

Tesis de Posgrado

Regulación de la respuesta inmune contra el toxoplasma gondii en la mucosa intestinal y análisis del valor inmunoproláctico de antígenos del parásito en el modelo murino

Martin, Valentina

2003

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:

Martin, Valentina. (2003). Regulación de la respuesta inmune contra el toxoplasma gondii en la mucosa intestinal y análisis del valor inmunoproláctico de antígenos del parásito en el modelo murino. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3675_Martin.pdf

Cita tipo Chicago:

Martin, Valentina. "Regulación de la respuesta inmune contra el toxoplasma gondii en la mucosa intestinal y análisis del valor inmunoproláctico de antígenos del parásito en el modelo murino". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3675_Martin.pdf

EXACTAS UBA

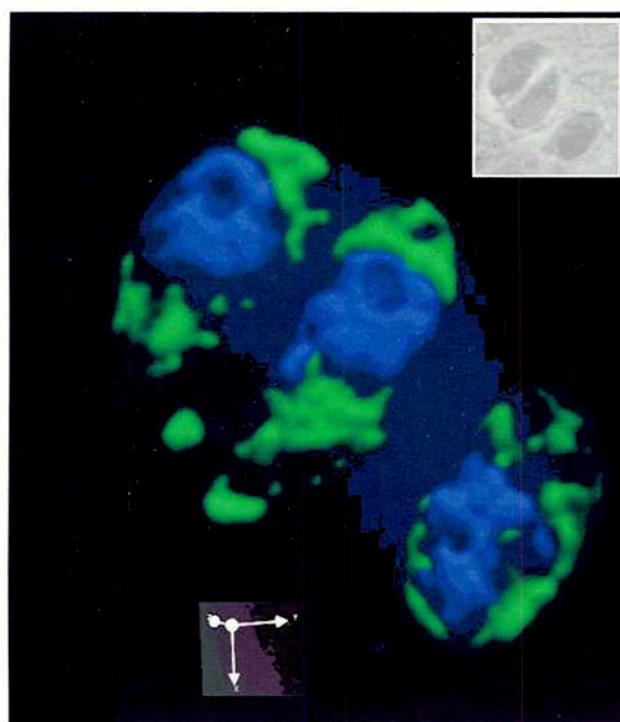
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

**REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE
CONTRA EL TOXOPLASMA GONDII EN LA
MUCOSA INTESTINAL Y
ANÁLISIS DEL VALOR INMUOPROFILÁCTICO DE
ANTÍGENOS DEL PARÁSITO EN EL MODELO MURINO**



Lic. Valentina Martin
Tesis para optar al Título de Doctor en Ciencias Biológicas
de la Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Director: Dr. Lloyd Howard Kasper
Co-Director: Dr. Sergio Oscar Angel
2003

Nº 3675

RESUMEN

El *Toxoplasma gondii*, es un parásito protozoario que infecta al hospedador mediante la ingestión oral de quistes tisulares u ooquistes induciendo una respuesta inmune en el intestino y sistémica del tipo Th1, produciendo inmunidad contra una re-infección. La infección experimental oral de diferentes cepas de ratones resulta en dos modelos interesantes de regulación de la respuesta inmune. Los ratones C57BL/6 (H-2^b) desarrollan una ileitis inflamatoria aguda (IBD), caracterizada por la sobreproducción de IFN- γ y la síntesis de óxido nítrico en el intestino delgado dentro de los primeros siete días que, dependiendo de la dosis parasitaria inicial, puede producir la muerte debido al proceso inflamatorio. En cambio los ratones C3H/HeJ y CBA/J (H-2^K) muestran solo pequeños procesos inflamatorios, cursando una infección aguda normal con establecimiento de la infección crónica.

En el presente estudio, se demuestra que los linfocitos intraepiteliales (IELs) primados con antígeno de *T. gondii* previenen la ileitis aguda en ratones susceptibles (C57BL/6), e *in vitro* reducen la producción de quemoquinas inflamatorias por enterocitos infectados, evento que estaría mediado por el TGF- β que secretan. Los IELs serían un componente esencial en la homeostasis del intestino luego de la infección oral con este parásito.

Como un primer acercamiento en el conocimiento de la respuesta que este parásito genera en ratones que cursan una infección aguda normal, se caracterizó la respuesta de la línea celular enterocítica MODE-K (H-2^K) frente a la infección para estudiar su valor como modelo *in vitro*. Estas células mostraron activarse frente a la infección con taquizoitos del *T. gondii*, secretando un patrón de citoquinas y quemoquinas cuya cinética resulta cepa específica. Los IELs derivados de los ratones CBA/J mostraron reducir la expresión de quemoquinas en los enterocitos infectados, y este efecto fue observado tanto en IELs no primados como primados. Estos IELs de ratones naïve, a diferencia de los provenientes de ratones susceptibles, producirían citoquinas anti-inflamatorias en forma endógena lo cual podría ser un componente importante en la resistencia al desarrollo de la ileitis aguda frente a la infección.

La segunda parte de esta tesis estuvo enfocada al estudio de la habilidad de antígenos específicos del parásito de estimular *in vitro* una respuesta a nivel sistémico y de mucosas luego de una infección oral de ratones susceptibles (C57BL/6) y resistentes (BALB/c [H-2^d]) con el fin de evaluar su posible uso en el desarrollo de vacunas. Para esto se usaron formas

recombinantes de los antígenos ROP2, GRA4 y TgPI. Los antígenos rROP2 y rGRA4 mostraron inducir una respuesta humoral, e *in vitro* estimularon una respuesta celular en células de nódulos mesentéricos linfáticos y de bazo del tipo Th1, que resultaron variables según la cepa de ratón que fue infectada. En cambio el antígeno rTgPI genera una baja respuesta inmune durante la infección. Notablemente, la cepa de ratones C57BL/6 produjo altos niveles de IFN- γ y una baja producción de IL-5, mientras que en BALB/c la producción de ambas citoquinas fue menor o nula respectivamente.

Estos antígenos fueron utilizados en ensayos de inmunización de ratones de las cepas C57BL/6 y C3H con el fin de estudiar su valor inmunoprotectivo frente a la infección oral cuando se los combina con hidróxido de aluminio como adyuvante. rGRA4 indujo una protección parcial en ambas cepas de ratones, generando una respuesta predominante del tipo Th1 mientras que rROP2 confirió protección sólo en la cepa C3H, siendo ésta más importante que rGra4. La inmunización con una mezcla de rROP2 y rGRA4, como con una proteína quimérica rROP2-rGRA4, indujo una protección parcial similar a la obtenida con el antígeno rGRA4 solo (C57BL/6) o rROP2 solo (C3H). Finalmente, el valor inmunoprotectivo de rGRA4 combinado con aluminio fue comparado con el producido por un sistema de vacunas de ADN, obteniéndose valores similares de protección parcial. En otro estudio, rTgPI mostró inducir una inmunidad protectora en ratones C3H tanto a nivel de formación de quistes como ante infecciones letales, sugiriendo una inducción de inmunidad durante la etapa aguda de la infección. Estos resultados sugieren que estos antígenos podrían considerarse buenos candidatos para el desarrollo de una vacuna multi-antigénica basada en aluminio.

REGULATION OF THE IMMUNE RESPONSE IN THE INTESTINAL MUCOSA AGAINST *TOXOPLASMA GONDII* AND IMMUNOPROPHILACTIC VALUE OF DIFFERENT PARASITE ANTIGENS IN THE MURINE MODEL

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is a protozoan parasite that infects the host by oral ingestion of tissue cysts or oocysts, with the induction of a systemic and intestinal Th1 immune response resulting in the production of immunity against re-infection. There are two interesting models of the immune response regulation in the experimental oral infection with cysts of different strains of mice. C57BL/6 mice (H-2^b) develop acute inflammatory ileitis (IBD) characterized by the overproduction of IFN- γ and nitric oxide synthesis in the gut after seven days of infection, and depending on the initial parasite-dose this inflammatory response can result lethal. In contrast, oral infection of C3H/HeJ and CBA/J (H-2^k) reveal only mild inflammation in the gut, resulting resistant to the acute phase of the infection with the establishment of the chronic infection.

In the present study, we report that *T. gondii* antigen-primed intraepithelial lymphocytes (IELs) prevent the acute ileitis in C57BL/6 susceptible mice, and *in vitro*, reduce the production of inflammatory chemokines by infected enterocytes, event that would be mediated by TGF- β secretion. IELs could be an essential component in the gut homeostasis after oral infection with this parasite.

As a first attempt to study the immune response induced by this parasite in mice resistant to the acute infection, we have characterized the response elicited by the infection of the enterocyte cell line MODE-K (H-2^k) to evaluate its value as an *in vitro* model. Infection with *T. gondii* tachyzoites induced the activation of these cells, with the secretion of a cytokine and chemokine pattern with a strain-specific kinetics. Both unprimed and antigen-primed IELs isolated from CBA/J mice reduce chemokine expression by infected enterocytes. These IELs from naïve resistant mice, in contrast to the IELs from naïve susceptible mice, would produce endogenous anti-inflammatory cytokines that could result in an important component in the resistance to acute ileitis after infection.

The second part of this thesis, has been focused on the study of the ability of specific parasite antigens in stimulating *in vitro* a systemic and mucosal response in orally infected susceptible (C57BL/6) and resistant (BALB/c [H-2^d]) mice, in order to evaluate their possible use in the development of vaccines. For this purpose, we have used recombinant forms of ROP2, GRA4 and TgPI antigens. rROP2 and rGRA4 induce a humoral response, and stimulated an *in vitro* cellular response in mesenteric lymph nodes and spleen cells, that differ with the strain of mice. In contrast, rTgPI elicits a low immune response during the infection. Remarkably, C57BL/6 strain produced high IFN- γ and low IL-5 levels, while in BALB/c mice the production of both cytokines resulted lower or null respectively.

These antigens were also used in immunization assays of C57BL/6 and C3H mice in order to study their immune protective value against oral infection when combined with alum as adjuvant. rGRA4 induced partial protection in both strains of mouse, with a predominant Th1 response, while rROP2 conferred partial protection only in C3H mice, with a stronger response compared to rGRA4. Immunizations of mice with a mix of rROP2 and rGRA4, and with a chimeric rROP2-rGRA4 protein, induce a similar partial protection to rGRA4 alone (C57BL/6) or rROP2 alone (C3H). Finally, the comparison of the immune protective value of rGRA4 combined with alum with a DNA vaccine system, resulted in similar partial protective values. In another study, rTgPI showed to reduce the brain cyst load in C3H and protect them against a lethal challenge, suggesting that this protein could elicit immunity during the acute phase of infection. These results suggest that these antigens could be considered as candidates for the development of a multi-antigenic vaccine based on alum as adjuvant.

A Ana Inés y Roque

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar al Dr. Sergio Angel, por darme la posibilidad de realizar esta Tesis en su laboratorio, y por haberme incentivado en todo momento durante el transcurso de estos años.

Gracias al Dr. Guarnera por haberme permitido trabajar en el Instituto Malbrán.

Gracias al Dr. Lloyd Kasper por haberme dado la oportunidad de realizar las pasantías en su laboratorio de la Universidad de Dartmouth.

Gracias a los chicos del laboratorio, en especial a Pablo y a Mónica por haber compartido conmigo todos estos años, por haberme dado una gran mano con mi Tesis, por haberme tenido mucha paciencia y sobre todo por la amistad que me han brindado.

Gracias a las chicas del otro lab, en especial a Laura, Mara y Ariana por todos los buenos momentos que pasamos juntas trabajando y sobre todo, en nuestros descansos a la hora del café. También gracias a Pato, Silvio y Ariel.

Gracias a Bibiana y a la “Polaca” que me brindaron su ayuda durante el transcurso de mi tesis.

Gracias a los chicos del laboratorio de Dartmouth, en especial a Hajer por haber estado todo el tiempo al lado mío y con una maravillosa predisposición, y también a Magali, por haberme dedicado tiempo dentro y fuera del laboratorio.

Gracias a Marie y a Vero por haber podido contar con ellas siempre.

Gracias a mi mamá, mi papá, Mariana, Quica y Ñata, por haberme incentivado y apoyado en todo momento y circunstancia.

Y en especial gracias a vos Gus, por ser mi sol y a Milton, mi solcito.

Esta tesis fue realizada gracias al apoyo de los siguientes organismos:

FONCYT (PICT 98 05-04831)

CONICET: a través de sus programas de becas doctorales

Fundación ANTORCHAS: a través de sus programas de becas de terminación de doctorado

A.N.L.I.S. Dr. Carlos G. Malbrán

Universidad de Dartmouth, Hanover, NH, USA.

PUBLICACIONES

Martin V, Arcavi M, Santillán G, Amendoeira MR, De Souza Neves E, Griemberg G, Guarnera E, Garberi JC & Angel SO. (1998) Detection of Human Toxoplasma-Specific Immunoglobulins Class A, M and G by a Recombinant *Toxoplasma gondii* Rop2 protein. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*; 5: 627-631. USA.

Echeverria PC, Rojas PA, Martin V, Guarnera EA, Pszeny V and Angel SO. (2000) Characterization of an interspersed *Toxoplasma gondii* DNA repeat with potential uses for PCR diagnosis and PCR-RFLP analysis. *FEMS Microbiology Letters*; 184:23-27. UK.

Rojas PA, Martin V, Nigro M, Echeverria PC, Guarnera EA, Pszeny V and Angel SO. (2000) Expression of a cDNA encoding a *Toxoplasma gondii* protein belonging to the heat-shock 90 family and analysis of its antigenicity. *FEMS Microbiology Letters*; 190:209-213. UK.

Nigro M, Martin V, Kaufer F, Carral L, Angel SO, Pszeny V. (2001) High level of expression of the *Toxoplasma gondii*-recombinant Rop2 protein in *Escherichia coli* as a soluble form for optimal use in diagnosis. *Molecular Biotechnology*; 18:269-73.

Buzoni-Gatel D, Debbabi H, Mennechet F, Martin V, Lepage AC, Schwartzman JD, Kasper LH. (2001) Murine ileitis after intracellular parasite infection is controlled by TGFbeta producing Intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology*, 120(4): 914-24.

Nigro M, Gutierrez A, Hoffer A, Clemente M, Kaufer F, Carral L, Martin V, Guarnera E and Angel SO (2003) Evaluation of *Toxoplasma gondii* proteins for the diagnosis of recently acquire toxoplasmosis by an immunoglobulin G analysis. *Diagnostic in Microbiology and Infectious Disease*; en prensa.

ABREVIATURAS

Ag: antígeno
ARNm: ARN mensajero
ATPasa : hidrolasa de ATP
BSR : proteína recombinante específica de bradizoito
CD: cluster de diferenciación
CTL: citotoxicidad mediada por linfocitos T
DC: célula dendrítica
EGF: factor de crecimiento epidérmico
ET : encefalitis toxoplásmica
GM-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos
h: horas
HSP : proteína de choque térmico
IECs: células epiteliales intestinales
IFN : interferon
IL: interleuquina
iNOS: óxido nítrico sintasa inducible
IP-10: proteína inducible por IFN- γ
IRN: intermediarios reactivos de nitrógeno
KO: knock out
LPLs: linfocitos de la lámina propia
mAc : anticuerpos monoclonales
MCP: proteína quimiotáctica de monocitos
MHC: complejo mayor de histocompatibilidad
Min: minutos
MIP: proteína inflamatoria de macrófagos
NK: células natural killer
NML: nódulos mesentéricos linfáticos
ON: óxido nítrico
PBS:
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
RANTES: regulada en la activación y normalmente expresada en células T
RE : retículo endoplásmico
RMT: red membranosa túbulo-vesicular
SAG : antígeno de superficie
SFB: suero fetal bovino
SNC: sistema nervioso central
SRS : proteína de secuencia relacionada a SAG
TCA : ácidos tricarbónicos
TCR: receptor de células T
TGF: factor de crecimiento tumoral
Th: células T helper
TNF: factor de necrosis tumoral
TSo: sonicado de *Toxoplasma*
VP : vacuola parasitófora
WT: wild type

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
1.1 - <i>Toxoplasma gondii</i>	1
1.2 - Ciclo de vida	1
1.3 - Morfología y características	4
1.3.1- El taquizoito	4
1.3.2 - El bradizoito	8
1.3.3 - El esporozoito	9
1.4 - Invasión de la célula hospedadora	10
1.4.1 - Adhesión	10
1.4.2 - Invasión	11
1.4.3 - Micronemas	13
1.4.4 - Roptrias	13
1.4.5 - Gránulos densos	14
1.4.6 - Desarrollo intracelular	15
1.4.7 - Interacción parásito / célula hospedadora	15
1.4.8 - Interconversión taquizoito-bradizoito	16
- Diferenciación bradizoito-taquizoito	16
- Diferenciación taquizoito-bradizoito	16
1.5 - Estructura genética poblacional	17
1.6 - Toxoplasmosis	18
1.6.1 - Infección	19
1.6.2 - Patología: Toxoplasmosis adquirida	19
1.6.3 - Toxoplasmosis congénita	20
1.6.4 - Epidemiología: Toxoplasmosis humana	20
1.6.5 - Toxoplasmosis en animales de importancia ganadera	21
1.6.6 - Diagnóstico en humanos	22
1.6.7 - Tratamiento	23
1.6.8 - Virulencia	24
- Factores genéticos del hospedador	24
- Factores provenientes del parásito	25
1.7 - Respuesta Inmune	25
1.7.1 - Inmunidad sistémica: Iniciación	26
1.7.2 - Rol de la IL-12 en la inducción de una respuesta Th1	27
1.7.3 - Activación temprana de linfocitos T	29
1.7.4 - Modulación de la activación de células T	29
1.7.5 - Citotoxicidad mediada por linfocitos	30
1.7.6 - Inmunidad humoral	33
1.7.7 - Inmunidad en la mucosa intestinal	34
1.7.8 - Inmunidad innata en mucosas	34
1.7.9 - Inmunidad mediada por células	35
1.7.10 - Inmunidad humoral de mucosas	37
1.8 - Vacunas contra la toxoplasmosis	38
1.9 - Planteo del problema	40
1.10 - Objetivos	42

MATERIALES Y METODOS	43
2.1- Animales	43
2.2 - Parásitos	43
2.3 - Purificación de IELs	43
2.4 - Transferencia pasiva de IELs	44
2.5 - Análisis histopatológico y morfométrico	45
2.6 - Líneas celulares epiteliales intestinales	45
2.7 - Co-cultivo de enterocitos y IELs	46
2.8 - Extracción y detección de ARNm de quemoquinas por ensayo de protección de ARNasa	47
2.9 - Detección de proteínas en sobrenadantes de cultivos celulares	48
2.10 - Ensayo de migración <i>in vitro</i>	48
2.11 - Análisis de citometría de flujo	49
2.12 - Construcción de plásmidos y proteínas recombinantes	49
2.13 - Preparación de antígenos y proteínas recombinantes	50
2.14 - Purificación de plásmidos para la vacuna de ADN	51
2.15 - Cinética de la respuesta inmune en ratones oralmente infectados	51
2.16 - Inmunización con las proteínas recombinantes y desafío con <i>T. gondii</i>	52
2.17 - Obtención de secreciones intestinales	52
2.18 - Análisis de respuesta humoral en fluidos biológicos	53
2.19 - Aislamiento de células de NML y de bazo	54
2.20 - Ensayo de proliferación <i>in vitro</i>	54
2.21 - Análisis de citoquinas en sobrenadantes de cultivos	55
2.22 - Análisis estadístico	56

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PARTE I: Respuesta Inmune contra el *Toxoplasma gondii* en la mucosa intestinal

3 - Interacción entre células epiteliales intestinales y linfocitos intraepiteliales durante la infección con <i>Toxoplasma gondii</i>	57
3.1 - Los IELs antígeno-primados reducen la ileitis inflamatoria aguda en ratones susceptibles	58
3.2 - La infección con <i>T. gondii</i> induce un aumento en la expresión de quemoquinas inflamatorias en enterocitos	58
3.3 - Transmigración de IELs en células epiteliales intestinales polarizadas	61
3.4 - Los IELs primados inducen una disminución en la producción de quemoquinas en enterocitos infectados	64
3.5 - Los IELs producen TGF- β que promueve la disminución de quemoquinas inflamatorias	66
3.6 - El antígeno SAG-1 de <i>T. gondii</i> estaría involucrado en la IBD	67
4 - Caracterización <i>in vitro</i> de la respuesta inducida en la línea celular enterocítica MODE-K frente a la infección con <i>Toxoplasma gondii</i>	69
4.1 - Expresión de marcadores moleculares en la superficie de MODE-K inducidos por <i>T. gondii</i>	69
4.2 - La infección con <i>T. gondii</i> induce un aumento en la expresión de quemoquinas	71
4.3 - Aumento en la expresión de quemoquinas luego de la infección con otras cepas relacionadas	73

4.4 - <i>T. gondii</i> induce la expresión de citoquinas en células MODE-K	75
4.5 - La infección oral con <i>T. gondii</i> induce un aumento en la expresión de quemoquinas en los IELs	77
4.6 - Los IELs primados inducen una disminución en la producción de ARNm de quemoquinas de las líneas celulares enterocíticas IC _{Cl2} y MODE-K	78
DISCUSIÓN PARTE I	79
5 - Interacción entre células epiteliales intestinales y linfocitos intraepiteliales durante la infección con <i>Toxoplasma gondii</i>	79
6 - Caracterización <i>in vitro</i> de la respuesta inducida en la línea celular enterocítica MODE-K frente a la infección con <i>Toxoplasma gondii</i>	82
PARTE II: Análisis del valor inmunogénico e inmunoproláctico de antígenos del <i>Toxoplasma gondii</i>	
7 - Análisis cinético de la respuesta inmune contra antígenos de <i>Toxoplasma gondii</i> durante la infección	88
7.1 - Expresión de proteínas recombinantes de <i>T. gondii</i>	88
7.2 - Cinética de anticuerpos IgA intestinales de ratones infectados con <i>T. gondii</i> contra los antígenos ROP2, GRA4 y TgPI	90
7.3 - Cinética de anticuerpos séricos contra los distintos antígenos de <i>T. gondii</i>	92
7.4 - Análisis del perfil de isotipos de IgG contra los distintos antígenos de <i>T. gondii</i>	94
7.5 - Respuesta inmune celular generada por los distintos antígenos de <i>T. gondii</i> en nódulos mesentéricos linfáticos	94
7.6 - Respuesta específica de células de bazo frente a la estimulación <i>in vitro</i> con los antígenos definidos de <i>T. gondii</i>	97
8 - Análisis inmunoproláctico de antígenos del <i>Toxoplasma gondii</i> en el modelo murino ...	99
8.1 - Expresión de proteínas recombinantes de <i>T. gondii</i>	99
8.2 - Protección de ratones inmunizados frente al desafío con <i>T. gondii</i>	99
8.3 - Respuesta inmune humoral contra los antígenos recombinantes	102
8.4 - Respuesta linfoproliferativa estimulada por los antígenos rROP2 y rGRA4	105
8.5 - Producción de citoquinas	105
8.6 - Vacuna de ADN del antígeno GRA4	107
8.7 - Análisis del valor inmunoprotectivo del antígeno recombinante TgPI de <i>Toxoplasma gondii</i>	110
DISCUSIÓN PARTE II	113
9 - Análisis cinético de la respuesta inmune contra antígenos de <i>Toxoplasma gondii</i> durante la infección	113
10 - Análisis inmunoproláctico de antígenos del <i>Toxoplasma gondii</i> en el modelo murino	116
CONCLUSIONES	120
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.1 - *Toxoplasma gondii*

El *Toxoplasma gondii* es un protozooario intracelular obligado descrito por primera vez en 1908 por Nicolle y Manceaux en Africa del Norte y por Splendore en Brasil. La designación de la especie deriva del roedor *Ctenodactylus gondi* de Africa del Norte, del cual este parásito fue aislado, y el nombre del género viene de la palabra griega *toxon* que significa “arco” refiriéndose a la forma de media luna del organismo.

El *Toxoplasma* pertenece al phylum Apicomplexa, que consiste en parásitos intracelulares que tienen una estructura celular polarizada característica y un arreglo complejo del citoesqueleto y de sus organelas en su extremo apical (Dubey y col, 1998). Otros miembros de este phylum incluyen los patógenos humanos *Plasmodium* (causante de la malaria) y *Cryptosporidium* así como también los patógenos de animales como *Eimeria* (causante de la coccidiosis en pollos) y *Sarcocystis*.

1.2 – Ciclo de vida

El *Toxoplasma* es capaz de infectar y replicarse dentro de cualquier célula nucleada de tejidos de todas las especies de mamíferos y aves examinadas (Wong et al, 1993; Dubey, 1998). Esto es contrario a otros miembros de la familia Sarcocystidae como *Neospora* sp., *Sarcocystis* sp y *Hammondia* sp. (Dubey, 1993), los cuales tienen un rango de hospedadores más restringido.

El *T. gondii* presenta ciclos de multiplicación sexual en el intestino del gato y de otros felinos salvajes (hospedadores definitivos), y un ciclo de multiplicación asexual en los tejidos de una multitud de mamíferos, incluido el hombre, y aves (hospedadores intermediarios). Durante el curso de su ciclo, este parásito presenta tres estadios infectivos: el esporozoito (dentro de ooquistes) característico de la multiplicación sexual, el taquizoito (en vacuolas parasitóforas) y el bradizoito (en quistes tisulares), ambos característicos de la multiplicación asexual. Estos tres estadios están relacionados en un complejo ciclo de vida (Fig. 1.1).

