

Tesis de Posgrado

Toxoplasma Gondii : producción de anticuerpos monoclonales y su utilización en el estudio del rol biológico de antígenos del parásito

Pszenny, Viviana

1994

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Pszenny, Viviana. (1994). Toxoplasma Gondii : producción de anticuerpos monoclonales y su utilización en el estudio del rol biológico de antígenos del parásito. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2688_Pszenny.pdf

Cita tipo Chicago:

Pszenny, Viviana. "Toxoplasma Gondii : producción de anticuerpos monoclonales y su utilización en el estudio del rol biológico de antígenos del parásito". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1994.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2688_Pszenny.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

TESIS

**TOXOPLASMA GONDII: PRODUCCION DE ANTICUERPOS
MONOCLONALES Y SU UTILIZACION EN EL ESTUDIO
DEL ROL BIOLOGICO DE ANTIGENOS DEL PARASITO**

Autora
VIVIANA PSZENNY

Director
JUAN CARLOS GARBERI

Lugar de Trabajo
**CENTRO DE INVESTIGACIONES MEDICAS
ALBERT EINSTEIN**

—Fundación CIMA—

TESIS PARA OBTENER EL TITULO
DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLOGICAS

—Octubre 1994—

*Recibido
26/8/94
G. 2*

A MI MADRE Y A LA MEMORIA DE MI PADRE

FCE y N BIBLIOTECA

Si desde la ciencia tambien buscamos el prestigio personal, una variante de poder, estaremos inexorablemente destinados al fracaso, como hombres y mujeres y como especie.

Mi felicidad es enorme por poder vivir este momento junto a mis seres más queridos: Hugo, mi compañero del alma, Florencia, Elisa y Jacques, Marina, Héctor y Hernan, Nico, Cintia, Ceci y Esteban.

A la Dra. Ana Pastini **especialmente**: Por su valiosa ayuda, el apoyo moral y el asesoramiento científico, que sólo una gran amiga y una excelente profesional pueden brindar.

A Silvia: por haberme acompañado en los buenos y los malos momentos, durante todos estos años.

Gracias a todos aquellos que colaboraron para que esta tesis se convirtiera en realidad:

Al Dr. Andrés La Manna por sus aportes con ideas brillantes.

A mis ex compañeros de laboratorio, los Dres. Sergio Angel y Jorge Blanco, con quienes me hubiera gustado compartir este momento.

A Mara, Silvana, Mariana y Juan con quienes seguiré compartiendo la dura tarea de hacer ciencia.

A Xavier Kriskautsky por su trabajo fotográfico.

Al Instituto Malbran por brindarme la posibilidad de realizar la última etapa de mi trabajo.

Al Servicio de Patología del Hospital Israelita en especial al Dr. Fernando Cueva y a la Dra. Edit Illesca por su colaboración en el área de la histopatología.

A mi Director Dr. Juan Carlos Garberi.

ABREVIATURAS

AC	Anhidrasa Carbónica
Ac	Anticuerpo
AcMc	Anticuerpo Monoclonal
AD	Aglutinación Directa
ADN	Acido Desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
Ag	Antígeno
ARNasa	Ribonucleasa
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
BSA	Albúmina Sérica Bovina
DMSO	Dimetilsulfóxido
dT	Desoxitimidina
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilen diamino tetracético
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ESA	Antígeno Secretor-Excretor
gP	Glicoproteína
GRA	Proteína de los gránulos densos
HAI	Hemoaglutinación Indirecta
HAT	Hipoxantina-Aminopterina-Timidina
Ig	Inmunoglobulina
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
IPM	Red Membranosa Intrafagosomal
ISAGA	Immunosorbent agglutination assay
KD	KiloDalton
MTOC	Centro Organizador Microtubular
OPD	Ortofenilendiamina
p	proteína
pb	pares de bases
PBS	Buffer Fosfato Salino
PCR	Polymerase Chain Reaction

PEF	Penetration-enhancing factor
PEG	Polietilenglicol
PM	Peso Molecular
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoride
RaMPx	Inmunoglobulinas de conejo anti-Igs de ratón conjugadas con peroxidasa
ROP	Proteína de las rhoptrias
rpm	revoluciones por minuto
SNR	Suero Normal de Ratón
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SIA	Slide Immunoassay
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
TLCK	Lisina cloro metil cetona
TRIS	Tris (hidriximetil) aminometano
ufp	unidades formadoras de placa
VSGs	Variant-Specific surface glycoprotein (de <i>Trypanosoma</i>)
$\bar{X}$	Promedio
X-GAL	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopirano piranósido

INDICE

BREVE RESEÑA HISTORICA.....	1
INTRODUCCION	2
1. EL ORGANISMO.....	3
1.1. Agente Etiológico.....	3
1.2. Formas Parasitarias.....	4
1.3. Ciclo de Vida y Variaciones Morfológicas.....	8
1.3.1. Ciclo extraepitelial.....	8
1.3.2. Ciclo Enteroepitelial.....	10
1.4. Morfología y estructura del taquizoíto.....	14
1.5. Invasión, secreción y formación de la vacuola parasitófora.....	17
1.6. Reconocimiento parásito-huesped.....	21
1.7. Bioquímica de <i>Toxoplasma gondii</i>	22
1.7.1. Proteínas.....	22
1.7.2. Carbohidratos y lípidos.....	26
2. TRANSMISION.....	27
2.1. Fuentes de infección.....	27
2.2. Toxoplasmosis congénita.....	27
2.3. Toxoplasmosis adquirida.....	29
3. EPIDEMIOLOGIA.....	30
4. MANIFESTACIONES CLINICAS.....	33
4.1. Forma Aguda.....	33
4.2. Forma crónica.....	34
5. DIAGNOSTICO.....	35
5.1. Diagnóstico directo.....	35

5.1.1 Demostración de parásitos.....	36
5.1.2. Demostración de antígenos en suero y fluídos corporales.....	37
5.1.3. Demostración de la presencia de ácidos nucleicos.....	38
5.2. Diagnóstico indirecto.....	39
5.2.1. Test de Sabin-Feldman o test de Dye.....	39
5.2.2. Test de hemaglutinación indirecta (HAI).....	40
5.2.3. Test de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).....	41
5.2.4. Test de Inmunofluorescencia-IgM (IFI-IgM).....	41
5.2.5. Test de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)....	42
5.2.6. Test de ELISA-IgM.....	43
5.2.7. Test de aglutinación directa (AD).....	43
5.2.8. IgM-ISAGA. (Immunosorbent agglutination assay).....	44
6. TRATAMIENTO.....	46
6.1. Otras drogas.....	47
7. PREVENCION.....	48
8. VACUNA CONTRA LA TOXOPLASMOSIS.....	48
MATERIALES Y METODOS.....	51
1. MANTENIMIENTO DE LOS TAQUIZOITOS DE LA CEPA RH DE <i>Toxoplasma gondii</i>	52
2. OBTENCION DE LOS TAQUIZOITOS.....	52
3. PURIFICACION DE LOS TAQUIZOITOS.....	53
4. OBTENCION DE TAQUIZOITOS LIBRES DE INMUNOGLOBULINAS CONTAMINANTES.....	53

4.1. Tratamiento con Glicina.....	53
4.2 Tratamiento de los ratones con drogas inmunosupresoras....	54
4.3. Cultivo in vitro de taquizoitos.....	54
5. OBTENCION DE SUERO NORMAL DE RATON DE LA CEPA Balb/c.....	54
6. OBTENCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES CONTRA TAQUIZOITOS DE LA CEPA RH DE <i>Toxoplasma gondii</i>	55
7. DESARROLLO DE METODOS DE DETECCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES Y POLICLONALES: SIA (Slide immunoassay).....	56
7.1. Descripción de las condiciones particulares para este ensayo.....	56
8. PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA TAQUIZOITOS DE LA CEPA RH DE <i>Toxoplasma gondii</i>	58
8.1. Especie animal y su mantenimiento.....	58
8.2. Procedimiento de inmunización.....	58
8.3. Preparación de medios y soluciones para la fusión.....	59
8.4. Fusión celular.....	60
8.4.1. Preparación de las células para la fusión.....	60
8.5. Procedimiento de fusión.....	61
8.6. Clonado de células híbridas.....	63
8.7. Criopreservación de la células.....	64
8.8. Congelamiento de células.....	64
8.9. Descongelamiento de células.....	65
8.10. Producción de anticuerpos monoclonales en gran escala.....	65
8.11. Cultivo in vitro de hibridomas.....	65
8.12. Cultivo in vivo de hibridomas.....	65
8.12.1. Preparación del animal y obtención de líquido ascítico.....	66
9. DETERMINACION DE CLASES Y SUBCLASES DE INMUNOGLOBULINAS SECRETADAS POR LAS LINEAS DE HIBRIDOMAS 1H10H8, 1H10E9E6,	

1F6C4T Y 5E9A3B4.....	66
10. PURIFICACION PARCIAL DEL ANTICUERPO MONOCLONAL Tg5.....	67
11. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR.....	67
11.1. Obtención de taquizoitos a partir de fluido ascítico....	69
11.2. Aislamiento de exo-antígenos.....	69
11.3. Preparación del homogenato total.....	70
11.4. Centrifugación diferencial del homogenato total.....	70
12. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON SDS (PAGE-SDS).....	71
13. WESTERN BLOT.....	71
14. DOT-BLOT.....	72
15. CONSTRUCCION DE UNA GENOTECA DE cDNA DE TAQUIZOITOS DE <i>T.gondii</i> EN λ gt11.....	73
15.1. Obtención y purificación de parásitos.....	73
15.2. Purificación de ARN total.....	73
15.3. Purificación de ARN mensajero.....	74
15.4. Construcción de la genoteca.....	77
15.5. Amplificación de la genoteca.....	79
15.6. Detección de fagos recombinantes que expresan proteínas de <i>T.gondii</i>	79
15.7. Amplificación de clones positivos.....	80
15.8. Purificación de los fagos recombinantes por centrifugación en gradiente de Cloruro de Cesio.....	81
15.9. Preparación de recombinantes lisogénicos.....	81
15.10. Preparación de lisados crudos de <i>E.coli</i> Y1089 lisogénicos.....	82
15.11. Electroforesis de extractos proteicos en geles de poliacrilamida.....	82

15.12. Western-blot (transferencia pasiva de proteínas a nitrato de celulosa).....	82
16. SECUENCIACION DEL FRAGMENTO CLONADO.....	83
16.1. Clonado en el fago M13.....	83
16.2. Preparación de células competentes para la transformación.....	83
16.3. Transformación.....	84
16.4. Preparación de ADN del fago de simple cadena.....	84
17. DETECCION FOTOCOLORIMETRICA DE ACTIVIDAD DE ANHIDRASA CARBONICA.....	86
18. TECNICAS HISTOLOGICAS.....	86
18.1. Procesamiento de tejidos.....	86
18.2. Técnicas histológicas de coloración.....	87
18.2.1. Hematoxilina-eosina.....	87
18.2.2. Giemsa.....	87
18.3. Inmunomarcación con fosfatasa-antifosfatasa alcalina o peroxidasa-antiperoxidasa.....	88
RESULTADOS.....	89
1. PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA TAQUIZOITOS DE LA CEPA RH DE <i>Toxoplasma gondii</i>	90
1.1. DESARROLLO DE UN ENZIMOINMUNOENSAYO (SIA) PARA LA SELECCION DE HIBRIDOS PRODUCTORES Y TITULACION DE SUEROS POLICLONALES.....	91
1.1.1. Puesta a punto del SIA.....	92
1.1.2. Titulación de sueros policlonales.....	94
1.2. FALSOS POSITIVOS DURANTE EL DESARROLLO DEL SIA.....	95
1.2.1. Curva de titulación del 2do. anticuerpo.....	96

1.2.2. Control de especificidad del segundo anticuerpo.....	97
1.2.3. Determinación de las causas de la reactividad del segundo anticuerpo con la preparación antigénica.....	97
1.2.4. Determinación del tipo de Igs de ratón presentes en la preparación antigénica.....	98
1.3. OBTENCION DE PREPARACIONES ANTIGENICAS PURAS.....	101
1.3.1. Purificación de taquizoítos.....	101
1.3.2. Análisis microscópico de cada banda.....	102
1.3.3. Obtención de taquizoítos libres de inmunoglobulinas contaminantes.....	105
1.3.4. Tratamiento con Glicina.....	105
1.3.5. Análisis por SIA.....	106
1.3.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida (10%) con SDS de taquizoítos no tratados y tratados con glicina.....	107
1.3.7. Western-Blot de tq no tratados y tratados con glicina.....	107
1.3.8. Análisis de viabilidad de los taquizoítos sometidos al tratamiento con glicina.....	109
1.3.9. Inmunosupresión con Ciclofosfamida.....	109
1.4. FUSION CELULAR.....	112
1.4.1. Nomenclatura utilizada.....	113
1.4.2. Detección de clones positivos y primer clonado.....	113
1.4.3. Segundo clonado.....	114
2. CARACTERIZACION PRELIMINAR DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES OBTENIDOS.....	119
2.1. LOCALIZACION SUBCELULAR PRELIMINAR.....	120
2.2. TIPIFICACION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	121
2.3. ANALISIS DE LAS PROTEINAS RECONOCIDAS POR LOS	

ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	121
2.3.1. Western-Blot con los anticuerpos monoclonales 1H10H8, 1H10E9E6, 1F6C4T y 5E9A3B4.....	121
2.4. LOCALIZACION CELULAR DE LAS PROTEINAS RECONOCIDAS POR LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	125
2.4.1. Inmunomarcación de extendidos de taquizoítos mediante la técnica de inmunoperoxidasa con los anticuerpos monoclonales 1H10H8, 1F6C4T y 5E9A3B4.....	125
2.4.2. Inmunomarcación con la técnica de fosfatasa-antifosfatasa alcalina, de improntas de bazo y extendidos de fluido ascítico de ratón infectado con taquizoítos de <i>T.gondii</i>	130
3. RECLONADO DE HIBRIDOMAS PRODUCTORES DEL ANTICUERPO MONOCLONAL 1H10H8.....	134
3.1. PRODUCCION MASIVA DEL AcMc Tg5.....	138
4. PURIFICACION DEL ANTICUERPO MONOCLONAL Tg5.....	139
5. ¿SON LOS ANTIGENOS RECONOCIDOS POR Tg5 EXCRETADOS-SECRETADOS?.....	144
5.1. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR.....	145
5.2. ANALISIS DE LAS DIFERENTES FRACCIONES POR PAGE-SDS.....	147
5.3. ANALISIS DE LA REACTIVIDAD DEL ANTICUERPO MONOCLONAL Tg5 CON LAS DIFERENTES FRACCIONES SUBCELULARES.....	149
5.3.1. SIA.....	149

5.3.2. Dot-Blot.....	150
6. ROL BIOLOGICO DE UN ANTIGENO DE <i>T.gondii</i> RECONOCIDO POR EL AcMc Tg5. SU IMPLICANCIA EN LA FISIPATOGENIA.....	151
6.1. DETECCION DE ACTIVIDAD DE ANHIDRASA CARBONICA EN EXTRACTOS PARASITARIOS TOTALES Y FRACCION DE ANTIGENOS ESA.....	152
6.2. EFECTO DE LA ACETAZOLAMIDA SOBRE LA CAPACIDAD INFECTIVA DE TAQUIZOITOS DE <i>T.gondii</i>	158
6.2.1. Experimentos de infeccion in vitro.....	158
6.2.2. Efecto de la acetazolamida sobre la capacidad infectiva de taquizoitos de <i>T.gondii</i> in vivo.....	168
6.3. EFECTO DE Tg5 SOBRE LA CAPACIDAD INFECTIVA DE TAQUIZOITOS DE <i>T.gondii</i>	182
6.3.1. Experimentos de infección in vitro.....	182
6.3.2. Acción del anticuerpo monoclonal Tg5 sobre la capacidad infectiva de <i>T.gondii</i> in vivo.....	189
6.4. EFECTO DEL ANTICUERPO MONOCLONAL Tg5 SOBRE LA ACTIVIDAD DE ANHIDRASA CARBONICA.....	200
7. DETERMINACION POR INGENIERIA GENETICA DEL EPITOPE RECONOCIDO POR EL AcMc Tg5.....	202
7.1. Utilización del anticuerpo monoclonal Tg5 en la detección de fagos recombinantes productores de péptidos inmunogénicos.....	203
7.2. Rastreo inmunológico.....	203
7.3. Purificación de los clones positivos.....	205
7.4. Análisis de los clones por mapeo de restricción.....	205
7.5. Obtención de extractos lisogénicos.....	205
7.6. Obtención de extractos crudos de las cepas lisogénicas.....	207

7.7. Análisis electroforético de los extractos proteicos.....	207
7.8. Análisis de las proteínas de fusión por Western-Blot.....	207
7.9. Secuenciación del ADN recombinante que codifica para el epítipo reconocido por el AcMc Tg5 en la proteína de fusión estudiada.....	210
7.10. Deducción de la secuencia de aminoácidos del fragmento clonado.....	210
7.11. Homología entre las secuencias aminoacídicas del fragmento clonado y la Anhidrasa Carbónica de mamíferos.....	211
DISCUSION.....	216
1. OBJETIVO DEL PRESENTE TRABAJO.....	217
2. PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA TAQUIZOITOS DE <i>Toxoplasma gondii</i>	218
2.1. Desarrollo del método de selección de híbridos productores: SIA.....	218
2.2. Determinación de las causas de la presencia de falsos positivos en el SIA.....	218
2.3. Obtención de preparaciones antigénicas libres de inmunoglobulinas.....	219
2.3.1. Tratamiento de los taquizoítos con glicina pH 2.8.....	219
2.3.2. Inmunosupresión con ciclofosfamida.....	220
2.4. Purificación de los taquizoítos por gradiente de sacarosa.....	220
2.5. Fusión celular.....	221
3. CARACTERIZACION PROLIMINAR DE LOS AcMc OBTENIDOS.....	221

4. LOCALIZACION CELULAR DE LAS PROTEINAS RECONOCIDAS POR LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES 1F6C4T, 5E9A3B4 y 1H10H8.....	222
5. El AcMc 1H10H8G5 (Tg5) RECONOCE ANTIGENOS DE SECRECION.....	225
6. DETERMINACION POR INGENIERIA GENETICA DEL EPITOPE RECONOCIDO POR EL AcMc Tg5.....	225
7. ROL BIOLOGICO DEL ANTIGENO DE <i>T.gondii</i> RECONOCIDO POR EL AcMc Tg5.....	226
7.1. Detección de actividad de anhidrasa carbónica en taquizoítos de <i>T.gondii</i>	226
7.2. Efecto de la acetazolamida sobre la infectividad de <i>Toxoplasma gondii</i>	227
7.3. Acción del AcMc Tg5 sobre la capacidad infectiva de <i>T.gondii</i>	228
7.4. Acción de Tg5 sobre la anhidrasa carbónica.....	229
8. CONCLUSIONES.....	230
9. CONSIDERACIONES SOBRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL PRESENTE TRABAJO.....	231
10. PROYECCIONES FUTURAS.....	236
BIBLIOGRAFIA.....	237

● BREVE RESEÑA HISTORICA

En 1908 Nicolle y Monceaux descubrieron el toxoplasma en un roedor de Africa del Norte (*Ctenodactylus gondii*). Por tener este protozoo forma de "cuarto creciente" fue bautizado "*Toxoplasma gondii*", del griego "toxon"=arco.

Las características de este parasito fueron descubriéndose muy lentamente:

1923: Janku, oftalmólogo checo, descubrió quistes en la retina de un niño afectado de toxoplasmosis congenita.

1937: Sabin describe los signos clinicos de la toxoplasmosis humana.

1948: Sabin y Feldman describen el dye-test.

1957: Goldman y Kelen utilizaron la inmunofluorescencia para explorar la inmunidad humoral en el hombre.

1970: simultáneamente, los equipos de Hutchinson y de Frenkel ponen de manifiesto el ciclo sexuado del parásito en el gato.

Desde entonces parasitólogos e inmunólogos han conjugado esfuerzos para reconstituir el "mosaico antigénico" del toxoplasma.

En años recientes, médicos, veterinarios, investigadores científicos y economistas han reconocido la importante posición de *Toxoplasma gondii* entre los patógenos de mayor significancia para el hombre y los animales.

La toxoplasmosis es una parasitosis mundialmente extendida que ocupa un lugar importante en medicina humana y veterinaria.

Dos categorías de individuos están expuestos a manifestaciones clínicas severas: el feto, por intermedio de la madre parasitada, y los individuos inmunodeprimidos.

En veterinaria, las consecuencias económicas son dignas de tener en cuenta, pues la toxoplasmosis es en muchos casos, responsable de abortos en las ovejas y porcinos.

Se estima que alrededor de un tercio de la población mundial está infectada con *Toxoplasma gondii*.

1. EL ORGANISMO.

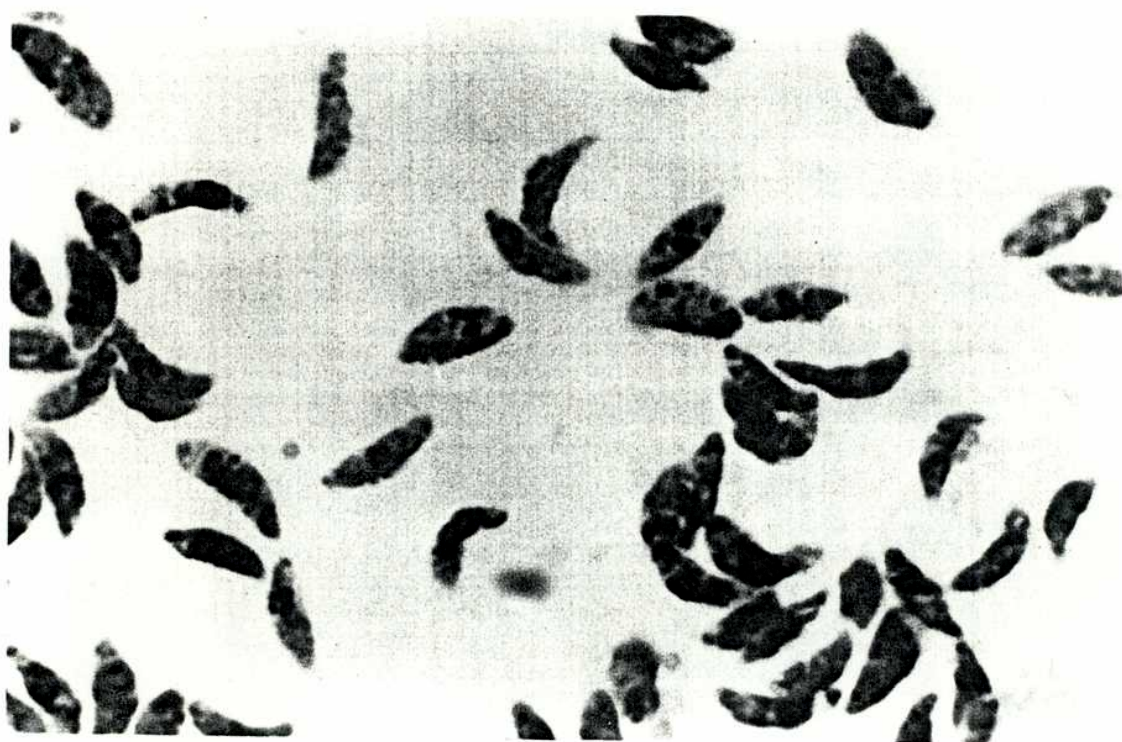
1.1. Agente Etiológico.

El agente etiológico de la toxoplasmosis es el *Toxoplasma gondii*, un protozoo parásito perteneciente al subphylum Apicomplexa y clasificado dentro de la familia Eimeriidae. Es único en cuanto a que es capaz de parasitar en forma indiscriminada variados tipos de células. Ha sido encontrado en el epitelio intestinal, hepatocitos, células alveolares del pulmón, músculo cardíaco y esquelético, células de la corteza adrenal, células testiculares, linfocitos y macrófagos, células retinales del ojo, músculo y endotelio uterinos, neuronas del cerebro y células rojas de las aves. Es obligadamente intracelular y existe en diferentes estadios en varios huéspedes. Prácticamente no hay orden de mamíferos en los cuales no se haya encontrado toxoplasmosis. También ha sido descripta para una amplia variedad de aves.

1.2. Formas Parasitarias.

Toxoplasma gondii existe en tres formas: el **taquizoíto** (forma proliferativa) (Fig. 1), el **quiste tisular** (forma de resistencia en el medio intracelular) (Fig. 2) en cuyo interior se encuentran los **bradizoítos** y el **ooquiste** (forma de resistencia en el medio extracelular) el cual produce esporozoítos. (Fig. 3 y 4) (Frenkel, 1973 ; Levine, 1973).

FIGURA 1



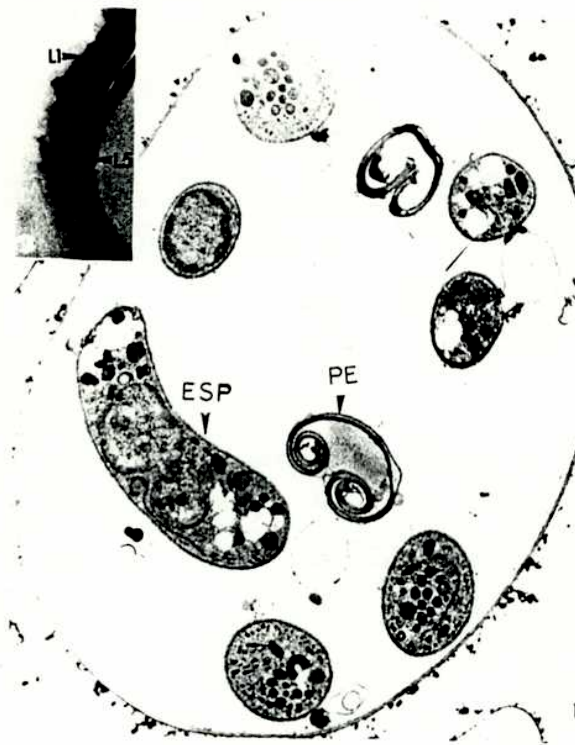
Taquizoítos teñidos con la técnica de May Grunwald-Giemsa (400X)

FIGURA 2



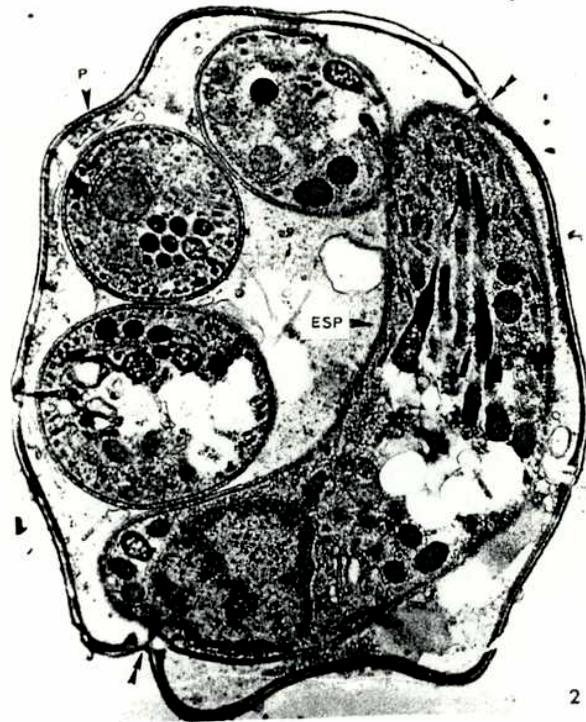
Quiste de *T. gondii* en cerebro de ratón, presente durante la etapa crónica de la enfermedad. M. E. 10.500X. Parasitología Clínica, Atlas-Neghme (1978).

FIGURA 3



Ooquiste de *T. gondii*. Este estadio ocurre solamente en el intestino de los felinos. PE: pared del esporoquiste. ESP: esporoquiste. Recuadro: pared del ooquiste con 5 capas o láminas. L1 y L5: capa 1 o externa y capa 5 o interna respectivamente. M.E. 10.500X. Christie, E. y col. (1978).

FIGURA 4



Esporoquiste de *T. gondii*. Flecha: indica poros. ESP: esporozoíto.
M. E. 10500X. Christie, E y col (1978).

1.3. Ciclo de Vida y Variaciones Morfológicas.

Este protozoo parásito existe en dos ciclos, en biotipos separados: un ciclo **extraintestinal** (ciclo asexual) y un ciclo **enteroepitelial** o **intestinal** (ciclo sexual).

Los mamíferos y las aves son considerados huéspedes **incompletos** (en ellos sólo se observa el ciclo de multiplicación extraintestinal) o **intermediarios** (el parásito sólo se multiplica por ciclos asexuales); en cambio, el gato y otros felinos salvajes son considerados huéspedes **completos** (son los únicos animales en los que el parásito se multiplica tanto en el intestino como en tejidos extraintestinales) o **definitivos** (en ellos ocurre la reproducción sexual del parásito).

1.3.1. Ciclo extraepitelial.

La primera forma asexual de *T. gondii* que aparece en la etapa de infección aguda de numerosos huéspedes intermediarios, ha sido originalmente designada forma proliferativa o trofozoíto. Sin embargo el término trofozoíto es ahora reservado para el primer estadio intestinal del gato. Para el estadio asexual, Hoare y Frenkel propusieron respectivamente los términos **endozoíto** y **taquizoíto**. El primero es meramente descriptivo de la localización dentro de la célula, mientras que el último se refiere a la rápida velocidad de multiplicación dentro de ellas.

El modo de replicación del endozoíto o taquizoíto es un proceso denominado endodyogenia por Goldman y Col. (1958).

Este proceso se caracteriza por la formación de dos conoides y sus membranas asociadas dentro de un organismo original. El núcleo del organismo brota y cada núcleo hijo se dirige hacia cada una de las estructuras citoplasmáticas recientemente formadas. Nuevas

membranas encierran los brotes nucleares y otras organelas, como mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico y ribosomas, las cuales son replicadas y repartidas entre las dos células hijas. La membrana inicial formada que rodea a cada célula hija es simple. Cuando se produce la ruptura del organismo materno, los organismos hijos adquieren la membrana externa.

Este proceso de endodyogenia parece ser una forma especial de esquizogonia, en el que solamente dos merozoítos son formados dentro del organismo parental. Ciclos reproductivos de endodyogenia repetidos, dentro de una célula parasitada resultan en la producción de organismos en rosetas, los cuales distienden la célula parasitada y eventualmente causan su ruptura. Una célula altamente parasitada fue originalmente llamada colonia terminal y más tarde pseudoquiste.

Cuando la infección aguda cesa, aparece en los tejidos del huésped intermediario una nueva forma asexual, llamada **quiste tisular**.

Al igual que los taquizoítos, el quiste tisular se desarrolla dentro de una vacuola en la célula huésped. Pero a diferencia de aquellos, esta forma no produce la ruptura de la célula. Ha sido sugerido como factor de formación de quistes, el desarrollo de inmunidad. Pero la presencia de quistes en el cerebro de neonato de 7 a 8 días de vida y la formación de quistes en sistemas de cultivo de tejidos no apoyan la teoría de la inmunidad como único mecanismo involucrado. (Jacobs, 1973).

El quiste tisular tiene una pared densa formada por deposición de material desde el parásito sobre la membrana de la vacuola parasitófora en la está contenido. Es probable que la célula huésped contribuya a esta deposición pues, en fotomicrografías electrónicas de quistes en desarrollo, se observa una alta concentración de mitocondrias y retículo endoplásmico de la célula

huesped, del lado externo de la vacuola parasitófora. La división del parásito dentro del quiste se realiza por endodyogenia, pero a una velocidad aparentemente más lenta que en la forma proliferativa. Frenkel (1973) propuso el término **bradizoíto** para estas formas quísticas, mientras que Hoare (1972) propuso el término **cystozoíto**. El material denso que forma las paredes del quiste se encuentra también distribuido entre el parásito y el quiste y se va empaquetando estrechamente contra las paredes del quiste, a medida que la reproducción continúa. De este modo las paredes del quiste se van haciendo progresivamente más gruesas.

Eventualmente los quistes pueden alcanzar un diámetro de 100 μm o más y pueden contener muchos parásitos.

1.3.2. Ciclo Enteroepitelial.

Cuando un gato ingiere las formas infectivas del parásito, (ooquistes maduros provenientes del suelo o plantas o quistes intracelulares provenientes de carnes parasitadas o animales presa), sus estructuras de protección son destruidas por los jugos digestivos quedando disponibles las formas proliferativas que inmediatamente invaden las células del epitelio intestinal donde se multiplican, primero por endodyogenia y posteriormente por esquizogonia. Este proceso resulta en la producción de 5 a 32 trofozoítos, (Dubey, 1972), que aparecen dentro de la célula huesped en forma de rosetas. Estos son liberados hacia el lumen del intestino e invaden otras células epiteliales. Han sido descritos al menos cinco generaciones de este estadio propagativo. (Dubey, 1972) a partir de las cuales ocurre un proceso de gametogonia, que conduce a la formación de microgametocitos y macrogametocitos.

Los procesos de gametogonia tienen lugar también en el epitelio intestinal, especialmente en las paredes de las

vellosidades del íleo, y culminan con la formación de ooquistes.

Estos procesos consisten en cambios morfológicos profundos, los cuales dan origen a microgametas (2 a 3 μm) y macrogametas (12 μm). Ellas aparecen de 3 a 15 días después de la infección.

Utilizando clones de toxoplasma desarrollados a partir de un único taquizoíto, Pfefferkon y col. (1977) mostraron que el genoma de cada taquizoíto contiene el potencial genético para la producción tanto de la micro como de la macrogameta.

La microgametogonia ocurre en una manera similar a la esquizogonia. El microgametocito mide de 7 a 10 μm . Su núcleo se divide muchas veces y un gran número de protuberancias se forman sobre la superficie del gametocito, hacia cada una de las cuales migra un único núcleo. Dentro de cada protuberancia se desarrollan dos flagelos que miden de 6 a 10 μm de longitud. Los microgametocitos así formados miden de 2 a 3 μm . A continuación son vertidos secuencialmente hacia la vacuola circundante, saliendo al medio extracelular cuando la célula huésped degenera.

El desarrollo del macrogametocito involucra principalmente el crecimiento del trofozoíto. La macrogameta temprana mide de 5 a 7 μm . Contiene gran cantidad de gránulos PAS-positivos. La macrogameta madura mide alrededor de 13 μm .

La fertilización es efectuada cuando una microgameta madura, emerge desde una célula epitelial hacia el lumen del intestino y alcanza a una macrogameta madura, que muy probablemente reside en el epitelio, y se produce la formación de la cigota de 10 a 12 μm ; ella se recubre de una envoltura translúcida, constituyendo el ooquiste. Después de la formación de la cigota y el ooquiste, ningún otro proceso ocurre dentro del intestino del gato. Los ooquistes son eliminados con las heces. El pico de producción ocurre entre los 5 y 8 días. Ellos son diseminados con las heces

por períodos que oscilan entre 7 y 20 días. Diez millones de ooquistes pueden ser diseminados con las heces en un único día.

Los ooquistes luego de excretados, sufren un proceso de esporogonia fuera del cuerpo, con la formación de dos esporoquistes, cada uno de los cuales contiene cuatro esporozoítos. Los ooquistes excretados por el gato y el área en la cual ellos son depositados son potencialmente peligrosos para el hombre y otros animales domésticos.

Un esquema del ciclo evolutivo de *Toxoplasma gondii* a través de los distintos huéspedes es mostrado en la Figura 5.

FIGURA 5

ESQUEMA DEL CICLO EVOLUTIVO DE *T. gondii*

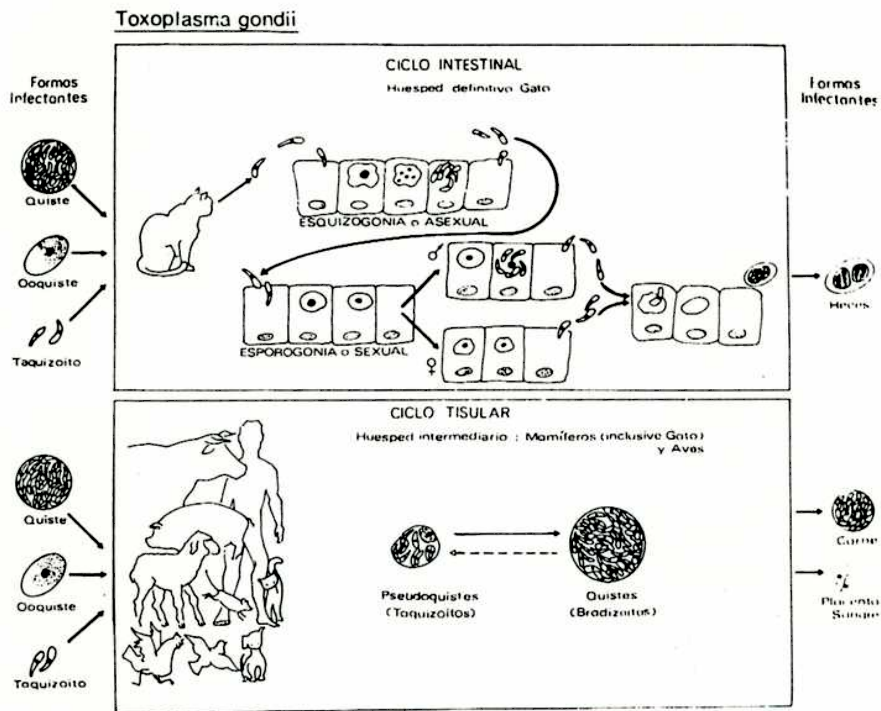


Fig. 27-7. Ciclo evolutivo de *Toxoplasma gondii*.

1.4. Morfología y estructura del taquizoíto.

FIGURA 6

El taquizoíto, forma del parásito encontrada durante la etapa aguda de la enfermedad, tiene forma de "cuarto creciente", con un extremo puntegudo y otro redondeado. (Fig. 6). Sus dimensiones son: 2 a 4 μm de ancho y 4 a 7 μm de longitud. Esta forma del organismo es la utilizada en los test serológicos como el de Sabin-Feldman, de Inmunofluorescencia Indirecta y el test de aglutinación.

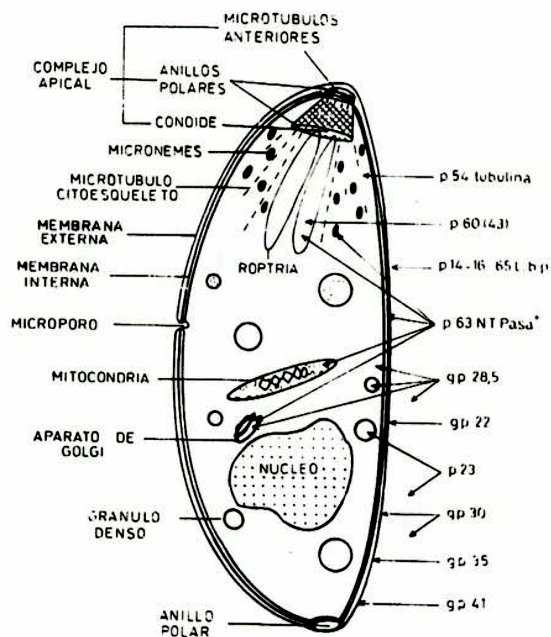


Taquizoíto visto por Scanning
Parasit. Clin., Atlas-Neghme, 1987.

El parásito se mueve por deslizamiento, aparentemente como resultado de la contracción y expansión de pequeñas fibras de su pared celular. Carece de organelas locomotoras tales como cilias y flagelos. Preparaciones teñidas con Giemsa recuerdan al merozoíto del parásito de la malaria, presentando un núcleo de coloración púrpura-rojizo y un citoplasma ligeramente azulado con gránulos oscuros. Microfotografías electrónicas revelan un conjunto altamente complicado de organelas.

El parásito (Fig. 7) posee un complejo sistema de membranas formado por una membrana plasmática típica externa, debajo de la cual se encuentran dos unidades de membrana estrechamente adosadas, que constituyen la membrana interna. Una interrupción de

FIGURA 7



Esquema celular y molecular del taquizoito. p: proteína; gp: glicoproteína; lbp: "lectin binding protein"; NTPasa: enzima con actividad ATPasa.

esta membrana e invaginación de la membrana externa aproximadamente a nivel del extremo anterior del núcleo, constituye la micropila, la cual podría funcionar como un citostoma, pero su función aún no ha sido aclarada. La membrana externa recubre al parásito en su totalidad y la membrana interna sólo deja afuera el conoide, organela que se encuentra en la parte anterior del parásito. Esta estructura tiene movimientos propios, independientes del resto; puede proyectarse y retraerse, y hasta realizar movimientos de rotación respecto del resto del cuerpo (Scholtyseck, 1973). Está formado por subunidades diagonales orientadas en sentido contrario a las agujas del reloj, vistas desde el polo posterior, (Nichols, (1987). Posee además dos anillos polares delgados, uno preconoidal y otro posterior. De este último parten 22 microtúbulos periféricos peliculares que forman una especie de jaula por fuera del citoplasma (Nichols, 1987). Estos microtúbulos siguen un curso espiralado en el mismo sentido que los filamentos del conoide y se extienden posteriormente más allá del núcleo. La zona de anclaje de estos microtúbulos en el anillo polar posterior es considerada un centro organizador microtubular (MTOC) (Nichols, 1987) donde se produciría la iniciación, ensamble, anclaje y estabilización de los microtúbulos. Se ha sugerido que las proteínas asociadas a los microtúbulos, trinucleótidos, monómeros de tubulina, y las propias condiciones iónicas promueven el ensamble de los microtúbulos. (Brinkley, 1985). Por otra parte microtúbulos internos del conoide se extienden hasta el anillo preconoidal anterior, considerándose esta zona un posible segundo MTOC.

En la parte posterior del conoide se encuentra un conjunto de organelas pares, en un número de 4 a 8, llamadas rhoptrias. Estas estructuras poseen forma de clava, con un cuello estrecho y una parte posterior vesicular que incrementa su tamaño a medida que se extiende hacia atrás. También se observan en esta zona cuerpos electrodensos llamados micronemas y gránulos densos. Las rhoptrias terminan en el área del aparato de Golgi, cerca del núcleo, que se

halla ubicado en la parte anterior de la mitad posterior de la célula. Su función más probable es asistir al parásito en la penetración a la célula huésped. Se ha podido observar a través de microfotografías de células recientemente parasitadas que las rhoptrias aparecen depletadas; la parte posterior se observa menos densa y contraída.

El núcleo está rodeado por una doble membrana con poros cubiertos por una simple y delgada membrana. Dentro del citoplasma hay un retículo endoplásmico rugoso, ribosomas libres, mitocondrias con numerosas crestas, y vacuolas de glucógeno.

1.5. Invasión, secreción y formación de la vacuola parasitófora.

Las estructuras que hasta el presente se consideran importantes para el proceso de penetración son las rhoptrias, los micronemas, pequeños cuerpos electrodensos, y los gránulos densos de mayor tamaño.

Las rhoptrias contienen al menos 10 proteínas, las cuales han sido identificadas con anticuerpos monoclonales. (Leriche y Dubremetz, 1991). Estas organelas parecen descargar su contenido durante el proceso activo de penetración de *Toxoplasma gondii* a la célula huésped. (Nichols, 1983; Nichols, 1981; Porchet-Hennere, 1983).

Lycke y Norrby, (1966) presentaron evidencias preliminares de que las rhoptrias contienen un factor que aumenta la penetración (PEF), el cuál fue parcialmente purificado como una proteína ácida de 70-150 kDa. El PEF incrementa el número de células infectadas y el número de parásitos por célula. (Norrby, 1971). Posteriormente Schwartzman y col. (1986) mostraron que una serie de AcMc específicos para las rhoptrias interfieren con el PEF inhibiendo parcialmente sus efectos. En particular el AcMc Tg49 reacciona con la proteína ROP1 de 60 kD. Dicho anticuerpo fue utilizado para

estudios de inmunolocalización mediante microscopía electrónica y marcación con oro. En todos los estadios del parásito examinados, las rhoptrias contenían ROP1. En el momento de la penetración, esta proteína fue encontrada fuera del parásito, asociada a la célula huésped y a la membrana de la vacuola parasitófora (MVP) en formación. Durante la replicación la ROP1 permaneció asociada a la MVP, pero en menores cantidades. (Saffer y col., 1992). Los autores sugieren algún rol de esta proteína en el establecimiento temprano de la infección en la célula huésped. Por otra parte, ROP1 fue clonada y secuenciada. La deducción de su estructura primaria revela que esta proteína posee una inusual carga asimétrica, con una región amino-terminal ácida rica en prolina y un dominio carboxi-terminal básico. Una hipótesis basada en esta estructura es que ella podría participar en la unión del parásito a la célula.

La función de las otras proteínas de las rhoptrias, varias de las cuales han sido clonadas, permanece oscura.

Los gránulos densos contienen antígenos referidos como proteínas GRA. Mediante estudios ultraestructurales varios de ellos han sido detectados en la vacuola parasitófora. Cada molécula mostró una localización diferencial, ya sea como proteína soluble (GRA 1 o P23) (Cesbron-Delauw, 1989), estrechamente ligada a la Red Membranosa Intravacuolar (GRA 2 o GP 28.5) (Charif, 1990) o asociada con la membrana vacuolar (GRA 5 o P21) (Lecordier, 1993).

Estas observaciones sugieren que éstos antígenos, almacenados en los gránulos densos, son liberados dentro de la vacuola parasitófora durante la invasión. Se ha demostrado que algunos de ellos son proteínas con propiedades de unión a Ca^{++} y por lo tanto podrían jugar un rol en el empaquetamiento de productos secretorios. Por otra parte su particular localización dentro del fagosoma sugiere un rol esencial en la sobrevivencia intracelular.

Se cree que las proteínas de los micronemas también participan en la invasión de *Toxoplasma gondii*, pero la descarga precisa y el mecanismo por el cual estas proteínas facilitan la invasión aún no se conocen.

El pasaje del parásito al interior de la célula huésped es rápido, ocurre en 15-30 segundos (Bommer, 1969), luego de lo cual se localiza dentro de una vacuola parasitófora, donde se replica hasta que es activado para salir de la célula huésped e invadir otras células.

Como fue demostrado en macrófagos por Sibley y col. (1985), *T.gondii* es capaz de sobrevivir y replicarse intracelularmente previniendo la acidificación de la vacuola parasitófora y su fusión con los lisosomas del huésped. Elegantes estudios recientes (Mellman, 1991) mostraron que la capacidad de los taquizoítos para producir una vacuola parasitófora incompetente para la fusión reside en su vía de entrada a la célula. Estos estudios se realizaron con fibroblastos de ovario de Hamster Chino (CHO) transfectados con genes que codifican para receptores Fc de IgG de linfocitos o macrófagos y taquizoítos cubiertos con IgGs dirigidas contra antígenos de su superficie. Si la vía de entrada a la célula fue a través de los receptores Fc expresados por estas células, se crea una vacuola de fusión competente. Por el contrario, si la invasión se realiza por los mecanismos normales, la fusión con los lisosomas es inhibida. (Joiner, 1990).

Durante la penetración la porción de membrana de la célula huésped que contribuye a la formación de la vacuola parasitófora parece modificarse. Por ejemplo, esta membrana pierde su Mg^{+} ATPasa y 5'-nucleotidasa pero no su $Na^{+}K^{+}$ ATPasa o sitios aniónicos (De carvalho y De Sousa 1989, 1990). Es posible que estas modificaciones, que están asociadas con la fusión incompetente podrían conducir a una inhabilidad para acidificar la vacuola parasitófora, si por ejemplo la H^{+} ATPasa no descarga hacia la

vacuola (Joiner, 1990). O sea, que durante la formación de la membrana vacuolar podría ocurrir una exclusión activa o inactiva de la bomba de protones de la membrana plasmática u otros canales iónicos.

Dentro de la vacuola parasitófora se forma una red secretoria de estructuras tubulares, la red membranosa intrafagosomal (IPM), que contiene proteínas de *T.gondii* (Sibley, 1988). La formación de esta red involucra una redistribución de las principales proteínas de la membrana externa de *T.gondii*, entre ellas las de 41, 35, 29 y 22 kDa. Esto fue demostrado mediante técnicas de radioinmunoprecipitación, SDS-PAGE e inmunomarcación con oro utilizando microscopía electrónica y AcMcs contra *T.gondii*. Además, en preparaciones purificadas de la red se encontró como componente principal una proteína de 32 kDa. Esta proteína fue reconocida por el AcMc IG5, el cual no reacciona con la superficie de taquizoítos intactos. Microscopía electrónica de preparaciones inmunomarcadas con este AcMc, mediante la técnica de inmunoperoxidasa, indica que la proteína de 32 kDa es un constituyente de vacuolas electrodensas dentro del taquizoíto. Así, el armado de la red parecería involucrar una liberación regulada de la proteína de 32 kDa conjuntamente con el aporte de proteínas de la superficie del parásito. Se piensa que las modificaciones del fagosoma de la célula huésped por *T.gondii* son eventos precisamente regulados que contribuyen a la sobrevivencia intracelular.

Es una intriga el hecho de que después de la invasión el potencial de membrana mitocondrial de *T.gondii* se reduzca (Tanabe y Murakami 1984) y las mitocondrias de la célula huésped se concentren rodeando la vacuola parasitófora. Esto sugiere que el sistema de transporte iónico de la membrana de la mitocondria permanece inactivo durante la vida intracelular y que *T.gondii* sólo sintetice ATP por la vía de la glucólisis, produciendo además piruvato, que por ser permeable a la membrana celular y

mitocondrial podría pasar a las mitocondrias del huesped. Por otro lado las mitocondrias son importantes en la regulación del calcio intracelular, tomándolo del citoplasma. La despolarización de la membrana mitocondrial impediría este mecanismo, provocando una disminución del calcio intramitocondrial. Es sabido, que la administración de un ionóforo de calcio en macrófagos de ratones infectados, provoca la liberación de los parásitos intracelulares. Podría ser factible entonces que altas concentraciones de Ca^{++} citoplasmático constituyan una señal para iniciar el crecimiento y multiplicación del parásito (Tanabé, 1984).

1.6. Reconocimiento parásito-huesped.

Existen evidencias de que la ingestión de *T.gondii* por los macrófagos involucra procesos de reconocimiento, con participación de componentes de superficie de ambas células. (Saffer 1989; De Carvalho y de Souza, 1990). Estudios llevados a cabo con otros protozoos patógenos han mostrado que sobre la superficie celular existen residuos de azúcares involucrados en el proceso de reconocimiento entre el parásito y la célula huesped. La adición de monosacáridos al medio de incubación (Crane y Dvorak, 1982; Araujo-Jorge y de Souza, 1984) o tratamiento de las células con lectinas (Meirelles 1983) y glicosidasas (Araújo-jorge y de Souza 1984; Villalta 1984) bloquean el proceso de invasión de estos parásitos a las células. En el caso de *T.gondii* se ha mostrado que ninguno de los monosacáridos testeados interfiere con la infección de la célula huesped (Crane y Dvorak, 1982). En un intento de caracterizar con más detalle la naturaleza de los componentes de la superficie de este parásito, se utilizó un panel de diferentes lectinas marcadas con fluoresceína, y ninguna de ellas se unía a los taquizoítos intactos. (Handman 1980). La ausencia de sitios de unión a lectinas sobre la superficie del parásito dejó abierta la posibilidad del uso de ellas para el aislamiento de taquizoítos, induciendo la aglutinación de otras células (Hoshino-Shimizu, 1980). Estudios recientes usando lectinas

marcadas con oro confirmaron los estudios previos. Sin embargo una restringida marcación en el interior de las rhoptrias indicó la presencia de macromoléculas, probablemente glicoproteínas, conteniendo manosa, galactosa, N-acetyl-D-galactosamina y ácido N-acetyl-murámico. En vista de la probable ausencia de sitios conteniendo carbohidratos expuestos sobre la superficie del taquizoíto, se sugirió que los residuos de azúcares encontrados en macromoléculas localizadas en las rhoptrias podrían ser liberados durante la fase inicial de la interacción parásito-huesped facilitando el reconocimiento célula a célula. (De Carvalho L.,1991).

Recientemente ha sido demostrado que la laminina y proteínas que unen laminina de 14-16 y 60 kDa están presentes sobre la superficie del taquizoíto. Estas proteínas de unión a laminina parecen estar involucradas en el contacto con la célula huesped (Joiner,1989).

Fue sugerido que el colesterol (usado como receptor por rickettsias) puede también ser usado por *T.gondii*, pero esta hipótesis no ha sido demostrada.

1.7. Bioquímica de *Toxoplasma gondii*.

1.7.1. Proteínas.

T.gondii contiene más de 1000 proteínas. Las principales proteínas de superficie de *T.gondii* se muestran en la figura 7. Las proteínas de superficie de 43, 35, 30 y 22 kDa están ancladas a la membrana a través de glicosil-fosfatidil-inositol. (Tomavo 1989), el cual es antigénicamente similar para todas ellas, así como también para los VSGs de tripanosomas. La más abundante de estas proteínas, la gp30, ha sido estudiada muy extensamente

(Santoro, 1986; Burg, 1988). Su peso molecular aparente, bajo condiciones reductoras, es de 30-35 kDa y bajo condiciones no reductoras de 27-28 kDa. Esta proteína fue detectada sólo en el estadio de taquizoítos y se observó en todas las cepas de *T.gondii* testeadas. Constituye aproximadamente el 5% del total de proteínas del taquizoíto. Está distribuida homogéneamente sobre la superficie del parásito, dentro de él y en la red tubular de la vacuola parasitófora. Es hidrofóbica, con un punto isoelectrico ligeramente ácido. Varias formas estrechamente relacionadas son resueltas por electroforesis bidimensional. Los productos de traducción primarios tienen un extremo carboxi-terminal hidrofóbico, el cual predice un clivaje postraducciona y modificación con un glicolípido de anclaje. El ARNm de la gp30 tiene 1500 nucleótidos y es poliadenilado. Anticuerpos contra p30 han sido identificados en adultos con toxoplasmosis aguda y crónica y en individuos infectados congénitamente. En estudios de protección pasiva, usando AcMcs contra p30, ha sido descripta la situación paradójica de protección parcial o incremento de la mortalidad. La administración de p30 con adyuvantes, en ratones, ha resultado en una protección sustancial. (Kasper, comunicación personal). Esta proteína es capaz de estimular respuestas de tipo IgG, IgM, IgE, IgA e IgA secretoria, así como también linfocitos que producen interferón- γ y linfocitos citotóxicos. Estas observaciones sugieren que la p30 puede sensibilizar tanto linfocitos TH1 como TH2. Ha sido utilizada para el desarrollo de un sensible test de diagnóstico de la toxoplasmosis congénita. (Decoster, 1988b).

Antígenos excretorios-secretorios de *T.gondii* (ESA) han sido intensamente estudiados. Ellos confieren sobrevida aumentada en ratones y ratas de experimentación. (Duquesne, 1990; Sharma, 1984). Uno de ellos, gp 28.5, ha sido indentificado por un anticuerpo monoclonal (Sharma 1984) que también tiene reacción cruzada con una proteína de 58 kDa. La proteína gp 28.5 está presente en los gránulos densos, debajo de la membrana externa del taquizoíto, en

el aparato de Golgi donde probablemente es empaquetada para la secreción y en la red membranosa intrafagosomal. (Charif 1990, Sibley y Sharma 1987). Se encuentra también en los bradizoítos y en la pared de los quistes (Charif, 1990). Su función es desconocida. Se han detectado anticuerpos contra esta proteína en el suero de todos los individuos con infección crónica testeados. (Decoster, 1988b).

Otro antígeno ESA estudiado, el p23, fue clonado y secuenciado. Tiene propiedades de unión al calcio y está localizado en los gránulos densos de taquizoítos y bradizoítos y en la vacuola parasitófora. (Cesbron-Delauw, 1989).

Sadak y Dubremetz (1988), utilizando anticuerpos monoclonales preparados contra una fracción subcelular enriquecida en rhoptrias, detectaron por inmunoblotting dos principales proteínas de 55 y 60 kDa de las rhoptrias. Por experimentos de pulse-chase demostraron que estas proteínas derivaban de precursores de 66 y 68 kDa respectivamente.

Estudios citoquímicos mostraron que las rhoptrias de *T. gondii* contienen proteínas básicas, polisacáridos y fosfatasa ácida.

Recientemente Leriche y Dubremetz (1991), lograron una caracterización más completa del contenido proteico de las rhoptrias y gránulos densos a través de un procedimiento de fraccionamiento subcelular y técnicas de inmunodetección y Western blot utilizando anticuerpos monoclonales. Un resumen de dicha caracterización se muestra en la tabla 1.

Antibody	IFA	IEM	M_r	Pi	Antigen	[Ref.]
T5 2A7	Anterior	Neg	220	7.2-7.6		
T5 4G1	Anterior	Neg	168	7.5		
T5 4H1	Anterior	Neg	120	7.4		
T5 1B11	Anterior	Neg	90	4.7		
T5 2A3 and T5 2C3	Rhoptry	Rhoptries	60.5	5.8	PEF ROP 1	[16]
T3 4A7	Rhoptry	Rhoptries	55+59+60	>8	ROP 2,3,4	[7]
T2 2H3	Rhoptry	Rhoptries	60	>8	ROP 4	[7]
T4 2F8 and T5 2D1	Rhoptry	Rhoptries	55+59	>8	ROP 2,3	[7]
T5 3E2	Rhoptry	Rhoptries	59.5	>8	ROP 5	
T5 1A11 and T4 3H1	Rhoptry	Neg	57	nd		
T3 1E5 and T5 3H12	Rhoptry	Rhoptries	42	4.7	ROP 6	[18]
T6 2H11	Bipolar	Dense granules	30	nd	GRA 3	
T5 1F5	Bipolar	Dense granules	28	7.8	GRA 2	[21]
T5 2B4	Bipolar	Dense granules	27	4.8	GRA 1	[8,20]

Antibody, monoclonal antibody identification; IFA, immunofluorescence pattern; IEM, immunoelectron microscopic localization; M_r , apparent M_r in SDS-PAGE, reducing conditions; Pi, isoelectric point measured on 2D-electrophoresis; nd, not done.

