

Evaluar el impacto de la infección materna con la cepa RH de *Toxoplasma gondii* durante los últimos días de gestación, sobre los órganos linfoides del neonato, utilizando como modelo experimental ratones de la cepa BALB/c.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Diseñar un modelo murino de infección materna donde el periodo de gestación llegue a término y sobrevivan los neonatos.
- Determinar el efecto de la infección materna sobre las diferentes poblaciones celulares en la médula ósea del neonato.
- Determinar el efecto de la infección materna sobre las diferentes poblaciones celulares en sangre periférica del neonato.
- Evaluar el efecto de la infección materna con *T. gondii* sobre el timo y bazo del neonato.
- Detectar la presencia de *Toxoplasma gondii* en órganos del neonato por la técnica de PCR

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



II. MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos químicos

El medio RPMI 1640, Suero fetal bovino, L-Glutamina 200 mM, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio y azul tripano (0.4 %) se adquirieron de Gibco, Invitrogen Corporation, USA.

De Invitrogen Corporation, USA se adquirieron la enzima Platinum Taq DNA Polimerasa, mezcla de dNTP 10 mM grado PCR, amortiguador de tinción, la RNasa H, agarosa grado biología molecular, Tris-base y los oligonucleótidos para la amplificación del gen B1 de *Toxoplasma gondii*.

De Sigma Chemical Company (St. Louis, MO) se obtuvieron los siguientes reactivos: Yoduro de propidio, solución de antibióticos (penicilina 200 U/mL, estreptomina 100 µg/mL) y EDTA.

De Fermentas Life Sciences, se obtuvo el kit Genomic DNA Purification para la extracción de DNA genómico.

Los anticuerpos rata anti-mouse CD25-PE (PC61 5.3), rata anti-mouse CD4-FITC (RM4-5), rata anti-mouse CD8a-FITC (5H10) y rata anti-mouse CD8a-PE (5H10) se adquirieron de Caltag Laboratories (Burlingame, CA).

El cloruro de potasio, alcohol etílico absoluto, fosfato dibásico de sodio, fosfato monobásico de potasio, ácido bórico, cloroformo, bicarbonato de sodio, cloruro de amonio, cloruro de sodio, ácido cítrico, xilol, tolueno y ácido clorhídrico se adquirieron de J.T. Baker, S.A. de C.V. (Xalostoc, México, Mex.)

Material biológico

Animales

Se adquirieron de Harlan (Teklan USA), ratones de la cepa BALB/c hembras y machos de 4 a 6 semanas de edad, los cuales se alojaron en cajas de plástico, con cubiertas de acero inoxidable bajo condiciones estándar de luz y temperatura. Se les administró agua y alimento Harlan 2018S *ad libitum*. Todos los procedimientos de uso y cuidado de los animales de experimentación se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-199 “Especificaciones técnicas para la producción y cuidado del uso de animales de laboratorio”.

Parásito

Se utilizó la cepa RH de *Toxoplasma gondii*. Los taquizoitos son recuperados de la cavidad peritoneal de un ratón BALB/c 72 horas después de ser inoculados con 1×10^7 /mL taquizoitos. En condiciones de esterilidad se removió el fluido peritoneal después de inyectar 4 mL de solución de NaCl al 0.9 % estéril. El fluido peritoneal se pasó tres veces, por una jeringa con aguja del no. 26, se lavó dos veces por centrifugación a $200 \times g$ durante 10 min con solución NaCl al 0.9 % estéril. El paquete celular se resuspendió en 1 mL de solución de NaCl al 0.9 % estéril. Los taquizoitos se cuantificaron en una cámara de Neubauer, se verificó la viabilidad del parásito, ésta debió ser mayor del 95 % por exclusión del colorante azul tripano. Se ajustó el número de taquizoitos a 10^7 /mL, se realizaron diluciones con solución de NaCl al 0.9 % estéril hasta obtener la concentración deseada.

Diseño experimental

Para este modelo se utilizaron ratones BALB/c con un peso aproximado de 22 g. En una caja se colocaron 2 ratones hembra y 1 ratón macho, toda la noche. Se verificó a la mañana siguiente la presencia del tapón vaginal en las hembras, cuando éste se observó se consideró como el día 0 de la gestación. Las hembras embarazadas se identificaron y se retiraron de las cajas de cruce. Cada experimento consistió de 4 hembras gestantes infectadas vía i.p. con *Toxoplasma gondii*, y 4 hembras gestantes no infectadas, éstas se inocularon con 0.5 mL de NaCl al 0.9 % estéril vía i.p.

Para conocer la dosis óptima de *T. gondii* para la infección materna así como el tiempo de gestación necesario para que el producto llegue a término, se utilizaron diferentes dosis y diferentes periodos de gestación en el cual se infectaron las hembras como se describe en la tabla 2.

Tabla 2 Dosis y periodo de gestación en el que se llevó a cabo la infección materna.

| Momento de la infección, (periodo de gestación) | Número de taquizoitos/mL inoculados por vía i.p. | | |
|---|--|------|-----|
| 7 días | 3000 | 1000 | 300 |
| 14 días | 3000 | 1000 | 300 |
| 19 días | 300 | 100 | 30 |

Una vez obtenido el número de taquizoítos a inocular y el tiempo de gestación adecuado para que las crías llegaran a término. Se llevó a cabo un total de 6 experimentos para evaluar los cambios presentes en los órganos linfoides de los neonatos sobrevivientes, tabla 3. La tabla presenta el número de hembras y neonatos utilizados en cada uno de los experimentos (n).

Tabla 3 Número de animales utilizados en cada experimento.

| Experimento | Variables estudiadas | Hembras gestantes | | Neonatos | |
|-------------|---|----------------------|-------------------|----------------------|-------------------|
| | | <i>No infectadas</i> | <i>Infectadas</i> | <i>No infectadas</i> | <i>Infectadas</i> |
| | | <i>n</i> | <i>n</i> | <i>n</i> | <i>n</i> |
| 1 | Número de neonatos, peso corporal, peso del timo y bazo | 5 | 5 | 30 | 30 |
| 2 | Cuantificación de las poblaciones celulares de médula ósea | 4 | 4 | 20 | 20 |
| 3 | Cuantificación de las poblaciones celulares en sangre periférica | 2 | 2 | 10 | 10 |
| 4 | Número de células tímicas, apoptosis y cuantificación de las poblaciones CD4, CD8 y CD25 en el timo y el bazo | 5 | 5 | 30 | 30 |
| 5 | Estudio histológico del timo y el bazo | 4 | 4 | 20 | 20 |
| 6 | Detección de <i>Toxoplasma gondii</i> por PCR | 2 | 2 | 10 | 10 |

Después de 7 días de edad, las crías se clasificaron como neonatos de madres infectadas, y neonatos de madres no infectadas, se enumeraron y pesaron, también se observó el aspecto físico tanto del neonato como el de la madre. En todas las hembras después de los 7 días del nacimiento de las crías, se extirpo el útero con la finalidad de observar algún cambio presente en el órgano.

Evaluación de la distribución de las poblaciones celulares en la médula ósea.

La obtención de la médula ósea de los neonatos se obtuvo del fémur. Se removió el fémur de cada neonato y se eliminó el exceso de músculo y grasa. Se realizaron cortes en los extremos del fémur, dejando a la médula ósea expuesta, ésta se colocó cuidadosamente en un portaobjetos, por medio de presión se realizó el extendido. Los extendidos se secaron al aire, después se llevo a cabo la tinción de Giemsa-Wright. La evaluación global de los extendidos, se realizó usando el objetivo de 10x, la apreciación celular se determino en un promedio de 10 campos (Celularidad/grasa, heterogeneidad celular y porcentaje de megacariocitos) por cada extendido. La proporción y características morfológicas de las células de los extendidos de médula ósea se analizaron con el objetivo de inmersión 100x. La cuenta diferencial se realizó en 250-500 células por extendido, se identificó el tipo de células de acuerdo a su morfología característica (Travlos 2006, Everds 2004). Los resultados se expresaron como el porcentaje de cada población celular.

Cuenta diferencial de sangre periférica.

De cada neonato se colectó sangre periférica de acuerdo al método descrito por Everds N (2004), con una sola gota de sangre se realizó el frotis sanguíneo, se secó el frotis al aire y se tiñó con la técnica de Giemsa-Wright. Se contaron un total de 100 células por cada frotis; cada tipo de célula se expresó como porcentaje del total de células contadas. Los leucocitos se clasificaron por su morfología característica como polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y mononucleares (linfocitos y monocitos

Determinación del índice tímico y esplénico.

Los neonatos a los 7 días de edad fueron pesados y a cada uno de ellos se les extirpó quirúrgicamente el timo y el bazo, se pesaron los órganos y se relacionaron con el peso corporal del animal, se calculó así el índice tímico y esplénico:

$$\begin{aligned}\text{Índice tímico} &= \text{peso del timo (g)} / \text{peso corporal (g)} \\ \text{Índice esplénico} &= \text{peso del bazo (g)} / \text{peso corporal (g)}\end{aligned}$$

Aislamiento de timocitos y esplenocitos.

El timo y el bazo de cada neonato, se extirpó en condiciones de esterilidad, se disgregó utilizando una malla de tela de organza en 3 mL de medio RPMI 1640 suplementado. La suspensión celular obtenida se lavó dos veces por centrifugación 200 x g durante 10 min, posteriormente se lisaron los eritrocitos presentes con una solución isotónica de cloruro de amonio a temperatura ambiente. La suspensión celular se centrifugó nuevamente a 200 x g durante 10 min. El paquete celular se resuspendió en 1 mL de RPMI 1640 suplementado. Se contó el número de células verificando una viabilidad mayor del 95 % por exclusión del colorante azul tripano en la cámara de Neubauer. Se ajustó el número de células a 10^7 células/mL en medio RPMI 1640 suplementado. Se obtuvieron alícuotas de 1 mL de timocitos y esplenocitos (1×10^6 cel/mL) para el análisis de apoptosis y marcadores de superficie.

Cuantificación de las células apoptóticas mediante la técnica del pico subG₀

El porcentaje de las células apoptóticas, se determinó por citometría de flujo mediante el método descrito por Nicoletti et al (1991) y Telford et al (1994). Se depositaron 10^6 células tímicas en tubos de fondo redondo de 5 mL (BD Biociencias USA) en un volumen de 1 mL de RPMI suplementado. Las células se fijaron con 1 mL de etanol frío al 70%

durante una hora a 4°C. Las células fijadas se lavaron con 2 mL de PBS para eliminar el exceso de etanol, posteriormente se resuspendieron en 0.5 mL de PBS y 0.2 mL de regulador de permeabilización. Para la detección del contenido de DNA subdiploide la suspensión celular se resuspendió en 0.5 mL de amortiguador de tinción. Las muestras teñidas se analizaron en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, San José, CA, USA) donde se utilizó el programa Cell Quest Pro versión 5.2.1. En el diagrama de puntos de FL2-A vs. FL2-W se eliminaron los eventos que eran falsos eventos G2/M (dobletes) y aquellos que se ubicaron por debajo de un valor de 20 en FL2-A. Se adquirieron 10,000 eventos en dicha región por muestra. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células apoptóticas.

Inducción de apoptosis *in vitro*

Se depositaron 10^6 células en tubos de fondo redondo de 5 mL (BD Biociencias USA) en un volumen de 1 mL de RPMI suplementado. Para la inducción de apoptosis se adicionó dexametasona (MetaxTM, solución inyectable) a una concentración de 10^{-7} M, mientras los tubos en que no se indujo la apoptosis sólo contenían la suspensión celular. Los tubos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂, durante 4, 6 y 24 horas, posteriormente se cuantificó las células apoptóticas por la técnica antes descrita.

Cuantificación de las poblaciones CD4+, CD8+ y CD25+ mediante citometría de flujo.

Los timocitos y esplenocitos recién aislados se tiñeron con anticuerpos monoclonales CD4 (RM4-5), CD8 (5H10) y CD25 (PC61 5.3), marcados con diferentes fluorocromos. Para el análisis de las subpoblaciones del timo definidas por la expresión de CD4 y CD8 se tiñeron con anti-CD4-FITC versus anti-CD8-PE. Para las subpoblaciones del timo y el bazo definidas por la expresión de CD4 y CD25 las células se tiñeron anti-CD4-FITC versus anti-CD25-PE y para la expresión de CD8 y CD25, las células se tiñeron con

anti-CD8-FITC y anti-CD25-PE. Todos los anticuerpos fueron titulados para encontrar la concentración óptima de tinción (0.1 $\mu\text{g/mL}$) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se incubaron las células junto con los anticuerpos durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Después del periodo de incubación, las células se lavaron por centrifugación 200 x g durante 5 min a 4 °C con PBS pH 7.4. Finalmente las células se resuspendieron en 0.5 mL de paraformaldehído al 0.5 % y se analizaron en el citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, San José, CA, USA). En el diagrama de puntos de tamaño vs granularidad se delimitó la región (R1) correspondiente a los linfocitos y excluyendo a los fragmentos celulares. Se adquirieron 10, 000 eventos en la R1 por muestra. En cada experimento, se procesaron en conjunto con las muestras un control (células sin ningún reactivo conjugado con fluorocromo, es decir células sin teñir) utilizado para establecer los niveles de auto fluorescencia, también se utilizaron controles teñidos con un solo fluorocromo, células teñidas con PE y otras teñidas con FITC, estos controles se utilizaron para optimizar los voltajes de los PMT, estableciendo la compensación de la fluorescencia y la sensibilidad del detector en el equipo. El porcentaje de células teñidas positivamente se estimó por la intensidad de fluorescencia, y se analizó en el programa Cell Quest Pro versión 5.2.1.

Estudio histológico del timo y el bazo.

El timo y el bazo se extirparon eliminando todo el tejido conjuntivo adherido, se depositaron los órganos completos en la solución de formaldehído amortiguado al 10 % para su fijación. Los órganos se deshidrataron al pasarlos por diferentes grados de alcohol. Se llevó a cabo el aclaramiento de los mismos en xilol y finalmente se incluyeron en parafina. De cada muestra se realizaron cortes de 5 a 7 micras de espesor (Micrótopo rotatorio American Optical USA). Los cortes obtenidos se desparafinaron y se llevó a cabo la tinción con hematoxilina-eosina. La descripción histológica se realizó con base en lo observado en 5 cortes de cada grupo de experimentación; se registró por fotografía la imagen representativa de cada corte con la ayuda del software PIXERA wiew founds Pro.

Detección de *Toxoplasma gondii* por la técnica de PCR

Extracción del DNA

Principio

El DNA se extrajo mediante la utilización de un *kit* comercial *Genomic DNA purification kit*, el cual tiene el siguiente fundamento: Este método involucra un *salting out* de las proteínas celulares por deshidratación y precipitación con una solución saturada de NaCl, (Miller SA et al 1988).

Procedimiento

Se extirpó el bazo y se obtuvo el fluido peritoneal de dos madres infectadas y dos no infectadas. El bazo y el hígado se utilizaron para detectar el parásito en los neonatos. Los fragmentos de los órganos (25-30 mg) y el fluido peritoneal (1 mL) se almacenaron a -20 °C para su posterior extracción de DNA. Los órganos se disgregaron y se homogeneizaron con 0.2 mL de amortiguador TE; el fluido peritoneal se centrifugó a 200 x g durante 10 min, se eliminó el sobrenadante, al paquete celular se homogenizó con 0.2 mL de amortiguador de TE. Posteriormente se adicionó 0.4 mL de solución de lisis, se incubó durante 5 min a 65 °C. Después del tiempo de incubación se adicionó 0.6 mL de cloroformo, se agitó suavemente de 3 a 5 veces, después se centrifugó la muestra durante 5 min a 4500 x g. Se observaron dos fases, la fase acuosa se transfirió a un microtubo y se adicionó 0.8 mL de solución de precipitación, se mezcló perfectamente y nuevamente se centrifugó durante 5 min a 4500 x g. La solución se decantó, finalmente el DNA se disolvió en 0.1 mL de NaCl 1.2 M, posteriormente se adicionó 0.3 mL de etanol, se incubó durante 10 min a -20 °C. Una vez terminado el tiempo de incubación, se centrifugó durante 4 min a 4500 x g, por último se lavó dos veces el DNA con etanol al 70 %. Se efectuó la evaporación del exceso de etanol a temperatura ambiente. El DNA se disolvió en 0.1 mL de agua inyectable y se almacenó a -20 °C hasta su análisis posterior.

