

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**ENSAYO DE LA PROTECCIÓN CONTRA LA TOXOPLASMOSIS CONGÉNITA
OBTENIDA MEDIANTE LA INMUNIDAD ESTÉRIL POR LAS VÍAS
SUBCUTÁNEA E UNTRAVENOSA, EN EL MODELO RATA**

por

Lorena LOPEZ



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

Orientación: Medicina Veterinaria

MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2007**

077 TG
Ensayo de la pr
López, Lorena



FV/27507

TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente de Mesa:



P.A. Ceballos

Segundo Miembro (Tutor):



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

Tercer Miembro (Co-tutor):



Fecha:

19/12/2007

Autores:



Nombre completo y firma
LORENA FERNANDA LÓPEZ ESTÉVEZ

Nombre completo y firma

Nombre completo y firma

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Parasitología de la Facultad de Veterinaria, UdelaR.
Por haber abierto sus puertas y permitirme desarrollar dicha tesis, en el departamento.

A mi tutor Dr. Álvaro Freyre por la dedicación y la colaboración que recibí por parte de él en todo momento.

Al Dr. Jesús Falcón por su ayuda en lo que fue la ejecución de los diferentes experimentos y la colaboración brindada en la compaginación de dicho trabajo.

A la Q.F. Juliana Méndez por el procesamiento de todas las muestras de los experimentos y por el tiempo dedicado a nuestra tesis.

A Jorge Claro por la ayuda que nos dio en lo correspondiente al manejo animal y su colaboración en los experimentos.

A la Dra. Patricia González por su colaboración en el desarrollo de los trabajos.

A la Dra. Laura Correa por su dedicación y apoyo.

TABLA DE CONTENIDO



Página

PAGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	IV
1. <u>RESUMEN</u>	1
1.1. <u>SUMMARY</u>	2
2. <u>INTRODUCCIÓN</u>	3
3. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	6
3.1. El modelo rata para el estudio de la inmunidad contra la toxoplasmosis connatal.....	6
4. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	8
4.1. <u>ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN</u>	8
4.2. <u>DISEÑOS EXPERIMENTALES</u>	9
4.3. <u>MATERIALES</u>	10
4.4. <u>MÉTODOS</u>	11
5. <u>RESULTADOS</u>	13
6. <u>DISCUSIÓN</u>	14
7. <u>CONCLUSIONES</u>	15
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	16
9. <u>ANEXO</u>	20

LISTA DE CUADROS:

Página

Cuadro I: Ensayos de transmisión trasplacentaria de <i>Toxoplasma</i> en ratas, por inoculación oral.....	25
Cuadro II. Resultados de experimentos de inmunización con una cepa completa (productora de quistes y ooquistes) de <i>Toxoplasma</i> seguida de medicación supresiva y posterior desafío con bradizoítos y ooquistes del parásito.....	27

RESUMEN

El objetivo es el ensayo de la protección contra la toxoplasmosis congénita mediante la inmunidad estéril por las vías s.c. e i.v., en el modelo rata.

Resultados: es posible lograr la inoculación experimental de ratas Fischer por las vías subcutánea o intravenosa con una cepa de *Toxoplasma* y evitar la infección residual mediante medicación supresiva. Sin embargo, únicamente la inmunización realizada por la vía intravenosa, generó protección contra la transmisión congénita experimental de la toxoplasmosis, y fue dependiente del estadio evolutivo utilizado para desafiar..

Conclusiones: Cuando se intente generar inmunidad estéril contra la toxoplasmosis congénita experimental en ratas mediante inoculación con cepas completas del parásito, seguida de medicación supresiva para evitar la infección residual, deberá utilizarse la vía intravenosa, pero no la vía subcutánea. Asimismo, es necesario investigar la utilidad de la inoculación oral para el mismo propósito.

SUMMARY

Dr. Doe. y Bida

The goal is to test protection against congenital toxoplasmosis by means of sterile immunity by the s.c. and i.v. routes.

Results: the immunization of rats by the s.c. inoculation of tachyzoites or bradyzoites of complete strains of the parasite, followed by suppressive medication, is unsuccessful. Nevertheless, it is possible to reach protection by means of tachyzoites inoculated by the i.v. route, followed by suppressive medication.

