



Universidad Nacional
Federico Villarreal

Vicerrectorado de
INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

DETECCIÓN Y COMPORTAMIENTO DE *Toxoplasma gondii* ME49
EN UN MODELO ANIMAL SOMETIDO A DISTINTOS PROTOCOLOS DE
INMUNOSUPRESIÓN

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

Autor:

Diestra Calderón, Andrea Jackeline

Asesor:

Blga. Sáez Flores, Gloria

Jurados:

Dr. Iannacone Oliver, José A.

Mg. Velarde Vílchez, Mónica M.

Mg. Murrugarra Bringas Victoria Y.

Lima –Perú

2019

DEDICATORIA

A Dios, a mis padres, en especial a mi madre por su apoyo y su confianza en mis habilidades, a mis mentores y a todos aquellos que de alguna manera tuvieron que ver en mi desarrollo personal y profesional

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por apoyarme en la decisión de estudiar biología, a mi madre que siempre estuvo ahí, a mi alma máter, profesores y mentores por sus enseñanzas, a mis asesores por la oportunidad de desarrollar mi tema de tesis en sus instalaciones, por guiarme en el camino y permitirme ser parte de un gran equipo de investigación.

INDICE

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN | 6 |
| ABSTRACT | 7 |
| | |
| I. INTRODUCCIÓN | 8 |
| 1.1 Descripción y formulación del problema..... | 9 |
| 1.1.1 Descripción del problema | 9 |
| 1.1.2 Formulación del problema | 10 |
| 1.2 Antecedentes | 10 |
| 1.3 Objetivos..... | 11 |
| - Objetivo general | 11 |
| - Objetivos específicos..... | 11 |
| 1.4 Justificación | 12 |
| 1.5 Hipótesis..... | 13 |
| | |
| II. MARCO TEÓRICO | 14 |
| 2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación | 14 |
| 2.1.1 Taxonomía de <i>T.gondii</i> | 14 |
| 2.1.2 Morfología del parásito..... | 14 |
| 2.1.3 Ciclo biológico | 19 |
| 2.1.4 Genotipos de <i>Toxoplasma gondii</i> | 20 |
| 2.1.5 Vías de transmisión | 22 |
| 2.1.6 Patogenia y respuesta inmune | 23 |
| 2.1.7 Inmunosupresores | 25 |
| 2.1.8 Interconversión Bradizoito- Taquizoito | 26 |
| 2.1.9 PCR en tiempo real | 27 |
| 2.1.10 REP 529 | 28 |
| | |
| III. MÉTODO | 29 |
| 3.1 Tipo de investigación | 29 |
| 3.2 Ámbito temporal y espacial | 29 |
| 3.3 Variables..... | 29 |
| 3.4 Población y muestra | 30 |

| | |
|---|-----------|
| 3.5 Instrumentos | 30 |
| 3.6 Procedimientos | 31 |
| 3.6.1 Obtención de un modelo animal infectado con <i>T.gondii</i> ME49 | 31 |
| 3.6.2 Inmunosupresión | 31 |
| 3.6.3 Colecta de muestra | 31 |
| 3.6.4 Purificación de ADN..... | 32 |
| 3.6.5 Curva de calibración | 32 |
| 3.6.6 PCR en Tiempo Real | 33 |
| 3.7 Análisis de resultados..... | 34 |
| | |
| IV. RESULTADOS | 35 |
| 4.1 Curva de calibración | 35 |
| 4.2 PCR en Tiempo Real | 37 |
| | |
| V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS..... | 40 |
| 5.1 Obtener el modelo animal con el inóculo adecuado con quistes de la cepa ME49..... | 40 |
| 5.2 Evaluar dos protocolos de inmunosupresión en el modelo animal murino infectado con <i>Toxoplasma gondii</i> | 40 |
| 5.3 Detección de <i>T.gondii</i> en fluidos corporales mediante PCR en Tiempo Real | 41 |
| 5.3.1 Tejido..... | 41 |
| 5.3.2 Coágulo sanguíneo..... | 42 |
| | |
| VI. CONCLUSIONES..... | 44 |
| VII. RECOMENDACIONES | 45 |
| VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 46 |
| IX. ANEXOS | 50 |

RESUMEN

Toxoplasmosis es una enfermedad predominantemente crónica y asintomática causada por *Toxoplasma gondii*; un parásito que puede permanecer de por vida en los tejidos del hospedero, constituyendo una enfermedad crónica y asintomática. Al estar frente a un evento de inmunosupresión, esta fase crónica se reactiva en una fase aguda de replicación activa en donde el parásito migra por los fluidos corporales hacia otros tejidos, llegando a ser una co-infección mortal. Los métodos para la detección eficaz de *T. gondii* en fluidos corporales necesitan ser estandarizados y probados en modelos in vivo de Toxoplasmosis reactivada, para lo cual, se desarrolló un protocolo de inmunosupresión en un modelo murino con la finalidad de detectar *T. gondii* cepa ME49 (Tipo II) en sangre, como comprobante de reactivación parasitaria. Se utilizaron 3 grupos de ratones, Grupo A: 10 ratones ME49 e inmunosuprimidos con ciclofosfamida (125 mg/k durante 7 días continuos), Grupo B: 10 ratones ME49 inmunosuprimidos con Dexametasona (70 mg/kg), Grupo C: 10 ratones inmunosuprimidos (5 con ciclofosfamida 125 mg/k y 5 con Dexametasona 70 mg/k). Con el uso de Ciclofosfamida como inmunosupresor se observan valores de CT (ciclo threshold) promedio de 24,2 en cerebro y 36 en sangre por PCR Tiempo Real (qPCR), en comparación con el uso de Dexametasona como inmunosupresor, en donde se observan valores de CT promedio de 18,3 en cerebro sin tener resultados en sangre por qPCR. Se concluye que el Protocolo A, usando Ciclofosfamida como inmunosupresor resulta más efectivo y que con la técnica de PCR en tiempo Real se detectó *T.gondii* de manera específica y también sensible.

Palabras clave: *Toxoplasma gondii*, inmunosupresión, qPCR

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a predominantly chronic and asymptomatic disease caused by *Toxoplasma gondii*; a parasite that can remain for life in host tissues, constituting a chronic and asymptomatic disease. When faced with an immunosuppression event, this chronic phase is reactivated in an acute phase of active replication where the parasite migrates through body fluids to other tissues, becoming a deadly co-infection. The methods for the effective detection of *T. gondii* in body fluids need to be standardized and tested in in vivo models of reactivated toxoplasmosis, for which, an immunosuppression protocol was developed in a murine model in order to detect *T. gondii* strain ME49 (Type II) in blood, as proof of parasitic reactivation. 3 groups of mice were used, Group A: 10 ME49 mice and immunosuppressed with cyclophosphamide (125 mg / k for 7 continuous days), Group B: 10 ME49 mice immunosuppressed with Dexamethasone (70 mg / kg), Group C: 10 immunosuppressed mice (5 with cyclophosphamide 125 mg / k and 5 with Dexamethasone 70 mg / k). With the use of Cyclophosphamide as an immunosuppressant, average CT (cycle threshold) values of 24.2 in the brain and 36 in blood are observed by Real Time PCR (qPCR), compared with the use of Dexamethasone as an immunosuppressant, where values are observed of average CT of 18.3 in the brain without results in blood by qPCR. It is concluded that Protocol A, using Cyclophosphamide as an immunosuppressant is more effective and that with the Real-time PCR technique *T. gondii* was detected specifically and also sensitively.

Key words: *Toxoplasma gondii*, immunosuppression, qPCR

I. INTRODUCCIÓN

La Toxoplasmosis es una enfermedad producida por el agente parasitario intracelular *Toxoplasma gondii*, es declarada como “oportunista” porque en la mayoría de las veces se mantiene en un estado latente o asintomático en la mayoría de la población, sin embargo, cuando los individuos son expuestos a inmunosupresión, ocasionan la reactivación de esta enfermedad, pasando de una etapa latente o crónica a una etapa aguda llegando a ser mortal. Los métodos para la detección de *Toxoplasma gondii* en fluidos corporales no han tenido éxito en su totalidad debido al mecanismo de acción del parásito en el hospedero intermediario. En una primera estancia el parásito invade los fluidos corporales para la diseminación hacia las células, esta etapa llamada aguda es muy breve, con una duración aproximada de 48 horas post infección y no es posible captar todos los casos a tiempo (Paugam et al., 1995). Después estos taquizoítos pasan a ser bradizoítos y forman quistes tisulares, es cuando hablamos de una etapa crónica en donde el parásito ya no puede ser detectado en fluidos corporales mediante técnicas de laboratorio. Por este motivo, para optimizar la detección del parásito en fase aguda, son necesarias nuevas técnicas considerando las bajas cargas parasitarias presentes en los fluidos corporales y la falta de una técnica gold standard para el diagnóstico de Toxoplasmosis. En el siguiente estudio se propone un modelo murino experimental para comprobar si una infección crónica por *T.gondii* puede reactivarse a una etapa aguda sometiendo a estos animales a dos protocolos de inmunosupresión y se pondrá a prueba una técnica de biología molecular que podría ser utilizada como una herramienta útil para la detección de *Toxoplasma gondii*.

1.1 Descripción y formulación del problema

1.1.1 Descripción del problema

La Toxoplasmosis es una enfermedad que puede permanecer latente y asintomática de por vida en la mayoría de los casos debido a que *T.gondii* es un parásito intracelular, sin embargo, cuando el hospedero se encuentra en un proceso de inmunosupresión, por ejemplo, cuando cursa por una enfermedad o evento que deprime al sistema inmunológico, representa un riesgo para la salud que podría llegar a ser mortal, es en este momento en que la enfermedad se reactiva en una etapa aguda, donde los taquizoítos de *T.gondii* entran en una etapa multiplicativa e invaden otras células, éste evento hace que estén presentes incluso en los fluidos corporales.

Se ha considerado a los fluidos corporales como un tipo de muestra menos invasiva, sin embargo, los métodos para la detección del parásito en fluidos corporales no han tenido éxito en su totalidad debido al mecanismo de acción de *Toxoplasma gondii* en el hospedero intermediario, también al tipo de cepa y el tropismo que presenta hacia ciertos órganos diana, son estos factores los que determinan también la mortalidad de una infección por *T.gondii*.