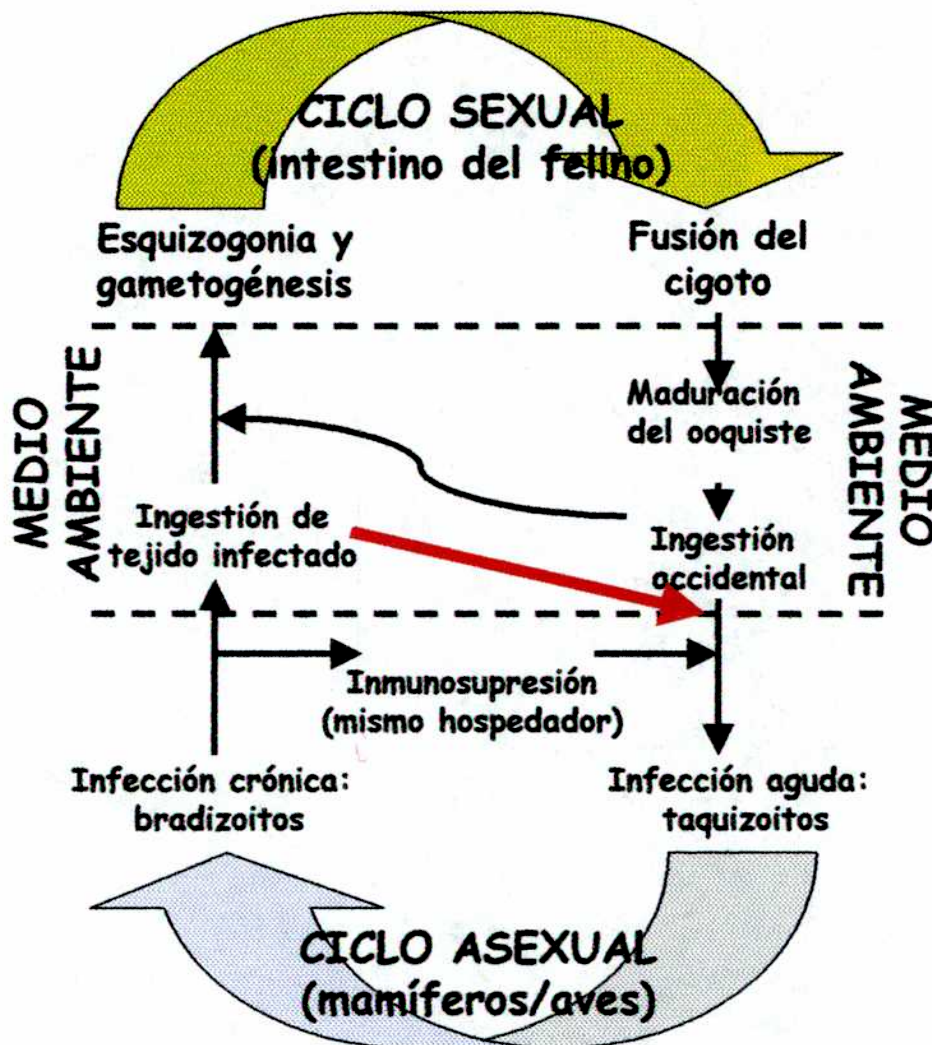


Figura 1.1: Diagrama del ciclo de vida de *T. gondii*. Los componentes sexuales y asexuales del ciclo de vida son potencialmente independientes; en particular, la fase asexual puede teóricamente ciclar entre hospedadores intermediarios *ad infinitum*. No se conoce el grado al cual las porciones sexuales y asexuales del ciclo completo se mantienen una a la otra en la naturaleza.

El ciclo sexual se inicia cuando un miembro de la familia felina ingiere ooquistes del medio ambiente o tejidos infectados con quistes conteniendo bradizoitos. Las enzimas proteolíticas del estómago y del intestino delgado disuelven la pared de los quistes, liberando los esporozoitos o bradizoitos que infectan las células epiteliales del intestino delgado del felino y algunos pasan al estadio de taquizoito. Por otro lado algunos parásitos comienzan a multiplicarse por esquizogonia y luego inician la formación de los gametocitos o elementos sexuales, que evolucionan a microgametocitos (del tipo masculino) y macrogametocitos (del tipo femenino), mientras que otros se diferencian a bradizoitos para luego formar los quistes tisulares. Los microgametocitos sufren una serie de divisiones nucleares (Dubey y col, 1972) y dan lugar a 22 microgametas flageladas, las cuales nadan hacia las macrogametas maduras para fertilizarlas y formar los cigotos. Luego de la fertilización, se forma la pared del ooquiste con cinco capas alrededor del parásito (Ferguson y col, 1975). Las células epiteliales infectadas se rompen y descargan los ooquistes dentro del lumen intestinal los cuales terminan siendo excretados junto con las heces del felino. En este punto, los ooquistes son inmaduros y no son infectivos. Una vez que entran en contacto con la atmósfera, se produce la esporulación que conduce a la formación de esporozoitos, convirtiéndose así en altamente infectivos, pudiendo sobrevivir en el ambiente por varios meses y posiblemente hasta años. Cualquier animal de sangre caliente que ingiera esos ooquistes infectivos se convierte en un hospedador para el ciclo asexual.

En el hospedador intermediario y también en el felino, luego de la ingestión de quistes tisulares u ooquistes, se produce la infección de las células epiteliales intestinales (Fig. 1.1). Los bradizoitos o esporozoitos liberados, respectivamente, se diferencian a taquizoitos. Este estadio se encuentra durante la fase aguda de la toxoplasmosis. Ellos se replican dentro de una vacuola parasitófora intracelular con un tiempo de generación de 6 a 8 horas (*in vitro*) durante el cual se acumulan de 64 a 128 parásitos por célula (Radke y col, 1998), momento en el cual la membrana plasmática de la célula hospedadora se rompe y los parásitos son liberados al medio extracelular. Los taquizoitos libres pueden infectar virtualmente cualquier célula nucleada que encuentren, y continuar la replicación intracelular dispersándose por todos los tejidos del hospedador. Si no son controlados por el sistema inmune, los taquizoitos son altamente virulentos y causan una toxoplasmosis generalizada que resulta siempre fatal (Frenkel, 1967). Entonces, la inducción de la respuesta inmune mediada por células T y la

resistencia al estadio de taquizoito es un paso clave en el ciclo de vida del *T. gondii*, ya que determina la supervivencia del hospedador y la del parásito mismo.

Luego de que el animal infectado desarrolla inmunidad, los taquizoitos se diferencian a bradizoitos, forma del parásito que presenta una multiplicación lenta que es esencialmente inactiva e inocua. Los bradizoitos sobreviven dentro de quistes tisulares que están aislados del sistema inmune del hospedador por la pared quística, que está compuesta principalmente por productos derivados del tejido del hospedador. Estos quistes comienzan a aparecer alrededor de los 7 a 10 días luego de la infección y definen el estadio crónico del ciclo asexual. Estos quistes se encuentran principalmente en el sistema nervioso central y tejido muscular, en donde residen durante toda la vida del hospedador.

Luego de la ingestión de quistes tisulares en carne cruda o mal cocida proveniente de un hospedador crónicamente infectado, como se mencionó arriba, los bradizoitos liberados infectarán el epitelio intestinal del próximo hospedador susceptible y se diferenciarán al estadio de taquizoito para completar así el ciclo asexual. Los componentes sexual y asexual del ciclo de vida son potencialmente independientes; en particular, la fase asexual puede teóricamente ciclar entre hospedadores intermediarios *ad infinitum*.

1.3 – Morfología y características

1.3.1- El taquizoito

El *T. gondii* es un miembro de los Alveolados porque posee un complejo de membrana interna que consiste en vesículas membranosas aplanadas que se ubican justo por debajo de la membrana plasmática (Lindsay y col, 1997). En los Apicomplexa, esta estructura trimembrana es llamada películo y es discontinua en el extremo anterior, en el microporo situado lateralmente, y en el poro que se encuentra en el extremo posterior. El taquizoito posee las organelas celulares clásicas: núcleo, mitocondria, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y ribosomas, y dado su estilo de vida intracelular obligado, posee un número de organelas secretorias reguladas: las micronemas, las roptrias y los gránulos densos (Fig. 1.2 y 1.3C). Las roptrias son estructuras secretorias, que consisten cada una en un cuello anterior angosto que se extiende dentro del interior del conoide, y una parte posterior con forma de saco. Las micronemas son estructuras con forma de bastón que aparecen mayoritariamente en

el extremo apical del parásito. Los gránulos densos tienen una localización más generalizada dentro de la célula. Cada compartimento tiene su propio complemento de proteínas cuya función es consistente con el momento de su liberación.

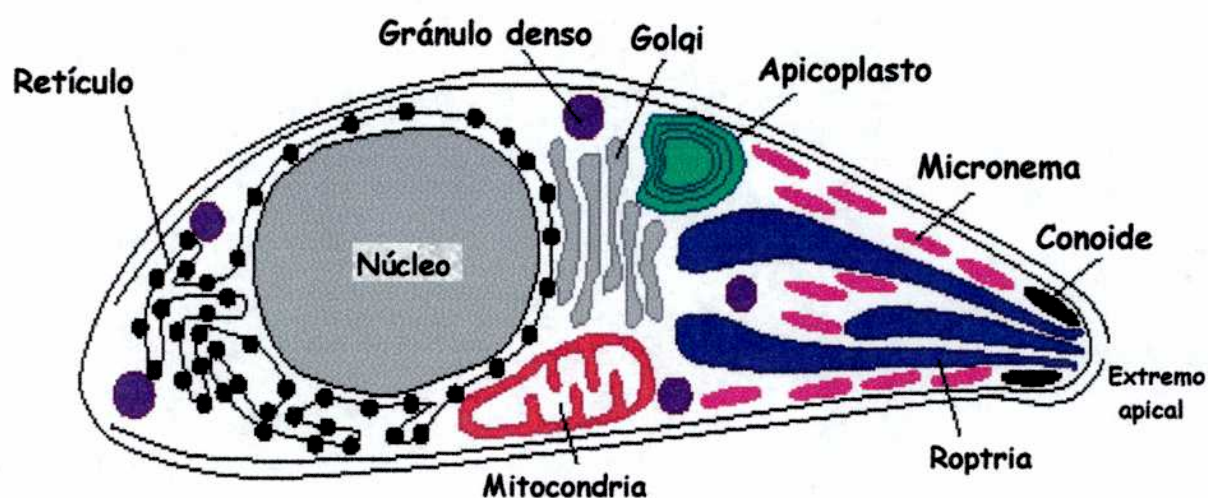


Figura 1.2: Dibujo esquemático de un taquizoito de *T. gondii*, mostrando las principales organelas del estadio asexual del parásito.

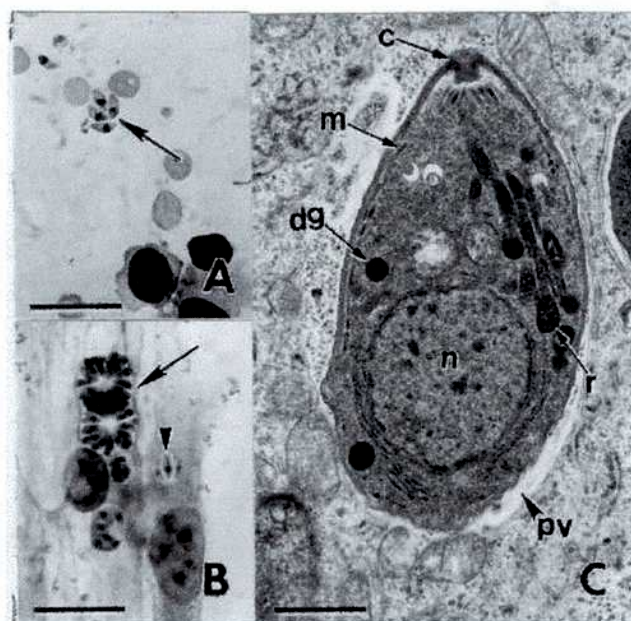


Figura 1.3: A. Taquizoitos libres (flecha larga). B. Taquizoitos dentro de una vacuola parasitófora intracelular (flecha larga) y se indica un parásito libre (flecha corta). C. Micrografía electrónica de transmisión de un taquizoito de *T. gondii* en un exudado celular peritoneal de un ratón. C, conoide; dg, gránulo denso; m, micronema; n, núcleo; r, roptrias; pv, vacuola parasitófora.

El citoesqueleto del *T. gondii* es un complejo de estructuras que han evolucionado aparentemente para proveer una integridad estructural, para dirigir una secreción polarizada y para permitir que el parásito pueda deslizarse a través de las superficies e invadir células hospedadoras (Frixione y col, 1996; Morrissette y col, 1997; Nichols y col, 1987). El conoide es una estructura con forma de cono situada en el extremo anterior de la célula y rodeada por 2 anillos (Fig. 1.4). Hay dos microtúbulos que se extienden desde los anillos y pasan a través del centro del conoide, que se cree que funcionan como un andamio que dirige a las roptrias y micronemas para pasar a través del conoide y secretar su contenido en el extremo apical (Nichols y col, 1987). Justo posterior al conoide, hay un anillo polar que funciona como un centro de organización de donde emanan microtúbulos que descienden en forma de espiral. Aunque los taquizoitos se pueden mover por deslizamiento, flexión, ondulación y rotación, no tienen medios visibles de locomoción como cilias, flagelos o pseudopodios.

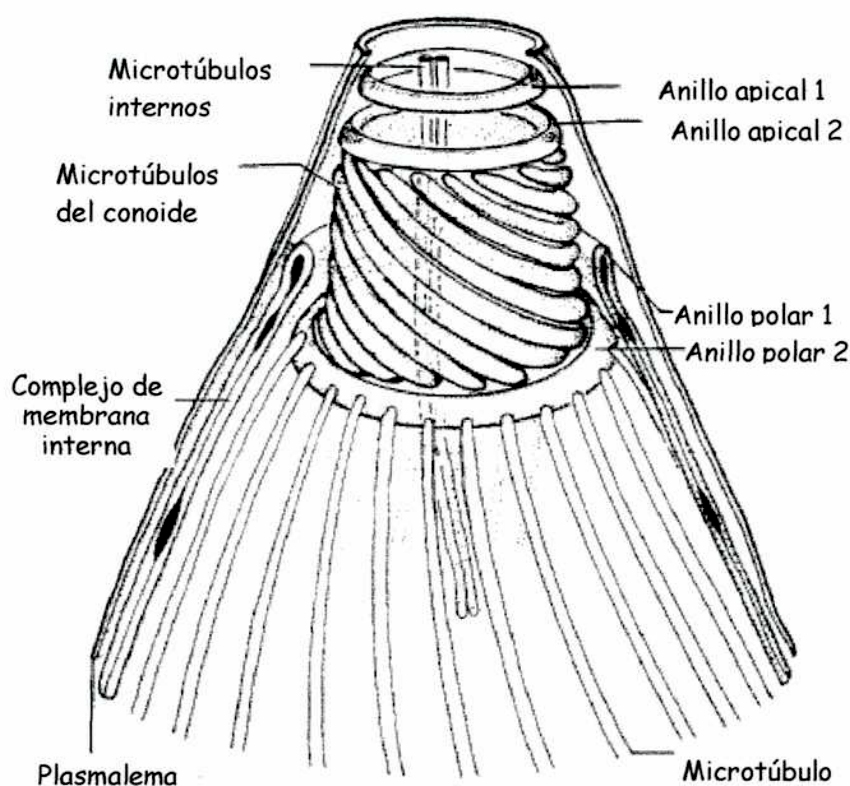


Figura 1.4: Representación esquemática del complejo apical de *T. gondii*. Modificado de Dubey y col, 1998.

El taquizoito tiene una forma de media luna, con un tamaño aproximado de 4 a 8 μm de largo por 2 a 4 μm de ancho (Smith 1995), y presenta un extremo anterior puntiagudo (conoidal) y un extremo posterior redondeado (Fig. 1.2 y 1.3C). Este estadio del parásito posee una tasa de multiplicación rápida dentro de cualquier célula del hospedador intermediario y en el hospedador definitivo en células que no sean epiteliales intestinales. Los taquizoitos se encuentran en la célula hospedadora dentro de una vacuola parasitófora intracelular (Fig. 1.3B), en donde se multiplican asexualmente mediante endodiogenia repetida (Fig. 1.5), una forma especializada de reproducción en la cual dos progenies se forman dentro del parásito materno, consumiéndolo (Sheffield y col, 1968). La célula hospedadora se rompe cuando ya no puede soportar el crecimiento de los taquizoitos, los cuales quedan liberados al medio extracelular e invaden células adyacentes. Esta multiplicación rápida del parásito es característica de la fase aguda de la infección.

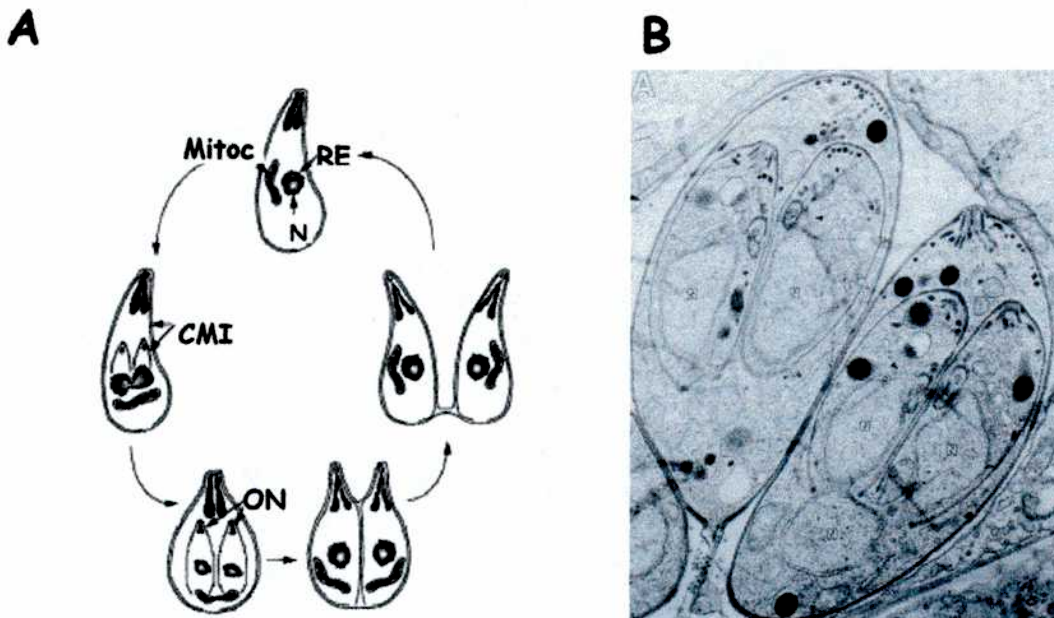


Figura 1.5: A. Diagrama de la endodiogenia. A medida que el parásito comienza a dividirse, dos complejos de membrana interna (CMI) empiezan a desarrollarse en el medio de la célula de donde aparece un conoide rudimentario y un centro de organización microtubular (anillo polar). A medida que el CMI se extiende desde estas estructuras, el núcleo (N) y la mitocondria (Mitoc) se dividen dentro del contorno de esta membrana. Las organelas apicales nacientes (ON) se desarrollan dentro de los polos a medida que las células hijas crecen. Eventualmente, el citoplasma completo se divide entre las hijas y el CMI de la madre se disocia. Un surco de clivaje divide las células a partir del polo anterior. Esta división continúa hacia abajo a lo largo de las células hasta que llega al extremo posterior, en donde deja un cuerpo residual conectando las dos hijas. RE: retículo endoplásmico. (Black y Boothroyd, 2000) B. Micrografía electrónica de transmisión de un taquizoito durante la endodiogenia dentro de un macrófago peritoneal murino para formar dos taquizoitos hijos.

1.3.2 – El bradizoito

Es la forma proliferativa lenta del parásito que se multiplica dentro de un quiste tisular. Los quistes tisulares crecen y permanecen en el citoplasma de la célula hospedadora a medida que los bradizoitos se dividen por endodiogenia. Los quistes en general son esféricos y varían en tamaño: los jóvenes pueden medir 5 μm de diámetro y contener solo 2 parásitos, mientras que los más viejos pueden contener cientos de organismos y medir hasta 100 μm (Fig. 1.6) (Dubey, 1977; 1993). Se localizan principalmente en tejidos neurales y musculares, incluyendo cerebro, ojos y músculo esquelético y cardíaco (Dubey, 1988), pero también pueden localizarse en órganos viscerales. Los quistes tisulares pueden permanecer durante toda la vida del hospedador sin causar una respuesta inflamatoria. La aparición y la persistencia de los quistes son características de la fase crónica de la infección.

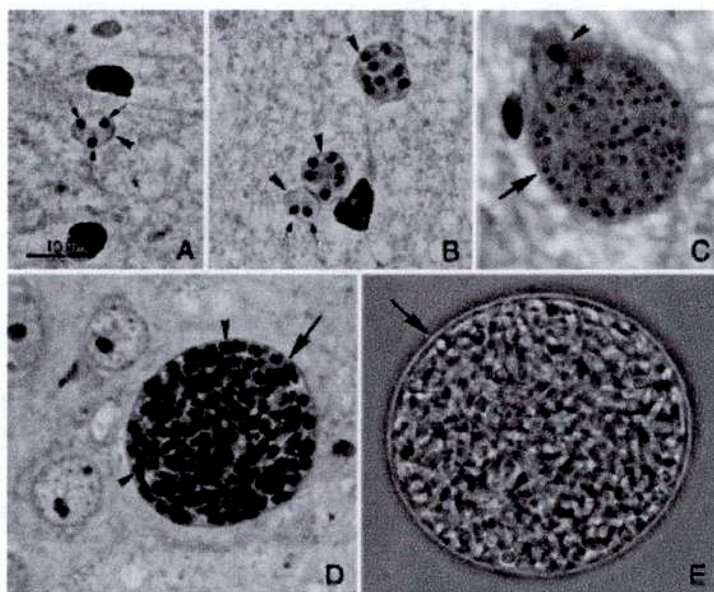


Figura 1.6: Quistes tisulares de *T. gondii* en cerebros de ratones. A. Quiste tisular con tres bradizoitos, cada uno con un núcleo terminal (flechas). Notar la fina pared del quiste (flecha corta). Impresión de impregnación con plata y tinción con Giemsa. B. Tres quistes con paredes bien definidas (flechas cortas). Notar el quiste tisular con dos bradizoitos, cada uno con un núcleo terminal (flechas). Impresión de impregnación con plata y tinción con Giemsa. C. Quiste tisular intracelular en sección. Notar la fina pared del quiste (flecha) y el núcleo de la célula hospedadora (flecha corta). Tinción con hematoxilina y eosina. D. Quiste tisular con numerosos bradizoitos PAS-positivos (flechas cortas) envueltos en una pared PAS-negativa (flecha). Tinción PASH. E. Quiste tisular liberado del cerebro de un ratón. Notar la pared del quiste (flecha) envolviendo cientos de bradizoitos. Impresión sin teñir. (Dubey y col, 1998)

La morfología del bradizoito es muy semejante a la del taquizoito aunque es más pequeño: mide aproximadamente 7 por 1.5 μm . El bradizoito tiene el núcleo situado hacia el extremo posterior, contiene gránulos de amilopectina que constituirían una reserva energética (Dubey y col, 1988) y son menos susceptibles a la destrucción por enzimas proteolíticas que los taquizoitos (Jacobs y col, 1960).

1.3.3 – El esporozoito

A nivel estructural, el esporozoito es similar al taquizoito, excepto que hay mayor abundancia de micronemas, roptrias y gránulos de amilopectina. Este estadio es el resultado de la reproducción sexual del parásito que ocurre en las células epiteliales del intestino del gato. Cada ooquiste contiene dos esporoquistes, los cuales a su vez contienen cuatro esporozoitos cada uno (Fig. 1.7) (Frenkel y col, 1970).

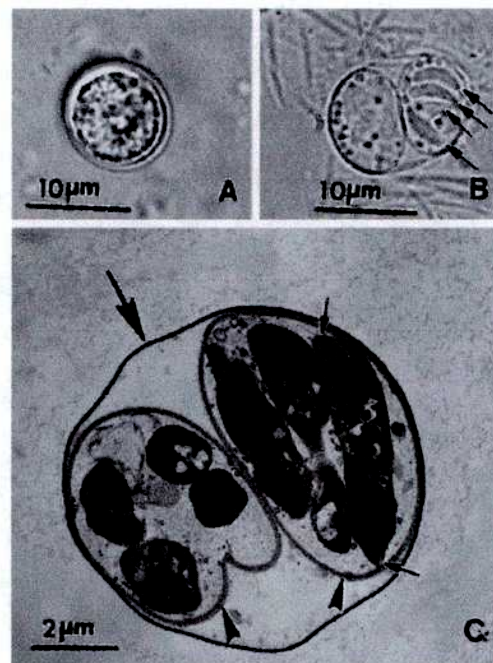


Figura 1.7: Ooquistes de *T. gondii*. A. Ooquiste sin esporular. Notar la masa central (esporonte) que ocupa la mayoría del ooquiste. B. Ooquiste esporulado con dos esporoquistes. Se visualizan cuatro esporozoitos (flechas) en uno de los esporoquistes. C. Micrografía electrónica de transmisión de un quiste esporulado. Notar la fina pared del ooquiste (flecha larga), dos esporoquistes (flechas cortas) y esporozoitos, uno de los cuales está cortado longitudinalmente (flecha pequeña) (Dubey y col, 1998)

1.4 – Invasión de la célula hospedadora

1.4.1 – Adhesión

Para que un patógeno intracelular logre entrar en una célula, primero debe hacer un contacto íntimo con la superficie de la célula. Como las membranas lipídicas del hospedador y del patógeno normalmente poseen una carga neta negativa, se requieren interacciones receptor-ligando para vencer esta fuerza repulsiva y mantener la unión firme requerida tanto para la movilidad como para la invasión. El *T. gondii* es inusual entre los patógenos intracelulares conocidos debido a que es promiscuo en su habilidad de invadir una amplia variedad de células hospedadoras.

La membrana plasmática de los taquizoitos y bradizoitos consiste predominantemente en una variedad de proteínas que están unidas a la membrana por un motivo glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Nagel, 1989; Tomavo y col, 1989), en donde la mayoría son miembros de la familia del antígeno de superficie 1 (SAG1) o SAG2 (Lekutis y col, 2000; Manger y col, 1998; Boothroyd y col, 1998). SAG1 (Burg y col, 1988) es la proteína de superficie más abundante (Kasper y col, 1983; 1993) y ha sido implicada, al menos en parte, en los eventos iniciales de adhesión a la membrana de la célula hospedadora (Grimwood y col, 1992; Mineo y col, 1994; 1993; Robert y col, 1991). Otro antígeno de la familia SAG1 implicado en el proceso de adhesión antes de la invasión del parásito es el antígeno SAG3. Utilizando un mutante nulo para este antígeno, Dzierszinski y col (2000) demostraron que estos parásitos exhibían una reducción en su habilidad de adherirse a las células hospedadoras *in vitro*, con lo cual resultaban menos virulentos.