Se corroboró la integridad del DNA extraído, mediante el corrimiento electroforético de una alícuota de 1 μ L de cada muestra en un gel de agarosa al 1 %, éste se tiñó con bromuro de etidio; se aplicó un voltaje de 90 volt durante 35 min; al finalizar el corrimiento electroforético, con ayuda de un transiluminador de luz se observó una banda única (DNA genómico) por muestra en el gel.

Se cuantificaron las muestras de DNA midiendo la absorbencia en una dilución 1:50, a 260 nm en un espectrofotómetro QuantPro™. Una UA a 260 nm fue equivalente a 50 μ g/mL y la relación de 260/280>1.7 del DNA aislado confirmó la concentración y la pureza respectivamente.

Amplificación del gen B1 por PCR

El gen B1 del *Toxoplasma gondii*, es un gen que se repite cada 35 veces con un tamaño de 2214 nucleótidos en cada repetición y esta altamente conservado entre las cepas de *Toxoplasma gondii* (Burg et al 1989).

Procedimiento

La PCR se realizó en un volumen total de 25 μ L; con los oligonucleótidos específicos para el gen B1 (Tabla 3), fueron diseñados en la base de datos BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Se adicionó 2 μ L del DNA, amortiguador de PCR 1x, MgCl₂ 1.5 mM, solución de dNTPs 10 mM y Taq Polimerasa 1 U Invitrogen™. La reacción se incubó en un termociclador Techne (Cambridge) a 95 °C por 10 min seguido de 40 ciclos de 94 °C por 1 min con 52 °C por 30s y 72 °C por 1 min. Finalmente la reacción se mantuvo a 72 °C por 7 min y después a 4°C. Los fragmentos amplificados se separaron en un gel de agarosa al 2 %. En cada experimento, se procesaron en conjunto con las muestras, un control positivo de DNA de 14x10⁶ taquizoítos obtenidos de la cavidad peritoneal de un ratón de pase y un control negativo de DNA extraído de la cavidad peritoneal de un ratón no infectado.

Tabla 4. Secuencia de los nucleótidos usados para la detección de *Toxoplasma gondii*

| Gen amplificado | Secuencia de oligonucleótidos | Tamaño del producto |
|------------------------|--------------------------------------|----------------------------|
| B1 | Tg 1 Fw 5'-AAAAATGTGGGAATGAAAGAG-3' | 469 pb |
| | Tg 2 Rw 5'-ACGAATCAACGGAAGTGTAAAT-3' | |

Análisis estadístico

Las diferencias entre los grupos se analizó con la prueba paramétrica t-Student o con la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney de acuerdo a cada caso, utilizando el software Sigma Stat versión 3.1. Se consideró una $p < 0.05$ para la significación estadística.

III. RESULTADOS

Diseño del modelo experimental.

Se probaron diferentes dosis de taquizoítos inoculados en diferentes periodos de la gestación en ratones de la cepa BALB/c con el objetivo de determinar la dosis óptima de taquizoítos y el momento de la infección materna que permitiera el nacimiento y la sobrevivencia de las crías (tabla 5).

Tabla 5. Efecto del número de taquizoítos y momento de la infección materna con *T. gondii* sobre la supervivencia de los ratones BALB/c.

| No. de hembras infectadas | Dosis de Taquizoítos | Momento de la infección (días de gestación) | No. de madres sobrevivientes / No. de madres infectadas | No. de crías sobrevivientes/Total de crías nacidas |
|---------------------------|----------------------|---|---|--|
| 4 | 3000 | 7 | 0/4 | 0/0 |
| 4 | 1000 | 7 | 0/4 | 0/0 |
| 4 | 300 | 7 | 0/4 | 0/0 |
| 4 | 3000 | 14 | 1/4 | 0/0 |
| 4 | 1000 | 14 | 2/4 | 0/0 |
| 4 | 300 | 14 | 3/4 | 0/0 |
| 4 | 300 | 19 | 3/4 | 1/4 |
| 4 | 100 | 19 | 3/4 | 2/6 |
| 4 | 30 | 19 | 4/4 | 6/8 |

Se inocularon 4 hembras gestantes por cada dosis de taquizoítos (3000, 1000 y 300) en el día 7 de gestación. En esta etapa se observaron resultados negativos; las hembras morían a los dos a tres días de la infección. Se infectaron hembras en el día 14 de la gestación con las mismas dosis, los resultados obtenidos no fueron satisfactorios: se observó una mayor sobrevivencia de las hembras al disminuir la dosis de taquizoítos, sin embargo, el periodo de gestación no llegó a término, por lo que se decidió utilizar dosis de taquizoítos menores (300, 100 y 30) e infectar en el día 19 de la gestación, en este

caso se observó un aumento en el número de hembras y crías sobrevivientes, conforme disminuyó la dosis de taquizoítos.

El objetivo del presente estudio fue evaluar los cambios presentes en los órganos linfoides de los neonatos de madres infectadas con *Toxoplasma gondii* por lo que se decidió utilizar el siguiente modelo: la infección materna se realizó en el día 19 de la gestación con 30 taquizoítos por vía intraperitoneal, ver figura 8.

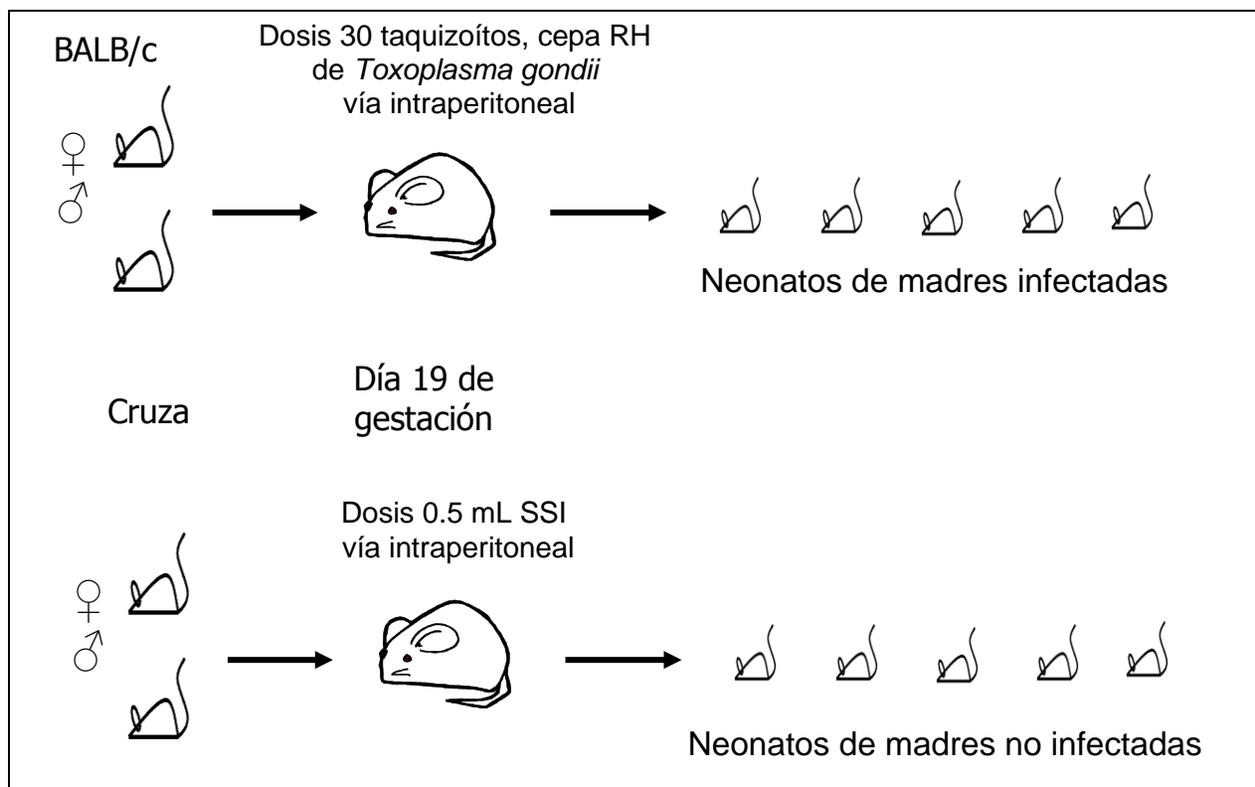


Fig. 8. Grupos de animales de experimentación y momento en el que se llevó a cabo la infección materna.

Se vigiló diariamente el aspecto de las hembras desde el inicio de la infección hasta el momento en que los neonatos cumplieron 7 días de edad. Con el fin de comprobar el éxito de la inoculación. Las hembras infectadas presentaron ciertos signos de enfermedad como el erizado del pelo, dorsiflexión, apatía y taquipnea, como se muestra en la figura 9A; estos signos se presentaron al segundo día de la inoculación, es decir,

en el momento del parto y se acentuaron progresivamente hasta la muerte que sobrevino a los 9 días postinoculación, durante este tiempo las hembras alimentaban a sus crías. Las hembras no infectadas no presentaron ningún signo de enfermedad, (figura 9B).

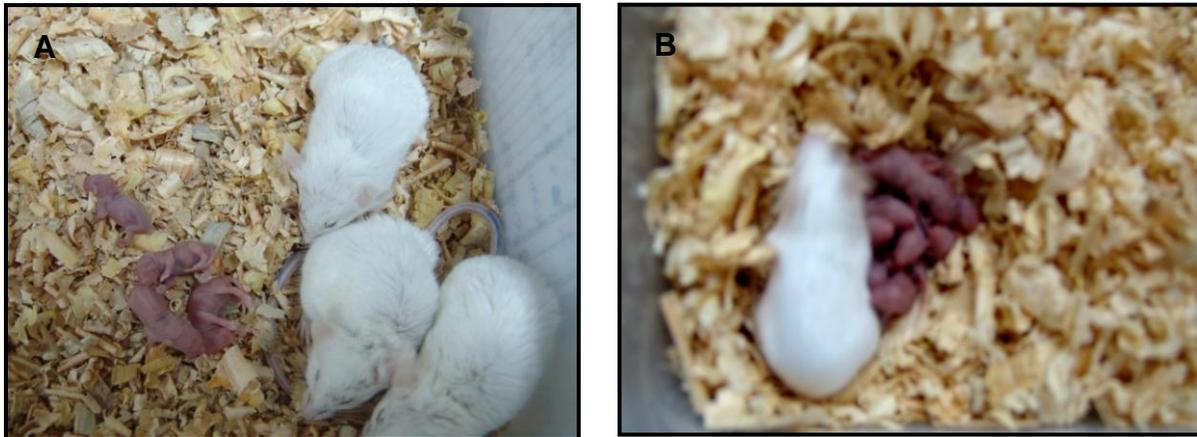


Fig. 9. Apariencia de A) madres infectadas con *T. gondii* y las B) madres no infectadas

Se realizó la autopsia a las madres infectadas a los 9 días postinoculación se extirpó el aparato reproductor con el propósito de comprobar si estaba afectado por la inoculación del parásito por vía intraperitoneal. El útero de las madres infectadas presentó una disminución del tamaño (atrofia) (figura 10A) comparado con el útero de las madres no infectadas (figura 10B).

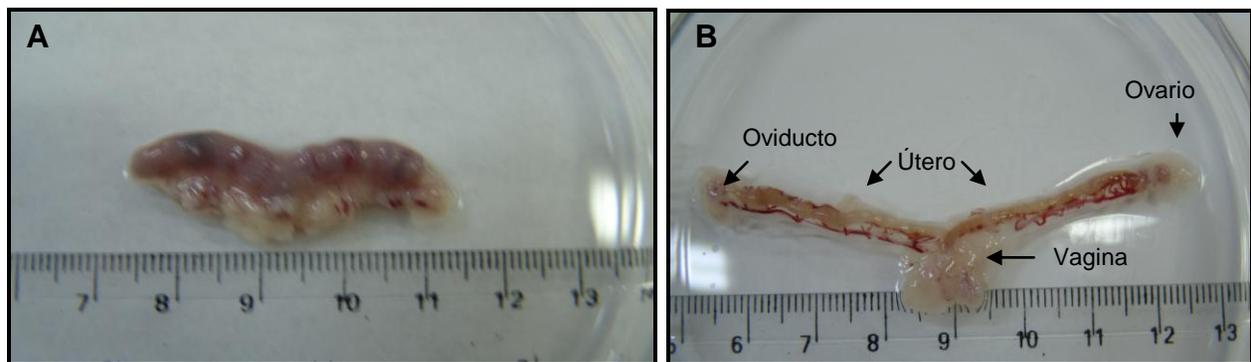


Fig. 10. Morfología del útero de A) madre infectada con *T. gondii* por vía i.p. de B) madre no infectada.

Efecto de la infección materna sobre la apariencia, tamaño, número y peso de los neonatos.

Al nacer las crías de las madres infectadas presentaron un color de piel rojo intenso, signo de una congestión y una disminución en el tamaño. Estas características estuvieron presentes desde el nacimiento hasta la edad de 7 días (figura 11A).

El tamaño de la camada al nacer fue de 8 crías, pero sólo sobrevivieron 6 después de 7 días en las camadas de madres infectadas. Por el contrario en las camadas de las madres no infectadas, el número de neonatos era alrededor de 10 crías y todas ellas sobrevivían a la misma edad (figura 11B).

Se determinó el peso corporal de los neonatos a los 7 días de edad, figura 11C. Se observó que el peso de los neonatos de madres infectadas disminuyó significativamente comparado con los neonatos de madres no infectadas ($2.9 \text{ g} \pm 0.52$, $6.0 \text{ g} \pm 0.15$, respectivamente). El peso corporal de los neonatos de madres infectadas disminuyó aproximadamente un 52 %.

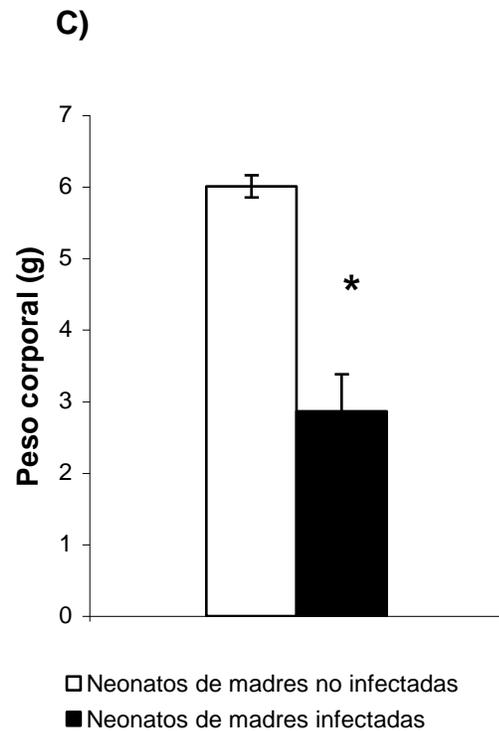
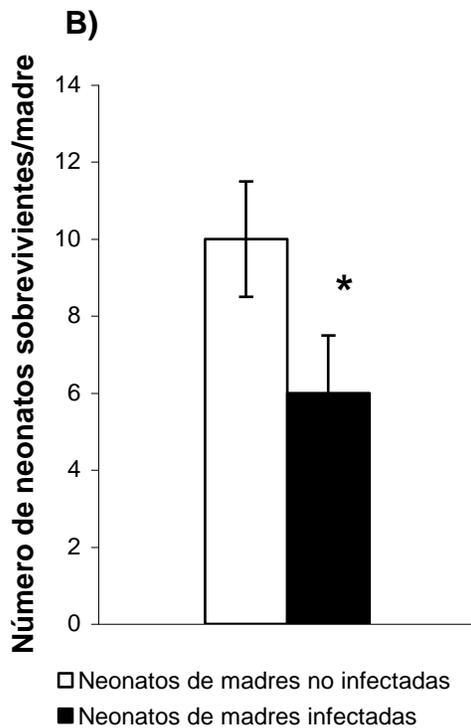


Fig. 11. A) Apariencia y tamaño del neonato; B) Número de neonatos sobrevivientes por madre infectada; C) Peso corporal de los neonatos a los 7 días de edad. Los datos en B) y C) representan la media \pm el error estándar de 30 neonatos de madres no infectadas y 30 neonatos de madres infectadas. Se utilizó la prueba t-Student, * $p < 0.001$.

