

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**INVESTIGACIÓN DE LA INMUNIDAD CRUZADA EN LA TOXOPLASMOSIS
CONGÉNITA EXPERIMENTAL**

II. Desafíos con quistes y ooquistes de Toxoplasma

Por

Ana CARDOSO LÓPEZ



TESIS DE GRADO presentado como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias (Orientación Higiene, Inspección, Control Tecnología de los Alimentos)

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2005**

034 TG
Investigación d
Cardoso López, Ana



TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente de Mesa:

Dra. Perla A. Cabrera Stábile.
Prof. de Parasitología.

Segundo Miembro (Tutor):

Dr. Alvaro Freyre Mc. Call.
Prof. Agdo de Parasitología. D.T.

Tercer Miembro:

Dr. Jesús Falcón Banegas.
Asistente

Fecha:

Autor :

Ana V. Cardoso López

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República Oriental del Uruguay por darme la posibilidad de llevar a cabo esta Investigación.

Al equipo de Investigación del Laboratorio de Toxoplasmosis de la FV por el apoyo técnico y humano brindado.

Un particular agradecimiento a mi tutor, Dr. Alvaro Freyre.

A mis familiares y amigos por el apoyo brindado.

LISTA DE CUADROS:

Cuadro I: Ensayos de transmisión trasplacentaria de *Toxoplasma* en ratas, por inoculación oral..... 6

Cuadro II: Resultados de la transmisión congénita de *Toxoplasma* en ratas inmunizadas per os y desafiadas per os durante la gestación con cepas homólogas y heterólogas del parásito, y sus respectivos controles..... 11

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	IV
1. <u>RESUMEN</u>	1
2. <u>INTRODUCCIÓN</u>	2
3. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	4
3.1. El modelo rata para el estudio de la inmunidad contra la toxoplasmosis connatal.....	4
4. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	7
4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	7
4.2. ANIMALES.....	7
4.3. CEPAS DE TOXOPLASMA.....	8
4.4. MÉTODO PARA LOGRAR LA CONCEPCIÓN DE LAS RATAS.....	8
4.5. OBTENCIÓN DE QUISTES DE TOXOPLASMA.....	9
4.6. OBTENCIÓN DE OOQUISTES DE TOXOPLASMA.....	9
4.7. BIOENSAYOS.....	9
4.8. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	10
5. <u>RESULTADOS</u>	10
6. <u>DISCUSIÓN</u>	12
7. <u>CONCLUSIONES</u>	13
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	14

1. RESUMEN

En Uruguay nacen cerca de 150 niños toxoplásmicos anualmente, y la porción medible de las pérdidas por aborto ovino toxoplásmico son de 5 millones de dólares anuales. Actualmente no se dispone de vacunas contra la toxoplasmosis aplicables a las personas, pero se ha desarrollado un modelo animal en la rata para el ensayo de inmunógenos contra la toxoplasmosis congénita. El objetivo de esta tesis es ensayar la protección vaccinal contra la toxoplasmosis congénita en el modelo rata contra el desafío de dos estadios evolutivos de cepas del parásito. Para ello, grupos de ratas inmunizadas previamente a la gestación con *Toxoplasma* son desafiadas con 3 cepas de *Toxoplasma* durante la gestación. Al parto, las camadas son bioensayadas. Se observa que las cepas M3 y Prugniaud de *Toxoplasma*, brinda protección cruzada sólo parcial contra la toxoplasmosis congénita iniciada por las cepas Elg, Hopa Hopa y Prugniaud. Los resultados no se ajustan fielmente a lo que sucede en la naturaleza con sus referentes humano y ovino, en los que los individuos inmunes protegen totalmente a su descendencia contra la infección congénita. La razón puede estar en el uso de dosis de desafío muy elevadas, entre otros. Será necesario continuar estas investigaciones.

2. INTRODUCCIÓN

Los resultados de investigaciones llevadas a cabo por el equipo de investigación del Laboratorio de Toxoplasmosis de Facultad de Veterinaria, indican que en Uruguay nacen cerca de 150 niños toxoplásmicos anualmente (Freyre y col. 1992; Conti y col. 1998). Algunos de ellos mueren rápidamente, en tanto que la mayoría desarrolla lesiones de coriorretinitis ocular o sufren retraso intelectual más adelante. Esta situación es similar en todos los países del globo (Freyre y Falcón, 1989).