Hay evidencia que demuestra la habilidad de los parásitos de unirse a laminina, proteína de la matriz extracelular (Furtado y col, 1992a; 1992b), ya que los anticuerpos dirigidos contra esta proteína, bloquean la adhesión del parásito en un nivel similar al visto con anticuerpos anti-SAG1 (Furtado y col, 1992a ; Mineo y col, 1994).

La contribución de la superficie de la célula hospedadora a la adhesión ha sido menos estudiada. Se ha observado en ciertas líneas celulares que la unión del parásito aumenta tres veces cuando las células proceden de la fase G₁ a la fase media-S, y decrece a niveles basales cuando las células entran en la fase G₂/M (Grimwood y col, 1996). En este mismo estudio, también se demostró que un suero policlonal contra células en la fase media-S es tres veces

más efectivo en bloquear la adhesión del parásito que el suero contra la fase G₁. Estos datos sugieren que el *Toxoplasma* estaría utilizando en la adhesión un ligando antigénico similar en diferentes líneas celulares, aunque no se excluye la posibilidad de un epítopo dependiente del ciclo celular que bloquee la interacción por impedimento estérico.

Hasta ahora, el mecanismo de acción preciso de las lectinas, laminina y proteínas de la superficie del parásito que interaccionan con los ligandos de la célula hospedadora e intervienen en la adhesión del *T. gondii* a la célula, no está totalmente definido. La incapacidad de identificar un solo ligando que intervenga en la invasión sugiere que este es un proceso que no depende de un solo receptor o molécula de interacción, sino que se trataría de la intervención de sistemas sinérgicos y complementarios. Esta podría ser una explicación a la gran variedad de células hospedadoras y de animales que este parásito puede infectar.

1.4.2 - Invasión

El *T. gondii* penetra activamente tanto a células fagocíticas como no fagocíticas, mediante un proceso de deslizamiento activo (“gliding”) dependiente de actina-miosina (Sibley y col, 1999). La invasión se inicia con la reorientación del parásito para crear un contacto entre el extremo apical y la membrana de la célula hospedadora. La locomoción del parásito entero, ocurre moviendo la posición de contacto entre la superficie celular y el sustrato a lo largo del cuerpo del parásito en la misma orientación de los microtúbulos subpeliculares. Debido a la forma creciente del parásito y a la forma espiralada de su citoesqueleto, este deslizamiento en forma de tirabuzón a través de la superficie resulta en una trayectoria de vueltas helicoidales alrededor del eje longitudinal de la célula (Hakansson y col, 1999; King, 1988; Russell y col, 1981; Stewart y col, 1988). Esta entrada es rápida (de 5 a 30 segundos), con una constricción del cuerpo del parásito a medida que pasa dentro de la célula hospedadora (Fig. 1.8). Está demostrado que la movilidad del parásito es absolutamente necesaria para la invasión, ya que mutantes de *Toxoplasma* resistentes a citocalasina D logran invadir líneas celulares sensibles en presencia de la droga, mientras que la invasión quedó completamente bloqueada cuando se utilizaron parásitos normales con células resistentes a la droga (Dobrowolski y col, 1996).

Una vez dentro de la célula hospedadora, el parásito queda envuelto en un compartimento no fusigénico llamado vacuola parasitófora (VP) que se genera durante la

invasión (Lingelbach y col, 1998). Por microscopía electrónica, se confirmó la participación de organelas secretorias en la invasión del parásito. Estudios más recientes confirmaron que las micronemas, las roptrias y una tercer clase de organela, los gránulos densos, secretan sus contenidos en una serie de eventos precisamente orquestados durante la invasión (Carruthers y col, 1997). Las micronemas descargan sus contenidos durante el contacto inicial del polo apical del parásito con la superficie de la célula hospedadora (Carruthers y col, 1999). Inmediatamente después, las roptrias parecen inyectar sus contenidos dentro del citoplasma local de la célula hospedadora (Nichols y col, 1983). Finalmente, una vez que el parásito está totalmente encapsulado en su VP, la secreción de los gránulos densos se activa para liberar proteínas dentro del lumen de la VP (Leriche y col, 1990; Carruthers y col, 1997).

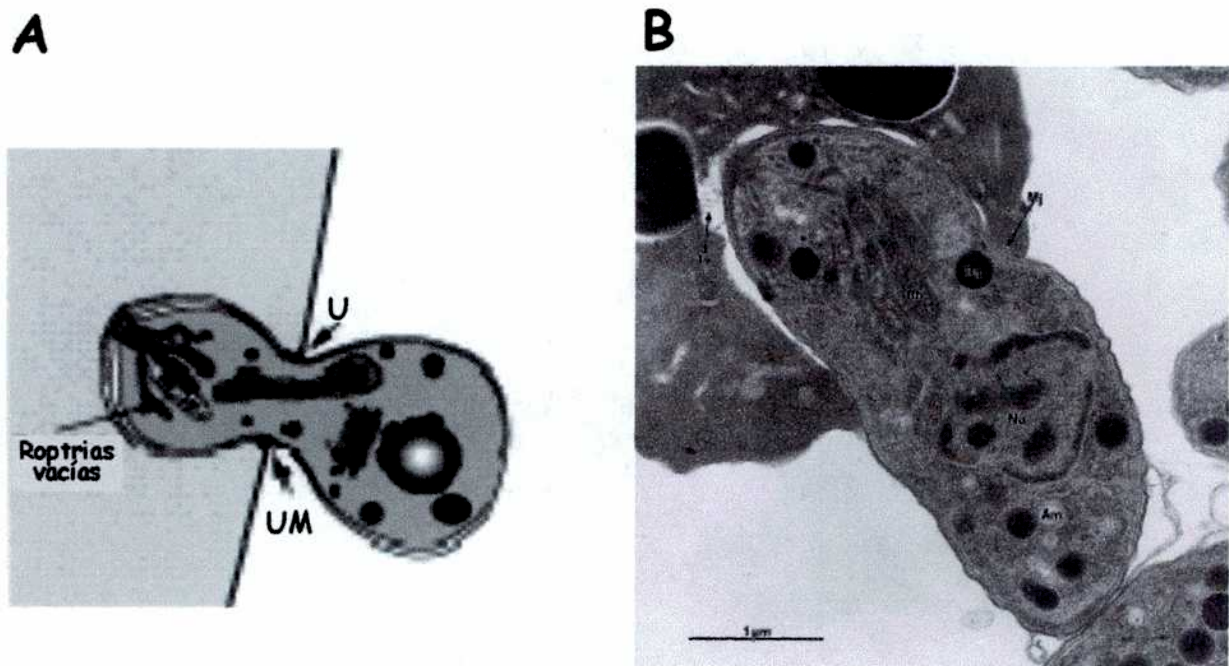


Figura 1.8: Invasión del *Toxoplasma*. A. Ilustración de los eventos críticos asociados a la la invasión de la célula hospedadora. La secreción de las roptrias está representada por las vesículas vacías y la liberación de material membranosos dentro de la vacuola parasitófora que se está formando. A medida que el parásito se desliza dentro de la célula (como se indica por la constricción del cuerpo del parásito), una unión móvil (UM) se forma entre la superficie del parásito y el plasma de la célula hospedadora. (Black and Boothroyd, 2000). B. Micrografía electrónica de transmisión de un taquizoito penetrando en un neutrófilo peritoneal de un ratón. (Dubey y col, 1998)

1.4.3- Micronemas

Son organelas pequeñas y alargadas, que se encuentran típicamente orientadas a lo largo del eje principal del parásito dentro del extremo apical y en la periferia debajo de la membrana interna (Dubey y col, 1998). Los contenidos de estas organelas son descargados durante el contacto inicial del polo apical del parásito con la superficie celular (Carruthers y col, 1999a). Luego de la descarga, algunas proteínas de las micronemas permanecen asociadas con la superficie apical del parásito en donde se cree que median la adhesión mediante la unión a proteínas en la célula hospedadora (Carruthers y col, 1997; Garcia-Reguet y col, 2000).

Se han confirmado once proteínas en las micronemas y se han identificado al menos nueve proteínas adicionales basadas en sus propiedades de secreción u homología con otras proteínas conocidas (Achbarou y col, 1991; Fourmaux y col, 1996a; Wan y col, 1997; Brydges y col, 2000; Donahue y col, 2000; Garcia-Reguet y col, 2000; Hehl y col, 2000; Brecht y col, 2001). Estos estudios demostraron primero, que la mitad de estas proteínas son del tipo I de proteínas de membrana, con una única secuencia intramembrana situada cerca del C-terminal; segundo, que muchas proteínas (MICs1-4 y 6-9) contienen dominios adhesivos que se encuentran en proteínas de vertebrados tales como integrinas, trombospondina, kalikreina y factor de crecimiento epidérmico (EGF) (ver Tomley y Soldati, 2001); y tercero, que las proteínas de las micronemas a menudo funcionan en complejos adhesivos, como por ejemplo el complejo MIC2/M2AP (proteína asociada a MIC2) (Rabenau y col, 2001). Este complejo presumiblemente se engancha a proteínas de la célula hospedadora y a medida que el parásito penetra, el complejo ocupa la unión en movimiento, una yuxtaposición del parásito y la membrana plasmática de la célula hospedadora que se desliza sobre el zoito durante la entrada.

1.4.4- Roptrias

Durante la invasión, las roptrias secretan sus contenidos dentro de la VP naciente a través de un ducto angosto formado en el conoide por la fusión de la membrana de las roptrias con el extremo apical (Nichols y col, 1983; Prochet-Hennere y col, 1983). Las roptrias del *T. gondii* contienen al menos 8 proteínas conocidas, ROP1 a ROP8 (Ossorio y col, 1992;

Beckers y col, 1997; Leriche y col, 1991), las cuales están involucradas en la biogénesis de la VP (Beckers y col, 1994; Saffer y col, 1992) y en su asociación con organelas del hospedador (Sinai y col, 2001). El pI básico de varias de las principales proteínas de las roptrias (ROP2-5) ha llevado a la proposición de un rol de polipéptidos policatiónicos en la penetración del hospedador, cuya actividad es a través de alteraciones energía-dependientes de las proteínas de la membrana o alteración de la microviscosidad de la membrana a través de la intercalación en la bicapa lipídica (Werk y col, 1984).

Otra proteína de las roptrias cuya función fue demostrada por Sinei y col (2001) es la ROP2. Esta proteína sería un posible mediador en el proceso llamado “asociación organela-membrana” de la VP mediante el cual el parásito incorpora lípidos y/o precursores de lípidos de la célula infectada (Sinai y Joiner, 1997; Sinai y col, 1997). Esta proteína se localiza en la membrana de la VP con su dominio N-terminal expuesto al citosol de la célula hospedadora el cual se inserta dentro de las membranas externas de la mitocondria estableciendo una asociación estable (Sinai y col, 2001)

1.4.5 – Gránulos densos

Luego de que la VP se formó, se desarrolla una red membranosa túbulo-vesicular (RMT) dentro de ella. Algunas de las membranas de la RMT están conectadas a la membrana de la VP (Sheffield y Melton, 1968; Sibley y col, 1986; 1985; 1995). La RMT parece derivar del extremo posterior del taquizoito (Sibley y col, 1995). Los gránulos densos liberan sus contenidos desde los polos anterior y posterior del parásito (Carruthers y Sibley, 1997). La función de esta red parecería que es aumentar el área superficial de la VP y al menos cuatro proteínas de los gránulos densos (GRA1, GRA2, GRA4 y GRA6) se asocian a la RMT (Achbarou y col, 1991; Labruyere y col, 1999).

Se ha propuesto que GRA3, una proteína soluble que se oligomeriza e inserta en la membrana de la VP, podría funcionar como un complejo formador de poros (Ossorio y col, 1994). Estos poros servirían para la adquisición de purinas en la forma de ATP citosólico del hospedador, ya que el *Toxoplasma* es auxótrofo para la biosíntesis de purinas (Perrotto y col, 1971; Shwartzman y Pfefferkorn, 1982). Existen dos isoformas del nucleósido trifosfato hidrolasa (NTPasa), que pueden cumplir un rol en el procesamiento de nucleótidos en la vía de recuperación de purinas y la ciclofilina 18 (High y col., 1994).

Las proteínas Gra5 y GRA8, se localizan en la membrana vacuolar y permanecen segregadas de aquellas dentro de la red tubular (Carey y col, 2000; Ossorio y col, 1994). Recientemente se ha descrito una proteína que forma parte de los gránulos densos y que es un inhibidor de serin proteinasas (TgPI) (Pszenny y col, 2000) que se secreta al lumen de la VP cuando los parásitos entran a la célula hospedadora (Pszenny y col, 2002). La TgPI pertenece a la superfamilia de los inhibidores tipo KAZAL no clásicos, con cuatro dominios KAZAL. Los dos primeros tienen actividad de inhibición de tripsina, triptasa y quimiotripsina, y en menor medida inhiben triptasa y trombina. Los dos segundos dominios inhiben elastasas de neutrófilos humanos y de páncreas y también quimiotripsina.

1.4.6- Desarrollo intracelular

El ciclo de multiplicación del *Toxoplasma* en la célula, a partir de la invasión luego de la lisis celular (fibroblasto), dura alrededor de 48 horas. El parásito se divide por endodiogenia y el tiempo de duplicación es alrededor de 6 horas. Todos los parásitos de una misma vacuola se dividen al mismo tiempo. El crecimiento intracelular en el seno de la VP confiere al parásito una cierta protección contra el sistema inmunológico del hospedador, pero este crecimiento necesita asegurarse los nutrientes que pueden ser adquiridos debido a la asociación estrecha con la célula hospedadora.

1.4.7 - Interacción parásito / célula hospedadora

La VP que rodea al parásito todo el tiempo que este se encuentra dentro de la célula hospedadora, determina las interacciones con las organelas de la célula e interviene en el intercambio de nutrientes y metabolitos. La VP sufre un proceso de maduración durante las primeras horas luego de la invasión, que implica la incorporación de proteínas parasitarias en la membrana y la asociación del retículo endoplásmico (RE) y las mitocondrias de la célula hospedadora alrededor de la vacuola.

La vacuola generada durante la invasión del *Toxoplasma* es inusual en que no se acidifica (Sibley y col, 1985) o fusiona con ninguna vesícula citoplasmática. El parásito previene el proceso endocítico mediante la exclusión o eliminación rápida de las proteínas

integrales de membrana de la célula hospedadora y la modificación extensiva con proteínas propias (Lingelbach y Joiner, 1998; Mordue y col, 1999).

La VP es luego transportada, presumiblemente a lo largo de microtúbulos del hospedador, a una posición yuxtannuclear en donde se rodea del RE y de la mitocondria del hospedador. Se ha propuesto que el reclutamiento de estas dos organelas de la célula hospedadora podría servir para proveer lípidos para la VP (Trotter y col, 1994).

Como se mencionó anteriormente, el *Toxoplasma* además de ser auxótrofo para la biosíntesis de purinas también lo es para el triptofano. Esto fue demostrado por Pfefferkorn (1984) quien observó que la inhibición de la multiplicación del *Toxoplasma* en fibroblastos activados con IFN- γ era dependiente de la concentración celular de triptofano, y que el IFN- γ inhibe el crecimiento del parásito mediante la inducción de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa que degrada triptofano (Pfefferkorn, 1986).

1.4.8 - Interconversión taquizoito-bradizoito

El taquizoito es la forma proliferativa del parásito, mientras que el bradizoito es la forma de división lenta que aparece y se enquistas luego de una fuerte respuesta inmunológica del hospedador. La interconversión entre taquizoito y bradizoito no solo juega un papel pivote en el establecimiento de la infección crónica (taquizoito-bradizoito), sino que también es responsable de la reactivación de la enfermedad (bradizoito-taquizoito).

Diferenciación bradizoito-taquizoito

Gracias a los anticuerpos monoclonales específicos de los estadios parasitarios, se pudo analizar la cinética de conversión de bradizoitos a taquizoitos *in vitro* (Soete y col, 1993; Bohne y col, 1993). La diferenciación de bradizoito en taquizoito pasa por estados intermediarios que co-experimentan antígenos específicos de los dos estadios (Soete y col, 1993). *In vivo*, el pasaje de bradizoito a taquizoito se evidencia al bloquear el IFN- γ (Silva y col., 1998).

Diferenciación taquizoito-bradizoito

La transformación espontánea de taquizoitos en bradizoitos se puede observar en cultivos celulares y conduce a la formación de quistes *in vitro*. La conversión está asociada con cambios morfológicos y moleculares biológicos, incluyendo la expresión de antígenos estadio-específicos y alteraciones en el metabolismo (Ferguson y Hutchison, 1987; Denton y col, 1996). Los estudios usando anticuerpos monoclonales (mAc) para la expresión de proteínas estadio-específicas durante la conversión *in vitro*, demostraron que la conversión de estadio dentro de una misma vacuola parasitófora es asincrónica y la expresión de proteínas específicas de bradizoito es jerárquica en parásitos que sufrían conversión de estadio (Soete y col, 1993).

El modelo *in vitro* más ampliamente usado involucra el crecimiento de parásitos en medio alcalino (Soete y col, 1993), que tiene en común con otros métodos como choque térmico o condiciones ácidas, en que parecen basarse en una inducción de estrés en el parásito. Los inhibidores de la función mitocondrial y los inductores de estrés oxidativo también han demostrado inducir el enquistamiento *in vitro* (Soete y col, 1994; Bohne y col, 1994). Se han identificado varias proteínas de superficie, enzimas y proteínas de choque térmico (HSP) estadio-específicas (ver Bohne y col, 1995; Parmley y col, 1995; Toursel y col, 2000).

La caracterización bioquímica de ambos estadios reveló que existen diferencias en el metabolismo de carbohidratos (Ferguson y Hutchison, 1987; Tomavo, 2001). La presencia de gránulos de amilopectina en bradizoitos pero no en taquizoitos, apoya aún más estas diferencias. Estas diferencias estarían asociadas con el ciclo de ácidos tricarboxílicos y el camino de fosforilación oxidativa (Ferguson y Hutchison, 1987). Recientemente se ha demostrado que los bradizoitos poseen una ATPasa del tipo P que está ausente en taquizoitos (Holpert y col, 2001).

1.5 – Estructura genética poblacional

La mayoría de las cepas de *T. gondii* (>94%) tienen un alto grado de similitudes morfológicas, antigénicas y moleculares, y caen en una de la tres líneas clonales distintas: tipo I, II o III, en lugar de mostrar la mezcla esperada de una población sexual (Howe and Sibley, 1995). Estos tres linajes clonales poseen solamente dos alelos en cualquier locus dado, los

cuales son altamente similares con un 98% de identidad a nivel nucleotídico. Este patrón sugiere que la mayoría de las cepas actuales de *T. gondii* fueron derivadas de un único cruzamiento genético reciente entre dos cepas parentales (Grigg y col, 2001a). De hecho se estima que estos tres linajes clonales comparten un ancestro común dentro de los últimos 10.000 años y representan formas exitosas del cruzamiento genético recién descrito, las cuales incorporaron a su ciclo de vida la capacidad de transmisión oral de quistes tisulares (Su y col, 2003).

Los tres tipos clonales aparentemente no son estados polimórficos menores o azarosos sin consecuencia fenotípica: las cepas del linaje del tipo I son altamente virulentas en ratones y quizás para humanos (Grigg y col, 2001b) y se definen por tener un LD₁₀₀ de un único organismo viable; comparten una combinación de alelos en diferentes loci, y este patrón es diferente del que se encuentra en las cepas no virulentas. Recientemente se han mapeado loci que correlacionan con virulencia en los cromosomas VI y VII (Su y col, 2002). Las cepas restantes se encuentran comprendidas en dos tipos clonales discretos conocidos como tipos II y III; son relativamente no virulentas con un típico LD₅₀ $\geq 10^3$ y establecen fácilmente una infección crónica en ratones (Howe y col, 1996), con la formación de altos números de quistes. Las cepas del tipo II son las más comunes tanto en animales infectados crónicamente como en los casos humanos de toxoplasmosis, mientras que las cepas del tipo III están ampliamente confinadas a animales (ej. aves, gatos, roedores) que en general no son fuente de alimento tradicionales para humanos.

Dada la pequeña mezcla genética de alelos que se observa entre las distintas cepas, la recombinación meiótica no parece ser el principal mecanismo en generar la diversidad genética en las poblaciones naturales de este parásito. Hay varias razones que intentan justificar la clonalidad extrema de las poblaciones naturales del *T. gondii*: (1) los hospedadores intermediarios se infectan típicamente con una sola cepa de manera que cuando sirven de alimento para un gato, la infección resultante es monotípica y no lleva a la formación de nuevos genotipos, (2) la transmisión directa entre hospedadores intermediarios sucesivos hace que el gato no sea esencial en el ciclo de vida, salteando de esta manera el ciclo sexual.

1.6 – Toxoplasmosis

1.6.1 - Infección

El hombre y los animales pueden infectarse con las tres formas del parásito. La infección por vía oral es la causa principal y natural de adquirir la enfermedad. El hospedador puede infectarse mediante la ingesta de carne infectada cruda o mal cocida, especialmente porcina, de carnero y de animales salvajes de caza, o por la ingesta de comidas crudas que han estado en contacto con carne infectada. Otra forma de infección es a través de la ingesta de ooquistes que los gatos han esparcido con sus heces, los cuales pueden encontrarse en frutas o vegetales sin lavar, en la tierra, o el agua contaminada sin filtrar.

La infección con taquizoitos se produce cuando una mujer o animal hembra se primo-infecta durante la preñez, entonces hay un pasaje transplacentario del parásito desde la madre al feto. En el humano, otras formas de infección se pueden producir por transfusión sanguínea, trasplante de órganos o accidente de laboratorio.

1.6.2- Patología: Toxoplasmosis adquirida

En adultos, la severidad de la infección con *T. gondii* se correlaciona con el estado inmunológico de la persona infectada. La toxoplasmosis en los adultos inmunocompetentes es generalmente suave o clínicamente silenciosa. Las infecciones suaves pueden resultar en linfadenopatías, fiebre, fatiga y malestar, todos síntomas que se resuelven en semanas o meses sin un tratamiento específico.

Sin embargo, la infección en personas inmunocomprometidas, puede ser severa. La inmunosupresión causada por una terapia (inmunosupresores, corticoides), hemopatía maligna (leucemia), síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) o por desórdenes linfoproliferativos puede resultar en la reactivación de infecciones latentes del *T. gondii*. La reactivación puede ocurrir en una variedad de tejidos, pero el sistema nervioso central es el sitio de mayor importancia clínica dado que la replicación descontrolada del parásito puede llevar a la encefalitis toxoplásmica (ET). Esto es debido a que los bradizoitos revierten a taquizoitos que rápidamente proliferan en astrocitos y microglia (Fagard y col, 1999; Luder y col, 1999) generando focos de necrosis tisular en el sitio inicial del quiste tisular. En ausencia de tratamiento, esta reactivación resulta casi siempre fatal.

1.6.3 - Toxoplasmosis congénita

Las mujeres infectadas con *T. gondii* antes de la concepción, salvo raras excepciones (Vogel y col, 1996), no transmiten la infección a sus fetos. Las mujeres que se infectan con el parásito durante el embarazo o que sufren una reactivación de la infección crónica (Mitchell y col, 1990; Minkoff y col, 1997) pueden transmitir la infección a sus fetos a través de la placenta. El riesgo de infección congénita es mínimo cuando la infección aguda materna ocurre durante el primer trimestre (10-25%) y máximo cuando ocurre durante el tercer trimestre (60-90%) (Foulon y col, 1999; Dunn y col, 1999). Sin embargo, la severidad de la enfermedad es mayor si la infección es adquirida durante el primer trimestre (Remington y col, 2001; Holliman, 1995). El riesgo total de infección congénita a partir de una infección aguda durante el embarazo es de 20 a 50%.

Alrededor del 10-33% de las infecciones adquiridas durante el embarazo resultan en abortos espontáneos, muerte neonatal o toxoplasmosis severa que se caracteriza por hidrocefalea, encefalitis, retardos psicomotores, convulsiones y coriorretinitis (Tenter y col, 2000). Sin embargo, más del 67% de las infecciones fetales son generalmente asintomáticas en el nacimiento, pero si se les hace un seguimiento hasta la adultez, se observa el desarrollo de incapacidades de aprendizaje o visuales a lo largo de su crecimiento (Carter y col, 1986; Wilson y col, 1980). Si no se los trata, la toxoplasmosis congénita puede resultar una enfermedad severa y hasta fatal (Desmont y col, 1974). El tratamiento durante el primer año de vida, apenas se diagnostica la toxoplasmosis congénita, reduce los riesgos de la manifestación clínica. En cambio existen controversias en cuanto al valor del tratamiento en la madre embarazada para evitar la transmisión congénita.

1.6.4 – Epidemiología: Toxoplasmosis humana

La toxoplasmosis humana está difundida por todo el mundo y aproximadamente 40 a 50% de los adultos sanos entre 30 y 40 años de edad presentan una seroconversión toxoplásmica. Sin embargo, existen variaciones importantes en la prevalencia entre los distintos países, dado que un estudio indica que la seroconversión concierne de 3 a 45% de

los individuos en Estados Unidos y alcanza un 80% en Europa Occidental (Hunter y Remington, 1994a). Estas variaciones se explican esencialmente por las diferencias de hábitos alimentarios, por la abundancia relativa de gatos, por las condiciones climáticas y el nivel de higiene de la población.

Dado que un ambiente cálido y húmedo es más propicio para la supervivencia de los ooquistes, la seroprevalencia es importante en los países tropicales en donde existe una gran concentración de felinos (90% de la población adulta en Salvador, 94% en Guatemala), mientras que es menor en los climas fríos (28% en Alaska) y secos (42% en Australia) (Ashburn, 1992). En un estudio realizado con muestras de sueros tomadas en individuos de la Ciudad de Buenos Aires y Gran Buenos Aires se observó un 56% de seropositivos (Rosenzvit y col. 1995).