Conclusions: Whenever the generation of sterile immunity against congenital experimental toxoplasmosis in rats followed by suppressive medication is the goal, the intravenous but not the subcutaneous route should be used. Also, it is necessary to investigate the oral inoculation for the same purpose.

2. INTRODUCCIÓN

La presente tesis guarda una raíz común con la tesis defendida por la Dra. P. González (2007), en el sentido que en ambas investigaciones se indaga la protección contra la toxoplasmosis congénita en el modelo rata, aunque mediante la inmunidad estéril obtenida por dos métodos diferentes, como se explica al final de esta introducción. Por lo dicho, las introducciones de sendas tesis con considerablemente similares. La revisión bibliográfica es idéntica. También, varios de los materiales y métodos utilizados son comunes a ambas tesis.

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.

Existe el antecedente casi inmediato de las tesis Dras. Laura Correa (2004) y Ana Cardoso (2005), de ensayo de inmunidad cruzada en el modelo rata, efectuando desafíos con la fase quística y ooquistica de *Toxoplasma*. En ellos se constató la existencia de inmunidad cruzada en proporciones muy altas, aunque no en forma total, debido probablemente a la utilización de dosis de desafío excesivamente elevadas. En una tesis posterior (González, 2007), se obtuvo protección inmune en la totalidad de las ratas inmunizadas con la cepa RH, y se observa-por comparación con las tesis anteriormente mencionadas-que esta

protección está en función del tamaño de la dosis de desafío con ooquistes y bradizoítos de tres cepas diferentes del parásito.

En la presente tesis, se indaga la protección contra la toxoplasmosis congénita en el modelo rata mediante La inmunidad estéril por las vías s.c. e i.v.

La hipótesis que sustenta al objetivo, es que se obtendrá protección mediante la inmunidad estéril conferida por una infección con la cepa ME-49, coartada mediante el uso de sulfadiazina y pirimetamina. Se aproxima así aún más la situación experimental a la situación real, al reducir el estímulo antigénico en el tiempo y también en su dispersión en la economía del huésped (por medio de la mediación supresiva), asimilándose así a la situación de la aplicación de un inmunógeno a subunidad. Por otra parte, la diferencia entre las cepas RH y ME-49, es que la primera se trata de una cepa incompleta, es decir que ha perdido la capacidad de generar quistes y ooquistes. Esta pérdida conlleva seguramente la pérdida de antígenos que eventualmente pueden tener capacidad protectora. La cepa ME-49 por el contrario, es una cepa completa, es decir, que mantiene todos sus antígenos originales.

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 Prugnauud. 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 Prugnauud). 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 desafiada 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.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

Primeramente se determinará el método para coartar con sulfadiazina y pirimetamina las infecciones toxoplásmicas inducidas por la vía s.c. con una cepa completa (ME-49) de *Toxoplasma* (Experimento 1). Una vez en posesión de dicho conocimiento, se empleará para inducir infecciones toxoplásmicas por inoculación subcutánea de taquizoítos (Experimento 2) y de bradizoítos (Experimento 3), seguidas de medicación supresiva, para asimilar la situación experimental lo más posible a la situación real de inmunización, en que los inmunógenos actúan por mecanismos de inmunidad estéril, en el caso de las vacunas a subunidad. Como experimento de alternativa, frente a la eventualidad del insuceso de los Experimentos 2 y/o 3, se determinó el método para la inoculación de taquizoítos por la vía i.v., seguida de supresión farmacológica (Experimento 4). Una vez con este conocimiento, se intentó la inmunización con taquizoítos vía i.v., seguida de tratamiento supresor, y su desafío con quistes y ooquistes del parásito (Experimento 5).