1.7.2. Carbohidratos y lípidos.

Hay poca información acerca de los carbohidratos de *T. gondii*. Anticuerpos contra un carbohidrato de 6 kDa parece ser un marcador del estadio agudo de la infección. (Erlick, 1983), pero aún no ha sido caracterizado. Mauras y col (1980) encontraron 3×10^4 sitios de unión a concanavalina A. El GPI de la p30 es un diacilglicerol unido vía fosfoinositol al azúcar, el cual incluye manosa. La pared del quiste tisular también une lectinas.

Tampoco hay mucha información acerca de la composición lipídica de *T. gondii*. Tiene una baja relación de colesterol/fosfolípidos, gran cantidad de fosfatidilcolina y de ácidos grasos insaturados y una relativamente baja cantidad de esfingomielina. (Gallois, 1988).

2. TRANSMISION.

2.1. Fuentes de infección.

Los gatos son de importancia central en la diseminación de *Toxoplasma*. Un gato puede eliminar varios millones de ooquistes capaces de infectar un gran número de animales y hombres, mientras que un animal infectado puede transmitir la infección sólo a los pocos individuos que consumen de su carne. Las heces del gato que contaminan con ooquistes el suelo son la principales fuente de infección. La carne cruda o poco cocida es fuente de quistes tisulares. La infección transplacentaria es importante por la frecuencia de enfermedad severa que resulta en los recién nacidos. La mayoría de los seres humanos se infectan por vía oral, con ooquistes de gatos o quistes tisulares de carne. Los gatos defecan en el suelo, y los ooquistes persisten por varios meses en un lugar sombrío y húmedo. Especialmente los gatos domésticos, que defecan en los patios, son causa de contaminación importante. Los ooquistes fácilmente infectan al niño que juega en el suelo, y a cualquier persona que pone sus manos contaminadas en la boca. Del suelo se infectan los pájaros, ratones y ratas, y éstos, a su vez, son la fuente de infección para los gatos. También del suelo se infectan ovejas, cerdos, gallinas, etc., que son fuentes de carne para el consumo humano.

2.2. Toxoplasmosis congénita.

La toxoplasmosis congénita es probablemente la forma más seria de la infección (Remington y Desmonts, 1976). Esta se produce debido a la primoinfección y posterior parasitemia de la mujer embarazada, que en algunos casos determina el pasaje del parásito a través de la placenta infectando al feto (Desmonts y Couveur, 1979).

Dependiendo de la localización geográfica, la incidencia de toxoplasmosis congénita oscila entre 0.25 y 5 de cada 1000 niños nacidos vivos (Remington y Desmonts, 1983). En los EE.UU., por ejemplo, nacen anualmente 3000 niños infectados. (Krick y Remington 1978).

Según las estadísticas, el 34% de las mujeres que adquieren la enfermedad durante el embarazo, transmiten la infección a sus niños. (Desmonts y Couveur, 1974). En este sentido se ha visto que el pasaje del parásito a través de la placenta está más favorecido en los últimos meses de embarazo que en los primeros, aunque los trastornos producidos en el feto son más graves cuando el pasaje se produce en los primeros meses de la gestación. (Dupouy-Camet, 1990).

Del total de niños infectados durante el embarazo, el 75% no presentan la sintomatología de la enfermedad hasta el primer año de vida (Desmonts y Couveur, 1974). Las patologías observadas incluyen grandes daños del sistema nervioso central, evidenciados por trastornos neurológicos y oculares (Frenkel 1974).

Los problemas oculares registrados en el 90 % de los casos y en ambos ojos son la coroiditis y el estrabismo. En lo que respecta a los cuadros neurológicos encontramos la hidrocefalia, calcificaciones intracerebrales, microcefalia y convulsiones (Wilson y col., 1980).

El costo correspondiente al mantenimiento anual de las personas con secuelas de toxoplasmosis congénita en los EE.UU. se estima en cientos de millones de dólares (Wilson y Remington, 1980).

2.3. Toxoplasmosis adquirida.

La toxoplasmosis adquirida puede ser aguda o crónica. Dentro de la primera, y en relación al órgano o sistema, predominantemente afectado se distinguen las siguientes formas: generalizada, ganglionar, ocular, cardíaca, del sistema nervioso central, cutánea, pulmonar y hepática. De todas las formas la mejor estudiada es la ganglionar. Representa del 13 al 15% de todas las adenopatías de causa no precisada. Afecta de preferencia a niños y adultos jóvenes de sexo femenino. Los ganglios más afectados son los cervicales posteriores y laterales, en menor proporción los submaxilares y más raro es el compromiso de los ganglios axilares e inguinales. Por lo general miden de 0.5-2 cm, son de consistencia elástica, poco dolorosos, no se adhieren a planos profundos, no confluyen, ni se fistulizan. El adenograma revela una adenitis inespecífica y la biopsia demuestra una "reticulosis medular linfohistiocitaria". El diagnóstico diferencial debe plantearse con aquellas enfermedades que afectan de preferencia los ganglios cervicales, por ejemplo: mononucleosis infecciosa, rubeola, lúes secundaria, impétigo del cuero cabelludo, adenopatía por fenitoína, tuberculosis, sarcoidosis, Hodgkin, metástasis y linfomas. La confirmación del parásito se obtiene mediante la observación del mismo a través de inoculaciones experimentales del material del ganglio y/o test serológicos seriados que indiquen fases evolutivas características de los períodos agudos de la enfermedad. Dentro de las formas crónicas tenemos la cardíaca, ocular y del sistema nervioso central.

3. EPIDEMIOLOGIA.

La toxoplasmosis es la zoonosis parasitaria más difundida en la naturaleza. Se encuentra distribuida en todo el mundo. Prevalece más en regiones tropicales que en zonas árticas o áridas. Se ha demostrado tanto en poblaciones humanas como en más de 300 especies de mamíferos domésticos y silvestres, y en alrededor de 30 especies de aves de corral y silvestres. Las estadísticas serológicas, efectuadas en distintos países, indican una infección predominante del 40-50% de los adultos sanos entre los 30 y 40 años de edad (Fig. 8) (Remington, 1976; Cour Boveda, 1976, Chiscano, 1981).

Estas cifras varían de un lugar a otro, lo que se atribuye, entre otras causas, a factores geográficos y climáticos, a hábitos alimenticios, al tipo de trabajo, a la higiene ambiental y a la presencia de gatos infectados. La ciudad de París (Francia) y Costa Rica alcanzan los valores más altos de serología positiva (90 y 75% de la población adulta entre 30 y 40 años). En cambio España, Japón y Gales alcanzan valores de 25% en la misma franja de la población estudiada. En Argentina se realizó un estudio con 448 sueros provenientes de personas de distintas edades y sexo, de mujeres embarazadas y de personas con alteraciones fisiológicas (reumatismo, enfermedades alérgicas, cáncer). Ciento veinte sueros provenían a su vez de la provincia de Río Negro; el resto, de la Ciudad de Buenos Aires y Gran Buenos Aires. Serología positiva se observó en el 56.2% de los casos. (Fig.8). Los análisis estadísticos indicaron que la infección es independiente del sexo, y de las demás situaciones analizadas.

La tasa de prevalencia es relativamente baja en los niños pequeños y aumenta en forma paulatina con la edad. La difusión del parásito ocurre en diferentes ciclos inter-animales de la misma o de diferentes especies, de las cuales pasa al hombre pudiéndose

finalmente producir transmisión inter-humana vía infección congénita. (Fig 9).

FIGURA 8

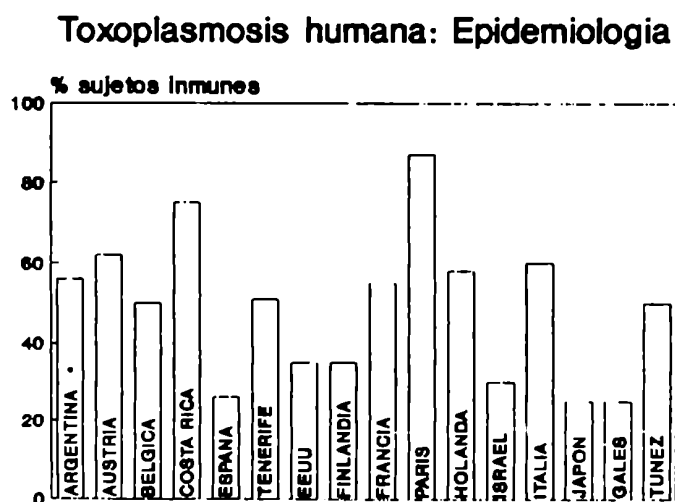
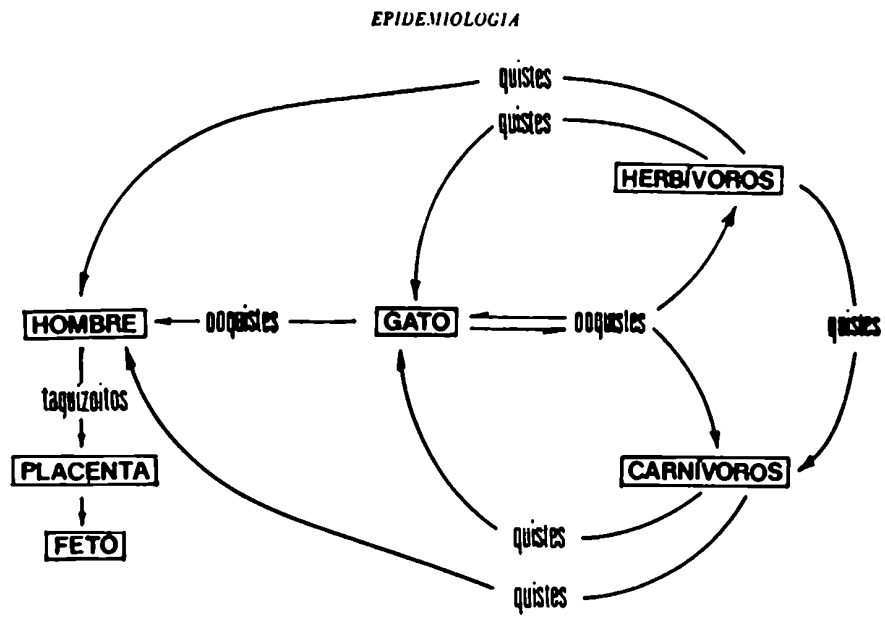


Gráfico de las estadísticas epidemiológicas de serología positiva a *T. gondii* en el mundo. Argentina: datos obtenidos de 448 sueros tomados al azar en Bs. As. (928) y Rio Negro (120). La serología se investigó por medio de las técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y Enzimoimmunoensayo (ELISA).

FIGURA 9

FORMA DE TRANSMISION DE T. GONDII ENTRE LOS DISTINTOS HUESPEDES



4. MANIFESTACIONES CLINICAS.

En huéspedes inmunocompetentes, la infección por *Toxoplasma* es usualmente subclínica o se manifiesta como una linfadenitis aguda. En cambio, en pacientes inmunocomprometidos (transplantados, individuos con SIDA, etc.) y en neonatos esta enfermedad puede ocasionar consecuencias muy severas.

4.1. Forma Aguda.

La manifestación clínica más común es la linfadenopatía, la cual usualmente involucra los nódulos linfáticos cervicales posteriores. (Gray, 1972). Sin embargo, los nódulos linfáticos de cualquier sitio del cuerpo pueden estar involucrados. Linfadenopatía generalizada se ha encontrado en más de la mitad de los casos y esplenomegalia transiente en un tercio de los casos. Mientras que la toxoplasmosis linfadenopática es autolimitada, puede ser recurrente o existir durante meses, imitando un linfoma o carcinoma metastásico. Los pacientes pueden presentar también un síndrome de "mononucleosis infecciosa", tal como linfadenopatía cervical, fiebre, malestar, linfocitosis atípica, mialgia, tos y eritema macropapular, aunque los test de anticuerpos heterófilos son usualmente negativos. (Krick, 1978).

En las formas severas agudas los pacientes pueden presentar pneumonitis, miocarditis, pericarditis, hepatitis, anemia hemolítica Coomb negativa, polimiositis, encefalitis o meningoencefalitis. Sin embargo esto raramente ocurre en individuos inmunocompetentes. Pacientes con enfermedades hematológicas malignas, especialmente linfomas o leucemias linfocíticas, transplantados sometidos a tratamiento con drogas

inmunosupresoras, individuos con SIDA y otras enfermedades son propensos a tener formas severas de la enfermedad, con frecuencia rápidamente fatal. En el 50% de los casos documentados existe un compromiso del sistema nervioso central. El paciente presenta dolor de cabeza, cambios de estado mental, déficit neurológico focal. En algunos casos se producen abscesos cerebrales que ocasionan la muerte.

4.2. Forma crónica.

En los huéspedes inmunocompetentes, los taquizoítos intracelulares se rodean de una pared, constituyendo la forma quística (Jones, 1980). El quiste puede ser virtualmente encontrado en todos los órganos, pero el sistema nervioso central, el corazón y el músculo esquelético son los sitios de infección latente más comunes. El quiste puede persistir durante toda la vida del huésped. Los bradizoítos dentro del quiste se multiplican muy lentamente. Luego de cierto período, la ruptura de quistes puede causar una inflamación local o parasitemia. El paciente continúa asintomático, pero puede desarrollar una coriorretinitis. Así, el compromiso ocular es generalmente considerado la manifestación tardía de una forma congénita silenciosa. En individuos inmunocomprometidos la ruptura de los quistes es dramática, conduciendo a una inflamación fulminante y muerte.

5. DIAGNOSTICO.

El diagnóstico de la toxoplasmosis puede ser establecido actualmente en base a dos criterios diferentes:

a) **Directo:** basado en la demostración de la presencia de parásitos o alguno de sus componentes en muestras biológicas (fluidos corporales o material de biopsias).

b) **Indirecto:** por demostración serológica de anticuerpos específicos.

Tanto los métodos directos como indirectos incluyen una amplia variedad de técnicas, algunas de las cuales ya han sido abandonadas, otras son de uso rutinario, mientras que otras están en pleno desarrollo.

5.1. Diagnóstico directo.

Si bien los métodos directos son de antigua data, muchos de ellos son dificultosos y no concluyentes. Actualmente, con el advenimiento de enfermedades que comprometen al sistema inmune como es el caso de individuos HIV positivos o en pacientes transplantados sometidos a tratamientos con drogas inmunosupresoras, se tornó imprescindible un diagnóstico rápido y preciso de la toxoplasmosis aguda. La serología en estos casos es comunmente ambivalente y no concluyente, por lo cual se hace necesario recurrir a sistemas de diagnóstico directo. Las técnicas de detección directa convencionales no son satisfactorias debido a lo laborioso que resulta su implementación y tampoco la serología ha dado respuestas concretas. Por tal motivo, en los últimos años, han comenzado a desarrollarse nuevas y modernas técnicas de detección directa, con resultados muy promisorios.

Los métodos directos pueden ser clasificados en tres grupos:

5.1.1.- Demostración de parásitos

5.1.2.- Demostración de antígenos del parásito.

5.1.3.- Demostración de ácidos nucleicos del parásito.

5.1.1 - Demostración de parásitos.

Estos métodos se basan en la demostración de la presencia de taquizoítos o quistes en tejidos por técnicas histológicas convencionales o técnicas inmunocitoquímicas a partir de material de biopsia.

Extendidos de fluidos biológicos o improntas de tejidos son preferentemente teñidos con Giemsa, visualizándose los taquizoítos con su núcleo de color rojo púrpura y su citoplasma azul. En secciones de tejidos, sin embargo, la identificación de taquizoítos es más complicada. debido a la similar morfología presentada por una variedad de otros protozoos y hongos. Transitoriamente tuvo cierto significado la identificación del parásito en los tejidos, mediante el empleo de anticuerpos marcados con fluoresceína, una forma de colorearlos selectivamente. Pero lo complicado del método hizo que se lo abandonara. Actualmente, el uso de anticuerpos monoclonales específicos contra antígenos del parásito, en técnicas inmunoenzimáticas sobre cortes de tejidos, ha facilitado enormemente el diagnóstico histopatológico. (Garberi, 1991).

Otro modo de demostración directa de la presencia de *Toxoplasma* es por subinoculación de tejidos infectados (usualmente material de biopsias o de autopsias) en animales de experimentación (por ej. ratón blanco) o en cultivo de tejidos. (Hayes, 1973; Chang, 1972). Abbas (1967) demostró que los cultivos celulares son menos sensibles para el aislamiento de parásitos,

que la inoculación en ratones.

El organismo puede ser aislado de material de biopsia proveniente de neonatos (por ej. músculo esquelético) mediante su inoculación en ratones. La desventaja de este método es que, el organismo aislado de infantes infectados congénitamente, es relativamente avirulento para el ratón. El período requerido para la demostración definitiva del parásito es de 4 a 6 semanas. En los casos en que el organismo es virulento para el ratón, puede encontrarse en el exudado peritoneal del ratón inoculado en unos 5 a 10 días.

Toxoplasma también ha sido aislado de fluidos corporales, por ej. fluido ventricular y cerebroespinal, (Chang, 1972; dos Santos, 1975), fluido subretinal, humor acuoso o fluido amniótico. El aislamiento a partir de tejidos tales como músculo esquelético, pulmón, cerebro u ojos, obtenidos de biopsias o autopsias de jóvenes y adultos, puede reflejar solamente la presencia de quistes tisulares. Por lo tanto no es una prueba de infección aguda. Una excepción a esto, es el aislamiento de *Toxoplasma* a partir de nódulos linfáticos de jóvenes y adultos. Tal evidencia indica la presencia de taquizoítos, ya que los quistes son raramente encontrados en nódulos.

5.1.2. - Demostración de antígenos en suero y fluidos corporales.

La antigenemia de *Toxoplasma* en humanos con infección aguda ha sido demostrada a través del test de ELISA, (Araujo y Remington, 1980; Van Knapen, 1977). Por medio de esta técnica también han sido encontrados antígenos en fluido cerebroespinal y fluido amniótico de recién nacidos con toxoplasmosis congénita, (Araujo y Hadman, 1980).

En un estudio realizado por Remington y Col. (Araujo y

Remington, 1980; Araujo y Hadman, 1980), el test de ELISA detectó antigenemia en 15 de 23 sueros (65.2%) provenientes de pacientes con toxoplasmosis aguda recientemente adquirida. En cambio, en el suero de 28 individuos normales (seronegativos para anticuerpos contra *Toxoplasma*) y de 55 individuos crónicamente infectados con *T. gondii*, no fue detectada antigenemia. Araujo y Hadman, (1980) también usaron anticuerpos monoclonales para detectar antigenemia.

5.1.3. - Demostración de la presencia de ácidos nucleicos.

Para este propósito la técnica de hibridización es una de las herramientas nuevas aportadas por la biología molecular. En la última década se han clonado una serie de secuencias de ADN con el objeto de ser utilizadas en el diagnóstico de enfermedades infecciosas (Kisbury, 1987). En el caso de la detección de parásitos se han clonado sondas de diferentes especies como *Plasmodium*, *Tripanosoma* y *Leishmania*. (Barker, 1990).

Recientemente, algunos investigadores han descripto el uso de secuencias de ADN de *T. gondii* como sondas para la detección del material genético del parásito (Burg 1989, Grover 1990, Savva 1990, Holliman 1990, Weiss 1991), utilizando para ello la sensible técnica de PCR (Mullis y Faloona, 1987). Esta técnica está siendo testeada por estos grupos obteniéndose resultados diversos, en especial en los casos más críticos como son la toxoplasmosis congénita y cerebral.

En los últimos años varios grupos han investigado la posibilidad de usar secuencias de ADN repetitivas como sondas de diagnóstico de enfermedades parasitarias. (Barker 1990)

Recientemente fueron aisladas y clonadas en nuestro laboratorio tres secuencias repetitivas de *T. gondii*

(Blanco, J. 1992). Una de estas secuencias está repetida más de 1000 veces en el genoma de *T.gondii*. (Angel,1991). Esta sonda, marcada radioactivamente, fue utilizada para la detección de DNA de *T.gondii* en muestras de sangre de ratones con toxoplasmosis aguda experimental. Este diagnóstico se realizó mediante un simple método de hibridización utilizando la técnica de Dot-Blot.

Posteriormente, esta sonda marcada no radioactivamente, con dioxigenina-dUTP, fue utilizada para el diagnóstico temprano de encefalitis toxoplásmica en pacientes con SIDA. (Angel, 1992).

5.2. Diagnóstico indirecto.

Se basa en la detección serológica de anticuerpos específicos contra *T. gondii*.

Los test serológicos más ampliamente usados para el diagnóstico de la toxoplasmosis son : el test de Sabin-Feldman, también llamado test de dye, (Sabín y Feldman, 1948), de fijación de complemento [FC] (Warren, 1942), de hemoaglutinación indirecta [HAI], (Jacobs, 1957), inmunofluorescencia indirecta [IFI], (Walton,1966), aglutinación directa [AD] y ELISA.

5.2.1. Test de Sabin-Feldman o test de Dye.

Desde su descripción en 1948, el test de dye ha sido standarizado (Beverley y Beattie,1958) y adaptado a microescala (Feldman y Lamb 1966; Waldeland 1976; Balfour 1982). El test se realiza sobre parásitos vivos y un abundante suplemento de suero humano normal, y requiere alto grado de experiencia técnica, en cuanto a la seguridad de ejecución como en la exactitud en la

interpretación. El test se basa en la observación de que, cuando organismos vivos provenientes de exudado peritoneal de ratones infectados son incubados en presencia de suero inmune y complemento (Schreiber y Feldman 1980), ocurre lisis inmune y los parásitos son incapaces de incorporar el colorante vital azul de metileno.

Parásitos expuestos a suero no inmune bajo idénticas condiciones aparecen teñidos profundamente cuando son observados al microscopio. El título reportado es la dilución a la cual el 50% de los parásitos aparecen teñidos, o sea permanecen vivos. La Organización Mundial de la Salud (WHO) ha recomendado que el título sea expresado, por comparación con un suero standart de referencia internacional, en Unidades Internacionales por mililitro.

El test de Sabin Feldman es específico y sensible. Excelentes resultados se obtuvieron tanto en sueros humanos como también en animales. Sin embargo, su utilidad en la práctica diaria se ve restringida por sus exigencias técnicas. Este test constituye el procedimiento de referencia empleado en la evaluación de nuevas técnicas.

5.2.2. Test de hemaglutinación indirecta (HAI).

La técnica descrita por Boyden y aplicada a la toxoplasmosis por Jacobs y Lunde (1957), es relativamente sencilla y presenta la ventaja de emplear toxoplasmas muertos como antígeno. El antígeno es preparado a partir de exudado peritoneal de ratones infectados con dosis altas de toxoplasmas virulentos, utilizándose el extracto lisado del parásito, que se puede conservar en estado congelado o liofilizado. Esta preparación es mezclada con glóbulos rojos de cordero, o eritrocitos humanos de grupo O, previamente tratados con ácido tánico. Los hematíes sensibilizados con el

antígeno, aglutinan en contacto con un suero que contenga anticuerpos anti-toxoplasma. La prueba se realiza en sueros previamente inactivados y mezclados con una solución tampón (pH 7,2) en diluciones dobles de 1:4 a 1:4.000, utilizándose, de preferencia, el micrométodo en placas (Knierim, 1966). La lectura, que se realiza macroscópicamente, consiste en la apreciación de la aglutinación de los hematíes, a través de un espejo. Como resultado final, se considera la dilución más alta del suero en que se observa aglutinación franca.

El método es empleado fundamentalmente, en el control de la toxoplasmosis crónica y en estudios seroepidemiológicos.

5.2.3. Test de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

La introducción por Kelen y col. (1962) de la técnica de inmunofluorescencia indirecta en la serología de la toxoplasmosis, representó un notable adelanto.

Este test usa parásitos enteros, fijados o secados sobre portaobjetos, los cuales son incubados con diluciones seriadas del suero a testear. Los anticuerpos anti-toxoplasma son detectados usando un antisuero anti-IgG o anti-inmunoglobulinas totales conjugadas con fluoresceína y observados a través de un microscopio de fluorescencia. El test es usualmente específico y se ha descrito una buena concordancia cuantitativa con el test de dye. (Walton, 1966; Sulzer y Hall 1967; Kramer 1970).

5.2.4. Test de Inmunofluorescencia-IgM (IFI-IgM).

El test de IFI ha sido adaptado para la detección de anticuerpos del tipo IgM contra *T. gondii* y ha resultado exitoso en el diagnóstico de la toxoplasmosis congénita e infecciones adquiridas. (Alford, 1974; Karim, 1975; Camargo, 1978; Remington

I, 1968, Remington II, 1968; Stagno, 1970; Aparicio Garrido, 1972). El uso de anticuerpos IgM en el diagnóstico de infecciones congénitas viene del descubrimiento en 1963 por Eichenwald y Shinefield (1963) de que el feto es capaz de producir anticuerpos IgM específicos. La presencia de anticuerpos IgM en el suero obtenido de neonatos es una evidencia de síntesis de anticuerpos específica por el feto infectado en el útero. A diferencia de los anticuerpos IgG, los anticuerpos IgM maternos normalmente no pasan la barrera placentaria.

5.2.5. Test de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

A diferencia de los test descritos anteriormente, el test de ELISA es rápido, requiere poca experiencia técnica, puede ser medido objetivamente y conduce en sí mismo a la automatización.

Este test ha sido usado para la detección de IgG específicas (van Loon y Van Der Veen 1980; Carlier 1980), para la detección de IgM específicas (Camargo 1978a; Mineo 1980; Naot 1981) y para la detección de inmunoglobulinas específicas totales (Lin 1980; Milatovic y Braveny 1980).

Este test se puede realizar con parásitos enteros, fijados o secados sobre un soporte o bien con antígenos solubles en cuyo caso el test resulta más práctico ya que la observación microscópica no es necesaria. Además se pueden utilizar como antígenos, diferentes fracciones del parásito, con lo cual se pueden indentificar anticuerpos de diversas especies. La utilización de anticuerpos conjugados con enzimas hace a este test muy sensible ya que puede ser realizado con mínimas cantidades de antígenos adsorbidas a superficies de plástico.

5.2.6. Test de ELISA-IgM.

Naot y Remington (Naot, 1980; Naot, 1981) desarrollaron un ELISA-IgM doble sandwich para la detección de anticuerpos IgM contra *Toxoplasma*. Este ensayo se basa en la captura de IgM humanas por medio de anticuerpo anti-IgM humanos que cubren la superficie de los pozos de la placa de microtitulación. De este modo se evita cualquier interferencia debida a anticuerpos del tipo IgG presentes en el suero, ya que sólo quedan unidas la inmunoglobulinas del tipo IgM. La adición de antígenos de *Toxoplasma* resulta en una reacción específica entre estos antígenos y los anticuerpos IgM anti-*Toxoplasma* adheridos. Para la detección del complejo formado IgM anti-*Toxoplasma*-antígeno se utiliza un antisuero conjugado con enzimas.

5.2.7. Test de aglutinación directa (AD).

Esta técnica fue aplicada a la toxoplasmosis por Fulton y Turk (1959). Se trata de una reacción cualitativa y cuantitativa. Utiliza como antígeno parásitos enteros preservados en formol, los cuales puestos en contacto con una muestra de suero inmune diluida, evidencia la formación de un halo de aglutinación uniforme en un pocillo de plástico. Esta reacción detecta anticuerpos dirigidos preferentemente contra antígenos de membrana. La reacción es intensa con anticuerpos del tipo IgM y poco sensible para anticuerpos del tipo IgG. Por lo tanto, no se obtienen resultados comparables con el test de dye, que solo detecta IgG.

Para determinar si un resultado positivo corresponde a anticuerpos IgG o IgM, el suero inmune es tratado previamente con 2 Mercapto-ethanol (Me). Este procedimiento no afecta a los anticuerpos IgG; de modo que la persistencia del título positivo, a niveles inalterados luego del tratamiento con 2 Me,

indica la presencia de anticuerpos IgG contra *Toxoplasma*.

5.2.8. IgM-ISAGA. (Immunosorbent agglutination assay).

Este método desarrollado por Desmonts y Remington (1981) se realiza sobre placas de microtitulación en las cuales cada pozo está cubierto con anticuerpos anti-IgM humanos, como para el IgM-ELISA. El suero a testear es agregado a los pozos e incubado para permitir la unión de las IgM. Luego se agrega una suspensión de taquizoítos de toxoplasma, preparados como para el test de aglutinación directa y se incuba a 37°C. Si anticuerpos IgM se hallan presentes, secuestrados en la superficie del pozo, los taquizoítos quedan unidos. Las placas son leídas sobre un fondo oscuro con una fuente de luz lateral, observándose un patrón de lectura que varía desde un botón en la base del pozo para un suero negativo, hasta un tapiz completo cubriendo enteramente la base del pozo para un suero fuertemente positivo.

Una dificultad para la realización de este test es que requiere un gran número de taquizoítos, cuya obtención es dificultosa y laboriosa. Remington, Eimstad y Araujo, (1983) introdujeron una modificación, que consiste en la realización del test sobre perlitas de latex cubiertas con antígenos de *Toxoplasma*. (Latex IgM-ISAGA). Sólo 250 µg de preparación antigénica son necesarios para cubrir 10 mg de perlitas de latex de 0.9 a 1.1 mm de diámetro. Esta cantidad de antígeno puede ser fácilmente obtenida a partir de 10⁶ taquizoítos y se pueden realizar más de 2000 test, mientras que con la misma cantidad de organismos enteros se pueden realizar solamente de 3 a 5 determinaciones.

Cada una de estas técnicas tiene su valor, pero también sus limitaciones, de manera que es importante usarlas en combinación para que los resultados tengan valor diagnóstico. En todos los

casos la presencia de toxoplasmosis aguda sólo puede ser asegurada mediante la repetición de los análisis con intervalos de tres semanas de manera de poder realizar una cinética de los anticuerpos.

6. TRATAMIENTO.

Actualmente el tratamiento de elección es la acción combinada de pirimetamida y sulfatiazina. Estos medicamentos provocan un bloqueo metabólico de la síntesis y utilización de los ácidos paraaminobenzoico, fólico y folínico. Estos fármacos actúan sinérgicamente sobre los taquizoítos, pero la membrana envolvente de los quistes es resistente a ellos, impidiendo la destrucción de los bradizoítos. Los esquemas de tratamiento son variables, pero generalmente son prescritos por un mes. Se puede observar mejoría después de 8 días de tratamiento, pero la recuperación se observa recién después de los 25 días. El mayor inconveniente de esta terapia es la toxicidad de la pirimetamina sobre la médula ósea y las erupciones de piel asociadas a las sulfas (Pedrol, 1990). Se ha comprobado además que la pirimetamina tiene efectos teratogénicos lo cual hace que no sea aconsejable suministrarla durante el primer trimestre del embarazo. El antibiótico alternativo en estos casos es la espiramicina. El tratamiento debe realizarse durante tres semanas seguidas y repetirse a lo largo del embarazo con interrupciones de dos semanas. Luego de la primera mitad del período de gestación se puede utilizar la combinación pirimetamina-sulfas, con suministros de ácido fólico. Este mismo tratamiento es aconsejable en los casos de niños con toxoplasmosis congénita, pudiéndose suministrar espiramicina durante los períodos de interrupción. El tratamiento se suele dejar al final del primer año, pues a esa edad el niño cuenta con un sistema inmune maduro.

En el caso de individuos inmunosuprimidos el tratamiento es inevitable. La pauta terapéutica es siempre la combinación de pirimetamina-sulfas-ácido fólico. La toxicidad del tratamiento no permite una administración conjunta, razón por la cual los pacientes están sujetos a recidivas. Los efectos colaterales producidos por estos antibióticos exigen un perfecto y rápido

diagnóstico. El desarrollo de métodos de detección directa es de vital importancia en estos casos.

Los agentes recomendados hasta el presente para el tratamiento de la enfermedad son efectivos sobre la forma proliferativa, pero no pueden erradicar formas enquistadas, especialmente del sistema nervioso central y ojos.

6.1. Otras drogas.

Se hallan en fase experimental el suministro de algunos macrólidos como roxitromicina (Chan,1986) y azitromicina (Araujo,1988). La clindamicina mostró ser efectiva en el tratamiento de la toxoplasmosis murina (Araujo, 1974, Mc Master, 1973) y en infección ocular en el conejo (Tabbara, 1974). Sin embargo, debido a sus potenciales efectos gastrointestinales colaterales, especialmente la colitis pseudomembranosa, no puede ser recomendado como tratamiento de rutina en los casos de niños con infección congénita y en mujeres embarazadas. Por otro lado, se halla en estudio la posibilidad del uso del interferón- γ en el tratamiento de la toxoplasmosis.

7. PREVENCIÓN.

Las mujeres embarazadas seronegativas y los pacientes inmunodeficientes son las dos poblaciones más importantes en cuanto a la aplicación de medidas preventivas.

La tabla 2 resume los principales métodos de prevención de la toxoplasmosis congénita.

8. VACUNA CONTRA LA TOXOPLASMOSIS.

Si bien esta enfermedad afecta peligrosamente sólo una parte de la población humana, el incremento de los enfermos de SIDA afectados de toxoplasmosis ha renovado el interés en la obtención de una vacuna. Una de las estrategias a seguir está basada en el hecho natural de que una primera infección protege de por vida al individuo de una segunda infección. Basándose en la idea de que existen antígenos que se expresan tanto en el estadio de quiste como en el de taquizoíto y que tienen función protectora, Cesbron-Delauw y col. (1989) realizaron el rastreo inmunológico de una genoteca de ADN copia obtenida de taquizoítos, con anticuerpos contra quistes tisulares. Uno de los clones detectados corresponde a la proteína p23. Tal como lo sugieren los autores, dicha proteína parecería jugar un importante rol en la penetración. Así, el interés de este antígeno como vacuna está basado en la posibilidad de bloquear la invasión del parásito.

Por otro lado Chardes y col. (1990) y Bourgin (1991) realizaron estudios sobre activación de IgAs secretorias en el intestino delgado de ratones de experimentación. Los principales antígenos responsables de la activación de dichos sistemas son la gp 30, la p 22 y la p 28.

La enzima GST (glutathione transferase) fue clonada por Johnson y col (Tenter, 1991) y reconocida por sueros de pacientes con toxoplasmosis aguda. El grupo de Bout, en Francia (Chardes, 1990; Bourguim, 1991), también clonó dicha proteína (un fragmento mayor) con la idea de producir una vacuna que actúe activando la producción de IgAs y de respuesta celular intestinal, puesto que ésta sería la primer barrera del parásito.

Hasta el momento se han descrito varias fracciones proteicas que parecen inducir parcialmente una respuesta protectora en ratones. (Johnson, 1983; Sharma, 1984). La p23 descrita anteriormente es una de ellas.

TABLA 2

METODOS DE PREVENCION DE LA TOXOPLASMOSIS CONGENITA

Prevención de la infección en mujeres embarazadas

- Evitar el contacto con materiales que potencialmente pueden estar contaminados con heces del gato. Desinfectarlos con agua hirviendo y usar guantes cuando se manipulean tales materiales, especialmente cuando se trabaja en jardinería o en huertas.
 - Cocinar la carne a temperaturas $\geq$ de 66°C.
 - Evitar el contacto de mucosas de la boca y ojos durante el manipuleo de carne cruda.
 - Lavarse las manos luego del manipuleo de carne cruda.
 - Lavar todas las superficies que estuvieron en contacto con la carne cruda.
 - Lavar frutas y verduras antes de su consumo.
 - Prevenir el acceso de moscas y cucarachas sobre frutas y vegetales.
-

Prevención de la infección del feto

- Testeo serológico periódico de la mujer embarazada.
- Tratamiento durante el embarazo ante una primoinfección.

1. MANTENIMIENTO DE LOS TAQUIZOITOS DE LA CEPA RH DE *Toxoplasma gondii*.

Taquizoitos de *Toxoplasma gondii* de la cepa RH, son mantenidos rutinariamente a través de pasajes peritoneales en ratones Balb/c y CF-1.

Procedimiento: Taquizoitos frescos recién extraídos del ratón, son lavados por centrifugación a 400g, 3 veces, con PBS pH 7.4. Luego son contados en cámara de Neubauer y llevados a una concentración de 2×10^7 tq/ml. Esta dilución corresponde a una imagen microscópica de 20-30 tq. por campo, con un aumento de 400X. 0.1 ml de esta dilución son inyectados intraperitonealmente en ratones de 2 a 3 meses de edad. Al cabo de aproximadamente 72 hs. (para la cepa Balb/c) o de 86 hs. (para la cepa CF-1) se extrae fluido ascítico con un rendimiento habitual de unos 5×10^7 a 10^8 tq por ratón. Para evitar el riesgo de perder la cepa por muerte prematura de ratones o por algún otro inconveniente, es aconsejable mantener a 4°C una suspensión de reserva de tq en PBS, pH 7.4, con penicilina y estreptomycin, la cual se renueva cada vez que se sacrifican los ratones.

2. OBTENCION DE LOS TAQUIZOITOS.

La extracción del líquido peritoneal se realiza mediante el sacrificio del ratón con eter o cloroformo, separación del pelaje sin rotura de la membrana peritoneal y uso de aguja y jeringa de 1 ml, evitando de esta manera la contaminación con sangre del ratón. La principal impurificación se debe a las células presentes en el líquido peritoneal, cuyo número es grande. Los taquizoitos invaden dichas células, se multiplican en ellas hasta que las mismas explotan, liberándolos. Es por ello importante el momento en que se extrae el líquido peritoneal. Si se realiza antes del momento óptimo se obtendrá un bajo porcentaje de tq y un alto porcentaje de células. En el momento óptimo la mayoría de las células han

explotado y el rendimiento en tq es de un 95% a un 99% .Dicho momento se logra estandarizando el número de parásitos inyectados y el tiempo desde la inyección hasta la extracción.

3. PURIFICACION DE LOS TAQUIZOITOS.

Se realizó mediante un gradiente discontinuo de sacarosa (iguales volúmenes de 40-50-60% de sacarosa en PBS- Ca^{++}), preparado en tubos de 40 ml. Los parásitos contenidos en el exudado peritoneal fueron previamente lavados 3 veces en buffer TSE (Tris-ClH 10 mM, ClNa 15 mM, EDTA 10 mM, pH 7.2) frío y luego 2 ml de esta suspensión de parásitos fue cargada sobre la parte superior del gradiente y centrifugada a 10000g, durante 30' en centrífuga refrigerada. Se utilizó un rotor SW25.1 con "swinging buckets". Luego el gradiente fue fraccionado en alícuotas de 0.5 ml las cuales fueron lavadas tres veces en PBS- Ca^{++} . Los lavados fueron realizados por centrifugación a 3000g durante 10'. Las fracciones enriquecidas en la suspensión de parásitos fueron juntadas y lavadas con PBS, pH 7.2.

4. OBTENCION DE TAQUIZOITOS LIBRES DE INMUNOGLOBULINAS CONTAMINANTES.

4.1. Tratamiento con Glicina.

Taquizoitos obtenidos de fluido ascítico fueron lavados tres veces con PBS, pH 7.4, resuspendidos en 1 ml de glicina 0.1M, pH 2.8 e incubados durante 15' a temperatura ambiente. Luego fueron centrifugados a 12.000 rpm, en microcentrífuga. El sobrenadante (fracción que contiene las inmunoglobulinas desprendidas de la superficie del parásito) fue separado para su posterior análisis por PAGE-SDS (10%). El pellet (fracción de tq. libres de inmunoglobulinas) fue lavado tres veces con PBS pH 7.4 y también sometido a una PAGE-SDS (10%).

4.2. Tratamiento de los ratones con drogas inmunosupresoras.

Ratones de la cepa Balb/c, de 2 meses de edad, fueron inmunosuprimidos con ciclofosfamida (200 mgs/Kg de peso) vía intradérmica, dos días antes de la inoculación con tq.

4.3. Cultivo in vitro de taquizoítos.

Taquizoítos de cepa RH fueron cultivados in vitro sobre monocapas de células VERO, en medio RPMI-1640 suplementado con 2% de suero fetal bovino y mantenidos a 37°C en atmósfera gaseada (95% aire-5% CO₂). Una monocapa de 10⁶ células fue infectada con 2 x 10⁶ taquizoítos y mantenida en estufa, en las condiciones mencionadas anteriormente, durante 3 o 4 días, hasta que la observación microscópica indicara la presencia de gran cantidad de taquizoítos extracelulares. Luego se recolectó el sobrenadante, se centrifugó 3 veces en PBS, pH 7.4, y se sometió a purificación en gradiente discontinuo de sacarosa.

5. OBTENCION DE SUERO NORMAL DE RATON DE LA CEPA Balb/c.

Se extrajo sangre de la cola del ratón y se colocó en tubos Eppendorf de 1 ml de capacidad. Se introdujo un palillo de madera para facilitar la posterior remoción del coágulo. Se dejó a temperatura ambiente por 30' a 40' para permitir la formación del coágulo y se agitó vigorosamente para soltarlo de las paredes del tubo. Se dejó a 4°C durante toda la noche para dar lugar a la retracción del mismo. Se separó el suero por aspiración con pipeta capilar. Esta metodología conduce a la obtención de sueros libres de hemólisis. El suero obtenido fue utilizado como control negativo en los ensayos de SIA.

6. OBTENCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES CONTRA TAQUIZOITOS DE LA CEPA RH DE *Toxoplasma gondii*.

Se inmunizó un grupo de 5 ratones de la cepa Balb/c, por inyección intraperitoneal con una emulsión de antígeno en adyuvante completo de Freund preparada del siguiente modo:

En una jeringa de vidrio, se colocó un volumen de 0.1 ml de una suspensión de 10^8 tq en PBS, pH 7.4. En una jeringa similar se colocó un volumen de 0.1 ml de adyuvante completo de Freund (bien agitado previamente). Se utilizó una llave de tres vías para conectar las dos jeringas. La conexión se hizo soldando dos agujas Nro. 18. La emulsión se realizó agregando la fase acuosa en el aceite, y luego pasando rápidamente de una jeringa a otra la emulsión, hasta que al colocar una gota sobre agua, ésta no se disperse. Con este procedimiento todo el antígeno es recuperado en la emulsión y ésta puede guardarse en la jeringa por varias semanas a 4°C.

Se administraron dos boosters, preparados de igual modo, pero con adyuvante incompleto de Freund, con intervalos de 15 días cada uno. A los 15 días del segundo booster los ratones se sangraron a blanco. Para obtener la mayor cantidad de sangre sin hemolizar se sacrifica a los animales con eter, rápidamente se abre la cavidad peritoneal y por punción de la vena cava inferior se obtiene la sangre. Esta se procesa, para la obtención del suero como se describe arriba. El inmunosuero obtenido fue utilizado para poner a punto el enzimoimmunoensayo utilizado en el seguimiento de los anticuerpos monoclonales. así como también como control positivo en dicho ensayo.

7. DESARROLLO DEL METODO DE DETECCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES Y POLICLONALES: SIA (Slide immunoassay).

7.1. Descripción de las condiciones particulares para este ensayo.

a. Fijación del antígeno.

- 10 μ l de una suspensión conteniendo 10^5 tq en buffer PBS pH 7.4, es depositada por círculo en el portaobjeto. Se deja secar sobre una plancha metálica tibia.

b. Lavado de la sal depositada.

- Se cubre el portaobjeto con agua destilada durante 10". Se sacude el portaobjeto para quitar el agua y se repite este paso. Se deja secar.

c. Bloqueo de los sitios libres del vidrio para evitar la interacción del primer o segundo anticuerpo con dichos sitios y la consiguiente aparición de falsos positivos.

- 10 μ l una solución de 1% albúmina sérica bovina (BSA) o 2% de leche descremada La Serenísima en PBS pH 7.4, se depositan por círculo. Se incuba durante 10' a temperatura ambiente, en cámara húmeda.

d. Se repite el paso b.

e. Reacción del primer anticuerpo (policlonal o monoclonal) con el antígeno.

- 10 μ l de suero y/o sus diluciones en solución de bloqueo o 10 μ l de sobrenadantes de cultivo se depositan por círculo. Se incuba durante 45' a temperatura ambiente, en cámara húmeda.

f. Bloqueo.

- Se lava rápida y cuidadosamente con solución de bloqueo evitando que los 10 μ l depositados en cada círculo en el paso anterior, se mezclen. Se cubre el portaobjeto con solución de bloqueo durante 10" y se quita sacudiendo. Se repite este paso. y se incuba durante 10' con solución de bloqueo.

g. Se repite el paso b.

h. Reacción con el segundo anticuerpo.

- Se utilizó como segundo anticuerpo inmunoglobulinas antirratón hechas en conejo. Se depositó en cada círculo 10 μ l de una dilución 1:1000 del segundo anticuerpo, hecha en solución de bloqueo. Se incubó durante 30' a temperatura ambiente, en cámara húmeda.

- Se lava con solución de bloqueo como en el paso f, sin la necesidad de ser tan cuidadosos.

i. Se repite el paso b.

j. Revelado de la reacción enzimática.

- 10 μ l de una solución de 1 μ g de OPD (Ortofenilendiamina) y 0.5 μ l de agua oxigenada 30 volúmenes/ ml de citrato de sodio 0.1M pH 4.5 se depositan en cada círculo. (Sustrato de la reacción enzimática).

k. Lectura.

- Se realiza una lectura visual, semicuantitativa, a los 5', 15' y 30'.

El control negativo utilizado en este ensayo es el suero de ratón normal, diluido 1:50 en solución de bloqueo.

Este SIA tiene la ventaja de requerir volúmenes muy pequeños (10 μ l por círculo). Es de rápida y sencilla ejecución y se utilizó para determinaciones cualitativas.

8. PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA TAQUIZOITOS DE LA CEPA RH DE *Toxoplasma gondii*.

8.1. Especie animal y su mantenimiento.

Cinco ratones Balb/c, de dos meses de edad, libres de micoplasma, comprados en la CONEA, se mantuvieron en jaulas estériles, con viruta y agua estéril en una habitación limpia y con temperaturas entre 18°C y 25°C, aislados de todo contacto con otros animales de experimentación. Esta cepa es la más conveniente debido a que la mayoría de los mielomas murinos utilizables en las fusiones fueron derivados de ella.

Además los ratones son fáciles de manejar y de mantener y generalmente responden mejor que las ratas.

8.2. Procedimiento de inmunización.

Los ratones fueron inmunizados por inyección intraperitoneal, con 10^7 a 10^8 taquizoitos en 200 μ l de PBS pH 7.4, con adyuvante completo de Freund. La emulsión fue preparada como se describió en el ítem 6. de esta Sección. Luego se administraron dos boosters, con un intervalo de 19 días entre las inyecciones, con igual número de taquizoitos y adyuvante incompleto de Freund. El título del inmunosuero, obtenido por punción retroorbital, fue determinado por SIA.

8.3. Preparación de medios y soluciones para la fusión.

- **Medio de cultivo:** Medio RPMI-1640 (Gibco).

Incompleto: 1 sobre de medio RPMI-1640, adicionado con 1 gr. Piruvato de sodio y 2 grs. de Bicarbonato de Sodio, fue disuelto en 1l de agua bidestilada, llevado a pH 7.4 con HCl y esterilizado por filtración, a través de membrana milipore 0.22 μ .

Completo: RPMI-1640 incompleto, suplementado con:
Glucosa (3grs/l)
Glutamina (200 mM)
Penicilina-Estreptomocina (10.000/ml)
Nistatina (20 U/ml)
Suero Fetal Bovino (10%)

Medio HAT: Se utilizó medio RPMI-1640 completo, suplementado con 1ml de los componentes A, B y C (detallados a continuación) por cada 100 ml de medio:

A.- Hipoxantina 10^{-4} M. Stock 100X = 136 mg en 100 ml de agua bidestilada.

B.- Aminopterina 4×10^{-7} M. Stock 100X = 1,76 grs. en 100 ml de agua bidestilada.

C.- Timidina 1.6×10^{-5} M. Stock 100 X = 38.7 mg en 100 ml de agua bidestilada.

La hipoxantina se disolvió a 70°C. La aminopterina se disolvió en 25 ml de de agua más 0.5 ml de NaOH 5N, luego se neutralizó con HCl 5N y se ajustó al volumen final con agua destilada.

Se esterilizó por filtración (filtro milipore 0.22 μ). Se almacenó a -20°C en oscuridad.

Medio HT: Se preparó de la misma manera que el medio HAT pero sin aminopterina.

Polietilenglicol.(PEG): Se preparó una solución al 41% (P/V) agregando a 4.2 ml de RPMI-1640 incompleto, pH 7.3 grs. de PEG (1500) (FLUKA) y se disolvió a 56 °C, en un vial bien tapado. El PEG fue esterilizado previamente en autoclave durante 15' a 1 atm.

8.4. Fusión celular.

El protocolo de fusión utilizado es una adaptación del original descrito por Galfré y Milstein (1977).

8.4.1. Preparación de las células para la fusión.

-Células de mieloma :

Se utilizaron las líneas celulares X₆₃ y NS0

-Preparación de las células de mieloma : Las células de mieloma fueron descongeladas y mantenidas en cultivo, por varias generaciones, en medio RPMI-1640 completo, a 37°C, en atmósfera húmedificada y gaseada con 5% de CO₂.

Las células fueron chequeadas para micoplasma. Luego se realizó un reclonado de las mismas y se seleccionaron los clones con mejores características de crecimiento. Se analizó también la capacidad de estas células de crecer en presencia de 8-azaguanina (30 µg/ml). Además fueron chequeadas en medio HAT.(Hipoxantina - Aminopterina - Timidina).

El día de la fusión las células de mieloma en fase de crecimiento logarítmico fueron transferidas del frasco de cultivo a un tubo cónico de 50 ml. Se tomó una alícuota para recuento. (se contó en cámara de Neubauer diluida 1/1 con azul de tripan). Luego del conteo las células fueron centrifugadas a 1000 r.p.m.

por 10 minutos y resuspendidas en medio RPMI a una concentración de 10^7 /ml.

-Células de bazo: Tres días antes de la fusión los ratones recibieron un último booster con adyuvante incompleto de Freund, vía intraperitoneal.

El día de la fusión se procedió a remover el bazo de tres ratones, bajo condiciones estériles:

- 1- Se sumergió cada ratón en etanol al 70%.
- 2- Se cortó la piel en el lado izquierdo del abdomen hasta ver el bazo bajo la pared abdominal.
- 3- Se desinfectó la pared abdominal con etanol al 70%, y se hizo una incisión por encima del bazo.
- 4- Se extrajo el bazo cuidadosamente con pinzas estériles desprendiéndolo del mesenterio.
- 5- Se transfirió a una caja de Petri con medio RPMI incompleto, se retiró el tejido conectivo extra y se transfirió a otra caja de Petri con 5 a 10 ml de RPMI incompleto.
- 6.- Se colocó el bazo sobre un trozo de malla fina de acero inoxidable, . Con una mano se sostuvo la malla sobre el medio de cultivo y con la otra se presionó suavemente el bazo con una espátula con el objeto de liberar las células. Se lavó dos veces con medio de cultivo.
- 7.- Se transfirió la suspensión de células obtenidas con pipeta Pasteur a un tubo cónico de 15 ml. Se centrifugó a 1000 r.p.m. (200 G) durante 10'. Se resuspendieron las células en 10 ml de RPMI-1640 completo, para hacer el recuento celular. A tal efecto se removi6 una alícuota de la suspensión, se diluyó 1/10 con azul de Tripan 0.1% y se hizo el recuento en cámara de Neubauer.

8.5. Procedimiento de fusión.

a- 3 ml de PEG (41%) y 50 ml de RPMI-1640 completo, fueron

colocados al baño maría a 37°C dentro del flujo laminar.

b- Se mezclaron las células de bazo con las células de Mieloma en una proporción aproximada de 3 a 1, en un tubo de 50 ml. Se llevó a un volumen de 40 ml con RPMI. Se centrifugó y removió todo el sobrenadante, aspirando cuidadosamente. Se agitó suavemente para desprender el precipitado celular.

c- Se agregaron 2 ml de PEG (precalentado a 37°C) gota a gota con una pipeta de abertura amplia. Se resuspendió suavemente el precipitado celular durante 1 minuto, cuidado de no destruir agregados pequeños. Se incubó a 37 °C por un minuto adicional.

d- Se agregó gota a gota RPMI (precalentado a 37°C) para diluir el PEG. Esta adición se realizó lentamente y con suave agitación. Se agregaron 5 ml en los primeros 5 minutos, 10 ml en los siguientes 5 minutos y un volumen adicional de 15 a 20 ml en los últimos 5 minutos.

e- Se centrifugó a 1000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se añadieron 5 ml de medio RPMI-1640 completo y se resuspendieron las células cuidadosamente, evitando el pipeteo excesivo o brusco que pudiera separar las células fusionadas. Se agregaron 10 ml más de RPMI-1640 y se hizo el recuento de células viables (Se contó el nro. de células mieloma viables, las cuales son más grandes que las células de bazo).

f- Las células fusionadas fueron resuspendidas en medio RPMI-1640 a una concentración de 10^6 células mieloma viables /ml y distribuidas en alícuotas de 0.1 ml/pozo en 8 placas de microcultivo de 96 pozos, de fondo plano. Se utilizaron 6 placas para la fusión realizada con las células de mieloma X₆₃ y 2 placas para la fusión realizada con las células NSO.

g- Las placas de microcultivo fueron incubadas a 37°C, en

atmósfera húmeda y CO_2 al 5%

h- Al día siguiente se agregó 0.1 ml/pozo de medio HAT 2X.

i- 5 días después de la fusión se removió la mitad del medio de cultivo y se reemplazó con RPMI-HAT fresco y precalentado.

j- A los 8 días de la fusión y luego de una cuidadosa inspección, se removió el sobrenadante en aquellos pozos que mostraron un vigoroso crecimiento y cambio de color del medio a amarillo, para hacer la selección de los híbridos secretores del anticuerpo deseado. Se adicionó medio fresco a dichos pozos.

k- A los 15 días después de la fusión el medio HAT fue reemplazado por medio HT, y 10 días después por medio RPMI-1640 completo.

l- Los pozos positivos, testeados por SIA, fueron transferidos a placas de 24 pozos y luego expandidos a frascos de cultivo pequeños (25 cm^2).

m- Una vez expandidas, se congelaron en N_2 líquido cuatro ampollas de cada una de las líneas obtenidas.

8.6. Clonado de células híbridas.

El método utilizado en este caso fue el de clonado por dilución límite. Se utilizaron placas de 96 pozos y cada clonado se realizó según el siguiente esquema: Se sembraron $100 \mu\text{l}$ con 10^5 células alimentadoras por pozo (de bazo o timo de ratón Balb/c de dos meses de edad según el caso) conteniendo 5 células híbridas en las tres primeras filas de cada placa, 2 células híbridas en las tres filas siguientes y 0.1 células híbridas en las dos últimas filas de cada placa. siguientes.

8.7. Criopreservación de la células.

Los hibridomas seleccionados fueron congelados en nitrógeno líquido. Así pueden mantenerse por tiempo indefinido. Dado que los hibridomas son muy vulnerables en las primeras semanas posteriores a su establecimiento y se pueden perder fácilmente, es muy conveniente congelar algunos viales de células tan pronto se identifican los hibridomas deseados. Después de aislar un clon activo, es conveniente hacer un cultivo masivo de las células y congelar alícuotas como stock de seguridad.

8.8. Congelamiento de células.

Medio de Congelación: Suero Fetal Bovino, inactivado a 56°C durante 30' + 7% de Dimetilsulfóxido (DMSO), mantenido a 4°C .

- Se centrifuga la suspensión celular a 1000 rpm y se descarta el sobrenadante.
- Se resuspenden las células en medio de congelación a una concentración aproximada de $10^7/\text{ml}$.
- Se colocan alícuotas de 1 ml en criotubos estériles de 2 ml con tapa de rosca (Nunc N^o 1078). Se ajusta bien la tapa.
- Se congelan las células lentamente, colocándolas progresivamente, a 4°C , -20°C , -70°C . (dos horas a cada temperatura). Alternativamente los criotubos pueden envolverse en gasa y colocarse a -70°C , por 12 horas, dentro de una caja de Telgopor.
- Luego los criotubos son transferidos a nitrógeno líquido.

8.9. Descongelamiento de células.

- Las células se descongelan rápidamente en baño de agua a 37°C.
- Se limpia el criotubo con alcohol 70%
- Tan pronto se descongelan, las células son transferidas a un tubo con 10 ml de RPMI-1640 completo, frío.
- Se centrifuga la suspensión celular a 1000 rpm, se resuspende el pellet en medio de cultivo (10 ml) y se siembra en dos frascos.

8.10. Producción de anticuerpos monoclonales en gran escala.

Para la producción en gran escala, los hibridomas pueden ser cultivados in vitro, en condiciones de cultivo celular en donde producen hasta 100 µg de AcMc/ml o in vivo como tumores en la cavidad peritoneal donde producen hasta 400 µg de AcMc/ml. La principal ventaja del cultivo celular es que el anticuerpo producido es el único anticuerpo murino presente en el medio de cultivo. La ventaja de la producción in vivo es la gran cantidad de anticuerpo que se puede obtener a un costo mucho más bajo.

8.11. Cultivo in vitro de hibridomas.

Las líneas obtenidas fueron expandidas en cultivo durante varias generaciones. Se separó el sobrenadante por centrifugación a 1000 rpm, el cual fue congelado a -20°C para su posterior utilización.

8.12. Cultivo in vivo de hibridomas.

Las células híbridas fueron propagadas en ratones Balb/c, como tumores ascíticos peritoneales.