En los países en donde la tradición culinaria privilegia el consumo de pescado, la seroprevalencia es menor, del orden de 25% en Japón y 35% en Finlandia (Remington y Desmont, 1976). De la misma manera, en los países en donde se consume carne bien cocida, el número de sujetos portadores de anticuerpos específicos es poco elevado, como en Estados Unidos en donde alcanza el 30%. En Francia por el contrario, en donde la carne se consume poco cocida, la prevalencia serológica positiva es muy elevada (90% entre los 20 y 30 años). La seroprevalencia parece encontrarse en una neta disminución actualmente, debido al desarrollo de métodos de congelación que alteran la infectividad de los quistes.

En las últimas dos décadas, ha habido un dramático aumento en el número de individuos inmunocomprometidos y un aumento concomitante en los casos de toxoplasmosis severa. Estudios epidemiológicos manifiestan que la incidencia de fallecimientos en este grupo varía de 30 a 40%, y llega hasta un 47% en Europa (Hunter y col, 1994a, Beaman y col, 1994).

Por otro lado, estudios americanos y europeos indican que la incidencia de la toxoplasmosis congénita varía de 0,012% a 0,35% (Remington y Desmont, 1995). Estas cifras son consideradas muy elevadas cuando se tiene en cuenta las lesiones que estas infecciones pueden ocasionar.

1.6.5 - Toxoplasmosis en animales de importancia ganadera

La toxoplasmosis es la zoonosis parasitaria más difundida en la naturaleza. Se ha encontrado en todas las latitudes, en más de trescientas especies de mamíferos domésticos y

silvestres y en alrededor de treinta especies de aves de corral y silvestres. Entre los animales de ganadería, el cordero y el cerdo, son los principales portadores de quistes tisulares en el tejido muscular y constituyen así una fuente de infección para el hombre. En Europa, la frecuencia media de parasitismo a partir de estos dos animales se estima en más de 50% (Dubey y Beattie, 1988). En animales como cabras y ovejas la infección toxoplásmica puede inducir abortos, siendo una causa de pérdidas económicas (ver Tenter y col. 2000). En Uruguay fue estimada una pérdida de 1.4 a 4.7 millones de dólares por abortos en el ganado ovino (Freyre y col 1997).

1.6.6 – Diagnóstico en humanos

El diagnóstico específico indicativo de una infección puede ser establecido por la puesta en evidencia de anticuerpos anti-*T. gondii* en suero o por la presencia del parásito. La detección de parásitos se puede realizar directamente en frotis, luego de una coloración o inmunofluorescencia, pero la identificación es difícil ya que la carga parasitaria es a menudo débil. Más recientemente, se han desarrollado técnicas basadas en la detección de ADN de *T. gondii* por amplificación génica (Burg y col, 1989).

El método más comúnmente utilizado en el diagnóstico la toxoplasmosis está basado en el análisis serológico. Las técnicas para detectar anticuerpos específicos son numerosas: test de coloración (dye-test) de Sabin Feldman (1948), test de inmunofluorescencia indirecta, test de aglutinación, tests inmunoenzimáticos ELISA. Para los tests de ELISA que están basados en el reconocimiento de antígenos parasitarios solubles, la proteína SAG1 presenta un interés particular debido a que es un blanco privilegiado de anticuerpos séricos durante las fases aguda y crónica de la infección (Santoro y col, 1985; Decoster y col, 1992).

El esquema clásico de la cinética de anticuerpos anti-*T. gondii* en el momento de una primera infección permite la interpretación de los resultados serológicos. La detección de IgG específicas pero no de IgA ni IgM descarta una infección aguda. Por el contrario, la detección de IgM y/o IgA específicas, no permite definir con una sola muestra el estadio de la infección, requiriéndose el análisis pareado con otra muestra tomada a los 14 días. Una técnica comúnmente utilizada en Europa en los laboratorios de referencia es el ensayo de avididad de IgG (Jenum y col, 1997; Hedman y col, 1989), el cual se basa en la detección de la avididad de

las IgG que se unen al *T. gondii* que aumenta a partir de los 5 meses luego de una primoinfección.

La toxoplasmosis congénita debe ser sospechada en caso de una seroconversión de la mujer embarazada. El diagnóstico prenatal puede realizarse mediante un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de líquido amniótico (Hohlfeld y col, 1994; Grover y col, 1990; Cazenave y col, 1992; Jenum y col, 1998; van de Ven y col, 1992; Furlon y col, 1999), mediante la detección de anticuerpos IgA e IgM en sangre fetal, incapaces de atravesar la barrera placentaria (Decoster y col, 1992), o mediante Western blot (Gross y col, 2000). Sin embargo, el diagnóstico es confirmado por persistencia de anticuerpos IgG más allá de los 7 meses de vida.

El diagnóstico de la toxoplasmosis cerebral en el inmunosuprimido se realiza con el test de aglutinación diferencial, pero principalmente en el análisis por imágenes. La sola evidencia del parásito a partir de sangre, de lavado broncoalveolar, de una aspiración de médula, de cortes de tejidos patológicos o eventualmente de líquido céfalo-raquídeo sirve para el diagnóstico de las formas diseminadas más graves.

1.6.7- Tratamiento

Las drogas más comúnmente utilizadas en el tratamiento de la toxoplasmosis son la pirimetamina, la sulfadiazina, la clindamicina y la espiramicina. Las dos primeras, se utilizan casi invariablemente en asociación, y funcionan interfiriendo con el metabolismo de la síntesis de ácido fólico en el parásito y en consecuencia la síntesis de ácidos nucleicos. Las dos últimas drogas contrarrestan la síntesis proteica del parásito. La toxicidad de estas drogas en el tratamiento de pacientes limita la duración del tratamiento, con lo cual la eficacia resulta menor (Joss, 1992).

En mujeres embarazadas se recomienda el tratamiento con espiramicina debido a que no tiene efectos tóxicos, alcanza una alta concentración en placenta y es capaz de atravesarla reduciendo el riesgo de transmisión al feto (Wong y col, 1994). Si la infección fetal está documentada como altamente probable, se recomienda la utilización conjunta de pirimetamina y sulfadiazina alternada con el tratamiento de espiramicina, a pesar de la potencial toxicidad de la pirimetamina para la madre y el feto. Asimismo, en el inmunodeprimido y en el infante con toxoplasmosis congénita, el tratamiento de referencia es

la asociación de sulfadiazina y pirimetamina, ya que el tratamiento postnatal tiene un efecto de prevención significativo en la ocurrencia de lesiones oculares.

1.6.8- Virulencia

Según las especies hospedadoras y en el seno de una misma especie, existe un amplio espectro de manifestaciones clínicas de la toxoplasmosis que van desde la mortalidad hasta la cronicidad. Estas variaciones dependen no solo del parásito sino que también del hospedador.

– Factores genéticos del hospedador

En la naturaleza, los ratones son importantes hospedadores intermediarios del *T. gondii*. Esto sugiere que la respuesta inmune en el ratón está bien adaptada para hacerle frente a este parásito particular. Además, el ciclo de vida del parásito en el ratón es muy similar al de humanos. El modelo murino es muy útil para estudios relacionados con la patogenia de la infección toxoplásmica, debido a la existencia de líneas con distinta sensibilidad y la posibilidad de realizar cruzamientos. La sensibilidad de los hospedadores puede ser medida en términos de mortalidad o de carga parasitaria durante la fase aguda y en términos de desarrollo de encefalitis durante la fase crónica de la infección.

La infección de los ratones C57BL/6 genéticamente sensibles produce un aumento en la producción sistémica de IFN- γ y de la actividad microbiciada de las células de Kupffer, similarmente a lo que se observó en los ratones resistentes A/J; estos resultados pueden hacer suponer que la sensibilidad de los ratones a la infección aguda puede estar ligada en ciertos casos a una respuesta inmunitaria excesiva y deletérea (McLeod y col, 1989; Liesenfeld y col, 1996). También es importante resaltar que la vía de infección afecta la sensibilidad ya que los ratones sensibles a una infección oral pueden ser resistentes a un mismo inóculo dado por vía intraperitoneal.

En cambio, el control de la carga parasitaria cerebral luego de una infección oral con quistes estaría ligada a los genes del complejo H-2 (McLeod y col 1989). La utilización de ratones B10 congénitos para los genes del MHC mostraron que el carácter de resistencia está ubicado en la región H-2D/L. El diseño de mutantes en esta región, permitió identificar al gen L^d como el responsable de la resistencia al enquistamiento en el modelo de infección oral

(Brown y col, 1995). Por mutación del gen I-A^b en ratones B6 sensibles al enquistamiento, se demostró que las moléculas clase II controlan igualmente el desarrollo de la carga parasitaria cerebral (Brown y McLeod, 1990).

La resistencia a la fase crónica de la infección toxoplásmica se evalúa por la capacidad de prevenir el desarrollo de una encefalitis. Suzuki y col, (1991a) demostraron que la determinación genética de la inducción de la encefalitis toxoplásmica está ligada a la presencia de uno o varios genes localizados en la región H-2D del MHC: los ratones portadores del alelo H-2D^d son resistentes y los portadores de los alelos b o k son sensibles.

– Factores provenientes del parásito

Las cepas parasitarias se clasifican en función de las manifestaciones patológicas que inducen en ratones Swiss-Webster: las virulentas son las que inducen la muerte durante la fase aguda de la infección mientras que las no virulentas permiten el establecimiento de una infección crónica. La influencia de la cepa parasitaria en la severidad de la infección se expresa durante la fase aguda o crónica de la infección. Por ejemplo, las cepas ME49 y DAG son no virulentas en ratones CBA/J durante la fase aguda, pero en el curso de la fase crónica, la cepa ME49 induce encefalitis mortal (Suzuki y col, 1989a)

Uno de los aspectos más sorprendentes del *T. gondii* es que la alta virulencia de las cepas del tipo I es independiente del background genético del ratón hospedador (Howe y col, 1996). En contraste, las cepas II y III, tienen un LD₅₀ variable que depende de la ruta de inoculación, del genotipo del hospedador y de la dosis. Los estudios en el modelo murino indican que la virulencia aguda de las cepas del tipo I se debe al crecimiento rápido y arrollador, que lleva a altas cargas tisulares de parásitos y al disparo de una respuesta masiva de citoquinas del tipo Th1 (Gavrilescu y Denkers, 2001; Mordue y col, 2001). Paradójicamente, estas mismas citoquinas se necesitan para controlar las infecciones por cepas no virulentas; sin embargo en esta circunstancia, se producen a niveles apropiados y se reprimen luego de la inducción inicial (Mordue y col, 2001).

1.7 – Respuesta Inmune

Durante una infección natural con *T. gondii*, el sistema inmunológico es estimulado tanto a nivel de mucosas, lugar de penetración del parásito, como a nivel sistémico. La infección induce en el hospedador una respuesta inmune humoral y una fuerte respuesta mediada por células que resulta en el bloqueo de la multiplicación del taquizoito y en la formación de quistes conteniendo bradizoitos, evento que comienza a los 14 días, que definen la etapa crónica de la infección. Virtualmente todas las cepas de ratón desarrollan una fuerte respuesta inmune del tipo Th1, independientemente del haplotipo MHC que posean. La resistencia del hospedador al parásito es críticamente dependiente de IFN- γ (Suzuki y col, 1989b; Schar-ton- Kersten y col, 1996). Durante las fases aguda y crónica de la infección, las células NK y las células T CD4⁺ y CD8⁺ son activadas e inducidas a producir esta citoquina protectora (Gazzinelli y col, 1992). El TNF- α también participa en la resistencia del hospedador, pero parece ser más crítico en la fase crónica (Gazzinelli y col, 1993; Deckert-Schluter y col, 1998; Yap y col, 1998).

1.7.1 – Inmunidad sistémica: Iniciación

La infección con *T. gondii*, induce una fuerte inmunidad no específica, independiente de células T, que juega un rol importante en el desarrollo de células T parásito-específicas. Este aspecto no específico tan potente se reveló en estudios en donde la infección con *T. gondii* limitó la coinfección con patógenos no relacionados como *Leishmania major*, infecciones con ciertos virus y desarrollo de ciertos tumores (Santiago y col, 1999; Gazzinelli y col, 1991; Hibbs y col, 1971; Mahmoud y col, 1976). La activación de la respuesta innata ocurre en estadios tempranos de la infección que resulta en la síntesis de IFN- γ , IL-12, TNF- α , GM-CSF, IL-6 e IL-1 por células NK, células dendríticas, macrófagos y neutrófilos. En ratones, el IFN- γ y el TNF- α actúan sinérgicamente para mediar la inducción de la función microbicida de los macrófagos (Gazzinelli y col, 1996; Sher y col, 1993), que resulta en la producción de radicales libres y óxido nítrico (ON) por la activación de la sintasa óxido nítrico inducible (iNOS). En humanos, se demostró *in vitro* que la actividad anti-*Toxoplasma* inducida por IFN- γ depende, al menos en parte, de la inducción de IDO (indolamina 2,3 dioxigenasa) que degrada el triptofano y provoca un cese en el crecimiento del parásito en macrófagos y fibroblastos (Pfefferkorn, 1984).

Dos roles principales se le atribuyen a esta activación temprana: el primero es limitar la replicación del taquizoito antes del desarrollo de la inmunidad mediada por células T; y el segundo, dirigir el desarrollo de una respuesta de células T apropiada induciendo la diferenciación de células Th precursoras a células Th1 efectoras (Fig. 1.9). Dentro de este medio de citoquinas pro-inflamatorias, los componentes del sistema inmune adquirido que son importantes para el control de la infección, principalmente los linfocitos T, reconocen la combinación apropiada de Ag, MHC y moléculas co-estimuladoras.

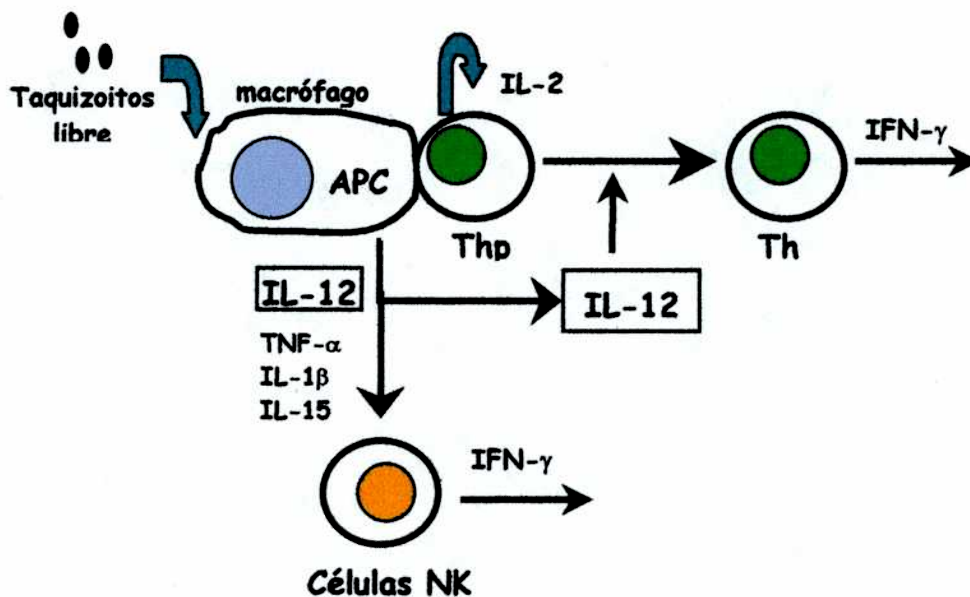


Figura 1.9: Caminos alternativos de inducción de la síntesis de IFN- γ . La vía independiente de células T está dirigida por IL-12, así como también por TNF- α , IL-1 β e IL-15. Estas citoquinas pro-inflamatorias inducen la producción de IFN- γ en células NK, que pueden promover la activación de macrófagos y la adquisición de la actividad microbiostática. Por otro lado, la presentación de péptidos del parásito por una célula presentadora de antígeno profesional (APC) como un macrófago o una célula dendrítica a una célula precursora (Thp) resulta en la diferenciación a Th1 en presencia de IL-2 y de IL-12 producida por la APC.

1.7.2 - Rol de IL-12 en la inducción de una respuesta Th1

La IL-12 es la principal citoquina que promueve la síntesis de IFN- γ en células NK y linfocitos T induciendo una respuesta Th1 (Fig 1.9) (Biron and Gazzinelli, 1995). Esto se demostró en un estudio en donde la neutralización de esta citoquina con anticuerpos inducía

respuestas reducidas de IFN- γ y mortalidad aguda de ratones infectados con una cepa no virulenta de *T. gondii* (Gazzinelli y col, 1994); y en otro estudio, en donde ratones deficientes en la subunidad p40 de IL-12, morían frente a la infección con la misma cepa del parásito presentando una cinética similar a animales knockout (KO) para IFN- γ (Scharton-Kersten y col, 1997). La IL-12 es más importante en el establecimiento que en el mantenimiento de la resistencia del hospedador dependiente de IFN- γ ya que el tratamiento anti-IL-12 en ratones crónicamente infectados no mostró ningún efecto a diferencia del tratamiento anti-IFN- γ que resultó en una rápida reactivación de la infección (Gazzinelli y col, 1994).

Una fuente importante de IL-12 son las células dendríticas que producen IL-12p40 en respuesta a la infección con *T. gondii* (Scanga y col, 2002). Hay evidencia de la existencia de una vía de regulación una vez que la producción de esta citoquina ha sido iniciada. Esta vía estaría relacionada con la inducción de lipoxina A₄, un eicosanoide que funciona mediante la supresión de la expresión del receptor de quemoquinas CCR5, involucrado en el mecanismo de estimulación de IL-12 (Reis e Sousa y col, 1999; Aliberti y col, 2002). Estos descubrimientos sugieren que una vez que la producción de IL-12 por DCs ha sido inducida y las respuestas Th1 iniciadas, la síntesis de la citoquina es inhibida activamente, probablemente para beneficio tanto del hospedador como del parásito.

En estudios recientes se demostró que el *T. gondii* posee la habilidad de interferir activamente la vía de activación NF- κ B en macrófagos (Butcher y col, 2001; Shapira y col, 2002) la cual está involucrada en la regulación de numerosos genes como IL-12, IFN- γ , TNF- α e iNOS. En células infectadas con este parásito, a pesar de la rápida fosforilación y degradación de I κ B, el NF- κ B no se transloca al núcleo, y este evento mostró ser dependiente de la expresión de una HSP70 del parásito y transitorio, produciendo una represión sólo al inicio de la infección de la célula (Dobbin y col, 2002). Adicionalmente, las citoquinas IL-10 y TGF- β tienen una acción inhibitoria sobre la producción de IL-12 por macrófagos, y su expresión puede ser inducida por los parásitos o sus productos. Aparte de la ventaja obvia que le trae al parásito el desarrollo de una inmunidad retardada, la supresión de la producción de IL-12 en macrófagos infectados puede representar una co-adaptación que apaga su activación local a la vez que protege al hospedador de un choque por citoquinas (ver Sacks y Sher, 2003).

1.7.3 - Activación temprana de linfocitos T

El *T. gondii* tiene la habilidad de inducir la proliferación y producción de IFN- γ en linfocitos T durante los primeros días de la infección. Esta activación temprana de la actividad de células T ocurre principalmente mediante la vía clásica de procesamiento y presentación de péptidos antigénicos en el contexto de MHC clase I y II y las moléculas co-estimuladoras apropiadas. Pero hay evidencia que sugiere que en ratones, el *T. gondii* posee propiedades de superantígeno que pueden contribuir a esta activación temprana (Denkers y col, 1994)

Por otro lado, también hay una activación temprana de linfocitos $\alpha\beta$ que producen IFN- γ la cual es consecuencia de la habilidad de las células presentadoras de Ag de activar los linfocitos T en un medio de citoquinas inflamatorias. La evidencia *in vivo* de esta activación temprana está demostrada en un estudio en donde la producción de IFN- γ por estos linfocitos durante la fase aguda de la infección (7 días) mostró estar asociada a la protección de ratones desafiados con una cepa cistogénica (Gazzinelli y col, 1994); y en otro estudio en donde linfocitos intraepiteliales CD8⁺ aislados 11 días luego de una infección oral fueron capaces de transferir una protección adoptiva dependiente de IFN- γ (Buzoni-Gatel y col, 1997).

1.7.4 – Modulación de la activación de células T

Si la respuesta Th1 generada por *T. gondii* no es regulada, la respuesta misma representa un riesgo para los tejidos del hospedador. La citoquina IL-10 es producida por una gran variedad de células que incluyen linfocitos Th2, células B, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos. La IL-10 inhibe la síntesis de una gran variedad de citoquinas proinflamatorias de macrófagos y es entonces un importante modulador de las funciones efectoras de estas células (Gazzinelli y col, 1992). El principal mecanismo por el cual la IL-10 inhibe la síntesis de IFN- γ en NK y linfocitos Th1 es mediante la inhibición de la síntesis de IL-12 en macrófagos (D'Andrea y col, 1993). La inducción simultánea de IL-10 durante la iniciación de la inmunidad mediada por células es crucial para evitar una respuesta de citoquinas del tipo 1 abrumadora.

La IL-4 es otra citoquina que inhibe ciertas funciones de macrófagos y potencia el efecto de la IL-10 sobre estas células (Oswald y col, 1992; Sher y col, 1992). Además, la IL-4 juega un papel principal en el control del desarrollo de la inmunidad mediada por células mediante su efecto sobre células precursoras Th dando como resultado la diferenciación al fenotipo Th2 (Swain y col, 1994).

El TGF- β es un importante regulador de la activación de macrófagos (Tsunawaki y col, 1988). Esta citoquina demostró influenciar la función efectora de macrófagos (producción de ON) contra parásitos protozoarios. Más aún, el TGF- β potencia los efectos de IL-10 en macrófagos e inhibe la síntesis de IFN- γ en células NK inducida por la IL-12 (Hunter y col, 1995; Oswald y col, 1992).

Luego de una primación con IFN- γ , los macrófagos expuestos a productos microbianos o a TNF- α , producen altos niveles de intermediarios reactivos de nitrógeno (IRN). Estos compuestos son importantes como moléculas responsables de las funciones microbicidas y microbiostáticas. Pero también se reveló que tienen una actividad inmunosupresora particularmente durante la fase temprana de la infección con *T. gondii* (Candolfi y col, 1994). Hay evidencia que demuestra que los efectos reguladores de los IRN son sobre linfocitos T y es debida en parte a la inducción de apoptosis (Martins y col, 1995).

1.7.5 - Citotoxicidad mediada por linfocitos

Además de liberar IFN- γ en respuesta a Ag parasitarios, las células CD8⁺ exhiben una fuerte actividad citotóxica (CTL) restringida a MHC clase I sobre células infectadas (Hakim y col, 1991; Subauste y col, 1991). También demostró que luego de una infección oral, los linfocitos intraepiteliales CD8 TCR α/β positivos confieren protección luego de una transferencia, y que *in vitro* secretan IFN- γ y exhiben actividad CTL contra enterocitos infectados (Buzoni-Gatel y col, 1997; Chardes y col, 1994). Por otro lado, se ha encontrado actividad CTL restringida a HLA clase I en células CD8⁺ de sangre periférica de humanos con toxoplasmosis aguda y este tipo de clones pueden ser cultivados de linfocitos de sangre periférica de pacientes con infecciones crónicas (Montoya y col, 1996; Purner y col, 1996). Por lo tanto, tanto en ratones como en humanos, la infección con *Toxoplasma* provee un

estímulo potente para la generación de células CD8⁺ efectoras capaces de lisar células blanco infectadas con el parásito.

Se conoce poco acerca de la identidad de los Ag parasitarios presentados en el contexto de MHC clase I durante una infección natural. La principal proteína de superficie SAG1 o p30 parece ser capaz de dirigir respuestas CD8⁺ cuando se la administra en el contexto de adyuvantes como Quil A (Khan y col, 1991). Adicionalmente, otros antígenos de *T. gondii* son capaces de inducir respuestas CTL, ya que luego de un fraccionamiento bioquímico de un extracto de taquizoito soluble se observó que la principal actividad citolítica está contenida dentro de una fracción que no incluye a SAG1 (Denkers y col, 1993).

La generación de la actividad protectora de las células CD8⁺ requiere la presencia de linfocitos T CD4⁺ (Gazzinelli y col, 1991). Utilizando ratones KO para MHC clase II, se descubrió que una población de CD4⁺ NK1.1, que funciona independientemente de MHC clase II, provee la función “helper” mediante la producción de IL-2 para la generación de células CD8⁺ efectoras durante la fase temprana de la infección (Denkers y col, 1996). Estos ratones sobreviven durante la infección aguda, pero mueren durante la infección crónica temprana, con lo cual se concluyó que tanto las células CD8⁺ como las CD4⁺ restringidas a MHC clase II se requieren para prevenir la reactivación de quistes. Por otro lado, Casciotti y col (2002) observaron que en ausencia de CD4⁺, la menor cantidad de IFN- γ resulta en elevados números de parásitos en los tejidos de los ratones, y en una protección a la mortalidad por una respuesta hiperinmune. Como estos ratones no sobreviven a la infección crónica, las células CD4⁺ serían requeridas para el mantenimiento a largo plazo de la respuesta de células CD8⁺. Como en estudios recientes se sugirió que el mantenimiento de las células CD8⁺ de memoria es dependiente de IL-15 (Khan y Kasper, 1996; Lodolce y col, 1998; Zhang y col, 1998) producida por varios tipos celulares como macrófagos y células dendríticas, Casciotti y col (2002) proponen que las células CD4⁺ serían requeridas para mantener a las células presentadoras de antígeno en un estado activado de manera que constantemente re-estimulen a las células de memoria T CD8⁺.

En humanos, la infección con *Toxoplasma* además resulta en la generación de linfocitos CD4⁺ citotóxicos (Curiel y col, 1993; Montoya y col, 1996; Purner y col, 1996). Con respecto a la especificidad antigénica de estas células, se generó un clon secretor de IFN- γ específico para la proteína ROP-2 (Saavedra y col, 1991). Cuando se sintetizaron y se ensayaron *in vitro* péptidos conteniendo los tres epitopos potenciales de células T, se encontró

que una gran proporción de donantes seropositivos respondían al menos frente a uno de estos péptidos (Saavedra y col, 1996). Con lo cual, esta proteína sería un Ag importante reconocido durante la respuesta de linfocitos T en humanos.