4.2. DISEÑOS EXPERIMENTALES.

4.2.2.1. Experimento No. 1. Determinación de un método para coartar terapéuticamente la infección toxoplásmica inducida con una cepa completa por las vías s.c (taquizoítos y bradizoítos)

Las ratas Fischer de un grupo de 4 animales, de aproximadamente 200 g de peso corporal, recibieron 10^7 taquizoítos de la cepa Prugniaud por vía subcutánea, en 4 puntos distintos en el dorso. Otro grupo de 4 ratas fue inoculado con 10^7 taquizoítos de la cepa ME49 por la misma vía. Otro grupo de 4 ratas fue inoculado con 10^7 bradizoítos por la vía s.c., en tanto que dos grupos más de 9 y 5 ratas recibieron cantidades similares de bradizoítos Prugniaud y ME-49, respectivamente. Simultáneamente, fueron medicadas con 10 mg de sulfadiazina sódica y 200 μ g de pirimetamina 2 veces al día, con un tomero. La primera dosis fue siempre administrada previo ayuno de 12 horas. Simultáneamente, los animales quedaron con agua de bebida conteniendo 10 mg sulfadiazina sódica por cc. Este esquema terapéutico responde a la información de que la vida media de la sulfadiazina en sangre, es de 5 horas (Schoondermark, 1993), y se prolongó durante 15 días. Luego de cesada la administración de las drogas, se dejó transcurrir 25 días, para posibilitar la multiplicación de *Toxoplasma* y facilitar así un eventual bioensayo positivo. Luego de este período, se sacrificaron las ratas, para realizar el bioensayo de cerebro y músculo, cada uno en 2 ratones CF-1. El

bioensayo de cerebro se efectuó a partir de un hemisferio cerebral por cada rata, y el de músculo, con un miembro posterior completo, dado a comer a dos ratones ayunados 12 horas. Luego de 25 días, se sangraron los ratones, y se practicó la reacción de AD con sus sueros.

4.2.2.2. Experimento No.2. Inmunidad estéril tras inoculación con taquizoítos de una cepa completa (ME49) de *Toxoplasma* por vía s.c., y medicación supresiva.

En este experimento se indagará la protección tras la inoculación con taquizoítos de la cepa ME-49, una cepa completa de *Toxoplasma* por la vía s.c. y subsiguiente esterilización parasitológica con quimioterapia específica. El esquema de inmunización y tratamiento se hará siguiendo los mejores resultados obtenidos en el Experimento No. 1. Los desafíos se harán con la cepa M7741 de *Toxoplasma*. En cuanto a los estadios utilizados para desafiar, en principio se utilizarán bradizoítos y ooquistes de *Toxoplasma*. Este experimento lleva además controles de ratas no inmunizadas pero desafiadas con inóculos similares.

4.2.2.3. Experimento No.3. Inmunidad estéril tras inoculación vía s.c. con bradizoítos de una cepa completa (ME49) de *Toxoplasma* y medicación supresiva.

En este experimento se indagará la protección tras la inoculación con bradizoítos de la cepa ME-49, una cepa completa de *Toxoplasma* por la vía s.c. y subsiguiente esterilización parasitológica con quimioterapia específica. El esquema de inmunización y tratamiento se hará siguiendo los mejores resultados obtenidos en el Experimento No. 1. Los desafíos se harán con la cepa M7741 de *Toxoplasma*. En cuanto a los estadios utilizados para desafiar, en principio se utilizarán quistes y ooquistes de *Toxoplasma*. Este experimento lleva además controles de ratas no inmunizadas pero desafiadas con inóculos similares.

4.2.2.4. Experimento No. 4. Determinación de un método para coartar terapéuticamente la infección toxoplásmica inducida con una cepa completa por la vía i.v. (taquizoítos).

Este experimento se desarrolló en forma muy similar al Experimento No.1, con la diferencia que 4 ratas recibieron 10^7 taquizoítos ME-49 por vía endovenosa, utilizándose para ello las venas de la cola y una jeringa con aguja 27 G.

4.2.2.5. Experimento No. 5. Inmunidad estéril tras inoculación con taquizoítos de una cepa completa (ME49) de *Toxoplasma* por vía i.v, y medicación supresiva.