Los eventos de inmunosupresión propician la migración del parásito desde los tejidos hacia los fluidos corporales como la sangre periférica, sin embargo, la carga parasitaria por lo general es baja, por este motivo, tanto las técnicas de purificación como las técnicas de detección necesitan ser estandarizadas y optimizadas, potenciando la sensibilidad para detectar la menor carga de parásito de una manera óptima y eficaz.

1.1.2 Formulación del problema

¿Cómo es posible detectar *Toxoplasma gondii* en organismos que pasan por una fase reactivada de Toxoplasmosis?

1.2 Antecedentes

El estudio de la Toxoplasmosis ha tenido amplio desarrollo en la observación de cambios histopatológicos y en la detección de anticuerpos. Pruebas serológicas han sido ya estandarizadas y son practicadas en varios centros de diagnóstico a nivel nacional. Los métodos serológicos tradicionales se basan en la detección y cuantificación de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii*, agente parasitario causante de la Toxoplasmosis, la presencia de anticuerpos ante este parásito es indicativo de la exposición al agente causal pero, en muchos casos, no diferencia entre un proceso actual o pasado (Foroghi et al., 2008). En individuos inmunosuprimidos la producción de anticuerpos está afectada, y por lo tanto, éstos no podrán detectarse de manera confiable. A lo anterior se agrega el hecho que los agentes patógenos pueden causar la inmunosupresión como uno de los mecanismos para evadir la respuesta inmune del huésped. Se han experimentado con diversos tipos de muestra para mejorar la detección del parásito en fluidos corporales, con el fin de hacer el diagnóstico más óptimo y menos invasivo.

Estudios han revelado la preferencia de *Toxoplasma gondii* por el tejido, desarrollando una larga etapa crónica y una etapa aguda muy breve. Para simular los eventos de inmunosupresión en un modelo animal se

han probado varios tipos de fármacos en altas dosis (Jeklova et al., 2008) haciendo que cumplan función inmunosupresora.

Toxoplasma gondii tiene como órgano diana al cerebro, pero puede migrar y afectar a otros órganos y fluidos corporales dependiendo del estado en el que se encuentre el hospedero y del genotipo de *Toxoplasma* en cuestión.

Las técnicas moleculares poseen especificidad y sensibilidad en el diagnóstico de diversas enfermedades, el uso de qPCR ha sido estandarizando para Toxoplasmosis (Wahab et al., 2010), sin embargo hay aspectos que considerar: El tipo de muestra, la secuencia blanco a detectar y la condición del paciente o individuo animal a tratar. Actualmente existen estudios que comprueban la especificidad y sensibilidad del qPCR para detectar *T.gondii* (Belaz et al., 2015) (Homan et al., 2000), destacando al gen REP 529, que permite detectar concentraciones más bajas de parásito, debido a que es altamente conservado y repetitivo en el genoma de *T.gondii*.

1.3 Objetivos

- **Objetivo General:** Detectar *Toxoplasma gondii* en fase aguda y evaluar su comportamiento en un modelo animal sometido a inmunosupresión aplicando técnicas moleculares.
- **Objetivos Específicos:**
 - a) Obtener el modelo animal con quistes de la cepa ME49.
 - b) Evaluar dos protocolos de inmunosupresión en el modelo animal murino infectado con *Toxoplasma gondii*.
 - c) Evaluar qPCR para la detección de *T.gondii* en sangre periférica y tejido.

1.4 Justificación

La Toxoplasmosis es una enfermedad con una alta tasa de exposición (40-95%) en el Perú (data no publicada, grupo de investigación Toxoplasmosis), esta condición sugiere que es un parásito que está presente en nuestro entorno y que puede afectar a un porcentaje de nuestra población. Por lo general, nuestro sistema inmune es capaz de bloquear la acción de este parásito, evitando su replicación masiva, generando anticuerpos que pasan a ser parte de las defensas de nuestro organismo, sin embargo, cuando el organismo está expuesto a eventos de inmunosupresión se propicia la migración de parásitos, a este evento lo llamamos reactivación, en donde al estar en una fase replicativa, necesita hacer uso de los fluidos corporales para su transporte a nuevas células.

No se ha descrito con certeza en qué momento una fase crónica de Toxoplasmosis pasa a ser una fase aguda debido a un evento de inmunosupresión activa, y si esto en realidad sucede en aquellos pacientes en los cuales se presenta esta enfermedad. Por este motivo, en este estudio se utilizará un modelo animal hospedero intermediario, así como lo es el humano, para evaluar el proceso de cambio de fases producto de una inmunosupresión inducida, haciendo posible la migración del parásito a los fluidos corporales y detectándolos por técnicas moleculares como método de diagnóstico. El aporte de este trabajo es comparar dos métodos de inmunosupresión, con la finalidad de elegir aquel que nos permita detectar *T. gondii* en sangre periférica mediante la técnica de PCR en Tiempo real, lo cual nos permitirá también conocer el comportamiento de la cepa ME49 ante un evento de inmunosupresión activa.

1.5 Hipótesis

H₀: No es posible detectar *Toxoplasma gondii* ME 49 en un modelo animal sometido a distintos protocolos de inmunosupresión, de manera que no se pueden establecer ciertos patrones en su comportamiento.

H_a: Es posible detectar *Toxoplasma gondii* ME 49 en un modelo animal sometido a distintos protocolos de inmunosupresión, de manera que se pueden establecer ciertos patrones en su comportamiento.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación

2.1.1 Taxonomía de *T.gondii*

Toxoplasma gondii se incluye dentro del Phylum Apicomplexa, Clase Sporozoea, Subclase Coccidia, Orden Eucoccidida, Suborden Eimeriina, Familia Sarcocystidae y Subfamilia Toxoplasmatinae (Petersen & Dubey, 2005), fue descrito por primera vez por Nicolle & Manceaux, quienes en 1908 aislaron este protozoo de células mononucleares del bazo e hígado de un roedor africano (*Ctenodactylus gundi*). En un principio fue considerado como una especie de *Leishmania*, pero un año después, tras mayores estudios, se concluyó que se trataba de una nueva especie y la denominaron *T. gondii* por su forma arqueada (del griego toxon = arcos) y por el nombre vulgar del roedor en el que fue hallado, “El Gondi” (Nicolle et al., 1909). Este protozoo parasita a numerosas especies acuáticas y terrestres, fundamentalmente a mamíferos y aves; sin embargo, los felinos son los únicos hospederos de la forma sexuada del parásito y productores de ooquistes, por lo que su presencia es esencial en su ciclo biológico (Jones & Dubey, 2010).

2.1.2 Morfología del parásito

Existen tres tipos de estados morfológicos de *Toxoplasma gondii*: taquizoítos (estadío de multiplicación rápida), bradizoítos (en quistes tisulares y de multiplicación lenta), y ooquistes (en ooquistes esporulados como forma resistente al medio ambiente), los cuales están involucrados en un ciclo de vida complejo.

Taquizoíto

El taquizoíto es la forma de *Toxoplasma* más estudiada debido a la facilidad para mantenerse en cultivo celular y en un modelo murino. Corresponde a la forma asexual infectiva altamente invasiva y de diseminación tisular. Tiene una apariencia de arco o media luna con un tamaño de 3 x 7 μm y con una distribución polarizada de sus organelos citoplásmicos, de tal forma que se identifica un extremo apical y un extremo posterior. Está rodeado por un complejo de tres membranas (membrana plasmática y el complejo membranal interno) conocido como películo. Posee un núcleo, una única mitocondria que tiene la característica de convolucionar (compuesta de dos estructuras que cumplen una función en conjunto) dentro del citoplasma del taquizoíto y alrededor del núcleo, aparato de Golgi y retículo endoplásmico. En la región apical se encuentran organelos relacionados con la motilidad, la secreción y la invasión celular, como son: el conoide (un organelo retráctil conformado al menos por α tubulina y que es activado durante la invasión), el anillo polar anterior, las roptrías, los micronemos y los gránulos densos. De mecanismo intracelular, se multiplica utilizando un proceso llamado endodiogenia (Goldman et al., 1958), que culmina con la lisis de la célula parasitada, expulsando así taquizoitos al exterior o formando quistes (Dubey et al., 1998).

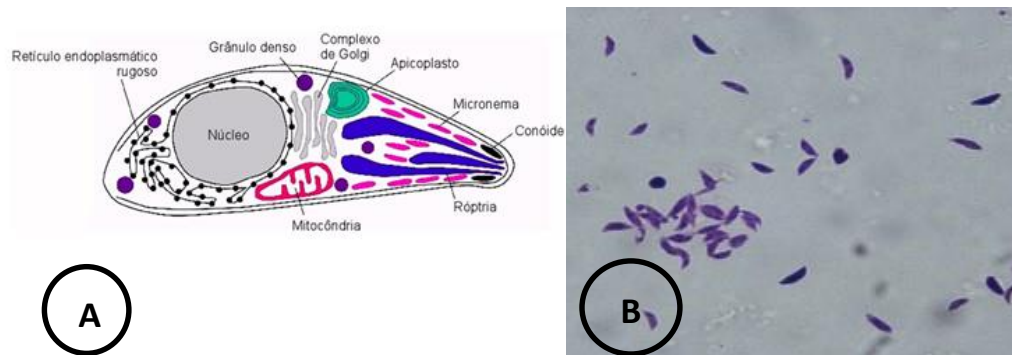


Fig 1: A. Ultraestructura de taquizoíta. Cambridge University Press, Expert Reviewers in Molecular Medicine, 2001. **B.** Taquizoitos en coloración HE (40x). Atlas de Parasitología (Toxoplasma), MEDCUBlog, 2016.

Bradizoíta

La estructura del bradizoíta difiere levemente del taquizoíta; sin embargo, a diferencia del esporozoíta y del taquizoíta, este carece de lípidos y el número de roptrias tanto como de gránulos densos es inferior, mientras que el número de micronemas y gránulos de amilopectina es superior. Los bradizoítos son más delgados, tienen un núcleo posterior y son menos susceptibles a la destrucción por enzimas proteolíticas, son de reproducción lenta (Dubey et al., 1998), y en ocasiones pueden reconvertirse en taquizoítos (Skariah et al., 2010).