Las células con actividad citotóxica generadas por la infección con *T. gondii*, tienen la habilidad de producir simultáneamente altos niveles de IFN- γ (Fig. 1.10). Utilizando ratones KO para perforina, incapaces de desarrollar CTL o actividad lítica de NK, se observó que esta actividad no parece ser requerida para la resistencia frente a la infección aguda (Denker y col, 1997). Sin embargo, la función CTL parece jugar un rol importante durante los estadios tardíos de la infección, posiblemente contribuyendo a la prevención de la reactivación de quistes, o limitando el número de parásitos que inicialmente se enquistan dentro de tejidos del sistema nervioso central. La habilidad de producir IFN- γ sería la característica clave más probable de esta población de células efectoras en el control de la infección.

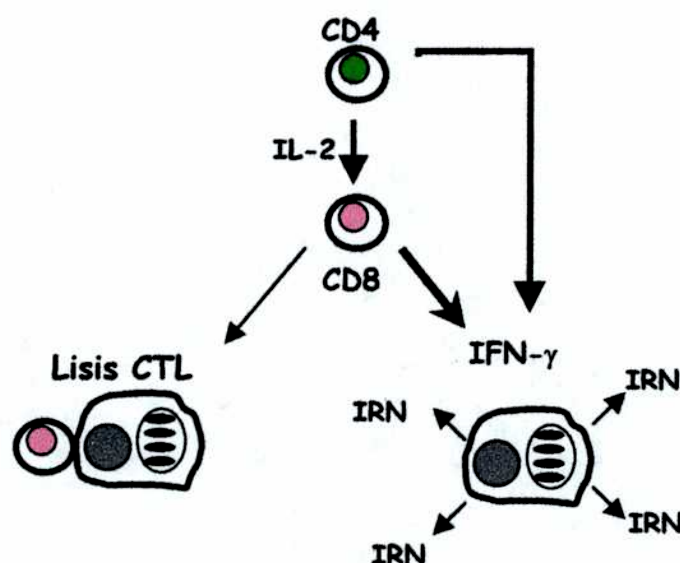


Figura 1.10: Rol dual de los linfocitos T CD8+ como efectores de inmunidad hacia el *T. gondii*. El primado de las células CD8+ que requiere antígeno parasitario, células CD4+ e IL-2, resulta en una actividad efectora anti-parasitaria. Estas células exhiben una actividad citolítica restringida a MHC clase I contra células infectadas y liberan altos niveles de IFN- γ que es la principal actividad efectora de estas células durante la infección aguda. El IFN- γ actúa en parte, a través de su habilidad de inducir funciones microbicidas como producción de ON e intermediarios reactivos de nitrógeno (IRN). La función CTL parece cumplir un rol funcional secundario durante la infección crónica.

1.7.6 – Inmunidad humoral

La infección con *T. gondii* estimula una respuesta de anticuerpos específica. Tanto las infecciones humanas como murinas inducen la producción de IgG, IgM e IgE en suero, y también IgA en secreciones. Aunque no está claro el rol de los anticuerpos en la resistencia, hay estudios que demuestran que la administración de anticuerpos policlonales (Krahenbuhl y col, 1972; Pavia, 1986) o monoclonales (Johnson y McDonald, 1983) anti-*T. gondii* antes de la infección, resulta en una reducción de la mortalidad o en la prolongación del tiempo de vida en ratones. Utilizando ratones KO para células B, Kang y col (2000) observaron que la infección con el parásito inducía una mortalidad asociada con la proliferación continua de taquizoitos en sus cerebros y pulmones, mientras que la expresión de IFN- γ , TNF- α e iNOS eran normales. Paralelamente, Sayles y col (2000) utilizaron ratones KO para células B vacunados con taquizoitos atenuados, y estudiaron la respuesta frente a al desafío con la cepa virulenta RH. Los resultados demostraron un aumento en la sobrevida de los ratones vacunados con respecto a los controles sin vacunar, con lo cual sugirieron que en total ausencia de células B, hubo algo de resistencia presumiblemente por la respuesta celular T generada, pero esta sola no es suficiente para proteger completamente a los ratones ya que ratones normales vacunados presentan un 100% de sobrevida.

En presencia de anticuerpos específicos, los taquizoitos son rápidamente lisados por activación del complemento a través de la vía clásica (Schreiber y col, 1980), aunque los parásitos son resistentes al complemento en ausencia de anticuerpos (Fuhrman y Joiner, 1989). Este mecanismo mediado por complemento dependiente de anticuerpos podría jugar un rol importante en la resistencia de ratones a la infección. Los anticuerpos también jugarían un rol protector en colaboración con macrófagos, ya que se demostró que estas células son capaces de fagocitar y matar parásitos cubiertos con anticuerpos *in vitro* (Anderson y col, 1976). Adicionalmente, Mineo y Kasper (1994) demostraron que el tratamiento de taquizoitos con un mAc anti-*T. gondii* en ausencia de complemento, no inhibía ni el pegado ni la invasión del parásito a fibroblastos humanos, sino que inhibía su proliferación intracelular.

En conclusión, la inmunidad humoral y celular actúan en concierto en la resistencia del hospedador contra el *T. gondii*. El rol de cada tipo de respuesta inmune parece diferir dependiendo del estadio de la infección y la localización anatómica.

1.7.7 – Inmunidad en la mucosa intestinal

Las defensas inmunológicas de la mucosa intestinal están compuestas de sitios inductores bajo la forma de una red de órganos linfoides secundarios organizados como las placas de Peyer y los ganglios mesentéricos, y de sitios efectores bajo la forma de una red linfática secundaria difusa compuesta por linfocitos T y B de la lamina propia y los linfocitos intraepiteliales. La interacción eficaz entre los mecanismos de defensa inmunológicos específicos y no específicos, innatos como adquiridos, es indispensable porque las mucosas son la vía de entrada natural de numerosos agentes infecciosos como el *T. gondii*. Este parásito, luego de ser ingerido, se libera de los quistes u ooquistes dentro del tracto gastrointestinal e inicialmente invade el epitelio intestinal antes de diseminarse por todo el cuerpo. Esto induce una respuesta inmune local en la mucosa intestinal tanto del tipo celular como humoral.

1.7.8 – Inmunidad innata en mucosas

Luego de la infección oral con quistes de *T. gondii*, el parásito se adhiere y multiplica dentro de las células epiteliales del intestino (Speer y Dubey, 1998), lo cual parece ser un requisito para la inducción de la inmunidad del hospedador. Las células epiteliales infectadas producen una variedad de citoquinas y quemoquinas que están involucradas en la migración de células efectoras al sitio de infección y que pueden resultar críticas en la iniciación del proceso inflamatorio de la mucosa.

Empleando el modelo murino se observó que la invasión del intestino resulta en una robusta respuesta inmune en la mucosa, que puede incluir la activación de neutrófilos, macrófagos tisulares, monocitos, células dendríticas y eosinófilos. La respuesta intestinal está caracterizada por una fuerte respuesta Th1 y por la producción de un amplio rango de citoquinas como IFN- γ , TNF- α e IL-1. Los macrófagos y monocitos pueden controlar y matar a los parásitos por mecanismos oxidativos y no oxidativos. Los macrófagos activados por IFN- γ exhiben actividad microbicida por producción de altos niveles de ON que es tóxico para el *T. gondii* (Khan y col, 1997). Adicionalmente, los macrófagos amplifican la respuesta inmune adquirida específica y son necesarios para la presentación antigénica que provee una protección a largo plazo contra la infección recurrente.

Otras células que migran al sitio de infección y se activan son las células dendríticas de las placas de Peyer y células de la lamina propia (Kelsall y Strober, 1997). Las placas de Peyer tienen la particular capacidad de inducir células Th productoras de citoquinas del tipo 2 (IL-4, IL-5 y IL-10) y tipo 3 (TGF- β). Pero la fuerte respuesta Th1 que genera la infección intestinal con *T. gondii*, probablemente supere el ambiente de citoquinas en la mucosa intestinal que favorece la diferenciación de células Th2 y Th3, debido a las fuertes señales provenientes del parásito como la de inducir IL-12 en forma directa en células presentadoras de antígenos. Recientemente, Aliberti y col (2000) demostraron que un elemento crucial en esta potente respuesta Th1 generada por *T. gondii* es a través de la interacción con el receptor de quemoquina CCR5 en las células dendríticas. Posteriormente, demostraron que la ciclofilina-18 era el principal componente liberado por *Toxoplasma* que estimulaba la producción de IL-12 en células dendríticas, y este factor dispara la señal celular a través del receptor CCR5 (Aliberti y col, 2003). La habilidad de generar esta fuerte respuesta protectora puede beneficiar la transmisión del parásito previniendo que el parásito mate a su hospedador intermediario.

1.7.9 – Inmunidad mediada por células

Los linfocitos de la mucosa o IELs están localizados entre las células epiteliales por debajo de las uniones intercelulares (Fig. 1.11), y expresan una serie de receptores de superficie distinta de los linfocitos de sangre periférica y comprenden una población fenotípicamente distinta. En ratones, la mayoría de estos IELs son linfocitos T, y hasta un 90% son CD8+. La naturaleza de las cadenas homo o heterodiméricas que constituyen la molécula CD8, permite definir dos poblaciones: la timo-dependiente CD8 $\alpha\beta^+$ (40% de la población total) que en su mayoría portan un TCR $\alpha\beta^+$, y la población de IELs timo-independiente CD8 $\alpha\alpha^+$ (60%) que portan TCR $\alpha\beta$ (20%) o TCR $\gamma\delta$ (40%) (Guy-Grand y col, 1991). Los IELs CD8 $\alpha\beta^+$ proveen un número importante de funciones inmunológicas que incluyen actividad citotóxica (Gelfanov y col, 1996; Guy-Grand y col, 1996), secreción de citoquinas como IL-2, IL-3, IL-5, TNF- α , TGF- β , IL-10 e IFN- γ (Guy-Grand y col, 1998; Lefrancois y col, 1997) y modulación de la muerte y regeneración de las células epiteliales.

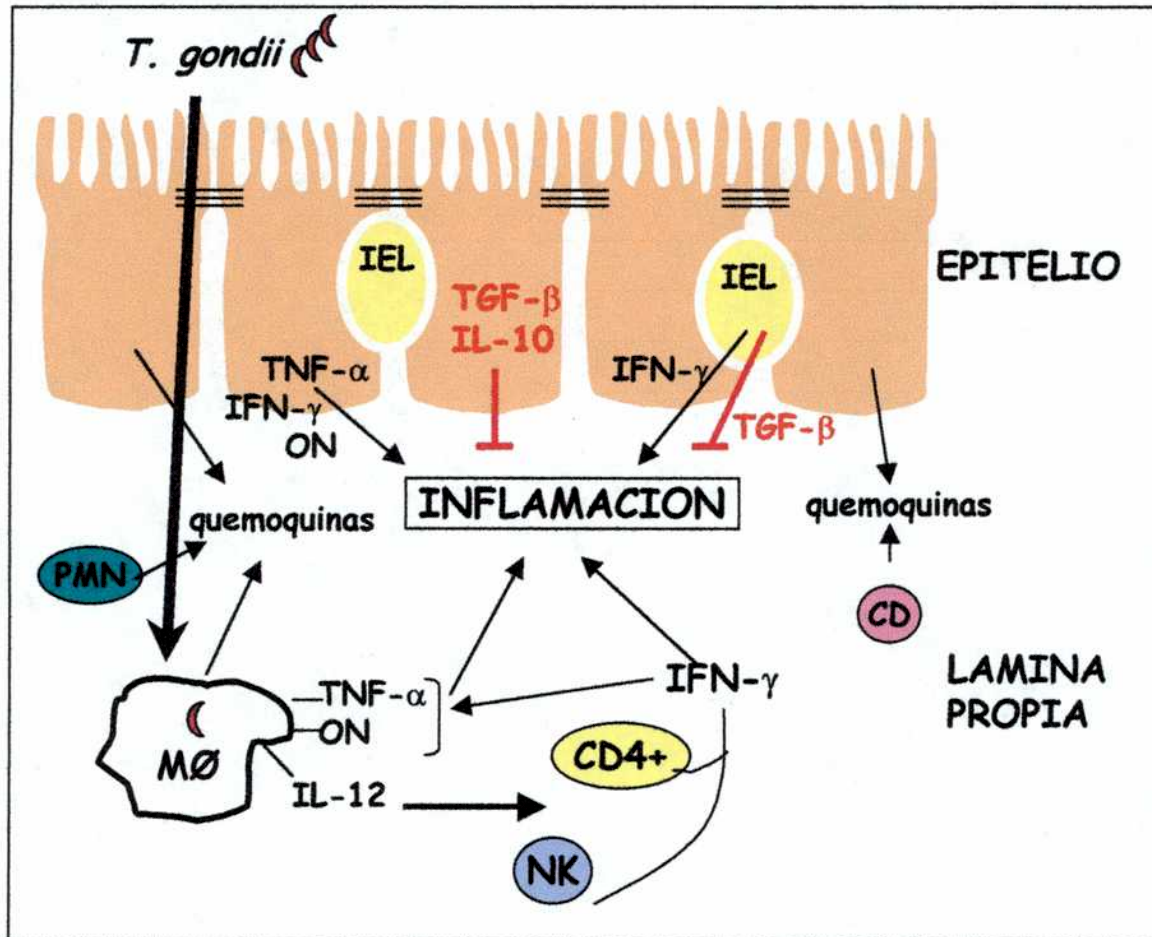


Figura 1.11: Modelo de respuesta inmune en la mucosa intestinal frente a la infección oral con *T. gondii*. Los enterocitos infectados producen óxido nítrico (ON) así como quemoquinas que participan en la quimio-atracción de polimorfos nucleares (PMN) y diferentes células presentadoras de antígeno como macrófagos (M), monocitos, células dendríticas (CD) de las Placas de Peyer, nódulos mesentéricos linfáticos o de la lámina propia ($CD4+$). Las células a lo largo de todo el intestino participan en la homeostasis mediante la secreción de citoquinas regulatorias (en rojo).

Por otro lado, los linfocitos de la lámina propia son en su mayoría (65%) linfocitos CD4⁺ convencionales y el resto son CD8⁺. La mayoría tienen TCR $\alpha\beta$ y secretan citoquinas *in situ* como IFN- γ , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 y TNF- α (Abreu-Martin y col, 1996). Durante las inflamaciones intestinales, se observa una muy importante síntesis de IFN- γ y de TNF- α por estas células. Estas dos citoquinas pueden provocar un efecto deletéreo extremadamente severo. El doble rol a la vez protector y deletéreo del IFN- γ está particularmente estudiado en el curso de la infección con *T. gondii*. Esta citoquina resulta indispensable para la protección contra el parásito en cepas de ratones resistentes, y también responsable de la muerte de ratones pertenecientes a cepas sensibles como C57BL/6 por la inducción de una necrosis intestinal mediada por ON (Liesenfeld y col, 1996, 1997).

La evidencia de que la población de IELs en el intestino tiene un rol importante en la inmunidad contra el *T. gondii* ha sido obtenida de distintos estudios. Chardes y col (1993) demostraron que luego de una infección oral en ratones, los IELs sintetizan IFN- γ , principal mediador de la protección, y también IL-4, IL-5 e IL-6 que intervienen en la diferenciación y maduración de linfocitos B. Además, estos IELs CD8 $\alpha\beta$ aislados una semana después de la infección, ejercen *in vitro* una actividad citotóxica restringida a MHC clase I, frente a células epiteliales infectadas con *Toxoplasma* (Chardes y col, 1994). La transferencia adoptiva de IELs primados con antígenos de *T. gondii* a ratones naïve, provee una protección frente al desafío letal en una cepa sensible, y una disminución del 90% en la carga parasitaria en cerebros de ratones resistentes (Buzoni-Gatel y col, 1997).

1.7.10 – Inmunidad humoral de mucosas

La infección con *T. gondii* induce la producción de IgA secretorias específicas. McLeod y Mack (1986) fueron los primeros en demostrar la presencia de IgA específicas en las secreciones intestinales de ratones infectados por inmunofluorescencia y ELISA. Luego de la infección oral de ratones, la producción de IgA se observa entre la cuarta y séptima semana. Los principales antígenos reconocidos por estas IgA intestinales poseen pesos moleculares que van de 22 a 60 kDa (Chardes y col, 1990). Las IgG se detectan en forma tardía mientras que no se detectaron IgM.

El rol de las IgA intestinales en la protección contra el *T. gondii* fue sugerido por McLeod y col (1988) luego de una inmunización oral de ratones con una cepa mutante. Mack y McLeod (1992) demostraron que las IgA actuarían a nivel intestinal mediante un proceso de exclusión del parásito, impidiendo la penetración a los enterocitos. La incubación de taquizoitos con IgA secretorias de leche purificadas de mujeres con infección aguda provoca una reducción de 50 a 75% de la infección de enterocitos *in vitro*. La principal proteína reconocida por estas IgAs es la SAG1.

1.8 – Vacunas contra la toxoplasmosis

La toxoplasmosis es una enfermedad de gran importancia médica y veterinaria. En humanos, los pacientes inmunosuprimidos pueden exhibir síntomas severos frente a la reactivación de la infección como encefalitis toxoplásmica, mientras que en mujeres embarazadas la infección puede causar enfermedades congénitas que pueden llegar hasta el aborto (Gagne, 2001; Tenter y col, 2000). En animales, esta enfermedad es de gran importancia económica a nivel mundial ya que causa abortos y pérdidas neonatales en todo tipo de ganado (Buxton, 1998). Adicionalmente, los quistes tisulares de *T. gondii* en la carne del ganado infectado son una fuente importante de infección para los humanos (Dubey, 2000). Este aspecto de gran importancia mundial para la salud pública y la economía hace que el desarrollo de una vacuna efectiva para controlar esta infección sea un objetivo importante, ya que además, el tratamiento de esta enfermedad en humanos es difícil debido a los efectos tóxicos de las drogas disponibles.

Hasta ahora, la única vacuna comercial es la cepa S48 de taquizoitos vivos atenuados para uso en ovejas (Buxton, 1991). Sin embargo, esta vacuna causa efectos colaterales, tiene una vida de almacenado corta, induce una inmunidad breve y tiene un costo alto. Más aún, este tipo de vacunas vivas también tiene el riesgo de revertir a una cepa patogénica con lo cual no resulta adecuada para el uso en humanos. Por todas estas razones, la mayor parte de los trabajos actuales se están abocando a la investigación de vacunas basadas en proteínas recombinantes, y de ADN. Respecto a las proteínas recombinantes, estas requieren para su empleo combinarlas con algún adyuvante para generar la respuesta inmune adecuada. Las vacunas de ADN se presentarían como muy promisorias ya que no requieren adyuvantes para

estimular una fuerte respuesta celular de larga duración, activando linfocitos de ambos linajes además de inducir la producción de anticuerpos.

La ruta de administración de los candidatos para vacunas y el uso de adyuvantes adecuados, han mostrado ser factores importantes en la inducción de una respuesta inmune. Para estimular la defensa a nivel de mucosas, se han empleado sistemas que utilizan adyuvantes como la toxina del cólera (Bourguin y col, 1993; Wu y Russell, 1997; Debard y col, 1996; Velge-Roussel y col, 2000), mutantes no tóxicos de enterotoxina (LTR72 y LTK63) (Bonenfant y col, 2001) y salbutamol (Fermin y col, 1999) administrados por vía oral o intranasal. Por vía intraperitoneal, subcutánea o intramuscular se han utilizado antígenos combinados con ISCOM (quil A, compuesto inmuno-estimulador) (Lunden y col, 1993), liposomas (Bulow y Boothroyd, 1991), IL-12 recombinante o pGM-CSF (Letscher Bru y col, 1998; Desolme y col, 2000), SBAs1 (adyuvante inductor de respuesta Th1) (Haumont y col, 2000), Adyuvante completo de Freund (Angus y col, 2000; Supply y col, 1999) y aluminio (Petersen y col, 1998). Finalmente, varios antígenos se han empleado en vacunas de ADN desnudo que expresan parte o el antígeno entero (Nielsen y col, 1999; Angus y col, 2000; Desolme y col, 2000; Vercammen y col, 2000; Supply y col, 1999) y recientemente se ensayó un injerto de piel de ratón vacunada con un gen que codifica para un antígeno de *T. gondii* (Saito y col, 2001). Estos sistemas fueron ensayados en distintas cepas de ratones, en ratas y en cobayos los cuales fueron desafiados con dosis letales y no letales de distintas cepas del parásito, mostrando distintos grados de protección que abarcan desde altos hasta exacerbación de la infección. Sin embargo, la mayoría de estos adyuvantes no pueden ser incluidos en la formulación de vacunas para uso humano debido a su toxicidad.

La mayoría de los trabajos se han centrado en el estudio de antígenos de membrana del taquizoito, siendo SAG1 el antígeno más estudiado (Petersen y col, 1998; Letscher Bru y col, 1998; Haumont y col, 2000; Nielsen y col, 1999; Angus y col, 2000). En los últimos años, también han sido analizados como candidatos a vacunas los principales antígenos excretorios-secretorios expresados en taquizoitos y bradizoitos como GRA1, GRA4 y GRA7 (Desolme y col, 2000; Vercammen y col, 2000; Supply y col, 1999) así como también el antígeno de bradizoito MAG1 (Parmley y col, 2002). Entre los antígenos de las roptrias, ROP2 y ROP1 fueron utilizados en ensayos de inmunizaciones (Saavedra y col, 1996; Fachado y col, 2003; Vercammen y col, 2000; Chen y col, 2003).

1.9 – Planteo del problema

La mucosa intestinal es la primer barrera contra la infección toxoplásmica. De hecho, empleando parásitos transfectados con el gen de la β -galactosidasa se pudo observar que ratones infectados con una cepa de *T. gondii* atenuada genéticamente (vacuna viva) bloqueaban completamente la invasión a las mucosas de los parásitos transfectados (Dr. J.F. Dubremetz, comunicación personal). En algunos ratones, y animales, puede observarse ocasionalmente el desarrollo de inflamaciones intestinales, que en el modelo murino está restringido al “background” genético del ratón. Ya sea para ampliar los conocimientos de la respuesta inmune contra el *T. gondii* o para el desarrollo de una vacuna oral, es necesario establecer cuales son los factores que regulan la respuesta inmune en la mucosa intestinal. La cepa de ratones C57BL/6 (H-2^b) es genéticamente susceptible a la infección oral con quistes tisulares, ya que desarrolla una forma letal de ileitis inflamatoria aguda. Por lo tanto este modelo ofrecía una ventaja para tratar de encontrar los factores moduladores de tal respuesta inflamatoria. Por otro lado, la cepa CBA/J (H-2^k) es resistente a la infección aguda y presenta solo una leve inflamación intestinal luego de la infección oral con el parásito. Este modelo ha sido poco estudiado, pero también podría aportar resultados interesantes respecto a la respuesta inmune efectiva y sin procesos inflamatorios graves.

En el desarrollo de una vacuna contra el parásito, está claro que la inmunización con un solo antígeno no parece ser suficiente para conferir una protección completa, proponiéndose el desarrollo de una vacuna multiantigénica. El mosaico antigénico del *T. gondii* está bien caracterizado a nivel de respuesta humoral en humanos, pero muchos antígenos nunca fueron estudiados a nivel de respuesta celular. El modelo murino es el más comúnmente usado para caracterizar la infección oral del *T. gondii* así como el valor inmunoprolífico de los distintos antígenos. A pesar de la buena caracterización de la respuesta inmune sistémica contra el *T. gondii* en ratones, se conoce poco sobre cómo estos antígenos inducen dicha respuesta. Por lo tanto, es difícil extrapolar el valor inmunoprotectivo de una proteína del modelo murino al humano.

Por otro lado, la elección del adyuvante y la vía de inmunización también es importante. En el caso de mujeres embarazadas seronegativas lo más importante es bloquear el pasaje del taquizoito por la placenta. La utilización de un adyuvante como el aluminio de

amplio uso en el humano, podría ser una alternativa interesante para inmunizaciones que activen la respuesta inmune sistémica, neutralizante de la expansión del taquizoito. Con el mayor conocimiento de cómo es la homeostasis de la respuesta inmune en la mucosa intestinal, las vacunas orales desarrolladas con antígenos con comprobada eficacia, tendrían interesantes perspectivas de uso.

1.10 – Objetivos

Parte I

- Analizar el papel de los linfocitos intraepiteliales y su interacción con las células epiteliales intestinales durante la ileitis aguda y la necrosis hiper-inflamatoria en la cepa susceptible de ratones C57BL/6 (H-2^b), utilizando una línea murina de células enterocíticas diferenciadas (IC_{cl2}).
- Caracterizar la respuesta generada por *T. gondii* durante la infección de células de la línea enterocítica MODE-K, derivada del epitelio intestinal de ratones C3H/HeJ (H-2^k) que no desarrollan ileitis luego de la infección, con el fin de estudiar su valor como modelo *in vitro* de células enterocíticas resistentes a la infección aguda.

Parte II

- Caracterizar la cinética de la respuesta inmune generada contra los antígenos ROP2, GRA4 y TgPI luego de una infección oral en el modelo murino, utilizando formas recombinantes mediante el análisis de su habilidad de estimular *in vitro* una respuesta celular a nivel local y una respuesta humoral y celular sistémica. Analizar en forma comparativa la respuesta generada en dos cepas de ratones con diferente haplotipo y susceptibilidad frente a la infección con *T. gondii*.
- Examinar la eficacia de las formas recombinantes de estos antígenos y una proteína quimérica ROP2-GRA4 cuando se las combina con aluminio, en conferir inmunidad protectora contra la infección con *T. gondii* en dos cepas de ratones con distinta susceptibilidad.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

2.1- Animales

Ratones hembras de 8 a 10 semanas de las cepas C57BL/6, CBA/J, BALB/c y C3H fueron utilizados en los estudios.

2.2 – Parásitos

Para los estudios *in vitro*, se utilizaron taquizoitos de las cepas RH (Sabin, 1941), RH-SAG1 KO y PTG de *T. gondii* y taquizoitos de *Neospora caninum*. Los parásitos fueron mantenidos en cultivos primarios de fibroblastos de prepucio humanos en medio MEM (Gibco Laboratories) suplementado con 2% de suero fetal bovino (SFB) y 1% penicilina-estreptomicina-anfotericina B a 37° en una atmósfera humidificada de CO₂ 5%. Luego de la lisis celular, los taquizoitos fueron cosechados, centrifugados, lavados con buffer fosfato salino (PBS), resuspendidos en el medio correspondiente para la inoculación de la línea celular y contados en un hemocitómetro.