En este experimento se indagará la protección tras la inoculación con taquizoítos de la cepa ME-49, una cepa completa de *Toxoplasma* por la vía i.v. y subsiguiente esterilización parasitológica con quimioterapia específica. El esquema de inmunización y tratamiento se hará siguiendo los mejores resultados obtenidos en

el Experimento No. 4. Los desafíos se harán con la cepa M7741 de *Toxoplasma*. En cuanto a los estadios utilizados para desafiar, en principio se utilizarán quistes y ooquistes de *Toxoplasma*. Este experimento lleva además controles de ratas no inmunizadas pero desafiadas con inóculos similares.

4.3. MATERIALES.

4.3.1. Animales

Se utilizaron ratas de la raza Fischer. Se trata de una raza endogámica que teóricamente dará resultados considerablemente homogéneos. Se utilizarán ratones de la cepa CF-1, de 20 gr de peso corporal, para obtener taquizoítos y bradizoítos de *Toxoplasma*, así como para los bioensayos. Se utilizaron gatos de la raza europea, procedentes del criadero del Laboratorio de Toxoplasmosis.

Solo 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 Desmots y Remington, con el uso de 2-ME (J. Clin.Microbiol., 11:562-568,1980). Se interpretó como reactivo, un animal cuyo suero fue 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 manos de los autores.

En cuanto al cumplimiento con la ética de experimentación animal, 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.

4.3.2. Cepas de *Toxoplasma*

Cepas usadas para inmunizar: Se utilizaron las cepas ME-49 y Prugniaud, que son cepas completas (formadora de quistes y ooquistes). Esta característica se considera importante para que intervengan en la inmunización más antígenos.

Cepas usadas para desafiar: Se utilizó la cepa M-7741, aislada de un caso de aborto ovino toxoplásmico en Estados Unidos.

4.4. MÉTODOS

4.4.1. Método para determinar la concepción de las ratas

Para lograr la concepción de las ratas, fueron alojadas a razón de 1 macho cada 4 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 80% con la futura gestación. Se repitió este procedimiento hasta que todas las ratas necesarias quedaron cubiertas. Esta metodología se ha revelado como la más eficaz en investigaciones previas de los autores.

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

Una vez nacidas las camadas, se subinocularon de inmediato en ratones. Para ello se utilizaron los hígados y pulmones de los neonatos. Se utilizaron los órganos de la mitad de las camadas que tenían ocho o más neonatos, y de toda la camada si ésta tuvo menos de ocho neonatos. Al cabo de 30 días, se buscaron anticuerpos antitoxoplásmicos mediante la reacción de AD en el suero de los ratones receptores. Se consideró que los neonatos estuvieron protegidos, cuando las subinoculaciones de sus tejidos resultaron negativas para *Toxoplasma*.

4.4.4. Obtención de quistes de *Toxoplasma*

Para la obtención de quistes de *Toxoplasma*, se inocularon ratones intraperitonealmente con quistes de la cepa ME49 y de las cepas de desafío. Se utilizaron estos ratones luego de 30-60 días de la infección, como dadores de quistes cerebrales. Los cerebros se homogeneizaron mediante pasaje en una jeringa con aguja 19G, con 1 cc de PBS por cerebro. Para la liberación de bradizoítos, se digirieron con 5 mg /ml de pepsina durante 5 minutos a 37° C. Se contaron los bradizoítos en cámara de Neubauer.

4.4.5 Obtención de ooquistes de *Toxoplasma*.

Para la obtención de ooquistes del parásito, se inocularon gatitos recientemente destetados, negativos a la AD para toxoplasmosis a la dilución de 1:64. Procedieron del criadero del Laboratorio de Toxoplasmosis de la Fac. de Veterinaria. Se les suministró el cerebro de un ratón con infección toxoplásmica crónica. Se colectaron las heces de los días 4 a 7 posinfección, las que se concentraron por el método de Sheather modificado, y se incubaron con agitación en 2% de ácido sulfúrico durante 96 hs. hasta completar la esporulación. Previa neutralización y enumeración, los ooquistes fueron inoculados por boca en ratas.

Para lograr la concepción de las ratas, serán alojadas a razón de 1 macho cada 4 hembras. Al día siguiente se inspeccionarán las hembras mediante hisopado vaginal, que permite evidenciar los espermatozoides depositados en la vagina. Su presencia guarda correlación de 80% con la futura gestación. Se repetirá este procedimiento hasta que todas las ratas necesarias queden cubiertas. Esta metodología se ha revelado como la más eficaz en investigaciones previas de los autores.