Evaluación de la distribución de las poblaciones celulares en médula ósea del neonato.

Se analizó la médula ósea de 20 neonatos de 4 madres no infectadas y 20 neonatos de 4 madres infectadas mediante el examen microscópico de frotis. En los frotis de médula ósea de neonatos de madres no infectadas se observó una población heterogénea con adipocitos dispersos, así como megacariocitos y neutrófilos con núcleo en forma de anillo, característicos del ratón (imágenes 12A y B).

La médula ósea de los neonatos de madres infectadas presentó una mayor cantidad de células plasmáticas, las células tienen un tamaño de 12 a 15 μm , forma ovalada y se caracterizan por un citoplasma abundante e intensamente basófilo y un núcleo excéntrico (imágenes 12C y D).

La cuenta diferencial de la médula ósea de los neonatos de madres infectadas mostró una disminución significativa en el porcentaje de linfocitos ($3.16 \% \pm 0.56$) comparado con el porcentaje de linfocitos ($9.6 \% \pm 0.98$) en los neonatos de madres no infectadas. Por el contrario el porcentaje de células plasmáticas se incrementó significativamente en los neonatos de madres infectadas ($9.8 \% \pm 0.80$) comparado con los neonatos de madres no infectadas ($0.91 \% \pm 0.21$) (figura 13).

El porcentaje de monocitos en la médula ósea de los neonatos de madres infectadas disminuyó significativamente a la mitad comparado con el porcentaje que se encontró en la médula ósea de los neonatos de madres no infectados (tabla 6).

No se observaron cambios significativos en las poblaciones de megacariocitos, neutrófilos y eritroblastos en ambos grupos de neonatos. Con respecto a la línea mieloide sólo se observaron cambios en los monocitos.

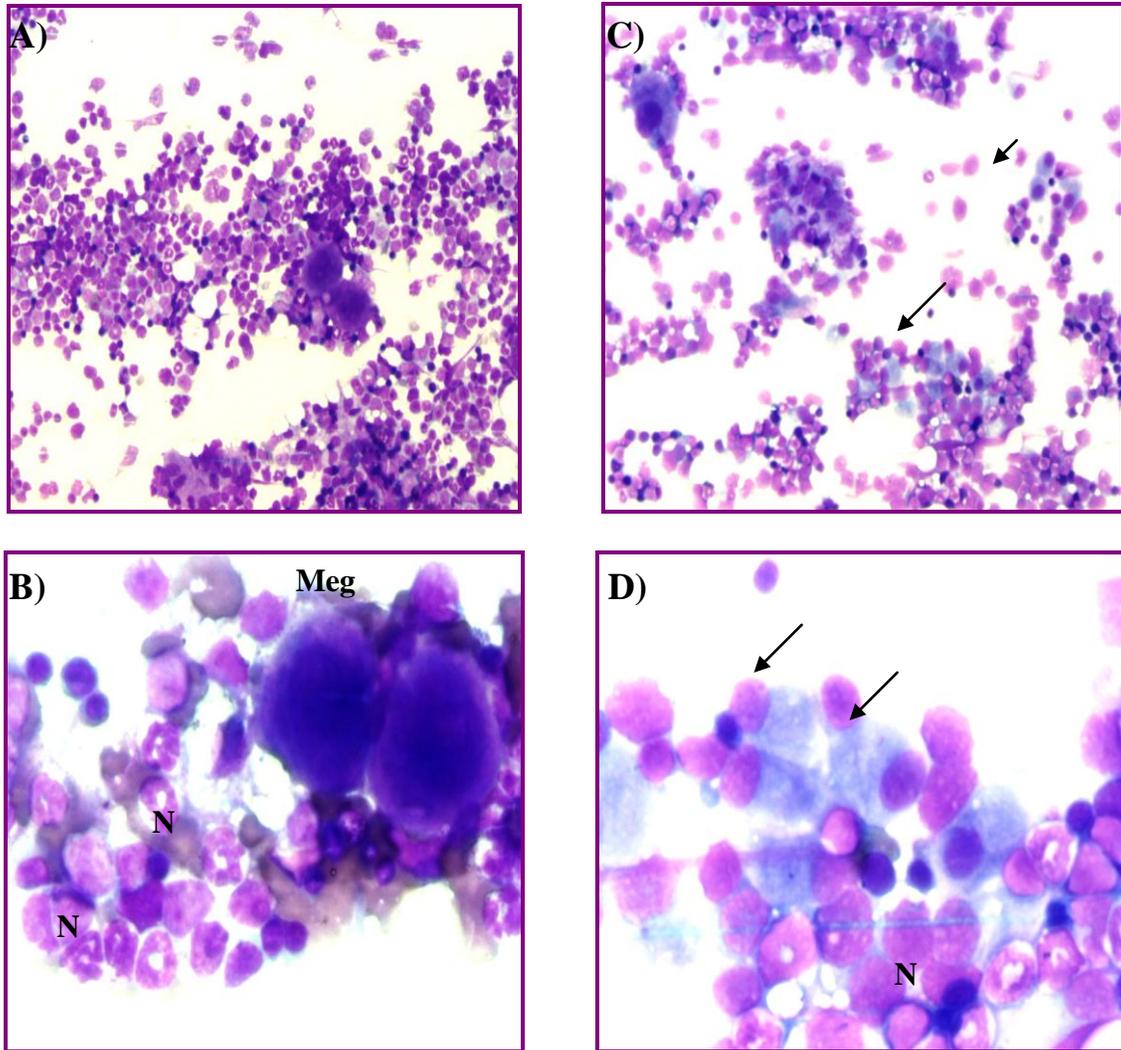


Fig. 12. Frotis de médula ósea. A) y B) frotis de médula ósea de neonato de 7 días de edad de madre no infectada, se observó una distribución de la población heterogénea característica de médula ósea en B) la imagen mostró dos megacariocitos (Meg) células de gran tamaño, alrededor de ellos neutrófilos (N) con núcleo en forma de anillo. C) y D) frotis de médula ósea de neonato de 7 días de edad de madre infectada, se observó una mayor cantidad de células plasmáticas, D) células plasmáticas con abundante citoplasma basófilo y núcleo excéntrico (flechas). Aumento de 100x, tinción de Giemsa-Wright. Imágenes representativas del experimento 4.

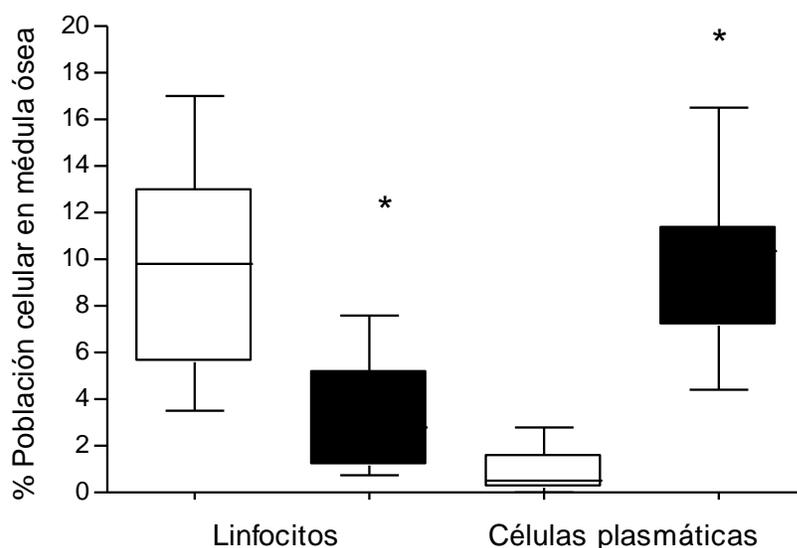


Fig. 13 Composición de la línea linfóide de médula ósea de neonato de 7 días de edad. Los extremos de las cajas definen los P²⁵ y P⁷⁵ (percentiles 25 y 75 respectivamente). La línea horizontal dentro de la caja representa la mediana y las líneas verticales los P¹⁰ y P⁹⁰ de 20 neonatos de 4 madres no infectadas y 20 neonatos de 4 madres infectadas. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney *p<0.001. □ Neonatos de madres no infectadas, ■ Neonatos de madres infectadas.

Tabla 6. Efecto de la infección materna sobre la distribución de la línea mieloide en la médula ósea del neonato de 7 días de edad.

| Población celular | Neonato de madre no infectada % | Neonato de madre infectada % | p |
|-------------------|---------------------------------|------------------------------|--------------|
| Neutrófilos | 31 ± 2.0 | 35 ± 2.1 | 0.229 |
| Monocitos | 0.50 ± 0.11 | 0.24 ± 0.07 | 0.022 |
| Eritroblastos | 55 ± 1.9 | 50 ± 1.72 | 0.056 |
| Megacariocitos | 0.78 ± 0.11 | 0.63 ± 0.09 | 0.353 |

Los datos representan la media ± DS de 20 neonatos de 4 madres no infectadas y 20 neonatos de 4 madres infectadas. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney.

Efecto de la infección materna con *Toxoplasma gondii* sobre las poblaciones celulares de sangre periférica del neonato.

Se analizó la sangre periférica de 10 neonatos de 2 madres no infectadas y 10 neonatos de 2 madres infectadas mediante la observación microscópica del frotis sanguíneo. La figura 14, muestra imágenes representativas de los frotis sanguíneos. En las imágenes 14A y B se observaron diferentes monocitos con una gran cantidad de gránulos. En las imágenes 14C y D se observó a los monocitos que contenían una gran cantidad de vacuolas (flechas) en su citoplasma, algunos de ellos presentaron algunas elongaciones de su citoplasma como se observó en la imagen 14D.

Los neutrófilos de sangre periférica de los neonatos de madres infectadas presentaron gránulos y pequeños fragmentos de taquizoítos alrededor de ellos como se indicó con las flechas en las imágenes 14 E y F. En los frotis de sangre periférica de los neonatos de madres no infectadas no se presentaron este tipo de cambios en los neutrófilos imagen 14G y monocitos, imágenes 15H e I.

Se realizó la cuenta diferencial en sangre periférica de los neonatos de ambos grupos de experimentación (figura 15). Se observaron cambios en los porcentajes de linfocitos, monocitos y neutrófilos en los neonatos de madres infectadas.

El número de linfocitos disminuyó en un $31.5 \% \pm 6.6$ a diferencia de los linfocitos de los neonatos de madres no infectadas ($62.5 \% \pm 3.1$). Por el contrario, el porcentaje de monocitos y neutrófilos aumentó de manera significativa en los neonatos de madres infectadas, $18.08 \% \pm 5.2$; $49.58 \% \pm 8.6$ respectivamente, comparado con los datos obtenidos de los neonatos de madres no infectadas, $10.18 \% \pm 8.6$; $26.71 \% \pm 7.8$ respectivamente. No se observaron basófilos y eosinófilos en los frotis sanguíneos de ambos grupos

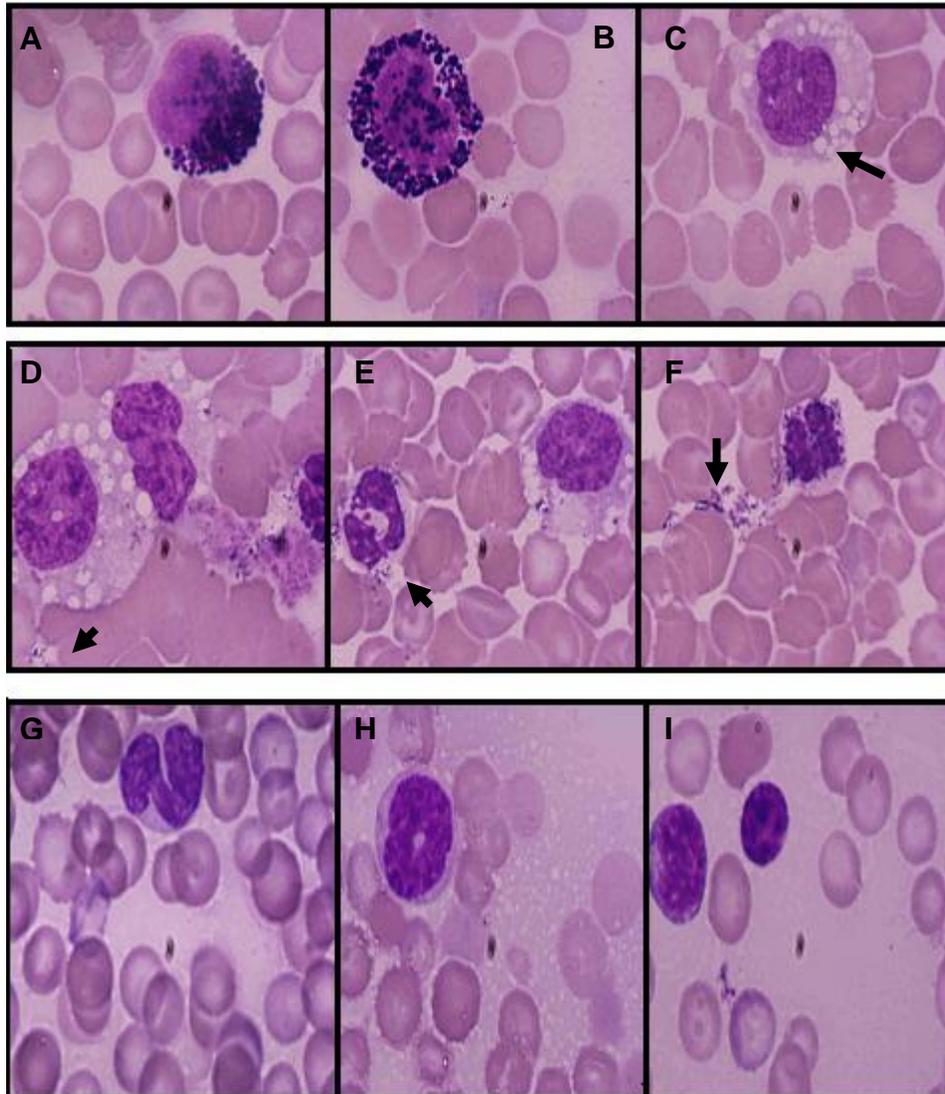


Fig. 14. Frotis de sangre periférica de neonatos de 7 días de edad. A) y B) monocitos con núcleo arriñonado ocupando casi todo el citoplasma con una gran cantidad de gránulos, en neonatos de madres infectadas. C) y D) monocitos con gran cantidad de vacuolas, con restos de taquizoítos (flechas) en los mismos neonatos. E) y F) neutrófilos rodeados por fragmentos de taquizoítos (flechas) en los frotis sanguíneos de neonatos de madres infectadas. En los frotis de neonatos de madres no infectadas se observó G) neutrófilo, H) e I) monocitos sin cambios en su morfología. Tinción de Giemsa-Wright, 100x.