Las cepas cistogénicas 76K y ME49 fueron utilizadas para la obtención de quistes para los estudios de infección *in vivo*. Estas cepas producen un gran número de quistes conteniendo bradizoitos en cerebros de ratones crónicamente infectados. Los quistes fueron mantenidos mediante pasajes cada 2 meses a ratones naïve por vía intraperitoneal. Para los estudios, el tejido cerebral conteniendo quistes fue suspendido en una solución salina y los quistes fueron contados en 6 a 10 muestras de un volumen de 10 µl. La suspensión fue ajustada para contener el número de quistes adecuado en cada dosis de 0,5 ml para infectar por alimentación forzada intragástrica a los ratones de las distintas cepas.

2.3 – Purificación de IELs

Los IEL fueron obtenidos de acuerdo a un procedimiento previamente descrito pero con modificaciones (Guy-Grand y col, 1978). Los intestinos delgados de los ratones fueron enjuagados con PBS, y se removieron las placas de Peyer y la grasa.

Luego fueron cortados en trozos de 2 cm, y cada trozo de intestino fue abierto longitudinalmente en un paño de incisión estéril. La mucosa fue raspada y disociada por rotura mecánica usando una barra de agitación magnética durante 15 min en medio RPMI 1640/HEPES (Life Technologies, Grand Island, NY) conteniendo 10% SFB (Flow Laboratories, McLean, VA) y 1 mM ditioeritritol (DTT) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Los restos de tejido y agregados celulares fueron removidos por pasaje a través de una columna de lana de vidrio (1,6 g) empaquetada en una jeringa de 20 ml en RPMI con 10% SFB. Los linfocitos fueron obtenidos por centrifugación en una capa de Ficoll ($d = 1,077$; NycoPrep, Nycomed, Oslo, Norway). Las células fueron luego suspendidas para los experimentos en medio RPMI 1640/HEPES conteniendo 10% SFB. La pureza fue determinada por “cell sorting analysis” utilizando anticuerpos conjugados a isotiocianato de fluoresceína (FITC) anti-CD8 α , -CD8 β , -CD4 y -CD19 (Pharmingen).

Para el análisis de la expresión de ARNm de quemoquinas y los co-cultivos, los IELs primados fueron aislados el día 7 luego de la infección oral de los ratones C57BL/6 con quistes de *T. gondii* y el día 11 post-infección de los ratones CBA/J, tiempo en el que mostraron una mayor eficiencia en transferir protección. Estos últimos IELs con haplotipo H-2^K fueron utilizados para el co-cultivo con los enterocitos MODE-K.

IELs CD8 α ⁺ y CD8 β ⁺ fueron purificados por incubación tanto con microesferas anti-CD8 α (Miltenyi Biotec) o anticuerpos anti-CD8 β (BD Pharmingen) seguido de microesferas de anti-IgG de rata (Miltenyi Biotec) y separados con una columna de “cell sorting” magnéticamente activada (Miltenyi Biotec). La tinción de CD8 α ⁺ y CD8 β ⁺ (BD Pharmingen) confirmó un 98% de pureza en las poblaciones.

2.4 – Transferencia pasiva de IELs

Los ratones C57BL/6 receptores ($n = 6$) recibieron por vía intravenosa 2×10^6 IELs aislados de intestinos de ratones dadores naïve (IELs no primados) o infectados 7 días antes (IELs primados). Cuatro días luego de la transferencia, los ratones receptores fueron desafiados por vía oral con 30 quistes de la cepa 76K. Para determinar la

parasitemia, los ratones del grupo control fueron examinados para la presencia de anticuerpos anti-*T. gondii* específicos 3 semanas después de la transferencia. Los ratones receptores que recibieron IELs primados con antígenos y que no fueron desafiados, no mostraron seroconversión en el experimento control.

2.5 – Análisis histopatológico y morfométrico

Los intestinos extraídos de los ratones transferidos con IELs fueron inmediatamente fijados en formalina 10%, embebidos, seccionados y teñidos con Hematoxilina & Eosina para el examen histológico. Las secciones fueron examinadas y fotografiadas en rollo Kodak Tmax con un fotomicroscopio Olympus VanOx. Los tejidos fueron analizados por un patólogo certificado para la detección de signos de infiltración leucocitaria, ulceración, engrosamiento de la mucosa, hemorragia e integridad de las células epiteliales. El patólogo trabajó sin el conocimiento de la identidad de los especímenes. Se determinó la altura media de 10 villi y la profundidad media de 10 criptas. Solo se midieron especímenes que exhibían secciones orientadas longitudinalmente a través de las criptas.

2.6 – Líneas celulares epiteliales intestinales

Se utilizaron dos líneas de células epiteliales intestinales para los ensayos *in vitro*: IC_{CL2} y MODE-K. Las células IC_{CL2} son células enterocíticas intestinales trans-inmortalizadas (H-2^b) derivadas del intestino delgado de un ratón transgénico que porta los antígenos SV40 T y t ubicados bajo el control del promotor de la L-piruvato kinasa (Bens y col, 1996). Estas células han mantenido las principales características de las células intestinales de la cripta. Las células IC_{CL2} se desarrollan en cultivo como una monocapa confluyente de células cuboidales con microvilli apical corto separado por uniones estrechas. Las células fueron crecidas en frascos de 25 cm² (Falcon; BD Labware, Franklin Lakes, NJ) en un medio definido modificado (MDM) DMEM/HAM's F12 (1/1, v/v; Life Technologies, Grand Island, NY) suplementado con SFB 2%, insulina 5 µg/ml, factor de crecimiento epidérmico 10 ng/ml, transferrina humana 5 µg/ml, dexametasona 50 nM, selenato de sodio 30 nM, triiodotironina 1 nM, penicilina-

estreptomicina 100 IU/ml, fungizona 1%, gentamicina 50 UI/ml, aminoácidos no esenciales 1% y HEPES 20 mM (Sigma-Aldrich) a 37°C en una atmósfera de CO₂ 5%. El MDM fue utilizado dentro de las 2 semanas de preparación para asegurar la actividad de los factores de crecimiento.

MODE-K es una línea celular epitelial intestinal derivada de ratones C3H/HeJ (H-2^k) que fue generosamente provista por el Dr. D. Kaiserlian (Lyon, France). Esta línea celular adherente fue obtenida por immortalización de células epiteliales del intestino delgado de ratones C3H/HeJ jóvenes por transferencia retroviral del gen inmortalizante T grande SV40 usando un vector MuLV de replicación defectuosa (Vidal y col, 1993). Un 95% de las células MODE-K expresan cytokeratina, indicando un aspecto fenotípico de células epiteliales intestinales normales aunque presentan un grado de diferenciación pobre. Estas células MODE-K fueron mantenidas a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ 5% en medio RPMI 1640 (Gibco) conteniendo 10% SFB, penicilina-streptomicina, 1% aminoácidos no esenciales, 0,055% (w/v) piruvato de sodio y 4 mM L-glutamina.

Las células de ambas líneas celulares fueron plaqueadas en filtros de policarbonato permeable cubiertos con colágeno I en el caso de las IC_{CL2} (tamaño de poro 4-μm; Costar; Cambridge, MA) a una densidad de 5×10^5 células/filtro para los experimentos de co-cultivo. Las células fueron infectadas en una relación 2:1 (parásito:célula) y la integridad de la monocapa infectada fue confirmada por microscopio antes de cada experimento. Todos los experimentos fueron realizados en 3 filtros separados para cada condición.

2.7 – Co-cultivo de enterocitos y IELs

Para los experimentos de co-cultivo, las células IC_{CL2} y MODE-K (5×10^5 céls/filtro) fueron sembradas en la superficie inferior de filtros permeables, que en el caso de IC_{CL2} estaban recubiertos con colágeno I, y se incubaron dados vuelta durante 10 días en MDM (Figura 3.4). Cuando los enterocitos alcanzaron la confluencia (4 días para MODE-K) y la completa diferenciación (10 días para IC_{CL2}), la superficie basolateral fue invertida y se los infectó con los taquizoitos en una relación 1:2 (célula:taquizoitos) por 2 h. Luego, los filtros fueron cuidadosamente enjuagados con medio completo para

remover los parásitos libres y se los ubicó en su orientación normal. Se estudió la producción de ARNm de quemoquinas y citoquinas, y también la presencia de proteínas en los sobrenadantes celulares a diferentes tiempos post-infección.

Los IELs purificados de ratones infectados o no infectados fueron colectados como se describió previamente y 1×10^6 fueron agregados dentro del filtro (lado basal de los enterocitos) en 1 ml de MDM. Los co-cultivos de los IELs primados o no primados en contacto con los enterocitos infectados o no infectados fueron mantenidos y examinados a las 4 y 22 h (6 y 24 h respectivamente luego de la infección) y posteriormente se los cosechó para el análisis de producción de ARNm de quemoquinas. La integridad de las monocapas infectadas fue cuidadosamente chequeada por observación en microscopio antes de cada experimento. Como control, la reproducibilidad de la infección fue monitoreada por análisis microscópico confocal láser de la capa teñida con un anticuerpo policlonal específico anti-*T. gondii*.

Para los estudios con α TGF- β , los IELs primados fueron primero incubados con α TGF- β (100 ng/mL, mAc de pollo; R&D Systems, Minneapolis, MN). Los IELs primados incubados con anticuerpos irrelevantes (anticuerpo isotipo-específico irrelevante de IgG de pollo, Sigma) fueron utilizados como control. Se realizó un co-cultivo con enterocitos infectados de la línea celular IC_{cl2} como se describió anteriormente, con la diferencia de que se agregó α TGF- β o anticuerpos irrelevantes al medio de co-cultivo (100 ng/ml). Se examinó la producción de ARNm de quemoquinas a las 4 h luego del contacto (6 horas después de la infección).

2.8 – Extracción y detección de ARNm de quemoquinas por ensayo de protección de ARNasa

A distintos tiempos luego de la infección de la monocapa de células IC_{cl2} y MODE-K se examinó la expresión de quemoquinas mediante un ensayo de protección de ribonucleasa de multisonda (RPA). Para analizar la expresión luego del co-cultivo de IELs con los enterocitos, los IELs retenidos en la parte superior de la cámara del filtro fueron descartados por lavados repetidos con PBS. La membrana de policarbonato del filtro conteniendo la monocapa fue separada y agregada directamente a 3 ml de reactivo TRIzol (Life Technology, Grand Island, NY). Las membranas fueron homogeneizadas y

guardadas a -80°C hasta ser usadas. El ARNm fue extraído de acuerdo a las instrucciones del fabricante y la concentración fue determinada por espectroscopía de UV a 260 nm (medida de relación de 260/280-nm). Entre 10 y 20 μg de ARNm fue extraído de las membranas de los filtros juntados. La expresión de ARNm de quemoquinas y citoquinas en las células fue detectada con un kit de sistema de Ensayo de Protección de ARNasa multi-Sonda RiboQuant (Pharmingen) como lo describió el fabricante utilizando sondas de las proteínas de interés marcadas con ^{32}P . Luego de la incubación de la sonda con las muestras, se realizó una digestión con ARNasa durante 45 min a 30°C . Los extractos fueron cargados en un gel de poliacrilamida 5% y cuantificado con un programa NIH Image 1,61/ppc. La sonda del gen de la gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH) permitió la determinación de las muestras y la comparación de especies de ARNm individuales entre las muestras. Los datos fueron normalizados y expresados como unidades de densitometría relativas a los niveles de ARNm de GAPDH.

2.9 - Detección de proteínas en sobrenadantes de cultivos celulares

Luego de la infección de las células IC_{cl2} y MODE-K con los taquizoitos de las distintas cepas de *T. gondii* y de *N. caninum*, se colectó el sobrenadante celular y se midió la secreción de diferentes quemoquinas y citoquinas a distintos intervalos de tiempo. Para esto se usaron kits de ELISA comercialmente disponibles de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Genzyme, MA).

2.10 – Ensayo de migración *in vitro*

Los IELs primados o no primados de ratones de la cepa C57BL/6 fueron resuspendidos en un colorante fluorescente intravital, diacetato 5-clorometilfluoresceína (1 μM) e incubados 15 min a 37°C . Una vez teñidas, las células fueron lavadas, y 10^6 IELs/filtro fueron agregados a la cámara superior de los filtros conteniendo la monocapa confluyente de células IC_{cl2} crecidas durante 10 días y este co-cultivo se mantuvo durante 4 h a 37°C . El filtro fue luego removido y enjuagado extensivamente con medio. Las monocapas fueron sometidas a fijación con

paraformaldehído 3,7% en PBS durante 30 min a 4°C. Una vez fijadas, las monocapas fueron permeabilizadas con acetona y teñidas con yoduro de propidio y rhodamina-phalloidin (Molecular Probes) y visualizadas por microscopía de escaneo láser confocal (MCR 1024; Bio-Rad) usando una imagen fluorescente de canal dual para identificar selectivamente las células marcadas con fluorescencia y el citoesqueleto de actina. Se analizó un mínimo de 10 campos (481 X 481 µm) en 15 secciones de la monocapa y se proyectaron al mismo nivel.

2.11 - Análisis de citometría de flujo

Para el marcado de la superficie celular, 2×10^6 células MODE-K normales o infectadas con taquizoitos de la cepa RH fueron agregadas a una placa de 96 wells y lavadas 2 veces con PBS. Las células fueron resuspendidas en 50 µl de FcBlock (Pharmingen) durante 15 min a 4°C para prevenir la tinción no específica. Luego se incubaron durante 1 h en hielo en presencia de mAc de rata anti-ratón conjugado a FITC (Pharmingen) en una dilución 1/50. Los anticuerpos utilizados eran específicos contra H2Kk, I-Ak, I-Ek, CD1d, CD40, CD95 y CD 119. Luego las células fueron lavadas y fijadas con 2% de buffer paraformaldehído y la tinción inmunofluorescente específica fue analizada usando un FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) al día siguiente.

2.12 - Construcción de plásmidos y proteínas recombinantes

La expresión de la proteína recombinante ROP2 (residuos 196-561) a partir del plásmido pQE-Rop2 ha sido previamente descrita (Martín y col, 1998) al igual que la proteína TgPI (Pszenny y col, 2000). Para obtener la rGRA4, la secuencia de ADN del gen *gra4* (Mevelec y col, 1992) fue obtenido de la base de datos GenBank (número de acceso M76432). El marco de lectura completo fue amplificado a partir de una biblioteca genómica de la cepa RH de *T. gondii* por PCR. Se sintetizó un cebador “sense” con una secuencia de reconocimiento adicional para la endonucleasa *Kpn* I (Gra4-F 5'-cgcggtaccatgcagggcacttggttttc-3'), y un cebador “antisense” con una secuencia de reconocimiento adicional para la endonucleasa *Eco* RI (Gra4-R 5'-

cgcggtaccatgcagggcacttggttttc-3'). El producto de PCR fue digerido con las enzimas *Kpn* I y *Eco* RI, purificado del gel de agarosa (Qiaex II, Qiagen), clonado en los sitios correspondientes del vector pBluescript (pB-*gra4*), y secuenciado. Luego el plásmido fue digerido con *Pst* I y *Kpn* I para liberar un fragmento que codifica para la región C terminal de la proteína Gra4 (residuos 163-345). El fragmento fue aislado del gel de agarosa y clonado en los sitios correspondientes del vector de expresión pQE30 (Qiagen). Para el desarrollo del sistema de vacuna de ADN basado en GRA4, el plásmido pb-*gra4* se digirió con las enzimas de restricción *Kpn* I y *Eco* RI, y luego fue purificado del gel de agarosa, y clonado en los sitios correspondientes del plásmido pcDNA3 para producir pGRA4 y posteriormente fue secuenciado.

Para construir la proteína quimérica (Quim), se diseñó un nuevo par de cebadores para Rop2: un "sense" (Rop2-F 5'- cgcggggtacccacatcttgcaacatggaa -3') con una secuencia de reconocimiento adicional para la endonucleasa *Kpn* I, y un "antisense" (Rop2-R 5'-gcgggtaccgcccgttctccatcagtttga-3') con una secuencia adicional para la misma endonucleasa en reemplazo del codón stop. El fragmento amplificado fue clonado en el vector pGEM (Promega), secuenciado, digerido con *Bam* HI (sitio interno del ADNc de Rop2 correspondiente al aminoácido 196 en la proteína (ver Martin y col, 1998) y *Kpn* I, y clonado en el plásmido pQE-*gra4* previamente digerido para generar pQE-*rop2-gra4*. Todos estos plásmidos pQE producen proteínas recombinantes con 6 histidinas ligadas al extremo N-terminal.

2.13 - Preparación de antígenos y proteínas recombinantes

El sonicado de *Toxoplasma* (TSO) fue preparado a partir de taquizoitos RH. Los fibroblastos infectados fueron despegados de los frascos, pasados a través de una jeringa con aguja de 27G, centrifugados, y el sobrenadante fue filtrado en un filtro de policarbonato de 3µm. Los taquizoitos fueron contados con un microscopio óptico, y posteriormente sonicados y sometidos a 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento.

Las proteínas recombinantes fueron expresadas en bacterias M15 de la cepa *Escherichia coli* (Qiagen). Un cultivo "overnight" (ON) fue diluido 1:40 en medio Luria suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (100 µg/ml). La expresión de las proteínas recombinantes fue inducida con isopropyl-b-D-thiogalactopiranosido

(IPTG) a una concentración final de 5mM. Luego de cosechar las bacterias, se resuspendieron en solución de lisis a pH 8 y se las sonicoó tres veces. Las proteínas fueron purificadas en condiciones no desnaturizantes en columnas de ácido nitriloacético de Ni²⁺ (Qiagen) como se describió previamente (Nigro y col, 2001). La pureza de las proteínas purificadas fue analizada por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10% en un sistema Mini-Protean (Bio-Rad) y teñidos con azul de Coomassie. Luego las proteínas purificadas fueron cuantificadas por el método de Bradford.

2.14 - Purificación de plásmidos para la vacuna de ADN

Los plásmidos pGRA4 y pcDNA3 vacío fueron purificados con un kit de cromatografía en columna (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La expresión de los plásmidos fue analizada en células COS-7 transfectadas. La introducción de ADN en las células fue facilitada por el Sistema de Transfección Mamífera Profection® (Promega, USA). La transfección con fosfato de calcio del gen *gra-1* en las células COS-7 fue realizada de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Manual Técnico Nro. O12, Promega USA). La expresión de las células transfectadas y de las células control fue analizada por Western blot.

2.15 – Cinética de la respuesta inmune en ratones oralmente infectados

Para los experimentos de seguimiento de la infección, los ratones C57BL/6 y BALB/c recibieron 20 quistes de la cepa ME49 por vía intragástrica. Se colectaron muestras de sangre y de secreción intestinal antes de la infección (día 0) y luego de 1, 3, 5 y 8 semanas de infección, y se hicieron pools de a 3 ratones. Para los estudios cinéticos de proliferación celular, las células de nódulos mesentéricos linfáticos (NML) y de bazo de ambas cepas de ratones fueron colectadas utilizando los mismos tiempos de infección que para los fluidos. Se sacrificaron 3 ratones para cada tiempo.

2.16 - Inmunización con las proteínas recombinantes y desafío con *T. gondii*

Para los experimentos de inmunización, los ratones de las cepas C57BL/6 y C3H fueron vacunados con 10 µg de rGRA4, rROP2, rROP2+rGRA4 o Quim absorbidos a Al(OH)₃ (Alhydrogel, Superfos Biosector a/s, Denmark) por inyección intramuscular (im) 4 veces en un período de 2 semanas. El grupo control fue inoculado con PBS-Alum. Para la vacunación con ADN, los ratones fueron inmunizados 3 veces a intervalos de 3 semanas por inyección im con 100 µg de pGRA4 o del vector pcDNA3 vacío.

Catorce días luego del último refuerzo, los ratones fueron desafiados por infección oral con 20 quistes de la cepa ME49 en el caso del desafío no letal. Los ratones sobrevivientes fueron sacrificados un mes después, sus cerebros fueron removidos y se determinó el número medio de quistes por cerebro por observación en un microscopio óptico de 4 muestras de 25 µl para cada cerebro. Para el desafío letal, los ratones fueron infectados con 100 quistes y se midió sobrevida. Para el caso de dosis letal 50 (LD₅₀), los ratones C3H fueron infectados con 50 quistes orales.

Se tomaron muestras de sangre de la cola antes de comenzar las inmunizaciones (día 0), 2 semanas luego del último refuerzo (día 28) y 4 semanas luego del desafío (día 56). El día 28, se sacrificaron 2 ratones por grupo y se aislaron las células de bazo para el estudio de la respuesta celular.

2.17 - Obtención de secreciones intestinales

Las secreciones intestinales de los ratones del experimento de seguimiento, fueron recuperadas según el método descrito por Elson y col (1984). Los ratones recibieron por vía intragástrica 4 dosis de 0,5 ml de solución de lavado gastrointestinal (NaCl 25 mM, Na₂SO₄ 40 mM, Na₂CO₃ 20 mM, Polietilen glicol 3350 45,5 mM) a intervalos de 15 min. Luego de 30 min de la última dosis, se les inyectó 0,2 ml de una solución de pilocarpina (Sigma) 1 mg/ml en suero fisiológico por vía intraperitoneal. Los ratones fueron inmovilizados y ubicados en una reja sobre una placa de Petri conteniendo 3 ml de una solución con antiproteasas (inhibidor de la tripsina de soja (Sigma) 10%, EDTA 50 mM). El efecto colinérgico de la pilocarpina provoca un aumento de las secreciones por un relajamiento de los esfínteres. Luego de 20 a 30 min de la inyección, las secreciones intestinales fueron homogeneizadas y recuperadas en un tubo cónico. Las

secreciones fueron agitadas en un vortex y centrifugadas a 650 g durante 10 min a 4°C para que los elementos sólidos y las grasas sedimenten. Al sobrenadante se le agrega 1% de fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 100mM en etanol 95%, y se lo centrifuga a 27000g durante 20 min a 4°C. Se recuperan las secreciones clarificadas y se adiciona 1% de PMSF 10mM, 1% acetato de sodio a 1% y 5% suero fetal bovino. Las secreciones intestinales así tratadas son conservadas a -20°C.

2.18 - Análisis de respuesta humoral en fluidos biológicos

Los anticuerpos de las muestras de sangre y de secreciones intestinales específicos contra los antígenos fueron analizados por ensayos de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) como se describió previamente (Martín y col, 1998). Brevemente, las placas de 96 pocillos de fondo plano (Immuno Plate Maxisorp; Nunc) fueron sensibilizadas toda una noche a 4°C con 100 µl de una solución 5 µg/ml de las proteínas recombinantes o 20 µg/ml de TSo diluidos en 0,05M de buffer carbonato (pH 9,6). Los complejos inmunes fueron revelados con el cromógeno ortofenilendiamina (OPD, Sigma) y H₂O₂ 0,15% como sustrato para los anticuerpos conjugados a peroxidasa de rábano. Se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de ELISA automático (Dynatech MR4000). Se determinó el valor de corte para cada anticuerpo ensayado como la media de absorbancia del suero pre-infección más 3 desviaciones estándar (DE). Los resultados fueron expresados como absorbancia relativa (absorbancia a 450nm de la muestra dividido por su correspondiente valor de corte). Los resultados fueron determinados por triplicado para cada suero y se realizaron al menos 2 ensayos independientes para cada suero.

Todos los anticuerpos utilizados eran de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón conjugados a peroxidasa. Los anticuerpos anti-IgA e -IgM (Sigma) fueron utilizados a una dilución 1:20.000 y los anticuerpos anti-IgG (Jackson) 1:4.000. Para el análisis de isotipos de IgG, se utilizaron anticuerpos anti-IgG1 diluidos 1:2.000 e -IgG2a 1:4.000 (Serotec).

Para las secreciones intestinales, se realizaron 3 diluciones seriadas al tercio partiendo de una dilución 1:30. Las diluciones óptimas para la determinación de IgA e IgM específicas contra los antígenos de los sueros de los ratones infectados fueron de

1:300, al igual que para determinar los isotipos IgG1 e IgG2a. En cambio, los sueros fueron diluidos 1:2.400 para la detección de IgG específicas.

2.19 - Aislamiento de células de NML y de bazo

Luego de la infección de los ratones del experimento de seguimiento, se extrajeron los NML y bazos a distintos tiempos y se los homogeneizó utilizando una malla de acero para dispersar las células que luego fueron lavadas con medio RPMI 1640 (Life Technologies). Los eritrocitos de la suspensión de células de bazo fueron lisados por shock hipotónico con una solución de lisis de cloruro de amonio 0,83%. Las células fueron lavadas y luego resuspendidas en medio completo RPMI 1640 suplementado con SFB 10%, 2-mercaptoetanol 5nM, piruvato de sodio 1mM, penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 U/ml). La viabilidad de las células usadas en estos experimentos fue siempre mayor a 80% como se midió por tinción con el colorante Trypan blue (Sigma).

2.20 - Ensayo de proliferación *in vitro*

Los esplenocitos y las células de NML (5×10^5 células/pocillo) fueron sembradas por triplicado en placas de fondo plano de 96 pocillos (Costar, Cambridge, MA). Las células fueron estimuladas con varias diluciones de TSo, o con una concentración óptima de 10 μ g de las proteínas recombinantes rROP2, rGRA4 y rTgPI. Como controles se utilizó medio solo y concanavalina A (Sigma) 5 μ g/ml. Las células fueron cultivadas durante 4 días a 37°C en una atmósfera de CO₂ 5% y 1 μ Ci/well de [3H]-timidina (actividad específica 5 Ci/mmol, Amersham Corp.) fue agregado durante 24 h. La incorporación en el ADN celular fue medida en un contador de líquido de centelleo LKB (Gaithersburg, MD). Los resultados (cpm $\times 10^{-3}$) representan la media $\pm$ error estándar (ES) de pocillos por triplicado y son representativos de al menos tres experimentos independientes.