4.4.6. Determinación del índice de protección vaccinal

El índice de protección vaccinal fue calculado de la siguiente manera (Prof. L. Lavarello, Dpto. de Estadística, Fac. Veterinaria de Montevideo, comunicación personal a A. Freyre, 1995):

$$\% \text{ protección} = 100 \left(1 - \frac{a' \cdot b}{b' \cdot a} \right)$$

donde:

a': cantidad de camadas infectadas nacidas de madres inmunizadas

b: cantidad total de camadas control (nacidas de madres no inmunizadas, inoculadas durante su gestación).

b': camadas infectadas nacidas de madres control

a: cantidad total de camadas nacidas de madres inmunizadas, inoculadas durante la gestación.

4.4.7. Análisis estadístico de los resultados

Para detectar toda asociación entre la transmisión congénita en ratas inmunizadas y no inmunizadas (ratas control) y las cepas de *Toxoplasma* utilizadas para desafiar, se utilizó el test de asociación de X^2 con la corrección de Yates, a un nivel de significación de $\alpha=0.05$.

4.4.8. Propuesta de un plan de análisis para la verificación o rechazo de las hipótesis.

La comparación de la frecuencia del pasaje congénito de *Toxoplasma* entre ratas inmunizadas según las distintas variables propuestas en este proyecto, y ratas no inmunizadas, permitió concluir si las variables analizadas condujeron al otorgamiento de una protección inmunitaria satisfactoria. En general, se considera que una protección vaccinal es buena cuando no menos del 80% de los animales inmunizados quedan protegidos contra el desafío. Este análisis permitió verificar o rechazar cada una de las hipótesis planteadas en esta propuesta.

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

Se aplicaron las directivas de la Organización Mundial de la Salud para la salvaguardia de las personas involucradas en el presente proyecto de trabajo,

contra el riesgo de infección toxoplásmica (Organización Mundial de la Salud. Informe de un comité de expertos de la OMS. Serie de Informes Técnicos 1994). Se aplicaron asimismo las "Normas de Bioseguridad del Laboratorio de Toxoplasmosis de la Facultad de Veterinaria," del 30 de abril del 2002.

5. RESULTADOS

Los bioensayos de cerebro y músculo de las 4 ratas que recibieron taquizoítos Prugnau por vía subcutánea, resultaron negativos, así como los de aquellas que recibieron taquizoítos ME-49, seguido de medicación supresiva (Experimento No.1). También resultaron negativos los bioensayos de los tres ensayos realizados con bradizoítos inoculados por la vía s.c. (Experimento No. 4). Por ello, se procedió a adoptar este método de esterilización farmacológica para los experimentos subsiguientes.

Los intentos de inmunizar ratas por inoculación subcutánea de taquizoítos o de bradizoítos, seguida de coartación farmacológica (Experimentos 2 y 3), resultaron infructuosos, según se desprende de los datos contenidos en el cuadro II: en el experimento 2, 3 de las 3 ratas desafiadas con ooquistes M7741 y 7 de 8 ratas desafiadas con bradizoítos M7741, transmitieron la toxoplasmosis congénita a su descendencia. En el Experimento 3, 6 de 9 ratas desafiadas con ooquistes y 7 de 9 ratas desafiadas con bradizoítos M7741 M7741, transmitieron la toxoplasmosis a sus fetos.

Los bioensayos de cerebro y músculo de las 4 ratas que recibieron taquizoítos ME-49 por vía i.v., (Experimento No.4), fueron negativos para *Toxoplasma*, tras la aplicación de medicación supresiva. Por ello, se procedió a adoptar este método de esterilización farmacológica para los experimentos subsiguientes.

Se observó la factibilidad de obtener protección mediante la inoculación de taquizoítos por la vía i.v., seguida de coartación farmacológica, aunque estuvo en función del estadio de desafío usado. En el Experimento No. 5, en efecto, se obtuvo protección total en 7 ratas desafiadas con bradizoítos (cuadro II). Sin embargo, la protección contra el estadio ooquistico, fue nula: 2 de 3 ratas desafiadas con este estadio de la cepa M7741, transmitieron la toxoplasmosis congénita (Experimento 5, cuadro II).