La prevención de la toxoplasmosis humana congénita se efectúa en el país y en el exterior generalmente en forma eventual, sobre la base de la detección de la infección durante la gestación, y el tratamiento de las madres detectadas infectadas. Este sistema es de moderada eficacia. A ello contribuye que muchas madres comienzan la vigilancia serológica en etapas considerablemente avanzadas de su gestación; a que sólo una parte de ellas regresa para volverse a chequear serológicamente, y a que con frecuencia no se interpretan correctamente los resultados serológicos. También es dable considerar que este método es más paliativo que preventivo, pues con cierta frecuencia, cuando se instaura el tratamiento específico a la embarazada, ya *Toxoplasma* ha causado lesiones que no revierten con el tratamiento, sólo se detienen. Desde luego, este sistema tiene también su costo económico, que no es desdeñable.

Por otra parte, los últimos estudios del equipo mencionado sobre toxoplasmosis ovina indican que el aborto ovino toxoplásmico es responsable de pérdidas económicas en la industria ovina del Uruguay por un valor de 2 a 5 millones de dólares anuales (solamente la porción medible de dichas pérdidas) (Freyre y col.,1999-b). Asimismo, la prevalencia de la infección del ganado ovino en el Uruguay, que se sitúa en el entorno del 25%, es fuente de infección humana, cuando se consume su carne insuficientemente cocida. El consumo de carne ovina es importante, particularmente en el interior del país. La prevalencia de la infección toxoplásmica ovina es de un tenor similar en otros países productores de lana (Freyre y Falcón, 1989).

Como alternativa ideal, se encuentra el desarrollo de una vacuna antitoxoplásmica. Existe una vacuna con alto nivel de protección contra la emisión de ooquistes toxoplásmicos por los gatos, cuya aplicación contribuiría a disminuir la prevalencia de la infección toxoplásmica humana y tal vez también la de los animales de consumo (Frenkel y col.,1991; Freyre y col.,1993; Choromanski y col.,1994). Tratándose de una vacuna a *Toxoplasma* vivo, su aplicación está pendiente de que pueda ser elaborada y distribuida en condiciones rentables. Existe asimismo una vacuna (Freyre,1998) que ayuda a disminuir las pérdidas por el aborto ovino toxoplásmico (Freyre y col.,1996; Freyre y col.,1997; Freyre y col.,1999-b), aunque su eficacia es solo del 70%, y no impide la colonización fetal por *Toxoplasma*, de modo que el consumo de la carne así producida continúa siendo fuente de infección para las personas (Dubey,1996; Freyre y col.,1996).

El hecho de ser una vacuna viva agrega tres inconvenientes más: que su transporte hasta el establecimiento debe hacerse en tanques de nitrógeno, la duración de su viabilidad en almacenamiento es limitada, y su manipulación peligrosa para las personas.

No existen actualmente vacunas aplicables a las personas (Freyre,1998), para prevenir la toxoplasmosis connatal (Freyre y col. 1992; Conti y col.,1998) o la toxoplasmosis aguda en personas inmunodeficientes (Freyre y Falcón,1989; Alexander,1996; Dubey,1996; Freyre y col., 2000)

Se dispone sin embargo, de modelos animales para el estudio de la inmunidad contra ambas situaciones, que mayormente utilizan la rata (Duquesne y col.,1990; Dubey y Shen,1991; Dubey y col., 1991; Schoondermark y col., 1993; Zenner y col., 1993; Roberts y col., 1994; Freyre y col., 1999-a; Freyre y col., 2000; Freyre y col., 2004). Se han efectuado experimentos prototípicos con estos modelos, cuyos resultados permiten ser optimistas respecto al logro de una vacuna contra la toxoplasmosis humana connatal así como contra el aborto ovino toxoplásmico, aún cuando son muy contados los ensayos efectuados con subunidades antigénicas, que se han dado a conocer (Büllow y Boothroyd, 1991; Khan y col., 1991; Angus y col.,2000; Nielsen y col., 2000; Velge-Roussel y col., 2000; Vercammen y col., 2000). Se posee considerable conocimiento acerca de los mecanismos implicados en la respuesta inmune contra la infección toxoplásmica en animales de experimentación (Alexander,1996), lo cual permite hacer una selección primaria de los antígenos toxoplásmicos potencialmente protectores, así como también seleccionar los adyuvantes teóricamente más apropiados (Khan y col., 1991).