Quiste tisular

También llamados cistozoítos, forma latente de *Toxoplasma gondii*, contienen en su interior a los bradizoítos. Los quistes pequeños (jóvenes) miden 5 μm de diámetro y contienen sólo dos bradizoítos, y los quistes grandes (viejos) contienen una gran cantidad de bradizoítos en su interior. Su morfología en el cerebro es esférica,

de hasta 70 μm de diámetro, mientras que en los intramusculares es elongado y de hasta 100 μm de largo (Dubey et al., 1998).

Los quistes tisulares pueden desarrollarse en las vísceras, incluyendo pulmones, hígado y riñones, siendo aún más prevalentes en tejidos neurales y musculares como: cerebro, ojos, músculos cardíacos y esqueléticos. La pared elástica y delgada encierra cientos de bradizoítos con forma de media luna, cada uno de aproximadamente 7 x 1,5 μm de tamaño (Jones & Dubey, 2010).

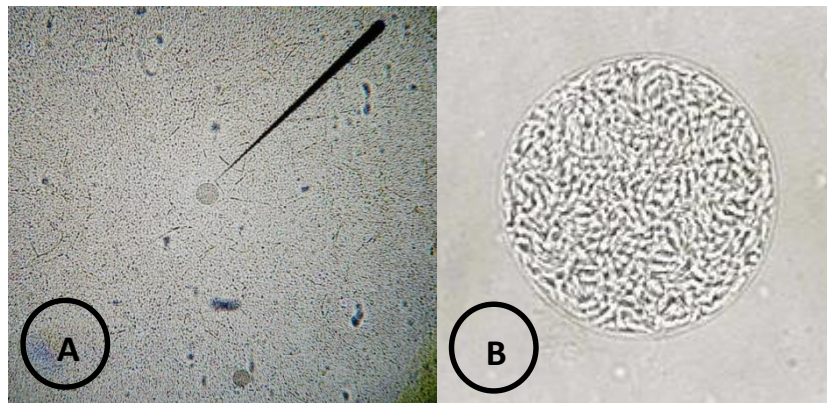


Fig 2: **A.** Quiste tisular de *Toxoplasma gondii* en cerebro de ratón (40x), **B.** Bradizoitos de *T.gondii* dentro del quiste tisular (40x - vista aumentada). Wikipedia Enciclopedia libre (*Toxoplasma gondii*), 2018.

Ooquiste y esporozoíto

Los ooquistes sin esporular son subsféricos a esféricos y miden de 10 a 12 μm de diámetro, mientras que los esporulados son subsféricos a elipsoidales y miden de 11 a 13 μm de diámetro. Cada

ooquiste esporulado contiene dos esporoquistes elipsoidales de 6 a 8 μm y cada uno de estos contiene cuatro esporozoítos en su interior. Los esporozoítos miden 2 x 6-8 μm con un núcleo subterminal y presentan abundantes micronemas, roptrias, gránulos de amilopectina y lípidos. El número de lípidos es superior al presente en los taquizoítos y bradizoítos (Jones & Dubey, 2010).

Son excretados en un período de una a tres semanas con las heces de los felinos que padecen la infección aguda, en primera instancia son inmaduros, no esporulados y en condiciones favorables del medio ambiente alcanzan su estado infectivo al día siguiente o durante los cinco días posteriores. Cada ooquiste esporulado, contiene dos esporoquistes y cuatro esporozoítos. Pueden permanecer viables en el suelo durante un año o más. (Pereira et al., 2010) y se inactivan a temperaturas superiores a 66°C en menos de 10 minutos.

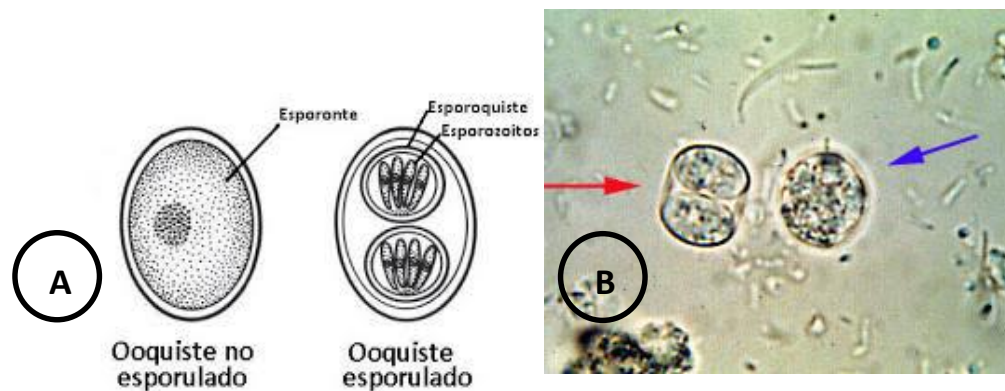


Fig 3: A. Diferencias entre ooquiste esporulado y no esporulado de *Toxoplasma gondii*, Adaptado de Dubey, 2010. **B.** Ooquiste esporulado (flecha roja) y no esporulado (flecha azul) en heces de gato (40x). VPTH 603 Veterinary Parasitology, Dr.Thomas Nolan, 2008

2.1.3 Ciclo Biológico

El ciclo biológico comprende tres fases: la enteroepitelial (en hospederos definitivos), la extraintestinal (en hospederos intermediarios y definitivos) y la esporogónica, que ocurre en el medio ambiente (Dubey, 2010).

Después de la ingestión de ooquistes esporulados (presentes en el agua, en la vegetación) o quistes tisulares por los hospederos definitivos, como el gato doméstico (*Felis domesticus*), la pared de éstos es disuelta por las enzimas proteolíticas durante la digestión. Los esporozoítos y bradizoítos son liberados y penetran el epitelio intestinal, donde desarrollan numerosas generaciones en los cinco tipos o estadios asexuales de la fase enteroepitelial. El ciclo sexual (gametogonia) se inicia dos días después de la ingestión de los quistes y los merozoítos inician la formación de los gametos de 3 a 15 días de la infección. Los microgametos masculinos penetran los macrogametos femeninos para formar los cigotos, los que más tarde se transforman en ooquistes y salen al lumen intestinal y al ambiente con las heces del felino (Dubey, 2010). En el exterior los ooquistes esporulan al cabo de 1 a 5 días.

En la fase extraintestinal, tanto de hospederos definitivos como intermediarios, estas formas infectivas llegan simultáneamente a la lámina propia del intestino, multiplicándose en el endotelio vascular, fibroblastos, células mononucleares y leucocitos segmentados, y como resultado se forman los taquizoítos, y a partir de éstos los bradizoítos. Estos últimos permanecen dentro de quistes.

Los ooquistes esporulados, los quistes o pseudoquistes también pueden ser ingeridos por un hospedador intermediario (mamíferos y

aves); en este caso el parásito migra, a través de la circulación sanguínea, del intestino a otros órganos y tejidos del hospedador, quedando encerrado en una célula conocida como pseudoquiste, donde el parásito se multiplica y se libera infectando nuevas células; con el tiempo el pseudoquiste puede calcificarse y formar un quiste de hasta 100 micras de tamaño (Fig.4)

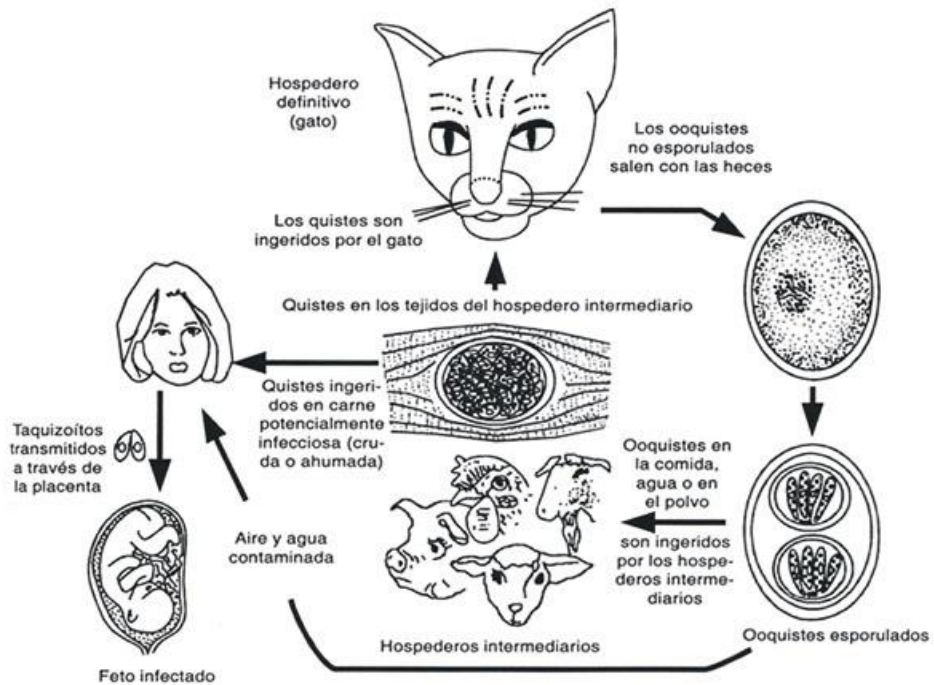


Fig 4. Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*. Adaptado de Dubey 2010.

2.1.4 Genotipos de *Toxoplasma gondii*

Tradicionalmente se conoce la existencia de 3 linajes de *T. gondii* (I, II y III) en Norteamérica y Europa, siendo más prevalente el genotipo II. En Sudamérica existen variantes y/o cepas atípicas que son las que predominan y que son diferentes a los 3 tipos mencionados

anteriormente. Esta diferencia es atribuída principalmente a factores epidemiológicos. En África se reportan los tipos II y III coexistiendo con cepas atípicas también (*África 1-3*). Los reportes de Asia no son escasos (Dardé et al., 2004), sin embargo se puede concluir que la diversidad más grande se encuentra en Sudamérica.

Actualmente existen 12 halogrupos (incluyendo los tipos I, II y III) y las cepas atípicas, los tipos I, II y III se han clasificado por su virulencia en el modelo murino.