Las expresiones de presencia a ausencia de protección surgieron luego del análisis estadístico de los resultados, con significación estadísticamente válida para dichas expresiones.

6. DISCUSIÓN

6.1. Comparación entre la protección conferida por la cepa RH (incompleta) y cepas completas del parásito.

La protección conferida por la inmunización con la cepa ME-49 seguida de medicación supresiva (Experimento 2), fue tan pobre como la ejercida por la cepa RH frente a similar desafío con 10^3 ooquistes M-7741 (Gonzalez, 2007). Cabe preguntarse si ello no se debió a una inmunidad deficiente, vinculada con el método de supresión farmacológica de la infección primaria. Esta hipótesis estaría apoyada por el hecho de que los desafíos con 10^2 ooquistes y con 10^4 bradizoítos, mostraron menor protección en los animales del experimento 3 y parte del experimento 5, que también recibieron supresión farmacológica.

Imposibilidad de obtener inmunización por la vía s.c. con coartación farmacológica.

La razón por la cual no se obtuvo inmunización por la vía subcutánea (Experimentos 2 y 3), es difícil de determinar con precisión bajo las condiciones experimentales dadas. Una hipótesis sería que la inmediatez de la medicación supresiva de *Toxoplasma* impediría la reproducción de los organismos inoculados, disminuyendo el estímulo antigénico. Prueba indirecta de ello sería el hecho de que la cepa RH, inoculada por vía s.c. pero sin supresión farmacológica, fué capaz de proteger contra ambos estadios de la misma cepa M7741, a pesar de tener un espectro antigénico más reducido (González, 2007). La otra hipótesis, muy a considerar, es que la vía oral de inmunización sería mucho más eficaz que otras vías posibles, por detener al parásito en su propia puerta de entrada al organismo. Esta hipótesis tiene varios defensores (Bout, 2002), aunque en nuestro concepto, por más sensata que parezca, nunca ha sido demostrada.

6.2. Los taquizoítos, por vía i.v., en modalidad de infección coartada farmacológicamente, protegen completamente contra desafíos con bradizoítos.

Esta conclusión se extrae de los resultados del Experimento No.5. Es importante destacar que la protección enunciada se ejerce contra el desafío con una cepa heteróloga. La importancia de estas conclusiones radica en que seleccionar unidades antigénicas por su capacidad inmunogénica es aún más fácil si se puede partir-como es el caso- de un estadio de multiplicación aún más fácil en la práctica que el bradizoíto: el taquizoíto. Más aún, al haberse constatado que el taquizoíto de *Toxoplasma* es capaz de proteger contra el bradizoíto, se pueden descartar

del arsenal a seleccionar antígenos, aquellos que sean privativos de uno u otro estadio, simplificándose de este modo la tarea de selección subantigénica.

7. CONCLUSIONES

Cuando se intente generar inmunidad estéril contra la toxoplasmosis congénita experimental en ratas mediante inoculación con cepas completas del parásito, seguida de medicación supresiva para evitar la infección residual, deberá utilizarse la vía intravenosa, pero no la vía subcutánea. Asimismo, es necesario investigar la utilidad de la inoculación oral para el mismo propósito.

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. Bout, D., Mévélec, M.N., Velge-rousell,F., Dimier-Poisson,I., Lebrun ;m. (2002). Prospects for a human *Toxoplasma* vaccine. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2:227-34.
5. Büllow R, Boothroyd JC (1991) Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigen in liposomes. *J Immunol*; 147: 3496.
6. Cardoso, A. (2005). Investigación de la inmunidad cruzada en la toxoplasmosis congénita experimental (desafíos con quistes y ooquistes). Tesis de grado, Facultad de veterinaria, Uruguay. 21 páginas.
7. 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.
8. 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.
9. Correa, L. (2004). Investigación de la inmunidad cruzada en la toxoplasmosis congénita experimental. Tesis de grado, Facultad de veterinaria, Uruguay, 21 páginas.