En el Laboratorio de Toxoplasmosis se han desarrollado modelos en la rata para el estudio de la inmunidad contra la toxoplasmosis, tanto de la forma congénita, como de la forma adquirida. Dichos modelos han funcionado favorablemente a través de sucesivos proyectos de investigación ya culminados. En la presente investigación se indaga la inmunidad cruzada entre diferentes cepas de *Toxoplasma*, en el modelo señalado de toxoplasmosis congénita.

Existe el antecedente inmediato de la tesista Laura Correa, de ensayo de inmunidad cruzada en el modelo rata, efectuando desafíos con la fase quística de *Toxoplasma*. En ellos se constató la existencia de inmunidad cruzada en proporciones muy altas, aunque no en forma total. La intención de la presente tesis, es ampliar los ensayos con desafíos quísticos y de ooquistes toxoplásmicos para el desafío vaccinal, en nuevos experimentos de inmunidad cruzada.

2.1. OBJETIVO

El objetivo de la presente tesis fue ensayar la protección vaccinal prototípica contra la toxoplasmosis congénita en el modelo rata desafiada con dos estadios evolutivos diferentes de cepas completas del parásito.

La hipótesis de trabajo fue que las cepas M3 y Prugnauud de *Toxoplasma*, productoras de quistes y ooquistes, producirían protección cruzada al menos parcial contra la toxoplasmosis congénita experimental generada por otras 3 cepas de *Toxoplasma* diferentes.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

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

Se han empleado varias especies de laboratorio para estudiar la inmunidad contra la toxoplasmosis connatal. El diseño utilizado consiste en inmunizar a las futuras madres antes de la concepción, y desafiarlas durante la gestación, para luego intentar la recuperación de *Toxoplasma* a partir de los recién nacidos. Se constata así la transmisión trasplacentaria de *Toxoplasma*, o por el contrario su ausencia, como reflejo de la protección inmunitaria alcanzada.

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

En el Laboratorio de Toxoplasmosis del Dpto. de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de Montevideo se ha ensayado la transmisión de la toxoplasmosis aguda durante la gestación en ratas no inmunes. Se utilizaron las mismas razas de ratas (Sprague-Dawley y Fischer). Se inoculó en el mismo momento de la gestación y se empleó el mismo bioensayo que los autores mencionados. Se obtuvo transmisión en el 0 al 70 % de las ratas madres, empleando 12 cepas de *Toxoplasma* de diferente patogenicidad para el ratón, cada una en 4-14 ratas. Se observaron amplias variaciones individuales en la frecuencia de transmisión en ratas de la misma raza que recibieron inóculos similares. En dichos experimentos, la frecuencia de la transmisión no se vio afectada ni por la cepa, ni por la dosis de *Toxoplasma*, ni tampoco por el momento de la gestación en que fueron inoculadas (6-8 o 15 días).

Sin duda, la raza de rata empleada tiene importancia en la tasa de transmisión de *Toxoplasma*. Así, se observó más transmisión en ratas Long Evans que en ratas Wistar. Paulino y col. (1999), obtienen tan sólo 11.4 % y 3 % de transmisión connatal en ratas Wistar y Holzman, respectivamente, inoculadas con 10^2 ooquistes de *Toxoplasma*.