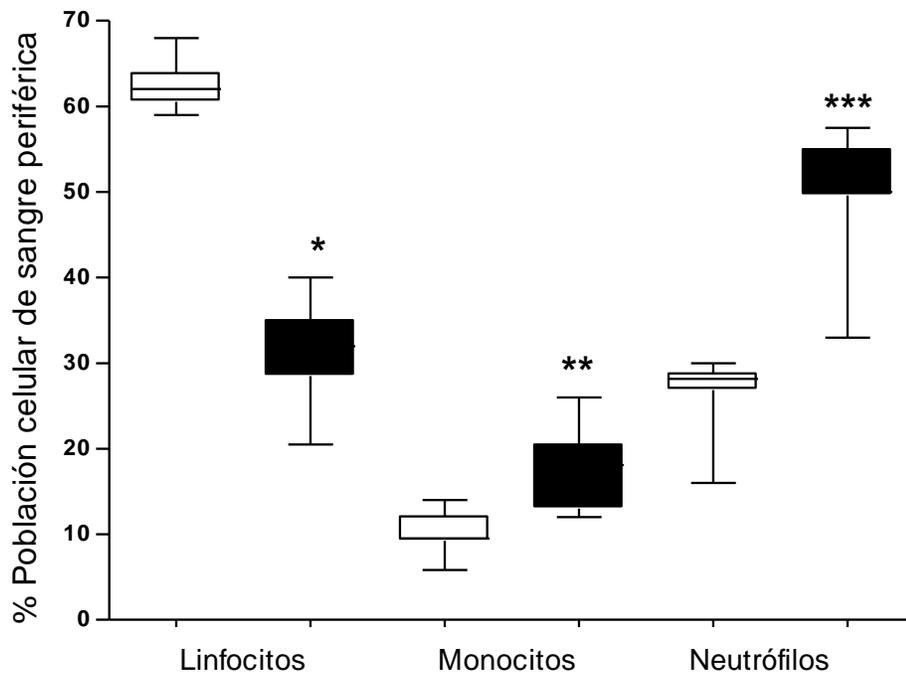


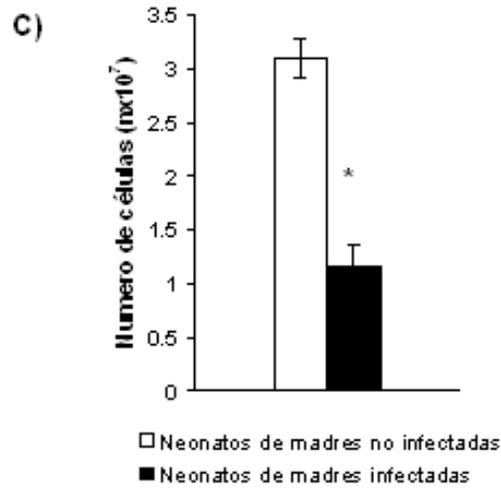
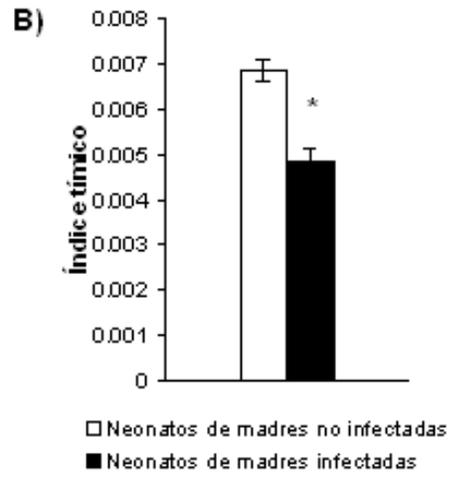
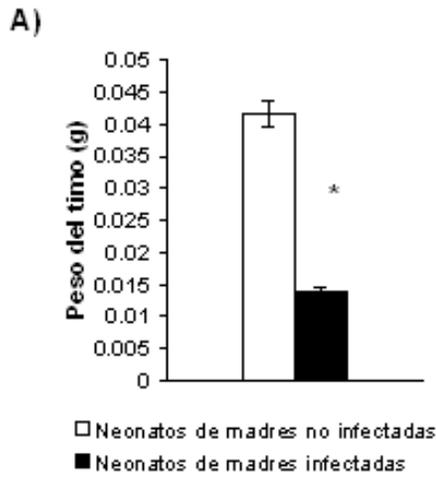
Fig. 15. Efecto de la infección materna sobre la composición de las células de sangre periférica de neonato de 7 días de edad. Los extremos de las cajas definen los P²⁵ y P⁷⁵ (percentiles 25 y 75 respectivamente). La línea horizontal dentro de la caja representa la mediana y las líneas verticales los P¹⁰ y P⁹⁰ de 10 neonatos de 2 madres no infectadas y 10 neonatos de 2 madres infectadas. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney *p<0.001 **p=0.006 y ***p=0.001, □ Neonatos de madres no infectadas, ■ Neonatos de madres infectadas.

Efecto de la infección materna con *Toxoplasma gondii* sobre el timo del neonato.

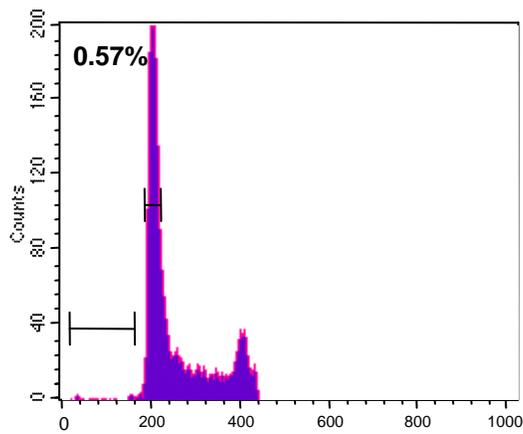
Para evaluar el efecto de la infección materna sobre el timo del neonato se analizaron 30 neonatos de madres infectadas y 30 neonatos de madres no infectadas. El peso del timo de los neonatos de madres infectadas ($0.0138 \text{ g} \pm 0.0008$) fue mucho menor comparado con el peso del timo de los neonatos de madres no infectadas ($0.0417 \text{ g} \pm 0.0021$) (figura 16A). La relación entre el peso del timo y el peso corporal (índice tímico) disminuyó dramáticamente ($0.0048 \text{ g} \pm 0.0002$) comparado con el índice tímico (0.0068 ± 0.0002) de los neonatos de madres no infectadas (figura 16B).

Se observó una reducción significativa en el número de timocitos en los neonatos de madres infectadas ($1.35 \times 10^7 \text{ células/mL} \pm 0.22$) comparado con el de los neonatos de madres no infectadas ($3.1 \times 10^7 \text{ células/mL} \pm 0.18$), esta reducción en el número de células tímicas es de aproximadamente la mitad (figura 16C).

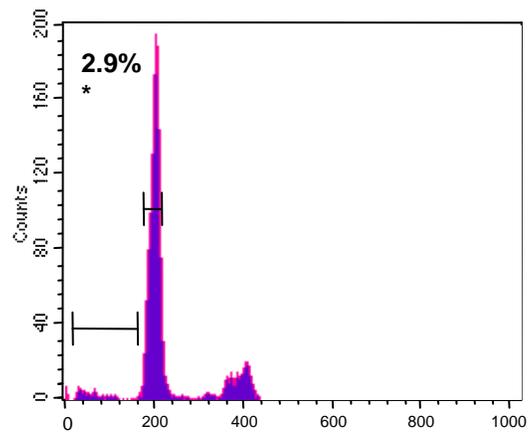
Se evaluó el porcentaje de apoptosis presente en el órgano, para lo cual se determinó de manera basal, la frecuencia de las células apoptóticas en el timo. Se mostró un incremento de 5 veces más ($2.9 \% \pm 0.23$) en los neonatos de madres infectadas, comparado con la apoptosis de las células ($0.57 \% \pm 0.03$) de los neonatos de madres no infectadas (figura 16D).



D) Neonato de madre no infectada



Neonato de madre infectada



Ioduro de propidio

Fig. 16. Efecto de la infección materna con *T gondii* sobre el desarrollo del timo en neonatos de 7 días de edad. A) Peso del timo, B) Índice tímico y C) Número de células del timo del neonato. Los datos representan el promedio \pm el error estándar de 30 neonatos de 5 madres no infectadas y 30 neonatos de 5 madres infectadas. Se utilizó la prueba t de Student $*p < 0.001$. D) Típico histograma que muestra el porcentaje de células apoptóticas presentes dentro de la región apoptótica (pico SubG₀). Los datos representan la mediana de 30 neonatos de 5 madres no infectadas y 30 neonatos de 5 madres infectadas. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney, $*p < 0.001$.

Se evaluó el número de células apoptóticas presentes sin ningún estímulo en diferentes periodos de incubación. Se observó un aumento de manera significativa en el porcentaje de apoptosis en los diferentes periodos de incubación, en las células tímicas de los neonatos de madres infectadas comparado con las células tímicas de los neonatos de madres no infectadas, sin embargo, no se observó un aumento de la apoptosis dependiente del tiempo de incubación (figura 17A).

No se observó cambios significativos entre las medianas durante las 4 y 6 horas de incubación (45.45 % y 43.11 %, respectivamente) en los mismos neonatos. El porcentaje de células apoptóticas del timo de los neonatos de madres no infectadas presentó la misma tendencia (t= 4 h 11.35 % y t=13.75 %).

Con respecto al periodo de incubación de 24 horas, se observó un incremento significativo del porcentaje de células apoptóticas (60.0 %) en el timo de los neonatos de madres infectadas, comparado con el porcentaje de células apoptóticas (43.19 %), en el timo de los neonatos de madres no infectadas.

En la figura 17B se muestran los resultados obtenidos en la inducción de células apoptóticas *in vitro*. Las células tímicas se estimularon durante 4, 6 y 24 horas con dexametasona (10^{-7} M), en ambos grupos de experimentación. El porcentaje de células apoptóticas del timo de neonatos de madres infectadas no se presentó cambios significativos entre los diferentes periodos de incubación con el inductor *in vitro*, (t=4 h 73.06 %, t=6 h 77.43 % y t=24 h 84.41 %).

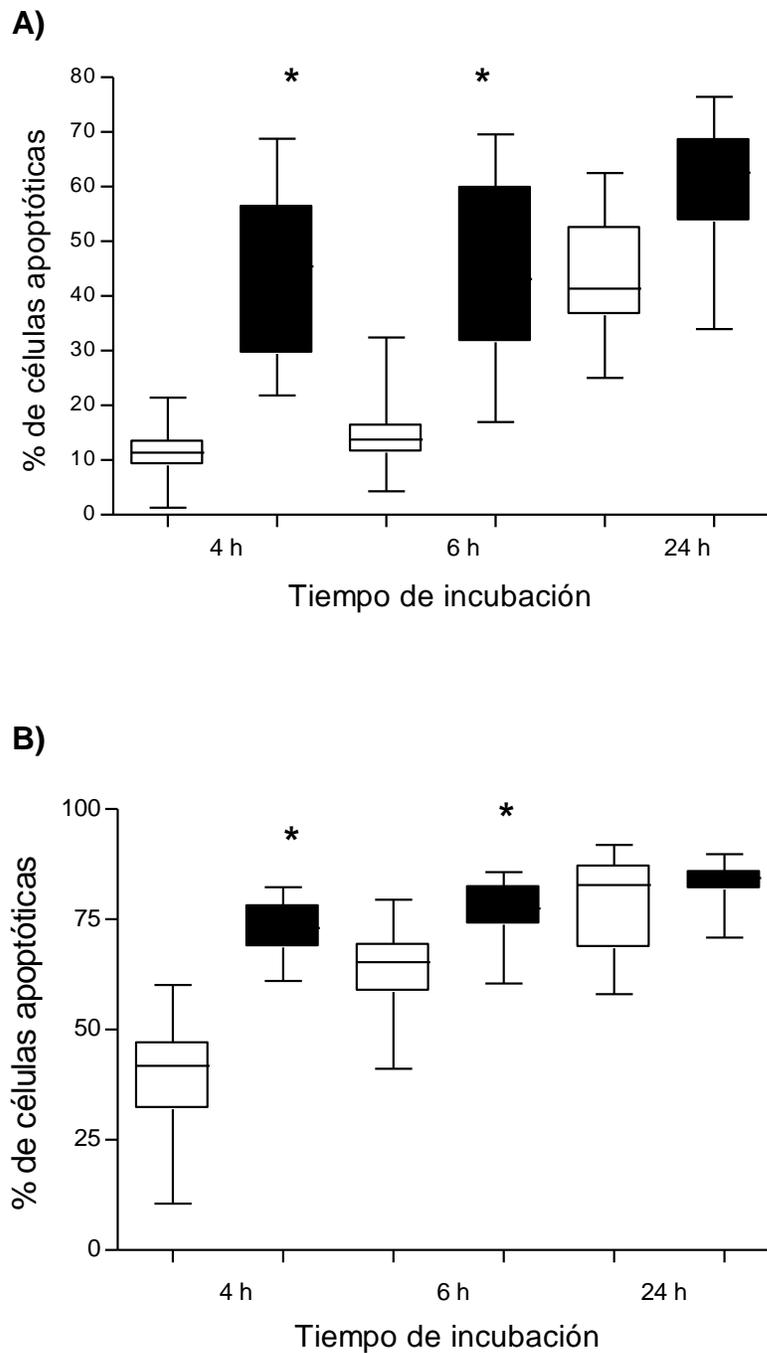


Fig. 17. Porcentaje de células apoptóticas en el timo de neonatos de 7 días de edad. A) Porcentaje de células apoptóticas sin inductor de apoptosis, B) porcentaje de células apoptóticas estimuladas con dexametasona ($10^{-7}M$) durante 4, 6 y 24 h. Los extremos de las cajas definen los P^{25} y P^{75} (percentiles 25 y 75 respectivamente). La línea horizontal dentro de la caja representa la mediana y las líneas verticales los P^{10} y P^{90} de 30 neonatos por grupo, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney $*p < 0.001$. □ Neonatos de madres no infectadas, ■ Neonatos de madres infectadas.

El porcentaje de células apoptóticas del timo de neonatos de madres no infectadas aumentó con respecto al periodo de incubación, (t=4 h 41.76 %, t=6 h 65.29 % y t=24 h 82.75 %). No se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de células apoptóticas en el timo de los neonatos de madres infectadas y en el de los neonatos de madres no infectadas en el periodo de 24 horas de incubación con dexametasona.

Efecto de la infección materna con *Toxoplasma gondii* sobre las subpoblaciones del timo en el neonato.

En el timo de los neonatos de madres infectadas, las células CD4⁺CD8⁺ (dobles positivas) se detectó una disminución significativa (75.0 % ± 9.4) comparado con las células de los neonatos de madres no infectadas (85.6 % ± 2.7), esta disminución es aproximadamente del 10 % (figura. 18D). Se observó un incremento en las células CD4⁺CD8⁻ de los neonatos de madres infectadas (15.6 ± 5.4), aproximadamente del 10 % con respecto al número de células CD4⁺CD8⁻ de los neonatos de madres no infectadas, ver figura 18C. No se observaron cambios significativos en la población de células CD8⁺ en ambos grupos (figura 18C y D).

Se determinó la distribución de las poblaciones CD4 y CD8 en los timocitos incubados durante 6 h sin estímulo, en ambos grupos de experimentación. En la figura 19 se observó disminución significativa de las poblaciones CD4⁺CD8⁺ (58.79 % ± 18.0) y un aumento de las células CD4⁺CD8⁻ (26.44 % ± 10.7 DS), en el timo de los neonatos de madres infectadas y un ligero aumento en las poblaciones de CD4⁻CD8⁺ (5.0 % ± 3.4), en los mismos neonatos con respecto a las poblaciones celulares del timo de los neonatos de madres no infectadas.