El Tipo I es considerado letal, estudios en ratón atribuyen esta característica a un rasgo del locus en el cromosoma VII, el cual es responsable del 50% de virulencia en los microorganismos (Araujo et al., 1997), de replicación rápida *in vitro* y de difícil conversión a bradizoitos. La cepa RH es la cepa de referencia de este tipo en estudios *in vitro* e *in vivo*. Estudios de Toxoplasmosis en humanos revelan que este tipo es predominante en Toxoplasmosis Congénita.

El Tipo II, se ha encontrado mayormente reportado en casos de Toxoplasmosis Humana. Para los ratones, es una cepa no virulenta que forma quistes tisulares, principalmente en el cerebro, estos quistes contienen al parásito en su estado bradizoíto, sin embargo los quistes pueden estar en diversos tipos de tejido (corazón, hígado, pulmón y musculo esquelético), los que son frecuentemente afectados. La cepa ME49 es la cepa de referencia de este tipo usada en este estudio.

El Tipo III, es el tipo más heterogéneo, genotipo con distintos alelos, mayormente encontrado en animales salvajes, raramente encontrado en humanos. En ratones, es más virulento que el Tipo II pero menos virulento que el Tipo I (Dardé et al., 2004).

2.1.5 Vías de Transmisión

Debido al adaptable ciclo de vida y diferentes estadios que lo componen, *Toxoplasma gondii* es uno de los organismos invasores oportunistas cuya infección puede adquirirse de diferentes maneras, dependiendo del ambiente y condiciones en la que se desarrollan tanto el hospedero definitivo y el hospedero intermediario.

Una de las formas de infección más conocida es a través de ooquistes esporulados e infectivos provenientes de las heces de los gatos ya sea por el contacto en el ambiente o el consumo de alimentos contaminados con estos ooquistes, sin embargo ésta es la razón menos común por la cual se puede dar esta transmisión. El consumo de carnes con quistes tisulares es otro de las vías, ya que los quistes se mantienen en temperaturas de 20 a 80°C. Entre otras vías de transmisión encontramos a los trasplantes de órganos, transmisión congénita (abortos espontáneos en el primer trimestre de embarazo) y personal del laboratorio que están expuestos al desarrollar estudios en modelos *in vivo* (manejo de modelos animales experimentales) e *in vitro* (manejo de cultivos celulares) (Fig.5).

Por lo general la Toxoplasmosis es una enfermedad asintomática, esto se da muchas veces gracias a que el agente expuesto tiene un sistema inmune competente y es capaz de mantener la latencia en cierta forma, pero cuando hablamos de personas infectadas cuyo sistema inmune se ve comprometido y débil, *T. gondii* deja su estado de latencia, produciendo Toxoplasmosis, es así como este microorganismo es también llamado “parásito oportunista”

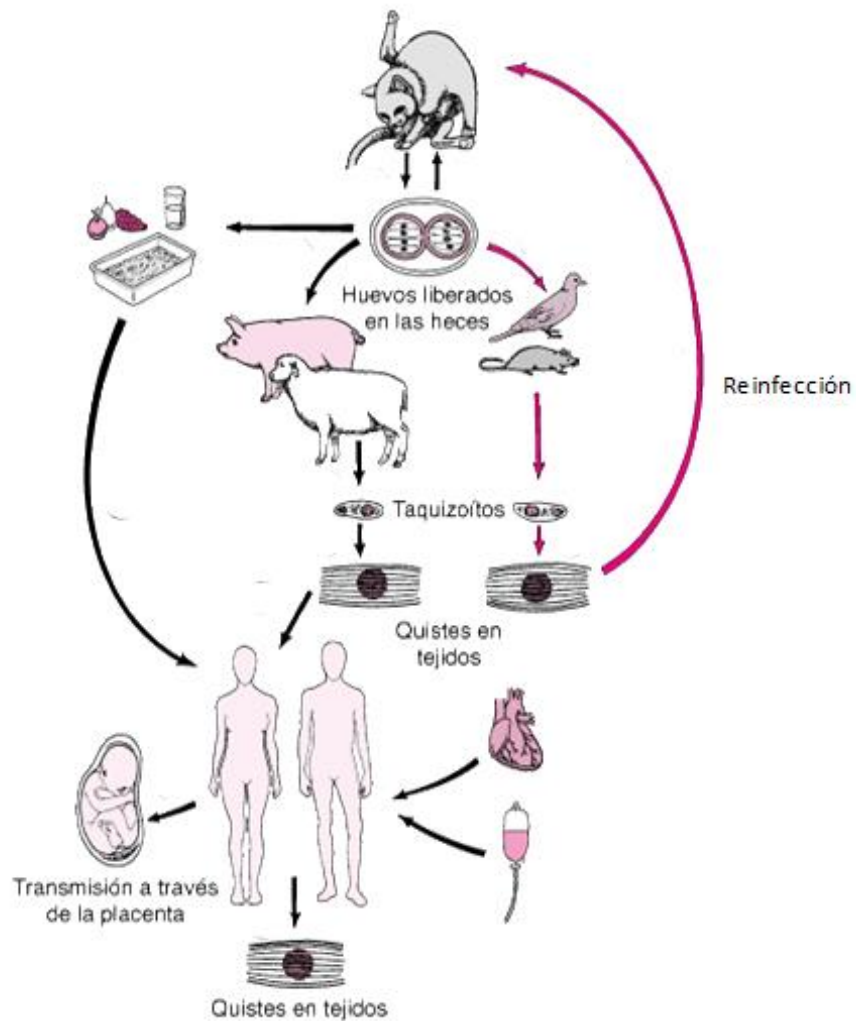


Fig 5.
de

transmisión de *Toxoplasma gondii*. Manual MSD, Merck Sharp & Dohme Corp.2018.

Vías

2.1.6 Patogenia y respuesta inmune

La penetración a la célula es un proceso en simultáneo de acción conjunta entre múltiples proteínas de *T. gondii*, que inicia con el reconocimiento de la célula hospedera mediada por la acción de las proteínas de superficie (SAG's), la secreción de productos del micronema (MIC's), roptrias (ROP's) y gránulos densos (GRA's) (Opitz & Soldati, 2002)(Sibley, 2003). Para la supervivencia dentro del medio

intracelular forma una vacuola parasitófora que no se acidifica y que no interviene con los procesos propios de la defensa inmune del hospedero, es así como *T. gondii* logra invadir. Cuando el número de taquizoítos en la vacuola es muy elevado, la célula se rompe, se produce necrosis celular (TNF) y una reacción inflamatoria (IFN γ , IL-12). Así, los parásitos se liberan al medio extracelular y ocurre la invasión a nuevas células, las que también serán destruidas, desencadenando así en simultáneo la infección de una manera exitosa.

La formación de quistes tisulares se lleva a cabo en órganos y tejidos en la primera semana de la infección (Ferguson & Dubremetz, 2007). Esta forma del parásito es responsable de la infección residual o latente y persiste en cerebro, músculo y ojo principalmente.

En un individuo inmunocompetente, la respuesta inmune es de tipo NK, Th1 y depende de CD4 auxiliares. IFN γ e IL-2 activan macrófagos. El IFN induce en los macrófagos la producción de TNF. La sinergia entre TNF e IFN γ en los macrófagos desencadena la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que provocan la muerte de los parásitos intracelulares, propiciando la conversión de taquizoítos a bradizoítos, los cuales se enquistan dando lugar a una infección latente y/o crónica (Melo et al., 2011).

En individuos con inmunodeficiencia, en la mayoría de los casos hay una reactivación de la infección crónica que provoca ruptura del quiste tisular, seguida por una proliferación incontrolada de *T. gondii* y destrucción tisular. Los linfocitos obtenidos de pacientes con VIH-SIDA tienen una producción alterada o disminuída de IFN γ e IL-2, elementos necesarios para el control de la infección.

2.1.7 Inmunosupresores

Fármacos como Dexametasona y Ciclofosfamida, ambos de naturalezas distintas, en ciertas dosis cumplen una función inmunosupresora, estudios previos basados en la reactivación de Toxoplasmosis Encefálica (TE) mencionan el uso de Dexametasona como un potente inmunosupresor, que, aplicado en la dosis y en la vía correcta, es capaz de favorecer la reactivación y la conversión de una etapa crónica (presencia de bradizoítos en quistes) a una etapa aguda (presencia de taquizoitos) (Selseleh et al., 2012).

La Dexametasona es un glucocorticoide utilizado comúnmente como antiinflamatorio y en ocasiones como inmunosupresor, este fármaco también es el que mejor acción ejerce sobre el sistema nervioso central, además de tener una reacción residual prolongada, que depende de la continuidad de la dosis aplicada al paciente. Como glucocorticoide, su mecanismo de acción es prevenir o suprimir la respuesta inmune e inflamatoria cuando se administran en dosis farmacológicas, estas moléculas cruzan fácilmente las membranas de las células y se unen a receptores citoplasmáticos induciendo la inhibición de la infiltración leucocitaria en el lugar de la inflamación, la interferencia con los mediadores de la inflamación y la supresión de respuestas inmunológicas.

La Ciclofosfamida es un fármaco alquilante antineoplásico que también tiene propiedades inmunosupresoras, su efecto residual hace que disminuya la respuesta inmune (inmunosupresión condicionada) (Ader & Cohen, 1975). Se ha comprobado en modelo animal como un fármaco utilizable para reactivación de enfermedades crónicas en modelo murino (Huyan et al., 2011). Este fármaco es inactivo *in vitro* y requiere ser activado por el sistema de enzimas microsomales hepáticas para

ser citotóxico, estas enzimas hepáticas convierten la ciclofosfamida en primer lugar a aldofosfamida y 4-hidroxiciclofosfamida, y luego a acroleína y fosforamida, dos potentes sustancias alquilantes del ADN. Al reaccionar con el ADN, los agentes alquilantes forman unos puentes que impiden la duplicación del mismo y provocan la muerte de la célula. La biodisponibilidad sistémica es de 97% para una dosis de 100 mg y de 74% para una dosis de 300 mg, alcanzando su punto máximo 2 a 3 horas después de su administración.