Se eligió esta cepa para evitar el rechazo de los hibridomas. Debido a que los mielomas murinos y las células inmunes utilizadas para la fusión fueron derivadas de ratones Balb/c, los hibridomas resultantes inoculados en esta cepa resultan histocompatibles.

8.12.1. Preparación del animal y obtención de líquido ascítico.

Los ratones fueron inyectados vía intraperitoneal con 0.5 ml de Pristane (Aldrich Chemical Company), para asegurar el éxito del tumor. A los 10 días se inoculó cada ratón con 0.5 ml de una suspensión de 5×10^6 células híbridas en PBS. A los 7 días aproximadamente, se comenzó a observar un aumento de volumen del abdomen. Se comenzó entonces, con la extracción de líquido ascítico mediante punción en la parte baja del abdomen, con aguja hipodérmica Nro. 16. Se repitió la operación dos o tres veces, con intervalos de tres días. Se recogió el líquido en un tubo. Las células y coágulos de fibrina se sedimentaron por centrifugación a 1000 rpm y el líquido ascítico obtenido fue alicuotado, titulado por SIA y congelado a -20°C .

9. DETERMINACION DE CLASES Y SUBCLASES DE INMUNOGLOBULINAS SECRETADAS POR LAS LINEAS DE HIBRIDOMAS 1H10H8, 1H10E9E6, 1F6C4T Y 5E9A3B4.

Se realizó mediante la técnica de SIA descrita arriba. Se utilizó como antígeno 10^5 tq por círculo, provenientes de fluido ascítico de ratones inmunosuprimidos, purificados en gradiente de sacarosa. Los anticuerpos monoclonales analizados provenían de sobrenadante de cultivo y fueron utilizados sin diluir. Como segundo anticuerpo se utilizó el siguiente panel de anti-sueros

específicos, anti-subclases de inmunoglobulinas de ratón hechas en conejo: Anti-Ig G₁, anti-Ig G_{2a}, anti-Ig G_{2b}, anti-Ig G₃, anti-Ig M, anti-Ig A. (Bio-Rad). Como tercer anticuerpo se utilizó un antisuero anti-conejo hecho en cabra, conjugado con peroxidasa (1:3000). El sistema de sustrato para la peroxidasa utilizado contiene Azino-di (3 ethyl-benzthiazoline sulfonate) (ABTS) y peróxido de hidrógeno (0.2%).

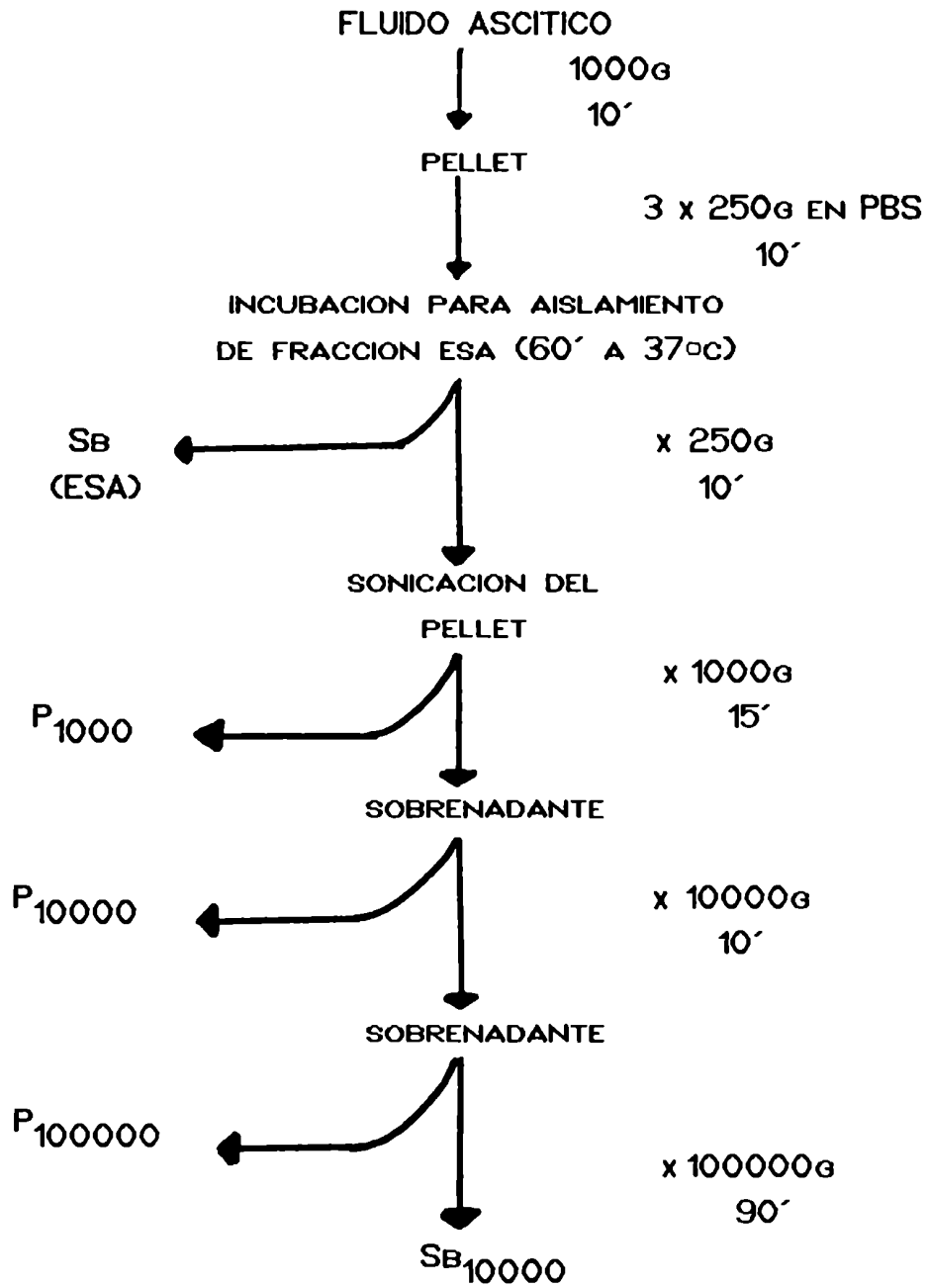
10. PURIFICACION PARCIAL DEL ANTICUERPO MONOCLONAL Tg5.

Dado que el AcMc Tg5 pertenece a la clase de las IgMs, se decidió realizar una precipitación con agua destilada para su parcial purificación. Se realizó un ensayo preliminar a partir de una alícuota de fluido ascítico del AcMc. Se procedió del siguiente modo: 100µl de fluido ascítico fueron centrifugados en microcentrífuga durante 15', para eliminar la grasa habitual presente en este fluido. Luego se realizó una dilución 1:10 con agua destilada. Se dejó durante toda la noche en cámara fría (4°C) para permitir la precipitación de la IgMs. Al día siguiente se centrifugó a 12.000 rpm en centrífuga Sorvall, durante 30'. El sobrenadante fue separado y el pellet fue resuspendido en 100µl de PBS, pH 7.4, para recuperar el AcMc precipitado en el mismo volumen inicial. Se analizaron ambas fracciones (precipitado y sobrenadante) por SIA y PAGE (en gradiente 10-15%) en condiciones reductoras y no reductoras. Luego se procedió a la purificación del resto del fluido ascítico obtenido.

11. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR.

Se realizó una centrifugación diferencial de acuerdo al esquema de la figura 10.

FIGURA 10



11.1. Obtención de taquizoitos a partir de fluido ascítico.

50 ratones de la cepa Balb/c, previamente inmunosuprimidos con ciclofosfamida, fueron inoculados cada uno con 2×10^6 tq de *T. gondii*, cepa RH, en 0.2 ml de PBS pH 7.4. A las 72 hs. se extrajo un volumen de 50 ml de fluido ascítico totales, el cual fue centrifugado durante 10' a 1000g. El pellet fue lavado 3 veces por centrifugación a 250g en PBS, libre de Ca^{++} y Mg^{++} , pH 7.4, purificado en gradiente de sacarosa y resuspendido en 50 ml de PBS. (6×10^9 tq). Una alícuota de 5 ml fue centrifugada a 250g. El pellet obtenido fue guardado a -20°C para la preparación de homogenato total. A partir de los 45 ml restantes se obtuvieron preparaciones correspondientes a Antígeno Secretor -Excretor (ESA), homogenatos totales, diferentes fracciones subcelulares.

11.2. Aislamiento de exo-antígenos.

Para la obtención de exo-antígenos el pellet de tq ($5,2 \times 10^9$ tq), fue incubado a 37°C , durante 1 hora en 50 ml de buffer fosfato salino libre de Ca^{++} y Mg^{++} , pH 7.4, suplementado con 10 U/ml de heparina, EDTA 0.1 mM, ditioneitol (DTT) 0.1mM, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fenimetilsulfonilfluoride (PMSF), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de tosil lisina clorometilcetona (TLCK). Luego la preparación fue centrifugada durante 10' a 1000g. El pellet fue lavado 3 veces con PBS libre de Ca^{++} y Mg^{++} , pH 7.4 y resuspendido en 1 ml de buffer Tris 50 mM, Cl_2Mg 12 mM, EDTA 2 mM, sacarosa 8%, y glicerol 2%, pH 7.4 y congelado para su posterior fraccionamiento subcelular. El sobrenadante (fracción que contiene exo-antígenos) fue clarificado 5 veces por centrifugación a 1000g, durante 10' y concentrado a un volumen final de 1 ml, mediante un concentrador CENTRIPET-10, que posee una membrana Amicon YMT, cuyo título de corte es de 10000 D.

11.3. Preparación del homogenato total.

Se probaron tres métodos de ruptura de los parásitos:

1. Congelamiento-descongelamiento: Un pellet de 6×10^8 tq, resuspendido en 1 ml de buffer Tris 20 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 0.32 M, pH 7.6, fue congelado 3 veces durante 5' en nitrógeno líquido y descongelado lentamente a temperatura ambiente.

2. Adición de perlitas de vidrio: A un pellet de 6×10^8 tq resuspendido en el mismo buffer, se le agregaron 200 mgs de perlitas de vidrio (glass beads, Acid washed Nro. G-52506 - Tipo III-IV). La preparación fue sometida a agitación con vortex durante 3'. Luego se dejó sedimentar y el sobrenadante fue centrifugado durante 10' a 200g para eliminar tq enteros y perlitas de vidrio.

3. Sonicación: Un pellet de 6×10^8 tq, resuspendidos en el mismo buffer, fue sonificado durante 30" a 40W, con microtip standar, en baño de hielo, en un Sonifier Ultrasonic Desintegrator (Branson Sonic Power CT, USA).

11.4. Centrifugación diferencial del homogenato total.

Un extracto crudo de 3.6×10^9 tq, obtenido por sonicación fue centrifugado durante 15' a 1000g. El pellet (P_{1000} : fracción de núcleos y grandes restos membranosos) fue resuspendido en 1 ml de PBS- Ca^{++} y Mg^{++} , pH 7.4. El sobrenadante, previamente diluido a una concentración de sacarosa 0.25M, fue centrifugado durante 10' a 10000g. El pellet (P_{10000} : fracción de mitocondrias, lisosomas y peroxisomas) fue resuspendido en 0.5 ml de buffer Tris 10 mM, sacarosa 0.25M, Cl_2Mg 1 mM, pH 7.4. El sobrenadante fue centrifugado a 105000g durante 90', obteniéndose un pellet (P_{105000} : fracción microsomal), el cual fue resuspendido en 0.2 ml

de buffer Tris 50mM, EDTA 2mM, Cl_2Mg 12mM, sacarosa 8%, y glicerol 2%, pH 7.4 y un sobrenadante (Sb_{105000} : fracción citosólica).

La concentración proteica de cada una de las fracciones fue determinada por la técnica de Bradford. Cada una de las fracciones obtenidas fueron congeladas a -20°C para su posterior análisis. La Figura 10 resume en un esquema el procedimiento seguido para la obtención de las distintas fracciones.

12. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON SDS (PAGE-SDS).

Las proteínas de los diferentes extractos (homogenatos totales, exo-antígenos, red membranosa intrafagosomal y fracciones subcelulares) fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida 10% con SDS. (Laemmli, 1970) Las muestras fueron hervidas en buffer Tris 0.1M, pH 6.8, SDS 2%, Mercaptoetanol 10%, glicerol 20% y azul de bromofenol 0.1%, durante 5'. Los marcadores de peso molecular usados fueron: Miosina (200), Fosforilasa B (97.4), Albúmina Bovina (68), Ovoalbúmina (43), Anhidrasa Carbónica (29), β -lactoglobina (18), y lisozima (14.9). (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg MD). La corrida electroforética se realizó a 100 Volts durante 3 horas. Los geles fueron teñidos con Coomassie Blue. Cuando la concentración proteica fue menor a $1\text{ }\mu\text{g}$ los geles fueron teñidos con NO_3Ag . En algunos casos la corrida electroforética fue realizada en un equipo Fast-System, en geles de poliacrilamida, en condiciones reductoras y no reductoras según el caso, en gradiente 10-15%. (sistema de buffer discontinuo).

13. WESTERN BLOT.

Las proteínas separadas por electroforesis fueron transferidas desde los geles de poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa

(0.22 μ), por difusión simple en buffer fosfato 25 mM y/o electrotransferencia. Las membranas de nitrocelulosa transferidas fueron sometidas al siguiente tratamiento:

- **Bloqueo:** Incubación durante 1 hora, con Tris-ClH 25 mM, pH 8, ClNa 150 mM y gelatina 3% .

- Incubación con el anticuerpo monoclonal 1H₁₀H₈, como primer anticuerpo, durante 1 hora. Cuando el título del AcM en el sobrenadante de cultivo fue bajo, se realizaron tres incubaciones sucesivas de 2 hs. cada una con diferentes sobrenadantes del mismo anticuerpo.

- **Lavado:** Se realizaron tres lavados sucesivos de 10' cada uno con TBS-Tween 20 (0.05%).

- Incubación con un segundo anticuerpo anti-raton, conjugado con peroxidasa, diluido 1:4000 en Tris-ClH 25 mM, pH 8, ClNa 150 mM, Tween 20 (0.05%) y gelatina 1% durante 1 hora.

- **Lavado:** Se realizaron dos lavados con TBS-Tween 20 (0.05%) de 10' cada uno y dos lavados con TBS sin Tween 20 de 10' cada uno.

- **Revelado:** Con 4-Cl-Naftol 0.05% (disuelto previamente en metanol) en Tris-ClH 25mM, pH 8, ClNa 150 mM, H₂O₂ 30V (0.02% preguntar). Cuando la concentración proteica era baja se reveló con diaminobenzidina.

14. DOT-BLOT.

Se sembró el antígeno sobre tiras de nitrocelulosa (0.22 μ). En todos los casos la cantidad de proteínas sembrada se hallaba entre 30ng y 1 μ g.

Luego de sembrado el Ag se realizaron los siguientes pasos:

- Bloqueo durante 30' con TBS (buffer Tris-ClH 25 mM, pH 8, ClNa 150 mM), leche descremada 3%.
 - Incubación con el primer anticuerpo durante 30".
 - Lavado: tres lavados con TBS-Tween 20 (0.05%), de 10' cada uno.
 - Incubación con un segundo anticuerpo anti-ratón hecho en cabra, conjugado con peroxidasa (1:4000), durante 30'.
 - Lavado: un lavado con TBS-Tween 20 (0.05%) durante 3' y un lavado con TBS sin tween durante 3'.
- Revelado con 4-Cl-Naftol 0.05% (disuelto previamente el metanol) en TBS y H_2O_2 30V (0.2%).

Cuando la concentración proteica era baja se reveló con diaminobenzidina.

15. CONSTRUCCION DE UNA GENOTECA DE cDNA DE TAQUIZOITOS DE *T.gondii* EN λ gt11.

15.1. Obtención y purificación de parásitos.

(Ver ítem 2 y 3 de la presente sección).

15.2. Purificación de ARN total.

A partir de parásitos purificados por un gradiente de sacarosa 40-50-60%, se procedió a la purificación del ARN total según lo esquematizado en la Figura 11.

Los parásitos purificados se lavaron tres veces con buffer TSE

frío y el pellet se homogeneizó en 12,5 ml de tiocianato de guanidina 4M en un homogeneizador vidrio/teflón.

La mezcla se precipitó con Acetato de Potasio/Etanol a -20°C por 1 hr. Se centrifugó durante 1 hr. a 8 K, y el pellet se resuspendió en 12,5 ml de Clorohidrato de guanidina 7,5 M y se volvió a centrifugar para eliminar restos celulares.

Se recuperó el sobrenadante y se realizó una segunda precipitación etanólica con 0,5 vol de etanol. Se resuspendió el pellet en 5 ml de EDTA-SDS y se realizaron tres extracciones con Cloroformo/Butanol (4:1).

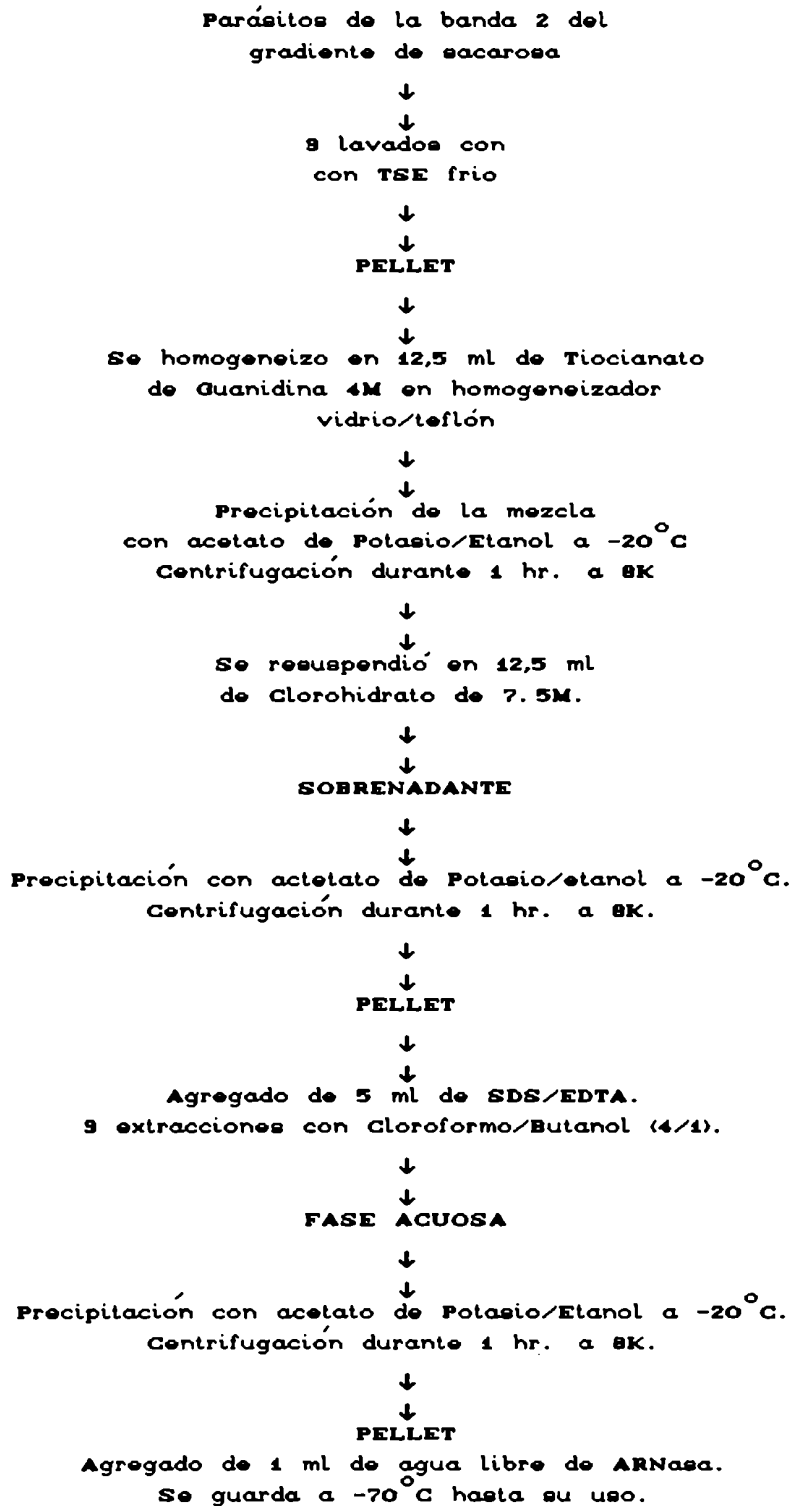
Se realizó una tercera precipitación etanólica y finalmente el pellet se resuspendió en 1 ml de agua libre de ARNasa y se conservó a -70°C hasta su uso.

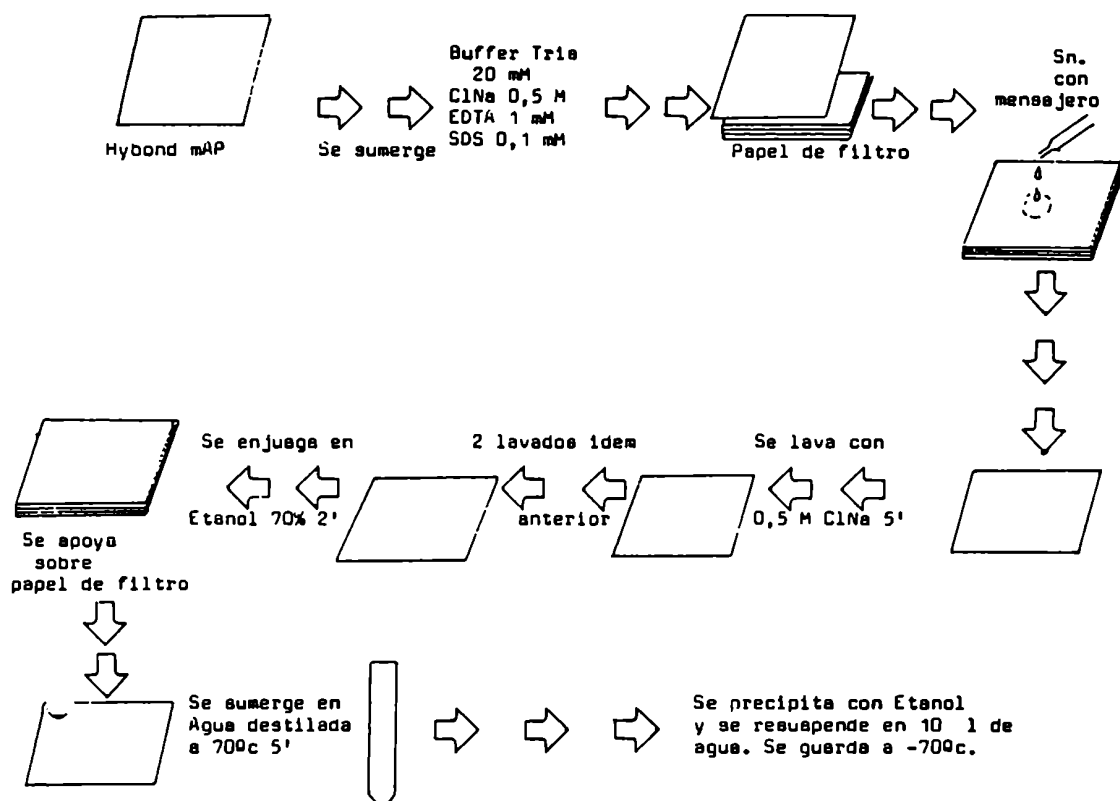
15.3. Purificación de ARN mensajero.

El ARNm de *T. gondii* fue aislado del ARN total por el método de Hybond mAP (papel con afinidad por el mensajero). El protocolo de su uso se encuentra esquematizado en la figura 12.

Se sumergió el papel en buffer Tris 20 mM, ClNa 0.5M, EDTA 1 mM, SDS 0.1%, pH 7.5 y luego se lo depositó sobre papel de filtro. Sobre éste se agregó la solución de ARN total y luego se lavó en 0.5M de ClNa por 5 minutos. Se repitió el lavado dos veces sucesivas usando nuevas soluciones de ClNa. Se enjuagó el papel en etanol al 70% durante dos minutos, y se depositó luego el Hybond mAP sobre papel de filtro para remover el exceso de etanol. Se sumergió el papel en agua destilada libre de ARNasas a 70°C durante 5 minutos. Se realizó la precipitación etanólica y el pellet se resuspendió en 10 μl de agua destilada libre de ARNasas. Se extrajo una alícuota de 1 μl para medir su absorbancia a 260 nm. Posteriormente se guardó esta solución a -70°C para su uso.

FIGURA 11





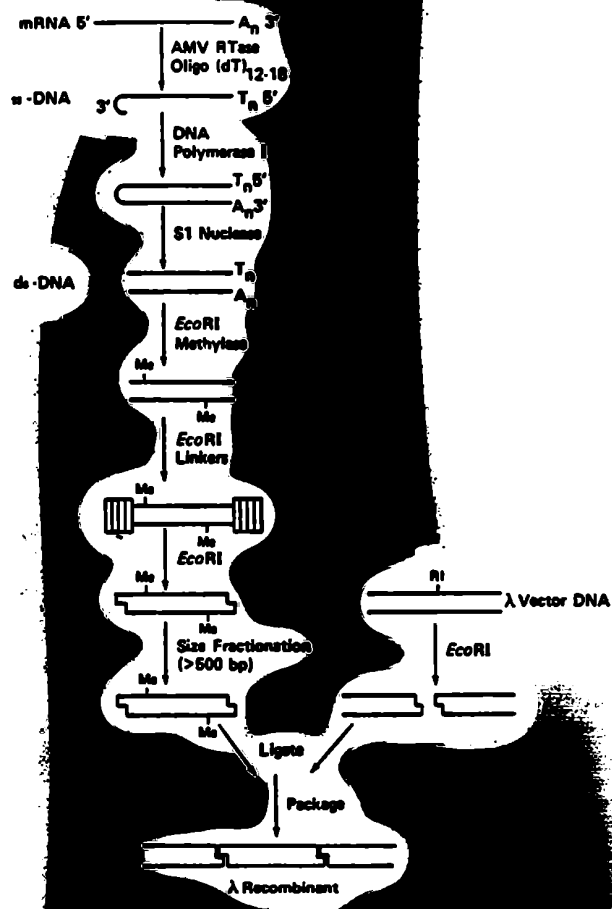
Esquema seguido para la purificación del ARNm de *T. gondii* utilizando el papel Hybond mAP.

15.4. Construcción de la genoteca.

La construcción de la genoteca se realizó siguiendo el protocolo descrito por Huynh (1985). Una sinopsis del mismo se muestra en la figura 13.

La transcriptasa Reversa del virus de la mieloblastosis aviaria catalizó la reacción de síntesis del ADN complementario (ADNc) a partir de los mensajeros aislados usando como molde el poli (A)⁺ y como primer oligo (dT)₁₂₋₁₈. El ADN así sintetizado se separó de su molde de ARN por calentamiento de la mezcla y posteriormente fue usado como sustrato de la ADN Polimerasa I de E. Coli, la cual sintetizó la 2da. cadena. Se trató con nucleasa S₁ para remover la región entre la primera y segunda cadena. El ADNc hasta aquí sintetizado fue metilado con Eco RI Metilasa y S-Adenosil-Metionina para proteger los sitios Eco RI internos del ADN. Se hizo un corto tratamiento con Polimerasa I (fragmento Klenow) para aumentar los extremos romos y posteriormente se lo ligó a los oligonucleótidos Eco RI sensibles. Se cortó con la enzima Eco RI y se pasó la mezcla por una columna de Biogel a 50mM obteniéndose las fracciones para ligar a los brazos de Lambda gt11 obtenidos digiriendo su ADN con Eco RI y desfosforilando. El empaquetamiento de ADN recombinante se realizó con las mezclas de empaquetamiento de Promega Biotech, siguiendo las instrucciones del fabricante.

FIGURA 19



Pasos seguidos para la construcción de una genoteca *T. gondii* en el vector de expresión λ gt11.

15.5. Amplificación de la genoteca.

El material empaquetado fue amplificado en placas de 150 mm utilizando como huésped a *E. coli* Y1088, (Huynh, 1985). Se utilizó como medio de crecimiento LB-agar/magnesio/ampicilina (Bacto-Tryptona) 1%, extracto de levadura 0.5%, ClNa 1%, Sulfato de Mg 10 mM, Ampicilina 75 g/ml, Agar 1.5%). Se realizó la infección en forma tal de tener 20.000 placas de lisis por caja de Petri. Se dejó creciendo a 42°C hasta la aparición de las placas de lisis (aproximadamente 3 hs.), y posteriormente se cubrió la superficie con 12 ml de medio SM (ClNa 0.6%, Sulfato de Mg 0.2%, gelatina 0.1%, Tris-ClH 50 mM, pH 7.5) y se dejó toda la noche a 4°C. Se recogió el medio y se le agregó 5% de Cloroformo. Luego de incubar 15 minutos a temperatura ambiente se centrifugó 10 minutos a 5000 rpm para separar los contaminantes celulares. El sobrenadante fue alicuotado con 0.3% de Cloroformo.

15.6. Detección de fagos recombinantes que expresan proteínas de *T.gondii*.

Se plaquearon 20.000 unidades formadoras de placas (Ufp) en cajas de Petri de 150 mm con medio LB/Agar/SO₄Mg/Ampicilina utilizando la cepa Y1090 de *E. Coli* en forma tal de obtener placas aisladas. Se dejó crecer las placas de lisis durante 3 hs a 42°C y posteriormente se indujo con un filtro de nitrato de celulosa embebido con Isopropil- β -D-Tiogalactopiranosido (IPTG) 10 mM. Se incubó la placa a 37°C por 3 hs y luego se removió el filtro de la placa cuidadosamente. Este fue lavado con TBS 1X, y luego se bloqueó con 10 ml de TBS 1X-20% de suero fetal de ternero durante 40 minutos. Anticuerpos monoclonales y sueros de pacientes crónicos y agudos fueron utilizados para el rastreo de los clones de expresión. Tanto el anticuerpo monoclonal como los diferentes sueros fueron incubados con los filtros durante 1 hr. a temperatura ambiente y posteriormente se procedió a hacer cuatro

lavados sucesivos con TBS 1X con 0.05% de Tween 20. El revelado de los filtros se realizó utilizando el método de segundo anticuerpo biotinilado-Avidina-Biotina conjugada con Peroxidasa (Vecta Stain, Vector Laboratories Inc.) según el protocolo del fabricante. Por último se procedió al revelado de la reacción con 4-Cl-1-Naftol como agente colorimétrico. Obtenidos los clones positivos en expresión, éstos fueron replicados y vueltos a plaquear con menor multiplicidad de infección hasta poder obtener los clones totalmente puros.

15.7. Amplificación de clones positivos.

El primer paso de la amplificación fue desarrollado siguiendo el protocolo ya enunciado anteriormente (15.5). Para la obtención de una mayor cantidad de fagos recombinantes se procedió de la siguiente manera: 10 ml de medio de cultivo LB conteniendo E.coli Y1090 se creció durante toda la noche, posteriormente se centrifugó a 3000g durante 5 minutos y al pellet que contenía las células se lo resuspendió en 5 ml de Sulfato de Mg 10 mM. Estas células fueron infectadas con 5×10^8 ufp e incubadas 20 minutos a temperatura ambiente. El contenido del tubo se volcó dentro de un erlenmeyer conteniendo 550 ml de LB. El cultivo fue incubado a 37°C siguiendo su crecimiento por medición de su densidad óptica a 620 nm cada 30 minutos. En el momento en que ésta disminuyó bruscamente se agregó al cultivo 5 ml de cloroformo, 100 µg/ml de lisozima y 5 µg de ADNasa y se siguió a la misma temperatura durante 45 minutos. Se centrifugó el cultivo a 7000 rpm durante 20 minutos y al sobrenadante se le agregó 50 ml de ClNa 5M y 50 grs. de Polietilenglicol 6000 (Peg Carbowax). Una vez disuelto el Peg se incubó durante toda la noche a 4°C y al otro día se procedió a su centrifugación durante 20 minutos a 7000 rpm. Se realizó otra centrifugación y precipitación y al último pellet se lo resuspendió en un buffer que contiene Tris-ClH 10 mM, Cloruro de Mg 10 mM, ClNa 0.5 M pH 8.

15.8. Purificación de los fagos recombinantes por centrifugación en gradiente de Cloruro de Cesio.

Para una mayor purificación se sembró 1 ml de la solución de fagos sobre un gradiente discontinuo de ClCs formado por tres distintas densidades (1.3, 1.5 y 1.7 g/ml) usando tubos ultra clear de 4 ml. Se centrifugó a 40.000 rpm en un rotor SW65 durante 4 hrs. a una temperatura de 20°C. Se extrajo la banda media opalescente de fagos por punción y posteriormente se dializó contra 200 ml de una solución que contenía 50 % de formamida, 200 mM de Tris-ClH, 20 mM de EDTA durante 4hrs. Se realizaron 3 sucesivas diálisis de 1 hr. cada una, contra 200 ml de una solución de 50 mM Tris-ClH, 100 mM ClNa y 2 mM EDTA, y otras tres sucesivas diálisis de 1 hr. cada una contra 10 mM Tris-ClH, 1 mM EDTA. El resultado de las diálisis se alicuotó y se guardó a -20°C.

15.9. Preparación de recombinantes lisogénicos.

Los fagos recombinantes purificados a homogeneidad fueron utilizados para infectar un cultivo de E.coli Y1089 crecido a saturación en medio LB con 0.2% de maltosa y 10 mM de Sulfato de Mg. Se utilizaron variadas multiplicidades de infección (entre 5 y 1000 ufp/célula). Luego de la infección se dejó 20 minutos a 32°C y posteriormente se plaquearon aproximadamente 200 células por caja de Petri con medio LB dejándolas incubando toda la noche a 32°C. Colonias tomadas al azar fueron replicadas en dos nuevas cajas de Petri en forma ordenada siendo crecidas una a 32°C y la otra a 42°C. Las colonias crecidas solamente a 32°C fueron replicadas en stab para su conservación.

15.10. Preparación de lisados crudos de E.coli Y1089 lisogénicos.

Las colonias de E.coli Y1089 lisogénicas tanto del wt como del recombinante fueron crecidas en 100 ml de LB a 32°C hasta densidad óptica 0.5 a 620 nm en donde se elevó la temperatura a 42°C rápidamente y se lo dejó 20 minutos. Se agregó posteriormente IPTG a una concentración final de 10 mM incubando el cultivo por 1 hr. a 37°C. Se cosecharon las células por centrifugación de 5 minutos a 5000 rpm y 32°C y el pellet se resuspendió en buffer TBS 1x con 0.1 ml Parametil-Sulfonil-Fluoruro (PMSF). Se congeló en Nitrógeno líquido y luego de descongelar se sonicó durante 1 minuto para romper los ácidos nucleicos. Se alicuotó y se guardó a -20°C.

15.11. Electroforesis de extractos proteicos en geles de poliacrilamida.

Se realizaron geles de distintos porcentajes de T (entre 10 y 5%). Estos fueron corridos a voltage constante de 100 volts en condiciones desnaturalizantes, es decir con SDS y 2-mercaptoetanol.

15.12. Western-blot (transferencia pasiva de proteínas a nitrato de celulosa).

A cada cara del gel de poliacrilamida se le adosó un filtro de nitrato de celulosa del mismo tamaño y posteriormente se le agregó a cada lado 3 papeles Wathman 3 MM cortados también del mismo tamaño. El sistema se sumergió en una cuba que contenía buffer Tris-ClH 25 mM. Se lo dejó transfiriendo durante 36 hs. El revelado de los filtros se realizó de acuerdo con lo descrito anteriormente. (15.6).

16. SECUENCIACION DEL FRAGMENTO CLONADO: (Sanger, 1977).

16.1. Clonado en el fago M13.

El fragmento clonado en el fago λ gt11, detectado con el AcMc 1H10H865, fue subclonado en el fago M13. Para ello el genoma del fago fue cortado con la endonucleasa de restricción Eco RI. Aproximadamente 15 μ g del genoma del fago fueron usados para la restricción.

Debido a que no es necesario purificar el fragmento, de los brazos del fago Lambda, el producto de la reacción de corte fue utilizado directamente para la ligación con el genoma del fago M13mp19. Se utilizaron para ello distintas relaciones fragmento/fago: 1:10, 1:20, 1:40. Con los productos de la ligación se transformaron bacterias E. coli de la cepa MV1190.

16.2. Preparación de células competentes para la transformación.

Se siguió el siguiente protocolo:

- Bacterias E.coli de la cepa MV1190 fueron crecidas durante toda la noche, en medio LB (Tryptona 1%, Extracto de levadura 0.5%, NaCl 1% P/V, pH 7,2) a 37°C en agitación (starter).
- 2,5 ml del cultivo crecido fueron inoculados en medio LB e incubados durante 1 h 30' a 37°C, en agitación.
- Este cultivo fue centrifugado durante 5' a 3500 rpm y el pellet fue resuspendido, en 10 ml de Cloruro de Calcio 50mM frío. Esta preparación fue mantenida en hielo durante 40 minutos.

- Se centrifugó nuevamente a 3500 rpm durante 5' y el pellet se resuspendió en 4 ml de cloruro de calcio 50 mM frío. Se dejó en hielo por lo menos 1 h antes de la transformación.

16.3. Transformación.

Se utilizaron 200 μ l de bacterias competentes, a las cuales se les agregó 1 μ l (2ng) de ADN del fago M13 mp19 y 90 μ l de cloruro de calcio 50 mM. La mezcla fue incubada a 0°C durante 1 hora. Al cabo de ese tiempo se le dió un shock térmico a 42°C durante 3'. y por último se les agregó 200 μ l del cultivo original de células (starter) junto con Xgal (100 μ g/ml), IPTG (10 mM) y 3 ml de LB agarosa 0.7% para ser plaqueadas sobre una placa de Petri de 90 mm con medio LB agar 1.5%. Se realizó el conteo de placas blancas y azules y se sacó el porcentaje de transformación en relación con el DNA RF del fago M13.

Las placas de color blanco fueron repicadas y reclonadas para su aislamiento en forma pura.

16.4. Preparación de ADN del fago de simple cadena.

Los fagos recombinantes junto con una placa proveniente del fago M13 mp19 wt (placa azul) fueron crecidos en 6 ml de LB conteniendo 45 μ l de cultivo starter de células E. coli MV1190 durante 5 horas a 37°C. Al cabo de este tiempo se prosiguió con el siguiente protocolo:

- Se centrifugó el contenido de cada tubo crecido a 3500 rpm, durante 10 minutos, para bajar las bacterias.

- El sobrenadante se volvió a centrifugar a 3500 rpm durante 10'.

- Al sobrenadante extraído se le agregó 1/10 del volumen de una solución que contenía cloruro de sodio 2,5 M y polietilenglicol (PEG 6000) 20%. Se homogeneizó por inversión 10 veces y posteriormente se dejó a temperatura ambiente durante 15'.

- posteriormente se centrifugó en tubos Sorvall a 12000 rpm, durante 10'. Se descartó el sobrenadante en aquellos tubos en los que el pellet era visible, cuidando de que no quede nada de PEG impurificando la muestra.

Los tubos en los cuales no se visualizó pellet fueron descartados.

- Una vez secos, los pellets fueron resuspendidos en 100 μ l de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8) con vortex durante 3 minutos.

- Se agregó a cada tubo 50 μ l de fenol equilibrado, se agitó con vortex durante 1 minuto, dejándose descansar la mezcla durante 5 minutos. Se agitó con vortex durante otro minuto y se centrifugó por último durante 5 minutos en microcentrífuga.

- Se realizó luego una extracción con cloroformo/isoamílico y por último una extracción con eter.

- A continuación se extrajo la fase acuosa y se precipitó con acetato de amonio-etanol. El pellet fue lavado con etanol 70%, secado al vacío y luego resuspendido en 20 μ l de buffer TE.

Las distintas muestras fueron corridas en geles de agarosa 0.7% de manera de corroborar la integridad del ADN.

17. DETECCION FOTOCOLORIMETRICA DE ACTIVIDAD DE ANHIDRASA CARBONICA.

Se midió la actividad enzimática en diferentes muestras disueltas en una solución de buffer fosfato salino (PBS), libre de Ca^{++} y Mg^{++} , pH 7.4, 0.005% de rojo fenol. Las muestras fueron colocadas en tubos eppendorf de 1,5 ml. El volumen final de cada muestra fue de 500 μl .

Los tubos así preparados fueron sometidos a una atmósfera saturada de CO_2 durante 3 minutos, tiempo en el cual el indicador de pH Rojo de Fenol viró totalmente hacia el amarillo.

Luego los tubos fueron sometidos a la presión de CO_2 atmosférica y su absorbancia a 550 nm fue medida en un fotocolorímetro, a tiempo cero y cada 5 minutos durante un intervalo de 20 minutos. Las respectivas lecturas de absorbancia fueron graficadas en función del tiempo. Se calculó la pendiente de la recta de regresión lineal de cada obtenida para cada muestra. Dicha pendiente es una medida de la velocidad de la reacción.

18. TECNICAS HISTOLOGICAS.

18.1. Procesamiento de tejidos.

Los órganos a procesar, previamente fijados con formol al 7%, fueron sometidos al siguiente procedimiento:

- 1- Fijación mediante dos pasajes de 2hs. cada uno en solución Vastarini.
- 2- Dos pasajes de dos hs. cada uno en alcohol 100%
- 3- Dos pasajes de dos hs. cada uno en alcohol 96%
- 4- Dos pasajes de dos hs. cada uno en benzol (entre 60°C - 65°C).

5- Inclusión en taco de parafina.

Los tacos obtenidos se someten a cortes de 2 a 3 μ en micrótomo, se montan sobre el portaobjeto, se fijan durante media hora en estufa a 60°C y se someten a la técnica de coloración específica.

18.2. Técnicas histológicas de coloración.

18.2.1. Hematoxilina-eosina.

Los cortes de tejidos montados y fijados sobre portaobjetos fueron sometidos al siguiente tratamiento:

- 1- Se sumergen de en Xilol durante 15'. (dos cambios).
- 2- Se sumergen en alcohol 100% durante 10'.
- 3- Se sumergen en alcohol 96% durante 10'.
- 4- Se realiza un pasaje por agua destilada.
- 5- Se tratan con hematoxilina durante 3'a 8'.
- 6- Se lavan con agua corriente, hasta el viraje de la hematoxilina.
- 7- Se tratan con eosina durante 3'.
- 8- Se sumergen en alcohol 96% durante 10'.
- 9- Se sumergen en alcohol 100% durante 10'.
- 10- Se realiza un pasaje por Xilol.
- 11- Se monta con bálsamo de Canadá.

18.2.2. Giemsa.

Los cortes de tejidos montados y fijados sobre portaobjetos fueron sometidos al siguiente tratamiento:

- 1- Se sumergen de en Xilol durante 15'. (dos cambios).
- 2- Se sumergen en alcohol 100% durante 10'.
- 3- Se sumergen en alcohol 96% durante 10'.

- 4- Se realiza un pasaje por agua destilada.
- 5- Se tratan con Giemsa durante 20' a 30'.
- 6- Se lavan con agua corriente, hasta el viraje de la hematoxilina.
- 7- Se sumergen en alcohol 96% durante 10'.
- 8- Se sumergen en alcohol 100% durante 10'.
- 9- Se realiza un pasaje por Xilol.
- 10- Se monta con bálsamo de Canadá.

18.3. Inmunomarcación con fosfatasa-antifosfatasa alcalina o peroxidasa-antiperoxidasa.

Extendidos de taquizoitos provenientes de fluido ascítico, o improntas de bazo de ratones, fueron secados a temperatura ambiente y sometidos al siguiente tratamiento:

- Dos lavados con buffer Tris-HCl 0.05 M, pH 7.6, durante 5'a 10' con agitación.
- Incubación con el AcMc $1H_{10}H_8$ (1:5) durante 1 hora, temperatura ambiente, en cámara húmeda.
- Dos lavados con buffer Tris-HCl 0.05 M, pH 7.6, durante 5', con agitación.
- Incubación con un segundo anticuerpo antiratón, hecho en conejo (1:20), durante 30' a temperatura ambiente, en cámara húmeda.
- Dos lavados de 5' con el mismo buffer.
- Incubación con el complejo fosfatasa-antifosfatasa alcalina o el complejo peroxidasa-antiperoxidasa (1:40), durante 30' a temperatura ambiente, en cámara húmeda.
- Dos lavados de 5' con el mismo buffer.
- Revelado con Naftol AB-n fosfato 0.01 mg/ml.

Cuando la reacción fue negativa los extendidos fueron lavados con agua destilada y coloreados con azul de Kuhun como colorante de contraste.

Las preparaciones así tratadas fueron montadas y selladas.

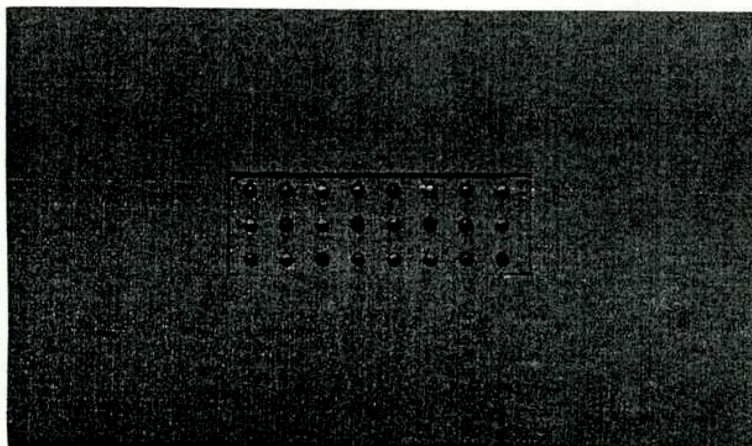
· PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES
CONTRA TAQUIZOITOS DE LA CEPA RH DE
Toxoplasma gondii

1.1. DESARROLLO DE UN ENZIMOINMUNOENSAYO (SIA) PARA LA SELECCION DE HIBRIDOS PRODUCTORES Y TITULACION DE SUEROS POLICLONALES.

Se puso a punto un enzimoinmunoensayo para la selección de híbridos productores, descrito previamente para la determinación de anticuerpos contra una variedad de antígenos. (Engvall, 1971; Van Weemen, 1971; Conway de Macario, 1983).

Se introdujo una variante, que fue el soporte utilizado para la fijación del antígeno. Se trabajó con un portaobjeto de microscopio recubierto de teflón de 24 pozos. (Fig.14). Cada pozo posee un diámetro de 3 mm y en él se pueden colocar volúmenes de hasta 10 μ l. (Esta modificación fue desarrollada por Conway de Macario, 1983).

FIGURA 14



1.1.1. Puesta a punto del SIA.

a. Fijación del antígeno.

Se decidió trabajar con 10^5 tq por pozo. A esta concentración la distribución de los mismos (fácilmente observable al microscopio óptico) es homogénea y no se despegan durante las distintas etapas de lavado. Además la intensidad de color de las reacciones positivas es buena ya a los 5 minutos de iniciada la reacción, y se mantiene estable hasta los 30'. A concentraciones mayores (del orden de 5×10^5 a 10^6 tq por pozo) se observa una distribución despereja, en grumos, que en la mayoría de los casos se va desprendiendo en forma desigual a medida que progresa el ensayo. Las pruebas de reproducibilidad realizadas confirman estas observaciones. Ensayos efectuados por sextuplicado dan reacciones colorimétricas de la misma intensidad cuando se trabaja con 10^5 tq por pozo, mientras que la intensidad de dichas reacciones se vuelve absolutamente heterogénea cuando se colocan 10^6 tq por pozo.

b. Curva de titulación del segundo anticuerpo.

Como se observa en la Tabla 3 la dilución óptima del 2do Ac a partir de la cual no se observa reacción positiva con la preparación antigénica es 1:1000.

c. Reemplazo de la solución bloqueante 1% BSA por leche descremada.

Como se observa en la tabla 4 el reemplazo de la solución de bloqueo 1% BSA por leche descremada 1.5% reproduce los resultados con la misma eficiencia y sensibilidad. Por lo tanto se decidió utilizar esta solución de bloqueo, ya que es de más bajo costo que la albúmina sérica bovina.

TABLA 3

**CURVA DE TITULACION DEL
SEGUNDO ANTICUERPO**

Pozo	Ag	Bloqueo	1er.Ac SNR	Bloqueo	2do.Ac RaMPx	OPD		
	5							
1	10 tq	1%BSA	1:50	1%BSA	1:10	1	1	2
2	"	"	"	"	1:100	0.5	1	2
3	"	"	"	"	1:1000	-	-	-
4	"	"	"	"	-	-	-	-

BSA: Albumina Serica Bovina.

SNR: Suero Normal de Raton.

RaMPx: Igs de conejo anti-Igs de raton conjugadas con peroxidasa.

OPD: Ortotofenilendiamina.

TABLA 4

**REEMPLAZO DE LA SOLUCION
BLOQUEANTE**

Pozo	Ag	Bloq.	1er.Ac SR	Bloq.	2do.Ac RaMPx	OPD		
	5					5'	15'	30'
1	10 tq	1%BSA	N(1:50)	1%BSA	1:1000	-	-	-
2	"	"	K(1:100)	"	"	1	2	2
3	"	"	K(1:1000)	"	"	0.5	1	2
4	"	"	K(1:10000)	"	"	-	0.5	1
5	"	Leche	N(1:50)	"	"	-	-	-
6	"	(1.5%)	K(1:100)	"	"	1	2	2
7	"	"	K(1:1000)	"	"	0.5	1	2
8	"	"	K(1:10000)	"	"	-	0.5	1
9	"	Leche	N(1:50)	"	"	-	-	-
10	"	(5%)	K(1:100)	"	"	0.5	1	1
11	"	"	K(1:1000)	"	"	-	0.5	1
12	"	"	K(1:10000)	"	"	-	0.5	0.5

BSA: Albumina Serica Bovina. OPD: Ortotofenilendiamina.

SR: Suero de Raton; N=Normal; I=Inmunizado.

RaMPx: Igs de conejo anti-Igs de raton conjugadas con peroxidasa.

Habiéndose definido las condiciones óptimas de fijación y adecuada concentración de Ag, sistema de bloqueo y titulación del 2do. Ac., se procedió a la titulación de los sueros policlonales producidos contra taquizoítos de *T. gondii*.

1.1.2. Titulación de sueros policlonales.

El testeo de los sueros obtenidos de los 5 ratones inmunizados (Materiales y Métodos, ítem 6) fue realizado por enzimoimmunoensayo. Los títulos obtenidos se detallan en la Tabla 5. En ella se presenta el número de ratones inyectados, las características del bazo, la presencia de tejido blanco de consistencia dura en el peritoneo (lo que dificulta la extracción como puede apreciarse en el volumen de suero obtenido), el volumen de suero obtenido y el título de anticuerpos.

TABLA 5

TITULACION DE SUEROS POLICLONALES (Por SIA)

Raton Nro.	Características del Bazo	Tejido (*)	Vol.Suero (ul)	Título
1	Grande	mucho	300	1:100000
2	Grande	mucho	150	1:100000
3	Grande	poco	440	1:1000
4	Normal	poco	420	1:1000
5	Normal	poco	480	1:10000

(*) Tejido blando de consistencia dura en el peritoneo.

1.2. FALSOS POSITIVOS DURANTE EL DESARROLLO DEL SIA.

Durante los primeros intentos de poner a punto un sistema de detección de anticuerpos surgió una seria dificultad que reveló la presencia de una contaminación en la preparación antigénica.

Este problema se puso en evidencia al intentar realizar la curva de titulación del 2do. Ac. Como se observa en la Tabla 6 a diluciones del 2do. anticuerpo tan grandes como 1:100000 la reacción dió positiva. (pozo 5). En ausencia del 2do. Ac no hubo reacción. (pozo 6). Para descartar la posibilidad de que el suero normal de ratón utilizado no fuera un buen control negativo, se repitió el ensayo utilizando solución bloqueante en reemplazo del 1er. anticuerpo, obteniéndose los mismos resultados.

TABLA 6

CURVA DE TITULACION DEL SEGUNDO ANTICUERPO

Pozo nro.	Ag	Bloqueo	1er. Ac	Bloqueo	2do.Ac	OPD		
	5							
	10 %	1%BSA	SNR	1%BSA	RaMPX	5'	15'	30'
1	.	.	1:50	.	1:10	2	2	3
2	.	.	.	.	1:100	1	2	2
3	.	.	.	.	1:1000	0.5	1	2
4	.	.	.	.	1:10000	0.5	1	1
5	.	.	.	.	1:100000	0.5	0.5	1
6	.	.	.	.	-	-	-	-

BSA: Albumina Serica Bovina.

SNR: Suero Normal de Raton.

RaMPX: Igs de conejo contra Igs de raton
conjugadas con peroxidasa.

OPD: Ortotolendilamina.

Para comprender la causa de este problema se diseñaron los siguientes experimentos realizados a través de la técnica de DOT-BLOT (Materiales y Métodos;14) de sencilla y rápida ejecución.

1.2.1. Curva de titulación del 2do. anticuerpo.

Se realizó con el objeto de ver si los resultados obtenidos mediante el SIA previo se reproducían en este sistema, (Fig. 15).

FIGURA 15
CURVA DE TITULACIÓN DEL SEGUNDO ANTICUERPO
(DOT-BLOT)



ANTIGENOS SEMBRADOS: 1, 2, 3, y 4: lisado de tq provenientes de exudado peritoneal. 5: Albúmina Serica Bovina (BSA) como control negativo. En todos los casos la cantidad de antígeno sembrado fue de 1 ug.

PRIMER ANTICUERPO: Igs de conejo contra Igs. totales de ratón conjugadas con peroxidasa. 1: 1/100; 2: 1/1000; 3: 1/10000; 4: 1/100000; 5: 1/100.

SISTEMA DE REVELADO: Diaminobenzidina.

Estos resultados confirman la dificultad planteada previamente en el SIA. Como se observa la reacción da positiva en todas las diluciones del 2do. Ac .

1.2.2. Control de especificidad del segundo anticuerpo.

Se realizó con el objeto de ver si los resultados obtenidos eran debidos a reacción inespecífica del anticuerpo anti-ratón con la preparación antigénica. (Fig. 16A).

La reacción dió negativa en todos los casos en que los antígenos no estaban relacionados con inmunoglobulinas de ratón. (pozos 3, 4 y 5). El pozo 1 corresponde a suero normal de ratón y el pozo 2 a exudado peritoneal de ratón infectado. En ambos casos hubo reacción positiva.

Estos resultados indican que el conjugado anti-ratón-peroxidasa utilizado como segundo anticuerpo en los enzimoimmunoensayos reacciona específicamente con inmunoglobulinas de ratón.

1.2.3. Determinación de las causas de la reactividad del segundo anticuerpo con la preparación antigénica.

Se realizaron dos ensayos de Dot-Blot cuyos resultados se muestran en las figuras 16B y 16C.

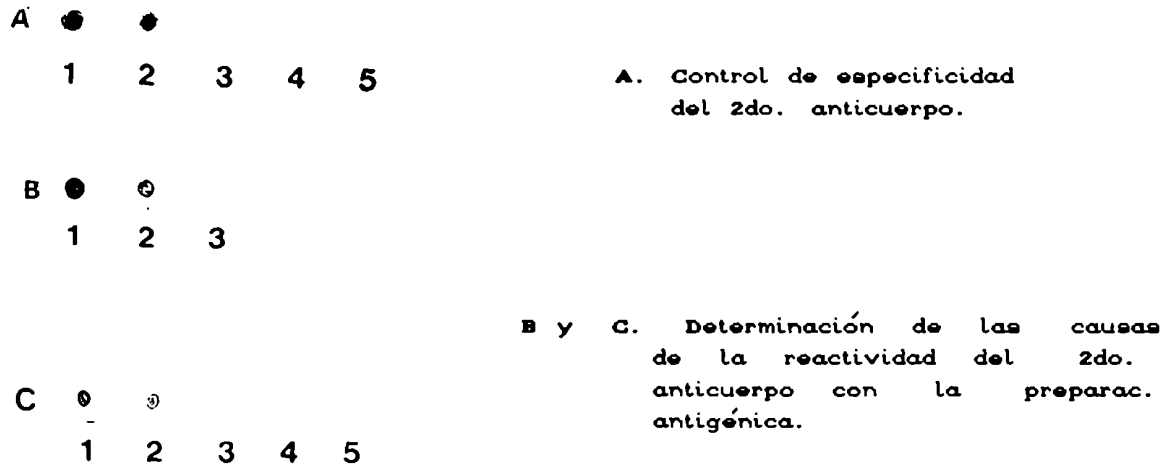
En la figura 16B se observa una fuerte reacción positiva (16B-1) con los taquizoítos obtenidos del exudado peritoneal (contaminados con macrófagos) y una reacción más débil con la preparación de macrófagos (16B-2). Estos resultados indican cierta reactividad del anticuerpo anti-ratón con los macrófagos. Pero, la reacción más intensa con los taquizoítos (16B-1) sugiere una causa adicional que ocasiona reacción positiva con la preparación antigénica. Para investigar ésto se realizó el Dot-Blot mostrado en la Fig. 16C. Se observa reacción positiva con preparaciones de

taquizoítos crudos (Fig. 16C-1) y más débilmente positiva en aquellas preparaciones de taquizoítos libres de macrófagos (Fig.16C-2) y en macrófagos libres de taquizoítos (Fig.16C-3). En 16C-4 la reacción es negativa, lo cual indica que el segundo anticuerpo no reacciona con extractos antigénicos provenientes de taquizoítos cultivados in vitro. Una posible explicación a estos resultados es la presencia de inmunoglobulinas de ratón anti-*T.gondii* unidas a la superficie de los taquizoítos, en las preparaciones provenientes de exudado peritoneal.