En 1999, Zenner y col. dan a conocer nuevas aplicaciones de su modelo en rata . Producen infecciones crónicas en ratas (n=5 a 10) antes de la gestación con las cepas RH, 76 K y Prugniaud. Luego las desafían durante la gestación en forma homóloga y heteróloga (aunque no enfrentan la inmunización con RH y el desafío con las cepas completas 76 K ó Prugniaud). Obtienen, en todos los casos, protección completa de las camadas (ausencia de infección toxoplásmica en ellas). En ensayos subsiguientes de la misma publicación, inmunizan ratas (n=4 a 8) con extracto de taquizoítos RH en adyuvante de Freund incompleto, con taquizoítos RH viables, con taquizoítos RH irradiados, o bien con antígenos de secreción-excreción. Obtienen casi 100 % de protección, también en estos casos. Cabe destacar, sin embargo, que en esta nueva serie de ensayos, desafiaron con la cepa RH (cepa incompleta) y por una vía que no es la natural (puesto que por vía oral los taquizoítos son inactivados por el jugo gástrico). Este aspecto es muy importante. Así, por ejemplo Wilkins (1988) no consigue evitar la infección connatal (aunque sí evita el aborto) de corderos cuyas madres fueron inmunizadas con una cepa igualmente incompleta y desafiadas oralmente con la cepa completa S89. Ello, a pesar que el ovino es una especie considerablemente resistente a la infección toxoplásmica, como la rata.

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

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

Las investigaciones de toxoplasmosis congénita experimental se resumen en el cuadro I.



Cuadro I.

Ensayos de transmisión trasplacentaria de toxoplasma en ratas, por inoculación oral.

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

(1) q. = quistes ooq. = ooquistes

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

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

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

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL:

Las ratas inmunizadas con las cepas de *Toxoplasma* mencionadas en 4.3 fueron servidas por los machos 2 meses más tarde. La cópula se constató mediante la visualización de esperma en el hisopado vaginal. A los 12 días de gestación fueron desafiadas con 10^3 quistes y 10^4 ooquistes de 3 cepas de *Toxoplasma* referidas en 4.3. Al parto, las camadas fueron subinoculadas en ratones para determinar la protección vaccinal cruzada ó la transmisión congénita. Por cada cepa de desafío utilizada, se inocularon ratas no inmunizadas, que sirvieron de controles de transmisión congénita.

4.2. ANIMALES:

Se utilizaron ratas de la raza Sprague Dawley de 200 gr. de peso corporal, debido a que en el Laboratorio de Toxoplasmosis de la Facultad de Veterinaria se ha configurado un modelo de toxoplasmosis en esta raza específicamente. Se utilizaron ratones de la cepa CF-1, de 20 gr de peso corporal, para obtener quistes de *Toxoplasma*, así como para los bioensayos. Fueron alojados en el bioterio de la Facultad de Veterinaria y alimentados con ración para roedores del Molino San José , Dpto. de San José (19% proteína).

Sólo se utilizaron ratas y ratones inicialmente libres de infección toxoplásmica. Se testaron muestras de suero de los animales mediante la reacción de aglutinación directa (AD) de Desmonts y Remington (1980). Se interpretó como reactivo, un animal cuyo suero fué positivo a la dilución 1:64 o mayor. La misma reacción se utilizó para comprobar la infección toxoplásmica (o su ausencia) en ratones subinoculados con tejidos fetales. La reacción de AD para toxoplasmosis ha demostrado alta sensibilidad y especificidad en ratas, ratones y ovinos con infección natural y experimental a *Toxoplasma*, en investigaciones previas del Laboratorio de Toxoplasmosis (Freyre y col., 1996, 1997, 1999-a-b, 2001) .

Se cumplió con los preceptos de la Comisión de Vigilancia de la Ética en Experimentación Animal de la Facultad de Veterinaria, con la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la UDELAR, con el Decreto de Protección Animal del 29.2.2000 y con la Ordenanza sobre Uso de Animales de Experimentación, Docencia e Investigación Universitaria del 21.12.99. Los recién nacidos y los adultos, fueron sacrificados por desnucamiento, una vez concluido su período experimental.

4.3. CEPAS DE TOXOPLASMA:

Cepas usadas para inmunizar: Se utilizaron las cepas Prugniaud y M3 de *Toxoplasma*, que son cepas completas del parásito. Esta última característica se considera importante para que intervengan más antígenos en la inmunización. Muchas otras cepas podrían cumplir este papel, además de las cepas mencionadas; simplemente se eligieron dos de ellas. Se utilizó la vía oral de inoculación.

Cepas usadas para desafiar: Se utilizaron las cepas Elg, Hopa-hopá y Prugniaud, de modo que los desafíos fueron homólogos y heterólogos. La vía de inoculación fue la oral, pues debía imitar la ruta de infección natural. Se administraron 10^3 quistes por rata en 2 de las cepas (Elg y Hopa Hopa); en el caso de los ooquistes se administró 10^4 ooquistes por rata en la cepa restante (Prugniaud) (cuadro II).

