

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**ENSAYO DE LA PROTECCION CONTRA LA TOXOPLASMOSIS CONGENITA
OBTENIDA MEDIANTE LA PREMUNICION Y MEDIANTE INMUNIDAD
ESTERIL POR LA VIA ORAL, EN EL MODELO RATA**

por

Ximena TORRES



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**

076 TG
Ensayo de la pr
Torres, Ximena



TESIS DE GRADO aprobada por:

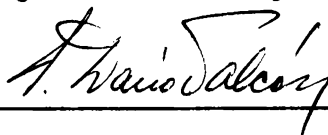
Presidente de Mesa:


P. A. Ceballos

Segundo Miembro (Tutor):


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

Tercer Miembro

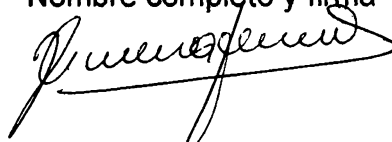


Fecha:

19 | 12 | 2007

Autor:

Ximena Fabiana Torres Kotogian
Nombre completo y firma


Ximena Torres.

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 dió en lo correspondiente al manejo animal y su colaboración en los experimentos.

A la Dra. Patricia González y a la Dra. Laura Correa por el apoyo brindado.

	Página
PAGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS	I
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	IV
1. <u>RESUMEN</u>	1
SUMARY	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. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN.....	8
4.2. DISEÑOS EXPERIMENTALES.....	8
4.3. MATERIALES.....	10
4.4. METODOS.....	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 IV. Resultados de Experimentos de inmunización oral con cepas completas <i>Toxoplasma</i> por la vía oral, con o sin medicación supresiva, y desafío con bradizoítos ú ooquistes del parásito.....	28

RESUMEN

El **objetivo** es el ensayo de la protección contra la toxoplasmosis congénita mediante la premunición y mediante inmunidad estéril por la vía oral.

Las inmunizaciones orales con una cepa completa , no seguida de medicación supresiva, brindan 100% de protección. Cuando la inmunización se hace con medicación supresiva, hay alta protección contra el estado homólogo (bradizoítos), pero no contra el estado heterólogo (ooquistes).

Sería preferible en futuras investigaciones, el empleo de inmunizaciones orales con *Toxoplasma*, aún seguidas de medicación supresiva, como medio de lograr protección contra la toxoplasmosis congénita experimental en la rata, a las efectuadas por otra vía, debido a su tasa de protección muy elevada.

Con el uso de la premunición, el modelo responde a semejanza de lo que ocurre en la naturaleza, donde las mujeres y las ovejas inmunes no transmiten la toxoplasmosis congénita. En condiciones de inmunidad estéril, el modelo parece aplicarse con resultados más aleatorios.

SUMMARY

The **goal** is to test protection against congenital toxoplasmosis by means of premunition and sterile immunity by the oral route.

Oral immunizations with a complete strain, not followed by suppressive medication, are 100% protective. When immunization is followed by suppressive medication, there is a high level of protection against the homologous stage (bradyzoites), but not against the heterologous stage (oocysts).

With premunition, the model resembles the situation in nature, where immune women and ewes do not transmit congenital toxoplasmosis. When sterile immunity is tested, the results are not so in agreement with the natural events.

2. INTRODUCCIÓN



La presente tesis guarda raíces comunes con las tesis defendidas por las Dra. P. González (2007) y L. López (2007) (sin publicar), en el sentido que en dichas investigaciones se indaga la protección contra la toxoplasmosis congénita en el modelo rata. Por lo tanto, las introducciones de las tesis referidas son considerablemente similares. La revisión bibliográfica es idéntica. También, varios de los materiales y métodos utilizados, son comunes a todas ellas.

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 (Correa, 2004) y (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 tesis inmediatamente anterior a la presente (L. López, 2007), se identificó la dificultad para instalar una inmunidad estéril protectora cuando se empleó la vía subcutánea en ratas, pero se logró protección utilizando la vía intravenosa de inmunización.

El objetivo de la presente tesis es el ensayo de la protección contra la toxoplasmosis congénita obtenida mediante la premunición y mediante inmunidad estéril por la vía oral.