1.2.4. Determinación del tipo de Igs de ratón presentes en la preparación antigénica.

Para determinar el tipo de inmunoglobulinas contaminantes se utilizó proteína A conjugada con peroxidasa y anti-IgM de ratón conjugada con peroxidasa como sistema de revelado en ensayos de Dot-Blot. El análisis de la figura 17 revela claramente la presencia de IgM contaminando la preparación antigénica. Se observa reacción positiva en ambas tiras (Fig.17A-1 y 17B-1) cuando los taquizoítos provienen de exudado peritoneal. Cuando la preparación antigénica se encuentra libre de macrófagos (Fig.17A-2 y 17B-2) la reacción con proteína A, usada como revelador, da negativa (17A-2), mientras que el anticuerpo anti-IgM sigue dando señal positiva. (17B-2). En 17A-3 y 17B-3 la preparación antigénica proviene de taquizoítos cultivados in vitro, sobre monocapas de células VERO. Por lo tanto son preparaciones libres de macrófagos y libres de inmunoglobulinas contaminantes. En ambos casos la reacción fue negativa.

FIGURA 16



ANTIGENOS SEMBRADOS: En A) 1: Suero normal de ratón, 2: lisado de tqs provenientes de exudado peritoneal de ratón, 3: Igs totales humanas, 4: Suero normal de caballo, 5: Albumina sérica bovina. En todos los casos la cantidad de antígeno sembrado fue de 1 ug.

En B) 1: lisado de tqs provenientes de exudado peritoneal de ratón infectado; 2: lisado de macrófagos provenientes de exudado peritoneal de ratón no infectado; 3: albúmina sérica bovina (control negativo). En todos los casos la cantidad de antígeno sembrado fue de 1 ug.

En C) 1: lisado de tqs provenientes de exudado peritoneal de ratón; 2: lisado de tqs purificados (libres de macrófagos)*; 3: lisado de macrófagos provenientes de exudado peritoneal de ratón no infectado.* 4: lisado de taquizoitos cultivados in vitro; 5: albúmina sérica bovina (control negativo). En todos los casos la cantidad de antígeno sembrado fue de 0.5 ug.

PRIMER ANTICUERPO: Igs de conejo contra Igs totales de ratón conjugadas con peroxidasa. (Dilución: 1:1000).

SISTEMA DE REVELADO: Diaminobenzidina.

* Esta purificación fue obtenida por centrifugación en un gradiente discontinuo de sacarosa (Mat. y Met.; 9).

La preparación de macrófagos se obtuvo por estimulación intraperitoneal con tioglicolato, de ratones no infectados.

Los taquizoitos fueron cultivados in vitro, sobre monocapas de células VERO. (Mat. y Met.; 4. 9).

FIGURA 17

DETERMINACION DEL TIPO DE INMUNOGLOBULINAS DE RATON
PRESENTES EN LA PREPARACION ANTIGENICA

A ●
1 2 3

B ●
1 2 3

ANTIGENOS SEMBRADOS EN A Y B: 1: lisado de tq provenientes de exudado peritoneal de raton; 2: lisado de tq provenientes de exudado peritoneal, libres de macrófagos^{*}; 3: lisado de tq cultivados in vitro[#]. En todos los casos la cantidad de antígeno sembrada fue de 1 ug.

PRIMER ANTICUERPO: En A: proteina A conjugada con peroxidasa. Dilucion: 1:3000. En B: Igs de cabra contra IgM de ratón. conjugadas con peroxidasa. Dilucion: 1:2000.

SISTEMA DE REVELADO: Diaminobenzidina.

^{*} Esta purificación fue realizada por centrifugación en un gradiente discontinuo de sacarosa (Mat. y Met.; 9).

[#] Los taquizoítos fueron cultivados in vitro, sobre monocapas de células VERO. (Mat. y Met. 4.9).

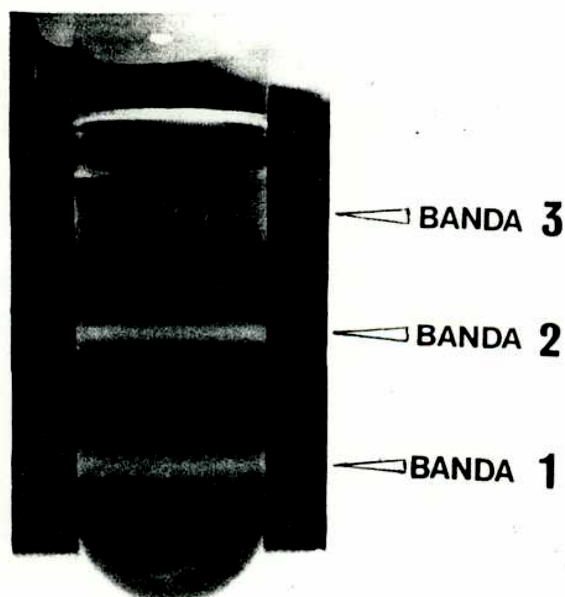
1.3. OBTENCION DE PREPARACIONES ANTIGENICAS PURAS.

1.3.1. Purificación de taquizoítos.

Los taquizoítos provenientes de fluido ascítico contienen una contaminación con macrófagos peritoneales de alrededor de un 10% . Como método de purificación se realizó una centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa, (Materiales y Métodos ; 3).

Luego de la centrifugación se visualizaron tres bandas claramente definidas (Fig.18).

FIGURA 18



Purificación de tq.
en gradiente discontinuo de sacarosa
(60-50-40%), durante
30' a 100000g.

1.3.2. Análisis microscópico de cada banda.

Muestras de cada una de las bandas fueron obtenidas como se indicó en Materiales y Métodos; 3 .

Banda 1: contiene en su mayor parte células de ratón y células de ratón parasitadas en distintos estadios; algunas de ellas se visualizaron en el momento de explosión parasitaria, es decir con los parásitos saliendo de su interior.

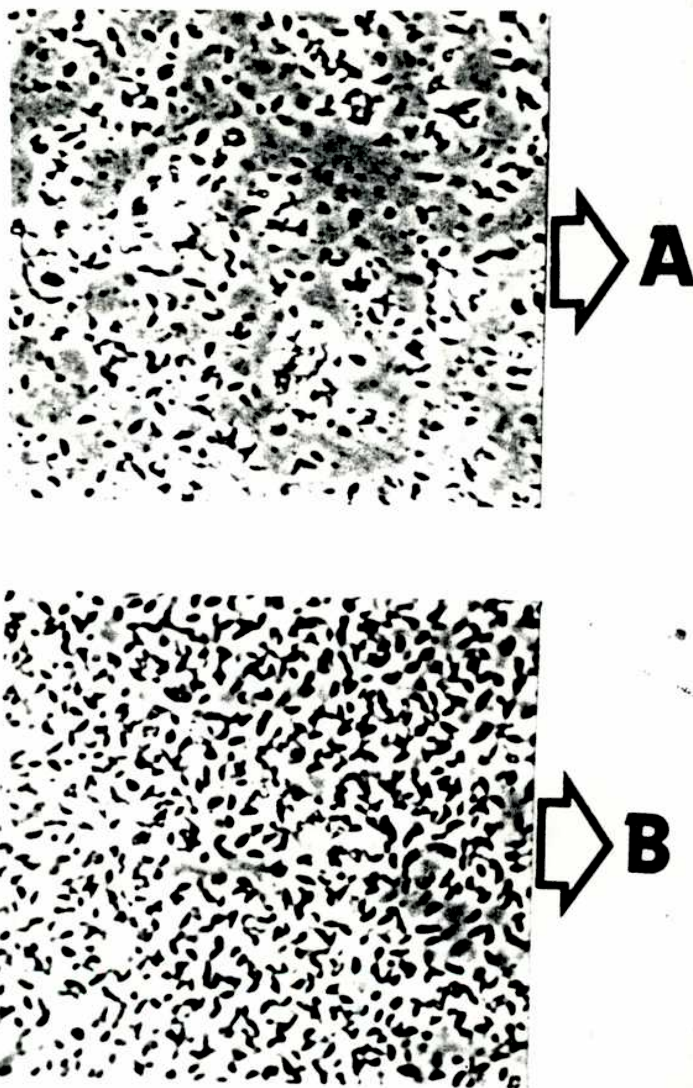
Banda 2: Esta banda muestra un notable enriquecimiento de taquizoítos respecto de las células de ratón (Fig. 19B) comparada con la preparación proveniente de fluido ascítico (Fig.19A). Un conteo en cámara de Neubauer de ambas preparaciones arrojó los siguientes resultados indicados en la Tabla 7.

Como se deduce de los valores obtenidos por conteo, el porcentaje de contaminación con macrófagos peritoneales, de aproximadamente un 10% inicial, se reduce a menos del 1% luego de la purificación.

La preparación pura de taquizoítos fue teñida con May-Grundwald-Giemsa y en ella se pudieron apreciar algunos elementos esféricos con coloración típica de núcleos.

Banda 3: En esta banda no se observaron parásitos ni células. Tampoco fueron encontrados núcleos celulares cuando sus componentes fueron teñidos con May-Grundwald-Giemsa. Sólo se observaron restos membranosos y partículas pequeñas.

FIGURA 19



PREPARACIONES DE PARASITOS VISTAS AL MICROSCOPIO OPTICO.

A. Preparación de taquizoítos obtenidos directamente de exudado peritoneal. Las flechas indican zonas con grupos celulares parasitados.

B. Preparación de taquizoítos extraídos de la banda 2 (Fig. 18) del gradiente discontinuo de sacarosa.

TABLA 7

	TAQUIZOITOS	MACROFAGOS	% DE MACROFAGOS
	(en 0.1ul)	(en 0.1ul)	
PREPARACION CRUDA			9.56
(fluido ascitico)			
PREPARACION PURA	450		0.66
(gradiente de sacarosa)			

1.3.3. Obtención de taquizoítos libres de inmunoglobulinas contaminantes.

Si bien los taquizoítos cultivados in vitro no manifestaban la dificultad de tener Igs. adosadas a su superficie, el costo requerido para su producción era muy elevado para su uso rutinario. Por otra parte disponíamos de la metodología para purificar taquizoítos (descrita anteriormente) a partir de fluido ascítico.

Se pensó entonces en tratar de obtener, a partir de preparaciones purificadas en gradiente de sacarosa, tq libres de Igs. Se diseñaron para ello dos estrategias que se detallan a continuación:

1.3.4. Tratamiento con Glicina.

Se sometió a los parásitos, purificados a través de un gradiente de sacarosa, a un tratamiento con glicina pH 2.8, (Materiales y Métodos; 4.1), lo cual produce el desprendimiento de las inmunoglobulinas unidas a su superficie.

Los parásitos tratados fueron centrifugados como se describe en Materiales y Metodos; 4.1., obteniéndose dos fracciones: Pellet y sobrenadante, que fueron analizadas por SIA, SDS-PAGE y WESTERN-BLOT.

1.3.5. Análisis por SIA.

Se analizaron 3 fracciones: (Tabla 8)

- 1- Pellet de tq purificados. (P_1)
- 2- Pellet de tq purificados, tratados con glicina. (P_2)
- 3- Sobrenadante de fracción 2. (Sb_2)

TABLA 8

ANÁLISIS POR SIA DE LAS FRACCIONES P1, P2 y Sb2

Pozo nro.	Ag (300ng)	1er.Ac	2do.Ac RaMPx (1:1000)	OPD (15')
1	P1	-		++
2	P2	-	.	-
3	Sb2	-	.	+

P1: Pellet de tq purificados.

P2: Pellet de tq purificados, tratados con glicina.

Sb2: Sobrenadante de tq purificados, tratados con glicina.

RaMPx: Igs de conejo anti-Igs de raton conjugadas con peroxidasa.

OPD: Ortotlenilendiamina.

Los resultados indicados en esta tabla muestran que la fracción 1 da reacción positiva con el conjugado antiratón, mientras que la fracción 2 da reacción negativa. El Sb₂ dió reacción positiva; esto significa que, con el tratamiento con glicina, se logró desprender las inmunoglobulinas que se hallaban en la superficie del parásito, las cuales se detectaron en el sobrenadante. .

1.3.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida (10%) con SDS de taquizoítos no tratados y tratados con glicina.

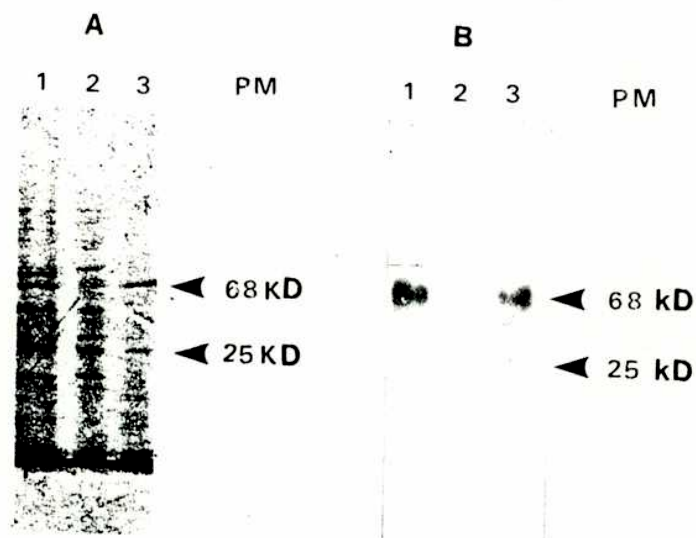
Las fracciones 1, 2 y 3 analizadas previamente por SIA fueron sometidas a SDS-PAGE. (Fig. 20A).

En la calle 2 de la figura 20A (tq tratados) se observa la desaparición de una banda de 68 KD, presente en la calle 1 (tq no tratados). Dicha banda se observa nítidamente en la calle 3 (Sb de tq tratados) y podría corresponder a la cadena pesada de las Igs M de ratón. También se observa en la calle 3 una banda de 25 kD que corresponde presumiblemente a las cadenas livianas de las IgM de ratón. La desaparición de esta banda en la calle 2 no es observable. Esto podría deberse a una superposición con una banda de peso molecular muy próximo correspondiente a alguna proteína del parásito.

1.3.7. Western-Blot de tq no tratados y tratados con glicina.

El Western-Blot de las preparaciones 1, 2 y 3 arrojó los siguientes resultados (Fig. 20B): Las bandas de 68 KD y 25 KD observadas en la calle 1 (Tq no tratados) y calle 3 (sb de tq

FIGURA 20



A: SDS-PAGE (10%). Calle 1: HT de tq no tratados con glicina. Calle 2: HT de tq tratados con glicina. Calle 3: Sb de tq tratados con glicina. El gel fue tenido con Coomassie Blue.

B: WESTERN-BLOT (por difusión simple). Calles 1, 2 y 3 igual que en A. No se utilizó primer anticuerpo. Como segundo anticuerpo se utilizó un conjugado anti-IgM de ratón-peroxidasa (1:2000). Se reveló con 4-Cl-Naftol.

tratados) de la fig 20B corresponden a las cadenas pesadas y livianas de la Ig M de ratón, dado que fueron reveladas con un anticuerpo anti-IgM de ratón de probada especificidad. El hecho de que dichas bandas no estén presentes en la calle 2 (pellet de tq (tratados) indica que el tratamiento con glicina fue efectivo en cuanto al desprendimiento de las inmunoglobulinas pegadas a la superficie del parásito.

1.3.8. Análisis de viabilidad de los taquizoítos sometidos al tratamiento con glicina.

Coloración Vital: La preparación de taquizoítos tratados con glicina fue teñida con Azul Tripan y observada al microscopio óptico. El 100% de los taquizoítos presentada coloración azul o sea eran no viables.

1.3.9. Inmunosupresión con Ciclofosfamida.

Si bien el tratamiento con glicina permitió demostrar la presencia de Igs contaminantes, resultó ser agresivo para la viabilidad de los parásitos. Además en esta preparación podrían estar ausentes antígenos importantes de *T.gondii* que serían extraídos simultáneamente con las inmunoglobulinas. Se pensó entonces en la alternativa de tratar a los ratones con drogas inmunosupresoras previo a la infección con taquizoítos.

Se trabajó con dos lotes de ratones, uno de los cuales recibió una dosis intradérmica de ciclofosfamida (2 mg /kg), dos días antes de la inoculación con taquizoítos. El otro lote, no tratado con ciclofosfamida, se utilizó como control. Se obtuvieron dos preparaciones antigénicas: una proveniente de los ratones inmunosuprimidos y la otra de los ratones no tratados. Ambas

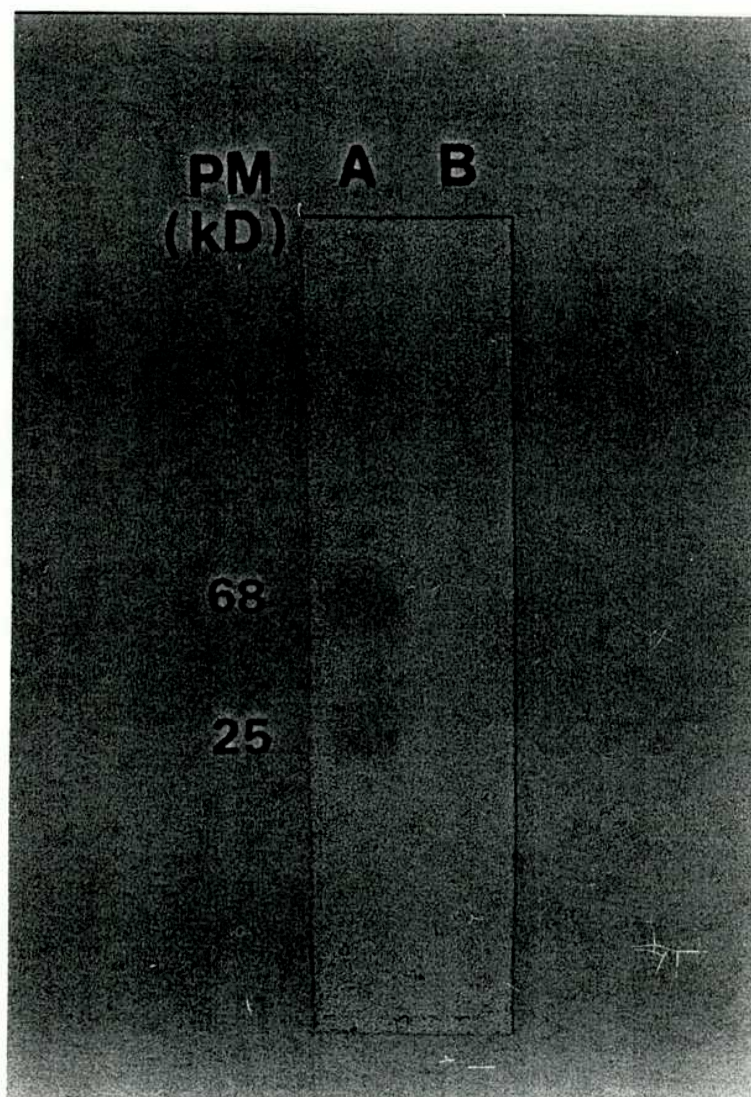
preparaciones fueron purificadas en gradiente de sacarosa y con ellas se realizó el Western-Blot de la Figura 21.

En la calle A (control) se observan dos bandas cuyos PM (68 KD y 25 KD) corresponden a las cadenas pesadas y livianas de las IgMs respectivamente. En la calle B (extractos de ratones inmunosuprimidos) no se observan dichas bandas. Estos resultados coinciden con los obtenidos luego del tratamiento con glicina, descrito anteriormente. Pero la inmunosupresión, previa a la inoculación de parásitos, permite la obtención de taquizoítos libres de inmunoglobulinas, **viabiles**. Luego estas preparaciones pueden ser sometidas al proceso de purificación en gradiente de sacarosa, para eliminar macrófagos peritoneales.

En síntesis, con preparaciones parasitarias procesadas de este modo, se estuvo en condiciones de comenzar con la puesta a punto del enzimoimmunoensayo descrito en Resultados; 1.1. para la detección de la actividad de los anticuerpos.

FIGURA 21

WESTERN-BLOT DE EXTRACTOS PARASITARIOS PROVENIENTES DE RATONES INMUNOSUPRIMIDOS Y RATONES CONTROLES



Antígenos sembrados: Calle A: Extractos parasitarios totales
provenientes de ratones no tratados. Calle B: Extractos
parasitarios totales provenientes de ratones inmunosuprimidos.
No se utilizó primer anticuerpo. Como segundo anticuerpo se
utilizó un conjugado anti-IgM de ratón-peroxidasa (1:2000). Se
reveló con diaminobenzidina.

1.4. FUSION CELULAR.

Habiéndose cumplido las etapas previas necesarias para la producción de anticuerpos monoclonales se llevó a cabo la fusión celular.

Se realizaron dos fusiones, una con la línea NSO y otra con la línea X_{63} .

Se utilizaron los bazos de tres ratones inmunizados como se explicó en Materiales y Métodos. La última inmunización se realizó tres días antes de la fusión. El día de la fusión se procedió a la extirpación de los bazos obteniéndose $1,98 \times 10^8$ células totales con 99% de viabilidad.

La relación célula de mieloma/bazo utilizada fue la siguiente:

1 célula NSO cada 2,2 células de bazo.

1 célula X_{63} cada 2,6 células de bazo.

La viabilidad de las líneas NSO y X_{63} fue del 94% y 95% respectivamente.

Después de realizadas ambas fusiones la viabilidad fue del 67% para la fusión realizada con la línea NSO y del 74% para la realizada con X_{63} .

En la tabla 9 se detallan los porcentajes de los pozos que presentaron híbridos, detectados por observación microscópica, y los porcentajes de pozos en los que se detectaron híbridos positivos, determinados por SIA.

TABLA 9

PLACAS DE FUSION

LINEA MIELOMA	POZOS SEBRADOS	HIBRIDOS OBTENIDOS	HIBRIDOS POSITIVOS	% HIBRIDOS OBTENIDOS	% HIBRIDOS POSITIVOS
X69	280	205	18	79	8.70
NSO	916	104	1	99	0.96

1.4.1. Nomenclatura utilizada.

Se numeraron las placas sembradas del 1 al 8. Cada placa de fusión lleva letras que indican la fila (horizontal) y números que indican la columna (vertical), de manera que cuando se designa un clon, por ejemplo 1F6, se refiere al pozo de la fila F, columna 6, de la placa 1.

1.4.2. Detección de clones positivos y primer clonado.

A medida que los clones se hacían visibles fueron testeados. En el primer testeo tres clones resultaron positivos, el 1F6, el 1F11 y el 2G10. A día siguiente éstos fueron clonados por dilución límite utilizando dos placas de clonado por clon, una con células alimentadoras de bazo de ratón Balb/c de dos meses de edad, y la otra con células alimentadoras de timo de ratón de la misma cepa, de tres semanas de vida.

En el segundo testeo diez clones resultaron positivos, los cuales fueron clonados por dilución límite utilizando una sola placa por clon con células alimentadoras de timo de ratón Balb/c de dos meses de edad.

En el tercer testeo cinco clones resultaron positivos, los cuales fueron clonados utilizando una placa por clon con células alimentadoras de bazo de ratón Balb/c de dos meses de edad.

El mismo día del primer clonado, estos clones fueron expandidos a placas de 24 pozos con 300 μ l de medio, agregándoseles medio fresco en la medida del requerimiento mostrado en cada pozo y finalmente congelados en N₂ líquido.

En la Tabla 10 se presentan los resultados positivos (de un total de 309 híbridos testeados en las ocho placas de fusión), el tipo de células alimentadoras usadas en el primer clonado y los clones que se congelaron.

Luego se hicieron los testeos correspondientes a las 21 placas de clonado, obteniéndose los resultados detallados en la Tabla 11.

1.4.3. Segundo clonado.

Se clonaron por segunda vez ocho clones usando células alimentadoras de bazo de ratón Balb/c de dos meses de edad. Los resultados positivos de los testeos se detallan en la Tabla 12.

Los clones finalmente obtenidos, expandidos y congelados están enumerados en la Tabla 13.

TABLA 10
HIBRIDOS POSITIVOS

CLON	SIA (Titulo)	CELULA ALIMENTADORA	CONGELADO
1F6	0.5	Bazo/Timo	si
1F11	0.5	Bazo/Timo	si
2G10	0.5	Bazo/Timo	si
2F10	1.0	Timo	no
2E6	2.0	Timo	si
5E9	1.0	Timo	si
4F7	0.5	Timo	no
4F8	0.5	Timo	no
7C2	1.0	Timo	si
7C4	1.5	Timo	si
7D2	0.5	Timo	si
2B6	1.0	Timo	si
2D10	2.0	Timo	si
2H2	0.5	Bazo	no
1G10	1.0	Bazo	no
8B1	1.0	Bazo	si
1H10	1.5	Bazo	si
2E8	1.0	Bazo	si

TABLA 11
PRIMER CLONADO

CLON	HIBRIDOS TOTALES	HIBRIDOS TESTEADOS	HIBRIDOS POSITIVOS	% DE HIBRIDOS POSITIVOS
1F6B	35	35	19	54
1F6T	13	7	1	14
1H10	42	42	26	61
1F11B	17	17	9	52
1F11T	11	2	1	50
2H2	30	30	9	30
1G10	20	20	0	0
2B6	77	41	10	24
2E6	23	23	1	4
2E8	19	19	0	0
2D10	8	8	0	0
2F10	16	16	5	31
2G10B	10	10	0	0
2G10T	12	12	0	0
5E9	21	4	4	100
7C2	33	33	5	15
7D2	25	12	3	25
7C4	24	24	4	17
8B1	29	20	0	0
4F7	9	9	2	22
4F8	14	14	1	7

TABLA 12
SEGUNDO CLONADO

CLON	HIBRIDOS TOTALES	HIBRIDOS TESTEADOS	HIBRIDOS POSITIVOS	% DE HIBRIDOS POSITIVOS
2B6B11	34	34	3	8
2B6C11	37	37	9	24
1F6C7B	21	21	1	4
1F11G7	22	22	2	9
5E9A3	28	20	3	15
5E9B11	8	8	1	12
2H2G3	19	19	4	21
1H10C12	30	30	3	10
1H10E9	29	29	5	17

TABLA 13

PLACAS DE SEGUNDO CLONADO

CLON	SIA	EXPANDIDO	CONGELADO
1F6C7BB3	0.5	si	si
1F6C7BG12	1.5	si	no
1F6C7BH1	1.5	si	si
1F6C7BH11	0.5	si	si
1F11G7BA8	1.0	si	no
1F11G7BB9	0.5	si	no
5E9A3B4	3.0	si	si
5E9A3C1	3.0	si	no
5E9A3E4	0.5	si	no
5E9A3H2	0.5	si	no
2B6C11A7	3.0	si	no
2B6C11A8	2.0	si	si
2B6C11D10	0.5	si	si
2B6C11D11	1.5	si	si
2B6C11E2	3.0	si	si
2B6C11E4	0.5	si	si
2B6C11E7	0.5	si	si
2B6C11G6	1.0	si	si
2B6C11H9	3.0	si	si
5E9B11A7	2.0	si	no
5B6B11A3	3.0	si	si
5B6B11F9	3.0	si	si
2H2G3B8	1.0	si	si
2H2G3D7	0.5	si	si
1H10C12B6	3.0	si	si
1H10C12E5	1.0	si	si
1H10C12G8	1.0	si	si
1H10E9C2	1.0	si	si
1H10E9E6	1.0	si	si
1H10E9E11	0.5	si	si

**ARACTERIZACION PR
CUERPOS MONOCLONA**

2.1. LOCALIZACION SUBCELULAR PRELIMINAR.

De las 21 líneas de hibridomas secretantes de AcMs contra tq de *T. gondii* obtenidas, se seleccionaron cuatro de alta producción de anticuerpos: 1H10H8, 1F6C4T, 1H10E9E6 y 5E9A3B4.

Con la intención de proceder a una caracterización preliminar de estos anticuerpos monoclonales se prepararon fracciones subcelulares a partir de homogenatos totales de Tq de *T. gondii*. Se obtuvo así un sobrenadante de 105000g (Sb₁₀₅₀₀₀) y un pellet de 105000g (P₁₀₅₀₀₀). Estas fracciones se analizaron por SIA (Tabla 14).

TABLA 14

CARACTERIZACION PRELIMINAR DE 5 LINEAS PRODUCTORAS DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CON T. GONDII POR SIA

ANTICUERPO MONOCLONAL (a)	PREPARACIONES ANTIGENICAS			
	TQ ENTEROS (#)	HOMOGENATO TOTAL (*)	SOBRENADANTE 105000g (*)	PELLET 105000g (*)
1H10H8	2.0	2.0	1.0	1.0
1F6C4T	1.0	0.5	0.0	0.5
1H10E9E6	2.0	2.0	1.5	1.0
5E9A3B4	1.0	1.0	0.0	1.0
1H10H6 (■)	0.0	0.0	0.0	0.0

a) Sobrenadante de cultivo sin diluir.

#) Tq de fluido ascítico₅ de ratones inmunosuprimidos, purificados en gradiente de sacarosa. (10⁵ tq por pozo).

*) 200 ng de proteínas por pozo.

■) Híbrido no productor, utilizado como control negativo.

Los anticuerpos monoclonales 5E9A3B4 y 1F6C4T reconocen eminentemente antígenos de la fracción de membrana o particulada (Pellet 105000g) y los anticuerpos 1H10H8 y 1H10E9E6 reconocen antígenos que se hallan en ambas fracciones subcelulares (Fracción citosólica [Sb_{105000g}] y de membrana [P_{105000g}]).

2.2. TIPIFICACION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Este análisis fue llevado a cabo por medio de un SIA, usando antisueros específicos contra las diferentes clases y suclases de Igs. (Tabla 15).

De los cuatro anticuerpos testeados, tres resultaron ser IgMs (1H10H8, 1H10E9E6 y 1F6C4T), mientras que 5E9A3B4 es una IgG1.

2.3. ANALISIS DE LAS PROTEINAS RECONOCIDAS POR LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.

2.3.1. Western-Blot con los anticuerpos monoclonales 1H10H8, 1H10E9E6, 1F6C4T y 5E9A3B4.

Extractos parasitarios totales de taquizoítos purificados, separados por electroforesis en gel de poliacrilamida (10%), en condiciones reductoras, fueron transferidos a nitrocelulosa e inmunodetectados con los AcMs 1H10H8, 1H10E9E6, 1F6C4T y 5E9A3B4.

Como se observa en la figura 22 (calle B) 1H10H8 reconoce dos bandas de 53KD y 43KD. El AcMc 1H10E9E6 (Calle C) reconoce un patrón de bandas idéntico. El AcMc 1F6C4T (Calle D) reconoce una banda mayoritaria de 58 KD y una de menor intensidad de 35KD, mientras que el AcMc 5E9A3B4 (Calle E) reconoce una banda de 71KD.

Para cada AcMc se realizó un control de especificidad utilizando marcadores de PM. En todos los casos dió negativo (Datos no mostrados), excepto para 1H10H8 (calle A) únicamente a la Anhidrasa Carbónica de eritrocitos bovinos.

TABLA 15
DETERMINACION DE CLASES Y SUBCLASES DE INMUNOGLOBULINAS
PRODUCIDAS POR HIBRIDOMAS

Nro.	ANTIGENO	1er.Ac	2do.Ac	3er.Ac	ABTS (15')
1	10 ⁵ tq	SRN (1:50)	Anti-IgG1	Anti-	-
2	"	"	Anti-IgG2a	-Conejo	-
3	"	"	Anti-IgG2b	hecho en	-
4	"	"	Anti-IgG3	Cabra	-
5	"	"	Anti-IgM	(1:3000)	-
6	"	"	Anti-IgA	"	-
7	"	"	PBS-Leche	"	-
8	"	SRI (1:10 ⁴)	Anti-IgG1	"	-
9	"	"	Anti-IgG2a	"	+/-
10	"	"	Anti-IgG2b	"	+
11	"	"	Anti-IgG3	"	+/-
12	"	"	Anti-IgM	"	-
13	"	"	Anti-IgA	"	-
14	"	1H10H8	Anti-IgG1	"	-
15	"	"	Anti-IgG2a	"	-
16	"	"	Anti-IgG2b	"	-
17	"	"	Anti-IgG3	"	-
18	"	"	Anti-IgM	"	+
19	"	"	Anti-IgA	"	-
20	"	1F6C4T	Anti-IgG1	"	-
21	"	"	Anti-IgG2a	"	-
22	"	"	Anti-IgG2b	"	-
23	"	"	Anti-IgG3	"	-
24	"	"	Anti-IgM	"	+
25	"	"	Anti-IgA	"	-

Continúa pag. siguiente⇒

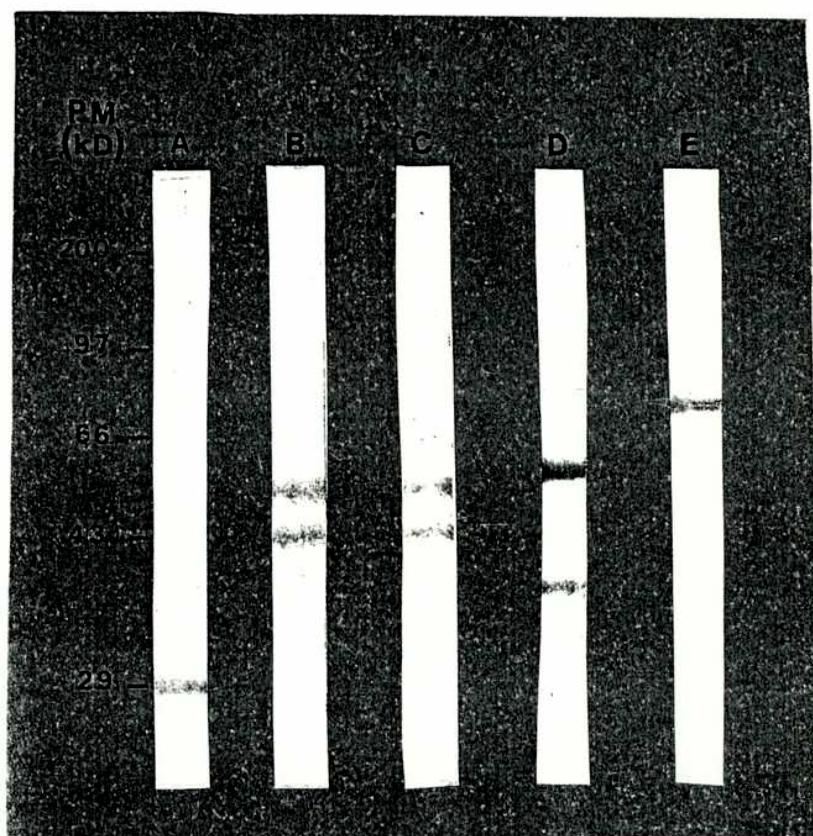
TABLA 15 (Continuación)

Nro.	ANTIGENO	1er.Ac	2do.Ac	3er.Ac	ABTS (15')
26		1H10E9E6	Anti-IgG1		-
27		"	Anti-IgG2a		-
28		"	Anti-IgG2b		-
29		"	Anti-IgG3		-
30		"	Anti-IgM		+
31		"	Anti-IgA		-
32	10 ⁵ tq	5E9A3B4	Anti-IgG1	Anti-	+
33	"	"	Anti-IgG2a	-Conejo	-
34	"	"	Anti-IgG2b	hecho	-
35	"	"	Anti-IgG3	en Cabra	-
36	"	"	Anti-IgM	(1:3000)	-
37	"	"	Anti-IgA	"	-
38	"	"	PBS-Leche	"	-

FIGURA 22

WESTERN-BLOT CON LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

1H10H8, 1H10E9E6, 1F6C4T Y 5E9A9B4



Antígenos: Calle A: 2 ug de cada uno de los siguientes marcadores de PM: MIOSINA de músculo de conejo (200 kD); FOSFORILASA B de músculo de conejo (97 kD); ALBUMINA bovina (66 kD); OVOALBUMINA (43kD); ANHIDRASA CARBONICA de eritrocitos bovinos (29 kD). Calles B, C, D y E: 90 ug de extractos parasitarios totales.

1er. Ac: A Y B: 1H10H8; C: 1H10E9E6; D: 1F6C4T Y E: 5E9A9B4.

2do. Ac: anti-inmunoglobulinas totales de ratón conjugadas con peroxidasa (1:1000).

Se reveló con 4-Cl-Naftol.

2.4. LOCALIZACION CELULAR DE LAS PROTEINAS RECONOCIDAS POR LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.

2.4.1. Inmunomarcación de extendidos de taquizoítos mediante la técnica de inmunoperoxidasa con los anticuerpos monoclonales 1H10H8, 1F6C4T y 5E9A3B4.

Utilizando la técnica de inmunoperoxidasa se realizó una inmunomarcación sobre extendidos de taquizoítos extracelulares, purificados, provenientes de fluido ascítico de ratones Balb/c, inmunosuprimidos.

Cuando extendidos de taquizoítos, previamente fijados con formaldehído 2% fueron inmunomarcados con el AcMc 1H10H8, se observó (Fig. 23 A) marcación, predominantemente, en la parte anterior del parásito y en algunos casos extendiéndose hacia atrás, a lo largo de un borde. En cambio cuando el mismo procedimiento se aplicó sobre extendidos de taquizoítos frescos, secados sobre el portaobjeto (Fig 23 B), se observó una fuerte marcación en áreas periféricas al taquizoítos.

Con los AcMcs 5E9A3B4 (Fig. 24) y 1F6C4T (Fig. 25) la marcación se observa en la membrana celular de los taquizoítos. Esto indica que ambos AcMcs reconocen antígenos de superficie aunque la distribución de los mismos es claramente distinta. En el caso de 5E9A3B4, parecerían distribuirse en grumos mientras que 1F6C4T reconoce antígenos con una distribución homogénea.

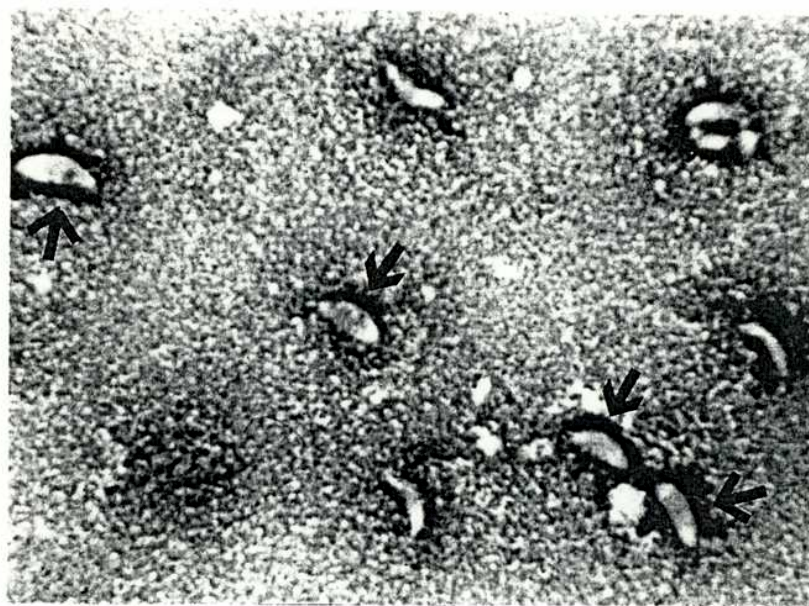
INMUNOMARCACION CON EL ANTICUERPO MONOCLONAL 1H10H8

FIGURA 29 A



Inmunomarcación de extendidos de taquizoitos, fijados con formaldehído 2%, utilizando el AcMc 1H10H8. Técnica empleada: Inmunoperoxidasa. Las flechas indican los lugares del parásito en donde se depositó el sustrato. 250X.

FIGURA 23 B



Inmunomarcación de extendido de taquizoitos frescos, secados sobre el portaobjeto, utilizando el AcMc 1H10H8. Técnica empleada: Inmunoperoxidasa. Las flechas indican las áreas circundantes del prásito con fuerte marcación positiva. 400X

FIGURA 24

INMUNOMARCACION CON EL ANTICUERPO MONOCLONAL 5E9A9B4



Inmunomarcación de extendido de taquizoítos frescos, secados sobre el portaobjeto, con 5E9A9B4. Técnica utilizada: inmunoperoxidasa. 625X.

FIGURA 25

INMUNOMARCACION CON EL ANTICUERPO MONOCLONAL 1F6C4T

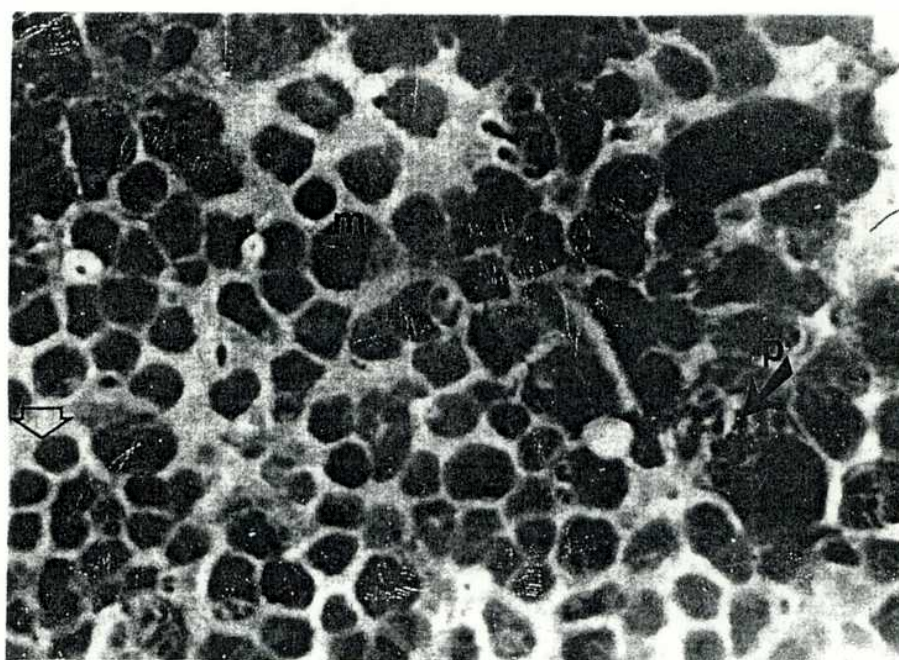


Inmunomarcación de extendidos de tachizoítos frescos, secados sobre el portaobjeto, con el AcMc 1F6C4T. Técnica utilizada: Inmunoperoxidasa. Las flechas indican marcación positiva sobre la membrana celular. 400X

2.4.2. Inmunomarcación de improntas de bazo y extendidos de taquizoítos, con el AcMc 1H10H8.

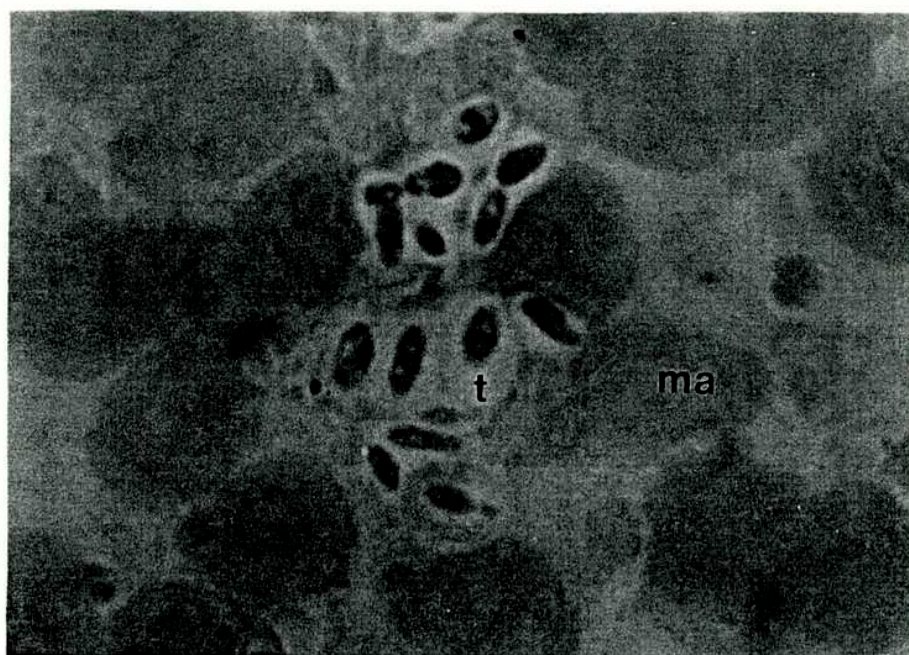
En improntas de bazo (Fig.26 A y B) la inmunomarcación mediante la técnica de fosfatasa-antifosfatasa alcalina, con el AcMc 1H10H8, resultó positiva en las formas parasitarias intra y extracelulares, pudiéndose observar también restos de parásitos en el citoplasma del macrófago. En cambio el patrón de inmunomarcación de extendidos de taquizoítos, utilizando el mismo anticuerpo fue claramente distinto (Fig.27 A). Se observa en este caso una fuerte marcación positiva en las zonas circundantes a los parásitos (*) y con menor intensidad en las áreas alejadas de los mismos (●). La figura 27 B (Control, contrastado con azul de khunn), muestra un extendido de taquizoítos provenientes de fluido ascítico del mismo ratón de la figura 27 A, inmunomarcado con un AcMc no relacionado. Se observa reacción negativa tanto en los taquizoítos como en las áreas circundantes.

FIGURA 26 A



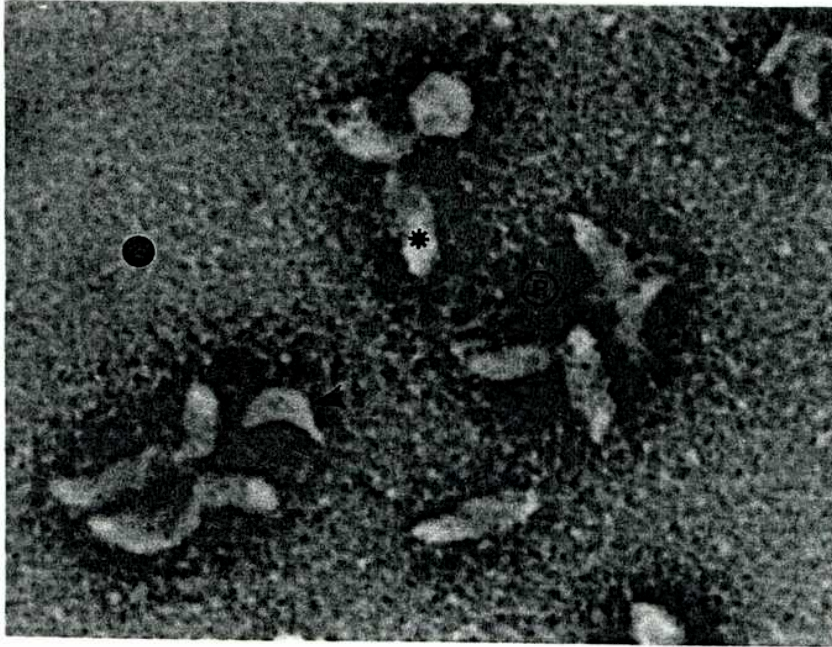
Impronta de bazo de ratón infectado con taquizoítos de *T. gondii*, inmunomarcado con el anticuerpo monoclonal 1H10H8, utilizando la técnica de fosfatasa-antifosfatasa alcalina. m: macrófagos. p-flecha: macrófagos con estructuras parasitarias, contrastando con otros elementos celulares no marcados (flecha clara) que no contienen parásitos. 250X.

FIGURA 26 B

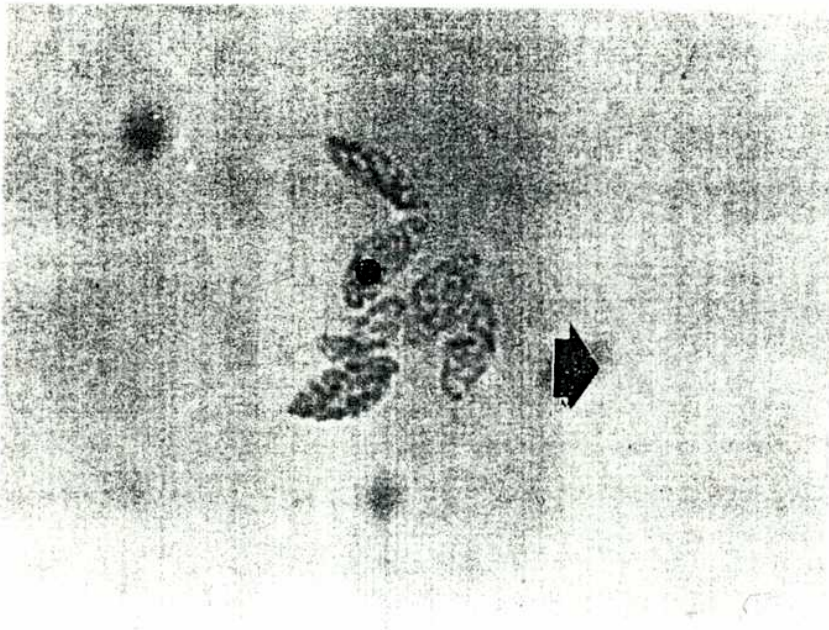


Impronta de bazo de ratón infectado con taquizoítos de *T. gondii*,
inmunomarcado con el anticuerpo monoclonal 1H10H8, utilizando la
técnica de fosfatasa-antifosfatasa alcalina. t: taquizoítos.
ma: macrófagos. 625X.

FIGURA 27



A: Extendido de fluido ascítico de ratón infectado con tq de *Toxoplasma gondii* inmunomarcado con el AcMc 1H10H8. Se observan tq (●) con fuerte marcación positiva en las áreas circundantes (→) y con menor intensidad en áreas alejadas (●). Inmunomarcación con la técnica de fosfatasa alcalina. 625X.



B: extendido de fluido ascítico perteneciente al mismo ratón de la figura 27 A, inmunomarcado con un AcMc no relacionado. Se observa falta de marcación tanto los parásitos (●) como en las áreas alejadas (→). Contrastado con azul de Khunn. 625X.

**3. RECLONADO DE HIBRIDOMAS PRODUCTORES
DEL ANTICUERPO MONOCLONAL 1H10H8**

El clonado y reclonado de las células híbridas es esencial para asegurar la monoclonalidad de los anticuerpos y para eliminar células no productoras. Tanto en el cultivo original como en las fases finales de crecimiento pueden encontrarse hibridomas no productores de anticuerpos. Esas variantes tienen alguna ventaja metabólica sobre los hibridomas productores, pueden crecer demasiado y ser las células predominantes en el cultivo.

Por estas razones se realizó el reclonado de la línea de híbridos productores del AcMc 1H10H8. Se utilizó el método de clonado por dilución límite (Mat. y Met.; 8.6). Se sembraron dos placas de 96 pozos Se usaron células alimentadoras de bazo de ratón Balb/c de dos meses de vida.

En la Tabla 16 se detalla el número de híbridos totales y el número y porcentaje de híbridos positivos obtenidos. La detección de hidridomas productores se realizó por enzimoinunoensayo (SIA) y los resultados se detallan en la Tabla 17.

TABLA 16

SEGUNDO CLONADO DEL HIBRIDOMA PRODUCTOR
DEL ANTICUERPO MONOCLONAL 1H10H8

PLACA Nro.	HIBRIDOS TOTALES	HIBRIDOS TESTEADOS	HIBRIDOS POSITIVOS	%HIBRIDOS POSITIVOS
1	21	21	16	76
2	15	15	12	80

TABLA 17

HIBRIDOS POSITIVOS DEL SEGUNDO CLONADO
DE LA LINEA DE HIBRIDOMAS 1H10H8

PLACA Nro.	CLON	TITULO DETERMINADO POR SIA
<u>1</u>	1H10H8-1B5	0.5
	1H10H8-1B6	1.0
	1H10H8-1C9	1.0
	1H10H8-1D5	2.0
	1H10H8-1D11	1.0
	1H10H8-1E7	0.5
	1H10H8-1E8	0.5
	1H10H8-1F4	1.0
	1H10H8-1F5	2.0
	1H10H8-1F7	0.5
	1H10H8-1G2	1.0
	1H10H8-1G5	3.0
	1H10H8-1G6	1.0
	1H10H8-1H1	1.0
	1H10H8-1H6	0.5
	1H10H8-1H7	2.5
<u>2</u>	1H10H8-2B8	1.5
	1H10H8-2C4	1.0
	1H10H8-2C7	0.5
	1H10H8-2D7	2.0
	1H10H8-2E8	1.5
	1H10H8-2E1	0.5
	1H10H8-2E2	1.0
	1H10H8-2E7	1.5
	1H10H8-2E11	0.5
	1H10H8-2G3	2.5
	1H10H8-2G7	2.0
	1H10H8-2H6	1.0

Los clones positivos fueron expandidos a placas de 24 pozos y luego a frascos de 25 cm². Se seleccionaron los clones de mayor título y se congelaron dos criotubos de cada uno.

El clon 1H10H8G5 (Tg5), por ser el de más alto título, fue elegido para continuar los estudios. Se recolectaron de este clon 700 ml de sobrenadante de cultivo y su título determinado por SIA, fue de 1:16.

3.1. PRODUCCION MASIVA DEL AcMc Tg5.

El hibridoma productor del AcMc Tg5 fue propagado como tumor ascítico peritoneal. Se utilizaron para ello 10 ratones de la cepa Balb/c de dos meses de vida. Se colectaron en total 30 ml de líquido ascítico, los cuales fueron alicuotados y congelados a -20°C. Su título, determinado por SIA, fue de 1:1600.

Con el objeto de mejorar la sensibilidad y definición de los resultados, se procedió a purificación de este AcMc.

Para ello se realizó, a partir de fluido ascítico, y en escala analítica, una precipitación con agua destilada (Materiales y Métodos; 10). Se obtuvieron dos fracciones: un precipitado y un sobrenadante. El análisis por SIA de ambas fracciones revela la presencia del anticuerpo en la fracción precipitada. (Tabla 18). El título obtenido fue de 1:800. Dado que el precipitado fue resuspendido en el mismo volumen inicial, este título puede ser comparado con el obtenido para la misma dilución del AcMc no purificado. (Tabla 18). Un cálculo estimativo indica que el rendimiento fue de aproximadamente un 70%

TABLA 18

ANALISIS POR SIA DE LAS FRACCIONES PRECIPITADA Y SOBRENADANTE
DEL ANTICUERPO MONOCLONAL Tg5

Nro	ANTIGENO	1er.Ac (#)	2do.Ac (*)	OPD (15')
1	10 ⁵ tq	f.pptada 1/10	1:4000	+++++
2	"	" 1/100	"	+++
3	"	" 1/400	"	++
4	"	" 1/800	"	+
5	"	" 1/1600	"	+/-
6	"	" 1/3200	"	-
7		f.sob. 1/10		+/-
8		" 1/100		-
9		" 1/400		-
10		" 1/800		-
11		" 1/1600		-
12		" 1/3200		-
13		SRI 1/1000		++
14		SRN 1/50		-
15	"	Tg5 1/100	"	++++
16	"	" 1/400	"	+++
17	"	" 1/800	"	++
18	"	" 1/1600	"	+
19	"	" 1/2400	"	+/-
20	"	" 1/3200	"	-

(#): AcMc 1H10H805

(*): Anticuerpo Anti-ratón hecho en conejo conjugado peroxidasa.

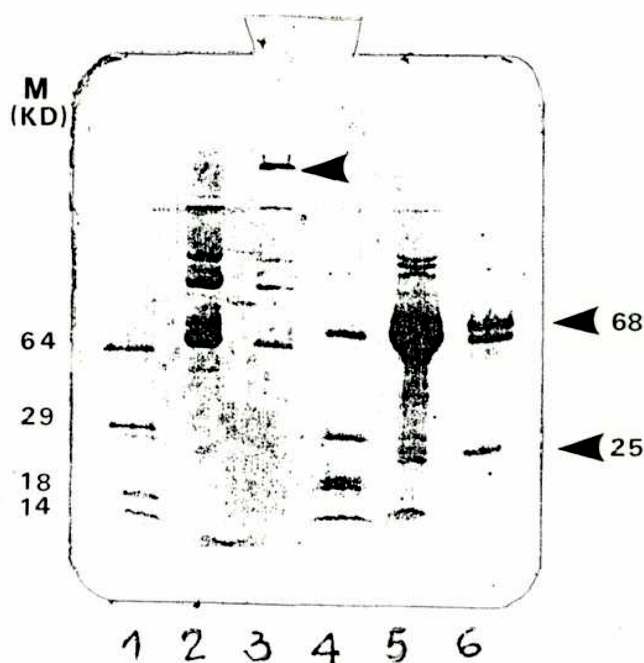
SRI: Suero de ratón inmunizado contra taquizoítos de T. gondii.
(Control positivo).

SRN: Suero de ratón normal (Control negativo).

OPD: Ortofenilendiamina.

Para determinar el grado de pureza alcanzado se realizó una PAGE-SDS (en gradiente 10%-15%), en condiciones reductoras y no reductoras de ambas fracciones. (Fig 28).

FIGURA 28



Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (en gradiente 10-15%) del anticuerpo monoclonal 1H10H8G5, precipitado con agua destilada. Calles 1 y 4: Marcadores de PM. Calles 2 y 5 : Fracción sobrenadante. Calles 3 y 6: Fracción precipitada. Vol. de siembra: 1 ul por calle. Calles 1, 2 y 3: sin mercaptoetanol. Calles 4, 5 y 6: con mercaptoetanol. El gel fue teñido con Coomassie Blue.

En la calle 3 (en condiciones no reductoras) se observa la banda correspondiente al anticuerpo monoclonal (⇐) y unas pocas bandas correspondientes a proteínas contaminantes. En la calle 8 (en condiciones reductoras) se observan las bandas correspondientes a las cadenas pesadas y livianas de las Ig M. (⇐) (68 KD y 25 KD respectivamente). Sólo aparece como contaminación una banda de 66 KD correspondiente a la albúmina.