4.4. MÉTODO PARA LOGRAR LA CONCEPCIÓN DE LAS RATAS

Para lograr la concepción de las ratas, fueron alojadas a razón de un macho cada tres hembras.

Al día siguiente se inspeccionaron las hembras mediante hisopado vaginal, que permite evidenciar los espermatozoides depositados en la vagina. Su presencia guarda correlación de 95% con la futura gestación. Este procedimiento fue reiterado hasta que todas las ratas necesarias quedaran cubiertas. Esta metodología se ha revelado como la más eficaz en investigaciones previas del Laboratorio de Toxoplasmosis (Freyre y col., 1999-a, 2001).

4.5. OBTENCIÓN DE QUISTES DE TOXOPLASMA:

100. 1 5

Para la obtención de quistes de *Toxoplasma*, se inocularon ratones intraperitonealmente con quistes de las cepas mencionadas. Se utilizaron estos ratones luego de 30-60 días de la infección, como dadores de quistes cerebrales. Los quistes se administraron por boca a las ratas gestantes, a la dosis de 10^3 quistes por animal.

4.6. OBTENCIÓN DE OOQUISTES DE TOXOPLASMA:

Para la obtención de ooquistes del parásito, se obtuvieron gatitos recientemente destetados, negativos a la AD para toxoplasmosis a la dilución de 1:64. Procedieron del criadero del Laboratorio de Toxoplasmosis de la Fac. de Veterinaria. Se les suministrará el cerebro de un ratón con infección toxoplásmica crónica. Se colectarán las heces de los días 4 a 7 posinfección, las que se concentrarán por el método de Sheather modificado y se incubarán con agitación en 2% de ácido sulfúrico durante 96 hs. hasta completar la esporulación. Previa neutralización y enumeración, los ooquistes serán inoculados por boca en ratas. La dosis de desafío será de 10.000 ooquistes esporulados por rata.

4.7. MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN TRASPLACENTARIA (BIOENSAYOS):

Una vez nacidas las camadas, se subinocularon de inmediato en ratones. Los órganos utilizados fueron hígado, pulmón y cerebro de los neonatos. Se utilizaron los órganos de la mitad de las camadas que tuvieron ocho o más neonatos, y de toda la camada cuando ésta era menor a ocho neonatos. Al cabo de 30 días, se buscaron anticuerpos antitoxoplásmicos mediante la reacción de AD en el suero de los ratones. Se consideró que los fetos estaban protegidos, cuando las subinoculaciones de tejidos de neonatos resultaban negativas para *Toxoplasma*.

4.8. **TRATAMIENTO ESTADÍSTICO:**

Para detectar toda asociación entre transmisión congénita en ratas inmunizadas y no inmunizadas (controles) y las cepas de *Toxoplasma* utilizadas para los desafíos, se utilizó el test de asociación de X^2 con la corrección de Yates, al nivel de significación de 0,05.

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

Se aplicaron las Normas de Bioseguridad del Laboratorio de toxoplasmosis del Dpto. de Parasitología de la Facultad de Veterinaria, aprobados en abril de 2003 por el Consejo respectivo.

5. RESULTADOS

Los resultados obtenidos se resumen en el Cuadro II.

Se inmunizó un total de 33 ratas, con 2 cepas de *Toxoplasma*, que fueron posteriormente desafiadas con quistes y ooquistes de 3 cepas del parásito. Treinta y ocho ratas más sirvieron de controles, siendo sólo inoculadas durante la gestación.

En las ratas que fueron inmunizadas y luego desafiadas durante la gestación con cepas homólogas de *Toxoplasma* (Prugniaud/ Prugniaud), se observó una protección elevada (88%), estadísticamente significativa, contra la toxoplasmosis congénita, así como contra una cepa heteróloga en que la protección sí fue total (M3/Elg) y también estadísticamente significativa. Es decir, la protección heteróloga no fue total en la mayoría de las combinaciones estudiadas, como las combinaciones Prugniaud/Elg, Prugniaud/ HopaHopa, M3/HopaHopa y M3/Prugniaud.