La hipótesis que sustenta al objetivo, es que se obtendrá protección mediante la inmunidad estéril conferida por una infección con la cepa ME-49 efectuada por la vía oral, coartada mediante el uso de sulfadiazina y pirimetamina.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

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 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.

Existe el antecedente casi inmediato de las tesis Dras. (Correa, 2004) y (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. Finalmente, en una tesis inmediatamente anterior (Lopez, 2007) (sin publicar), se concluye que no se puede suscitar protección por medio de la inmunización subcutánea con cepas completas del parásito, seguida de medicación supresiva, pero sí utilizando la vía intravenosa.

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

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

Esta serie de experimentos destinados a revelar la importancia de la inmunización entérica, comienza por 3 experimentos enteramente prototípicos, en los que se inmuniza por la vía oral, sin supresión farmacológica: Experimento 1 (inmunización con ooquistes ME-49), Experimento 2 (inmunización con bradizoítos ME-49), y Experimento 3 (inmunización con bradizoítos Prugnialud, a los efectos comparativos con la cepa ME-49). Como estos experimentos dieron resultados auspiciosos de protección, se realizó el Experimento 4, para determinar un método para suprimir farmacológicamente la infección realizada por vía oral, de modo de estudiar solamente la inmunidad entérica, sin presencia de la inmunidad general (sistémica). Una vez logrado este método, se realizó el Experimento 5 (inoculación oral de bradizoítos con supresión y desafío homólogo de cepa y estadio). Como este experimento dio resultados auspiciosos, se intentó el desafío heterólogo de cepa y de estadio toxoplásmico en el Experimento No.6.

4.2. DISEÑOS EXPERIMENTALES.

4.2.1. Experimento No 1. Protección tras la inmunización oral con ooquistes ME49, sin medicación supresiva, seguida de desafío con ooquistes M7741

Las ratas de este experimento fueron inmunizadas con 10^5 ooquistes de la cepa ME49. Dos meses más tarde, fueron puestas a copular, y al día 12 de la gestación, fueron desafiadas con 10^3 ooquistes de la cepa M7741. Se mantuvieron controles de transmisión (ratas gestantes infectadas durante la gestación, pero no inmunes a ella previamente). Los recién nacidos fueron bioensayados en ratones. Veinticinco días más tarde, se practicó la reacción de AD sobre el suero de los ratones receptores. Un resultado negativo se interpretó como presencia de protección vaccinal, y viceversa.

4.2.2. Experimento No.2. Protección tras la inmunización oral con bradizoítos ME49, sin medicación supresiva, seguida de desafío con ooquistes y bradizoítos M7741

Las ratas de este experimento fueron inmunizadas con 200 ooquistes de la cepa ME49. Dos meses más tarde, fueron puestas a copular, y al día 12 de la gestación, fueron desafiadas con 10^2 ooquistes y con 10^4 bradizoítos de la cepa M7741. El resto prosiguió como en los experimentos anteriores, y con los controles respectivos.

4.2.3. Experimento No. 3. Protección tras la inmunización oral con bradizoítos Prugniaud, sin medicación supresiva, seguida de desafío con bradizoítos M3 y bradizoítos M7741.

Las ratas de este experimento fueron inmunizadas con 200 quistes de la cepa Prugniaud. Dos meses más tarde, fueron puestas a copular, y al día 12 de la gestación, fueron desafiadas con 10^4 bradizoítos M7741 y con 10^4 bradizoítos de la cepa M3. El resto prosiguió como en los experimentos anteriores, y con los controles respectivos.

4.2.4. Experimento No. 4. Determinación de un método para coartar terapéuticamente la infección toxoplásmica inducida con una cepa completa por la vía oral (bradizoítos).

Las ratas Fischer de un grupo de 4 animales, de aproximadamente 200 g de peso corporal, recibieron 10^7 bradizoítos de la cepa ME49 por vía subcutánea, en 4 puntos distintos en el dorso. Luego de transcurridas 12 horas, 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.

4.2.5. Experimento No.5. Protección tras la inmunización oral con bradizoítos Prugniaud, con medicación supresiva, seguida de desafío con bradizoítos homólogos.

Este experimento es similar al experimento No.3. La diferencia es que la protección se busca tras la inoculación de las ratas con quistes de la misma cepa de *Toxoplasma*, pero con subsiguiente a esterilización parasitológica con quimioterapia específica, y el desafío se hace solamente con bradizoítos, esta vez homólogos. Este experimento conlleva controles de transmisión en ratas no inmunes.