El grado de pureza alcanzando con este rápido y sencillo método resulta suficiente a nuestros fines.

Se procedió entonces a la purificación, por este método, de 15 de los 30 ml de fluido ascítico obtenido. Su titulación por SIA arrojó los mismos resultados que los obtenidos en la preparación inicial.

5.1. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR.

A partir de extractos antigénicos, purificados en gradiente de sacarosa, provenientes de fluido ascítico de 50 ratones previamente inmunosuprimidos se obtuvo una fracción enriquecida en antígenos ESA y diferentes fracciones subcelulares obtenidas por centrifugación diferencial. A continuación se detallan las fracciones mencionadas:

- Extractos parasitarios totales
- Antígenos ESA
- P₁₀₀₀•
- P₁₀₀₀₀•
- P₁₀₀₀₀₀•
- S₁₀₀₀₀₀•

La concentración proteica de cada fracción fue determinada por la técnica de Bradford y se detalla en la Tabla 19.

TABLA 19

FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR
CONTENIDO PROTEICO DE CADA FRACCION
DETERMINADO POR LA TECNICA DE BRADFORD

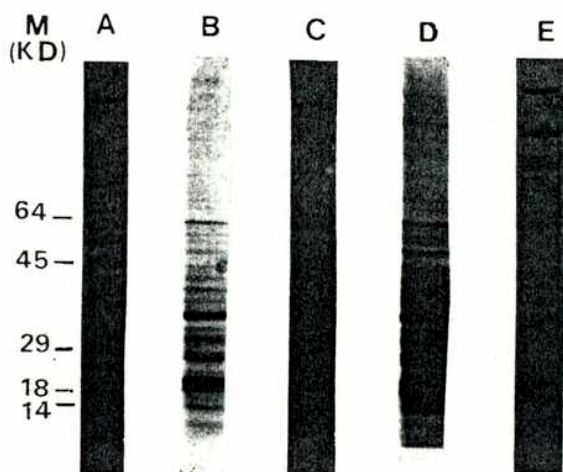
FRACCION	PROTEINAS TOTALES (mg)
Homogenato total	3.2
Antigenos ESA	0.8
P ₁₀₀₀	1.4
P ₁₀₀₀₀	0.5
P ₁₀₀₀₀₀	0.1
Sb ₁₀₀₀₀₀	0.6

5.2. ANALISIS DE LAS DIFERENTES FRACCIONES POR PAGE-SDS.

En la Fig.29 se muestra el patrón proteico de la diferentes fracciones (HT, P₁₀₀₀, P₁₀₀₀₀, P₁₀₀₀₀₀ y Sb₁₀₀₀₀₀) y en la Fig. 30 el correspondiente a la fracción ESA. Se observa un perfil electroforético distinto para cada una de las fracciones, con pesos moleculares en un rango de 10000 KD a 100000 KD.

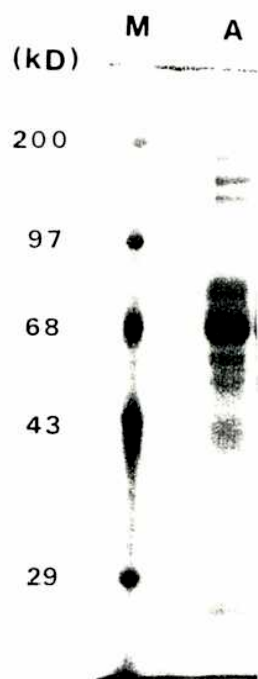
FIGURA 29

PAGE-SDS (en gradiente 8-25%) DE LAS
DISTINTAS FRACCIONES SUBCELULARES



Se sembró 1 ug de proteínas por calle. M: marcadores de PM, A: Homogenato total, B: P₁₀₀₀, C: P₁₀₀₀₀, D: P₁₀₀₀₀₀, E: Sb₁₀₀₀₀₀. El gel fue teñido con Nitrato de Plata.

FIGURA 30
PAGE-SDS (10%) LA FRACCION ESA



Se sembraron 90 ug de proteínas por calle. M: marcadores de PM.
 A: Homogenato total. B: Fracción ESA. El gel fue teñido con
 Coomassie Blue.

5.3. ANALISIS DE LA REACTIVIDAD DEL ANTICUERPO MONOCLONAL Tg5 CON LAS DIFERENTES FRACCIONES SUBCELULARES.

5.3.1. SIA.

Se realizó un enzimoimmunoensayo con las distintas fracciones subcelulares obtenidas. Los resultados (Tabla 20) muestran que el AcMc Tg5 reconoce predominantemente la fracción de antígenos ESA.

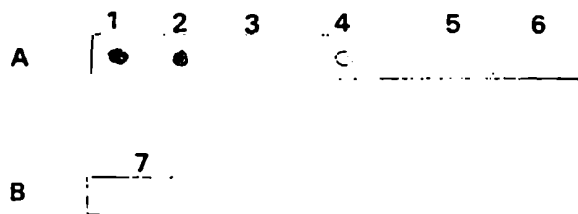
TABLA 20
SIA CON LAS DISTINTAS FRACCIONES SUBCELULARES

Nro.	ANTIGENO	1er.Ac	2do.Ac	OPD (15')
1	HT	Tg5 (1:800)	RαMPX	+
2	ESA			+++
3	P ₁₀₀₀			-
4	P ₁₀₀₀₀			+
5	P ₁₀₀₀₀₀			+/-
6	Sb ₁₀₀₀₀₀			+/-
7	HT	AcMcαIγ		-
9	HT	SRI (1:1000)		++

5.3.2. Dot-Blot.

La fig 31 muestra un experimento de Dot-Blot con cada una de las fracciones antes mencionadas. Se observa reacción positiva predominantemente con el homogenato total y la fracción de exoantígenos. Estos resultados confirman los datos previos obtenidos por SIA.

FIGURA 31
DOT-BLOT DE LAS DISTINTAS FRACCIONES SUBCELULARES



Antígenos sembrados: En A: 1- Homogenato Total, 2- Fracción ESA, 3- P₁₀₀₀, 4-P₁₀₀₀₀, 5-P₁₀₀₀₀₀, 6-Sb₁₀₀₀₀₀. En B: 7- Albúmina (Control). En todos los casos la cantidad de antígeno sembrado fue de 1 ug. Como primer Ac se utilizó el AcMc Tg5. Como segundo Ac se utilizó un conjugado anti-IgM de ratón-peroxidasa (1:2000). Se reveló con diaminobenzidina.

**6. ROL BIOLÓGICO DE UN ANTIGENO DE *T.gondii*
RECONOCIDO POR EL AcMc Tg5.
SU IMPLICANCIA EN LA FISIPATOGENIA.**

6.1. DETECCION DE ACTIVIDAD DE ANHIDRASA CARBONICA EN EXTRACTOS PARASITARIOS TOTALES Y FRACCION DE ANTIGENOS ESA.

Se midió actividad de anhidrasa carbónica (Mat. y Met.; 17) en extractos parasitarios totales y en la fracción de antígenos ESA, en cada una de las siguientes muestras:

- 1) PBS(*) + Rojo Fenol(^) (Control negativo)
- 2) PBS(*) + Rojo Fenol(^) + Anhid. Carbónica (Control positivo)(#)
- 3) " " + Extracto parasitario total (')
- 4) " " + Antígeno ESA (")
- 5) " " + Acetazolamida (†)
- 6) " " + Anhid. Carb.(#) + Acetazolamida (†)
- 7) " " + Ext.parasit.tot.(') + Acetazol. (†)
- 8) " " + Antígeno ESA (")+ Acetazolamida (†)

Volumen final de cada muestra= 500 μ l.

(*) Buffer fosfato salino, pH 7.4.

(^) 0.005% de Rojo Fenol.

(#) 5 μ g/ml de Anhidrasa Carbónica de eritrocitos bovinos, purificada por afinidad.

(') 5.6mg/ml de proteínas totales de *T.gondii*.

(") 600 μ g/ml de Antígeno Excretor-Secretor.

(†) 10 μ g/ml de acetazolamida.

Se midió la absorbancia a 550 nm cada 5 minutos, durante un intervalo de tiempo de 20 minutos de exposición a la presión de CO₂ atmosférica, en cada una de las muestras.

Se graficó absorbancia en función del tiempo y en cada caso se determinó la velocidad de la reacción como la pendiente de la recta de regresión lineal, expresada en unidades de

absorbancia/min. En el caso del control (reacción no catalizada), la pendiente expresa la velocidad del proceso espontáneo de deshidratación del ácido carbónico en dióxido de carbono más agua. Esta reacción llega al equilibrio cuando las presiones parciales de CO_2 en el seno de la solución y en la atmósfera se igualan.

Las figuras 32A, 32B y 32C muestran los resultados de tres experimentos independientes. En la muestra 2 (control positivo con anhidrasa carbónica), muestra 3 (extracto parasitario total) y muestra 3 (fracción ESA) la velocidad de la reacción fue mayor que la observada en la muestra 1 (control negativo). Este aumento de velocidad indica la presencia de actividad enzimática.

Cuando las mediciones se realizaron en presencia de acetazolamida, un inhibidor específico de la anhidrasa carbónica, la velocidad de la reacción en las muestras 6, 7 y 8, no presentó diferencias significativas respecto del control negativo (muestra 1). (Figura 32D).

FIGURA 32 A

DETECCION DE AC

	A550nm				regresiones a la recta			
tiempo	control	ac	ept	ESA	control	ac	ept	ESA
0	0.253	0.248	0.25	0.243	0.2428	0.2498	0.2458	0.245
5	0.299	0.375	0.328	0.348	0.2923	0.3725	0.3335	0.3542
10	0.34	0.49	0.425	0.468	0.3418	0.4952	0.4212	0.4634
15	0.392	0.628	0.501	0.59	0.3913	0.6179	0.5089	0.5726
20	0.443	0.735	0.602	0.668	0.4408	0.7406	0.5966	0.6818
pendiente					0.0095	0.0245	0.0175	0.0218

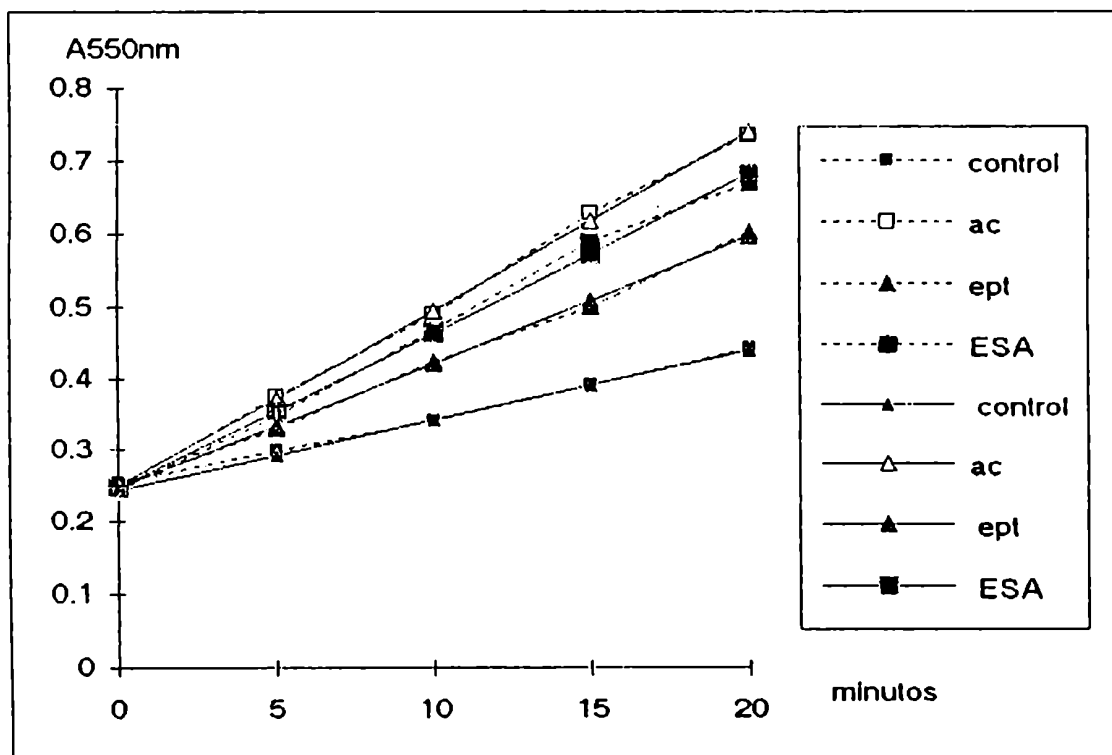


FIGURA 32 B

DETECCION DE AC

	A550nm				regresiones a la recta			
tiempo	control	ac	epl	ESA	control	ac	epl	ESA
0	0.18	0.166	0.153	0.188	0.183	0.188	0.1646	0.194
5	0.235	0.346	0.257	0.298	0.229	0.3148	0.2462	0.3026
10	0.27	0.435	0.33	0.416	0.275	0.4416	0.3278	0.4112
15	0.325	0.576	0.419	0.548	0.321	0.5684	0.4094	0.5198
20	0.365	0.685	0.48	0.606	0.367	0.6952	0.491	0.6284
pendiente					0.0092	0.0254	0.0163	0.02172

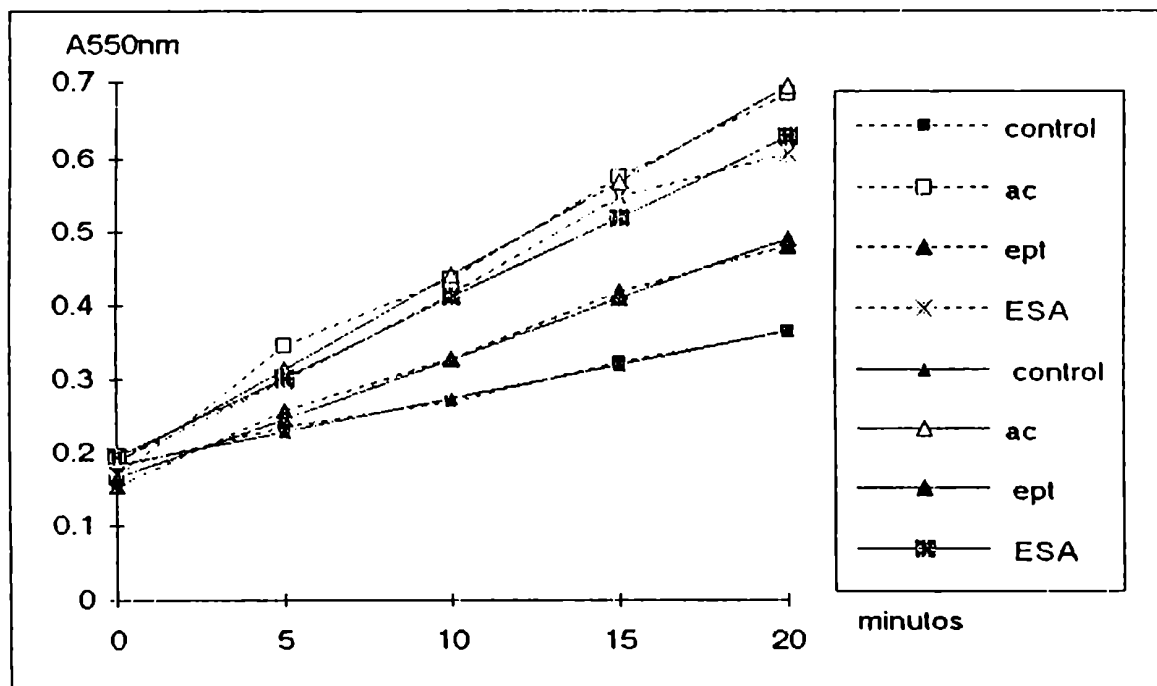


FIGURA 32 C

DETECCION DE AC

tiempo	A550nm				regresiones a la recta			
	control	ac	epl	ESA	control	ac	epl	ESA
0	0.3	0.286	0.27	0.301	0.2982	0.3002	0.266	0.2966
5	0.346	0.44	0.366	0.398	0.3459	0.432	0.3765	0.4068
10	0.388	0.562	0.502	0.516	0.3936	0.5638	0.487	0.517
15	0.445	0.732	0.583	0.638	0.4413	0.6956	0.5975	0.6272
20	0.489	0.799	0.714	0.732	0.489	0.8274	0.708	0.7374
pendiente					0.0095	0.0264	0.0221	0.022

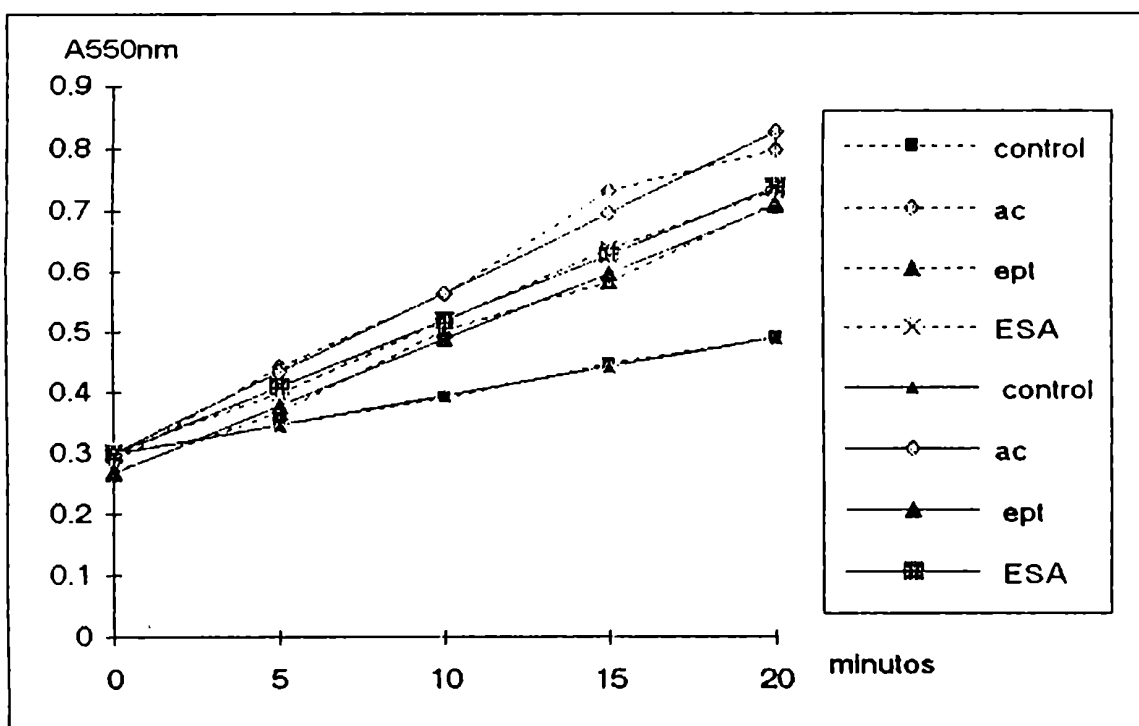
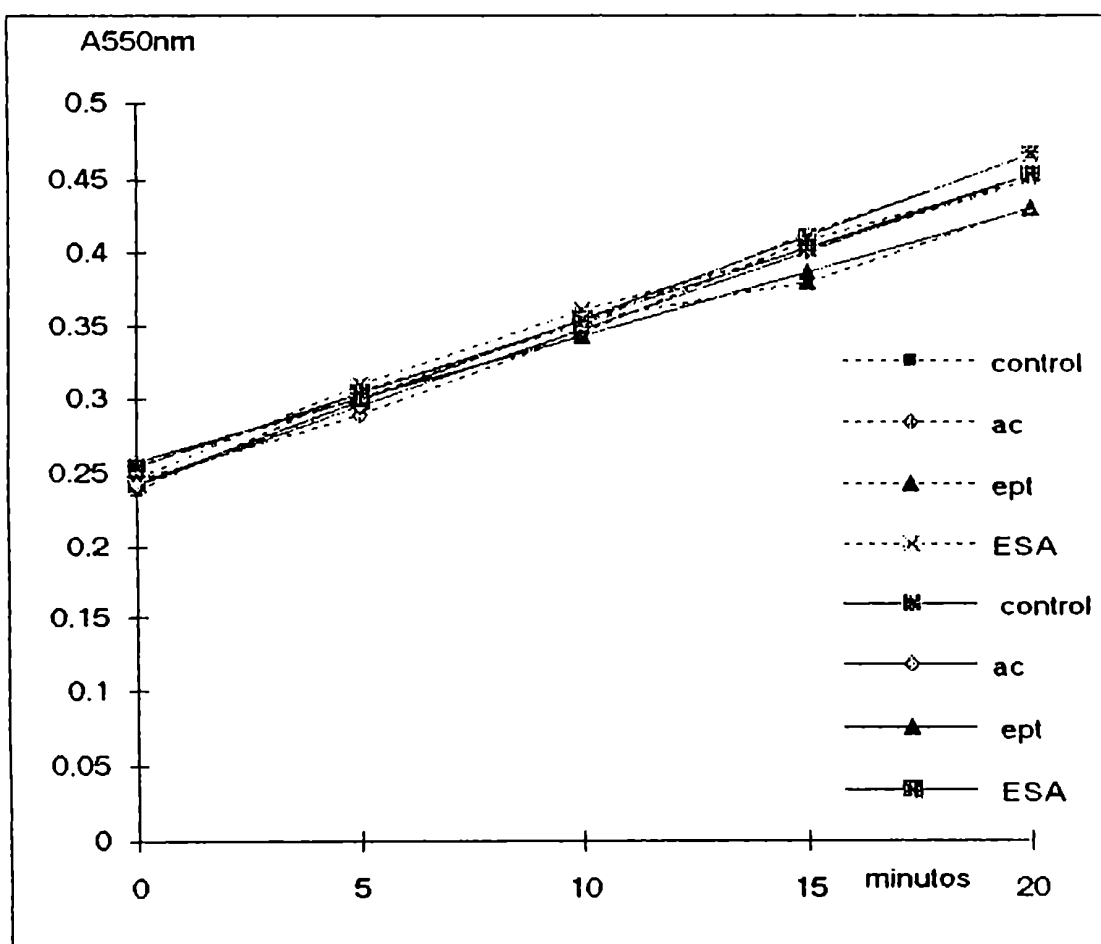


FIGURA 32 D

INHIBICION DE AC POR ACETAZOLAMIDA

tiempo	A550nm				regresiones a la recta			
	control	ac	epl	ESA	control	ac	epl	ESA
0	0.239	0.246	0.255	0.247	0.243	0.2424	0.2576	0.2546
5	0.306	0.289	0.3	0.31	0.2988	0.2949	0.3005	0.304
10	0.351	0.345	0.353	0.36	0.3546	0.3474	0.3434	0.3534
15	0.412	0.408	0.379	0.402	0.4104	0.3999	0.3863	0.4028
20	0.465	0.449	0.43	0.448	0.4662	0.4524	0.4292	0.4522
pendiente					0.0111	0.0105	0.0086	0.0099



6.2. EFECTO DE LA ACETAZOLAMIDA SOBRE LA CAPACIDAD INFECTIVA DE TAQUIZOITOS DE *T.gondii*.

Con el objeto de ver si la actividad de anhidrasa carbónica detectada en los extractos parasitarios se relaciona con la capacidad infectiva del parásito se realizaron experimentos de infección in vitro e in vivo en presencia y ausencia de acetazolamina.

6.2.1. Experimentos de infección in vitro.

Para estudiar este efecto se realizaron experimentos de infección in vitro utilizando células VERO (células epiteliales de riñon de mono), que crecen adheridas al sustrato formando monocapas. El grado de infectividad de los taquizoitos de *T.gondii* puede registrarse con facilidad a través del conteo de placas de lisis formadas por los parásitos durante el proceso infectivo. Para optimizar el registro microscópico de las placas de lisis formadas y su conteo, las monocapas se sometieron a tinción con Giemsa. A través de este método las placas de lisis son fáciles de visualizar y su conteo sencillo.

Puesta a punto del método.

La estrategia seguida fue la siguiente:

1- Una monocapa confluyente de células VERO crecida en un frasco de cultivo de 25 cm² de superficie fue infectada con 2×10^9 tq frescos, de modo tal de lograr una distribución homogénea de parásitos.

2- Se mantuvo en estufa de cultivo a 37°C en atmósfera gaseada (5% CO₂) inmovilizada durante 5 días.

3- Se utilizó como medio de cultivo RPMI 1640, suplementado con 2% de SFB.

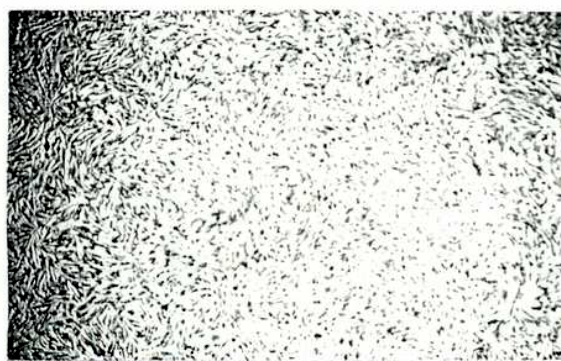
4- Al cabo de los 5 días se descartó el medio, se lavó la monocapa así infectada con PBS, pH 7.4 y se tiñó con May-Grundwald-Giemsa.

Las figuras 33A y 33B muestran el aspecto que presenta esta monocapa antes del proceso de infección. En las figuras 34A, 34B, 34C y 34D se observan a distintos aumentos las placas de lisis formadas por los taquizoítos luego del proceso infectivo.

FIGURA 33



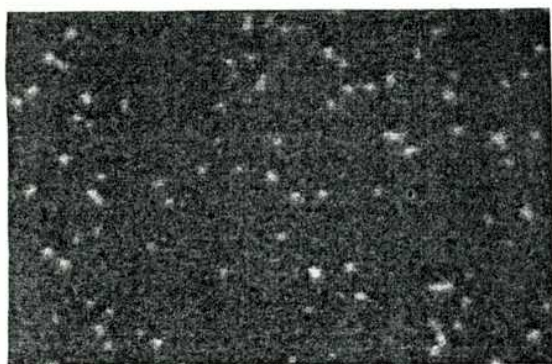
A



B

Monocapas de células VERO sin infectar. A: Lupa; B: 25X.

FIGURA 94



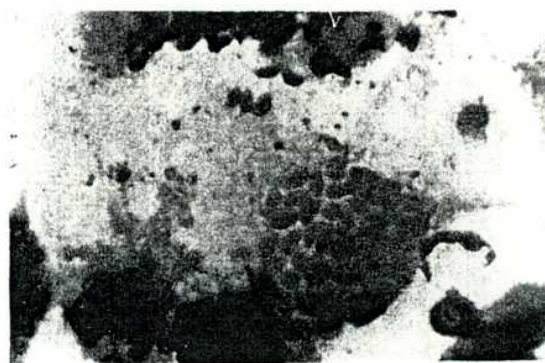
A



B



C



D

Monocapas de células VERO infectadas con un inóculo standard de
tachizoítos de *T. gondii*. A: Lupa; B: 25X; C: 100X; D: 600X.

Con el objeto de verificar la reproducibilidad de los resultados se realizaron cultivos individuales en cajas de Petri de 35mm, por sextuplicado. Cada caja fue sembrada con 5×10^5 células VERO. Al cabo de tres horas las células estaban adheridas formando una monocapa confluyente. Cada una de las cajas fue infectada con 1000 tq y mantenida en las condiciones descriptas previamente. El experimento fue detenido a los cinco días y procesado como se detalló antes. El conteo de placas de lisis arrojó los siguientes resultados:

Nro. de caja	Nro. de placas de lisis.
1	17
2	25
3	23
4	20
5	18
6	22

$$\bar{X} = 20.8 \pm 3.05$$

Los resultados indican que el método permite cuantificar de una manera reproducible los resultados de experimentos realizados en las mismas condiciones.

Una vez puesto a punto el método, comenzamos los estudios sobre el efecto de la acetazolamida sobre la capacidad infectiva del parásito.

Para ello se trabajó con monocapas de células VERO crecidas en placas de Petri de 35 mm. El diseño del experimento se describe en la Tabla 22.

TABLA 22

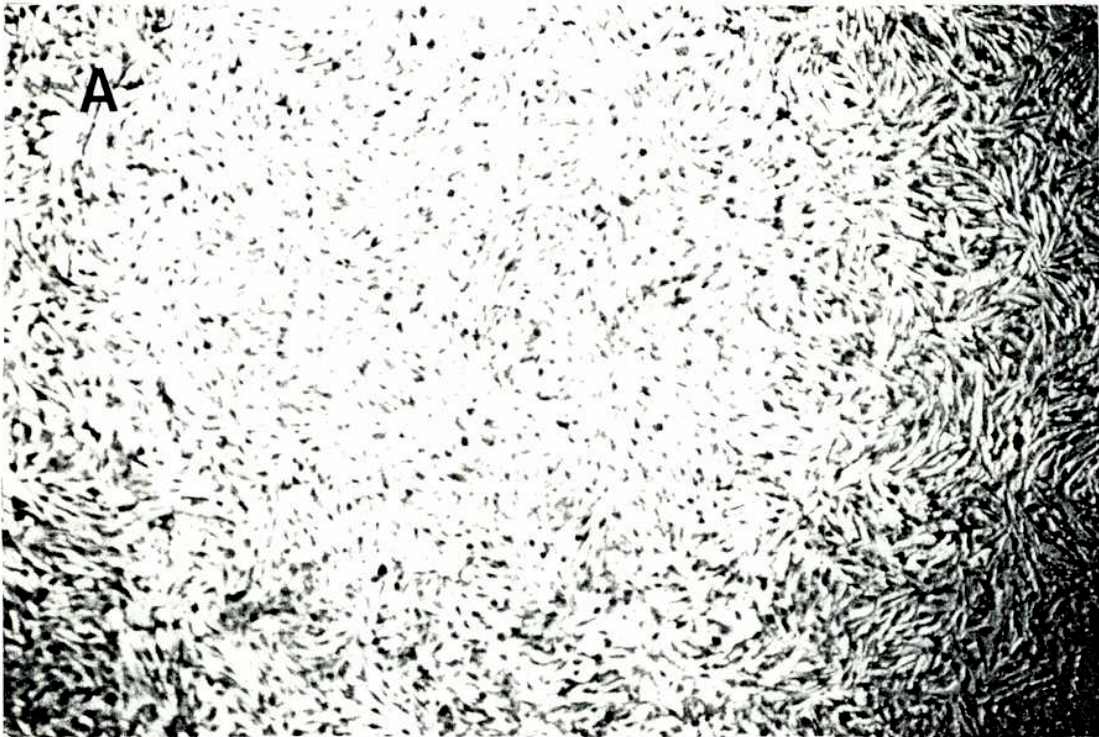
Placa	Taquizoítos	Acetazolamida ($\mu\text{g/ml}$)
1(*)	---	---
2(#)	10^3	---
3(#)	10^3	---
4(#)	10^3	---
5(^)	---	200
6(^)	---	200
7(^)	---	200
8	10^3	200
9	10^3	200
10	10^3	200

(*) Control de viabilidad del cultivo.
 (#) Control del grado de infectividad de los tq sin acetazolamida
 (^) Control del efecto de la acetazolamida sobre las células en cultivo.

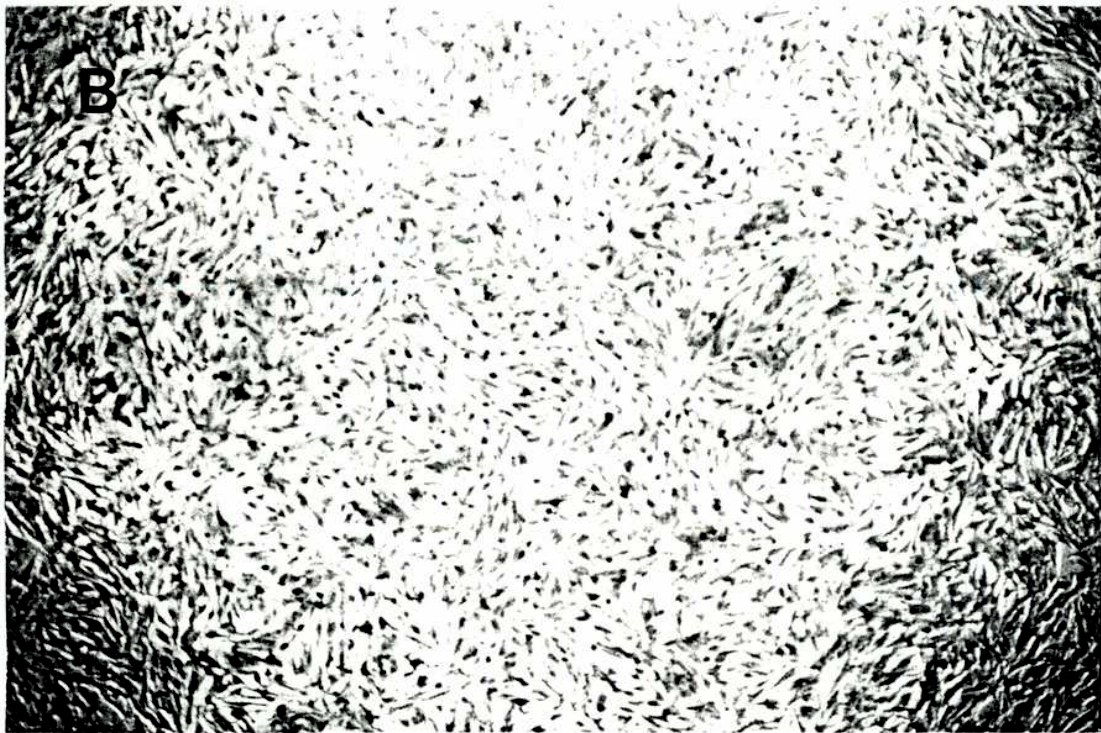
Luego de la infección en las distintas condiciones los cultivos fueron incubados a 37°C en cámara húmeda, gaseada con 5% de CO_2 - 95% de aire. Al cabo de seis días se detuvieron los cultivos. Se tñieron con Giemsa y se sometieron a observación microscópica para el conteo de las placas de lisis formadas en cada condición.

Las imágenes fotográficas de las Figs.35A y 35B muestran que no se observan diferencias en el aspecto de las células en presencia o ausencia de acetazolamida. Las placas de lisis formadas por los taquizoítos en ausencia de la droga reflejaron una tendencia a ser en general mayor de tamaño y más numerosas (Figs.35C y 35D) que las observadas cuando la infección se realizó bajo el efecto de la droga. (35E y 35F).

FIGURA 35



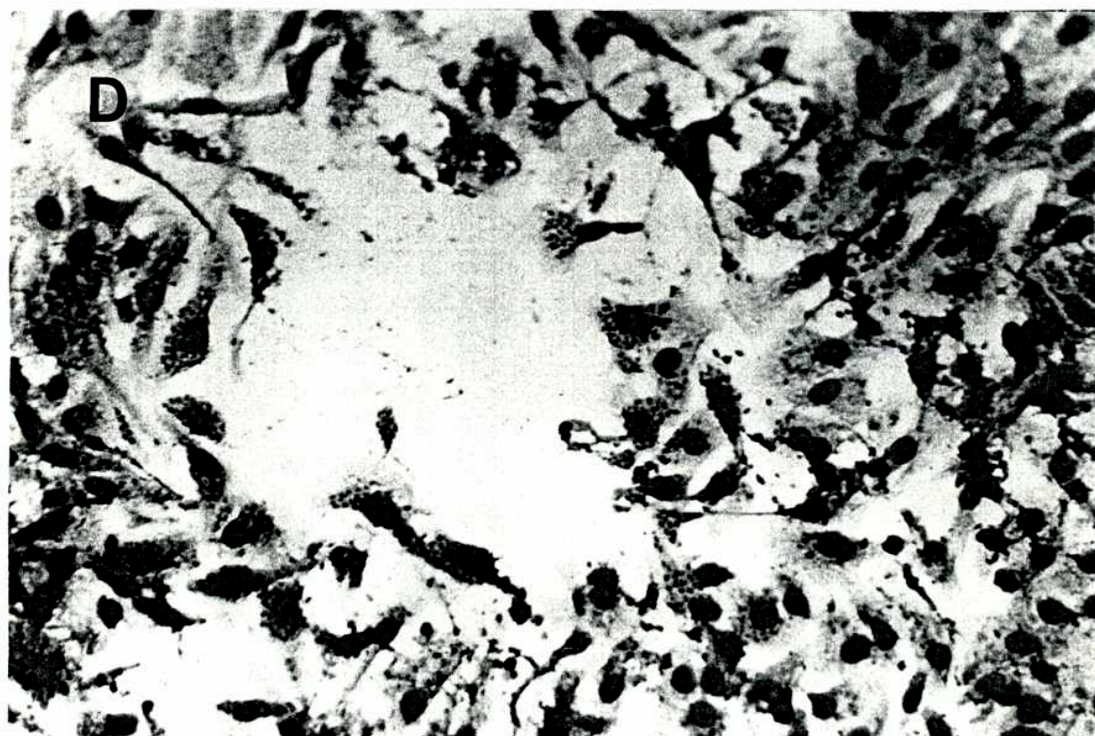
25 X



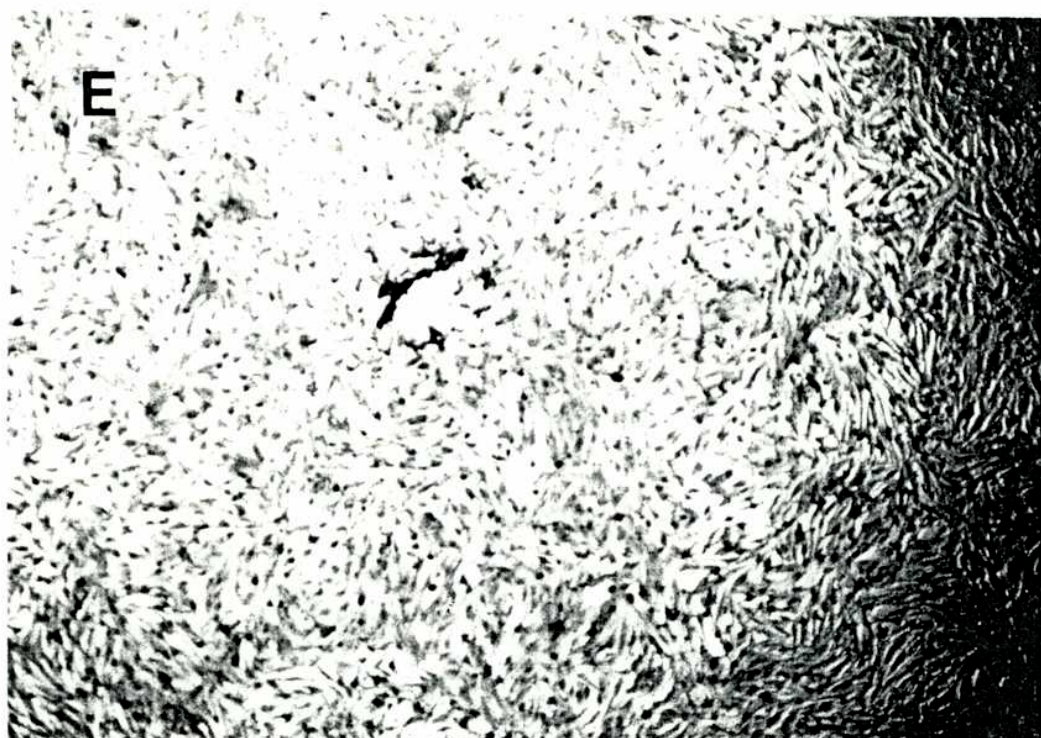
25 X



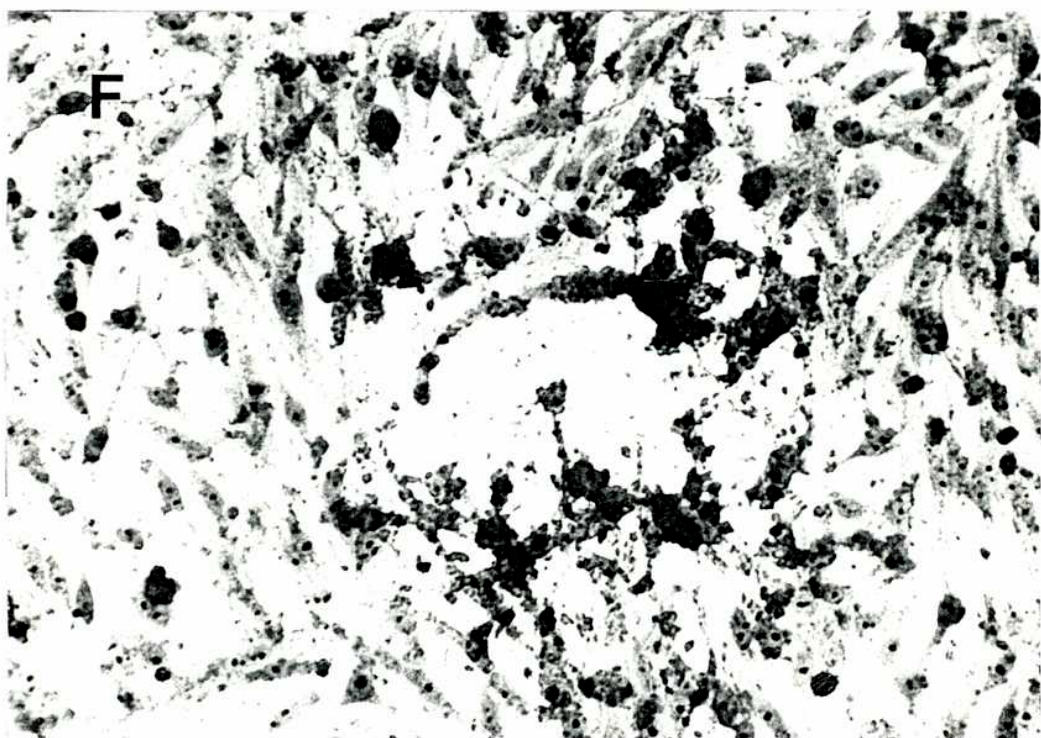
25X



100X



25X



100X

En la tabla 23 se detalla el número de placas de lisis producido en cada condición.

TABLA 29

Nro. de caja	Nro. de placas de lisis	Promedio
2	36	39 ± 2.94
3	38	
4	43	
8	23	24 ± 2.62
9	22	
10	28	

Estos resultados indican que, en las condiciones en que se realizó el experimento, el número de placas de lisis formadas cuando la infección se realizó en presencia del fármaco, se redujo en un 38% respecto de los controles (infección sin acetazolamida). infectiva de los parásitos que se hallaban en presencia del fármaco.

6.2.2. Efecto de la acetazolamida sobre la capacidad infectiva de taquizoítos de *T.gondii* in vivo.

Para comenzar a estudiar el efecto de esta droga sobre el proceso infectivo de *T.gondii* in vivo se trabajó con cinco lotes de ratones CF-1 en número de tres ratones por lote.

Los animales fueron sometidos al siguiente tratamiento:

Lote 1: No tratados

Lote 2: Inoculados en forma intraperitoneal con dosis diarias de 400 μ g de acetazolamida.

Lote 3: Inoculados con una única dosis intraperitoneal (administrada el día 1) de 2×10^6 tq.

Lote 4: Inoculados con una única dosis intraperitoneal (administrada el día 1) de 2×10^6 tq y dosis diarias intraperitoneales (a partir del día 1) de 400 μ g de acetazolamida).

Lote 5: Inoculados con una única dosis intraperitoneal (administrada el día 1) de 2×10^6 tq y dosis diarias intraperitoneales (a partir del día 2) de 400 μ g de acetazolamida).

Los animales fueron sacrificados al cuarto día y órganos tales como bazo e hígado fueron procesados en secciones histológicas para microscopía óptica y sometidos a coloración con hematoxilina-eosina y giemsa.

El análisis histopatológico de los cortes de hígado (Fig. 36) y bazo (Fig. 37) de cada lote se describe a continuación:

CORTES DE HIGADO (FIGURA 36)

TINCION: HEMTOXILINA-EOSINA.

- A = LOTE 1 - Parénquima hepático normal. (100 X).
- B = LOTE 2 - Parénquima hepático normal. (100 X).
- C = LOTE 3 - Foco de micronecrosis extensa que altera trabéculas hepatocitarias con infiltrado leucocitario polimorfonuclear. Aumento en la cantidad de células de Kuffer. Presencia de detritus celulares. (100 X).
- D = LOTE 4 - Pequeña lesión de muy escasa micronecrosis con aislados leucocitos polimorfonucleares. Aumento en la cantidad de células de Kuffer. Escasos detritus celulares. (100X).
- E = LOTE 5 - Moderado foco de micronecrosis con presencia de detritus celulares. Moderada cantidad de leucocitos polimorfonucleares y aumento en la cantidad de células de kuffer. (100X).

TINCION: GIEMSA

- F = LOTE 3 - Presencia de tres focos lesionales de las mismas características descriptas anteriormente para el mismo lote. (Foto C; hematoxilina eosina). (100X).
- G = LOTE 3 - Visualización de uno de los focos lesionales de la foto F, a mayor aumento. Las flechas indican la presencia de taquizoítos. (400 X).
- H = LOTE 4 - Pequeña lesión de escasa micronecrosis de iguales características a las descriptas anteriormente. (Foto D; hematoxilina-eosina). (100 X).
- I = LOTE 5 - Moderado foco de micronecrosis de iguales

características a las descriptas anteriormente.
(Foto E; Hematoxilina-eosina).(100 X).

CORTES DE BAZO: (FIGURA 37).

TINCION: HEMATOXILINA-EOSINA

- A ■ LOTE 1** - Parénquima esplénico de características normales. (100X)
- B ■ LOTE 2** - Parénquima esplénico de características normales. (200X).
- C ■ LOTE 3** - Foco lesional de micronecrosis con detritus celulares y presencia de macrófagos y leucocitos polimorfonucleares. (100X).
- D ■ LOTE 4** - No se observan focos de micronecrosis. Sólo presencia aumentada de células macrofágicas y proliferación linfocitaria. (300X).
- E ■ LOTE 5** - No se observan focos de micronecrosis. Las flechas indican tres células macrofágicas cargadas de parásitos. (400X).

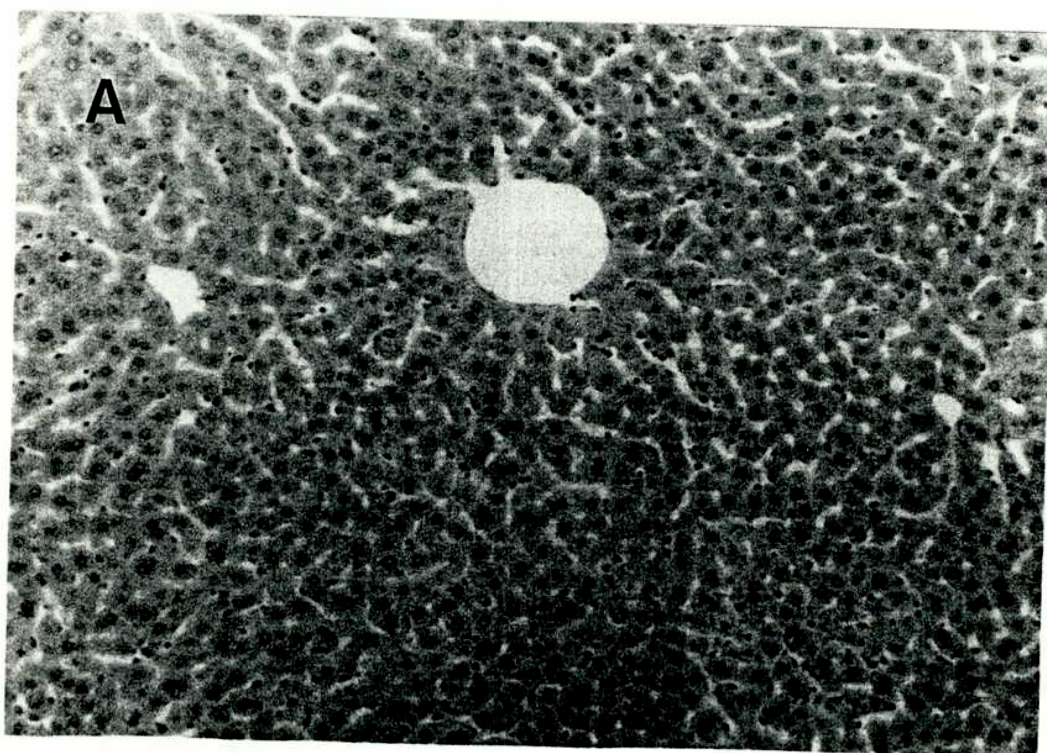
TINCION: GIEMSA

- F ■ LOTE 3** - Múltiples células macrofágicas cargadas de parásitos. Con difuso aumento en la cantidad de células linfocitarias y macrofágicas. (300X).
- G ■ LOTE 4** - Una célula macrofágica cargada de parásitos con aumento de la cantidad de células macrofágicas y linfocitarias en forma focal. (400X).
- H ■ LOTE 5** - Varias células macrofágicas cargadas de parásitos. (400X).
- I ■ LOTE 3** - Gran cantidad de parásitos dentro de células macrofágicas y libres. (1000X).
- J ■ LOTE 4** - Una célula macrofágica cargada de parásitos. (1000X).

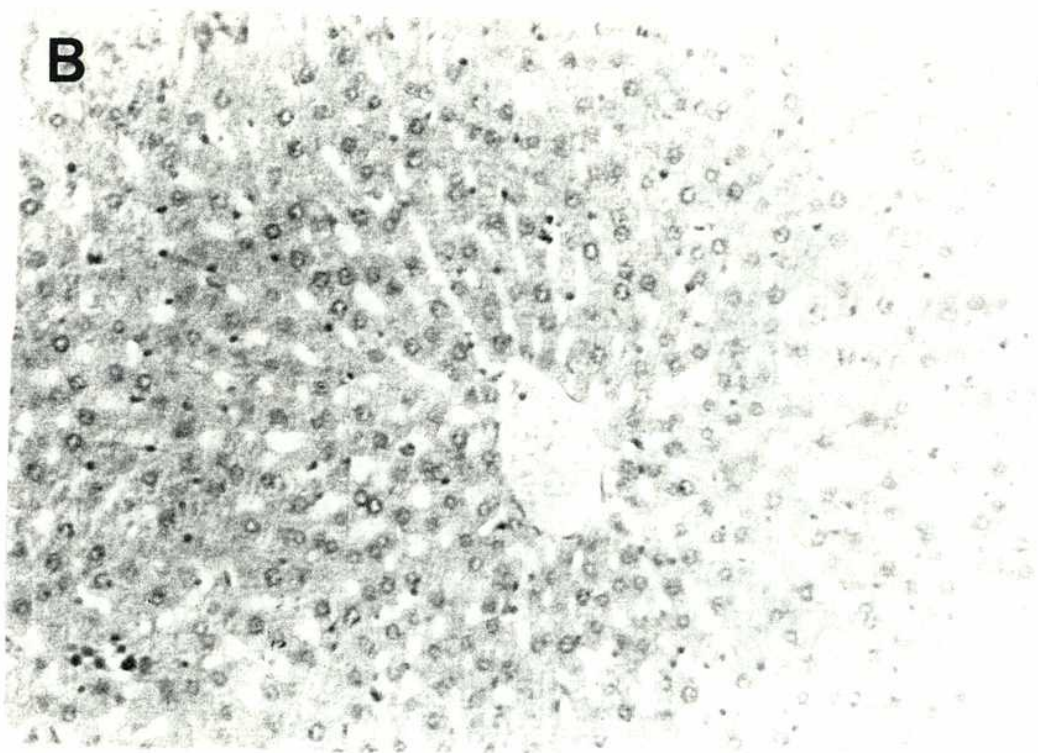
K - LOTE 5 - Algunas células macrofágicas cargadas de parásitos y algunos parásitos libres.