2.21 - Análisis de citoquinas en sobrenadantes de cultivos

Se colectaron los sobrenadantes de los cultivos de células de NML y de bazo luego de 72 hs de cultivo para la medición de IFN- γ e IL-5 por ELISA. El ensayo se realizó tal como se menciona en el ítem 2.9. Para la medición de IFN- γ , las placas (Immuno Plate Maxisorp; Nunc) fueron sensibilizadas toda la noche a 4°C con 3 μ g/ml de anticuerpo monoclonal de rata anti-IFN- γ de ratón (Pharmingen) diluido en 0,01M Na₂HPO₄ pH9. Las placas fueron lavadas con PBS Tween 20 0,05% y bloqueadas con albúmina sérica bovina 1% durante 2 hs a 37°C. Los sobrenadantes de los cultivos celulares fueron testeados por triplicado en 100 μ l/pocillo, y se agregó una dilución seriada de IFN- γ murina recombinante (Pharmingen) que abarca de 20 - 4.000 pg/ml para la curva estándar. Luego de la incubación durante 1 h a 37°C, se agregó 1 μ g/ml de anticuerpo de rata anti-IFN- γ de ratón biotinilado (Pharmingen) y más tarde un conjugado de estreptoavidina-peroxidasa (Sigma) diluida 1:1.000. Los complejos unidos fueron detectados con 0,15% H₂O₂ – 0,15% OPD (Sigma) en una solución de citrato (0,1 M)- fosfato (0,1 M), pH 4,5. Se midieron las absorbancias a 450nm en un lector de ELISA (Dynatech MR4000). Para la medición de IL-5 en los sobrenadantes celulares, se utilizó un kit de ensayo de ELISA comercial (BioSource). Las concentraciones de las citoquinas fueron calculadas con referencia a la curva estándar correspondiente. Para todos los análisis, los sobrenadantes de al menos 3 pocillos con células estimuladas con los antígenos fueron juntados y se ensayaron en distintas diluciones. Los límites de sensibilidad para los dos ensayos era de 15 pg/ml.

2.22 - Análisis estadístico

Los resultados correspondientes a la Parte I se expresaron como el promedio $\pm$ DE. Las diferencias estadísticas entre los grupos fueron analizadas utilizando el test de Student t. Un valor de $P < 0,05$ fue considerado significativo.

Con el objetivo de reflejar una variación en la población de células respondedoras de un pocillo a otro, los resultados de la proliferación de la parte II están representados como cpm $\pm$ ES ($\times 10^{-3}$). No se muestran los errores estándar en los ensayos de

citoquinas, debido a que los pocillos por triplicado se obtuvieron a partir de muestras de sobrenadantes agrupados. Los datos fueron comparados, en los casos apropiados, por el test de Student-t.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PARTE I

Respuesta Inmune contra el

***Toxoplasma gondii* en la Mucosa**

Intestinal

3. INTERACCIÓN ENTRE CÉLULAS EPITELIALES INTESTINALES Y LINFOCITOS INTRAEPITELIALES DURANTE LA INFECCIÓN CON *TOXOPLASMA GONDII*

La cepa de ratones C57BL/6 (H-2^b) es genéticamente susceptible a la infección oral con quistes tisulares de *T. gondii*, ya que desarrolla una forma letal de ileitis (IBD) caracterizada por necrosis del villi y células de la mucosa en sus intestinos delgados dentro de los primeros siete días (Liesenfeld y col, 1996). La respuesta inmune protectora mediada por IFN- γ , TNF- α e iNOS aparece sobre-estimulada en el intestino delgado de estos ratones susceptibles y la consecuente sobre-producción de óxido nítrico (ON) por iNOS en los órganos resulta en el desarrollo de la patología que contribuye a la muerte temprana (Liesenfeld y col, 1999; Khan y col, 1997).

Los IELs aislados de intestinos de ratones infectados confieren protección contra el desafío letal luego de la transferencia adoptiva a ratones naïve receptores (Buzoni-Gatel y col, 1997; Lepage y col, 1998). Por otro lado, las células epiteliales intestinales (IECs) o enterocitos que bordean el tracto alimentario pueden también participar en el control de la homeostasis del intestino (Stenson y Alpers, 1994; Wang y col, 1997) mediante la secreción de quemoquinas en respuesta tanto a una infección microbiana como a la exposición a citoquinas (Casola y col, 1998; Eckman y col, 1993; Fierer y col, 1993; Amichay y col, 1996). Estas establecen un gradiente capaz de influenciar la migración de macrófagos, monocitos, neutrófilos y linfocitos del torrente sanguíneo a través del endotelio hacia la mucosa y submucosa durante el proceso inflamatorio. Las lesiones intestinales están caracterizadas por un marcado infiltrado de neutrófilos asociado con niveles elevados de IL-8 en la mucosa. Particularmente, se ha observado que las células enterocíticas humanas pueden producir IL-8, RANTES y GRO α las cuales pueden ser quimio-atrayentes para IELs (Ebert, 1995).

En el presente estudio, se analizó el papel de los IELs y su interacción con los enterocitos durante la ileitis aguda y la necrosis hiper-inflamatoria en la cepa susceptible de ratones C57BL/6.

3.1 - Los IELs antígeno-primados reducen la ileitis inflamatoria aguda en ratones susceptibles

Los IELs aislados de ratones C57BL/6 sin infectar (no primados) o infectados (primados) fueron transferidos a ratones naïve y posteriormente desafiados por vía oral. Siete días luego de la infección se observó una necrosis fulminante en la porción distal del ileon del intestino delgado en los ratones que recibieron IELs no primados (Figura 3.1A). Una sección transversal del intestino delgado muestra una reducción en la longitud del villus. En la lámina propia y en el epitelio se observó hemorragia masiva e infiltración de leucocitos (Figura 3.2A). Las áreas infiltradas revelaron una degeneración del epitelio de la mucosa, especialmente notable en la extremidad del villus (Figura 3.2B). En contraste, no se observaron lesiones necróticas en ninguno de los ratones que recibieron IELs primados (Figura 3.1B). La relación de la longitud del villi ($69 \pm 4,2$) con la longitud de las criptas ($23 \pm 5,3$) fue casi normal (3:1) comparada con la de los ratones que recibieron IELs no primados. Este último grupo, mostró una menor relación (1,5:1), lo cual indica un daño tisular extensivo (53 ± 4 longitud del villi, $35 \pm 5,5$ longitud de las criptas). En el grupo de ratones que recibió IELs primados, no hubo atrofia del villi y solo se observó una infiltración leucocitaria leve en la lámina propia (Figura 3.2D). Todos los ratones que recibieron IELs primados, sobrevivieron a un desafío letal, mientras que los receptores de IELs no primados murieron dentro de los 11 días.

3.2 - La infección con *T. gondii* induce un aumento en la expresión de quemoquinas inflamatorias en enterocitos

La atracción de leucocitos a los tejidos es esencial para la inflamación y la respuesta del hospedador a la infección. Este proceso estaría controlado por quemoquinas que son citoquinas quimiotácticas. Para investigar si estas quemoquinas son producidas por los enterocitos, se infectaron células epiteliales IC_{cl2} polarizadas para estudiar la expresión de ARNm de un amplio rango de quemoquinas a distintos tiempos luego de la infección. Como se muestra en la Figura 3.3 A y B, la infección de estos enterocitos resultó en la expresión de una variedad de quemoquinas, que se hicieron evidentes a partir de las 6 h luego de ser infectadas. En particular las quemoquinas MCP-1, MIP-2, MIP-1 α y IP-10 fueron las que

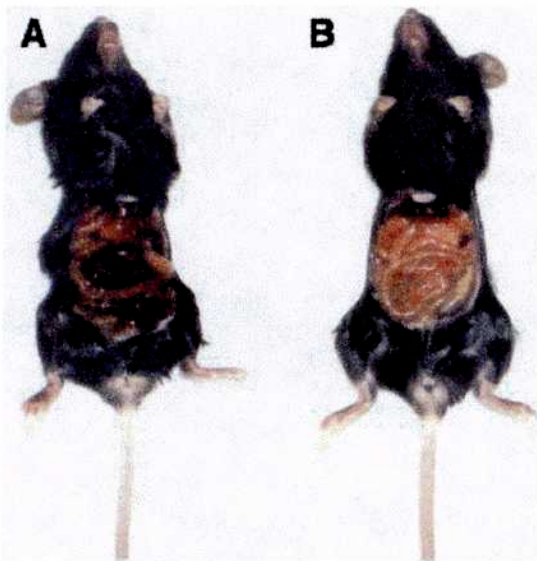


Figura 3.1: Inflamación del intestino delgado luego de la transferencia adoptiva de IELs y posterior infección con *T. gondii*. Cuatro días luego de la transferencia adoptiva de IELs (2×10^6 /ratón) no primados (A) o primados (B), los ratones C57BL/6 fueron desafiados oralmente con *T. gondii* y 7 días después fueron monitoreados para patología. Los resultados son representativos de un total de 6 animales por grupo. Al menos 4 experimentos adicionales mostraron resultados similares.

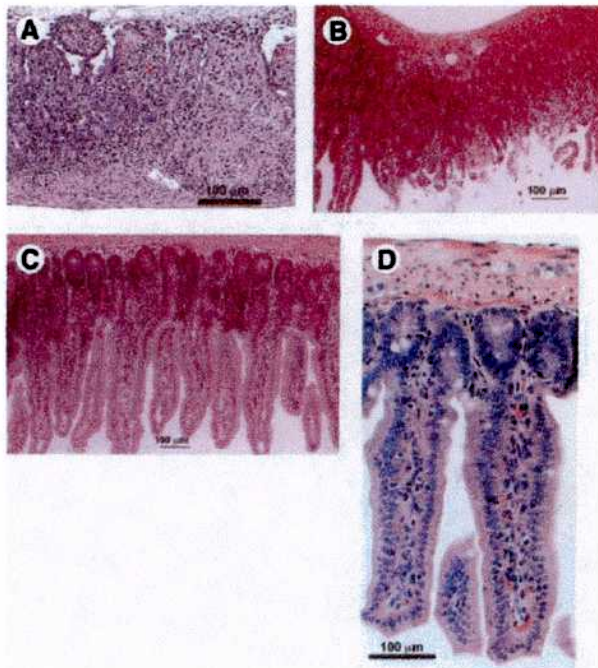


Figura 3.2: Cambios histológicos en el intestino delgado (íleon) de ratones C57BL/6 luego de la transferencia adoptiva de IELs y posterior desafío con *T. gondii*. Los IELs primados o no primados (2×10^6) fueron transferidos a ratones receptores. Cuatro días después los ratones fueron desafiados con 30 quistes por vía oral. Siete días después, se realizaron estudios histológicos en los intestinos delgados. Todas las muestras fueron teñidas con H&E. (A) Secciones ($3 \mu\text{m}$) y fotomicrografías del íleon de ratones C57BL/6 infectados con *T. gondii* luego de recibir IELs no primados muestran una reducción en la longitud y un aumento en el grosor del villi, con dramáticas infiltraciones leucocitarias en la lámina

propia. (B) Hay evidencia de una pérdida focal de células epiteliales superficiales en la extremidad del villi, indicativo del estadio más temprano de necrosis. En contraste, las fotomicrografías del íleon de ratones infectados con *T. gondii* luego de recibir IELs primados revelan un epitelio casi normal (C) con una infiltración leucocitaria leve en la lámina propia comparado con un intestino normal no infectado (D). Seis ratones fueron usados en cada grupo experimental.

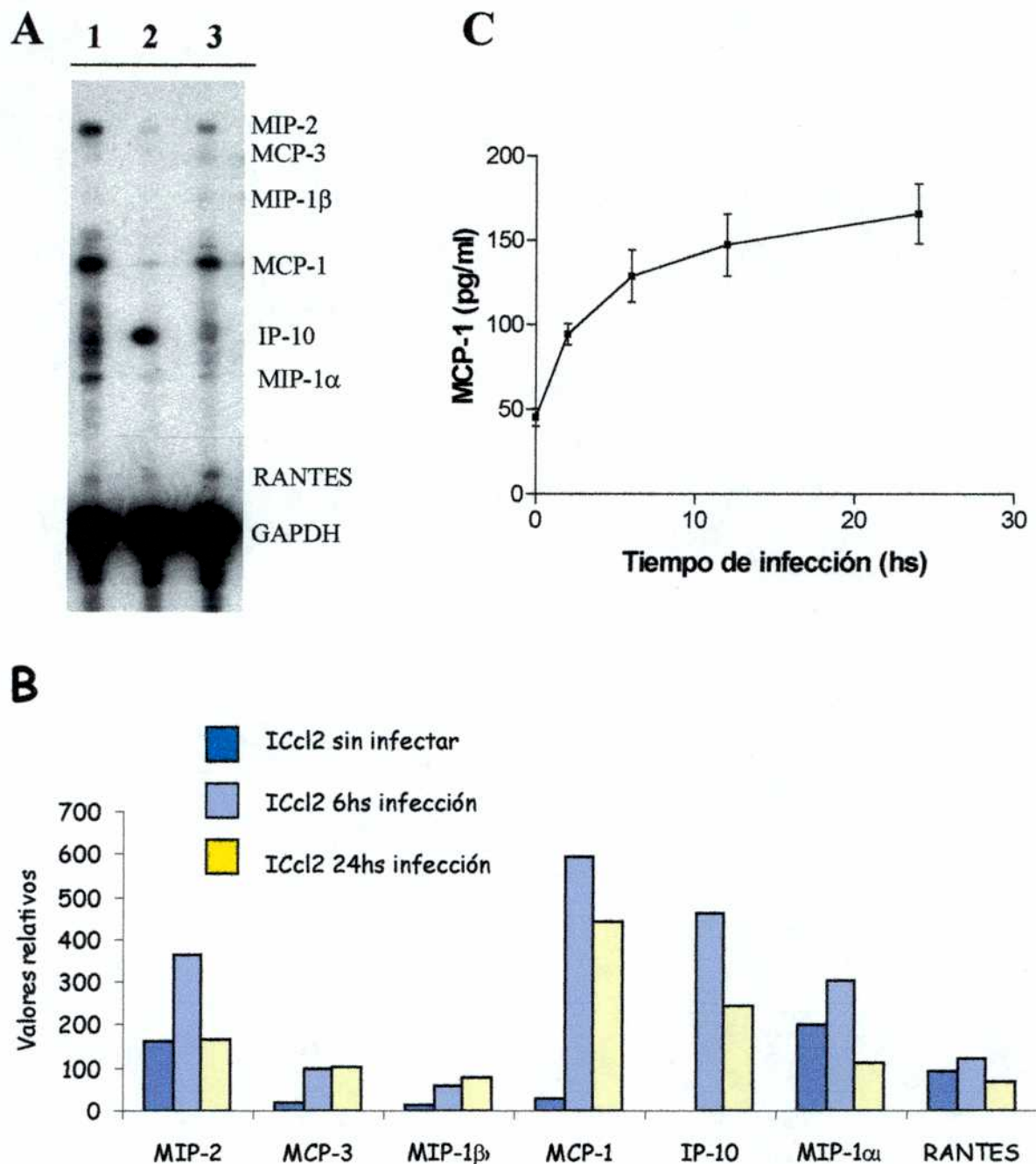


Figura 3.3: Producción de ARNm de quemoquinas en enterocitos IC_{CL2} infectados con *T. gondii*. Las células epiteliales polarizadas IC_{CL2} fueron sembradas en la superficie inferior de filtros de policarbonato de 4 μ m. Diez días después, la monocapa fue infectada en la superficie apical con taquizoitos de la cepa RH de *T. gondii*. Para cada condición, se utilizaron seis filtros cubiertos con colágeno I. Las células fueron removidas de los filtros y la expresión de ARNm de un amplio arreglo de quemoquinas fue examinada por un ensayo de protección de ARNasa. **A.** Autorradiograma representativo de un ensayo de protección de ARNasa luego de 6 h (1) o 24 h (3) de infección comparado con la expresión en células sin infectar (2). **B.** La expresión de ARNm fue estandarizada con la expresión de los genes L32/GAPDH y se expresó como unidades relativas de densitometría. **C.** Para asegurarnos de que las proteínas estaban siendo traducidas, los sobrenadantes de los cultivos fueron ensayados por ELISA para MCP-1 a diferentes tiempos post-infección de la línea celular IC_{CL2}.

mostraron mayor aumento en la expresión. Luego de la infección de la línea celular IC_{cl2}, se detectaron cantidades crecientes de la proteína MCP-1 en los sobrenadantes de los cultivos (Figura 3.3C).

3.3 - Transmigración de IELs en células epiteliales intestinales polarizadas

La IBD que se genera en respuesta a la infección con *Toxoplasma*, podría deberse en parte a la inducción de quemoquinas específicas producidas por los enterocitos que facilitan el tráfico y migración de células inflamatorias al sitio de infección. Con el objetivo de determinar el significado funcional de esta producción de quemoquinas inflamatorias frente a la infección con el parásito, se desarrolló un modelo *in vitro* para estudiar la migración de los IELs (Figura 3.4). Para esto, las células IC_{cl2} fueron crecidas en la superficie inferior de filtros permeables cubiertos con colágeno resultando en una monocapa invertida. Luego de infectar la monocapa en la superficie apical con taquizoitos de *T. gondii*, se agregaron IELs primados o no primados previamente teñidos con diacetato 5-clorometilfluoresceína en la cámara superior del Transwell. Como resultado, los IELs infiltrados en la capa de células epiteliales intestinales exhibían una coloración amarillo-verdosa. Por microscopía confocal se evaluó la migración de los IELs desde la cara basolateral hacia la apical de la monocapa de enterocitos (Shaw y col, 1998). Como se muestra en la Figura 3.5, el análisis confocal mostró que la migración de los IELs antígeno-primados (pIELs, $30 \pm 2,8$ células/campo) o no primados (nIELs, $7,5 \pm 0,7$ células/campo) fue mayor ($P < 0,01$) en células IC_{cl2} infectadas con *T. gondii* comparada con la migración observada en células IC_{cl2} sin infectar (pIELs, $5 \pm 1,4$ células/campo; nIELs, $4 \pm 1,7$ células/campo; [$P < 0,01$]). Más aún, la migración trans-epitelial de los IELs primados con antígeno detectada en la monocapa de enterocitos infectados fue mayor ($P < 0,01$) comparada con el control de IELs no primados. No se observó migración espontánea de IELs dentro de la monocapa de IC_{cl2} (Fig. 3.5A). Las células esplénicas derivadas de ratones infectados con el parásito al momento del aislamiento de los IELs no migraron dentro de la monocapa de enterocitos (datos no mostrados).

Previas observaciones *in vivo* indican que la población de IELs CD8 β ⁺ es la responsable del aumento en la sobrevivencia de los ratones C57BL/6 contra el desafío letal con el parásito (Chardes y col, 1994). Para determinar qué sub-población de IELs era la principal involucrada

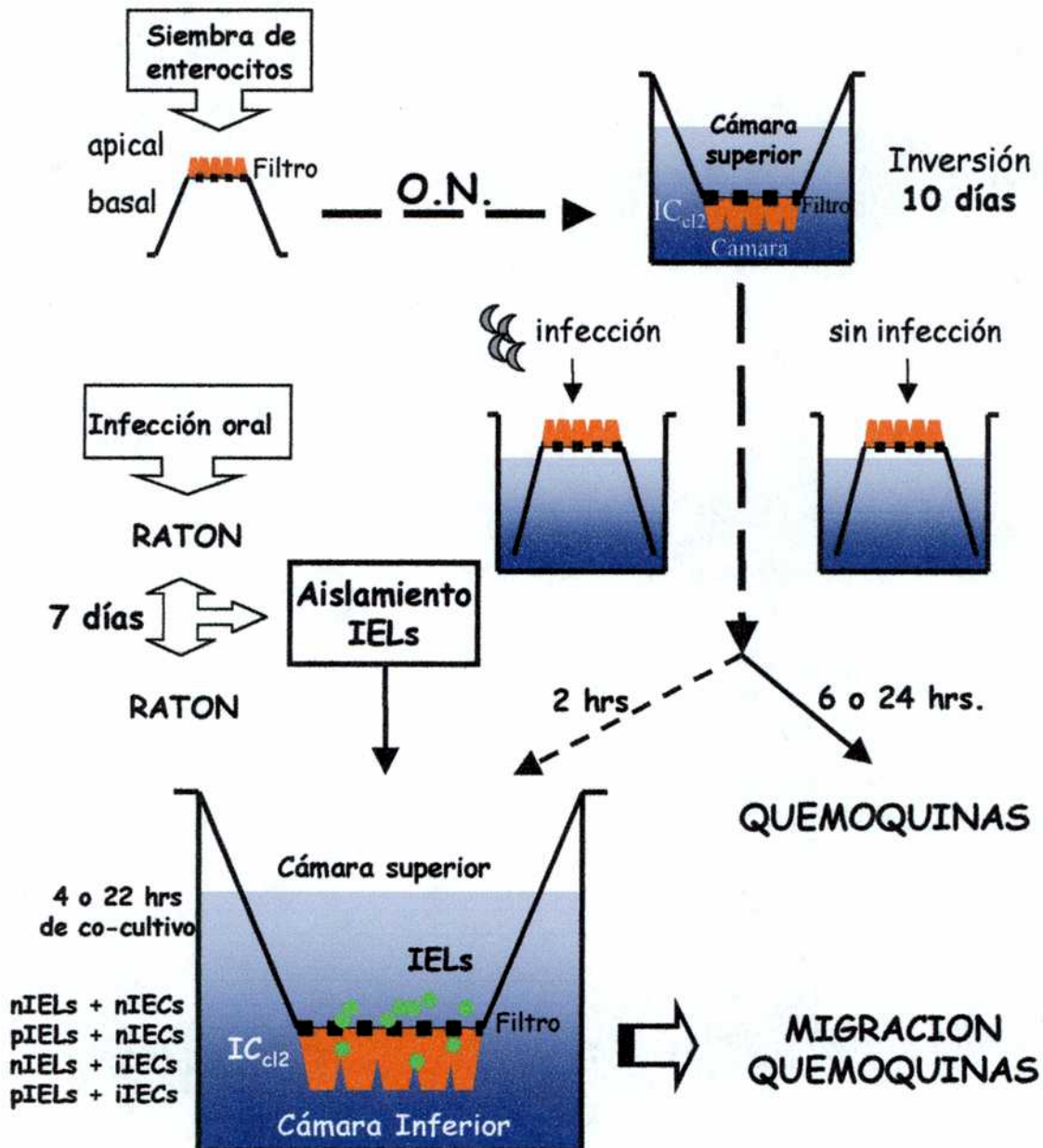


Figura 3.4: Esquema del sistema de co-cultivo de células enterocíticas con IELs. Las células ICcl2 fueron sembradas en la superficie inferior de filtros permeables. Diez días después, la monocapa polarizada fue infectada en la superficie apical con taquizoitos de la cepa RH de *T. gondii*. Dos horas después, IELs purificados de ratones naive (nIELs) o de ratones infectados (pIELs) siete días antes, fueron agregados a la parte superior del filtro. Luego de 24 hs de infección y 22 de co-cultivo, se realizó un estudio de trans migración intra-epitelial por microscopía confocal. Por otro lado, este mismo sistema de co-cultivo se utilizó para examinar la expresión de un amplio rango de quemoquinas por un ensayo de protección de RNasa a distintos tiempos en células ICcl2 luego de remover los IELs.

en la migración dentro del epitelio luego de la infección con *T. gondii*, células CD8 β + y CD8 β - fueron purificadas y agregadas a los cultivos. Como se muestra en la Figura 3.6, los grupos de linfocitos purificados enriquecidos en CD8 β + y CD8 β - tienen la capacidad de migrar dentro de la monocapa de IC_{cl2}. Sin embargo, los IEL CD8 β + primados mostraron una mayor migración que los IELs CD8 β + no primados o los CD8 β - en monocapas de de IC_{cl2} infectadas ($P < 0,01$).

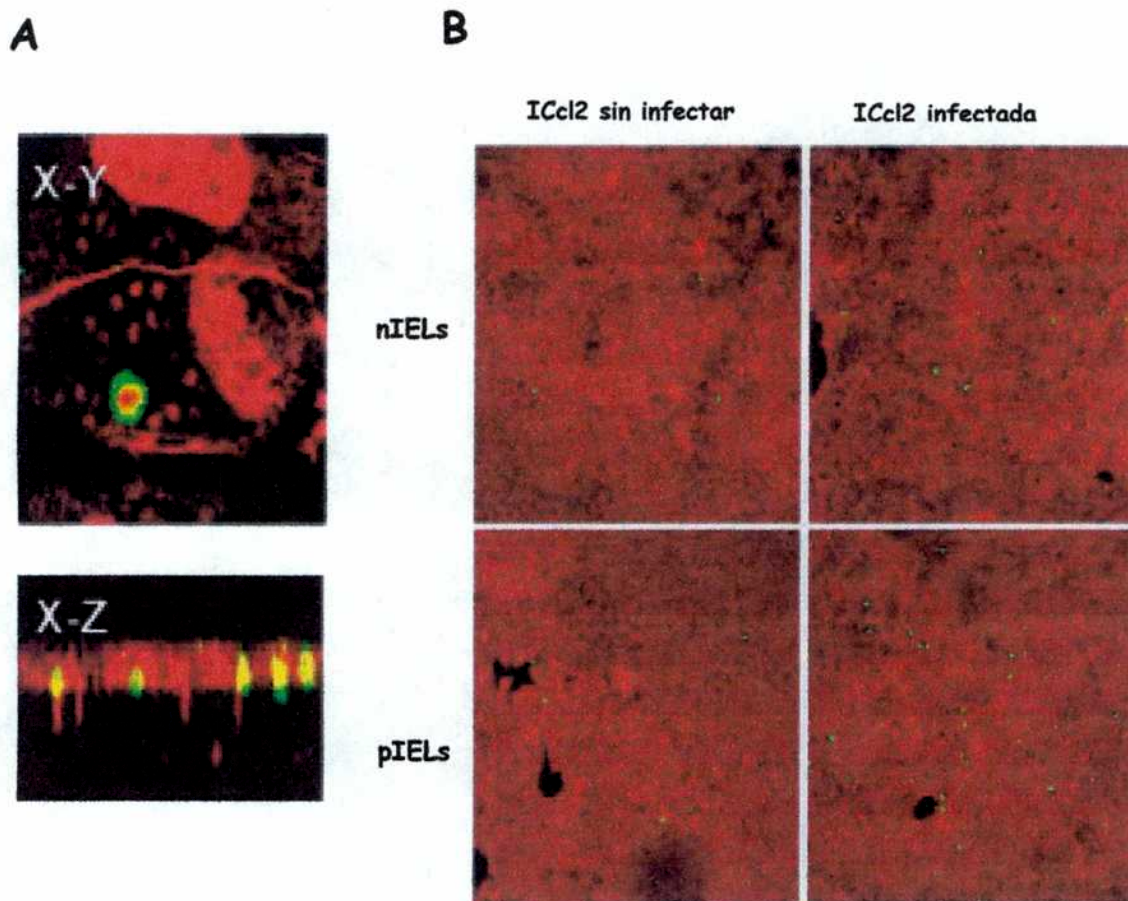


Figura 3.5: Microscopía confocal de co-cultivos de IELs y células enterocíticas IC_{cl2}. Los IELs (amarillo-verdosos) provenientes de ratones infectados (pIELs) o no infectados (nIELs) fueron resuspendidos en un colorante fluorescente intravital, y agregados a la parte superior de los filtros conteniendo una monocapa de células IC_{cl2} infectadas o sin infectar (en rojo). Luego de 4 h de co-cultivo, los IELs fueron removidos de la parte superior y las monocapas fueron fijadas, permeabilizadas y teñidas. **A.** Por microscopía confocal se visualizó la migración y se escaneó la monocapa de enterocitos longitudinalmente (x-y) o lateralmente (x-z). **B.** Las monocapas fueron luego examinadas por microscopía confocal, analizando un mínimo de 5 campos en 15 secciones de la monocapa para cada condición de co-cultivo y se proyectaron al mismo nivel.