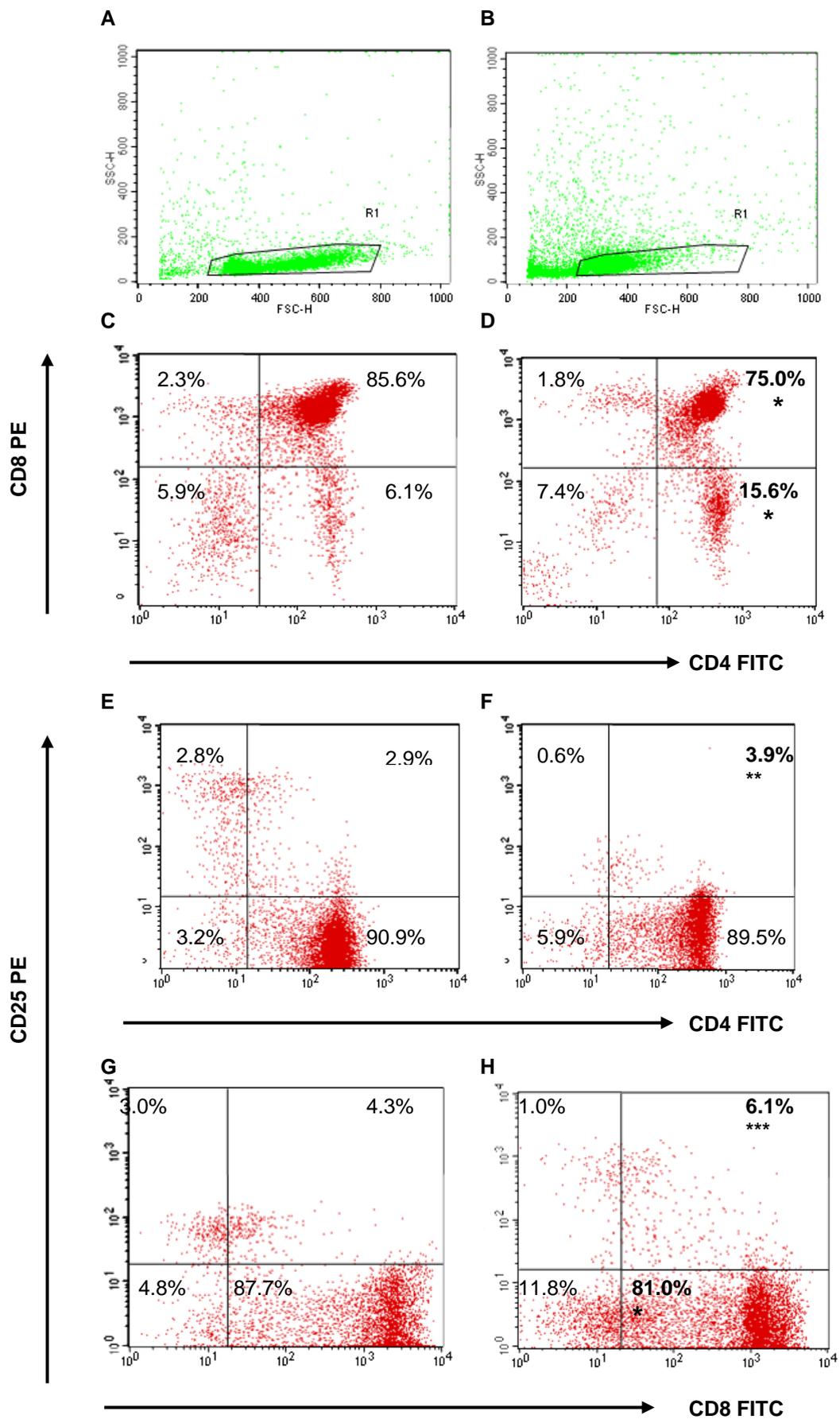


Fig. 18. Determinación de las subpoblaciones en el timo de neonatos de 7 días. A) Citograma tamaño vs granularidad de timocitos de neonato de madre no infectada y B) de neonato de madre infectada. La región R1 incluye todos los linfocitos y excluye los fragmentos celulares. C) y D) presentan la expresión de CD4 y CD8 de los timocitos de neonatos de madres no infectadas e infectadas respectivamente. La expresión de CD4 y CD25 en la población de timocitos de neonatos de madres no infectadas E) y de madres infectadas F). La expresión de CD8 y CD25 en timocitos de ambos neonatos se llevó a cabo mediante un análisis de citometría de flujo bicolor. Los valores (mediana) de las subpoblaciones se muestran dentro de cada cuadrante. La figura muestra uno de los ensayos representativos de 30 neonatos de 5 madres no infectadas y 30 de madres infectadas. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney * $p < 0.001$, ** $p = 0.047$ y *** $p = 0.014$.

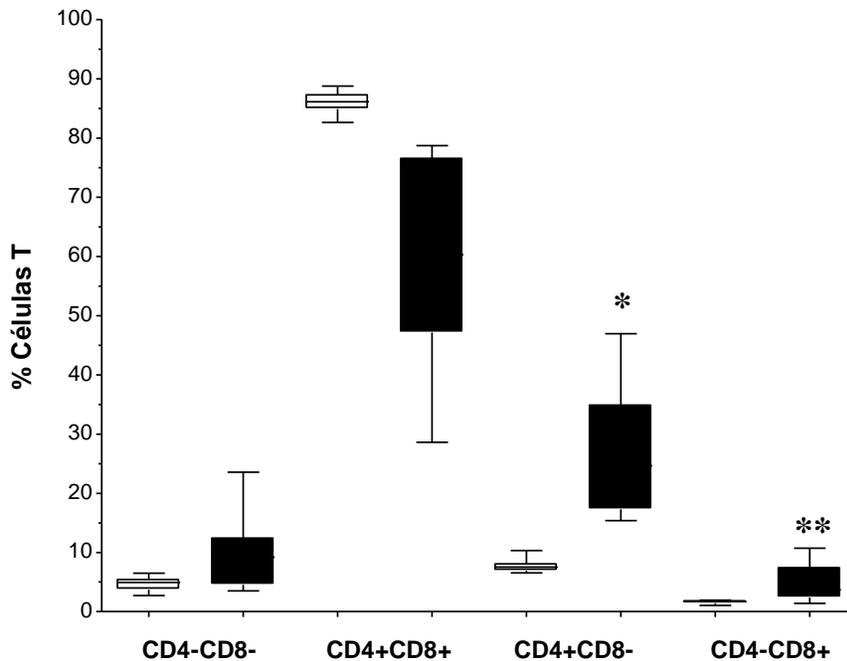


Fig. 19. Distribución de la subpoblación de timocitos seguidos por un periodo de incubación de 6 horas sin estímulo en los neonatos de 7 días de edad. Los resultados se expresaron como la mediana \pm DS de 15 neonatos de 5 madres no infectadas y de 15 neonatos de madres infectadas. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney * $p < 0.001$ ** $p < 0.002$. □ Neonatos de madres no infectadas, ■ Neonatos de madres infectadas.

El porcentaje de de las células CD4⁺CD25⁺ (3.9 % ± 1.8) se incrementó de manera significativa en los neonatos de madres infectadas comparado con las células de los neonatos de madres no infectadas, (2.9 % ± 1.3). Este incremento es de aproximadamente del 1 % (figura. 18F). No hay diferencia significativa entre los porcentajes de las células CD4⁺CD25⁻.

La células CD8⁺CD25⁺ aumentaron de manera significativa en los neonatos de madres infectadas (6.1 % ± 2.2), por el contrario, las células CD8⁺CD25⁻ (81.0 % ± 5.6), disminuyeron de manera significativa en los mismos neonatos comparado con el porcentaje de las células en el timo de neonatos de madres no infectadas.

Efecto de la infección materna con *Toxoplasma gondii* sobre la histología del timo en el neonato.

Con la finalidad de observar algún cambio en la histología del timo en nuestro modelo experimental, se realizó el estudio histológico de los cortes de timo teñidos con hematoxilina-eosina (H&E) de 20 neonatos de 4 madres no infectadas y de 20 neonatos de 4 madres infectadas (figura 20).

En el caso de los timos de los neonatos de madres no infectadas, se observó la corteza y la médula, ambas áreas bien definidas y la distribución en las poblaciones celulares de ambas áreas fue uniforme (figura 20B).

Los timos de los neonatos de madres infectadas presentaron las características histológicas del timo, fue posible observar el área de la corteza y la médula bien definidas, el tamaño del órgano se observó mucho menor pero sin ninguna alteración en su estructura, ver figura 20D. El área de la corteza mantuvo su aspecto normal, linfocitos abundantes se distribuyeron uniformemente en el parénquima. El área de la médula se observó invadida por un gran número de linfocitos (figura 20F), fenómeno que no se observó en la médula del timo de los neonatos de madres no infectadas (figura 20C).

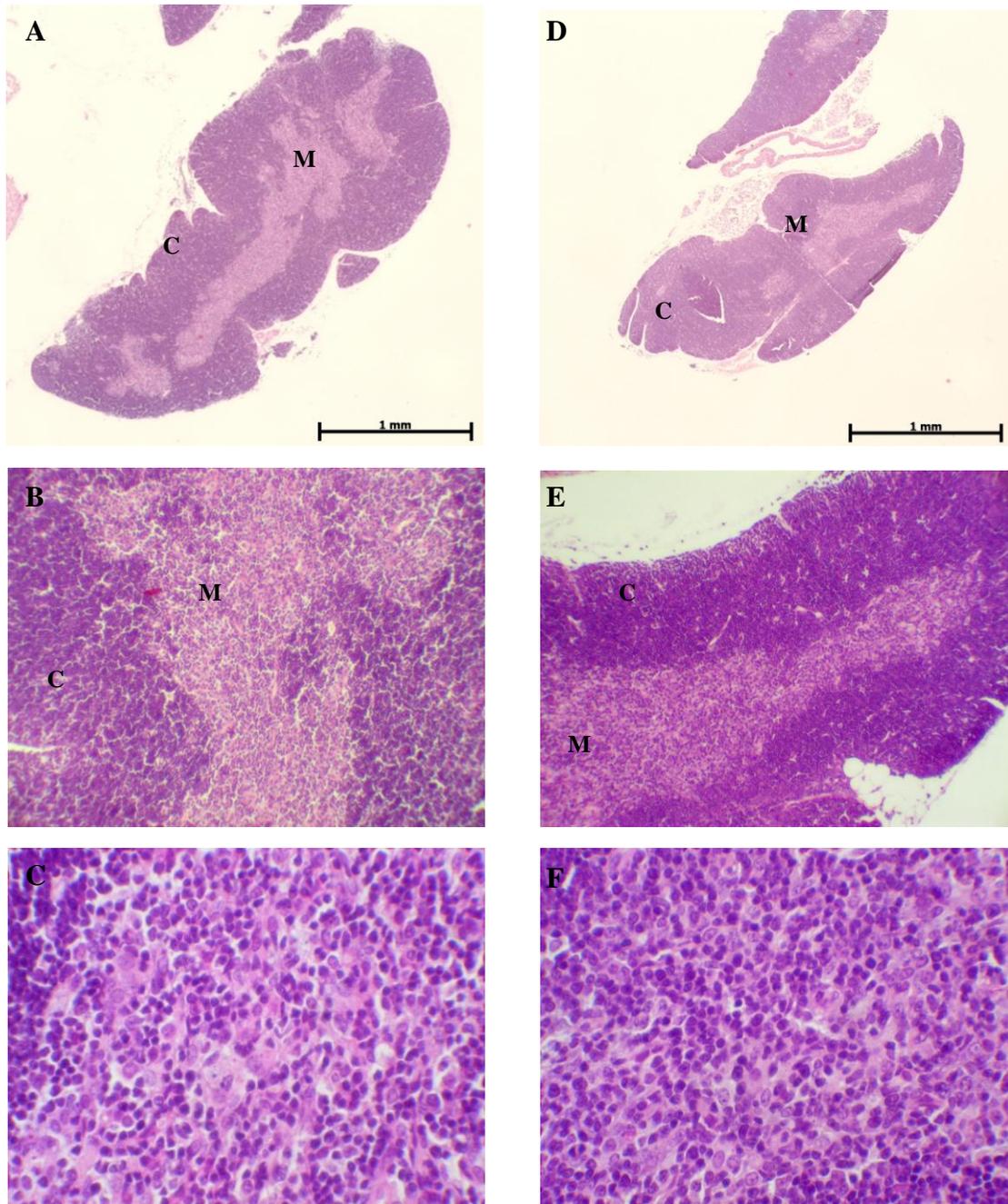


Fig. 20. Aspecto histológico de las secciones del timo teñidas con H&E. El panel vertical de la izquierda es tejido del timo de neonatos de madres no infectadas y el segundo panel vertical derecha es tejido del timo de neonatos de madres infectadas con *T. gondii*. En A y D se mostró un lóbulo del timo, donde se aprecia la corteza (C) y la médula (M) a menor aumento. En D se apreció la disminución del tamaño del órgano en el neonato de madre infectada. En B y E se observó las áreas de la corteza y médula bien definidas. En C y F se mostró a mayor aumento (100x) el área de la médula. En F se observó el área de la médula con una alta densidad de linfocitos. Estas imágenes son representativas de 20 neonatos de madres no infectadas e infectadas.

Efecto de la infección materna con *Toxoplasma gondii* sobre el bazo del neonato.

Con la finalidad de estudiar el efecto de la infección materna en un órgano linfoide secundario, se analizó el bazo de 30 neonatos de 5 madres no infectadas y 30 neonatos de 5 madres infectadas para determinar el índice esplénico y 20 neonatos de 4 madres no infectadas y 20 neonatos de 4 madres infectadas para evaluar la distribución de las subpoblaciones linfocitarias.

Se encontró una leve reducción en el índice esplénico (0.0082 ± 0.0004) de los neonatos de madres infectadas comparado con el índice esplénico (0.0092 ± 0.0002) de los neonatos de madres no infectadas (figura 21).

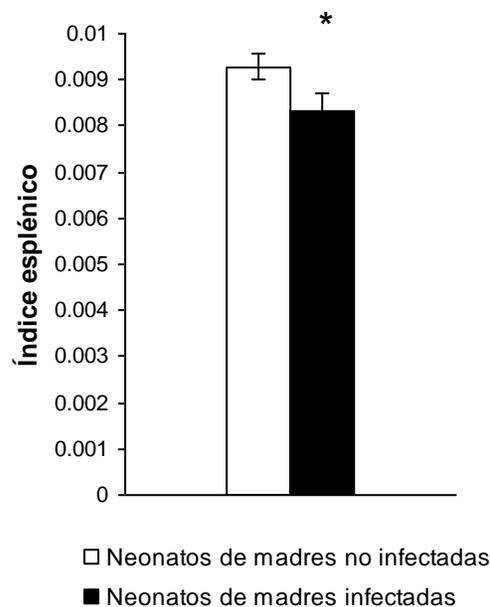


Fig. 21. Índice esplénico de neonatos de 7 días de edad. Los datos representan el promedio \pm el error estándar de 30 neonatos de 5 madres no infectadas y 30 neonatos de 5 madres no infectadas, se utilizó la prueba t de Student $*p < 0.001$

Se determinó la distribución de los linfocitos T en el bazo de acuerdo a la expresión de los marcadores de superficie: CD4⁺, CD8⁺ y CD25⁺. El porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD25⁺ (1.8 % ± 1.2) se incrementó significativamente en el bazo de los neonatos de madres infectadas comparado con las células T CD4⁺CD25⁺ (1.0 % ± 0.7) de los neonatos de madres no infectadas. Se observó en el bazo al igual que en el timo, un aumento significativo de los linfocitos T CD4⁺CD25⁻ (9.1 % ± 3.3) en los neonatos de madres infectadas comparado con la misma población (5.8 % ± 2.5) en los neonatos de madres no infectadas (figura 22D).