4.2.6. Experimento No. 6. Protección tras la inmunización oral con bradizoítos ME49, con medicación supresiva, seguida de desafío con ooquistes y bradizoítos M7741.

Este experimento es similar al Experimento No. 1. La diferencia con respecto al Experimento No. 1 es que la protección se busca tras la inoculación de las ratas con quistes de la misma cepa de *Toxoplasma*, pero con subsiguiente a esterilización parasitológica con quimioterapia específica. Este experimento conlleva controles de transmisión en ratas no inmunes.

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 Desmonts y Remington, con el uso de 2-ME (J. Clin.Microbiol., 11:562-568,1980). 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 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 utilizaron las cepas M-7741 y M3, aisladas de epizootías de aborto ovino toxoplásmico en Estados Unidos y Escocia, respectivamente.

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.

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 resultados se hallan resumidos en el Cuadro No. II.

5.3.1. Protección por inmunización oral sin coartación farmacológica.

Los ooquistes de la cepa ME-49 administrados por la vía oral, sin medicación subsiguiente, protegieron totalmente a 10 ratas contra la transmisión congénita originada por el desafío con 10^3 ooquistes M7741 en el Experimento No.1. Similarmente, los bradizoítos de la misma cepa, administrados por la misma vía, sin medicación subsiguiente, protegieron totalmente a 5 ratas contra la transmisión congénita originada por el desafío con 10^4 bradizoítos de la cepa M7741 (Experimento No.2), y casi totalmente contra 10^2 ooquistes M7741 (Experimento No.2). Algo similar sucedió con la inmunización conferida por bradizoítos Prugniaud suministrados por la vía oral, sin medicación subsiguiente a 4 ratas desafiadas con 10^2 ooquistes M7741 (Experimento No.3), y a 7 ratas posteriormente desafiadas con 10^4 bradizoítos de la cepa M3 (Experimento No.3). Las expresiones de presencia o ausencia de protección surgieron luego del análisis estadístico de los resultados, con significación estadísticamente válida para dichas expresiones.

Los bioensayos de cerebro y músculo de las 4 ratas que recibieron bradizoítos ME-49 por vía oral (Experimento No. 4) resultaron negativos,. Por ello, se procedió a adoptar estos métodos de esterilización farmacológica para los experimentos subsiguientes.

5.3.2. Protección por inmunización oral con coartación farmacológica

Una vez en conocimiento de los resultados anteriores, se intentó la inmunización seguida de coartación farmacológica. Así, la inmunización con bradizoítos Prugniaud por la vía oral, seguida de coartación farmacológica, protegió totalmente a 6 ratas contra el desafío inducido por 10^4 bradizoítos Prugniaud (Experimento No.5). Similarmente, la inmunización oral con bradizoítos de la cepa ME-49, seguida de coartación farmacológica, protegió a 4 de 5 ratas contra el desafío inducido por 10^4 bradizoítos de la cepa M7741, y a 1 de 3 ratas contra el desafío con 10^2 ooquistes M7741 (Experimento No.6).

6. DISCUSIÓN

6.1. Sobre los resultados de los experimentos de premunición (Nos. 1 a 3).

Los resultados experimentales aquí obtenidos demuestran que es posible obtener protección total mediante infecciones plenamente desarrolladas (no coartadas con medicación) de las cepas ME-49 y Prugniaud de *Toxoplasma*, contra desafíos heterólogos, tanto de cepas como de estadios toxoplásmicos. En efecto: obsérvese que la protección fue heteróloga de cepa (Experimentos Nos. 1 y 2, cepa ME49 contra cepa M7741, y Experimento No. 3, cepa Prugniaud contra cepas M7741 y M3). Pero también existió firme protección de estadios heterólogos (bradizoítos ME49 contra ooquistes M7741, en el Experimento No.2).