10. 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.
11. 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.
12. Dubey, J.P.(1996) Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. *Vet Parasitol*; 64: 65-70.
13. Dubey JP, Thayer DW (1994). Killing of different strains of *Toxoplasma gondii* tissue cysts by irradiation under defined conditions. *J Parasitol*; 80: 764-767.
14. Dubey JP, Shen SK (1991) Rat Model of Congenital Toxoplasmosis. *Inf Immun*; 59:3301-3302.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Freyre A, Falcón J, Mendez J, Rodriguez A, Correa O (2006) Partial cross-protection among 4 strains of *Toxoplasma* against congenital transmission in a rat model. *Exptal Parasitol*. In press. Volumen 112 páginas 8 a 12
19. 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.
20. 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.
21. 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.

22. 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.
23. 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.
24. Freyre A, Bonino J, Falcón J (1997) Aborto ovino toxoplásmico: su significación económica en el Uruguay. *Producción Ovina*. 10:29-42.
25. 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.
26. 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.
27. Freyre A, Queiruga G, Méndez J, Lavarello L (1992) Riesgo de infección toxoplásmica del feto humano en Montevideo. *An. Clínicos (España)* 4:122-127.
28. Freyre A, Falcón J (1989) Toxoplasmosis en las especies domésticas y como zoonosis. Montevideo Ed. Departamento de Publicaciones de la Universidad, 338 p.
29. González, P. (2007). Ensayo de la protección contra la toxoplasmosis congénita obtenida mediante la cepa RH, en el modelo rata. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria de Montevideo. 21 páginas.
30. 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.
31. 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.
32. Nielsen HV, Innes EA, Petersen E, Buxton D (2000) Strategies for development of vaccines against *Toxoplasma gondii*. En: Congenital toxoplasmosis. Berlín P.A. Thomas, E. Petersen (ed.) pp. 314-322.
33. Paulino JP, Vitor R (1999) Experimental congenital toxoplasmosis in Wistar and Holzman rats. *Parasite*; 6:63-6.

34. 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.
35. Schoondermark Van de Ven. (1993) Congenital toxoplasmosis: an experimental study in rhesus monkeys for transmission and prenatal diagnosis. *Exptal. Parasitol*; 77:200-11.
36. Thiermann E.(1957) Transmisión congénita del *Toxoplasma gondii* en ratas con infección leve. *Biológica*; 23: 59-67.
37. 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. volumen 68
38. 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. volumen 68.
39. 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.
40. 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.
41. 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. volumen 61.

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. Prugniaud	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)	
Correa (2004);	ooq. de 3 cepas	17/31	
Cardozo (2005)	q. de 3 cepas	15/28	
González (2007)	ooq. de 3 cepas q. de 1 cepa	11/23 4/5	

(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.

Cuadro II.

Resultados de experimentos de inmunización con una cepa completa (productora de quistes y ooquistes) de *Toxoplasma* seguida de medicación supresiva y posterior desafío con bradizoitos y ooquistes del parásito.

<u>Ex. No.</u>	<u>Inmunización⁽¹⁾</u>		<u>Desafío</u>	<u>Resultados⁽³⁾</u>	<u>Controles⁽⁴⁾</u>
2	ME49 taquizoitos, s.c.		10 ³ M7741 ooquistes 10 ⁴ M7741 bradizoitos	3/3 7/8	3/4 13/17
3	ME49 bradizoitos, s.c.		10 ² M7741 ooquistes 10 ⁴ M7741 bradizoitos	6/9 7/9	6/7 13/17
5	ME49 taquizoitos, i.v.		10 ² M7741 ooquistes 10 ⁴ M7741 bradizoitos	2/3 0/7	6/7 13/17

(1) Se administraron 10⁷ taquizoitos ó 5 x 10⁶ bradizoitos.

(2) 1 ml sulfadiazina 90 mg % con 0.2 mg/ml pirimetamina administradas con tomero dos veces al día.

(3) Numerador: No. de ratas que transmitieron *Toxoplasma* congenitamente/total No. de ratas estudiadas..

(4) Ratas madre no inmunizadas que recibieron inóculos de desafío similares