Debido al continuo uso de la Dexametasona en estudios de Toxoplasmosis, en este estudio se tomará como alternativa a otro candidato inmunosupresor: La Ciclofosfamida, ya que no sólo tiene un mecanismo diferente sino que también ha demostrado ser de utilidad para ser usada en modelos murinos (Bruzual & Finol, 2002).

2.1.8 Interconversión Bradizoíto – Taquizoíto

La reactivación de la etapa aguda de Toxoplasmosis, se da por medio de la interconversión de bradizoítos a taquizoítos, éste es un fenómeno fundamental ya que los taquizoítos son los encargados de la replicación invasiva.

En estudios *in vitro* se utilizan marcadores específicos, proteínas para bradizoíto (P36, P34, P21 y P18) y taquizoíto (P30), el proceso de ruptura del quiste tisular y liberación de bradizoífos ha demostrado la capacidad de éstos de infectar células fibroblastos formando vacuolas parasitóforas, siendo dentro de éstas donde se da la interconversión. La presencia de señal emitida por los marcadores específicos de bradizoítos persiste hasta las 58 horas post infección y es a las 58 horas

donde se evidencia la coexistencia de bradizoitos y taquizoitos dentro de la misma vacuola parasitófora (vacuola heterogénea), siendo a las 72 horas cuando los niveles de señal provenientes de los marcadores específicos a taquizoitos se incrementa y la de los bradizoitos desaparece (Soete et al., 1993).

2.1.9 PCR en tiempo real Cuantitativa (qPCR)

La PCR Cuantitativa (qPCR) es una técnica de diagnóstico molecular ampliamente utilizada en diversos estudios por su eficiencia y sensibilidad, siendo una variante de la PCR Convencional, esta técnica usa como adicional una sonda fluorescente sintetizada de manera específica afín a un par de iniciadores o cebadores (forward y reverse), cuya señal emitida puede ser captada y transmitida en tiempo real a través de un software que viene incorporado al termociclador. Los mecanismos de transferencia de energía son variados, siendo algunos más sensibles que otros, el diseño de la sonda y su estructura definida juega un rol importante que define este factor.

El mecanismo de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) se conforma de un reportero (R) encargado de transmitir energía a un quencher (Q) aceptor que determina la presencia o ausencia de señal fluorescente, de tal manera que, si ambos se encuentran en proximidad, la energía se transmite del reportero (R) al quencher (Q) en un mecanismo cerrado, sin embargo cuando esta sonda se encuentra hibridada a la cadena molde de interés, esta es sometida a la actividad 5'- exonucleasa del ADN Polimerasa, haciendo que se separen a una distancia en la cual la energía ya no pueda ser transmitida del reportero al quencher, siendo expulsada al exterior, captada y transmitida por el software para ser observada en tiempo real.

La cuantificación absoluta involucra el uso de curvas estándar (concentraciones de parásito en una dilución estándar), cada punto de la curva tiene un CT value (valor del ciclo threshold) conocido y estandarizado. Correlacionando el CT value de los puntos de la curva con los CT value de las muestras, es como se calcula la carga parasitaria de una muestra en cuestión. La eficiencia de la reacción de PCR se calcula mediante la fórmula: $e = (10^{(-1/\text{pendiente})} - 1)$, donde un valor de $e = 2$ equivale al 100% de eficiencia (Bustin et al., 2009).

2.1.10 REP529

El uso de una secuencia altamente repetitiva y conservada de 200 a 300 veces en el genoma de *Toxoplasma gondii* permite la detección de las cargas de parásito más bajas en la muestra, optimizando el diagnóstico de rutina para Toxoplasmosis. Para la detección de REP 529 (AF146527 GenBank) se utilizarán las secuencias de cebadores: Forward 5'-GCTCCTCCAGCCGTCTTG-3', Reverse 5'-TCCTCACCTCGCCTTCAT-3', y sonda fluorescente: 5' FAM-AGGAGAGATATCAGGACTGTA-3' MGB (Wahab et al., 2010).

III. MÉTODO

3.1 Tipo de investigación

Estudio de tipo experimental, donde se podrá a prueba la efectividad de dos protocolos de inmunosupresión en una población de estudio y una población control de ratones Swiss hembra de 2 meses de edad.

3.2 Ámbito Temporal y espacial

Estudio longitudinal y prospectivo, realizado en las instalaciones de los Laboratorios de Investigación de Desarrollo de la Universidad Cayetano Heredia Lima-Perú, 2017.

3.3 Variables

Variable dependiente: Ratón en fase aguda de toxoplasmosis.
Variables independientes: Dosis de inmunosupresor (ciclofosfamida 125 mg/k y dexametasona 70 mg/k), Valor de CT (Ciclo Threshold de qPCR cuantitativa).

3.4 Población y muestra

Se utilizaron 30 ratones de la cepa Swiss que se dividieron en 3 grupos. **Grupo A (Protocolo A):** 10 ratones Swiss hembra de 2 meses de edad infectados con ME49 vía oral e inmunosuprimidos con ciclofosfamida, **Grupo B (Protocolo B):** 10 ratones Swiss hembra de 2 meses infectados con ME49 vía oral e inmunosuprimidos con dexametasona y **Grupo C (Protocolo C):** 10 ratones Swiss hembra de 2 meses inmunosuprimidos (5 con ciclofosfamida y 5 con dexametasona).

Se colectaron muestras de sangre venosa a los grupos A y del grupo C, en el día 8 post- inmunosupresión, la colecta de muestra de sangre venosa del grupo B, se hizo a las 48 horas post-inmunosupresión. Se colectaron muestras de tejido (cerebro) de todos los grupos de ratones descritos en este estudio.

3.5 Instrumentos

El microscopio óptico se se utilizó como instrumento para el conteo de quistes de *T.gondii* y la obtención del inóculo apropiado para la infección de los ratones Swiss hembra. El termociclador Applied Biosystems™ StepOne™ se utilizó como instrumento para realizar el qPCR (PCR en tiempo real cuantitativo) y obtener los datos del CT (Threshold Cycle).

3.6 Procedimientos

3.6.1 Obtención de un modelo animal infectado con *T.gondii* ME 49

La cepa ME49 fue obtenida en cerebros de ratones Swiss, se separó una parte del cerebro y se homogenizó con solución salina (NaCl 0.9%), se colocó 20 µl de homogenizado en una lámina portaobjetos y colocando encima un cubre objetos se observó en el microscopio para hacer el conteo de los quistes presentes.

Se infectó cada ratón Swiss de 2 meses de edad con una carga de 16-18 quistes por vía oral y se observaron por 1 mes, tiempo en el que ya presentan quistes en el cerebro.

3.6.2 Inmunosupresión

Se utilizaron tres protocolos A, B y C, de los cuales, el Protocolo A consiste en Ciclofosfamida por vía intraperitoneal en 125 mg/k, el Protocolo B consiste en Dexametasona por vía intraperitoneal en 70 mg/k y en el Grupo C, consiste en aplicar los protocolos A y B en ratones no infectados, quedando los protocolos finales de la siguiente manera.

Grupo A (Protocolo A): 10 ratones Swiss hembra de 2 meses de edad infectados con ME49 vía oral y observados de 1- 8 meses e inmunosuprimidos con ciclofosfamida (IP) 125 mg/k durante 7 días continuos, **Grupo B (Protocolo B):** 10 ratones Swiss hembra de 2 meses infectados con ME49 vía oral, observados por 2 meses y luego inmunosuprimidos con Dexametasona 70 mg/k y sacrificados a las 48

horas post inmunosupresión, **Grupo C (Protocolo C):** 10 ratones Swiss hembra de 2 meses inmunosuprimidos (5 con ciclofosfamida 125 mg/k y 5 con Dexametasona 70 mg/k).

3.6.3 Colecta de muestras

Para la toma de muestra de sangre y tejido los ratones se eutanasiaron; se empleó un protocolo de anestesia basada en la combinación de Ketamina 35mg/kg y Xilacina 5mg/kg administrada con aguja tuberculina por vía intramuscular. Una vez comprobada la ausencia de reflejo nociceptivo por punción de la zona interdigital se procede a la extracción de sangre y tejidos de interés con el objetivo de verificar la infección.

La colecta de la sangre se hizo por punción cardiaca, con una jeringa de 1 ml, para posteriormente depositarla en tubos sin aditivos, luego se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos para separar el suero del coágulo sanguíneo (CLOT) y se almacenaron alícuotas de ambas muestras a -20°C hasta su uso.

Se colectó una porción del cerebro, se preservó en 1 ml de etanol absoluto y se guardó a -20°C hasta su uso.

3.6.4 Purificación de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el Kit High Pure PCR Template Preparation (Roche® Life Science). Para coágulo sanguíneo (CLOT), se adicionó un paso al inicio para asegurar la lisis mecánica previa a la exposición de la actividad enzimática de la Proteinasa K. Se

utilizaron matrix de lisis (Lysing matrix H 2ml tube MP Biomedicals) y la acción de FastPrep-24™ 5G (MP Biomedicals) en un tiempo y velocidad de 5,5 m/s por 30" para optimizar el proceso de lisis, los siguientes pasos se siguieron de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para tejidos se picaron 25 mg de cerebro preservados en etanol absoluto y se hidrataron en buffer Tris-EDTA (10 mM Tris-Cl, pH 8.0; 1 mM EDTA), después se empleó el mismo proceso de lisis al cual fue expuesto el coágulo sanguíneo.

3.6.5 Curva de Calibración de ADN

Las muestras de coágulo sanguíneo y tejido negativos se infectaron con 1 000 000 taquizoitos de *Toxoplasma gondii*, el ADN extraído de estas muestras fue sometido a diluciones seriadas de: 100 000, 10 000, 1000, 100, 10 y 1 eq-taq/ ml (equivalente de taquizoítos por mililitro).