No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de los linfocitos T CD8⁺CD25⁺ en el bazo de los neonatos de madres no infectadas. Sin embargo se presentó un incremento en el porcentaje de las células CD8⁺CD25⁻ (5.7 ± 1.9 DS) en los mismos neonatos, ver figura 22F.

Efecto de la infección materna con *Toxoplasma gondii* sobre la histología del bazo en el neonato.

Se realizó el estudio histológico de los cortes de bazo teñidos con hematoxilina-eosina (H&E) a los mismos 20 neonatos de 4 madres no infectadas y 20 neonatos de 4 madres infectadas donde se realizó el estudio histológico del timo.

En el bazo de los neonatos de madres infectadas no se observó la arquitectura típica del órgano, se presentó una dispersión entre las células que lo forman (figura 23E y F). Sin embargo, en el bazo de los neonatos de madres no infectadas se observó una arquitectura típica del mismo, la presencia de sinusoides y de vasos sanguíneos (figura 23B). No se observaron centros germinales en ambos grupos de experimentación. La presencia de megacariocitos (flechas), se observó en el bazo de ambos grupos de experimentación.

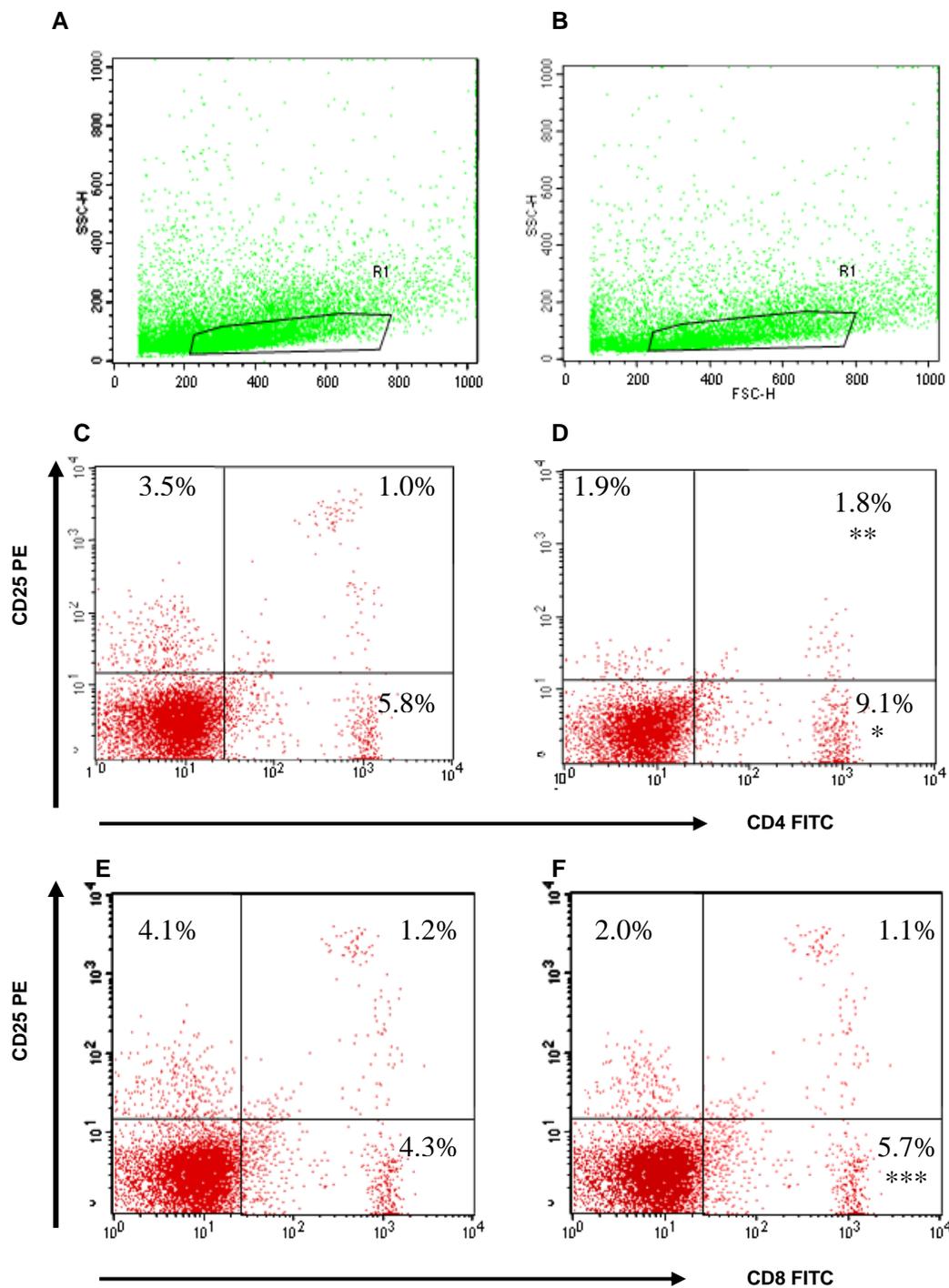


Fig. 22. Determinación de las subpoblaciones en el bazo de neonatos de 7 días. A) Citograma tamaño vs. granularidad de esplenocitos de neonato de madre no infectada y B) de neonato de madre infectada. La región R1 incluye todos los linfocitos y excluye los fragmentos celulares. La expresión de CD4 y CD25 en la población de esplenocitos de neonato de madre no infectada C) comparado con los esplenocitos del neonato de madre infectada D). La expresión de CD8 y CD25 en la población de esplenocitos de neonatos de madres no infectadas E) y neonatos de madres infectadas F). Los valores (mediana) de las subpoblaciones se muestran dentro de cada cuadrante. La figura muestra uno de los ensayos representativos de 30 neonatos de 5 madres no infectadas y 30 neonatos de madres infectadas. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney * $p < 0.001$, ** $p = 0.020$ y *** $p < 0.024$.

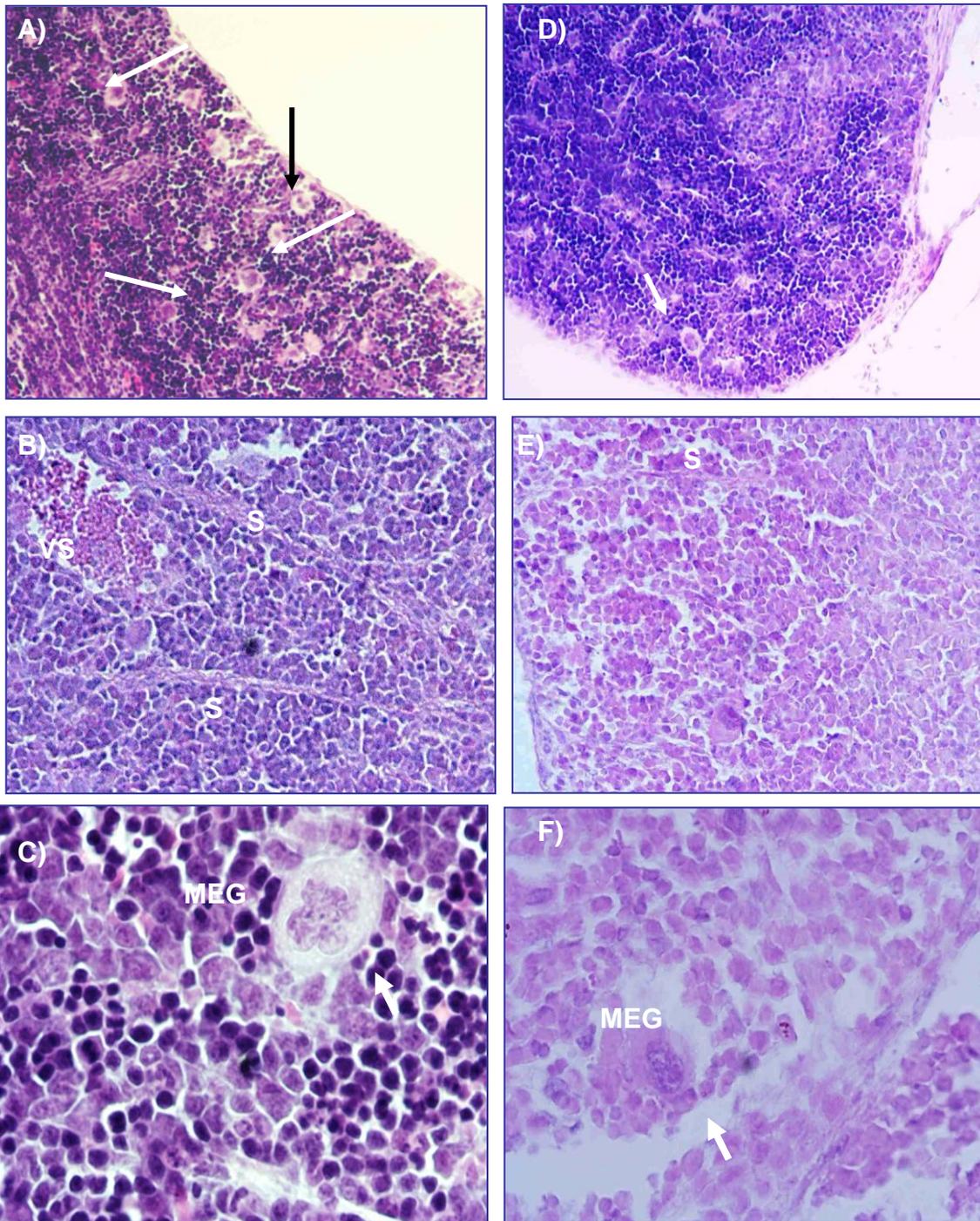


Fig. 23. Aspecto histológico de las secciones del bazo teñido con H&E. El panel vertical de la izquierda es tejido del bazo de neonatos de madres no infectadas y el segundo panel vertical derecha es tejido del bazo de neonatos de madres infectadas. En A y D se muestra el bazo con una gran cantidad de megacariocitos (MEG) flechas, 20x. En las imágenes B y E se observan tanto vasos sanguíneos (VS) como sinusoides venosos (S), 40x. En C se muestra la presencia de MEG rodeados de linfocitos, 100x. Estas imágenes son representativas de 20 neonatos tanto de madres no infectadas como de madres infectadas.

Detección de *Toxoplasma gondii* en el neonato mediante PCR

La detección del DNA del parásito se llevó a cabo por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), consistió en el análisis 10 neonatos de 2 madres no infectadas y 10 neonatos de 2 madres infectadas. Se realizó la detección de *T. gondii* en diferentes órganos y fluido peritoneal tanto de madres no infectadas como madres infectadas cuando los neonatos cumplieron 7 días de edad.

En la figura 24 se muestra el corrimiento electroforético de los amplificados de la PCR. Se observó la presencia de una serie de bandas, para determinar el tamaño de las mismas se compararon éstas con el marcador de peso molecular de 100 pares de bases (bp) conocidos. El fragmento de 469 pb corresponde al gen B1 de *T. gondii*. La expresión de este gen indicó la presencia del parásito en el órgano y fluido peritoneal.

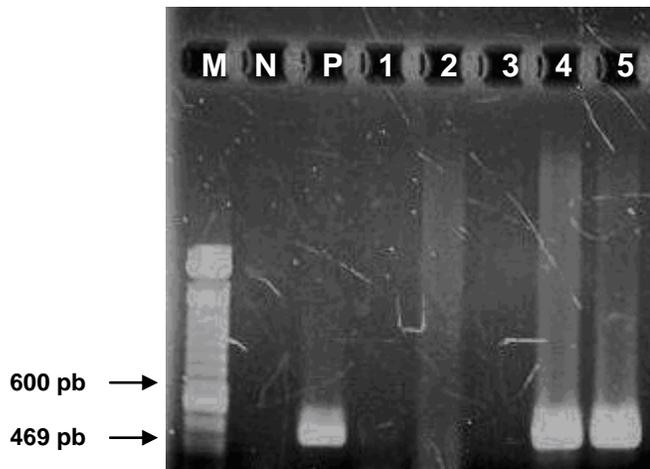


Fig. 24. Detección del DNA de *Toxoplasma gondii* en madres no infectadas e infectadas. Línea 1: bazo, línea 2: hígado y línea 3: fluido de la cavidad peritoneal de madres no infectadas; línea 4: bazo y línea 5 fluido de la cavidad peritoneal de madres infectadas. M. Marcador de peso molecular. N Control negativo de la PCR, P Control positivo DNA *T. gondii*. La posición del amplificado (469 pb) se indicó con una flecha.

Se llevó a cabo la detección de *T. gondii* en los neonatos tanto de madres infectadas como de no infectadas. La detección del parásito se realizó en el hígado y bazo de los neonatos a los 7 días de edad. Se llevó a cabo el corrimiento electroforético de los amplificadores en ambos grupos de órganos. No se observó la presencia de la banda de 469 pb en el grupo de neonatos de madres infectadas (figuras 25A y B). La banda de 469 pb sólo se presentó en el control positivo (14×10^6 taquizoítos).

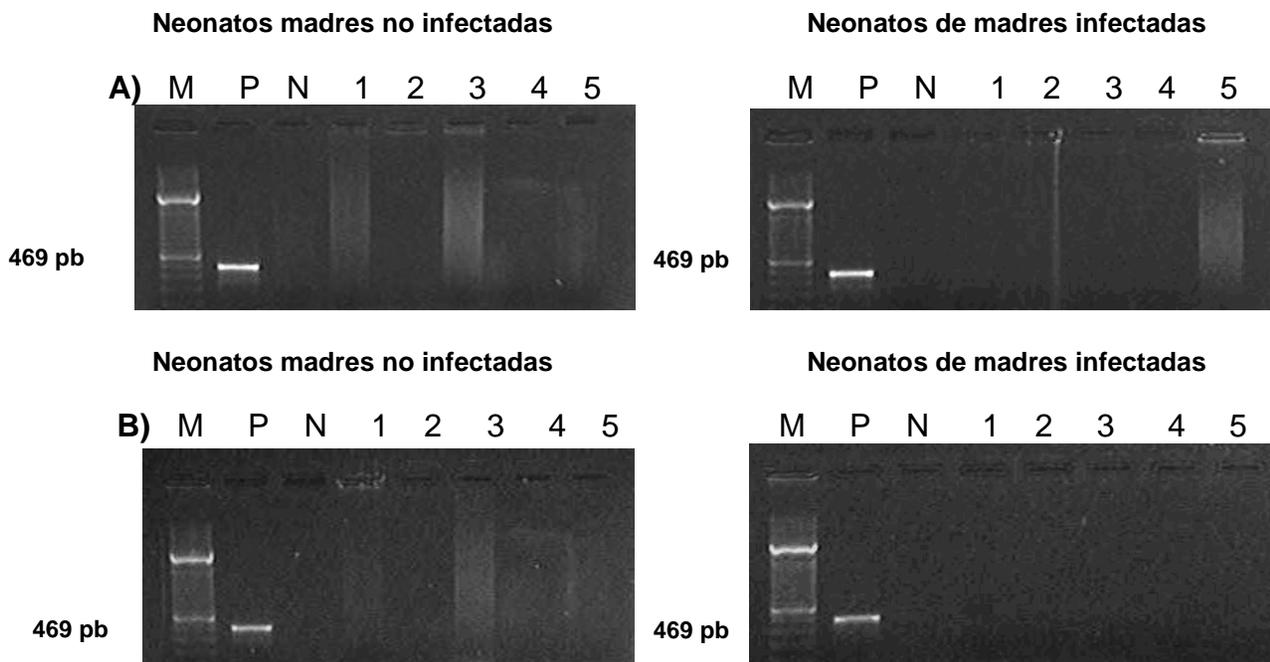


Fig. 25. Detección del DNA de *Toxoplasma gondii* en el tejido del neonato madres infectadas. A) Cinco bazos de neonatos de 7 días de edad (líneas 1-5) y B) cinco hígados de neonatos de 7 días de edad (líneas 1-5). M Marcador de peso molecular, N Control negativo de la PCR, P Control positivo DNA del parásito (14×10^6 taquizoíto).