En aquellas ratas que no fueron inmunizadas pero sí desafiadas, se demostró la transmisión congénita en 7 de 10 ratas inoculadas con la cepa Elg, 7 de 14 ratas inoculadas con la cepa Hopa Hopa, y 6 de 14 ratas inoculadas con la cepa Prugniaud.

CUADRO N° II

Resultados de la transmisión congénita de *Toxoplasma* en ratas inmunizadas per os y desafiadas per os durante la gestación con cepas homólogas y heterólogas del parásito, y sus respectivos controles.

<u>Cepas de <i>Toxoplasma</i> utilizadas para inmunizar</u> (200 quistes per os)	<u>Cepas de <i>Toxoplasma</i> utilizadas para el desafío</u>		
	10 ³ QUISTES	10 ⁴ OOQUISTES	
	ELG	HOPA HOPA	PRUGNIAUD
PRUGNIAUD	1/4 ⁽¹⁾	3/5	1/9
M3	0/5	2/5	3/5
Controles (ratas no inmunizadas, pero desafiadas)	7/10	7/14	6/14

⁽¹⁾ Numerador: ratas en las que hubo transmisión congénita.
Denominador: total de ratas investigadas.

6. DISCUSIÓN

Se observó protección elevada, en el grupo de ratas inmunizadas pre-gestación y desafiadas durante la gestación con la misma cepa del parásito y sólo en una cepa heteróloga de desafío en la que la protección fue total; pero en la mayoría de las combinaciones heterólogas la protección fue parcial o nula. Es decir, que no hubo protección heteróloga total en todas las combinaciones estudiadas. Estos resultados son divergentes con los obtenidos con 2 cepas de *Toxoplasma* en ratas (76 K y Prugnialud), entre las que se manifestó protección total (Zenner, 1993; Zenner y col., 1999). No resultó evidente el motivo de tal divergencia.

Opuestamente a los resultados de protección heteróloga parcial aquí obtenidos, es un hecho bien conocido que la infección de la mujer y de la oveja con *Toxoplasma*, protege al feto de una gestación subsecuente, contra la infección con el parásito.

Para explicar esta divergencia, se emite una hipótesis en tres proposiciones:

1. Antes de su primera gestación, las mujeres tendrían la oportunidad de infectarse con más de una cepa de *Toxoplasma* inmunológicamente diferente, de modo que una reinfección durante la gestación difícilmente resultaría heteróloga.
2. Otra explicación sería que la mayoría de las mujeres de un mismo nicho ecológico, se infectarían antes y durante la gestación con cepas toxoplásmicas inmunológicamente similares o idénticas. Existe evidencia molecular que avala la existencia de infecciones toxoplásmicas múltiples en humanos (Aspinall y col., 2003).
3. Existirían particularidades de las cepas de *Toxoplasma* y/o de los animales usados en nuestro trabajo, responsables de la brecha observada respecto al referente humano. En particular, la dosis de desafío utilizada, puede ser desproporcionada en relación al peso corporal de la rata, si se considera sólo aproximadamente, que 50g de carne de cerdo pueden contener 1 quiste de *Toxoplasma*. (Dubey and Thayer, 1994).

No es posible por ahora determinar si alguna de las dos primeras proposiciones es la correcta. Existen ejemplos de varias cepas de *Toxoplasma* aisladas de personas que habitan en un mismo nicho ecológico. Sería necesario definir la eventual existencia de inmunotipos. En cambio, es mucho más factible abordar la tercera proposición, optimizando el modelo rata empleado.

7. CONCLUSIONES

- Las cepas Prugniaud y M3 de *Toxoplasma*, productoras de quistes y ooquistes brindaron protección inmunológica cruzada parcial contra la toxoplasmosis congénita experimental, generada por 3 cepas de *Toxoplasma* diferentes, bajo dos estadios diferentes.
- La causa de este desencuentro con los referentes humano y ovino (en los que la infección toxoplásmica previa ocasiona protección completa), podría ser el uso de dosis demasiado elevadas de desafío con *Toxoplasma*.