3.6.6 PCR en Tiempo Real

Se utilizó la técnica de PCR en tiempo real (qPCR) para la detección de REP529 (AF146527) Fw: 5'- GCTCCTCCAGCCGTCTTG -3', Rv: 5'- TCCTCACCCCTCGCCTTCAT -3',5' FAM- AGGAGAGATATCAGG CTGTA -3' MGB. Se utilizaron reactivos Taqman® en la composición del Master Mix, Universal PCR Master Mix II 1X (Roche), H₂O libre de DNAsas y RNAsas, 0.6 µM de cada cebador, 0.2 µM de sonda y 100 ng de ADN para un volumen final de 20 µL de reacción. El protocolo de amplificación involucra 2 pasos iniciales de 50°C por un minuto y 95°C por 5 minutos seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por

1 minuto y 72°C por un minuto, el proceso del ciclado fue hecho en StepOne Plus® (Applied Biosystems). El Ciclo Threshold (CT) obtenido se relacionará con el obtenido en una curva de calibración para así determinar la carga parasitaria de la muestra.

3.7 Análisis de resultados

Para el análisis de datos se utilizó el método estadístico Test de Rango con signos de Wilcoxon para variables no paramétricas con un nivel de confianza del 95%, para procesar los datos se utilizó el paquete estadístico SPSS y los gráficos fueron diseñados en el software GraphPad Prism 6.

IV. RESULTADOS

4.1 Curva de Calibración

Coágulo sanguíneo (CLOT)

El Cq específico del Gen REP 529 amplificado mediante qPCR es correlativo a cada equivalente de taquizoitos (eq-taq), en su análisis de regresión lineal presenta una pendiente de -3.5821 y un R^2 de 0.997. Estos valores fueron utilizados para calcular esta reacción con una eficiencia de 90.18% ($e = 1.9$).

| CLOT | | | |
|---------|---------|-------|------|
| GEN | CARGA | CT | LOGQ |
| REP 529 | 1000000 | 15.94 | 6 |
| | 100000 | 19.01 | 5 |
| | 10000 | 22.49 | 4 |
| | 1000 | 26.22 | 3 |
| | 100 | 29.54 | 2 |
| | 10 | 32.95 | 1 |
| | 1 | 37.73 | 0 |

Tabla 1. Valores de CT para cada una de las diluciones a partir de ADN de coágulo infectado.

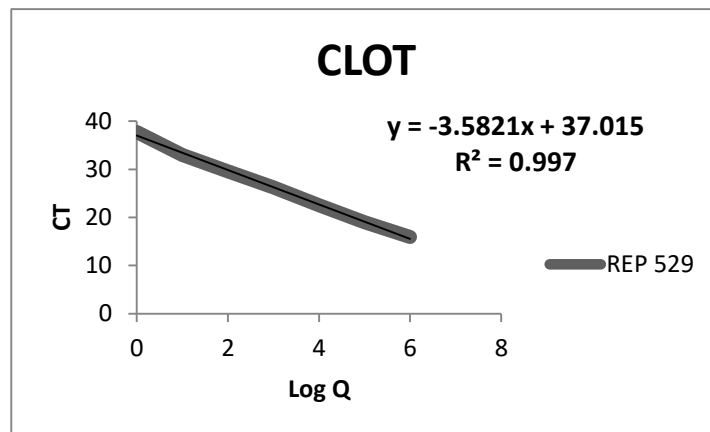


Fig 6. Análisis de regresión lineal de los valores de CT.

Tejido

El CT específico del Gen REP 529 amplificado mediante qPCR es correlativo a cada equivalente de taquizoítos (eq-taq), en su análisis de regresión lineal presenta una pendiente de -3.9171 y un R^2 de 0.9912. Estos valores fueron utilizados para calcular esta reacción con una eficiencia de 81% ($e= 1.8$).

| TEJIDO | | | |
|---------|--------|------|------|
| GEN | CARGA | CT | LOGQ |
| REP 529 | 100000 | 15.5 | 5 |
| | 10000 | 18.9 | 4 |
| | 1000 | 22.5 | 3 |
| | 100 | 26.1 | 2 |
| | 10 | 29.9 | 1 |
| | 1 | 35.6 | 0 |

Tabla 2. Valores de CT para cada una de las diluciones a partir de ADN de tejido infectado.

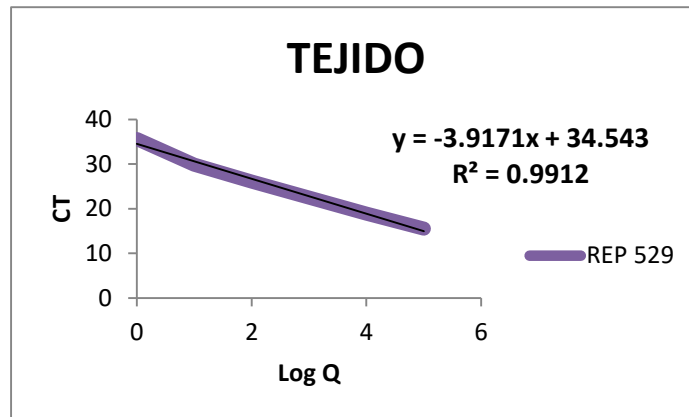


Fig 7. Análisis de regresión lineal de los valores de CT.

4.2 PCR Tiempo Real (qPCR)

Al procesar el ADN proveniente de las muestras de cerebro y sangre de los ratones se observan resultados positivos provenientes de los ratones infectados con la cepa ME49 de *Toxoplasma gondii*, de los cuales, los que están inmunosuprimidos con el protocolo de Dexametasona tienen CT promedio de 18.3 en cerebro y los inmunosuprimidos con el protocolo de Ciclofosfamida tienen un CT promedio de 24.2 en cerebro y 35.6 en sangre (Tabla 3) (Anexo 2).

| INFECTADOS E INMUNOSUPRIMIDOS | | | | SANOS E INMUNOSUPRIMIDOS | | | |
|-------------------------------|--------|----------------|-------------|--------------------------|--------|----------------|--------|
| DEXAMETASONA | | CICLOFOSFAMIDA | | DEXAMETASONA | | CICLOFOSFAMIDA | |
| CEREBRO | SANGRE | CEREBRO | SANGRE | CEREBRO | SANGRE | CEREBRO | SANGRE |
| 18.3 ± 0.87 | 0 | 24.2 ± 1.87 | 35.6 ± 0.86 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabla 3. Valores de CT en cerebro y sangre de los ratones pertenecientes a este estudio.

CEREBRO

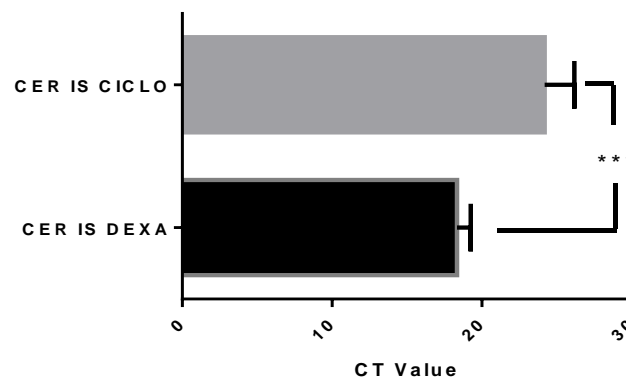


Fig 8. Comparación de los valores de CT obtenidos en las muestras de cerebro para ambos protocolos de inmunosupresión. CICLO (Ciclofosfamida), DEXA (Dexametasona). $p < 0.0001$ (***).

COÁGULO SANGUÍNEO (CLOT)

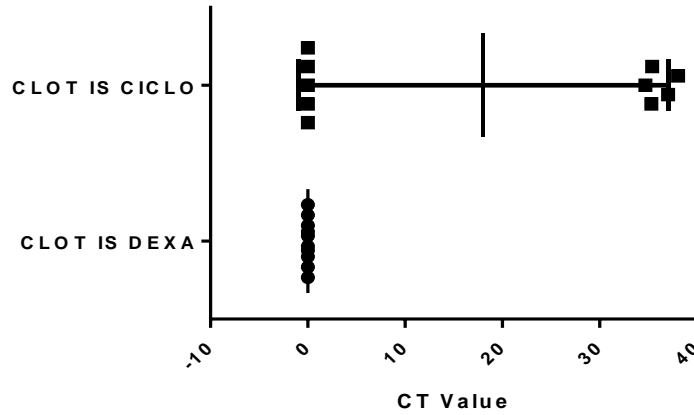


Fig 9. Valores de CT obtenidos en las muestras de coágulo sanguíneo (CLOT) para ambos protocolos de inmunosupresión (IS). CICLO (Ciclofosfamida), DEXA (Dexametasona). $p = 0.0325$ (*).

PROTOCOLO CICLOFOSFAMIDA

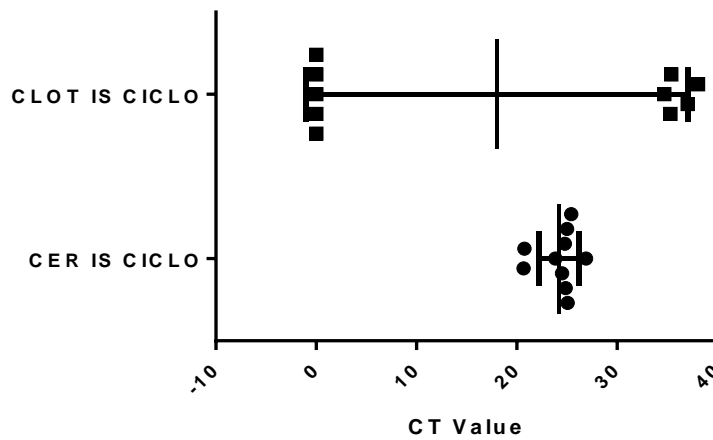


Fig 10. Valores de CT obtenidos en las muestras de cerebro y coágulo sanguíneo (CLOT) para el protocolo de inmunosupresión con ciclofosfamida.

PROTOCOLO DEXAMETASONA

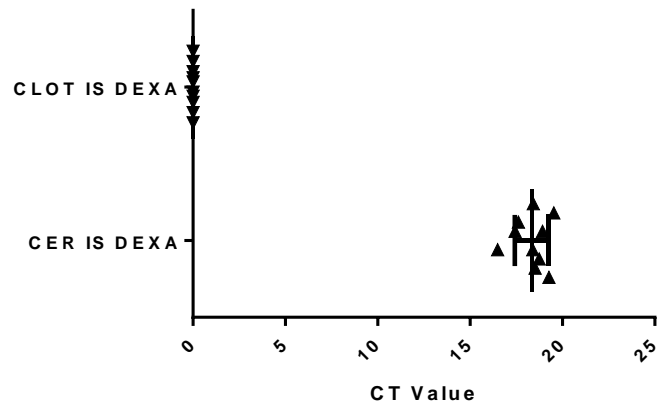


Fig 11. Valores de CT obtenidos en las muestras de cerebro y coágulo sanguíneo (CLOT) para el protocolo de inmunosupresión con dexametasona.