IV. DISCUSIÓN

Poco se sabe acerca de las alteraciones producidas en los órganos linfoides relacionados con la función inmune de los neonatos de madres infectadas con *T. gondii*. El modelo experimental presentado, se diseñó para estudiar el efecto de la infección materna con *T. gondii* en los órganos linfoides de los neonatos a los 7 días de edad.

Para el diseño del modelo experimental se tomaron en cuenta diferentes factores, como son el tipo de cepa, el tamaño del inóculo y el tiempo de gestación en el cual se llevó a cabo la infección. En el humano, si la infección ocurre durante el primer trimestre del embarazo, el riesgo de transmisión congénita es muy bajo (10-25 %); los efectos en el feto son más serios, se presenta aborto y malformaciones congénitas. Cuando la infección ocurre en el último trimestre, el riesgo de transmisión es alto (60-90 %) y las consecuencias en el feto son menos severas (Jones et al. 2001).

Este fenómeno lo observamos en nuestro modelo: la infección en la primera semana (7 días) de gestación provocó la muerte de los fetos, en la segunda semana (14 días) de gestación, también. Se utilizó la forma infectiva del parásito (taquizoítos) de la cepa RH, virulenta en el ratón, que tienen un alto índice de multiplicación *in vitro*, y además tienen la capacidad para atravesar barreras biológicas (sangre-cerebro, sangre-retina, placenta y mucosa intestinal) tanto *in vitro* como *in vivo* (Barragán et al. 2003). Por todo lo anterior se determinó disminuir el número de taquizoítos e inocular la última semana de gestación (19 días) con 30 taquizoítos.

Dos días después de la infección materna nacieron las crías. Las madres infectadas se observaron enfermas al día siguiente de la inoculación y permanecieron así hasta 9 días postinoculación. En el ratón el sistema inmune es menos maduro al nacer que en los humanos, se ha propuesto que el ratón a los 7 días de edad, se puede comparar en un recién nacido humano (Adkins et al. 2004), por lo tanto, se consideró estudiar a los neonatos a los 7 días de edad.

En nuestro modelo, el 80 % de los neonatos de madres infectadas nació, pero los neonatos eran de menor tamaño y presentaban congestión. No todos los neonatos sobrevivieron a la edad de 7 días, solo el 75 %. En comparación con los controles, se presentó un retardo significativo en el crecimiento de los neonatos de madres infectadas, el tamaño de los neonatos de madres infectadas siempre fue menor en comparación de los neonatos de madres no infectadas. Existen dos posibles mecanismos que pueden explicar el retardo en el crecimiento; uno de ellos es el daño de la placenta provocado por la infección, y el otro, es la malnutrición postnatal debida a que las madres estuvieron enfermas durante este periodo. Se observó el útero de las madres infectadas 7 días después del nacimiento y se observó atrofiado, comparado con el útero de las madres no infectadas.

En el humano, los neonatos de madres infectadas manifiestan un marcado bajo peso al nacer; probablemente causado por un retardo en el crecimiento intrauterino. El retardo en el crecimiento intrauterino es la principal causa de morbilidad y mortalidad en el periodo perinatal. El daño en la placenta es la primera causa de la muerte fetal. En la infección con *T. gondii*, la presencia de taquizoítos que circulan por el torrente sanguíneo y atraviesan la barrera placentaria, provocan la inflamación del corion o una placentitis, afectando el crecimiento fetal, el mecanismo exacto es desconocido (Abbasi et al. 2003; Shiono et al. 2007)

La exposición del feto con *T. gondii* durante el periodo del desarrollo puede alterar y/o destruir la maduración de los órganos linfoides, resultando en anomalías en la estructura y función del sistema inmune del neonato (Huldt et al. 1973; Marodi 2006; Petrova et al. 2007)

La médula ósea es el principal órgano hematopoyético y linfoide primario, responsable de la producción de eritrocitos, granulocitos, monocitos linfocitos y plaquetas. La hematopoyesis ocurre con la interacción entre el microambiente y las células del estroma, el microambiente provee citocinas necesarias para la proliferación, maduración y diferenciación a las diferentes estirpes celulares (Travlos 2006).

La médula ósea es sensible a factores externos y puede llegar a suprimir su función en respuesta a una dieta restringida, malnutrición, inflamación crónica, infecciones y enfermedades sistémicas (Diebold et al. 2000).

En los frotis de médula ósea se puede evaluar la presencia o ausencia de un tipo de célula, cambios relativos en las poblaciones celulares y alteraciones en las secuencias de maduración además de cambios morfológicos de las células (Everds 2004; Diebold et al. 2000).

En nuestros experimentos, la médula ósea de los neonatos de madres infectadas mostró un gran número de células plasmáticas, una disminución en el número de linfocitos y monocitos. La infección aguda durante la gestación puede interrumpir el balance inmunológico materno fetal debido al aumento en la producción de citocinas pro-inflamatorias, como son el IFN- γ , TNF- α e IL-12, (Shiono et al. 2007). Los macrófagos, los mastocitos y el trofoblasto son capaces de producir IL-6 en la interfase materno-fetal (Zenclussen et al. 2003), el IFN- γ e IL-6 son citocinas que conducen la proliferación y activación de las células B. El incremento de las células plasmáticas que observamos en la médula ósea podría ser provocado por una acción secundaria del IFN- γ que secreta la madre infectada. La cepa virulenta RH induce en el ratón BALB/c una sobreproducción de IL-12 e IFN- γ (Mordue et al. 2001; Nguyen et al. 2003).

En la médula ósea de los neonatos de madres no infectadas, nosotros encontramos un porcentaje de linfocitos y células plasmáticas de aproximadamente el 10 % y 1 % respectivamente. Estos datos son similares a los de otros autores en ratones sanos (Bolliger et al. 2004, Sanderson et al. 1981).

La médula ósea donde se producen todas las células sanguíneas circulantes, incluidas los linfocitos T inmaduros y lugar de maduración de los linfocitos B cambió la proporción de las células inmunes del neonato en respuesta a la infección materna

El timo es el órgano linfoide primario, capaz de seleccionar y madurar a las células T que eventualmente colonizan a los órganos linfoides secundarios (Crivellato et al. 2004; Pearse 2006). A lo largo de la vida este órgano es afectado por diferentes situaciones tales como el embarazo, envejecimiento y por una gran variedad de enfermedades infecciosas (Elmore 2006; Savino 2006; Savino et al 2007; Verinaud et al 2004).

En nuestro estudio, el timo de los neonatos de madres infectadas con *T. gondii* mostró una clara atrofia expresada por la pérdida de la masa absoluta y por reducción en las células del órgano. La pérdida de los timocitos está mediada por la apoptosis y por la disminución de los linfocitos en médula ósea que trae como consecuencia un menor número de linfocitos en el timo afectando el tamaño y peso del órgano. El porcentaje de células apoptóticas es bajo en el timo de neonatos de madres no infectadas, debido a la eliminación rápida de los cuerpos apoptóticos por los macrófagos *in vivo* (Xu et al. 2007).

Varios mecanismos, incluyendo la secreción de diferentes mediadores, son responsables de la inducción de la apoptosis. Uno de ellos está relacionada con los niveles de glucocorticoides en el torrente circulatorio. En este modelo, la infección materna induce estrés durante los últimos días de la gestación, lo cual podría conducir a elevados niveles de glucocorticoides (Knackstedt et al. 2005). Los glucocorticoides dentro de la circulación materna podrían ser inactivados por la placenta, sin embargo, el 10-20 % de los glucocorticoides maternos atraviesan la placenta y pasan al sistema circulatorio fetal, tales esteroides pueden activar la apoptosis en los timocitos de los neonatos de madres infectadas. Este mecanismo es uno de los que pueden estar participando en nuestro modelo. En nuestro modelo al inducir la apoptosis *in vitro* con dexametasona (glucocorticoide), se observó la misma cantidad de células apoptóticas independientemente del tiempo con la dexametasona, es decir, pareciera que las células estaban saturadas por esta sustancia y ya no respondían a la inducción. Este fenómeno no se observó con los timocitos de neonatos de madres no infectadas, las células respondieron al inductor de apoptosis y al tiempo de incubación con la dexametasona.

Otro mecanismo propuesto es el cambio en el microambiente del timo, como por ejemplo, un aumento de citocinas inflamatorias (TNF- α). La apoptosis ocurre como resultado de la sobreproducción de citocinas inflamatorias en cepas de *T. gondii* altamente virulentas (Gavrislescu et al. 2001; Shen et al. 2001).

Las alteraciones en el microambiente del órgano debido al aumento de glucocorticoides o citocinas pro inflamatorias que están presentes en la infección materna, tiene como consecuencia un aumento en la apoptosis de las células tímicas.

En nuestro estudio se observó cambios en las subpoblaciones de los timocitos y esplenocitos de los neonatos de madres infectadas, sin embargo, estos resultados no deben tomarse de manera concluyente, debido a que no se realizó la validación del método, no se realizaron los controles de isotipo para los diferentes fluorocromos así como también no se determinó la expresión de marcadores específicos para la identificación de las células Treg.

Los resultados abren la posibilidad para estudiar a fondo los cambios presentes en las subpoblaciones de los timocitos y esplenocitos, particularmente de la población CD4+CD25+Foxp3+ (células Treg). Belkaid (2007), demostró que algunos microorganismos promueven la inducción de las células Treg, para controlar la exacerbación de la respuesta contra el patógeno. Las células T autoreactivas naturales podrían ser activadas y limitar la respuesta contra el patógeno. Es de nuestro interés conocer la participación de estas células en nuestro modelo.

Una vez identificados todos estos cambios en las poblaciones celulares nos dimos a la tarea de observar si afectaban la arquitectura del timo. En la corteza se originan clones de linfocitos T que posteriormente sufren un proceso de maduración a medida que avanzan en dirección a la médula. En la médula, los linfocitos T en maduración se introducen en los vasos sanguíneos y linfáticos para formar parte de la reserva de linfocitos circulantes. Posteriormente se dirigen a los órganos linfoides secundarios,

donde alcanzan su madurez inmunológica completa (Elmore 2006; Pearse 2006; Verinaud et al. 2004; Savino 2006).

El estudio histológico del timo demostró que las áreas del órgano se mantuvieron delimitadas en ambos neonatos tanto de madres infectadas como de madres no infectadas. En los neonatos de madres infectadas la corteza no se observaron cambios significativos en la distribución de los linfocitos, sin embargo, en la médula se observó una mayor infiltración de linfocitos.

Los resultados obtenidos en los órganos linfoides primarios nos condujeron a observar si también el bazo, órgano linfoide secundario y la sangre periférica de los neonatos de madres infectadas sufren algún cambio.

El bazo es el mayor órgano linfoide secundario en el se lleva a cabo la respuesta inmune frente a los antígenos transportados en la sangre, recoge y elimina los eritrocitos viejos. En el ratón es el sitio de hematopoyesis en las etapas tanto neonatal como fetal (Mebius y Kraal 2005; Cesta 2006). El bazo de los neonatos de madres infectadas sólo mostró un cambio moderado en la disminución del índice esplénico.

La histología del bazo demostró ser un órgano hematopoyético extramedular, en tanto, los neonatos de madres infectadas como los de madres no infectadas, se observó una gran cantidad de megacariocitos y linfoblastos. No se observaron cambios significativos en la arquitectura de este órgano. La infección materna no afectó de manera indirecta el desarrollo del bazo en el neonato.

La toxoplasmosis aguda se caracteriza por la diseminación y crecimiento intracelular de los taquizoítos en una variedad de los órganos del huésped. En la respuesta inmune innata, los neutrófilos, monocitos y células dendríticas son atraídos a los sitios de infección. La defensa contra la infección, especialmente en el neonato que carece de memoria inmunológica y una baja capacidad para producir anticuerpos contra bacterias, virus, protozoarios y hongos, predominantemente depende de la inmunidad innata, durante la exposición intrauterina y en la etapa neonatal (Petrova et al. 2007).

En la sangre periférica de los neonatos de madres infectadas, el porcentaje de los monocitos y neutrófilos es significativamente alto. El incremento de los monocitos en sangre periférica podría explicar la migración de estas células de médula ósea donde se encuentran disminuidas.

En la infección aguda los taquizoítos se diseminan inicialmente del intestino a diferentes órganos. La sobrevivencia del huésped y el parásito depende de algunos taquizoítos que llegan a ser enquistados o diferenciados a bradizoítos, mientras que los taquizoítos restantes son eliminados (Tenter et al. 2000). Los monocitos juegan un papel importante en este fenómeno, debido a la acción fagocítica sobre los taquizoítos extracelulares y retardar la división intracelular por la producción de citocinas (Channon et al. 2000). En nuestros experimentos los monocitos de sangre periférica de los neonatos de madres infectadas muestran la presencia de gránulos, otros con grandes vacuolas en casi todo su citoplasma, con fragmentos de taquizoítos dentro. Los neutrófilos muestran imágenes similares, estos resultados indican que este tipo de células participan en el control de la parasitemia.

Mediante la técnica de PCR se corroboró la presencia del parásito en la cavidad peritoneal y en el bazo de la madre inoculada con *T. gondii*. Se realizó la búsqueda del parásito en el hígado y bazo de los neonatos tanto de madres infectadas como los de madres no infectadas. No se detectó en el hígado y el bazo el DNA del parásito en los neonatos de madres infectadas; no obstante, la presencia de monocitos vacuolados en sangre periférica indicó que la parasitemia pudo ser controlada por los fagocitos en la sangre y los taquizoítos no llegaron a almacenarse en tan corto tiempo en el hígado y el bazo. Los resultados sugieren que el parásito no está presente en estos órganos debido a la etapa temprana de la infección, al tamaño del inoculo, la parasitemia podría ser transitoria y/o en muy bajo nivel en el neonato, por lo tanto, no están presentes en estos órganos.

Finalmente, después de la inoculación con taquizoítos en la cavidad peritoneal de las madres en el día 19 de la gestación, los parásitos alcanzan el tejido placentario vía los leucocitos maternos, en la placenta, las citocinas maternas, en conjunto con el parásito la fiebre y el desequilibrio hormonal y metabólico que predomina en la gestación, pueden afectar el microambiente uterino e inducir cambios en el tejido y las células del sistema inmune del neonato.

Este trabajo provee un modelo murino que podría ser usado para entender la compleja relación entre la madre y el feto.

V. CONCLUSIONES

- La infección materna con 30 taquizoítos de *T. gondii* (cepa RH) en el día 19 de gestación, permitió realizar el estudio de los órganos linfoides del neonato y provee un modelo para el estudio de la compleja relación entre la madre y el feto.
- La médula ósea y el timo del neonato de madre infectada presentaron alteraciones en su desarrollo y celularidad.
- La infección materna con *T. gondii* provocó una respuesta inmune en el neonato a juzgar por la presencia de monocitos y neutrófilos activos en sangre periférica.
- El bazo del neonato de madre infectada no presentó ninguna alteración.
- El parásito no se detectó en el bazo e hígado del neonato de madre infectada debido a que la parasitemia fue controlada por el sistema inmune del neonato.