En próximos proyectos de investigación, debería evaluarse esta posibilidad. Si esta no fuera la causa, se podrían incluir antígenos provenientes de otras cepas que muestren protección complementaria contra la toxoplasmosis congénita.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alexander, J.(1996) Immunological Control of *Toxoplasma gondii* and Appropriate Vaccine Design. In: Current Topics in Microbiology and Immunology, Vol. 219. Ed. V. Gross. *Toxoplasma gondii*. Springer-Verlag. Berlín, pp. 183-195.
2. Aspinall TV, Marlee D, Hyde JE, Sims PFG (2003) Molecular evidence for multiple *Toxoplasma gondii* infections in individual patients in England and Wales : public health implications. *Int J Parasitol*; 33:97-103.
3. Angus CW, Klivington-Evans D, Dubey JP, Kovacs J (2000) Immunization with a DNA Plasmid Encoding the SAG1 (P30) Protein of *Toxoplasma gondii* Is Immunogenic and Protective in Rodents. *J Inf Dis*; 181: 317-24.
4. Büllow R, Boothroyd JC (1991) Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigen in liposomes. *J Immunol*; 147: 3496.
5. Choromanski L, Freyre A, Brown K(1994) Safety aspects of a vaccine for cats containing a *Toxoplasma gondii* mutant strain. *J Euk Microbiol*; 4:8.
6. Conti Díaz IA, Freyre A, Queiruga G, Noya C, Mendez J, Gedda C, Reig B, Acosta M, López Jordi J, González Banfi A (1998) Estudio de la toxoplasmosis en la Unidad de Perinatología del BPS en el período 1991 - 1996. *Rev Med Uruguay*; 14: 226-235.
7. Desmonts G, Remington JS (1980) Direct agglutination test for Diagnosis of *Toxoplasma* Infection: Method for Increasing Sensitivity and Specificity. *J Clin Microbiol*; 11:562-568.
8. Dubey JP, Shen SK, Kwok OCH, Thuilliez P (1997) Toxoplasmosis in rats (*Rattus norvegicus*): congenital transmission to first and second generation offspring and isolation of *Toxoplasma gondii* from seronegative rats. *Parasitol*; 115: 9-14.
9. Dubey, J.P.(1996) Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. *Vet Parasitol*; 64: 65-70.
10. Dubey JP, Thayer DW (1994). Killing of different strains of *Toxoplasma gondii* tissue cysts by irradiation under defined conditions. *J Parasitol*; 80: 764-767.
11. Dubey JP, Shen SK (1991) Rat Model of Congenital Toxoplasmosis. *Inf Immun*; 59:3301-3302.

12. Dubey JP, Urban JF Jr, SW Davis (1991) Protective immunity to toxoplasmosis in pigs vaccinated with a non persistent strain of *Toxoplasma gondii*. Am J Vet Res; 52:1316-1319.
13. Duquesne V, Auriault C, Darcy F, Decavel JP, Capron A (1990) Protection of Nude Rats against *Toxoplasma* Infection by Excreted-Secreted Antigen-Specific Helper T Cells. Infect Immun; 58(7):2120-2126.
14. Frenkel JK, Pfefferkorn E (1991) Prospective vaccine prepared from a new mutant of *Toxoplasma gondii* for use in cats. Am J Vet Res; 52: 759-763.
15. Freyre A, Falcón J, Mendez J, Rodriguez A, Correa O (2005) Partial cross-protection among 4 strains of toxoplasma against congenital transmission in a rat model. Exptal Parasitol. In press.
16. Freyre A, Falcón J, Correa O, Mendez J, González M, Venzal J (2001) Some factors influencing transmission of *Toxoplasma* in pregnant rats fed cysts. Parasitol Res; 87: 941-944.
17. Freyre A, Falcón J, Correa O, Mendez J, González M, Venzal J (2000) Residual infection of fifteen *Toxoplasma* strains in the brain of rats fed cysts. Parasitol Res; 87:915-918.
18. Freyre A, Falcón J, Correa O, Mendez J, González M, Venzal J(1999-a) Congenital transmission of experimental chronic toxoplasmosis in rats. J Parasitol; 85:746-748.
19. Freyre A, Bonino J, Falcón J, Castells D, Correa O, Casaretto A (1999-b)The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. Vet Parasitol; 81: 85-88.
20. Freyre, A.(1998) Vacunas contra *Toxoplasma*. En: Segundo Congreso Internacional de Toxoplasmosis. Santa Fé de Bogotá, Colombia, 1998. Eds: Carvajal H, Frenkel J K, N de Sanchez, pp 1-5.
21. Freyre A, Bonino J, Falcón J (1997) Aborto ovino toxoplásmico: su significación económica en el Uruguay. Producción ovina. 10:29-42.
22. Freyre A, Falcón J, Mendez J, Gedda C, D'Angelo JM (1996) Evaluación de las pérdidas económicas debidas a toxoplasmosis en ovinos en el Uruguay. Parasitología al Día (Chile); 20:100-108.
23. Freyre A, Fishbach J, Popiel I, Choromansky L (1993) Immunization of cats with tissue cysts, bradyzoites, and tachyzoites of the t-263 strain of *Toxoplasma gondii*. J. Parasitol; 79:716-719.