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 Modelo animal con el inóculo adecuado de quistes de la cepa ME49

Para el manejo adecuado de los animales pertenecientes a este estudio, se consideraron estudios previos, donde se utilizan ratones jóvenes, tanto para infección con cepas de *T.gondii* (Foroghi et al., 2008), así como modelos de inmunosupresión (Bruzual et al., 2002). Se determinó la edad y el sexo con la finalidad de facilitar el manejo y el proceso de infección, adaptando el protocolo de infección e inmunosupresión en ratones Swiss hembra de 2 meses de edad. Para la determinación del inóculo de cepa ME49 de *T.gondii*, se tomó como referencia cantidades de quistes utilizadas previamente en investigaciones anteriores, en este estudio se utilizó un inóculo con un intervalo cerrado de 16-18 quiste por cada 20 µl de tejido machacado, obteniendo una infección crónica en 100% (20/20) de los ratones de los grupos A y B.

5.2 Evaluación de dos protocolos de inmunosupresión

Para optimizar el protocolo de inmunosupresión que se usa actualmente en el laboratorio, se tomaron en cuenta: la dosis y el tiempo de exposición al nuevo fármaco.

El uso de ciclofosfamida como inmunosupresor en modelos animales ha sido probada en un estudio donde se administraron dosis de 50-200 mg/kg en intervalos de 2 días, encontrando sus mejores resultados con una dosis de 150 mg/kg en un tiempo de 10-14 días (Huyan et al., 2011).

Para esta tesis se tomó como referencia la dosis a aplicar también considerando la biodisponibilidad del fármaco (97% para una dosis de 100 mg/kg) (PeruLab) y se optimizó el tiempo de exposición a ciclofosfamida considerando que en la cinética de disposición se manifiesta que la disminución de niveles plasmáticos va disminuyendo lentamente hasta pasar las 24 horas, quedando así, un protocolo con una dosis de 125 mg/kg durante 7 días consecutivos.

5.3 Detección de *T.gondii* en fluidos corporales mediante PCR en Tiempo Real

Para demostrar que el uso de fármacos en altas dosis induce el efecto inmunosupresor en un modelo animal, simulando el fenómeno de reactivación de Toxoplasmosis, se utilizó un grupo de ratones infectados con una cepa tipo II de *Toxoplasma gondii* (ME49) con un tiempo de infección de 2 meses para cada fármaco de inmunosupresión (Dexametasona y Ciclofosfamida).

5.3.1 Tejido

Para los ratones del Grupo B, se observaron valores de CT promedio de $18,3 \pm 0,87$ indicando una presencia de 10 000 parásitos en promedio por muestra de tejido (cerebro). Para los ratones del Grupo A, se observaron valores de CT promedio de $24,2 \pm 1,87$ indicando una presencia de 100 parásitos en promedio por muestra de tejido (cerebro) (Tabla 3). A pesar de haber sido infectados con la misma carga parasitaria, los ratones del Grupo A

presentan un valor de CT promedio mayor al Grupo B, lo que indica menos carga parasitaria encontrada en relación al otro grupo de ratones. En la Fig.8 se hace la comparación de manera gráfica, donde además se observa un valor p ($p < 0001$), con el cual se puede afirmar una diferencia significativa entre los dos grupos. Ésta diferencia podría atribuirse a una disminución de la cantidad de quistes en el cerebro debido a la conversión en taquizoítos que se detectaron en los fluidos corporales (sangre).

5.3.2 Coágulo Sanguíneo

En este estudio se utilizaron muestras de coágulo sanguíneo (CLOT) para hacer la detección de *Toxoplasma gondii* en fluidos ya que este tipo de muestra permite detectar el parásito con mayor sensibilidad y especificidad en comparación a la sangre total (data no publicada, grupo de investigación Toxoplasmosis). La composición del coágulo sanguíneo hace que los parásitos queden atrapados en la masa, concentrándolos. De esta manera se complementa con el PCR en tiempo real para obtener una técnica de detección más eficaz.

Los resultados son negativos para coágulo sanguíneo en los ratones del grupo B, lo que indica que no se detectó taquizoitos de *T.gondii* en sangre periférica en ninguno de los ratones expuestos a inmunosupresión con el protocolo B (Dexametasona), de lo cual se puede inferir que el protocolo no estimuló la migración de taquizoitos desde los tejidos hacia los fluidos corporales. Sin embargo, para los ratones del grupo A se observó un valor de CT promedio de $35,6 \pm 0,86$ que indica una presencia entre 1 a 10 parásitos en promedio por mililitro de sangre en los ratones

inmunosuprimidos con el protocolo A, lo que evidenciaría la migración de *Toxoplasma gondii* a los fluidos corporales. Se observan también que no todos los ratones del grupo A tuvieron esta migración, obteniéndose este resultado en el 50% (5/10) de los ratones, esto podría ser atribuido también al sistema inmune de cada hospedero intermediario. En la Fig. 9 se hace la comparación gráfica de los resultados del CT Value entre el Protocolo A y el Protocolo B, donde además se obtuvo un valor p ($p= 0.0325$) que evidencia una diferencia significativa entre los dos grupos comparados.

En los grupos de ratones del grupo C los resultados de qPCR salieron negativos para coágulo sanguíneo y tejido (cerebro), lo que indica que efectivamente se ha empleado una secuencia de cebadores que realiza una detección específica de *Toxoplasma gondii*, diferenciando de manera eficaz entre una muestra positiva y una muestra negativa.

VI. CONCLUSIONES

- Para la infección efectiva con la cepa ME49, el inóculo adecuado es de 16-18 quistes por casa 20 µl de tejido machacado,
- El uso de un protocolo de inmunosupresión basado en Ciclofosfamida estimula la reactivación de una etapa aguda de Toxoplasmosis, haciendo posible detectar parásitos en fluidos corporales.
- La detección específica de *T.gondii* mediante PCR en tiempo real también permitió cuantificar la carga parasitaria.

VII. RECOMENDACIONES

Debido a que este estudio es de carácter experimental en un modelo animal, se recomienda utilizar este protocolo solamente con fines de investigación.

A pesar de existir múltiples estudios, se necesitan más para un mayor entendimiento del mecanismo de acción y el comportamiento de las cepas de *Toxoplasma* en el Perú.

Continuar con las investigaciones permitirá establecer una técnica Gold estándar para la detección oportuna de Toxoplasmosis en poblaciones vulnerables: personas con enfermedades autoinmunes, enfermedades del sistema nervioso, enfermedades metabólicas, personas con VIH/SIDA, embarazadas y sus bebés.

VIII. REFERENCIAS

- Ader, R., & Cohen, N. (1975). Behaviorally Conditioned Immunosuppression. *Psychosomatic Medicine*, 37(4), 333–340. <https://doi.org/10.1097/00006842-197507000-00007>
- Araujo, F., Slifer, T., & Kim, S. (1997). Chronic Infection with *Toxoplasma gondii* Does Not Prevent Acute Disease or Colonization of the Brain with Tissue Cysts Following Reinfection with Different Strains of the Parasite. *The Journal of Parasitology*, 83(3), 521. <https://doi.org/10.2307/3284421>
- Belaz, S., Gangneux, J.-P., Dupretz, P., Guiguen, C., & Robert-Gangneux, F. (2015). A 10-Year Retrospective Comparison of Two Target Sequences, REP-529 and B1, for *Toxoplasma gondii* Detection by Quantitative PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(4), 1294–1300. <https://doi.org/10.1128/JCM.02900-14>
- Bruzual, E., & Finol, H. J. (2002). Skeletal Muscle Ultrastructural Abnormalities in Mice Infected with *Toxoplasma gondii* and Treated with Ciclophosphamide. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad de Zulia*, XII(1), 19–23.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–612. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Dardé, M., Parasitologie-mycologie, S. De, Médecine, F. De, & Limoges, U. De. (2004). Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist*

Super Sanità, 40(1), 57–63.

- Dubey, J. P. (2010). Toxoplasmosis of Animals and Humans - CRC Press Book. In *CRC Press* (p. 336). <https://www.crcpress.com/Toxoplasmosis-of-Animals-and-Humans/Dubey/p/book/9781420092363>
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S., & Speer, C. A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(2), 267–299. <https://doi.org/10.1128/cmr.11.2.267>
- Ferguson, D. J. ., & Dubremetz, J. . (2007). The Ultrastructure of *Toxoplasma gondii*. In *The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods* (pp. 19–48). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012369542-0/50004-0>
- Foroghi, F., Keshavarz, H., & Shojaee, S. (2008). Detection of *Toxoplasma gondii* Antigens in Sera and Urine of Experimentally Infected Mice by Capture ELISA. *Iranian J Parasitol*, 3(1), 1–5.
- Goldman, M., Carver, R. K., & Sulzer, A. J. (1958). Reproduction of *Toxoplasma gondii* by Internal Budding. *The Journal of Parasitology*, 44(2), 161. <https://doi.org/10.2307/3274692>
- Homan, W. L., Vercammen, M., Braekeleer, J. De, & Verschueren, H. (2000). *Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in Toxoplasma gondii , and its use for diagnostic and quantitative PCR p. 30, 69–75.*
- Huyan, X., Lin, Y., Gao, T., Chen, R., & Fan, Y. (2011). International Immunopharmacology Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb / c mice. *International Immunopharmacology*, 11(9), 1293–1297. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.04.011>