6.2. Sobre los resultados de los experimentos de inmunidad estéril (Nos. 5 y 6).

Más significativamente, en el presente trabajo, fue posible obtener protección contra la toxoplasmosis congénita en el modelo rata, mediante infecciones coartadas con medicación, contra desafíos homólogos y heterólogos, cuando menos de dos cepas toxoplásmicas. Resta ensayar la protección heteróloga de estadios en este diseño. La conclusión señalada es muy importante, al estar el método de inmunización empleado, muy cercano a la tecnología vaccinal, por tratarse de una descarga antigénica limitada en el tiempo. Secundariamente, estas conclusiones adelantan que se podrán estudiar antígenos de bradizoítos con el fin de detectar una o más subunidades antigénicas suficientemente inmunogénicas como para integrar una vacuna antitoxoplásmica. El hecho que se pueda partir del estadio bradizoíto es una conclusión auspiciosa, dada la mayor facilidad para obtener este estadio experimentalmente, en contraposición a la dificultad que habría implicado trabajar con cantidades masivas de ooquistes toxoplásmicos, para los mismos fines.

6.3. De los resultados de protección observados en la presente tesis, contra la protección por las vías subcutánea e intravenosa en una tesis anterior.

De la comparación de los resultados de protección por inmunización sin medicación supresiva, obtenidos en esta tesis, con los resultados obtenidos en la tesis de (López, 2007) (sin publicar), surge que la tasa de protección por premunición (presente tesis) es muy superior a la obtenida por inmunidad estéril (Lopez, 2007) (sin publicar). Ello es razonable de esperar, por cuanto en la premunición subsiste el estímulo antigénico constante del parásito vivo, en estado de infección residual. Esta última situación, sin embargo, no se halla más que al inicio de la estrategia para el logro de una vacuna, por cuanto la infección residual como medio de protección vaccinal, no es admisible en animales de consumo ni en humanos.

En el mismo marco comparativo, pero refiriéndose a la inmunización seguida de medicación supresiva, se ha producido un adelanto en la presente tesis con respecto a la anterior (Lopez, 2007) (sin publicar). En efecto: en el experimento 5



hubo protección total contra la transmisión congénita, aunque se trató de un desafío homólogo de cepa y de estadio. En el experimento 6, sin embargo, hubo protección heteróloga de cepa (cepa ME49 contra cepa M7741), aunque no de estadio (bradizoítos ME49 contra ooquistes M7741).

Estos resultados superiores de protección con respecto a los de la tesis anterior, muy probablemente se deban al uso de la vía oral, que activa el compartimento linfocítico intestinal, presentando antagonismo a los organismos toxoplásmicos de desafío en su propia puerta de entrada al huésped.

7. CONCLUSIONES

Sería preferible en futuras investigaciones, el empleo de inmunizaciones orales con *Toxoplasma*, aún seguidas de medicación supresiva, como medio de lograr protección contra la toxoplasmosis congénita experimental en la rata, a las efectuadas por otra vía, debido a su tasa de protección muy elevada.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alexander, J.(1996) Immunological Control of *Toxoplasma gondii* and Appropriate Vaccine Design. En: Current Topics en 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 pag.
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 pag.
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, pag. 8 -12 y 101 - 112.
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 pag.
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. *Exptl. 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.
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.

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 oral con cepas completas *Toxoplasma* por la vía oral, con o sin medicación supresiva, y desafío con bradizoítos ú ooquistes del parásito.

<u>Exp No.</u>	<u>Immunización⁽¹⁾</u>	<u>Medicación Supresiva⁽²⁾</u>	<u>Desafío</u>	<u>Resultados⁽³⁾</u>	<u>Controles⁽⁴⁾</u>
1	ME49 ooquistes	no	10 ³ M7741 ooquistes	0/10	3/4
2	ME49 bradizoítos	no	10 ² M7741 ooquistes 10 ⁴ M7741 bradizoítos	1/12 0/5	6/7 13/17
3	Prugniaud bradizoítos	no	10 ⁴ M7741 bradizoítos 10 ⁴ M3 bradizoítos	0/4 0/7	13/17 8/12
5	Prugniaud bradizoítos	sí	10 ⁴ Prugniaud bradizoítos	0/6	8/12
6	ME49 bradizoítos	sí	10 ⁴ M7741 bradizoítos 10 ² M7741 ooquistes	1/5 2/3	13/17

(1) 10⁵ ooquistes o 200 quistes administrados con tomero. Cuando se usó mediación supresiva, se administraron 5 x 10⁶ bradizoítos por rata.

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

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

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