24. Freyre A, Queiruga G, Méndez J, Lavarello L (1992) Riesgo de infección toxoplásmica del feto humano en Montevideo. *An. Clínicos (España)* 4:122-127.
25. Freyre A, Falcón J (1989) *Toxoplasmosis en las especies domésticas y como zoonosis*. Montevideo Ed.. Departamento de Publicaciones de la Universidad, 338 p.
26. Kempf MC, Cesbron MF, Deslee D, Hermann T (1999) Different manifestations of *Toxoplasma gondii* infection in F344 and LEW rats. *Med Microbiol Immunol*;187: 137-142.
27. Khan IA, Ely K, Kasper H (1991) A purified parasite antigen (p 30) mediates CD8+ T cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J Immunol*; 147: 3501-3506.
28. Nielsen HV, Innes EA, Petersen E, Buxton D (2000) Strategies for development of vaccines against *Toxoplasma gondii*. *In: Congenital toxoplasmosis*. Berlín P.A. Thomas, E. Petersen (ed.) pp. 314-322.
29. Paulino JP, Vitor R (1999) Experimental congenital toxoplasmosis in Wistar and Holzman rats. *Parasite*; 6:63-6.
30. Roberts CW, Brewer JM, Alexander J (1994) Congenital toxoplasmosis in the Balb/c mouse: prevention of vertical disease transmission and fetal death by vaccination. *Vaccine*; 12: 1389-1394.
31. Schoondermark Van de Ven. (1993) Congenital toxoplasmosis: an experimental study in rhesus monkeys for transmission and prenatal diagnosis. *Exptl. Parasitol*; 77:200-11.
32. Thiermann E.(1957) Transmisión congénita del *Toxoplasma gondii* en ratas con infección leve. *Biológica*; 23: 59-67.
33. Velge-Roussel F, Marcelo P, Lepage AC, Buzoni-Gatel D, Bout DT (2000) Intranasal Immunization with *Toxoplasma gondii* SAG1 Induces Protective Cells into Both NALT and GALT Compartments. *Inf Immun*; p. 969-972.
34. Vercammen M, Scorza T, Huygen K, De Braekeleer J, Diet R, Jacobs D, Saman E, Verschueren H (2000) DNA Vaccination with Genes Encoding *Toxoplasma gondii* Antigens GRA1, GRA7, and ROP2 Induces Partially Protective Immunity against Lethal Challenge in Mice. *Inf Immun*; p.38-45.
35. Wilkins M F, O'connell E, Tepunga WA. *Toxoplasmosis in sheep III*. (1988) Further evaluation of the ability of a live *Toxoplasma gondii* vaccine to prevent lamb losses and reduce congenital infection following experimental oral challenge. *N Zeal Vet J*; 36 :86-89.

36. Zenner L, Estaquier J, Darcy F, Maes P, Capron A, Cesbron-Delaw M (1999), Protective immunity in the rat model of congenital toxoplasmosis and the potential of excreted-secreted antigens as vaccine components. *Par Immun*; 21: 261-72.
37. Zenner, L.(1993) Rat Model of Congenital Toxoplasmosis: Rate of Transmission of Three *Toxoplasma gondii* Strains to Fetuses and Protective Effect of a Chronic Infection. *Inf Immun*; 360-363.