- Jeklova, E., Leva, L., Jaglic, Z., & Faldyna, M. (2008). Dexamethasone-induced immunosuppression: a rabbit model. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 122, 231–240. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.11.011>
- Jones, J. L., & Dubey, J. P. (2010). Waterborne Toxoplasmosis - Recent Developments. *Experimental Parasitology*, 124(1), 10–25. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.013>
- Melo, M. B., Jensen, K. D. C., & Saeij, J. P. J. (2011). Toxoplasma gondii Effectors are Master Regulators of the Inflammatory Response. *Trends Parasitol*, 27(11), 487–495. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.08.001>
- Nicolle, C., Sci, L. M.-C. A., & 1909, U. (1909). Sur un protozoaire nouveau du gondi. *CR Acad Sci*, 148, 346.
- Opitz, C., & Soldati, D. (2002). “The glideosome”: A Dynamic Complex Powering Gliding Motion and Host Cell Invasion by Toxoplasma gondii. In *Molecular Microbiology* (Vol. 45, Issue 3). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03056.x>
- Paugam, A., Dupouy-Camet, J., Sumuyen, M.-H., Romand, S., Lamoril, J., & Derouin, F. (1995). Detection of Toxoplasma gondii Parasitemia by Polymerase Chain Reaction in Perorally Infected Mice. *Parasite*, Volume 2(2), 181–184. <https://doi.org/10.1051/parasite/1995022181>
- Pereira, K. S., Franco, R. M. B., & Leal, D. A. G. (2010). Transmission of Toxoplasmosis (Toxoplasma gondii) by Foods. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 60, pp. 1–19). Academic Press Inc. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(10\)60001-0](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(10)60001-0)
- Petersen, E., & Dubey, J. P. (2005). Biology of toxoplasmosis. *Cambridge*

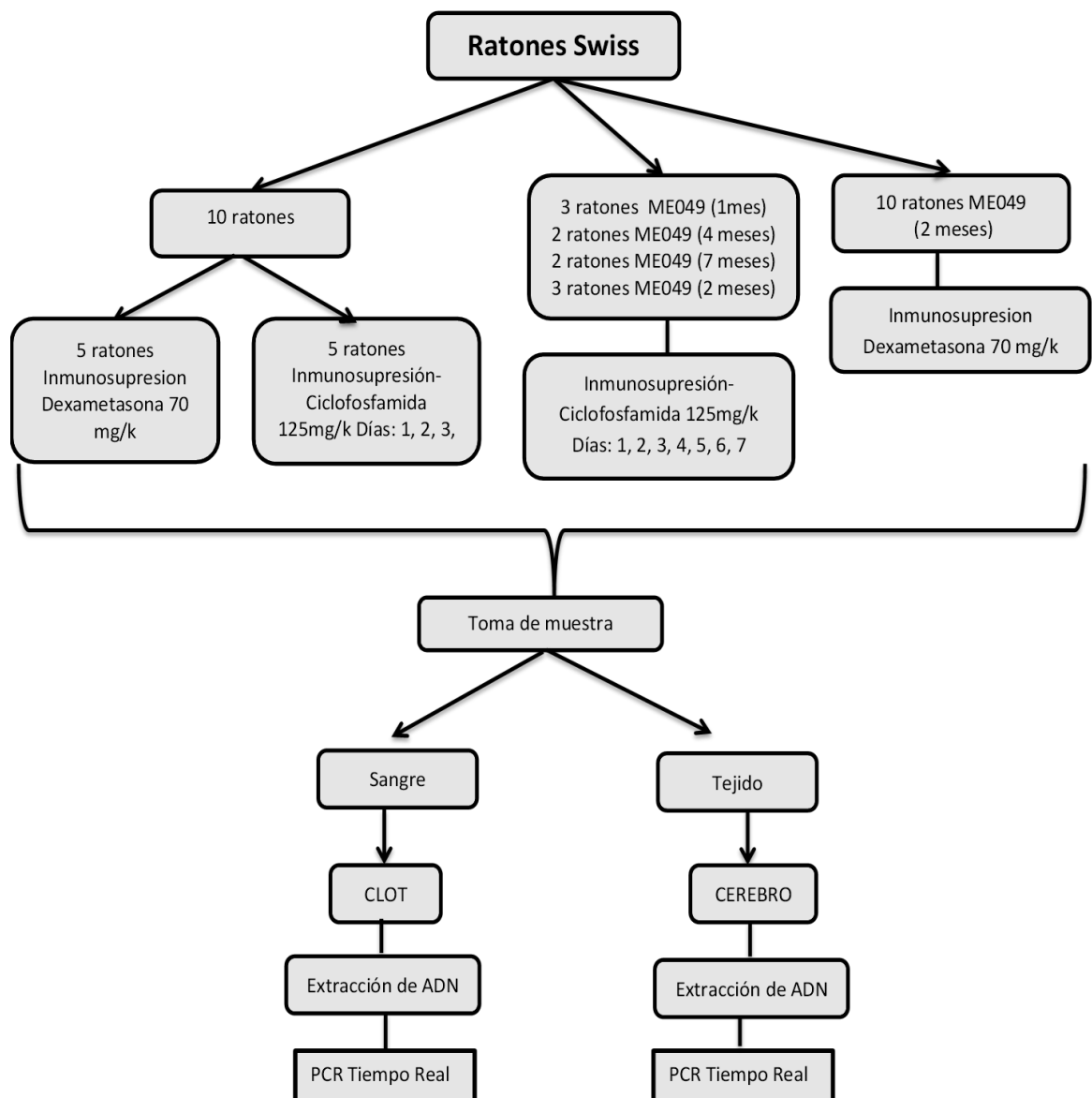
University Press, 1–10. www.cambridge.org

- Selseleh, M., Keshavarz, H., Mohebali, M., Shojaee, S., & Selseleh, M. (2012). *Production and Evaluation of Toxoplasma gondii Recombinant GRA7 for Serodiagnosis of Human Infections*. *50*(3), 233–238.
- Sibley, L. D. (2003). *Toxoplasma gondii*: Perfecting an Intracellular Life Style. In *Traffic* (Vol. 4, Issue 9, pp. 581–586). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2003.00117.x>
- Skariah, S., McIntyre, M. K., & Mordue, D. G. (2010). *Toxoplasma gondii*: Determinants of Tachyzoite to Bradyzoite Conversion. In *Parasitology Research* (Vol. 107, Issue 2). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1899-6>
- Soete, M., Fortier, B., Camus, D., & Dubremetz, J. F. (1993). *Toxoplasma gondii*: Kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion in vitro. *Experimental Parasitology*, *76*(3), 259–264. <https://doi.org/10.1006/expr.1993.1031>
- Wahab, T., Edvinsson, B., & Palm, D. (2010). Comparison of the AF146527 and B1 Repeated Elements , Two Real-Time PCR Targets Used for Detection of *Toxoplasma gondii* Comparison of the AF146527 and B1 Repeated Elements , Two Real-Time PCR Targets Used for Detection of *Toxoplasma gondii* □. *Journal of Clinical Microbiology*, *48*(2), 591–593. <https://doi.org/10.1128/JCM.01113-09>

IX. ANEXOS

ANEXO 1

FLUJOGRAMA DE TRABAJO



ANEXO 2

BASE DE DATOS

| GRUPO | | INDIVIDUO | CLOT qPCR REP 529 | | | CEREBRO qPCR REP 529 | | |
|---|---------|-----------|-------------------|--------|-----|----------------------|----------|-----|
| | | | CT | Eq-par | +/- | CT | Eq-par | +/- |
| INFECTADOS E INMUNOSUPRIMIDOS | GRUPO A | 1 | Undetermined | - | 0 | 17.44 | 3320 | 1 |
| | | 2 | Undetermined | - | 0 | 16.49 | 5250 | 1 |
| | | 3 | Undetermined | - | 0 | 17.62 | 3050 | 1 |
| | | 4 | Undetermined | - | 0 | 18.4 | 2090 | 1 |
| | | 5 | Undetermined | - | 0 | 19.27 | 1370 | 1 |
| | | 6 | Undetermined | - | 0 | 18.92 | 1620 | 1 |
| | | 7 | Undetermined | - | 0 | 18.74 | 1800 | 1 |
| | | 8 | Undetermined | - | 0 | 19.53 | 1870 | 1 |
| | | 9 | Undetermined | - | 0 | 18.52 | 1900 | 1 |
| | | 10 | Undetermined | - | 0 | 18.42 | 2070 | 1 |
| | GRUPO B | 1 | 35.31 | 5.4 | 1 | 26.89 | 200.53 | 1 |
| | | 2 | 34.72 | 7.83 | 1 | 24.50 | 1059.40 | 1 |
| | | 3 | Undetermined | - | 0 | 20.76 | 14428.50 | 1 |
| | | 4 | Undetermined | - | 0 | 20.69 | 15143.10 | 1 |
| | | 5 | Undetermined | - | 0 | 25.44 | 550.86 | 1 |
| | | 6 | 35.39 | 5.56 | 1 | 24.78 | 871.78 | 1 |
| | | 7 | 38.08 | 1.1 | 1 | 23.86 | 1659.46 | 1 |
| | | 8 | Undetermined | - | 0 | 25.00 | 747.23 | 1 |
| | | 9 | 37.05 | 1.75 | 1 | 25.08 | 706.09 | 1 |
| | | 10 | Undetermined | - | 0 | 24.88 | 810.67 | 1 |
| NO INFECTADOS E INMUNOSUPRIMIDOS D : DEXAMETASONA 70 mg/k C: CICLOFOSFAMIDA 125 mg/k | GRUPO C | D1 | Undetermined | - | 0 | Undetermined | - | 0 |
| | | D2 | Undetermined | - | 0 | Undetermined | - | 0 |
| | | D3 | Undetermined | - | 0 | Undetermined | - | 0 |
| | | D4 | Undetermined | - | 0 | Undetermined | - | 0 |
| | | D5 | Undetermined | - | 0 | Undetermined | - | 0 |
| | | C1 | Undetermined | - | 0 | Undetermined | - | 0 |
| | | C2 | Undetermined | - | 0 | Undetermined | - | 0 |
| | | C3 | Undetermined | - | 0 | Undetermined | - | 0 |
| | | C4 | Undetermined | - | 0 | Undetermined | - | 0 |
| | | C5 | Undetermined | - | 0 | Undetermined | - | 0 |

Interpretación de Resultados:

CT= Ciclo Threshold
 Eq-par= Equivalente de parásitos
 Negativo = 0/ Undetermined
 Positivo = 1