FIGURA 36

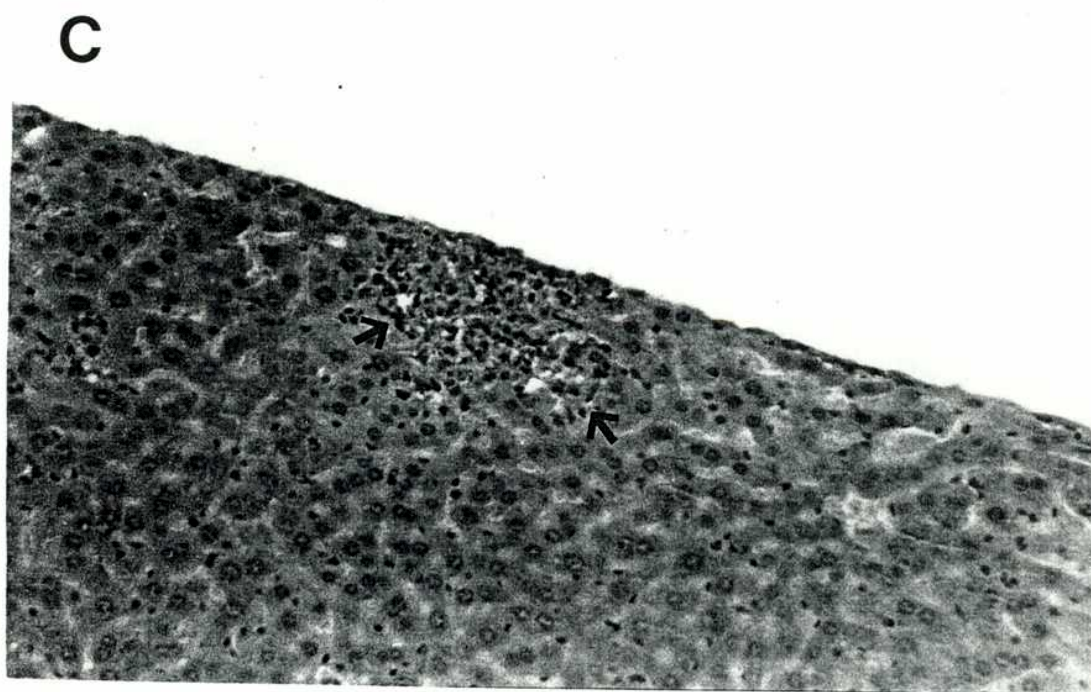
CORTES DE HIGADO



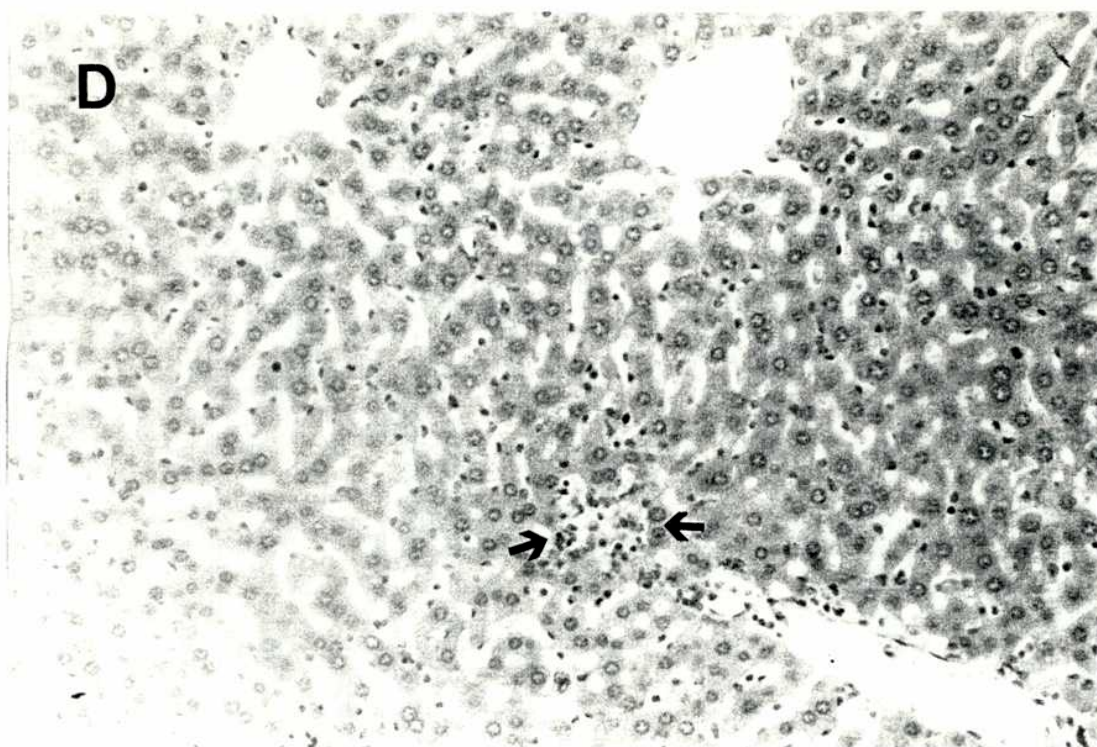
100X



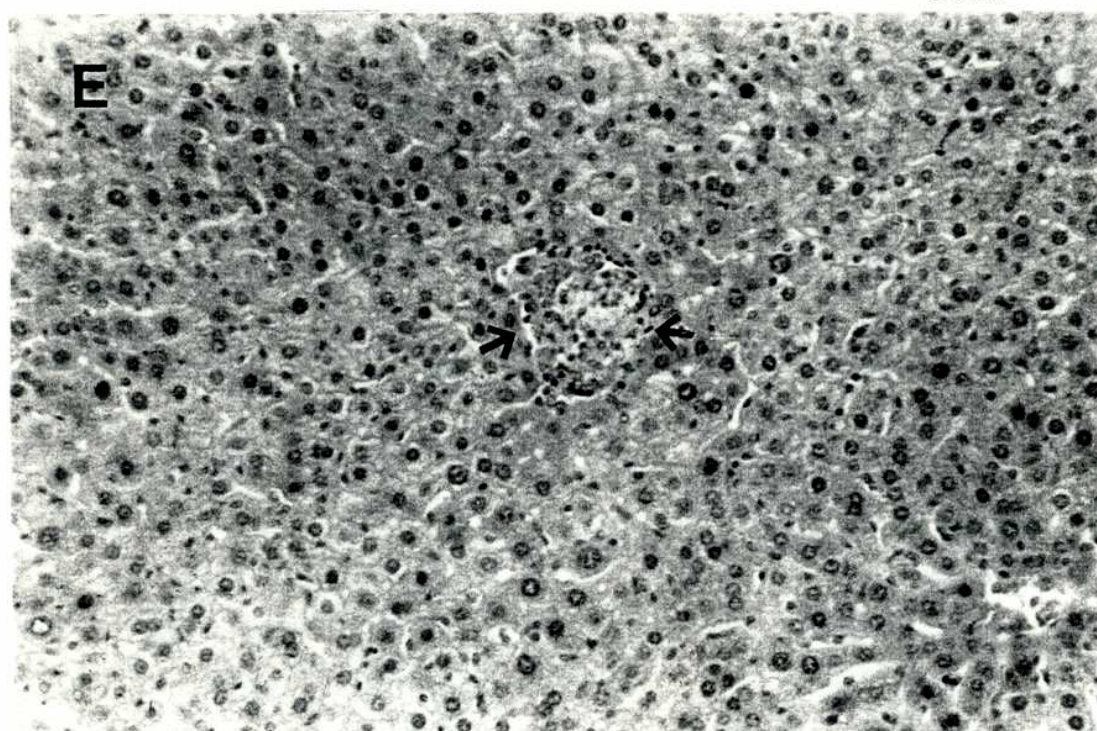
100X



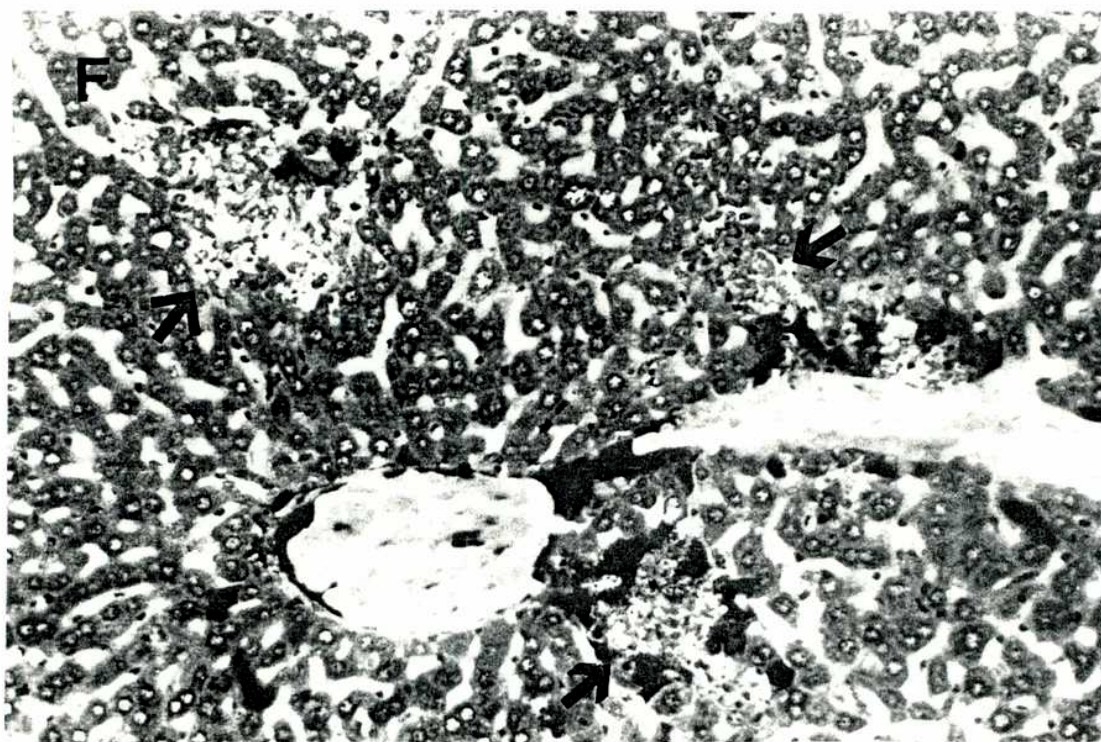
100X



100X



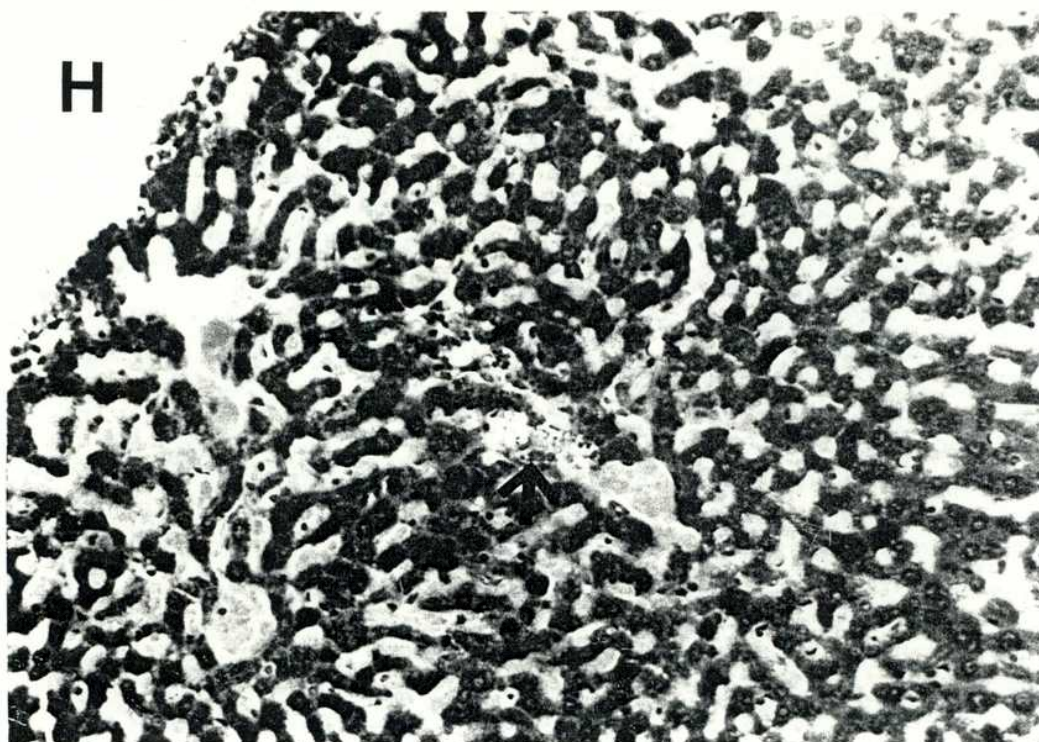
100X



100X



400X

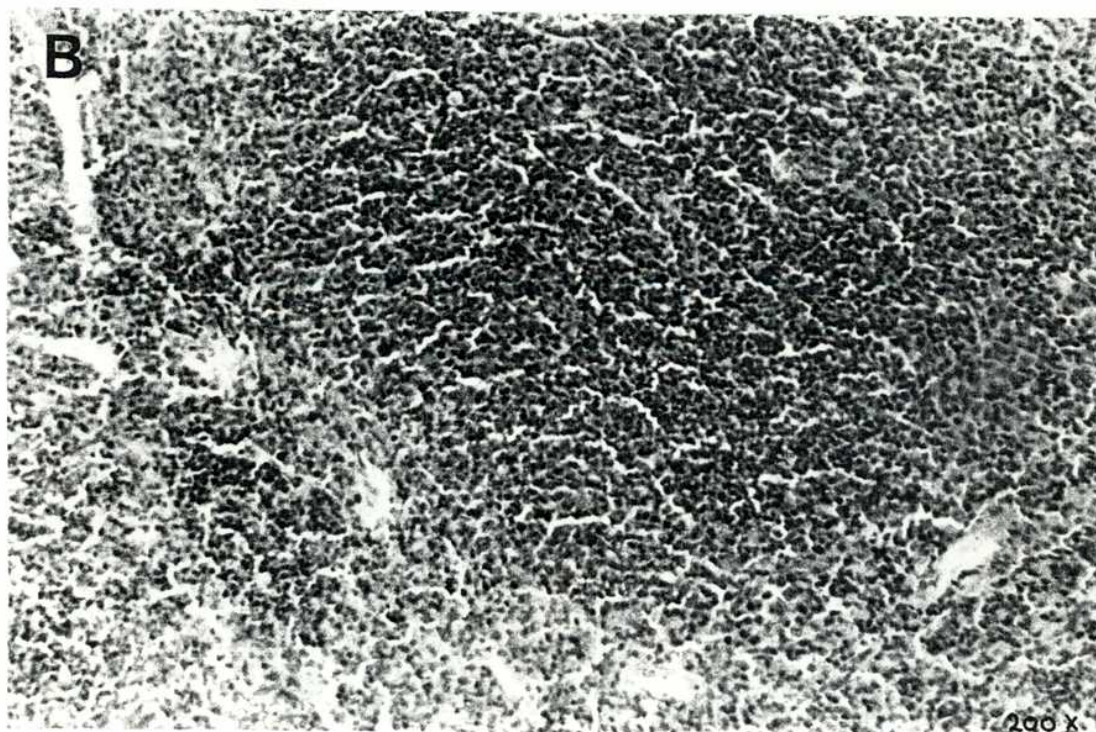
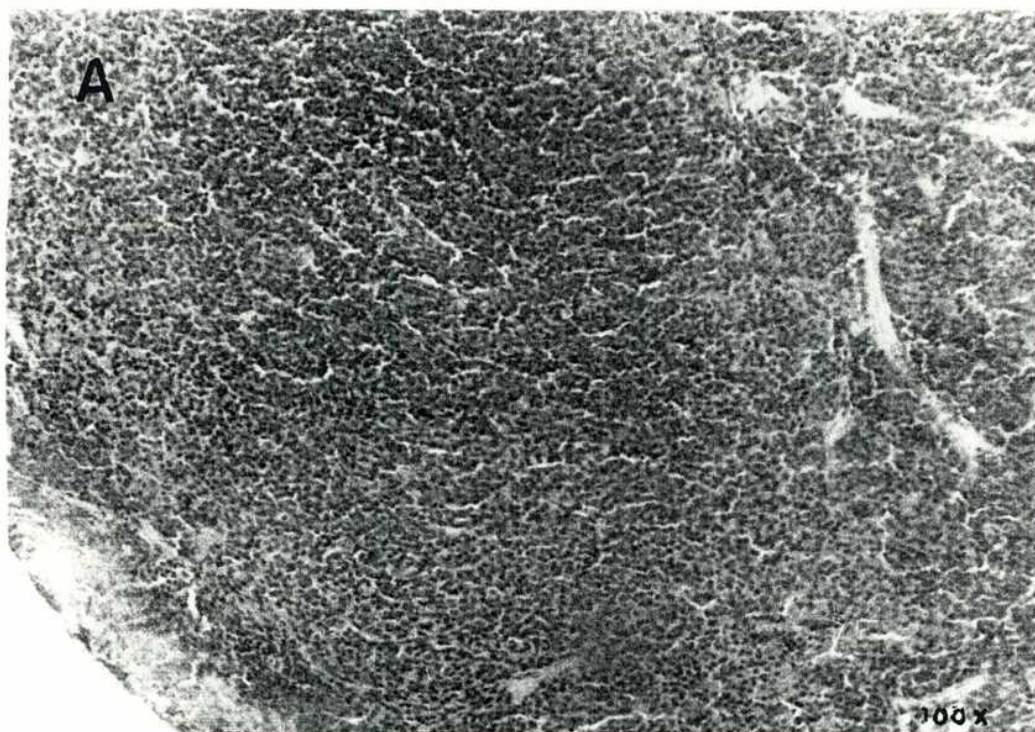


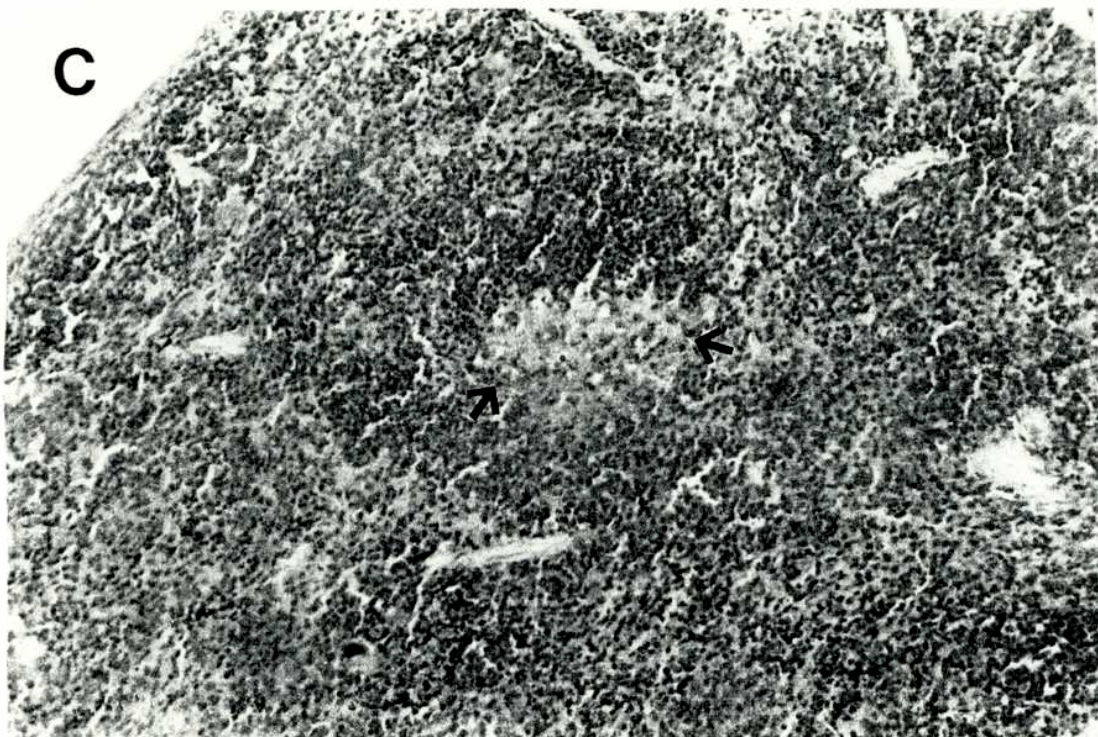
100X



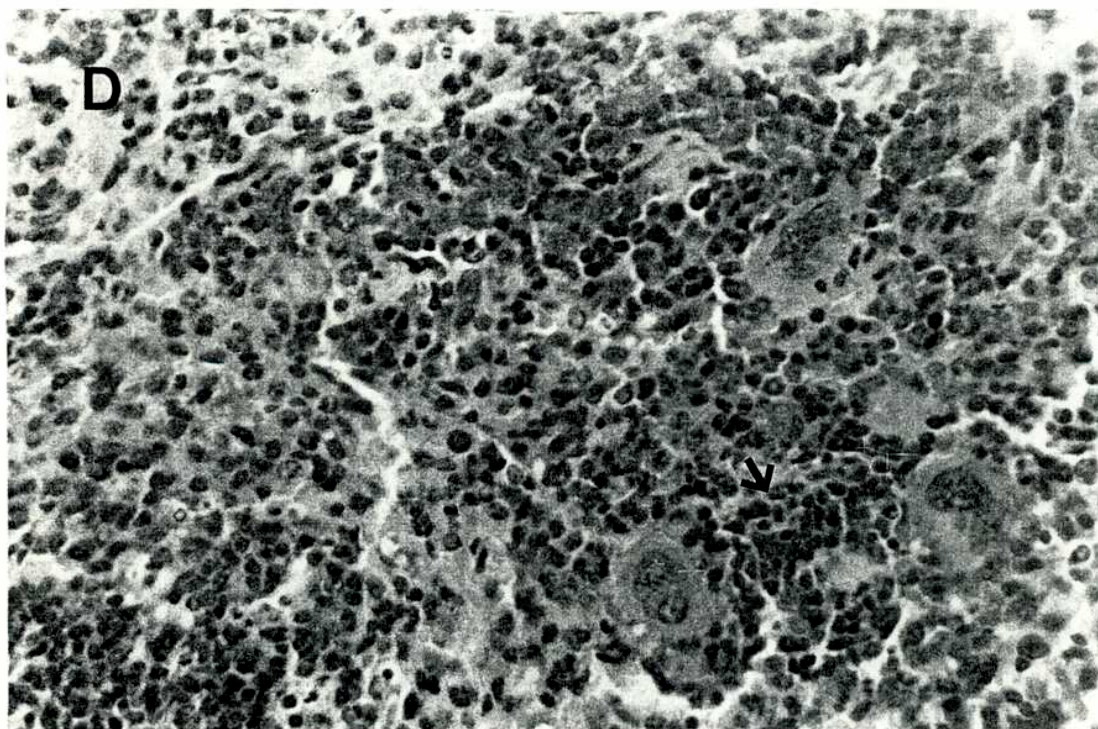
100X

FIGURA 37
CORTES DE BAZO

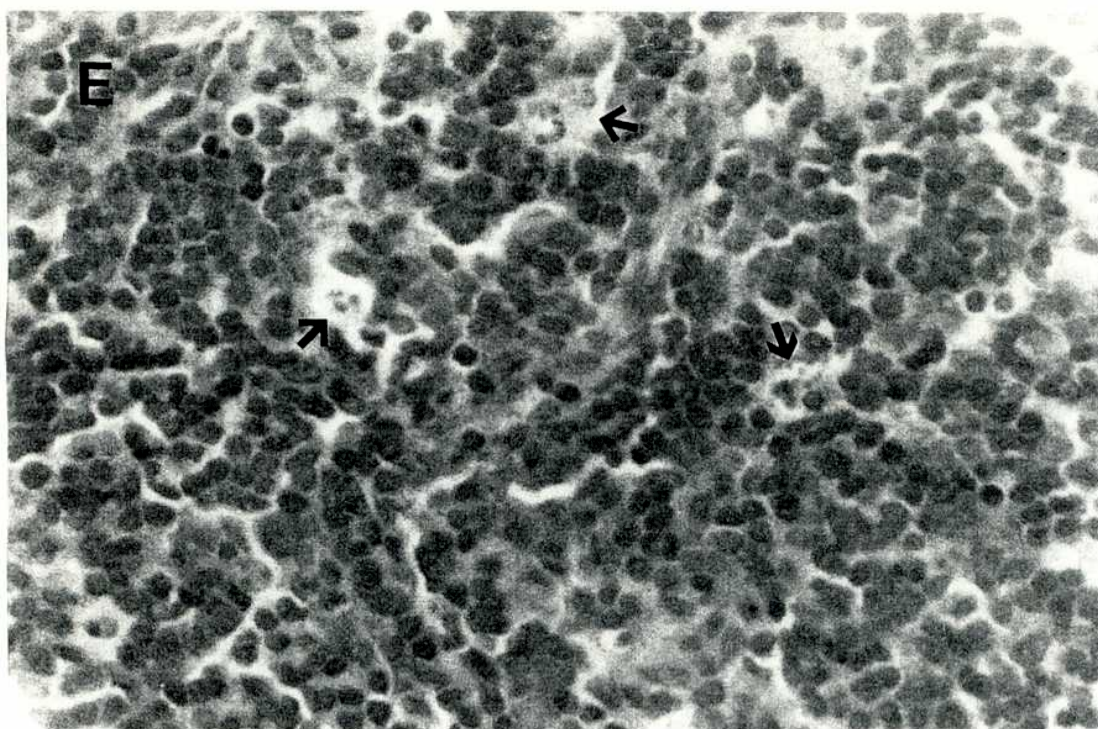




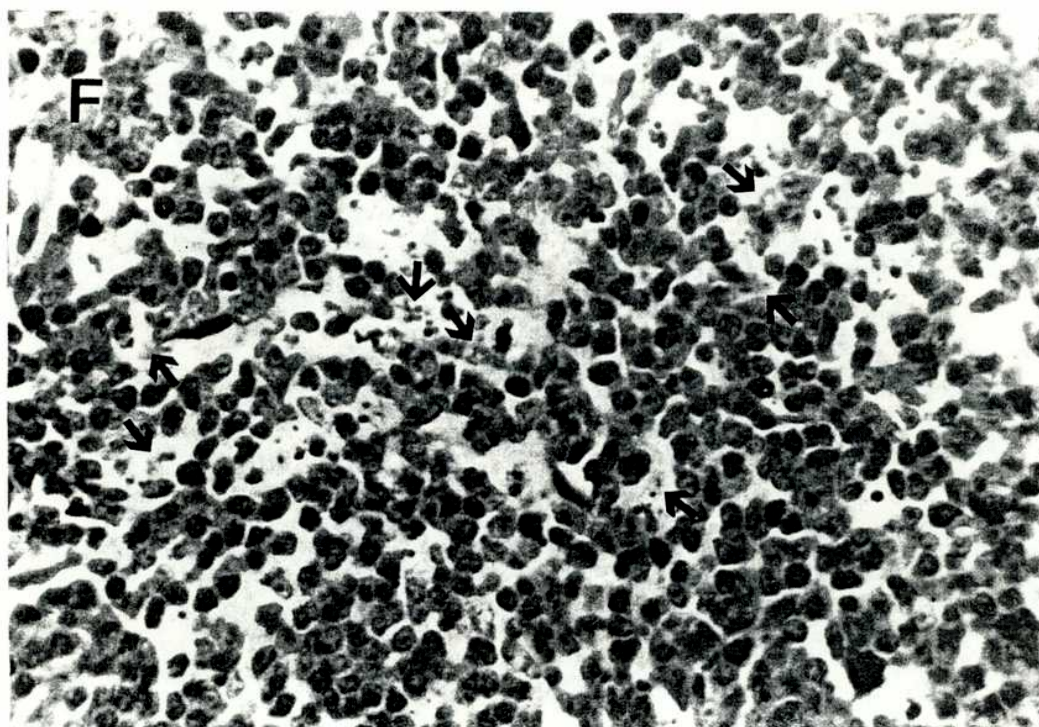
100X



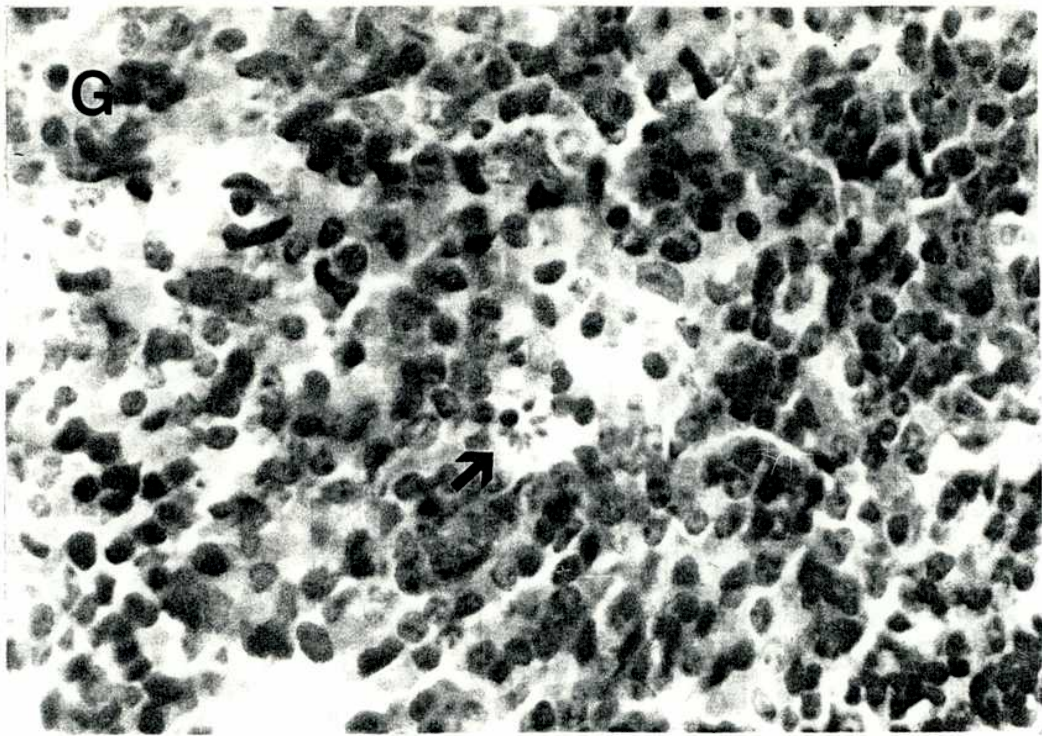
300X



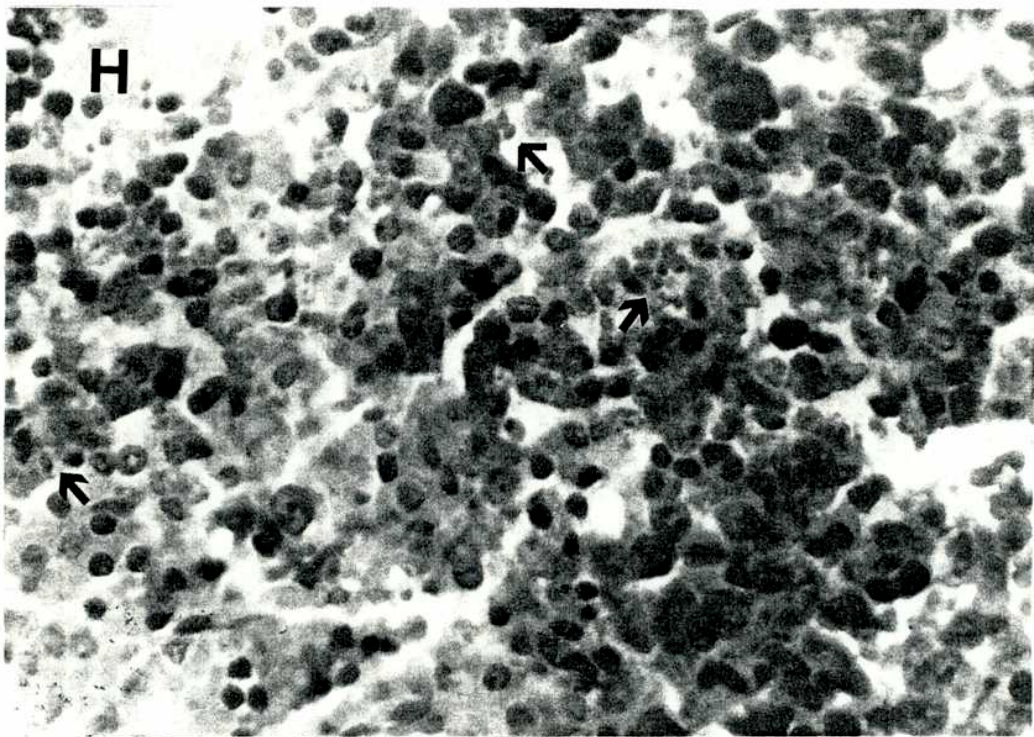
400X



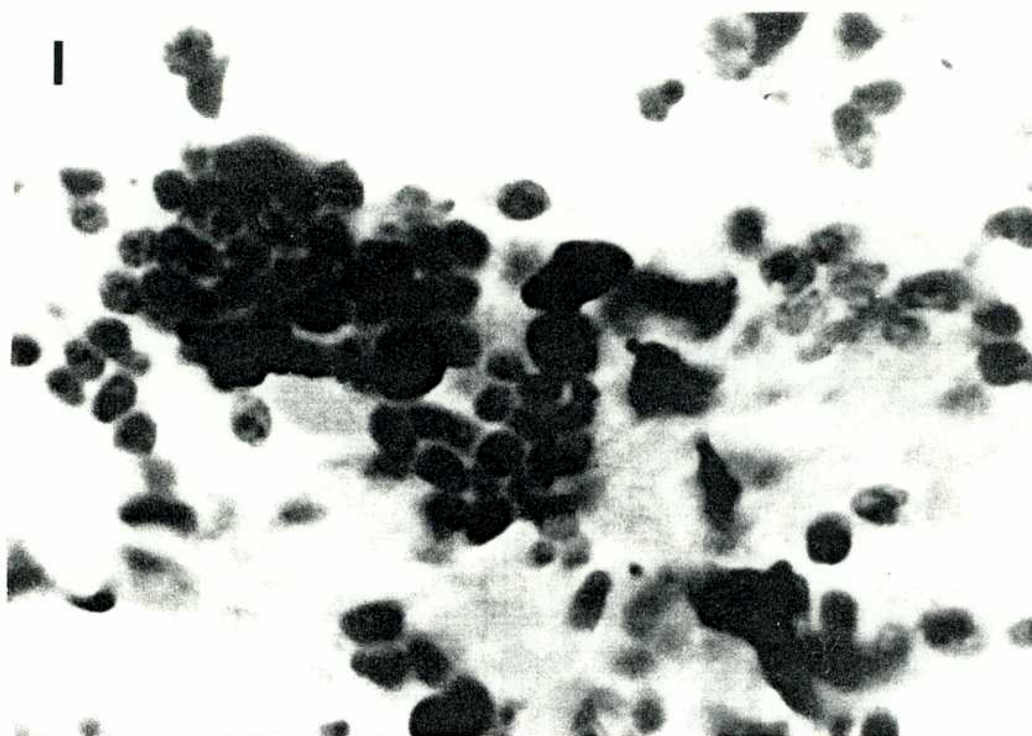
300X



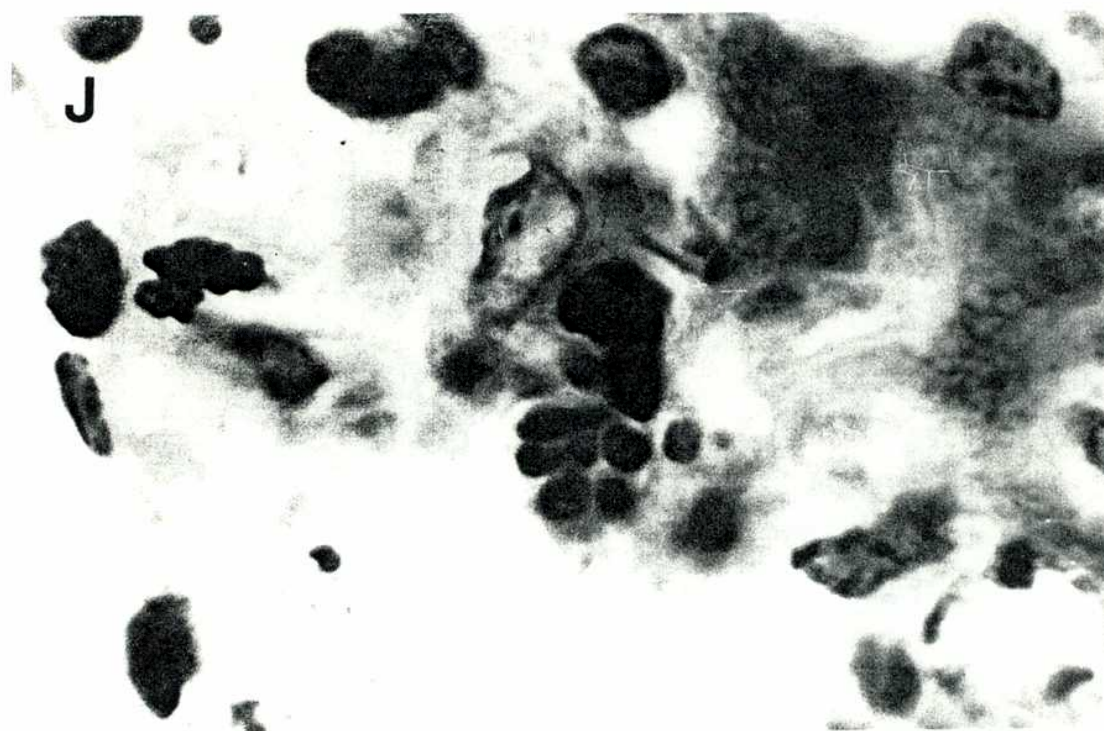
400X



400X



1000X



1000X



1000X

Como se deduce de estos resultados la acetazolamida reduce en forma significativa el grado de infectividad de los taquizoítos, como pudo visualizarse a través del menor número de células macrofágicas cargadas de parásitos y focos lesionales de micronecrosis de menor extensión observados en aquellos lotes de ratones tratados con el fármaco.

6.3. EFECTO DE Tg5 SOBRE LA CAPACIDAD INFECTIVA DE TAQUIZOITOS DE *T.gondii*.

6.3.1. Experimentos de infección in vitro.

Para estudiar este efecto se realizó un experimento utilizando la metodología de formación de placas de lisis en monocapas de células VERO, descripta previamente. Las células fueron infectadas con taquizoítos preincubados en presencia o ausencia del AcMc Tg5.

Para ello se sembraron 18 cajas de Petri de 35 mm con 5×10^5 cel VERO por caja, de manera de obtener monocapas confluentes. Cuando las células estuvieron adheridas, se descartó el medio de cultivo, se lavaron con PBS, pH 7.4 y se infectaron de acuerdo al siguiente esquema:

- Cajas 1, 2 y 3: 5×10^5 cél. VERO + 3 ml de medio fresco*.
- Cajas 4, 5 y 6: 5×10^5 cél. VERO + 3 ml de medio fresco* + 10^3 tq.
- Cajas 7, 8 y 9: 5×10^5 cél. VERO + 3 ml del AcMc Tg5 (diluído 1:100)[#].
- Cajas 10, 11 y 12: 5×10^5 cél. VERO + 3 ml del AcMc Tg5 (diluído 1:100)[#] + 10^3 tq.
- Cajas 13, 14 y 15: 5×10^5 cél. VERO + 3 ml del AcMc no relacionado (diluído 1:100)^{##}.

Cajas 16, 17 y 18: 5×10^5 cél. VERO + 3 ml del AcMc no relacionado (diluido 1:100)^{##} + 10^3 tq.

* : Medio RPMI suplementado con SFB 2%.

: Fluído ascítico del AcMc Tg5 (1:100) en medio fresco.

##: " " del AcMc no relacionado (1:100) en medio fresco.

Luego de la infección en las distintas condiciones, los cultivos fueron incubados a 37°C en cámara húmeda, gaseada con 5% de CO₂ - 95% de aire. Al cabo de 4 días se detuvieron los cultivos, se tiñeron con Giemsa y se sometieron a observación microscópica para el conteo de placas de lisis formadas en cada condición, obteniéndose los resultados indicados en la Tabla 24. El aumento del número de placas de lisis formadas en presencia de Tg5 fue del 82% con respecto al control (sin anticuerpo monoclonal) y del 100% con respecto al control con el anticuerpo monoclonal no relacionado.

En la figura 38 se muestra un registro fotográfico, realizado a través del microscopio óptico tomando distintos campos, de las cajas Nro. 1, 4, 10, y 16. En la imágenes de la cajas 1 (Fig.38A) se puede observar el aspecto de la monocapa de células sin infectar. Las imágenes de la cajas 4 y 16 muestran el aspecto que presentan las placas de lisis cuando se infectan con taquizoítos solos (caja 4; Figs. 38B y 38C) o preincubados con un AcMc no relacionado (caja 16; Figs. 38D y 38E). Es bien notorio el aumento en número y diámetro promedio que presentan las placas de lisis de la caja 10 (Figs. 38F y 38G), en donde los taquizoítos utilizados fueron preincubados con el anticuerpo monoclonal Tg5. Los controles con el anticuerpo momoclonal no relacionado y Tg5 solos no presentamos diferencias con respecto a la caja 1 (no mostrado).

TABLA 24

Nro. de caja

Nro. de placas
de lisis.

Promedio

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

10

22

17

36

20

21

15

18

20

$10,9 \pm 2.05$

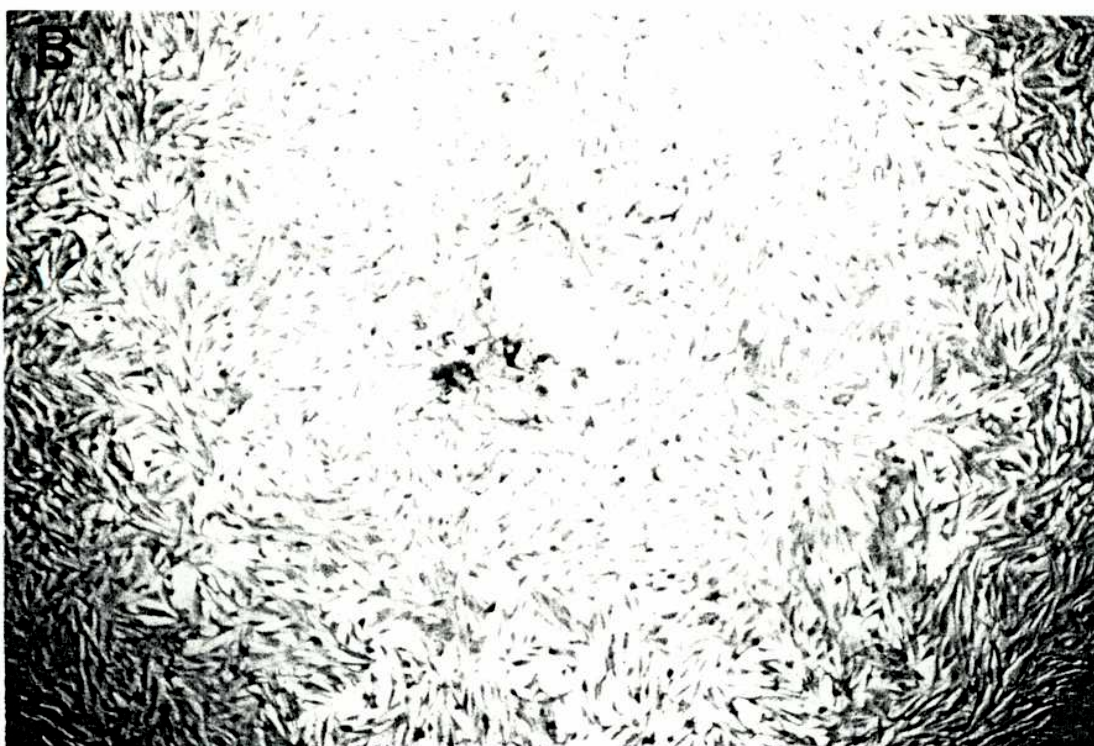
$25,9 \pm 3.2$

17.6 ± 2.05

FIGURA 38



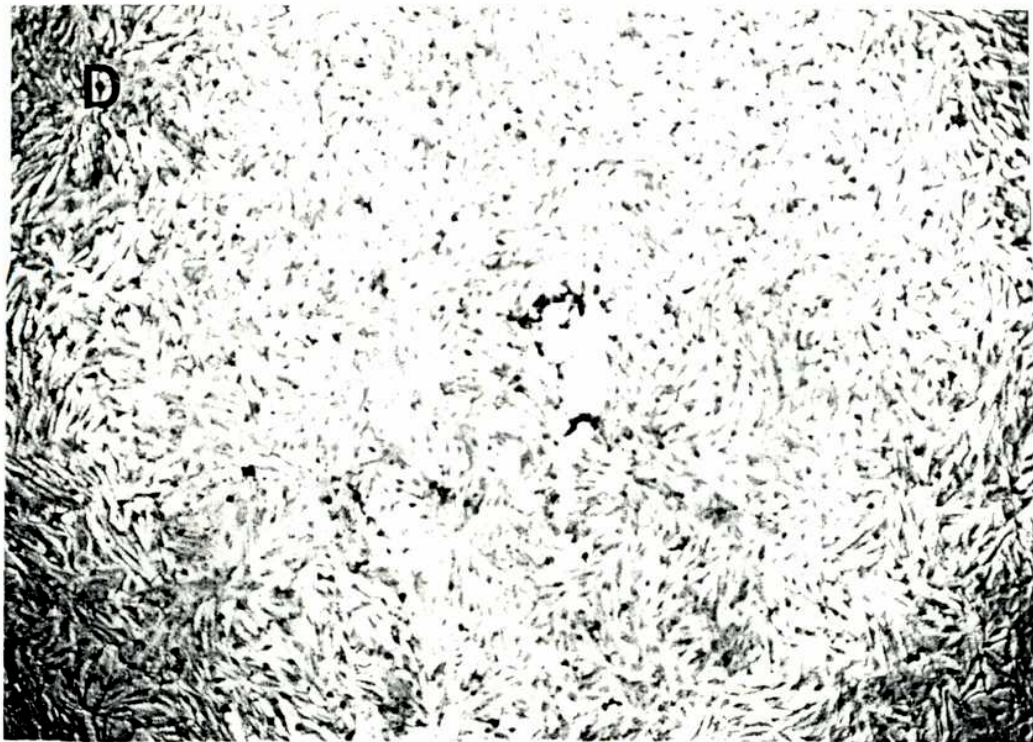
25X



25X



100X



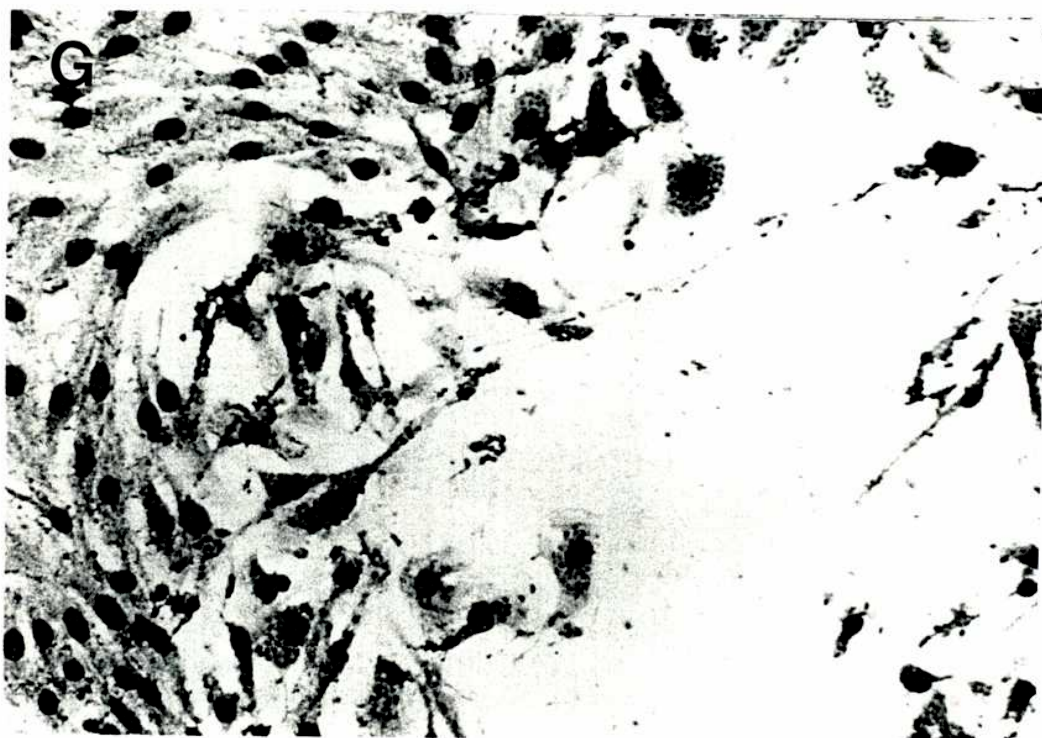
25X



100X



25X



100X

6.3.2. Acción del anticuerpo monoclonal Tg5 sobre la capacidad infectiva de *T.gondii* in vivo.

Con el objeto de estudiar el efecto del AcMc Tg5 sobre el grado de infectividad de taquizoítos de *T.gondii* in vivo, se realizó un experimento utilizando ratones de tres meses de edad, de la cepa CF-1. Estos ratones, al ser inoculados con una dosis intraperitoneal de 2×10^6 taquizoítos, mueren normalmente al cuarto día. Se trabajó con cinco lotes de tres ratones cada uno, los cuales fueron tratados del siguiente modo:

Lote 1: No tratados

Lote 2: Inoculados en forma intraperitoneal con dosis diarias del AcMc Tg5. (*).

Lote 3: Inoculados con una única dosis intraperitoneal (administrada el día 1) de 2×10^6 tq. (#)

Lote 4: Inoculados con una única dosis intraperitoneal (#) (administrada el día 1) de 2×10^6 tq y dosis diarias intraperitoneales (a partir del día 1) del AcMc Tg5. (*).

Lote 5: Inoculados con una única dosis intraperitoneal (#) (administrada el día 1) de 2×10^6 tq y dosis diarias intraperitoneales (a partir del día 2) del AcMc Tg5. (*).

(*) La dosis utilizada fue de 0.2 ml de una dilución 1/20 en PBS, pH 7.4, de fluido ascítico del AcMc Tg5.

(#) La dosis utilizada fue de 2×10^6 taquizoítos por ratón, en 0.2 ml de PBS, pH 7.4.

Los animales fueron sacrificados a los tres días de inoculación en lugar de cuatro, debido a que el lote 4 (ratones infectados conjuntamente con el AcMc Tg5), presentaba un cuadro de infección más severo que lo habitual. Organos tales como bazo e hígado fueron procesados en secciones histológicas para microscopía óptica y sometidos a técnicas de tinción con Hematoxilina-Eosina y Giemsa.

El análisis histopatológico de los cortes de hígado (Fig. 39) y bazo (Fig. 40) en cada uno de los lotes se describe a continuación:

CORTES DE HIGADO (FIGURA 39)

TINCION: HEMATOXILINA-EOSINA

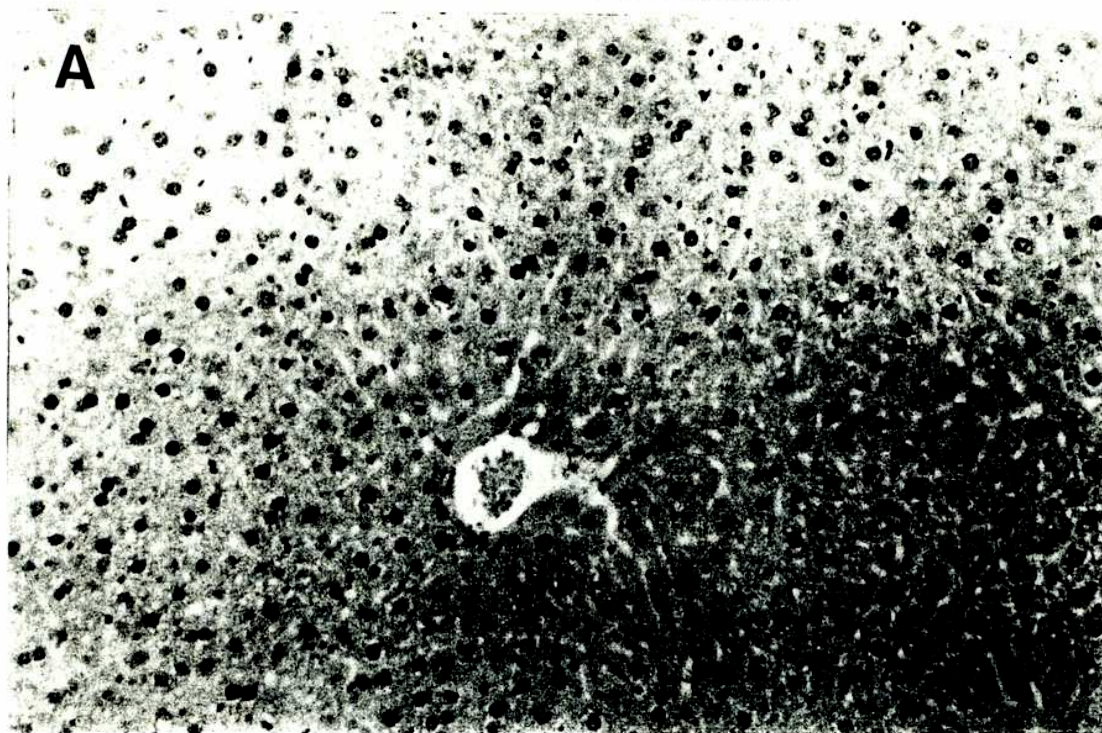
- A ■ LOTE 1** - Parénquima hepático normal. (100X).
- B ■ LOTE 2** - Parénquima hepático normal. (100X).
- C ■ LOTE 3** - Múltiples pequeños focos de micronecrosis. (100X).
- D ■ LOTE 3** - Visualización de uno de los focos lesionales de micronecrosis de la foto D, a mayor aumento. (400X).
- E ■ LOTE 4** - Presencia de focos lesionales de micronecrosis de gran extensión, con detritus celulares. (200X).
- F ■ LOTE 4** - Visualización de dos focos de necrosis como los descritos en foto E, a mayor aumento. (400X).
- G ■ LOTE 5** - Presencia de dos focos de micronecrosis de moderada extensión. (200X).
- H ■ LOTE 5** - Visualización de uno de los focos de la foto anterior a mayor aumento. (400X).

CORTES DE BAZO (FIGURA 40)

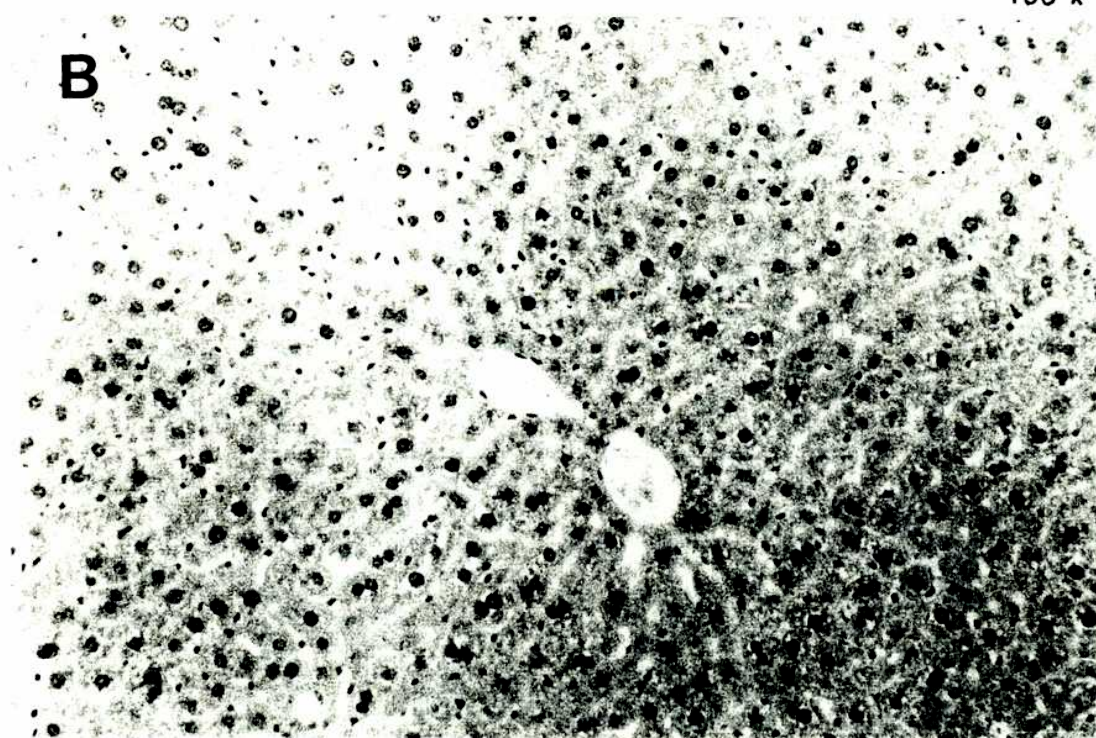
TINCION: HEMATOXILINA-EOSINA

- A = LOTE 1** - Tejido esplénico normal. (100X).
- B = LOTE 2** - Tejido esplénico normal. (100X).
- C = LOTE 3** - Dos focos moderados de micronecrosis. (100X).
- D = LOTE 3** - Visualización de los focos de micronecrosis de la foto anterior a mayor aumento. Las flechas indican células macrofágicas cargadas de parásitos en medio del foco lesional. (300X).
- E = LOTE 4** - Múltiples extensos focos de micronecrosis. (100X).
- F = LOTE 4** - Visualización a mayor aumento de la misma lesión. (300X).
- G = LOTE 5** - Presencia de focos de micronecrosis de moderada extensión. (100X).
- H = LOTE 5** - Visualización a mayor aumento de uno de los focos de la foto anterior. Las flechas indican presencia de parásitos en medio de un foco lesional moderado. (300X).