VI. PERSPECTIVAS

Los datos obtenidos permitieron conocer los cambios en la celularidad y desarrollo de los órganos linfoides del neonato de madre infectada con *T. gondii*. En un siguiente protocolo, será necesario continuar la investigación para confirmar el aumento de células Treg CD4+CD25+ Foxp3+, tanto, en timo como en bazo. Debido a la importancia que tienen en la regulación de la respuesta inmune. Por otra parte, conocer los niveles de glucocorticoides y de citocinas inflamatorias tanto en las madres como en los neonatos son importantes para poder comprender su participación en la diferenciación celular tanto en el timo como en la médula ósea.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasi M., Kowalewska-Grochowska K., Bahar M.A., Kilani R.T., Winkler-Lowen B., Guilbert L.J., 2003. Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*, Journal of Infectious Diseases 188, 608-616
- Adkins B, Leclerc C and Marshall-Clarke S, 2004. Neonatal adaptive immunity comes of age. Nature Reviews Immunology 4, 553-564.
- Barragan A and Sibley D, 2003. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. Trends in Microbiology 11, 426-430.
- Belkaid Y., 2007. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. Nature Reviews Immunology 7, 875-888.
- Black MW and Boothroyd JC, 2000, Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*, Microbiology and Molecular Biology Reviews 64, 607-623.
- Bolliger A.P., 2004. Cytologic evaluation of bone marrow in rats: indications, methods, and normal morphology. Veterinary Clinical Pathology 33:58-67
- Brendolan A, Rosado MM, Carsetti R, Selleri L and Dear NT. 2007. Development and function of the mammalian spleen. BioEssays 29, 166-177.
- Burg JL, Grover ChM, Pouletty P and Boothroyd JC. 1989. Direct and sensitive detection of pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase Chain Reaction. Journal of Clinical Microbiology 27, 1787-1792.
- Cesta MF, 2006. Normal Structure, Function, and Histology of the spleen. Toxicologic Pathology 34, 455-465.
- Channon J.Y., Seguin R.M., Kasper L.H., 2000. Differential infectivity and division of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood leukocytes. Infection and Immunity 68, 4822-4826.

- Claesson MH and Tjell V. 1976. Differential effect of cortisol on thymocytes from mice of different ages. *Acta Pathology Microbiology Scandinavia* 84, 185-195.
- Crivellato E., Vacca A., Ribatti D., 2004. Setting the stage: an anatomist's view of the immune system. *Trends in Immunology* 25, 210-217
- Cyter JG. 2003. Lymphoid organ development and cell migration. *Immunological Reviews* 195, 5-14
- Darrasse-Jèze G., Marodon G., Salomón BL., Catala M. and Klatzmann D. 2005. Ontogeny of CD4+CD25+ regulatory/supresor T cells in human fetuses. *Blood* 105, 4715-4721.
- de Medeiros BC, de Medeiros CR, Werner B, Loddo G, Pasquini R and Bleggi-Torres LF, 2001, Disseminated toxoplasmosis alter bone marrow transplantation: report of 9 cases, *Transpl Infect Dis* 3, 24-28
- Diebold J., Molina T., Camilleri-Broët S., le Tourneau A., Audouin J., 2000. Bone marrow manifestations of infections and systemic diseases observed in bone marrow trephine biopsy. *Histopathology* 37, 199-211.
- Dubey JP, Lindsay DS and Speer CA, 1998, Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical Microbiology Reviews* 11, 267-299.
- Elmore A.S., 2006. Enhanced histopathology of the thymus. *Toxicologic Pathology* 34, 656-665.
- Elsheikha HM, 2008. Congenital toxoplasmosis: Priorities for further health promotion action, *Public Health* 122, 335-353
- Everds N. 2004. Hematology of the mouse. In: Hans J Hendrich and Guillian Bullock, (Eds.) *The Laboratory Mouse*, Elsevier Academic Press; 2004. p.271-286
- Freij BJ and Server JL, 1991. Toxoplasmosis. *Pediatrics in review* 12, 227-236
- Freyre A, Falcon J, Méndez J, Rodriguez A, Correa L and González M, 2006. Refinement of the mouse model of congenital toxoplasmosis. *Experimental Parasitology* 113, 154-160

- Fux B, Ferreira AM, Cassali GD, Tafuri WL and Vitor RWA. 2000. Experimental Toxoplasmosis in BALB/c mice. Prevention of vertical disease transmission by treatment and reproductive failure in chronic infection. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 95, 121-126
- Gavrilescu L.C., Denkers E.Y., 2001. IFN- γ overproduction and high level apoptosis are associated with but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. *Journal Immunology* 167, 902-909
- Gavrilescu L.C., Denkers E.Y., 2003. Apoptosis and the balance of homeostatic and pathologic responses to protozoan infection. *Infection and Immunity* 71, 6109-6115.
- Howe DK and Sibley. 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *Journal Infection Disease* 172, 1561-1566
- Huldt G, Gard S and Olovson SG, Effect of *Toxoplasma gondii* on the thymus, *Nature*, 1973; 244:301-303
- Jones JL, Lopez A, Wilson M, Schulkin J and Gibbs R, 2001. Congenital Toxoplasmosis: A review. *Obstetrical and Gynecological Survey* 56, 296-305.
- Knackstedt M.K., Hamelmann E., Arck P.C., 2005. Mothers in stress: consequences for the offspring. *American Journal of Reproductive Immunology* 54, 63-69
- Maródi L. Neonatal innate immunity to infectious agents. *Infect Immun* 2006; 74:1999-2006
- Mebius RE and Kraal G. 2005. Structure and function of the spleen. *Nature Reviews Immunology* 5, 606-616.
- Miller SA, Dykes DD and Polesky HF, 1988, A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucleic Acids Research*, 16, 1215
- Mills KHG., 2004. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nature Reviews Immunology*, 4:841-855.
- Montoya JG and Liesenfeld O, 2004. Toxoplasmosis. *The Lancet* 363, 1965-1976

- Mordue D.G., Monroy F., La Regina M., Dinarello Ch.A., Sibley L.D., 2001. Acute Toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *Journal Immunology* 167, 4574-4584.
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F and Riccardi C, A rapid and simple method for measuring thymocytes apoptosis propidium iodide staining and flow cytometry, *J Immunol Methods* 1991;139:271-279
- Nguyen T.D., Bigaignon G., Markine-Goriaynoff D., Heremans H., Nguyen T.N., Warnier G., Delmee M., Warny M., Wolf S.F., Uyttenhove C., Van Snick J., Coutelier J.P., 2003. Virulent *Toxoplasma gondii* strain RH promotes T-cell-independent overproduction of proinflammatory cytokines IL-12 and γ -interferon. *Journal of Medical Microbiology* 52, 869-876.
- Pearse G., 2006. Normal structure, function and histology of the thymus. *Toxicologic Pathology* 34, 504-514.
- Petersen E, 2007. Toxoplasmosis. *Seminars in Fetal & neonatal Medicine*, 12 214-223.
- Petrova A., Mehta R., 2007. Dysfunction of innate immunity and associated pathology in neonates. *Indian Journal of Pediatrics* 74, 185-191.
- Roberts CW and Alexander J, 1992. Studies on a murine model of congenital toxoplasmosis: vertical disease transmission only occurs in BALB/c mice infected for the first time during pregnancy. *Parasitology* 104, 19-23
- Rorman E, Steim Zamir Ch, Rilkis I and Ben-David H, 2006, Congenital toxoplasmosis-prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. *Reproductive Toxocology* 21, 458-472.
- Saeij JP, Boyle JP and Boothroyd JC, 2005. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitology* 21, 476-478
- Sainz RM, Mayo JC, Reiter RJ. Tan DX and Rodriguez C. 2003. Apoptosis in primary lymphoid organs with aging. *Microscopy research and technique* 62, 524-539.

- Sanderson, J.H.; Philips, C.E. 1981, An atlas of laboratory animal hematology. New York: Oxford University Press; p. 88-125
- Savino W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. Plogs Pathogens 2006; 2:472-483
- Savino W, Dardenne M, Velloso LA and Silva SD. The thymus is a common target in malnutrition and infection. Br J Nutr 2007 98 Suppl. 1:S11-S16
- Seymour R., Sundberg JP. And HogenEsch H. 2006. Abnormal Lymphoid organ development in immunodeficient mutant mice. Veterinary Pathology 43, 401-423.
- Shen D.F., Matteson D.M., Tuailon N., Suedekum B.K., Buggage R.R., Chan Chi-Chao., 2001. Involvement of apoptosis and interferon- γ in murine toxoplasmosis. Investigative Ophthalmology & Visual Science 42, 2031-2036
- Shiono Y, Mun HS, He N, Nakasaki Y, Fang H, Furuya M, Aosai F and Yano A, Maternal-fetal transmission of *Toxoplasma gondii* in interferon- γ deficient pregnant mice, Parasitol Int. 2007; 56:141-148
- Stahl W, Sekiguchi M and Kaneda Y. 2004. Multiple organ dysfunction in congenital murine toxoplasmosis. Tokai Journal of Experimental & Clinical Medicine 29, 53-63.
- Suto A., Nakajima H, Ikeda K., Kubo S., Nakayama T., Taniguchi M., Saito Y., and Iwamoto I. 2002. CD4+CD25+ T cell development is regulated by at least 2 distinct mechanisms. Blood 99, 555-560.
- Tada T. Widayati DT and Fukuta K. 2006. Morphological study of transition of haematopoietic sites in the developing mouse during the perinatal period. Anatomy Histology Embriology 35, 235-240.
- Travlos GS. 2006. Histopathology of bone marrow. Toxicologic Pathology.; 34:566-598
- Telford WG, King LE and Fraker PJ, 1994 Rapid quantitation of apoptosis in pure and heterogeneous cell populations using flow cytometry, Journal of Immunology Methods;172:1-

- Tenter AM, Heckerroth AR and Weiss LM. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. International Journal for Parasitology 30, 1217-1258.
- Vela-Amieva M, Cañedo-Solares I, Gutiérrez-Castrellon P, Pérez-Andrade M, González-Contreras C, Ortiz-Cortes J, Ortega-Velásquez V, Galván-Ramírez ML, Ruiz-García M, Saltigeral-Simentel P, Ordaz-Favila JC, Sánchez C y Correa D. 2005. "Short report: Neonatal screening pilot study of *Toxoplasma gondii* congenital infection in México", American Journal Tropical Med Hyg, 72:142-144,
- Verinaud L, de Souza PC and Nieto V. Thymic atrophy in infectious diseases. Braz J Morphol Sci 2004; 21:111-116
- Xu G., Shi Y., 2007. Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. Cell Research 17, 759-771
- Zenclussen A.C., Blois S., Stump R., Olmos S., Arias K., Borel I.M., Roux E., Margini RA, 2003. Murine abortion is associated with enhanced interleukin-6 levels at the feto-maternal interface. Cytokine 24, 150-160
- www.javeriana.edu.co
- www.brown.edu/
- www.embryology.ch
-

VIII ANEXO

Aislamiento de timocitos y esplenocitos.

Reactivos y soluciones

- Medio RPMI 1640 suplementado: el medio contiene una concentración final de 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-Glutamina, 0.5% de aminoácidos no esenciales, 0.5% de piruvato de sodio, penicilina 200U/mL y estreptomycin 100 µg/mL.
- Solución de lisis: 0.8 mM EDTA, 15 mM NH₄Cl, 0.1mM NaHCO₃, pH 7.4
- Azul tripano al 0.4%

Cuantificación de las células apoptóticas mediante la técnica del pico sub G₀

Reactivos y soluciones

- Medio RPMI 1640 suplementado
- Solución concentrada 10x de PBS.

NaCl 80 g

KH₂PO₄ 2 g

Na₂HPO₄ 29 g

KCl 2 g

Se disolvieron en 900 mL de agua destilada, se ajusto el pH a 7.4 y se aforo a 1000 mL.

Se esterilizo durante 15 minutos a 15 lb de presión.

- Regulador de permeabilización: 0.2 M NaH₂PO₄ y 0.1M Ácido cítrico
- Amortiguador de tinción: Ioduro de propidio 1 mg/mL y RNAsa H 0.73 mg

Estudio histológico del timo y el bazo.

Reactivos y soluciones

- Solución de formaldehído amortiguado al 10%

| | |
|----------------------------------|--------|
| NaH ₂ PO ₄ | 3.5 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 6.5 g |
| Formol al 40% | 100 mL |

Se disolvieron en 900 mL de agua destilada, se almacenó a temperatura ambiente.

- Alcohol-ácido: se mezcló 1 mL de HCl concentrado en 100 mL de Alcohol al 70%
- Solución de Eosina: se pesó 1 g y se disolvió en 100 mL de alcohol al 96%
- Solución de Hematoxilina de Harris

| | |
|--------------------------|--------|
| Hematoxilina | 1 g |
| Alumbre de potasio | 20 g |
| Óxido mercúrico | 0.5 g |
| Alcohol etílico absoluto | 10 mL |
| Agua destilada | 200 mL |

Se disolvió la hematoxilina en el alcohol y el alumbre en agua caliente; se mezclaron ambas soluciones. Se llevó la mezcla a ebullición y se agregó rápidamente el óxido mercúrico. Cuando la mezcla tomó un color rojo púrpura se retiró del fuego. Se filtró antes de usar.

- Técnica para desparafinar
 - Xilol 10 min
 - Alcohol absoluto-xilol 5 min
 - Alcohol absoluto 3 min
 - Alcohol al 96% 3 min
 - Alcohol al 70% 3 min
 - Agua destilada 5 min

- Tinción con hematoxilina-eosina

Esta técnica de tinción comprende el siguiente proceso:

- Hematoxilina de Harris durante 5 minutos.
- Lavado con agua corriente.
- Diferenciación con alcohol-ácido.
- Lavado con agua corriente.

- Inmersión en agua amoniacal.
- Lavado con agua corriente (10-20 minutos).
- Tinción con eosina a temperatura ambiente.
- Inmersión en alcohol al 95 % para eliminar el exceso de eosina.
- Deshidratación y montaje.

Evaluación de la distribución de las poblaciones celulares en la médula ósea.

Reactivos y soluciones

- Solución de Giemsa-Wright: Colorante Wright: 1 g de polvo de Wright + 600 mL de alcohol metílico absoluto calentado a 56 grados hasta la disolución completa del colorante. Dejar enfriar.
- Tinción de Giemsa-Wright: las extensiones de Médula ósea se secaron al aire y se cubrieron con el colorante de Giemsa-Wright. Se añadió a la tinción una solución de amortiguadora se mezcló cuidadosamente, se tiñeron durante 45 min. Posteriormente se lavaron con agua y se secaron al aire.

Cuenta diferencial de sangre periférica.

Reactivos y soluciones

- Solución de Giemsa-Wright: Colorante Wright: 1 g de polvo de Wright + 600 mL de alcohol metílico absoluto calentado a 56 grados hasta la disolución completa del colorante. Dejar enfriar.
- Tinción de Giemsa-Wright: los frotis sanguíneos se secaron al aire y se cubrieron con el colorante de Giemsa-Wright. Se añadió a la tinción una solución de amortiguadora se mezcló cuidadosamente, se tiñeron durante 7 min. Posteriormente se lavaron con agua y se secaron al aire.

Detección de *Toxoplasma gondii* por la técnica de PCR

Reactivos y soluciones

- Solución de TE (Tris-EDTA)

Tris 1 M pH 7.4 10 mL

EDTA 0.5 M pH 8.0 2 mL

Mezclar y llevar a 1000 mL de agua destilada

- Solución de lisis y precipitación (NaCl 1.2 M) son proporcionadas por el kit comercial
- Alcohol etílico al 70%
- Solución de TBE 10x

Tris-base 108 g

Ácido bórico 55 g

EDTA 0.5M pH 8.0 40 mL

Disolver en 1000 mL de agua destilada, almacenar a temperatura ambiente.

- Agarosa 1%: agregar 1 g de agarosa a 99 mL de TBE 1x
- Bromuro de etidio 5 μ g/mL: disolver 1.25 mg de bromuro de etidio en 250 mL de agua, colocarlos en un recipiente ámbar y preservarlo a temperatura ambiente.