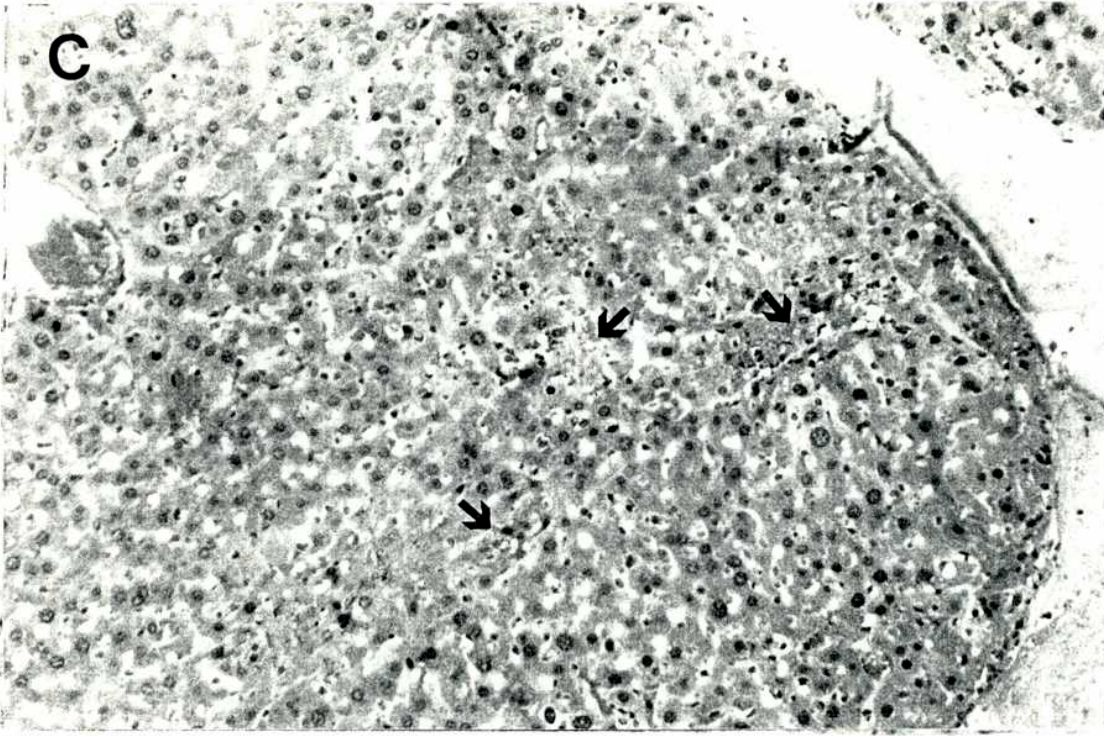
FIGURA 39
CORTES DE HIGADO



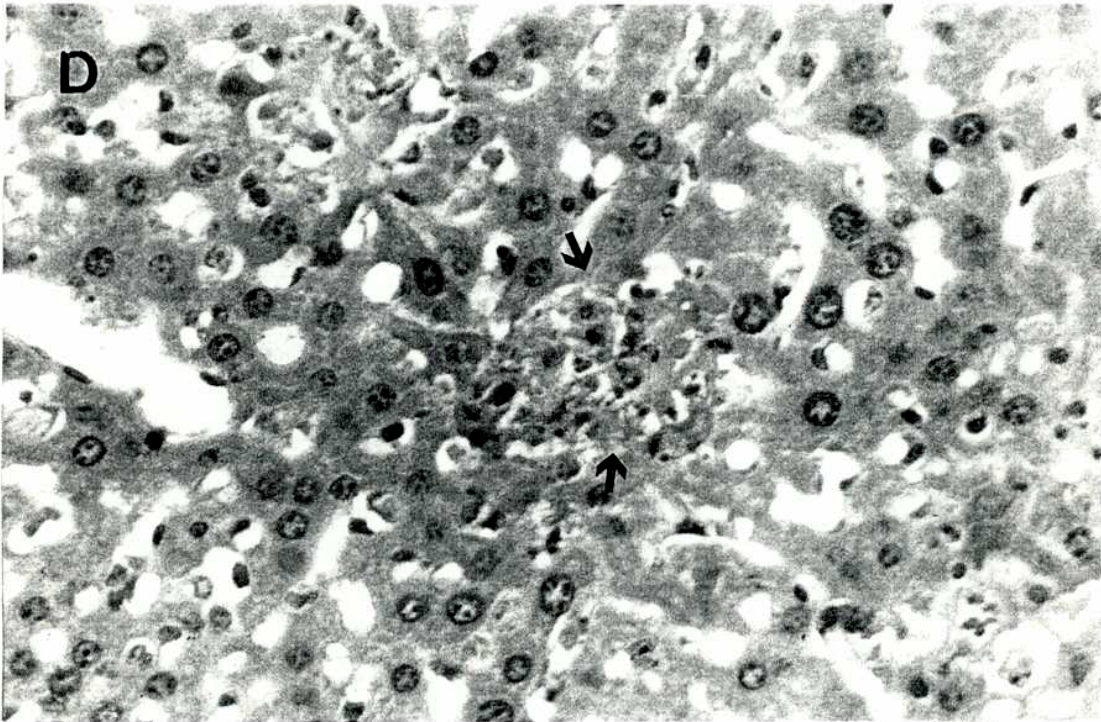
100 x



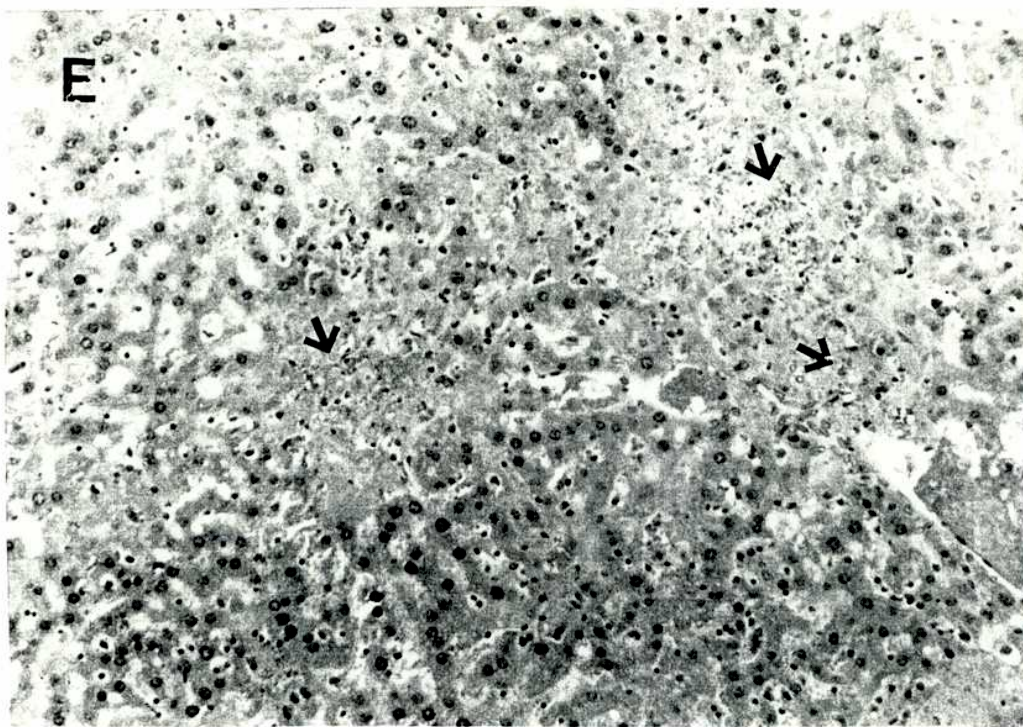
100 x



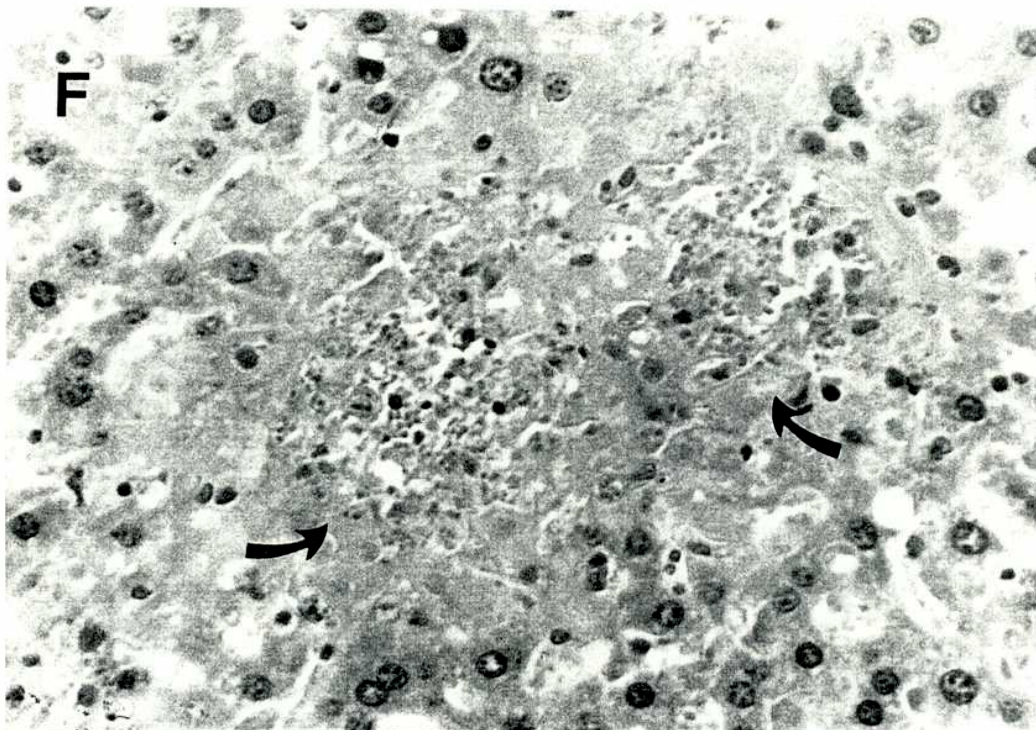
100X



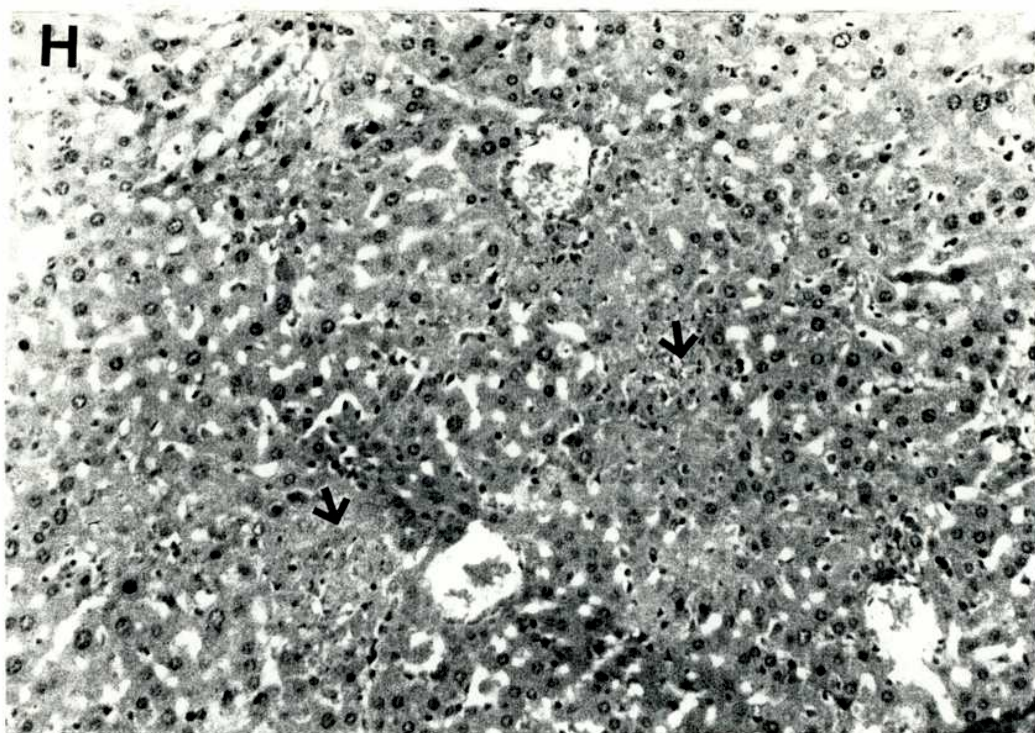
400X



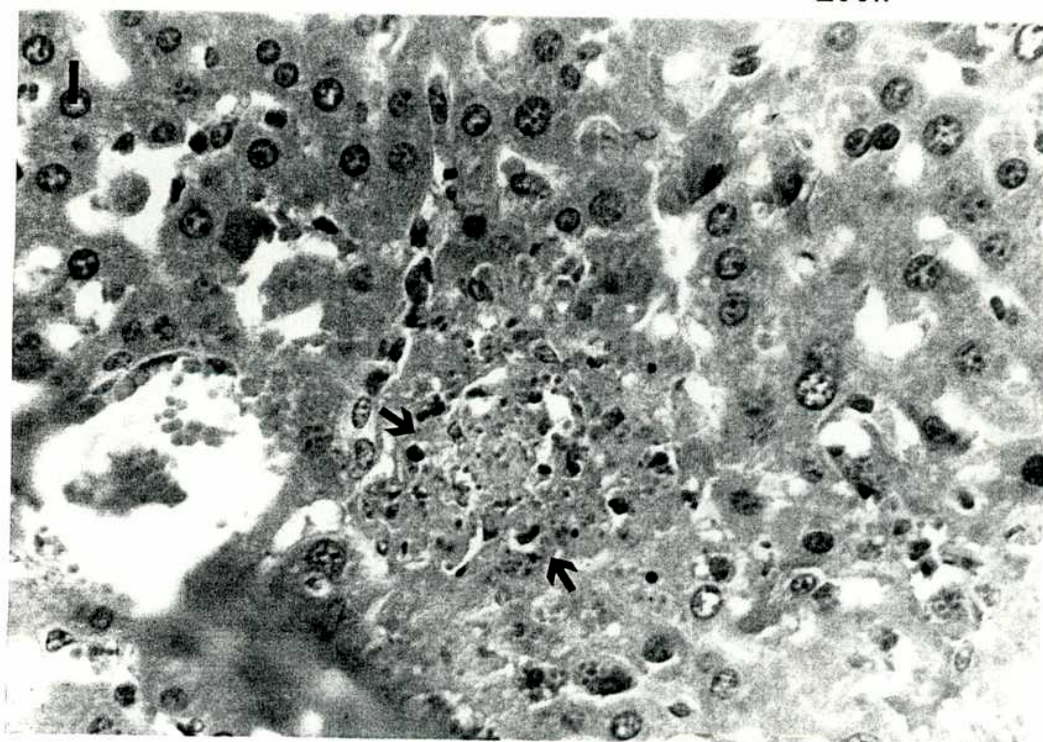
200X



400X

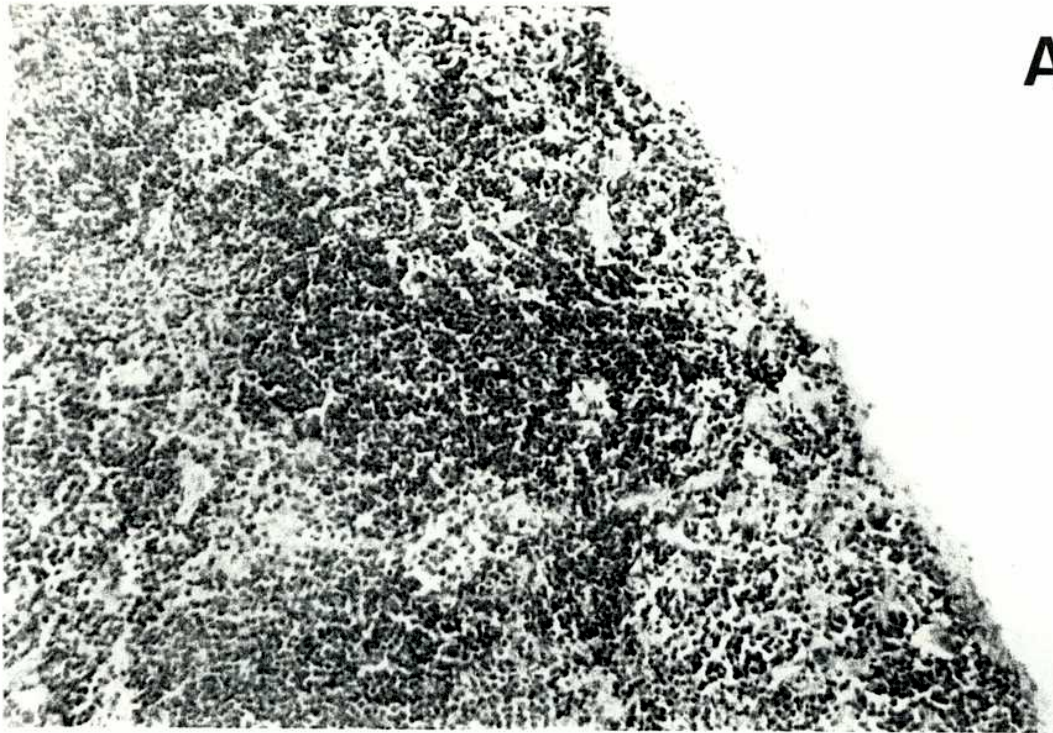


200X



400X

FIGURA 40
CORTES DE BAZO



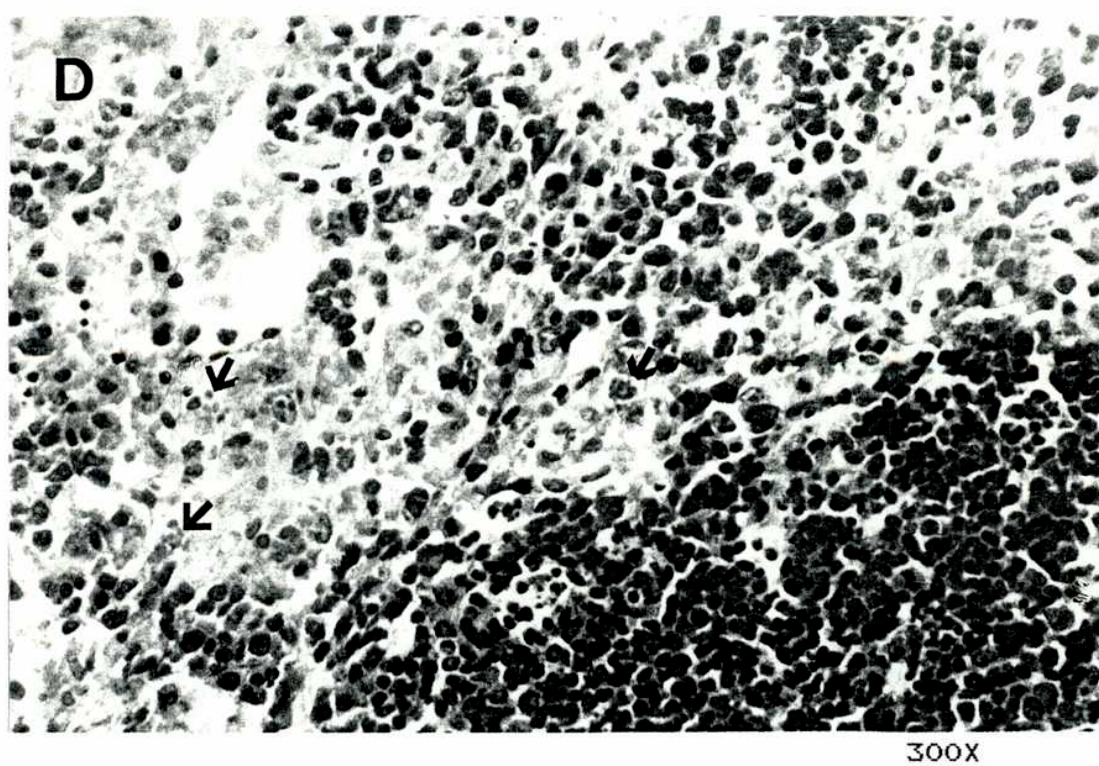
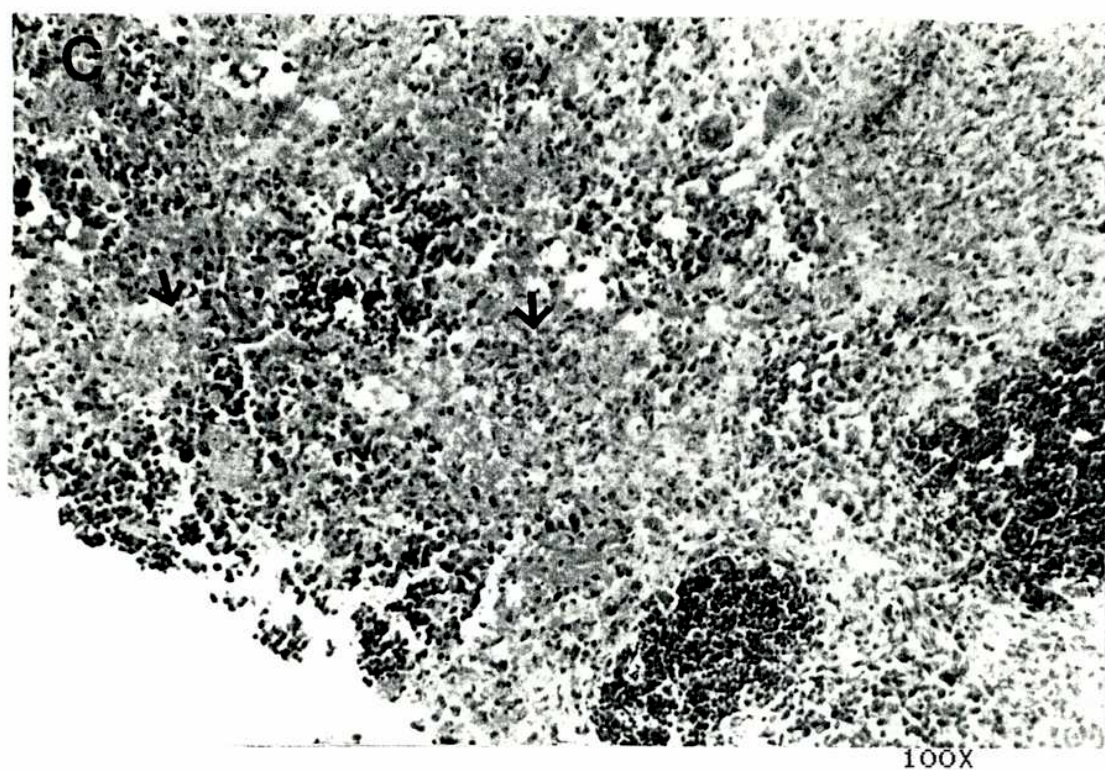
A

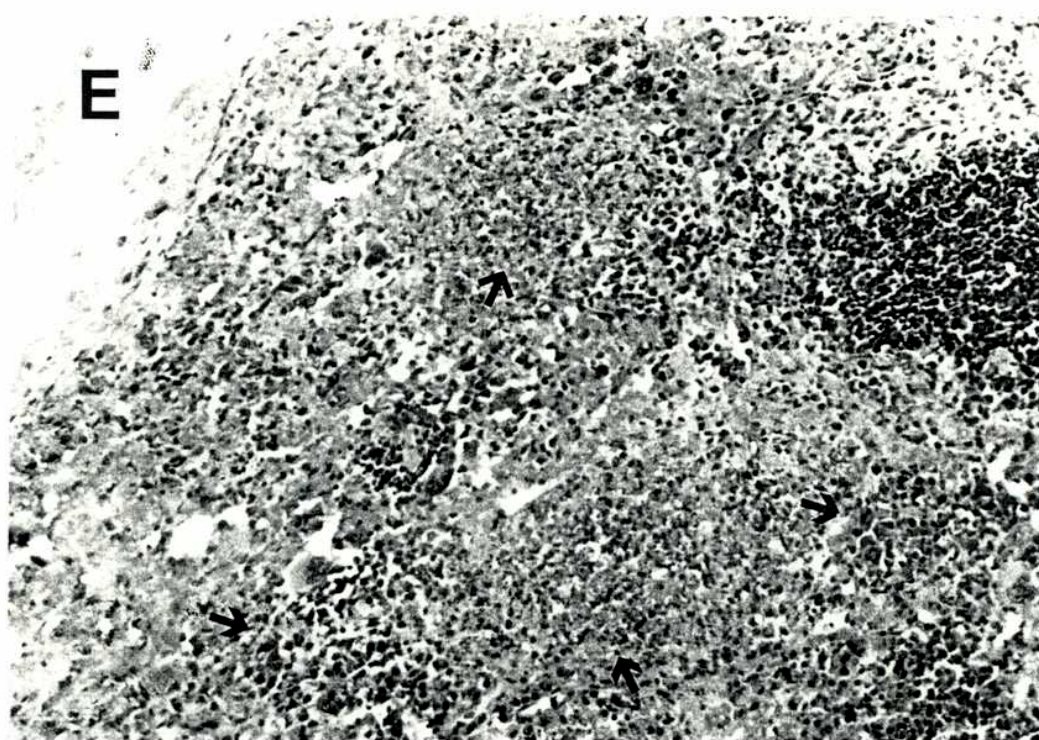
100 x



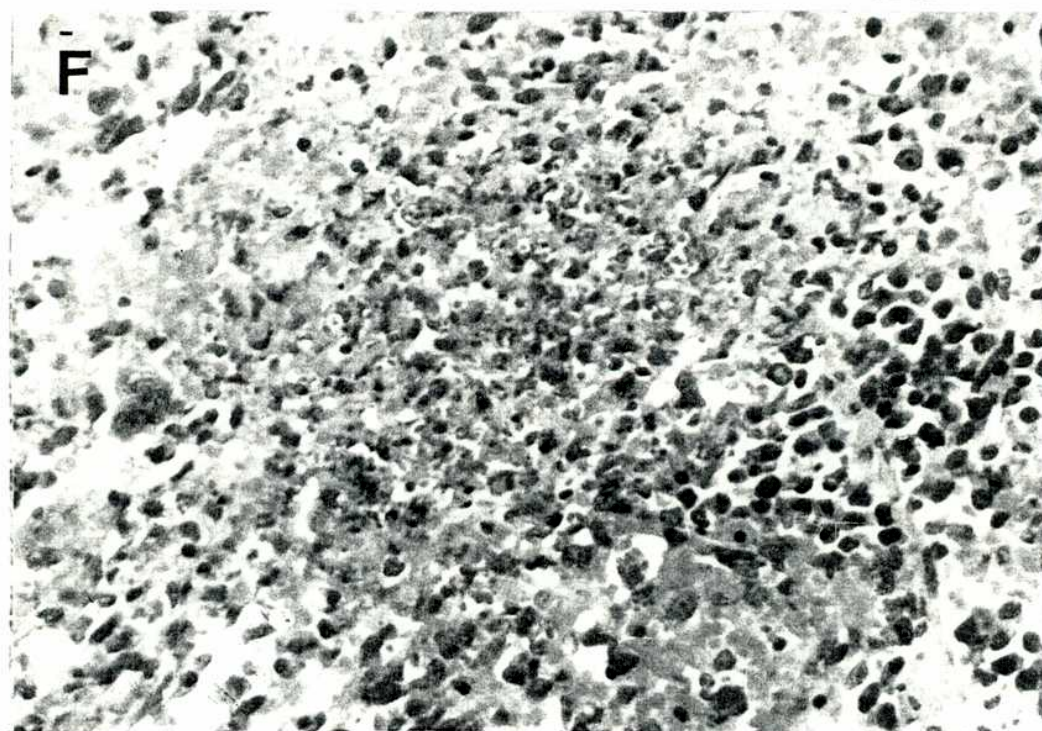
B

100 x

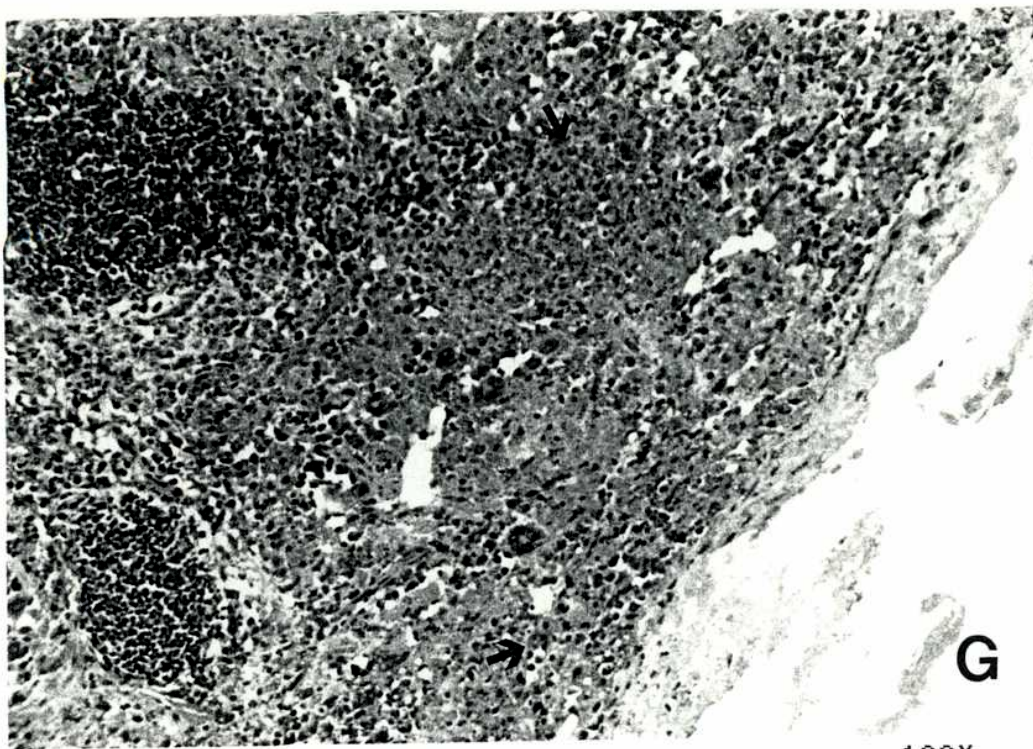




100X



300X



100X



300X

El análisis histopatológico de los cortes de hígado y bazo de cada uno de los lotes de ratones revela que el anticuerpo monoclonal Tg5 aumenta el grado de infectividad de los taquizoítos. Este efecto pudo ser claramente visualizado a través de la presencia de mayor cantidad de células macrofágicas cargadas de parásitos y focos lesionales de micronecrosis de mayor extensión en todos los casos en que la infección se realizó en presencia de dicho anticuerpo. Cuando la administración de Tg5 fue realizada 24 hs después de la inoculación con los taquizoítos, el grado de infección y de alteración histopatológica fue menor que en los casos en que la administración se realizó en forma conjunta. Esto estaría evidenciando una relación directa entre presencia del anticuerpo y grado de infectividad.

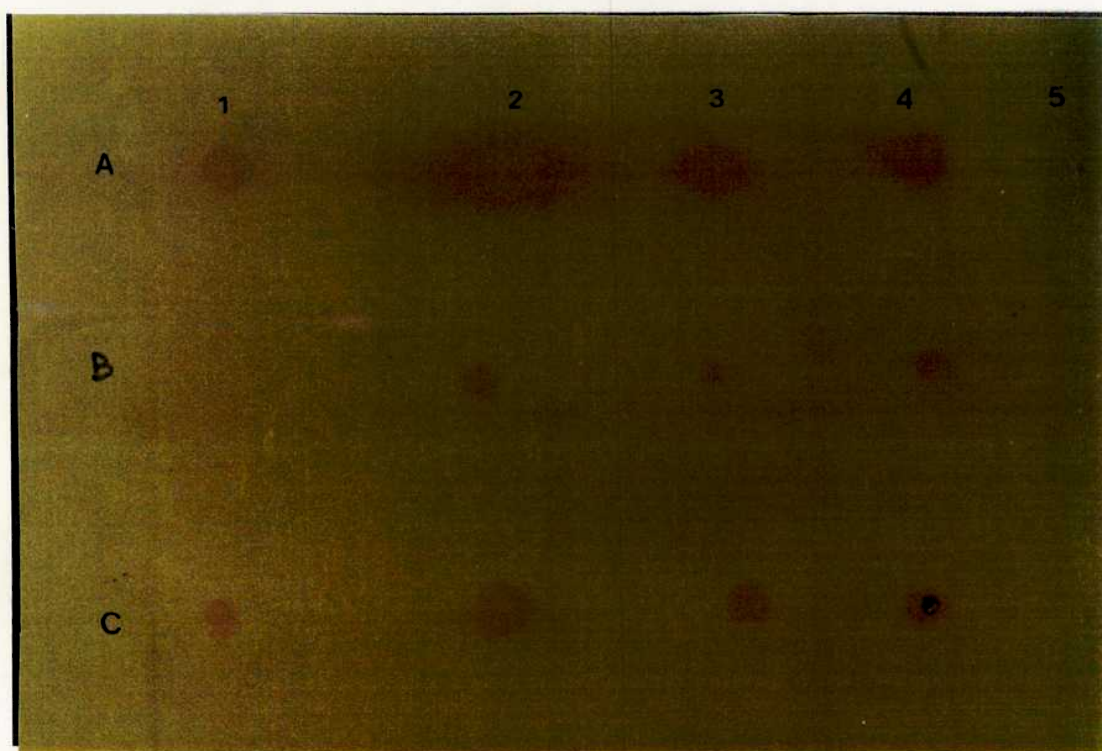
6.4. EFECTO DEL ANTICUERPO MONOCLONAL Tg5 SOBRE LA ACTIVIDAD DE ANHIDRASA CARBONICA.

En un experimento sencillo, descripto a continuación, pudimos visualizar claramente que Tg5 tiene un efecto activador sobre la Anhidrasa Carbónica Bovina y sobre la actividad de anhidrasa carbónica detectada en taquizoítos y fracción de Ags ESA.

El experimento se realizó utilizando membranas de nitrocelulosa, sobre las cuales se sembraron alícuotas de AC, de extractos parasitarios totales y de fracción de Ags ESA solas o preincubadas con distintas diluciones del AcMc Tg5. Las membranas así tratadas fueron secadas a temperatura ambiente, sumergidas en una solución de rojo fenol al 0.005% en buffer fosfato salino, pH 7.4, y colocadas bajo una atmósfera saturada de CO₂ hasta que el indicador de pH viró totalmente hacia el amarillo. A partir de este momento las membranas se retiraron de la solución y se dejaron bajo la presión de CO₂ atmosférica.

Como puede observarse en la Fig.41 la actividad de Anhidrasa Carbónica pudo visualizarse a través de manchas de color rojizo sobre un fondo claro amarillento. Las aparición de dichas manchas revela un aumento local del pH, que ocasiona el viraje del indicador hacia tonalidades rojizas. Es evidente el mayor tamaño que presentan las manchas, en todos los casos en que las muestras fueron preincubadas con el AcMc. Además la aparición de dichas manchas fue previa a la de las muestras no enfrentadas con el anticuerpo.

FIGURA 41



- A: ANHIDRASA CARBONICA** (5ug por cada siembra).
B: EXTRACTO PARASITARIO TOTAL (800ug por siembra).
C: ANTIGENOS ESA (500ug por siembra).
1- Sin anticuerpo monoclonal.
2- Con anticuerpo monoclonal Tg5 puro.
3- Con anticuerpo monoclonal Tg5 diluído 1:5.
4- Con anticuerpo monoclonal Tg5 diluído 1:10.
5- Controles: **A5** - AcMc puro.
B5 - AcMc diluído 1:5.
C5 - AcMc diluído 1:10.

CO

7.1. Utilización del anticuerpo monoclonal Tg5 en la detección de fagos recombinantes productores de péptidos inmunogénicos.

Con el objeto de estudiar la estructura del epítopo reconocido por este AcMc se realizó el rastreo inmunológico de una genoteca de ADN complementario de *T.gondii* en el fago λ gt11. Esta genoteca se obtuvo en el laboratorio en colaboración con el Dr. Jorge Blanco a partir de una preparación de ARN mensajeros de taquizoítos de *T. gondii*.

Se comenzó el trabajo a partir preparaciones de taquizoítos provenientes de fluido ascítico, purificadas mediante un gradiente discontinuo de sacarosa (Mat. y Met.;3). A partir de ellos se obtuvieron finalmente 35,6 ug de ARN mensajero que se transformaron en ADN copia doble cadena y se clonaron en el fago λ gt11 de acuerdo a las técnicas explicitadas en la sección Mat. y Mets. Esta genoteca fue de un tamaño inicial de $7,6 \times 10^5$ fagos con una eficiencia de 87% de fagos recombinantes.

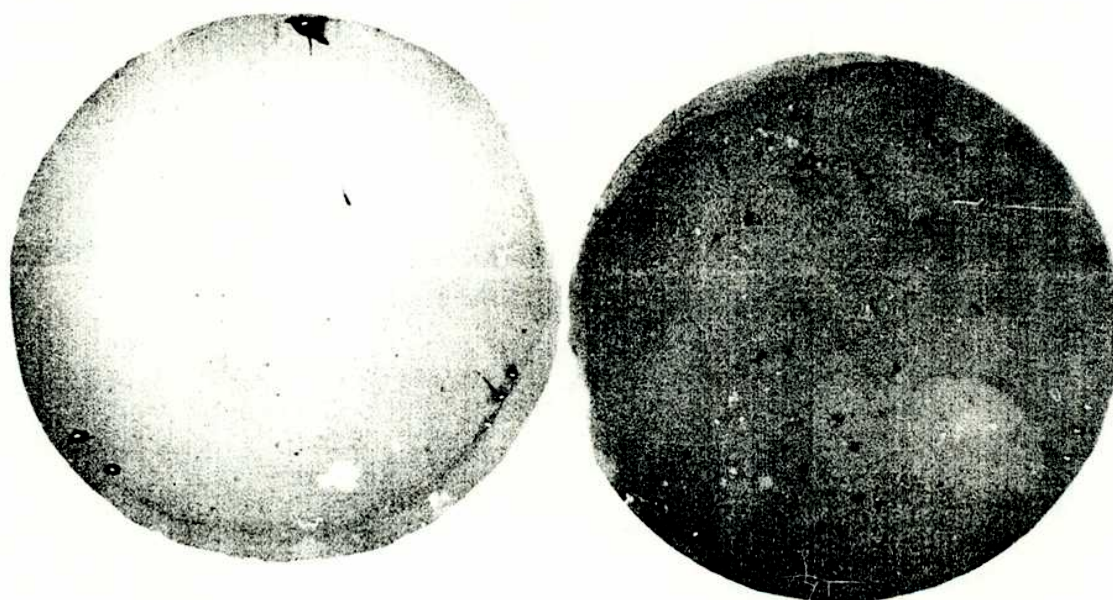
7.2. Rastreo inmunológico.

Dos tercios de la genoteca fue amplificada para su posterior rastreo inmunológico. De esta manera se obtuvieron 250 ml de una suspensión de fagos cuyo título fue de 2.7×10^{10} ufp/ml.

Al realizar la búsqueda de recombinantes positivos utilizando como sonda el anticuerpo monoclonal Tg5 se pudieron detectar dos placas positivas en una caja de Petri de 150 mm que contenía aproximadamente 20000 placas de lisis totales. Estas placas fueron rerastreadas en sendas cajas de Petri de 82 mm a un nivel de infección que producía unas 500 placas totales. Veinte de ellas presentaron señal en ambos filtros duplicados (Fig 42). Con sucesivos rerastreos bajando la multiplicidad de infección se

pudieron aislar dos clones recombinantes en forma pura. Se denominaron λ TgP5A y λ TgP5B respectivamente.

FIGURA 42



Búsqueda de clones positivos. En un segundo rastreo de la placa positiva se obtuvieron 500 placas de lisis de las cuales 20 eran positivas. Se realizó la búsqueda de cada caja pos duplicado para evitar falsos positivos.

7.3. Purificación de los clones positivos.

Los fagos recombinantes aislados fueron amplificados y purificados a homogeneidad en gradientes de cloruro de cesio. Posteriormente se aislaron sus genomas obteniéndose aproximadamente 500 a 1000 μg de ADN de fago.

7.4. Análisis de los clones por mapeo de restricción.

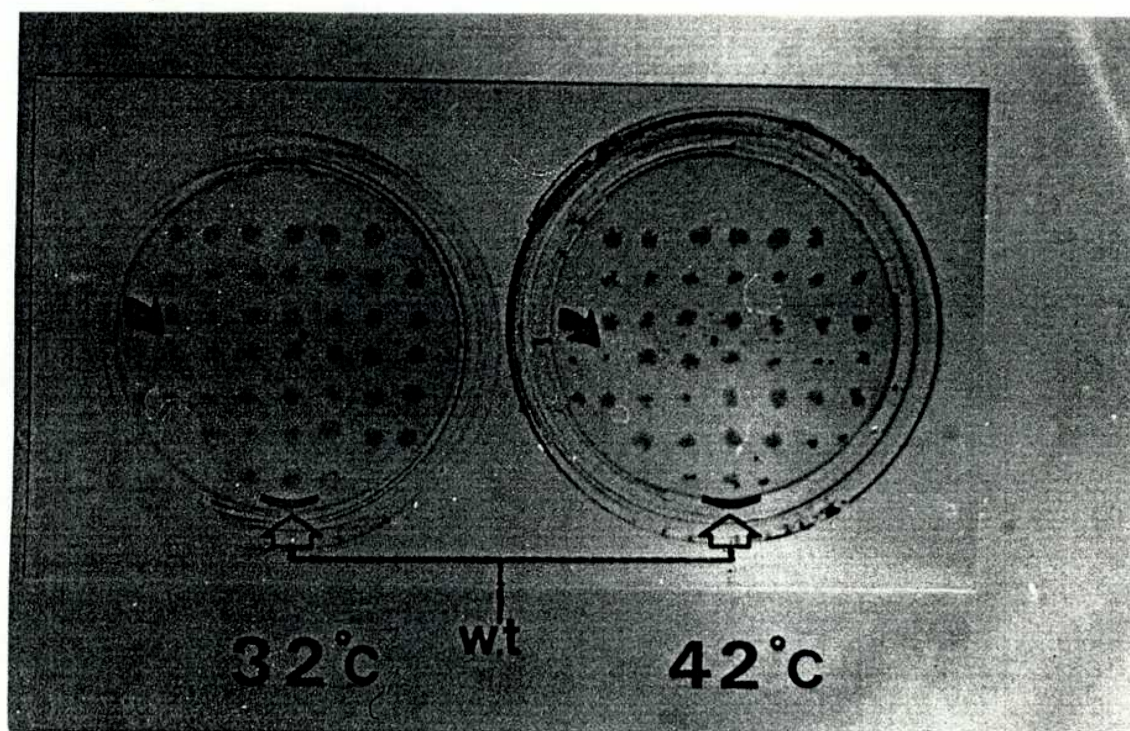
Los experimentos realizados para la determinación del tamaño del inserto clonado en dichos fagos fueron varios debido a que los mapeos de restricción preliminares que se realizaron con diversas enzimas no mostraron resultados concluyentes (datos no mostrados). Esto se debió fundamentalmente al tamaño relativo del fago con respecto al inserto (generalmente una relación de 50 a 1). La poca cantidad de inserto que se obtenía luego de la digestión no se visualizaba en los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Para subsanar este inconveniente se decidió extraer el inserto con la enzima EcoRI (lugar donde fue clonado) y marcar el mismo mediante la técnica de rellenado ("fill in"). Esto es, rellenar los extremos cohesivos con nucleótidos marcados, en presencia de la ADN polimerasa de *E. coli* (subunidad Klenow). Al correr estas preparaciones en geles de poliacrilamida se visualizó un fragmento escindido de unas 120 pb. Para descartar la posibilidad de que fuera un fragmento mayor con secuencias Eco RI internas y equidistantes, se realizaron cortes parciales con esta enzima. No pudieron hallarse fragmentos intermedios. Sin embargo, no podemos descartar que la digestión enzimática haya sido total, a pesar de nuestros esfuerzos para graduar su actividad.

7.5. Obtención de extractos lisogénicos.

Los fagos purificados fueron utilizados para la obtención de

bacterias lisogénicas para producir la proteína de fusión. En la figura 43 se observa el crecimiento diferencial entre las cepas lisogénicas obtenidas y cepas no lisogénicas cuando se las somete a dos temperaturas diferentes.

FIGURA 43



Con el fago recombinante positivo y el fago λ gt11 wt se realizaron células de *E. coli* Y1089 lisogénicas. Estas se detectan por su crecimiento diferencial a dos temperaturas diferentes. (32°C y 42°C).

7.6. Obtención de extractos crudos de las cepas lisogénicas.

Las cepas lisogénicas hechas tanto con el fago recombinante como con el fago wt fueron inducidas por el agregado de IPTG en medio líquido de manera de inducir la producción en gran cantidad de la proteína de fusión.

7.7. Análisis electroforético de los extractos proteicos.

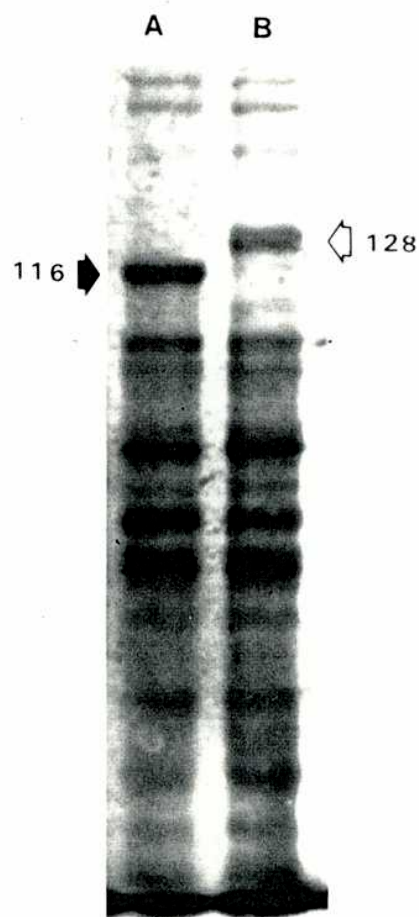
Los extractos proteicos tanto del fago recombinante como del fago wt fueron corridos en geles de poli(acrilamida) 7% en condiciones desnaturalizantes. (Figura 44). Como se observa en esta figura hay un retraso de la banda correspondiente a la β -galactosidasa (calle B) debido a la expresión de la proteína de fusión.

7.8. Análisis de las proteínas de fusión por Western-Blot.

El Western-blot de los geles de poli(acrilamida) de los extractos crudos de las bacterias lisogénicas (Figura 45) muestra que el AcMc Tg5, utilizado como sonda, reconoce a la proteína de fusión y no a la β -galactosidasa presente en el lisogénico wt.

FIGURA 44

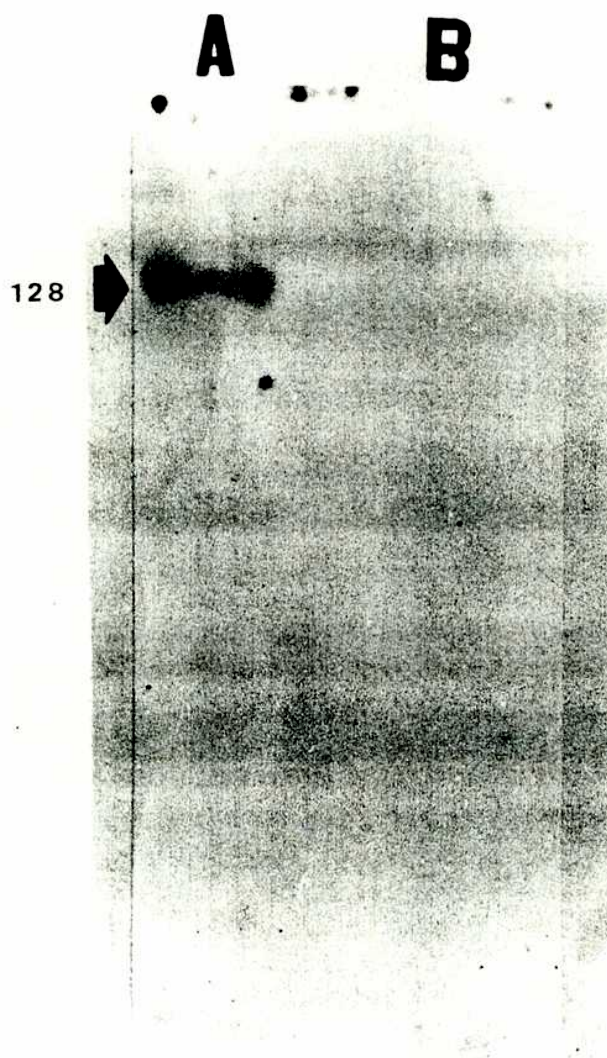
ANALISIS ELECTROFORETICO DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS



Electroforesis en gel de poliacrilamida (5%) con SDS de lisado de cepas de *E. coli* lisogénicas con: A- λ gt11 vt y B- λ gt11 recombinante Tg5. La flecha llena denota la proteína β -galactosidasa, mientras que la flecha vacía la proteína de fusión β -galactosidasa-proteína de *T. gondii*.

FIGURA 45

ANALISIS DE LA PROTEINA DE FUSION POR WESTERN-BLOT



Western-Blot de un gel de poliacrilamida 10% de los extractos de
E. coli y1089 lisogénicas con el fago el fago recombinante. La
detección se realizó con el AcMc Tg5.

7.9. Secuenciación del ADN recombinante que codifica para el epitope reconocido por el AcMc Tg5 en la proteína de fusión estudiada.

Se realizó la secuenciación del fragmento clonado por el método de di-deoxinucleótidos de Sanger y se obtuvo la siguiente secuencia nucleotídica:

```
CGT AAG CCA CCA ACC TGT ACA TGT GGA CAA CTG AAC TCT GAC CCT TTG
GGA GAA CGG CAA ACA CTC TTA ACG TTG AGA CAT CTC TCC AAC ACC AGG
TTT TAT AAC TTC AAA AAC ACG
```

Esta secuencia posee 117 pb y tiene un sólo marco de lectura posible, el cual es compatible con el marco de lectura que lleva el fago Lambda gt11 dentro del sitio Eco RI de clonado.

Este marco de lectura genera un fragmento peptídico de 39 aminoácidos, con un peso molecular de 4519 Daltons.

7.10. Deducción de la secuencia de aminoácidos del fragmento clonado.

```
CGT AAG CCA CCA ACC TGT ACA TGT GGA CAA CTG AAC TCT GAC CCT TTG
Arg Lys Pro Pro Thr Cys Thr Cys Gln Gln Leu Asn Ser Asp Pro Leu

GGA GAA CGG CAA ACA CTC TTA ACG TTG AGA CAT CTC TCC AAC ACC AGG
Gln Glu Arg Gln Thr Leu Leu Thr Leu Arg His Leu Ser Asn Thr Arg

TTT TAT AAC TTC AAA AAC ACG
Phe Tyr Asn Phe Lys Asn Thr
```

7.11. Homología entre las secuencias aminoacídicas del fragmento clonado y la Anhidrasa Carbónica de mamíferos.

En mamíferos existen tres diferentes isoenzimas: La AC I que se encuentra predominantemente en los tejidos del intestino, es de baja actividad y sensible a sulfonamidas, la AC II encontrada en eritrocitos y riñón y muchos otros tejidos, de alta actividad y sensible a sulfonamidas y la AC III, que se encuentra casi exclusivamente en el músculo esquelético, de baja actividad y resistente a sulfonamidas.

La figura 46 muestra la comparación de un fragmento aminoacídico desde el residuo 18 al residuo 37 de las tres isoenzimas.

FIGURA 46

		Residue Number																			
		18		20		25						30				35				37	
CA I	Lys	Leu	Tyr	Pro	Ile	Ala	Asn	Gly	Asn	Asn Lys	Gln	X Ser	Pro	Val Ile	Asp	Ile	Lys	Thr Ser	Ser	Glu	
CA II	Lys	Asp	Phe	Pro	Ile	Ala	Lys Asn Asp	Gly	Glu Asp	Arg	Gln	X Ser	Pro	Val Ile	Asp Asn	Ile	Asp Asn	Thr	Lys His Ala Asp	Thr Ala	
CA III	Glu	Leu Phe	Phe Tyr	Pro	Lys Ile	Ala	Lys	Gly	Glu Asp	Asn	Gln	X Ser	Pro	Ile Val	Glu	Leu	His Asn	Thr Ser	Lys	Asp Glu	

X: Residuo Sitio Activo.

Un análisis comparativo entre cada una de ellas y la secuencia aminoácídica del fragmento de *T.gondii* reveló homologías con la ACII de mamíferos, en particular la bovina.

Como se indica en la figura 47 ambas secuencias poseen cuatro aminoácidos idénticos alineados según el mismo ordenamiento. El residuo número 29 que se halla a continuación es treonina en el fragmento de *T.gondii* y serina en la anhidrasa carbónica. Ambos aminoácidos difieren únicamente en un grupo metilo y pertenecen a la misma familia de aminoácidos polares no cargados. (Fig. 48).

FIGURA 47
COMPARACION DE LAS SECUENCIAS AMINOACIDICAS
DEL FRAGMENTO CLONADO DE *T.gondii*
Y LA ANHIDRASA CARBONICA II DE MAMIFEROS (Residuos 9 al 47).

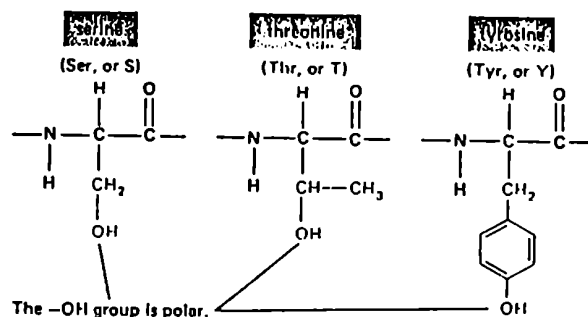
9
(*)Arg Lys Pro Pro Thr Cys Thr Cys Gly Gln Leu Asn Ser Asp Pro Leu
(#)Lys His Asn Gly Pro Glu Asn Trp His Lys Asp Phe Pro Ile Ala Lys
Asn
Asp

29
[Gly Glu Arg Gln Thr] Leu Leu Thr Leu Arg Hys Leu Ser Asn Thr
[Gly Glu Arg Gln Ser] Pro Ile Asp Ile Asp Thr Lys Thr Ala His
Asn Asn His Ala
Ala
Asp

47
Arg Phe Tyr Asn Phe Lys Asn Thr (*)
His Asp Pro Ser Leu Gln Pro Leu (#)

(*) FRAGMENTO CLONADO DE *T.gondii*.

(#) RESIDUOS AMINOACIDICOS 9 A 47 DE LA ANHIDRASA CARBONICA II DE MAMIFEROS.

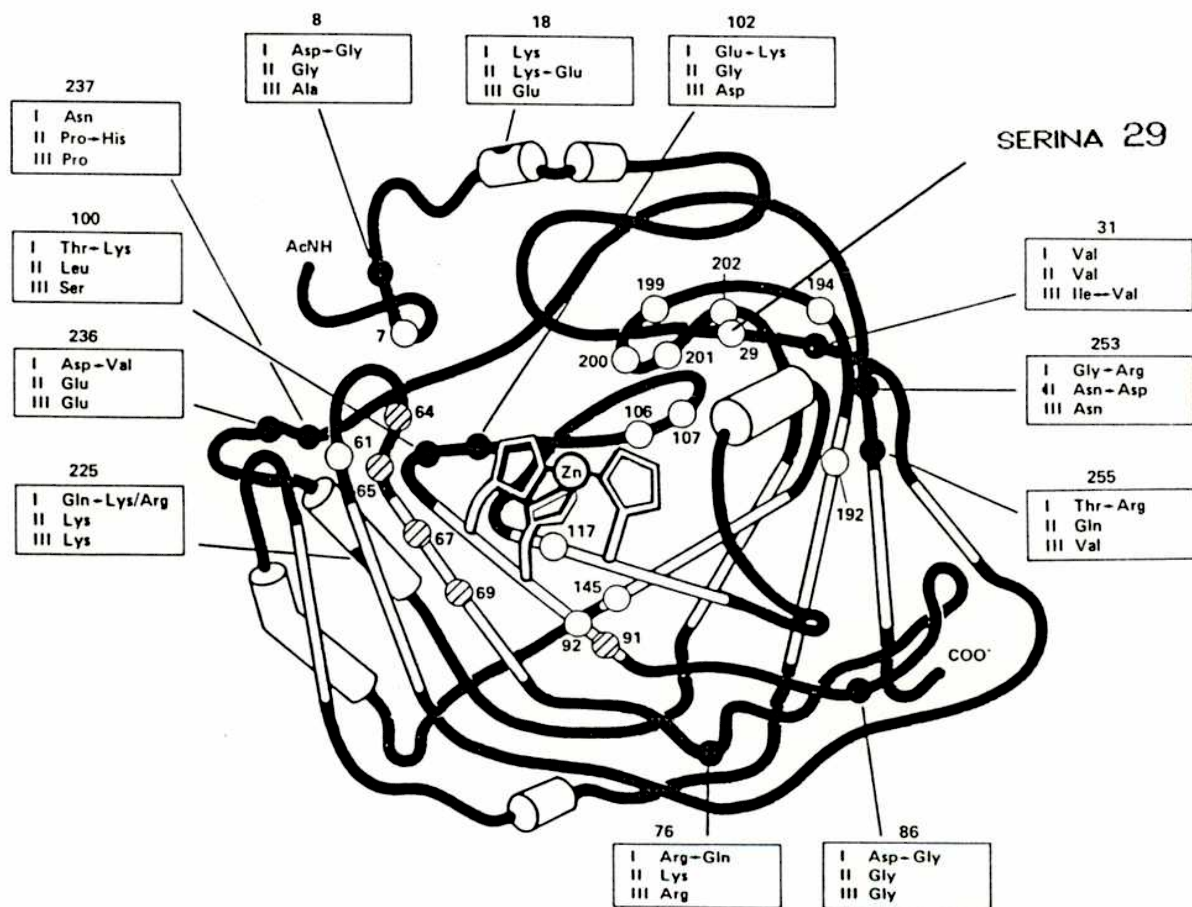


La serina número 29 forma parte del sitio activo de la enzima. (Figura 49)

Por otra parte, la comparación de los perfiles de hidrofobicidad de ambos fragmentos (Fig 50), revela una zona de similitud que abarca unos 10 aminoácidos.

Se requeriría la secuenciación completa del gen de *T.gondii* correspondiente al fragmento clonado para poder completar este análisis. Hipótesis sobre posibles implicancias de estos hallazgos serán presentadas en la sección Discusión del presente trabajo.

FIGURA 49
ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL
DE LA ANHIDRASA CARBONICA DE MAMIFEROS.



Los círculos vacíos indican residuos de aminoácidos que forman parte del sitio activo. La serina número 29 es uno de ellos.

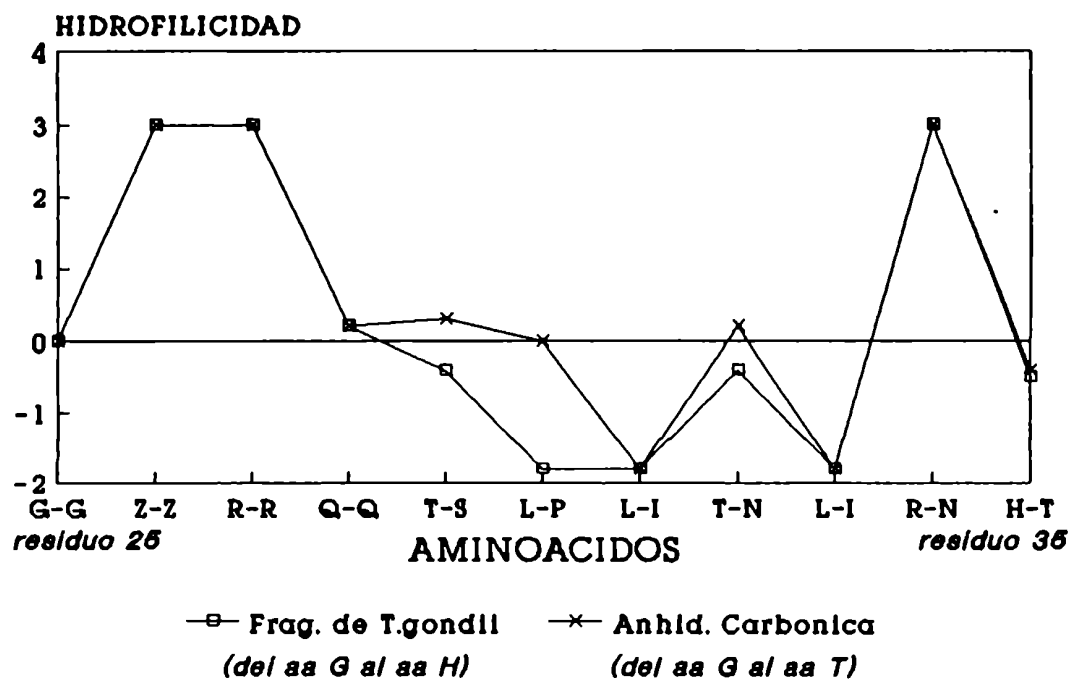
FIGURA 50

PERFIL COMPARATIVO DE HIDROFOBICIDAD ENTRE

EL FRAGMENTO CLONADO DE *T.gondii* Y LA ANHIDRASA CARBONICA II

DE MAMIFEROS.

PERFIL DE HIDROFILICIDAD COMPARATIVO ENTRE EL FRAGMENTO DE T.GONDII Y AC.



1. OBJETIVO DEL PRESENTE TRABAJO.

Se eligió *Toxoplasma gondii* como modelo de estudio por dos importantes razones:

1) La toxoplasmosis es una enfermedad de muy alto riesgo para el desarrollo del feto, en el caso de mujeres embarazadas que adquieren la infección durante el primer trimestre de embarazo. La infección transplacentaria puede causar aborto o malformaciones neonatales graves. Por otra parte, últimamente, la toxoplasmosis ha adquirido un interés adicional por ser la causa de encefalitis en pacientes inmunocomprometidos, incluyendo receptores de transplantes y en pacientes con SIDA.

2) *Toxoplasma gondii* se está utilizando como modelo de estudio del parasitismo intracelular. Es uno de los parásitos más ampliamente distribuidos y posee la inusual característica de invadir prácticamente todas las células nucleadas de mamíferos y de muchas aves. Los taquizoítos intracelulares residen dentro de vacuolas incapaces de acidificarse y unirse a cualquier organela del sistema endocítico de la célula huésped, logrando así su establecimiento y rápida proliferación. En contraste, el estado enquistado de bradizoíto permanece latente dentro de los tejidos por décadas, ocultándose aparentemente del sistema inmune del huésped, siendo refractario a cualquier terapia antimicrobiana potencialmente efectiva.

El presente trabajo de tesis tiene por objeto avanzar en el conocimiento de la composición antigénica de *Toxoplasma gondii* y su implicancia en la fisiopatogenia. A tal efecto se produjeron anticuerpos monoclonales contra taquizoítos de *T.gondii*, uno de los cuales fue utilizado en la detección, caracterización y estudio del rol biológico de un antígeno del parásito.

2. PRODUCCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA TAQUIZOITOS DE *Toxoplasma gondii*.

2.1. Desarrollo del método de selección de híbridos productores: SIA.

Una de las etapas más críticas en la producción de anticuerpos monoclonales es la selección de híbridos productores. Por lo tanto es de vital importancia la adecuada elección del sistema de detección de anticuerpos producidos. Este sistema debe reunir condiciones de alta sensibilidad, rapidez y simpleza de manera tal que se puedan efectuar un alto número de determinaciones en un tiempo corto.

Estas características se cumplieron satisfactoriamente en la técnica de micro-ELISA (SIA) desarrollada para la detección de anticuerpos anti-*T.gondii*. Esta técnica es de más sencilla ejecución y más económica que los ELISA convencionales debido a que los volúmenes de los reactivos a utilizar en cada etapa son considerablemente menores, del orden de 5 a 10 μ l por pozo. (Resultados: 1.1.).

2.2. Determinación de las causas de la presencia de falsos positivos en el SIA.

Durante el desarrollo del SIA se evidenció que las preparaciones antigénicas, obtenidas a partir del fluido ascítico producían reacciones falso positivas. (Resultados: 1.2.).

A través de experimentos de DOT-BLOT se demostró que tales preparaciones contenían inmunoglobulinas de ratón pues la aplicación del segundo anticuerpo (conjugado anti-inmunoglobulinas

totales de ratón) directamente sobre la preparación antigénica daba reacción positiva. Preparaciones antigénicas provenientes de taquizoítos cultivados in vitro no presentaban este problema. Se demostró también que tales inmunoglobulinas eran del tipo IgM, pues cuando se utilizó proteína A conjugada con peroxidasa como sistema de revelado la reacción fue negativa (Resultados: 1.2.4 y Fig.17). La proteína A no se une a las IgM. Cuando se utilizó un conjugado anti-IgM de ratón como sistema de revelado la reacción volvió a dar positiva.

El inmunoblot realizado con las fracciones obtenidas a partir de taquizoítos tratados con glicina (Resultados: 1.3.7. y Fig. 20) confirma que las inmunoglobulinas presentes en las preparaciones antigénicas son del tipo IgM.

Estas inmunoglobulinas pueden ser específicamente inducidas a la 24-48 hs luego de la infección (Handman y Remington 1980a) o simplemente deberse a anticuerpos naturales presentes en el huesped (Remington, 1986).

Asimismo, macrófagos contaminantes que contienen receptores Fc, son causa también de interacciones inespecíficas con los segundos anticuerpos. Preparaciones de macrófagos libres de taquizoítos (Resultados: 1.2.3. y Fig. 16 B2 y C2) dan reacción positiva con el sistema de revelado.

2.3. Obtención de preparaciones antigénicas libres de inmunoglobulinas.

2.3.1. Tratamiento de los taquizoítos con glicina pH 2.8.

El tratamiento con glicina pH 2.8 provoca el desprendimiento de la inmunoglobulinas adosadas a la superficie del taquizoíto. Si

bien este procedimiento permitió obtener preparaciones libres de inmunoglobulinas, los parásitos resultaron no viables. (Resultados: 1.3.8.).

2.3.2. Inmunosupresión con ciclofosfamida.

La inmunosupresión de ratones con ciclofosfamida previa a la inoculación con taquizoítos (Mat. y Met.: 4.2.) resultó ser un método eficaz para la obtención de preparaciones libres de inmunoglobulinas. (Resultados: 1.3.9.). Este procedimiento permite la obtención de taquizoítos viables a diferencia del método de la glicina.

2.4. Purificación de los taquizoítos por gradiente de sacarosa.

Las preparaciones de taquizoítos provenientes de fluido ascítico contienen habitualmente una contaminación con macrófagos peritoneales de alrededor de un 10% . El filtrado a través de fibra de vidrio reduce considerablemente la contaminación pero el rendimiento en taquizoítos es bajo. Es por ello que se utilizó el método de purificación a través de un gradiente discontinuo de sacarosa (Garberi y col., 1990). Se obtuvieron así preparaciones con menos del 1% de contaminación murina (Resultados: 1.3. y Tabla 7). Asimismo los taquizoítos obtenidos fueron viables pues fueron capaces de producir el mismo cuadro de infección en ratones, que los parásitos sin purificar.

2.5. Fusión celular.

La tecnología de immortalización de células productoras de anticuerpos específicos mediante su fusión con células de mieloma fue introducida por primera vez por Köhler y Milstein en 1974.

A partir de entonces esta técnica ha sido ampliamente adoptada por numerosos campos de las ciencias de la vida.

Las principales ventajas de los anticuerpos monoclonales producidos por hibridomas sobre los anticuerpos policlonales obtenidos por inmunización "convencional", se reflejan en especificidad definida, homogeneidad, capacidad de obtener cantidades ilimitadas de un mismo anticuerpo y de una manera reproducible, y la posibilidad de congelar los hibridomas productores por períodos de tiempo ilimitado.

Con este método los mielomas de ratón presentan un rango de frecuencia de fusión que va de 1 a 100 clones por cada 10^7 linfocitos. El porcentaje de eficiencia de la fusión realizada fue del 95%

3. CARACTERIZACION PRELIMINAR DE LOS AcMc OBTENIDOS.

Se comenzó el trabajo con cuatro líneas de alta producción de anticuerpos. Una caracterización preliminar mostró que los anticuerpos monoclonales 1H10H8 y 1H10E9E6, ambos del tipo IgM, reconocen antígenos del mismo peso molecular y presentes en dos fracciones subcelulares (fracción membranosa y soluble). Estos resultados sugieren que ambos anticuerpos son producidos por hibridomas originados de un único clon. (Resultados: 2.1.). Las dos líneas restantes, 1F6C4T y 5E9A3B4, reconocen antígenos

presentes únicamente en la fracción particulada. 1F6C4T reconoce antígenos de 58kD y 35kD y es del tipo IgM, mientras que 5E9A3B4 reconoce por inmunoblot una sola banda proteica de 71 kD y es del subtipo IgG1. (Resultados: Fig. 22 y Tabla 15)

4. LOCALIZACION CELULAR DE LAS PROTEINAS RECONOCIDAS POR LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES 1F6C4T, 5E9A3B4 y 1H10H8.

Los estudios de localización celular, realizados mediante técnicas de inmunomarcación, con los anticuerpos monoclonales 1F6C4T y 5E9A3B4, indican que ambos reconocen antígenos de membrana ubicados en la superficie del parásito, aunque con un patrón de distribución diferente. (Resultados: 2.4.1. y Figs.4 y 5).

Con el anticuerpo 1H10H8 se realizó una inmunomarcación, mediante la técnica de inmunoperoxidasa, sobre extendidos de taquizoítos provenientes de exudado peritoneal de ratones infectados. Se trabajó en dos condiciones diferentes:

- 1) Sobre extendidos de taquizoítos frescos, extracelulares.
- 2) Sobre extendidos de taquizoítos extracelulares, fijados con formaldehído al 2%.

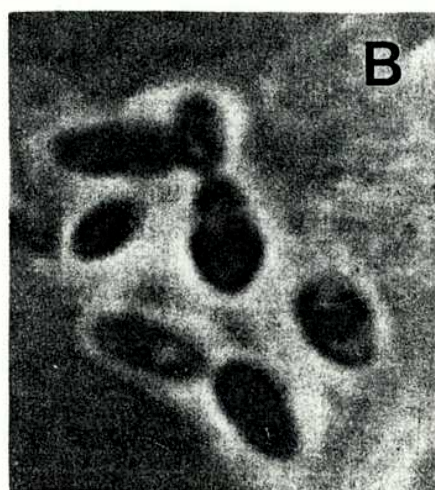
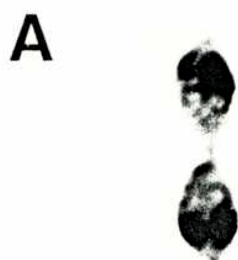
En el primer caso se observó una fuerte marcación en áreas externas circundantes a los taquizoítos, mientras que los parásitos fijados mostraron marcación fundamentalmente en el extremo anterior. (Resultados: 2.4.1 y Figs. 2 y 3) Estas diferencias podrían deberse al distinto tratamiento previo al que fueron sometidos los parásitos.

Cuando improntas de bazo de ratón infectado, fueron inmunomarcadas con el AcMc 1H10H8 mediante la técnica de

fosfatasa- antifosfatasa alcalina, se observó que, taquizoítos intracelulares (dentro de macrófagos) o formas libres (típicas de parásitos saliendo de las células), presentaban marcación intracelular. (Fig. 52B). Schwartzman (1986) obtuvo un patrón de marcación idéntico, (Fig. 52A), aplicando la técnica de inmoperoxidasa sobre taquizoítos intracelulares con anticuerpos monoclonales específicos para las rhoptrias. Estos anticuerpos reconocen antígenos pertenecientes a una familia de proteínas con epitopes relacionados, cuyos pesos moleculares determinados por inmunoblot se hallan dentro de un rango de 60-43 kD. (Schwartzman 1989). Los antígenos reconocidos por el AcMc 1H10H8 poseen pesos moleculares que están dentro del mismo rango. (Resultados: Fig. 22)

Estos resultados sugieren que el AcMc 1H10H8, reconoce proteínas contenidas en las rhoptrias.

FIGURA 51



A: SCHWARTZMAN (1986)

B: NUESTRO LABORATORIO (1992)

5. El AcMc 1H10H8G5 (Tg5) RECONOCE ANTIGENOS DE SECRECION.

Para ver si los Ags reconocidos por el AcMc Tg5 eran productos de secreción del taquizoíto, se preparó una fracción enriquecida en antígenos excretorios-secretorios (ESA) y diferentes fracciones subcelulares obtenidas por centrifugación diferencial. (Mat. y Met.: 11)

En ensayos de SIA y Dot-Blot el AcMc Tg5, (Resultados: 5.3.) reconoce predominantemente antígenos de la fracción ESA y levemente la fracción correspondiente al pellet de 10000g. Esta fracción incluye organelas celulares como lisosomas, mitocondrias y peroxisomas. Posiblemente las rhoptrías sedimenten junto con dichas organelas como fue demostrado por Leriche y Dubremetz (1991)

6. DETERMINACION POR INGENIERIA GENETICA DEL EPITOPE RECONOCIDO POR EL AcMc Tg5.

Se realizó la secuenciación del fragmento clonado en λ gt11, detectado con el AcMc Tg5 a partir de una genoteca de cDNA de tq de *T.gondii*. Esta secuencia posee 117 pares de bases. (Resultados: 7.9.) y tiene un sólo marco de lectura posible, el cual es compatible con el marco de lectura que lleva el fago λ gt11 dentro del sitio Eco RI de clonado. Este marco de lectura genera un fragmento peptídico de 39 aminoácidos.

Se comparó la secuencia de aminoácidos del fragmento clonado con la de la anhidrasa carbónica II de mamíferos. (Result: 7.11. y Fig. 47). Se eligió específicamente esta enzima debido a que, en el ensayo de inmunoblot mostrado en Resultados; Fig. 22, AcMc Tg5 reconoció de un total de cinco proteínas de diverso origen, únicamente a la anhidrasa carbónica.

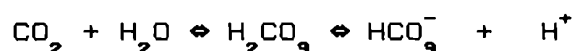
El análisis comparativo de ambas secuencias aminoacídicas reveló que el fragmento clonado comparte un epítopo secuencial de cinco aminoácidos con la anhidrasa carbónica II. (Result: 7.11. y Fig. 47). Además una región de 10 aminoácidos en ambas proteínas, que incluye el epítopo compartido, muestra un perfil de hidrofiliicidad similar. (Result.: Fig. 50).

7. ROL BIOLÓGICO DEL ANTIGENO DE *T.gondii* RECONOCIDO POR EL AcMc Tg5.

7.1 Detección de actividad de anhidrasa carbónica en taquizoítos de *T.gondii*.

Debido a que el AcMc Tg5 específico para proteínas de *T.gondii* reconoce también a la anhidrasa carbónica, se realizaron mediciones de actividad de dicha enzima en extractos parasitarios totales y fracción de antígenos ESA.

La anhidrasa carbónica es una enzima que cataliza la hidratación reversible del dióxido de carbono:



Para la detección de la actividad de esta enzima se desarrolló un método basado en la medición de la velocidad de deshidratación del ácido carbónico de una solución de buffer fosfato salino, pH 7.4, saturada con CO_2 . Cuando esta solución es expuesta a la atmósfera, la presión parcial del CO_2 en el seno de la solución es muy superior a la de dicho gas en la atmósfera y la reacción se desplaza espontáneamente hacia la formación de $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$. El incremento de pH producido durante este proceso, puede ser medido por aumento de absorbancia a 550 nm en función del tiempo, si la

solución contiene un indicador de pH como el rojo de fenol, el cual posee una zona de viraje que va del amarillo (pH 6.4) al rojo-violeta (pH 8.2). Este incremento, ocurre de una manera proporcional al tiempo, durante al menos los primeros 20 minutos de exposición a la atmósfera. La velocidad con que este proceso ocurre se deduce de la gráfica de absorbancia versus tiempo. La presencia de anhidrasa carbónica en la solución podrá ser detectada en consecuencia por el aumento de la pendiente de la recta resultante de graficar absorbancia en función del tiempo con respecto a la de una solución control.

Se pudo detectar así, actividad de dicha enzima en extractos parasitarios totales y fracción de antígenos ESA. Esta actividad fue totalmente inhibida cuando las mediciones se realizaron en presencia de acetazolamida, un inhibidor específico de la AC tipo I y II, perteneciente al grupo de las sulfonamidas. (Result.: 6.1.).

7.2. Efecto de la acetazolamida sobre la infectividad de *Toxoplasma gondii*.

Con el objeto de dilucidar si la actividad de anhidrasa carbónica presente en el parásito se relaciona con su capacidad infectiva, se llevaron a cabo experimentos de infección in vitro e in vivo en presencia y ausencia de acetazolamida.

En los experimentos de infección in vitro la presencia de acetazolamida en el medio de cultivo produjo una reducción en el número y tamaño de las placas de lisis formadas con respecto a los controles. El efecto de esta droga sobre la infectividad de *T.gondii* se repitió in vivo, como surge del análisis histológico comparativo, de órganos tales como bazo e hígado de animales infectados, tratados y no tratados con la droga. (Resultados: 6.2.).

Estos resultados sugerirían que la virulencia del parásito podría estar vinculada a la actividad de anhidrasa carbónica.

Además, se podría pensar en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. El tratamiento actual contra la toxoplamosis es la administración conjunta de pirimetamida más sulfatiazina. Estos medicamentos provocan un bloqueo metabólico de la síntesis y utilización de los ácidos paraaminobenzoico, fólico y folínico. No se ha tenido en cuenta hasta el momento, la posible acción directa de las sulfonamidas, como lo es la acetazolamida, sobre el parásito.

7.3. Acción del AcMc Tg5 sobre la capacidad infectiva de *T.gondii*.

Lycke y Norrby (1966) presentaron evidencias preliminares de que las rhoptrias de taquizoítos de *T.gondii* contienen un factor de aumento de la penetración, (PEF).

Schwartzman y col. (1986, 1989) mostraron mediante experimentos *in vitro*, que anticuerpos monoclonales específicos para las rhoptrias, inhiben al PEF disminuyendo el grado de infectividad de los taquizoítos.

Con la idea de encontrar respuestas del tipo inhibición de la penetración de los taquizoítos a las células en presencia del AcMc Tg5 se realizaron experimentos de infección *in vitro* e *in vivo*.

En los experimentos *in vitro* se utilizaron taquizoítos sólo o preincubados con dicho anticuerpo para infectar monocapas de células VERO en cultivo. Cuando la infección se realizó en presencia del AcMc se evidenció un sorprendente efecto que

consistió en un aumento del grado de infectividad. Este aumento fue cuantificado a través del conteo de placas de lisis formadas por los taquizoítos en presencia y ausencia del AcMc Tg5. (Resultados: 6.3.1.).

Este paradójico efecto se repitió *in vivo* cuando se utilizaron ratones a los que se les inocularon dosis habituales de taquizoítos conjuntamente o en ausencia de dicho anticuerpo. El análisis histológico de órganos tales como bazo e hígado reveló un aumento del grado de infectividad de *Toxoplasma gondii* por acción del AcMc. (Resultados: 6.3.2.).

7.4. Acción de Tg5 sobre la anhidrasa carbónica.

El análisis conjunto de los resultados hasta aquí obtenidos permitió el planteo de la siguiente hipótesis:

El aumento de la capacidad infectiva de *T. gondii* observado, por acción del AcMc Tg5, podría estar mediado por una activación de la anhidrasa carbónica del parásito.

Esta hipótesis fue confirmada mediante experimentos descriptos en Resultados: 6.4. (Fig. 41). En estos experimentos la AC II de eritrocitos bovinos resultó ser activada por Tg5 y también lo fueron las actividades de anhidrasa carbónica presentes en los extractos parasitarios totales y en la fracción de antígenos ESA.

8. CONCLUSIONES.

Se resumen a continuación los resultados y conclusiones del presente trabajo:

1) El AcMc Tg5 reconoce un antígeno de secreción de *T.gondii*, muy probablemente contenido en las rhoptrias.

2) Este AcMc específico para *T.gondii* reconoce también a la AC II de eritrocitos bovinos. Ambas proteínas comparten un epítopo de cinco aminoácidos, el cual está incluido dentro de una zona de 10 aminoácidos, cuyo perfil de hidrofobicidad es muy similar. El quinto aminoácido del epítopo compartido (Serina en la ACII y treonina en el antígeno de *T.gondii*), forma parte del sitio activo de la AC. (Resultados: Fig 49).

3) Extractos parasitarios totales de tq de *T.gondii* y fracciones de antígenos ESA poseen actividad de AC.

4) La acetazolamida, un inhibidor específico de la AC, inhibe también la actividad de AC observada en las preparaciones mencionadas en el punto 3).

5) La acetazolamida disminuye el grado de infectividad de *T.gondii* in vitro e in vivo.

6) El AcMc Tg5 provoca un aumento del grado de infectividad de los taquizoítos (tanto in vitro como in vivo).

7) Este aumento de la capacidad infectiva sería mediado, aparentemente, por una activación de la anhidrasa carbónica del parásito por acción de Tg5, un anticuerpo monoclonal de la clase IgM, característico de la fase aguda de la enfermedad.

9. CONSIDERACIONES SOBRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL PRESENTE TRABAJO.

De los resultados presentados surgen dos consideraciones importantes:

La primera se refiere al rol que una enzima como la anhidrasa carbónica podría tener en el establecimiento del taquizoíto dentro del fagosoma.

En los eritrocitos de mamíferos su rol está asociado con la rápida hidratación del CO_2 liberado de los tejidos corporales y en pulmones y riñón cataliza la deshidratación del ion bicarbonato, contribuyendo así a la regulación del pH del medio interno.

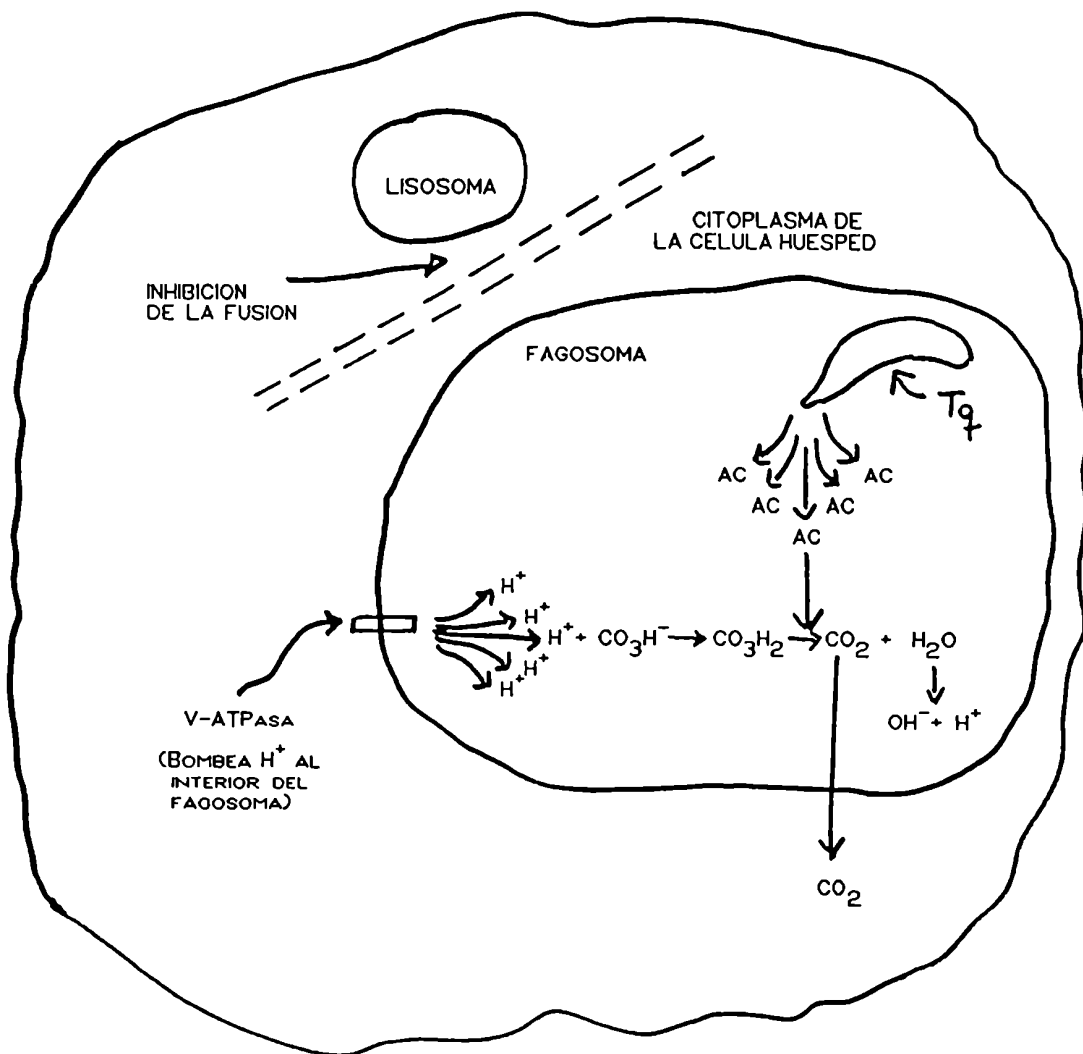
Es sabido que *T.gondii* vive a pH neutro. (pH 7.4). Una ligera disminución del pH reduce considerablemente su viabilidad. Sibley y col (1985) demostraron que *T. gondii* es capaz sobrevivir y multiplicarse dentro de la vacuola parasitófora, bloqueando su acidificación e inhibiendo su fusión con los lisosomas. De este modo, el parásito puede modificar los caminos endocíticos normales y escapar a los mecanismos de destrucción intracelular.

Pero los mecanismos involucrados en este efecto no han sido aún esclarecidos.

La presencia de una enzima con actividad de anhidrasa carbónica en *T.gondii* podría contribuir, al menos en parte, a contrarrestar la acidificación del fagosoma manteniendo el pH endógeno dentro de un rango compatible con la vida del parásito.

Un posible modelo teórico sobre este mecanismo es mostrado en el esquema de la Fig. 52.

FIGURA 52
MODELO TEORICO SOBRE EL ROL DE LA ACTIVIDAD
DE ANHIDRASA CARBONICA EN *Toxoplasma gondii*.



Este mecanismo mediado por la anhidrasa carbónica de *T.gondii* en el interior del fagosoma se asemejaría a lo que ocurre en la luz del túbulo contorneado proximal del nefrón, en donde la acidificación provocada por el bombeo activo de H^+ hacia la luz del túbulo es contrarrestada por la acción de la anhidrasa carbónica luminal.

La segunda consideración importante surge de la pregunta de por qué un anticuerpo surgido contra el parásito actuaría en su propio beneficio.

Una relación parásito-huesped adecuadamente balanceada implica una suerte de compromiso entre los mecanismos de virulancia del parásito y los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos del huesped.

Los procesos de selección natural, actuando como motores de la evolución, concluyen en el logro de una co-evolución adaptativa en esta compleja relación parásito-huesped.

Esta co-evolución involucra tanto el desarrollo de estrategias de evasión a la respuesta inmune y a la defensa inespecífica del huesped, así como también estrategias oportunistas que resultan en la explotación de estos procesos por parte de los parásitos favoreciendo su establecimiento dentro del organismo huesped.

Algunos parásitos utilizan mecanismos de evasión a la muerte mediada por el sistema complemento. *Leishmania major*, por ejemplo, posee una cubierta superficial de lipofosfoglicanos (LPG) que activa eficientemente el sistema complemento. Une C3, promoviendo la formación del complejo lítico C5b-9. Sin embargo, un proceso de elongación regulado de LPG impide la inserción de este complejo en la membrana del parásito impidiendo así la lisis. *Leishmania* no sólo evita la muerte mediada por complemento, sino que también

explota los receptores del complemento para ganar acceso a las células. Se une a ellos a través de C3, favoreciéndose así su internalización.

T. cruzi tiene un estadio extracelular virulento, el tripomastigote, que es refractario a la lisis mediada por complemento. (Nogueira, 1975). Este estadio produce moléculas que inhiben a la C3 convertasa, bloqueando así la activación del complemento sobre la superficie del parásito.

Diversas estrategias de evasión han sido desarrolladas también durante la entrada de los parásitos a las células. La captación de microorganismos por los fagocitos está frecuentemente asociada a la generación de productos tóxicos del oxígeno. Algunos parásitos entran a las células utilizando receptores no asociados al estallido respiratorio.

Luego de la entrada a las células han sido descriptos varios mecanismos de evasión. Diversas especies de *Leishmania* pueden sobrevivir en fagolisosomas, exhibiendo un metabolismo aumentado bajo condiciones acídicas, reflejando su adaptación al crecimiento intracelular.

Estadíos virulentos de *T. cruzi* rompen la membrana vacuolar 1-2hs después de la invasión entrando al citoplasma donde se replican. Para que se produzca esta ruptura la vacuola debe ser acidificada. (Ley, 1990) Este evento de acidificación está asociado con la liberación de posibles proteínas formadoras de poros desde el parásito, que son antigénicamente similares al componente membranolítico C9 del sistema complemento. (Andrews, 1990). Escapando al citoplasma, el estadio infectivo de *T. cruzi* evita los efectos dañinos del pH bajo y de las altas concentraciones de las hidrolasas lisosomales.

En el caso de *T.gondii* el hecho de que un anticuerpo de fase aguda como lo es Tg5 promueva un aumento del grado de infectividad nos haría pensar en una estrategia no considerada hasta el momento, por la cual este parásito explotaría en su propio beneficio la defensa inmune específica del huesped. En la etapa aguda ciertos antígenos secretados por el taquizoíto desencadenarían una respuesta inmune primaria que favorecería el establecimiento del parásito. Anticuerpos como Tg5 activarían al antígeno secretado por el parásito, con actividad de anhidrasa carbónica, cuya función contribuiría al bloqueo de la acidificación del fagosoma, permitiendo la permanencia y proliferación del taquizoíto.

Esta hipótesis podría explicar en parte algunas observaciones previas realizadas por otros autores y recopiladas por Krahenbul y Remington. En esta revisión los autores mencionan lo siguiente:

Se han realizado una variedad de intentos para conferir resistencia contra *T.gondii* por transferencia pasiva de antisuero homólogo u heterólogo. Eichenwald (1949) observó que cuando suero inmune es transferido a ratones crónicamente infectados, la infección parece exacerbarse temporalmente, como se evidenció por la parasitemia.

Werner (1978) encontró que la administración por vía oral o intraperitoneal de un antisuero contra *T.gondii* de alto título, hecho en conejo, a ratones crónicamente infectados resultó en la ruptura de quistes en el cerebro de estos ratones.

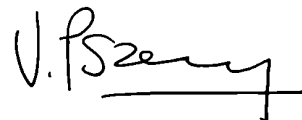
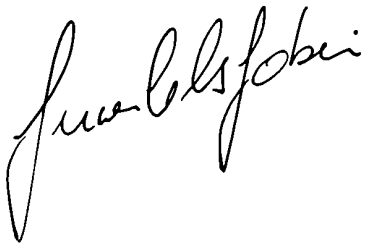
Gill y Prakash (1970) describieron que la transferencia pasiva de suero de conejo inmune a conejos o ratones antes del desafío con *T.gondii* de la cepa RH no confirió protección.

Si analizamos estas observaciones bajo la óptica de nuestra

hipótesis, podría resultar coherente el hecho de que la transferencia pasiva de suero inmune produzca síntomas de exacerbación o reactivación de la infección.

10. PROYECCIONES FUTURAS.

A partir de los resultados del presente trabajo se plantean varias líneas de investigación que incluyen la secuenciación completa del gen de *Toxoplasma gondii* que codifica la proteína con actividad de anhidrasa carbónica, estudios precisos de inmunolocalización con microscopía electrónica, utilizando el AcMc Tg5, purificación de la enzima para su exhaustiva caracterización. Estos y otros estudios permitirán una mayor comprensión de los procesos involucrados en el establecimiento del taquizoíto dentro de la célula huésped. Ello contribuirá a orientar el desarrollo de estrategias terapéuticas y de prevención más efectivas.



- Abbas, A.M.A.: Comparative study of methods used for the isolation of *Toxoplasma gondii*. Bull WHO 36:344-346, 1967.

- Alford, C.A., Jr., Stagno, S and Reynolds, D. W.: Congenital toxoplasmosis: clinical, laboratory and therapeutic considerations, with special reference to subclinical disease. Bull.N.Y. Acad. Med. 50:160-181.1974.

- Angel, S. Maero, E., Blanco, J.C., Pszeny, V., Zala, C., Gonzalez, R., Perelmutter, H. and Garberi, J.C. Early Diagnosis of Toxoplasmic Encephalitis in AIDS Patients by Dot Blot Hybridization Analysis. Journal of Clin. Microbiol. 30(12):3286-3287. 1992.

- Angel, S.O., Blanco, J.C., Maero, E., Pszeny, V. and Garberi, J.C. Repetitive DNA sequences of *Toxoplasma gondii* for development of diagnostic probe. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 86(4):483-484. 1991.

- Andrews, N.W. y col., Cell. 61:1277-1287. 1990.

- Aparicio Garrido, J. and Cour Boveda, I. Aplicación de la inmunofluorescencia indirecta al estudio de las fracciones inmunoglobulínicas en el diagnóstico de la toxoplasmosis adquirida y congénita. Interés clínico. Rev. Clin. Esp. 125:37-42. 1972.

- Araujo, F.G. and Remington, J.S. Effect of clindamycin on acute and chronic toxoplasmosis in mice. Antimicrob. Agents Chemother. 5:647-651. 1974.

- Araujo, F.G. and Remington, J.S.: Antigenemia in recently acquired acute toxoplasmosis. J. Infect. Dis. 141:144-150. 1980.

- Araujo, F.G., Guptill, D.R. and Remington, J.S. Azithromycin, a macrolide antibiotic with potent activity against *Toxoplasma gondii*. Antimicrob. Agents Chemoter. 32:755-757. 1988.

-Araujo, F.G., Handman, E. and Remington, J.S.: Use of monoclonal antibodies to detect antigens of *Toxoplasma gondii* in serum and other body fluids. *Infect. Immun.* 30:12-16, 1980.

-Araujo-Jorge, T.C. and De Souza, W. Effect of carbohydrates, periodate and enzymes in the process of endocytosis of *Trypanosoma cruzi* by macrophages. *Act. Trop.* 41:17-28. 1984.

-Atias, A. y Neghme, A. *Parasitología Clínica.* (Intermédica eds.). pp 231-247, Buenos Aires. 1978.

-Balfour, A.H., Fleck, D.G., Hughes, H.P.A. and Sharp, D. Comparative study of three tests (dye test, indirect haemagglutination test, latex agglutination test) for the detection of antibodies to *Toxoplasma gondii* in human sera. *J.Clin. Pathol.* 35:228-232. 1982.

-Barker Jr., R.H. Minireview: DNA probe diagnosis of parasitic infections. *Experimental Parasitology.* 70:494-499. 1990.

-Beverley, J.K.A., Beattie, C.P. Glandular Toxoplasmosis. A survey of 30 cases. *Lancet.* 2:379-383. 1958.

-Blanco, J.C., Angel, S., Maero, E., Pszeny, V., Serpente, Patricia. and Garberi, J.C. Cloning of repetitive DNA sequences from *Toxoplasma gondii* and their usefulness for parasite detection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46(3):350-357. 1992.

-Bommer, W. The life cycle of virulent *Toxoplasma* in cell cultures. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 47:505-512. 1969.

-Bourguin, I., Chardes, T. Mevelec, M.N., Woodman, J.P. and Bout, D. Amplification of the secretory IgA response to *Toxoplasma gondii* using cholera toxin, *FEMS Microbiol.* 81:265-272. 1991.

-Brinkley, B.R. Microtubule organizing centers. *Ann. Rev. Cell.*

Biol. 1:145-172. 1985.

-Burg, J.L., Grover, C.M., Pouletty, P. and Boothroyd, J.C. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polimerase chain reaction. J.Clin. Microbiol. 27:1787-1792. 1989.

-Burg, J.L., Perelman, D., Kasper, L.H., Ware, P.L. and Boothroyd, J.C. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. Journal of Immunology. 141:3584-3591. 1988.

-Camargo, M.E., Ferreira, A.W., Mineo, J.R. Takiguti, C.K., and Nakahara, C.S. Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. Infect Immun. 21(1):55-58. 1978a.

-Camargo, M.E., Leser, P.G., Kiss, M.H.B. and Amato Neto, V. Serology in early diagnosis of congenital toxoplasmosis. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 20:152--160. 1978.

-Carlier, Y., Bout, B. Dessaint, J.P., Capron, A., Van Knapen, F., Ruitenberg, E.G., Bergquist, R., Huldt, G. Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and other serological test for the diagnosis of toxoplasmosis. Bull WHO. 58:99-105. 1980.

-Cesbron-Delauw, M.F., Guy, B., Torpier, G., Pierce, R.J., Lenzen, G., Cesbron, J.Y. Charif, H. Lepage, P., Darcy, F., Lecocq, J.P. and Capron, A. Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 86:7537-7541. 1989.

-Chan, J and Luft, B.J. Activity of Roxithromycin (RU 28965), a macrolide, against *Toxoplasma gondii* infection mice. Antimicrob.

Agents. Chemother. 30:323-324. 1986.

-Chang, C.H., Stulberg, C., Bollinger, R. O., Walker, R. and Brough, A. J.: Isolation of *Toxoplasma gondii* in tissue culture. *J. Pediatr.* 81:790-791. 1972.

-Chardes, T., Bourguin, I., Mevelec, M.N., Dubremetz, J.F. and Bout, D. Antibodies responses to *Toxoplasma gondii* in sera, intestinal, secretions and milk from orally infected mice and characterization of target antigens. *Infect. Immunity.* 58:1240-1246. 1990.

-Charif, H., Darcy, F., Torpier, G., Cesbron-Delaw, M.F. and Capron, A. *Toxoplasma gondii*: Characterization and localization of antigens secreted from tachizoites. *Experimental Parasitology.* 71:114-124. 1990.

-Chiscano Rudolph, R. y Sierra Lopez, A. Indices de infección (prevalencia) de la toxoplasmosis en Tenerife. *Laboratorio.* 36:201-212. 1981.

-Christie, E., Pappas, P.W. and Dubey, J.P. Ultraestructure of encystement of *Toxoplasma gondii* oocysts. *J. Protozool.* 25:438-443. 1978.

-Cintra, W.M. and De Souza, W. Immunocytochemical localization of cytoskeletal proteins and electron microscopy de detergent extracted tachizoites of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Submicroscopy Cytology.* 17:503-508. 1985.

-Conway de Macario, E. Macario, A.J.L. and Jovell, R.J. *J. Immunol. Meth.* 59:39-47. 1983.

-Cour Boveda, I. y Aparicio Garrido, J. Toxoplasmosis: Contribución a su estudio epidemiológico en España. *Rev. Diag. Biol.* 26:525-534. 1976.

- Crane, M.J., and Dvorak, J.D. Influence of monosaccharides on the infection of vertebrate cells by *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii*. Molecular and Biochemical Parasitology. 5:333-341. 1982.

- De Carvalho, L. and De Souza, W. Cytochemical localization of plasma membrane enzyme markers during interiorization of tachyzoites of *Toxoplasma gondii* by macrophages. Journal of Protozoology. 36:164-170. 1989.

- De Carvalho, L. and De Souza, W. Internalization of surface anionic sites and phagosome-lysosome fusion during interaction of *Toxoplasma gondii* with macrophages. European Journal of Cellular Biology. 51:211-219. 1990.

- De Carvalho, L., Souto-Padron, T. and De Souza, W. Localization of Lectin-Binding sites and sugar-binding proteins in tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. J. Parasitol. 77(1):156-161. 1991.

- Decoster, A., Darcy, F., Caron, A. and Capron, A., IgA antibodies against p30 as markers of congenital and acute toxoplasmosis. Lancet. 2:1104-1107. 1988b.

- Desmonts, G and Couvreur, J. Toxoplasmosis in pregnancy and its transmission to the fetus. Bull. New. York. Acad. Med. 50(2):146. 1974.

- Desmonts, G. and Couver, J. Congenital toxoplasmosis: a prospective study of the offspring of 542 women who acquired toxoplasmosis during pregnancy. Pathophysiology of congenital disease. (Thalhammer, Baumgarten and Pollak, eds): Perinatal Medicine. Sixth European Congress, Stuttgart, George Thieme Publishers. Pg 51-60. 1979.

- Desmonts, G., Naot, Y. and Remington, J. S.: An IgM immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases:

diagnosis of acute congenital and acquired *Toxoplasma* infections. *J. Clin. Microbiol.* 14:456-491, 1981.

-Dos Santos, N.J.G.: *Toxoplasmosis a historical review, direct diagnostic microscopy and report of a case.* *Am. J. Clin. Pathol.* 63:909-915, 1975.

-Dubey, J.P. and Frankel, J.K., Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J. Protozool.* 19:155. 1972.

-Dupouy-Camet, J. de Souza, L., Bougnoux, M.E., Mandelbrot, L. Hennequin, C., Dommergues, M., Benarous, R. and Tourte-Schaerfer, C. Preventing congenital toxoplasmosis. *The Lancet.* 336:1017-1018. 1990.

-Duquesne, V., Auriault, C., Darcy, F., Declavel, J.P. and Capron, A. Protection of nude rats against *Toxoplasma* infection by excreted-secreted antigen-specific helper T cells. *Infection and Immunity.* 58:2120-2126. 1990.

-Eichenwald, H.F. Experimental toxoplasmosis II. Effect of sulfadiazine and antiserum on congenital toxoplasmosis in mice. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 71:327. 1949.

-Eichenwald, H.F. and Shinefield, H.R. Antibody production by human fetus. *J. Pediatr.* 63:870. 1963.

-Engvall, E. and Perlmann, P. *Immunochemistry*, 8:871. 1971.

-Erlich, H. A., Rodgers, G., Vaillancourt, P., Araujo, F. G. and Remington, J.S. Identification of an antigen-specific immunoglobulin M antibody associated with acute *Toxoplasma* infection. *Infection and Immunity.* 41:683-690. 1983.

-Feldman, H.A. and Lamb, G.A.. A micromodification of the *Toxoplasma* dye test. *J. Parasitol.* 52:415. 1966.

- Frenkel, J. K.: Toxoplasmosis: parasite life cycle, pathology and immunology. In Hammond. D.M. (ed): The Coccidia, Baltimore. University Park Press. pp.343-410. 1973.
- Frenkel, J.K. Pathology and pathogenesis of congenital toxoplasmosis. Bull. N. Y. Acad. Med. 50:182-191. 1974.
- Fulton, J.D. and Turk, J.L. Direct agglutination test for *Toxoplasma gondii*. Lancet. 2:1068-1069. 1959.
- Galfre, G., Howe, S., Milstein, C., Butchner, G.W. and Howard, T. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. Nature. 266:550-552. 1977.
- Gallois, Y., Foussard, F., Girault, A., Hodberg, J., Tricaud, A., Mauras, G. and Motta, C. Membrane fluidity of *Toxoplasma gondii*: A fluorescence polarization study. Biology of the Cell. 62:11-15. 1988.
- Garberi, J.C., Pastini, A.C., Pszeny, V., Angel, S.O., Blanco, J.C., Romano, L.A. y Haas, E. Anticuerpos monoclonales contra *Toxoplasma gondii* para el diagnóstico histopatológico de la toxoplasmosis. Medicina. 51(3):283-284. 1991.
- Garberi, J.C., Blanco, J.C., Angel S.O., Pszeny, V. Arakelian M.C. and Pastini, A. A rapid method for the isolation of pure tachyzoites. Preliminary characterization of its genome. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 85(4):429-434. 1990.
- Gill, H.S. and Prakash, O. Chemotherapy of experimental *Toxoplasma gondii* (RH strain) infection. Indian J. med. Res. 58:1197. 1970.
- Goldman, M., Carver, R.K., Sulzer, A. J.: Reproduction of *Toxoplasma gondii* by internal budding, J. Parasitol., 44(20):161. 1958.

-Gray, G. F., Jr. Kimball, A.C. and Kean, B.H. The posterior cervical lymph node in toxoplasmosis. Am. J. Pathol. 69:349-356. 1972.

-Grover, C.C., Thulliez, P. Remington, J.S., Boothroyd, J.C. Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction in amniotic fluid. J. Clin. Microbiol. 28:2297-2301. 1990.

-Handman, E., Giding, J.W. and Remington, J.S. Detection and characterization of membrane antigens of *Toxoplasma gondii*. Journal of Immunology. 124:2578-2583. 1980.

-Hayes, K., Billson, F.A., Jack, I., Sanderson, L., Rogers, J.G., Greer, C.H., Path, F.C. and Booth, L.S.: Cell culture isolation of *Toxoplasma gondii* from an infant with unusual ocular features. Med. J. Aust. 1:1297-1299, 1973.

-Hoare, C.A., The developmental stages of *Toxoplasma*. J. Trop. Med. Hyg., 75, 56, 1972.

-Holliman, R.E., Johnson, J.B., Savva, D. Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in association with AIDS using the polymerase chain reaction. Scand. J. Infect. Dis. 22:243-244. 1990.

-Huynh, T.B., Young, R.A., Davis, R.W. Constructing and screening cDNA libraries in Lambda gt10 and Lambda gt11. DNA cloning. Vol 1. A practical approach. Ed. by D.M. Glover. (IRL Press, Oxford, Washington DC). 1985.

-Hoshino-Shimizu, S., Mineo, J.R. and Camargo, M.E. Lectin used in the purification process of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. Journal of Parasitology. 66:989-991. 1980.

-Jacobs, L. and Lunde, M.N., "A hemagglutination test for Toxoplasmosis". J. Parasitol., 43:308-314. 1957.

- Jacobs, L.: New Knowledge of Toxoplasma and toxoplasmosis. Adv. Parasitol. 11:631-669. 1973.
- Johnson, A.M., McDonald, P.J. and Neoh, S.H. Monoclonal antibodies to Toxoplasma cell membrane surface antigens protects mice from toxoplasmosis. J. Protozool. 30:351. 1983.
- Joiner, K.A., Fuhrman, S.A., Miettinen, H. M., Kasper, L. H. and Mallman, I. *Toxoplasma gondii*: Fusion competente of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. Science. 249: 641-646. 1990.
- Joiner, K.A., Furtado, G., Mellman, I., Kleinman, H., Miettinen, H., Kasper, L.H., Hall, L. and Fuhrman, S.A. Cell attachment and invasion by tachyzoite of *Toxoplasma gondii*. Journal of Cellular Biochemistry. 13E,64. 1989.
- Jones, T.C. Immunopathology of toxoplasmosis. Springer. Semir. Immunopathology. 2:387-397. 1980.
- Karim, K. A. and Ludlam, G.B.: The relationship and significance of antibody titres as determined by various serological methods in glandular and ocular toxoplasmosis. J. Clin. Pathol. 28:42-49. 1975.
- Kelen, A.E. et al. Indirect fluorescent antibody method in serodignosis of Toxoplasmosis. Canad. J. Microbiol., 8:545-555. 1962.
- Kimata, I. and Tanabe, K. Secretion by *Toxoplasma gondii* of an antigen that appears to become associated with the parasitophorous vacuole membrane upon invasion of the host cell. Journal of Cell Science. 88:231-239. (1987).
- Kingsbury, D.T. DNA probes in the diagnosis of genetic and infectious deseases. TIBTECH. Elsevier Publications, Cambridge. pg

107-111. 1987.

-Knierim, F. y Saavedra, P., "Técnica de la reacción de hemaglutinación aplicada al diagnóstico serológico de las parasitosis". Bol. Chile. Parasitol. 21:39-44. 1966.

-Kohler, G. and Milstein. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 256:495-497. 1974.

-Kramer, J. Chalupsky, J. and Hubner, J. Relationship of the immunofluorescence reaction and the Sabin-Feldman reaction. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 14:129-134. 1970.

-Krick, J.A. and Remington, J.S. Toxoplasmosis in the adult. An overview. N.Engl. J. Med. 298:550-551. 1978.

-Lecordier, L., Mercier, C., Torpier, G., Tourvieille, B., Darcy, F., Liu, J.L, Maes, P., Tartar, A., Capron, A. and Cesbron-Delaw, M. Molecular structure of a *Toxoplasma gondii* dense granule antigens (GRA 5) associated with the parasitophorous vacuole membrane. Molecular and Biochemical Parasitology. 59:143-154. 1993.

- Laemmli, U.K. Nature. 227:680-685. 1970.

-Leriche, M.A. and Dubremetz, J.F. Characterization of the protein contents of rhoptries and dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies. Molecular and Biochemical Parasitology. 45:249-260. 1991.

-Leriche, M.A. and Dubremetz, J.F. Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion. Parasitol Res. 76:559-562. (1990).

- Levine, N.: Sarcocystis, Toxoplasma and related protozoa. In Levine, N. (ed): Protozoan Parasites of Domestic Animals and of Man. 2nd ed. Minneapolis. Burgess Publishing Company. pp 288-316. 1973.
- Ley, V. y col. J. Exp. Med. 171:401-413. 1990.
- Lin, T.M., Halbert, S.P. and O'Connor, G.R. Standardized quantitative enzyme-linked immunoassay for antibodies to *Toxoplasma gondii*. J. Clin Microbiol. 11:675-681. 1980.
- Lycke, E. and Norrby, R. Demonstration of a factor of *Toxoplasma gondii* enhancing the penetration of Toxoplasma parasites into cultured host cell. Br. J. Exp. Pathol. 47:248-256. 1966.
- Lycke, E., Carlberg, K. and Norrby, R. Interactions between *Toxoplasma gondii* and its host cell: function of the penetration-enhancing factor of Toxoplasma. Infect. Immun. 11:853-861. 1975.
- Mauras, G., Dodeur, M., Laget, P., Senet, J.M. and Bourillon, R. Partial resolution of the sugar content of *Toxoplasma gondii* membrane. Biochemical and Biophysical Research Communications. 97:906912. 1980.
- McMaster, P.R.B., Powers, K. G., Finerty, J.F. and Lunde, M.N. The effects of two chlorinated lincomycin analogues against acute toxoplasmosis in mice. Amer. J. Med. Hyg. 22:14-17. 1973.
- Meirelles, M.N., Martinez-Palomo, L.A., Souto-Padron, T. and De Souza, W. Participation of concanavalin A binding sites in the interaction between *Trypanosoma cruzi* and macrophages. Journal of Cell Science. 62:287-299. 1983..
- Mellman I., Lunn, J.A., Webster, P., Lombillo S. and Joiner, K. Cell Biology of *Toxoplasma gondii* entry into host cells. Mem.

Inst. Oswaldo Cruz. Suppl.1. Vol 86: 6-7. 1991.

-Milatovic, D. and Braveny, I. Enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of toxoplasmosis. J. Clin. Pathol.. 33:841-844. 1980.

-Mineo, J.R., Camargo, M.E., Ferreira, A.W. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. Infect Immun. 27:283-287. 1980.

-Mullis, K. B. and Faloona, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chain reaction. Methods Enzimol. 155:335-350. 1987.

-Naot, Y. and Remington, J.S.: An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies of *Toxoplasma gondii*: use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. J. Infect Dis. 142:757-766. 1980.

-Naot, Y., Desmonts, G. and Remington, J. S. IgM enzyme-linked immunosorbent assay test for the diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection. J. Pediatr. 98:32-36. 1981.

-Nichols, B. A. and Chiappino M. L. Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. J. Protozool. 34(2):217-226, 1987.

-Nichols, B.A. and O'Connor, G.R. Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoan *Toxoplasma gondii*. Lab. Invest. 44:324-335. 1981.

-Nichols, B.A., Chiappino, M.L. and O'Connor, G.R. Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. J. Ultrastruc. Res. 83:85-98. 1983.

-Nogueira, N., Bianco, C. and Cohn, Z. J. Exp. Med. 142:224-232.

1975.

- Norrby, R. Immunological study on the host cell penetration factor of *Toxoplasma gondii*. Infect. Immunn. 3:278-286. 1971.

-Pedrol, E., Gonzalez-Clemente, J.M., Gatell, J.M., Mallolas, J., Miro, J.M., Graus, F., Alvarez, R., Mercader, J.M., Berenguer, J. Jimenez de Anta, M.T., Valls, M.E. and Soriano, E. Central nervous system toxoplasmosis in AIDS patients: efficacy of an intermittent maintenance therapy. AIDS. 4:551-517. 1990.

-Pfefferkorn, E.R., Pfefferkorn, L.C. and Colby, E.D.:Development of gametes and oocyst in cats fed cyst deribed from cloned trophozoites of *Toxoplasma gondii*. J. Parasitology 63, 48. 1977.

-Porchet-Hennere, E and Nicolas G. Are rhoptries of coccidia really extrusomas?. J. Ultrastruct. Res. 84:194-203. 1983.

-Remington, J.S. and Desmond, G. Infectious disease of the fetus and newborn infant. (Remington and klein eds). pg 167-172. 1983.

-Remington, J.S. and Desmond, Toxoplasmosis. In: Remington, J.S., Klein, J.P. Eds.: Infection disease of the fetus and the newborn infants. Philadelphia. W.B. Saunders Co., pg 191-332. 1976.

-Remington, J.S. and Desmonts, G. Toxoplasmosis. In: Infectious disease of the fetus and newborn infant. (Remington J.S. and Klein, J.P. eds.) W.B. Saunders Company, Philadelphia. pp143-283. 1983.

-Remington, J.S., Eimstad, W.M., Araujo, F. G. J. Clin. Microbiol. 17:939. 1983.

-Remington, J.S., Miller, M.J. and Brownlee, I.: IgM antibodies in acute toxoplasmosis. I. Diagnostic significance in congenital cases and method for their rapid demostration. Pediatrics.

41:1082-1091. 1968.

-Remington, J.S., Miller, M.J. and Brownlee, I. IgM antibodies in acute toxoplasmosis. II. Prevalence and significance in acquired cases. J. Lab. Clin. Med. 71:855-866. 1968.

-Remington, J.S., Potasman, I. and Araujo, F.G. *Toxoplasma* antigens recognized by naturally occurring human antibodies. Journal of Clinical Microbiology. 24(6):1050-1054. 1986.

-Sadak, A. Taghy, Z., Fortier, B and Dubremetz, J.F. Characterization of a family of rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. Mol. and Biochem. Parasitol. 29: 203-211. 1988.

-Sabin, A.B. and Feldman, H.A. Dyes as microchemicals indicators of a new immunity phenomem affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). Science 108:660-663. 1948.

-Saffer L.D., Puijalon O. M., Dubremetz J.F., and Schwartzman. Localization of a *Toxoplasma gondii* Rhoptry Protein by Immunoelectron Microscopy During and After Host Cell Penetration. J. Protozool. 39(4):526-530. 1992.

-Saffer, L. D., Krug, S.A. and Schwartzman. The role of phospholipase in host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 40:145-149. 1989.

-Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74 (Nro. 12): 3463-3464. 1977.

-Santoro, F., Charif, H. and Capron, A. The immunodominant epitope of the major membrane tachyzoite protein (p30) of *Toxoplasma gondii*. Parasite Immunology. 8:631-639. 1986.

- Savva, D., Johnson, J.D. and Holliman, R. Polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii*. J. Med. Microbiol.. 32:25-31. 1990.

- Scholtyseck, E. Ultrastructure, En Hammond, D. M. and Long, P.L. eds., The Coccidia. University Park Press, Baltimore. 81-144. 1973.

- Schreiber, R.D. and Feldman, H.A. Identification of the activator system for antibody to *Toxoplasma* as the classical complement pathway. J. Infect. Dis. 141:366-369. 1980.

- Schwartzman, J.D. Inhibition of penetration- enhancing factor by *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies specific for rhoptries. Infection and Immunity. 51:760-764. 1986.

- Schwartzman, J.D. and Krug, E.C. *Toxoplasma gondii*: characterization of monoclonal antibodies that recognize rhoptries. Exp. Parasitol. 68:74-82. 1989.

- Sharma, S.D., Araujo, F.G. and Remington, J.S. *Toxoplasma* antigen isolated by affinity chromatography with monoclonal antibody protects mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. Journal of Immunology. 133:2818-2820. 1984.

- Sibley, D.L. and Krahenbuhl J.L. Modification of host cell phagosomes by *Toxoplasma gondii* involves redistribution of surface proteins and secretion of a 32 kDa protein. European Journal of Cell Biology. 47:81-87. 1988.

- Sibley, D.L., Krahenbuhl, J.L., Adams, M.W. and Weidner, E. *Toxoplasma* modifies macrophage phagosomes by secretion a vesicular network rich in surface proteins. The Journal of Cell Biology. 103:867-874. 1986.

-Sibley, L.D. and Sharma, S.D. Ultrastructural localization of an intracellular *Toxoplasma* protein that induces protection in mice. *Infection and Immunity*. 55:2137-2141. 1987.

-Sibley, L.D., Weidner, E. and Krahenbul, L. Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature*. 315:416-419. 1985.

-Stagno, S. and Thierman, E.: Valor de la inmunofluorescencia indirecta en el diagnostico serologico de la toxoplasmosis aguda. *Bol. Chil. Parasitol.* 25:915. 1970.

-Stiehm, E.R., Amman, A.J. and Cherry, J.D. Elevated cord macroglobulins in the diagnosis of intrauterine infections. *N. Engl. J. Med.* 275:971-977. 1966.

-Sultzer, A.J., Hall, E.C. Indirect fluorescent antibody test for parasitic diseases. IV Statistical study of variation in the indirect fluorescent antibody (IFA) test for toxoplasmosis. *Am. J. Epidemiol.* 86:401-407. 1967.

-Tabbara, K., Nozik, R.A. and O'Connor, G. R. Clindamycin effects on experimental ocular toxoplasmosis in the rabbit. *Arch. Ophthalmol.* 92:244-247. 1974.

-Tanabe, K. and Murakami, K. Reduction in the mitochondrial membrane potential of *Toxoplasma gondii* after invasion of host cell. *Journal of Cell Science*. 70:73-81. 1984.

-Tenter, A.M. and Johnson, A.M. Recognition of recombinant *Toxoplasma gondii* antigens by human sera in an ELISA. *Parasitol. Res.* 77:197-203. 1991.

-Tomavo, S., Schwarz, R.T. and Dubremetz, J.F., Evidence for glycosyl-phosphatidyl-inositol anchoring of *Toxoplasma gondii* mayor surface antigen. *Molecular and Cellular Biology*.

9:4576-4580. 1989.

-Van Knapen, F. and Panggabean, S.O.,: Detection of circulating antigen during acute infections with *Toxoplasma gondii* by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 6:545-547. 1977.

-Van Loon A.M. and Van der Veen, J. Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of toxoplasma antibodies in human sera. J. Clin. Pathol. 33:635-639. 1980.

-Van Weemen, B.K. and Schuurs, A.H.W.M. FEBS Lett. 15:232. 1971.

-Villalta, F. and Kierszenbaum. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: Role of cell surface galactose residues. Biochemical and Biophysical Research Communications 119:228-235. 1984.

-Waldeland, H. Toxoplasmosis in sheep. The reliability of a microtiter system in Sabin and Feldman's dye test. Acta Vet. Scand. 17:426-431. 1976.

-Walton, B.C., Benchoff, B.M., Brooks, W.H. Comparison of the indirect fluorescent antibody test and the methylene blue dye test for detection of antibodies to *Toxoplasma gondii*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 15:149-152. 1966.

-Warren, J. and Sabin, A. B., The Complement Fixation Reaction in Toxoplasmic Infection. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 51:11-14, 1942.

-Weiss, L.M., Udem, S.A., Salgo, M., Tanowitz, H.B., and Wittner, M. Sensitive and specific detection of *Toxoplasma* DNA in an experimental murine model: use of *Toxoplasma gondii* specific cDNA and polimerase chain reaction. J. Infect. Dis. 163:180-186. 1991.

-Werner, H., Masihi, K.N. and Meingassner, J.G. Investigation on the effect of immune serum therapy on cysts of *Toxoplasma gondii*

in latent infected mice. Zentralbl. Bakteriол. [Orig. A]. 242:405. 1978.

-Wilson, C.B., Remington, J.S., Stagno, S. and Reynolds, D.W. Development of adverse sequelae in children born with subclinical Toxoplasma infection. Pediatrics. 66:767-774. 1980.

FCE y N BIBLIOTECA