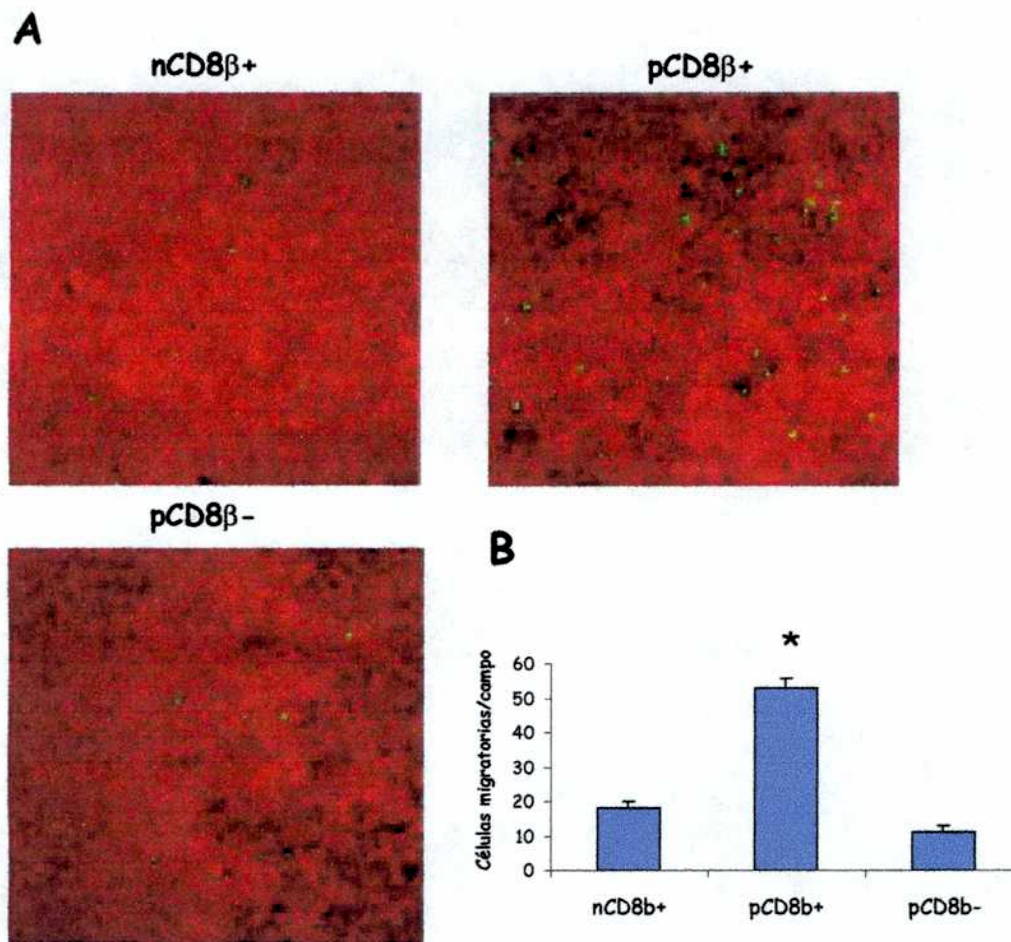


Figura 3.6: Migración de IELs CD8β+ o CD8β- dentro de células epiteliales intestinales ICcl2. La monocapa de células enterocíticas ICcl2 (en rojo) y los IELs migratorios (amarillo-verdoso) se visualizaron por microscopía confocal. **A.** Las células epiteliales fueron infectadas con taquizoitos de *T. gondii* antes de agregar IELs CD8β+ primados (pCD8β+) o no primados (nCD8β+) o CD8β- primados (pCD8β-). **B.** Las barras muestran la media ± ES de las células migratorias. * $P < 0,01$ comparado con CD8β+ no primados y CD8β- primados.

3.4 – Los IELs primados inducen una disminución en la producción de quemoquinas en enterocitos infectados

Para caracterizar la interacción fisiológica entre los IELs y los enterocitos se utilizó el sistema de co-cultivo celular *in vitro*. Las células ICcl2 sin infectar o infectadas con *T. gondii* fueron cultivadas en filtros de membrana permeable y luego de la incubación con IELs

primados o no primados se examinó el perfil de quemoquinas expresado. Como se observa en la Figura 3.7, en presencia de IELs primados, la expresión general de ARNm de quemoquinas en células IC_{cl2} resultó significativamente reducida. Por el contrario, los IELs provenientes de ratones naïve, no indujeron ningún efecto sobre la producción de quemoquinas de los enterocitos infectados.

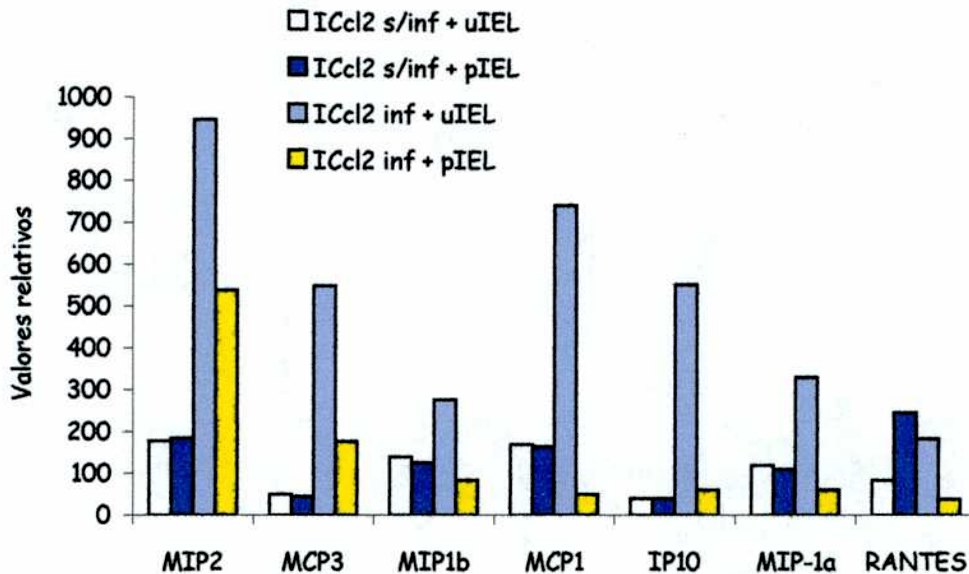


Figura 3.7: Expresión de ARNm de quemoquinas en células IC_{cl2} co-cultivadas con IELs primados o no primados. Se realizó un co-cultivo de ambos tipos celulares en el sistema *in vitro* previamente descrito. La línea celular enterocítica IC_{cl2} cultivada en filtros fue infectada o no previamente al agregado de IELs primados (pIEL) o no primados (uIEL) a la parte superior del filtro, en contacto con la superficie basolateral de la monocapa. Luego de 6 h de co-cultivo, los IELs fueron removidos de la parte superior del filtro por lavados extensivos y la monocapa de enterocitos fue examinada para la expresión de ARNm de quemoquinas. Los resultados son representativos de al menos 4 experimentos independientes.

3.5 - Los IELs producen TGF- β que promueve la disminución de quemoquinas inflamatorias

En el intestino, TGF- β ha sido asociado con la regulación de la producción de IFN- γ . Previas observaciones del laboratorio demostraron que los IELs aislados de ratones C57BL/6 infectados producen casi 7 veces más TGF- β cuando se los co-cultiva con macrófagos

infectados con *T. gondii*, comparado con los IELs provenientes de ratones naïve. Paralelamente, cuando se tratan ratones C57BL/6 naïve con anticuerpos anti-TGF- β antes y después de recibir IELs primados con antígeno, la protección conferida frente a la infección queda anulada, ya que se observa inflamación hemorrágica difusa y necrosis severa en sus intestinos delgados. El tratamiento de ratones naïve de esta cepa susceptible con Adv-TGF- β , previene la enfermedad intestinal inflamatoria frente a la infección oral con *T. gondii*.

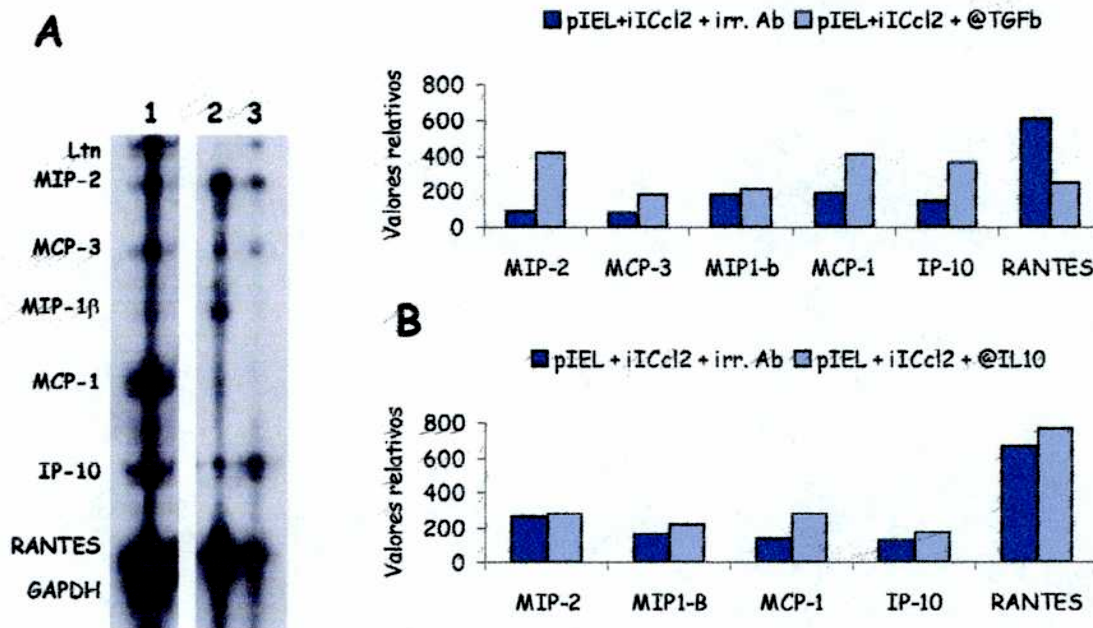


Figura 3.8: Efecto de TGF- β y IL-10 en el ARNm de quemoquinas producidas por células IC_{cl2} infectadas con *T. gondii*. Los IELs primados fueron incubados 2 h antes del co-cultivo con un mAc α TGF- β (A) o α IL-10 (B). Se utilizaron anticuerpos irrelevantes para incubar el grupo control. Los IELs fueron luego agregados a la parte superior de los filtros conteniendo la monocapa de células IC_{cl2} infectadas. El medio de este co-cultivo fue suplementado con mAc α TGF- β o α IL-10 respectivamente. Se estudió la expresión de ARNm de quemoquinas en las células ICCL2 luego de 4 h de contacto utilizando un ensayo de protección de ARNasa. A. Se muestra un autoradiograma respresentativo del ensayo de protección de ARNasa a la izquierda. Calle 1: control positivo; calle 2: tratamiento con mAc anti-TGF- β ; calle 3: tratamiento con anticuerpos irrelevantes. Los resultados están expresados como unidades de densitometría relativas luego de la normalización al ARNm de GAPDH y son representativos de 2 experimentos independientes.

Para seguir explorando el papel anti-inflamatorio de los IELs y más precisamente la relación entre el TGF- β producido por los IELs y su rol como molécula anti-inflamatoria, se evaluó el efecto de esta citoquina en la producción de quemoquinas en el sistema de co-

cultivo con la línea enterocítica IC_{cl2}. Para esto, los IELs aislados de ratones C57BL/6 infectados fueron preincubados durante 2 h con anticuerpos neutralizantes anti-TGF- β o con un anticuerpo control irrelevante. Estas células fueron luego agregadas a la cámara superior de los filtros conteniendo la monocapa de células IC_{cl2}. El medio de co-cultivo fue suplementado con anticuerpos anti-TGF- β o con el anticuerpo control irrelevante. Como se muestra en la Figura 3.8A, el papel inhibitor de los IELs primados sobre las células enterocíticas fue eliminado en presencia de anticuerpos anti-TGF- β ya que se observa un aumento en la expresión de los ARNm de las quemoquinas. El tratamiento con anti-TGF- β mostró un efecto inverso en la expresión de ARNm de RANTES y tuvo muy poco efecto en la expresión de MIP-1 α (dato no mostrado). Por otro lado, cuando se estudió el papel de la citoquina inhibitoria IL-10, se observó en general un pequeño aumento en la expresión de quemoquinas en presencia de anticuerpos anti-IL10 (Fig. 3.8B), pero el efecto fue menor que el obtenido con anti-TGF- β . El tratamiento con anti-IL-10 demostró el mayor efecto sobre la expresión de MCP-1, y contrariamente a TGF- β , la expresión de RANTES se vio levemente aumentada.

3.6 - El antígeno SAG-1 de *T. gondii* estaría involucrado en la IBD

SAG1, el antígeno de superficie mayoritario expresado en la superficie de taquizoitos de *T. gondii*, induce una respuesta de anticuerpos dominante durante la infección y está involucrado en el proceso de invasión. Utilizando parásitos deficientes en esta proteína, se obtuvieron resultados preliminares *in vivo* que demuestran que la infección intrainestinal con taquizoitos KO para SAG-1, en contraste con la cepa WT, no inducen una hiper-inflamación en el intestino delgado de ratones C57BL/6. Para evaluar el papel de este antígeno en la inducción de la respuesta inmune por células epiteliales, se infectaron las células enterocíticas IC_{cl2} con taquizoitos KO para SAG-1 o con RH y se determinó la expresión de ARNm de quemoquinas. Como se muestra en la Figura 3.9, la expresión de quemoquinas en los enterocitos en respuesta a la infección con el parásito KO resultó en general menor a la obtenida con el parásito WT. Estos resultados preliminares indicarían que SAG-1 sería una molécula clave en la iniciación del proceso inflamatorio.

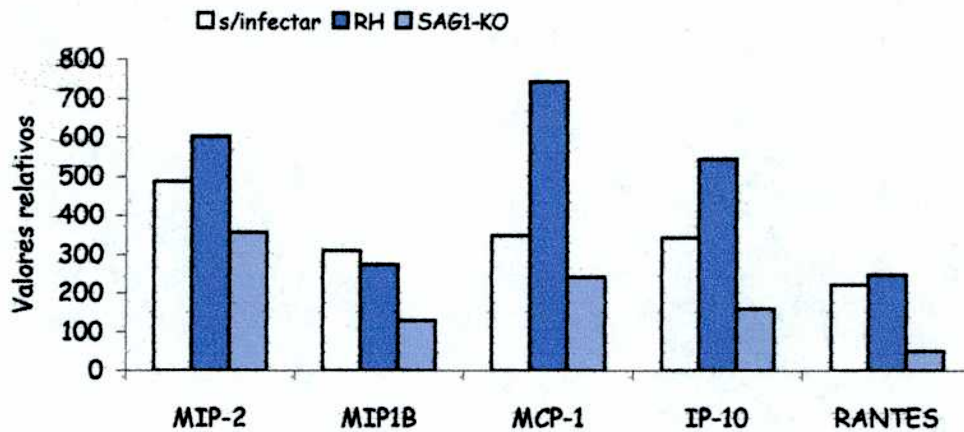


Figura 3.9: Producción de ARNm de quemoquinas en enterocitos ICcl2 infectados con taquizoitos P30-KO. Células enterocíticas ICcl2 fueron infectadas en la superficie apical con taquizoitos de la cepa RH o P30-KO de *T. gondii*. Luego de 6 h de infección, la expresión de ARNm de quemoquinas fue analizada por un ensayo de protección de RNasa. Los resultados se expresan como valores relativos a la expresión del gen GAPDH y son representativos de 2 experimentos independientes.

4 - CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE LA RESPUESTA INDUCIDA EN LA LÍNEA CELULAR ENTEROCÍTICA MODE-K FRENTE A LA INFECCIÓN CON *TOXOPLASMA GONDII*

Como se describió previamente, en ciertas cepas de ratones como C57BL/6 (H-2^b), la infección puede causar una forma severa de inflamación intestinal cuya patología comparte características morfológicas e histológicas con la enfermedad inflamatoria del intestino en humanos (IBD). En cambio las cepas de ratones C3H/HeJ y CBA/J (H-2^k), son resistentes a la infección aguda con el *T. gondii*, y los estudios histológicos muestran solamente una leve inflamación en el íleon con pequeñas placas de necrosis en la parte superior del villi.

En el presente estudio se caracterizó la respuesta generada por *T. gondii* durante la infección de enterocitos derivados de ratones resistentes. Debido a la corta vida media de los enterocitos *ex vivo*, aquí se caracterizó la línea celular MODE-K derivada del epitelio intestinal de ratones C3H/HeJ, con el fin de estudiar su valor como modelo *in vitro* de células enterocíticas resistentes a la infección aguda.

4.1 - Expresión de marcadores moleculares en la superficie de MODE-K inducidos por *T. gondii*

En estudios previos, se demostró que la transferencia adoptiva de IELs aislados de ratones infectados con *T. gondii* inducía protección contra el desafío oral de los ratones receptores (Buzoni-Gatel y col, 1997) y que estas células eran activadas para secretar citoquinas pro-inflamatorias y ejercer citotoxicidad frente a enterocitos infectados (Chardes y col, 1994). El efecto CTL de los IELs primados mostró estar genéticamente restringido sugiriendo que los enterocitos en una situación apropiada, pueden tener la capacidad de procesar y presentar antígenos del parásito. Utilizando la línea de células epiteliales intestinales MODE-K, se analizó *in vitro* la expresión de diferentes proteínas de superficie en respuesta a la infección con *T. gondii* por citometría de flujo. Estos enterocitos mostraron una expresión constitutiva de moléculas MHC clase I en su superficie y esa expresión no varió frente a la infección con el parásito (Fig. 4.1). En cambio se observó un incremento en la

expresión de moléculas MHC clase II del subtipo I-A^k e I-E^k y de la nueva molécula clase I CD1d luego de la infección.

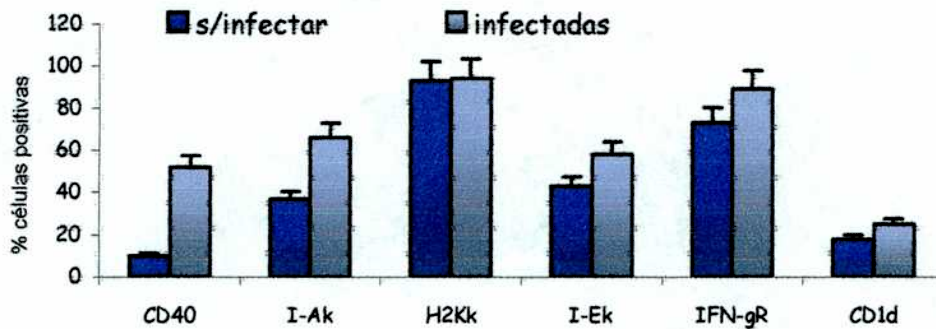


Figura 4.1: La infección con *T. gondii* induce la expresión de moléculas de superficie en células MODE-K. Por citometría de flujo se analizó la expresión de CD40, I-Ak, H2Kk, I-Ek, IFN- γ R y CD1d en la superficie células MODE-K normales e infectadas con taquizoitos de la cepa RH. Las células fueron incubadas con anticuerpos específicos conjugados a FITC y fueron analizadas por FACScan. Los resultados son representativos de 2 experimentos distintos.

Un importante componente asociado con la activación celular T es el papel de las moléculas co-estimuladoras. La interacción CD40/CD40 Ligando (CD154) de las células T tiene un papel central en la inducción de la inmunidad humoral y celular. Como se muestra en la Figura 4.1, el análisis fenotípico de las células MODE-K mostró una fuerte inducción en la expresión de la molécula CD40 en su superficie luego de la infección. Además de la expresión de moléculas presentadoras de antígeno, estos IECs expresan una amplia variedad de receptores para citoquinas (Markowitz y col, 1990; Filmus y col, 1992; Ciacchi y col, 1993; Reinecker y col, 1995). En este estudio, la infección con el parásito no indujo un aumento significativo en la expresión del receptor de IFN- γ (Fig. 4.1). Estas observaciones sugieren que el *T. gondii* puede activar estos enterocitos durante la infección.

4.2 - La infección con *T.gondii* induce un aumento en la expresión de quemoquinas

La atracción de leucocitos a los tejidos es esencial para la inflamación y para la respuesta del hospedador a la infección, y este proceso está controlado por quemoquinas. La producción de ARNm de quemoquinas frente a la infección con la cepa RH de *T. gondii* fue estudiada en la línea celular enterocítica MODE-K a diferentes tiempos usando un ensayo de

protección de ARNasa de multi-sonda. La infección *in vitro* de estas células resultó en un aumento de la expresión de ARNm de las quemoquinas MCP-3, MIP-1 β , MCP-1 e IP-10 que comenzó a ser evidente a partir de las 2 h luego de la infección, llegando a un máximo a las 6 h (Figura 4.2A). En cambio la expresión de MIP-2 y RANTES no varió durante la infección (Fig.4.2A).

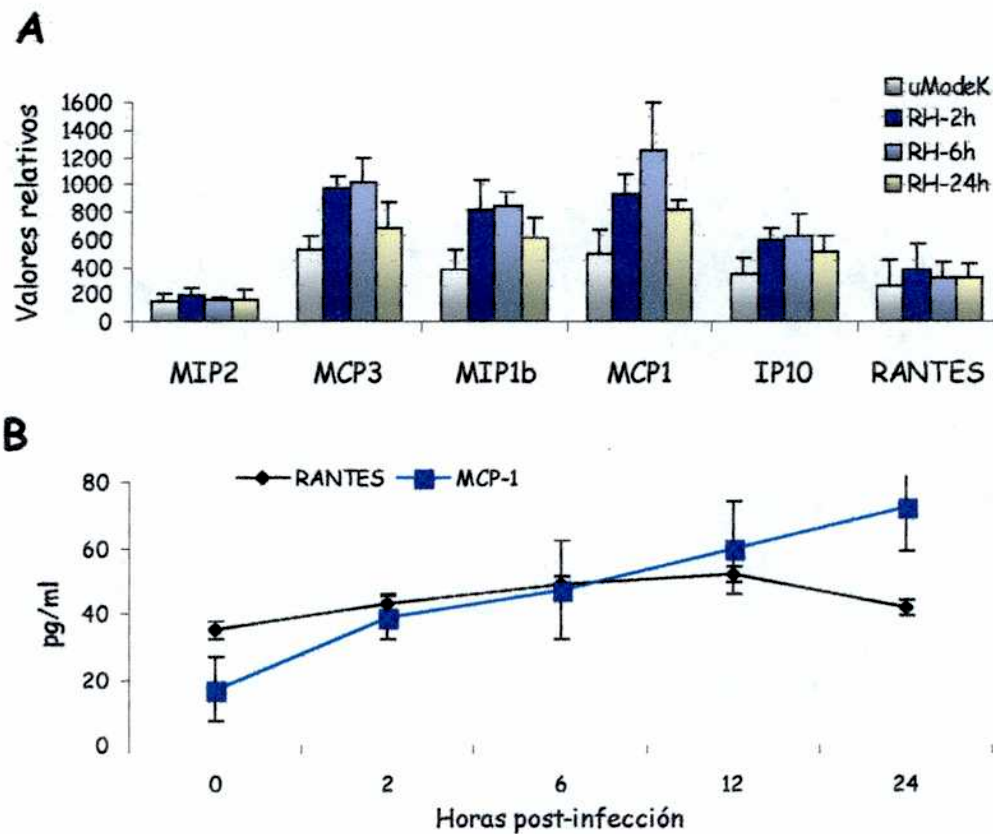


Figura 4.2: La infección con *T. gondii* induce un aumento en la expresión de quemoquinas en las células MODE-K. Las células epiteliales intestinales MODE-K fueron sembradas en la superficie inferior de filtros de policarbonato de 4 μ m. Cuatro días después, la monocapa fue infectada en la superficie apical con taquizoitos de la cepa RH de *T. gondii*. Las células fueron removidas de los filtros y la expresión de ARNm de un amplio arreglo de quemoquinas fue examinada por un ensayo de protección de ARNasa. **A.** La expresión de ARNm fue analizada en células sin infectar (uMode-k), y luego de diferentes tiempos de infección. La expresión de ARNm fue estandarizada con la expresión de los genes L32/GAPDH y los resultados se expresaron como unidades relativas de densitometría. **B.** Los sobrenadantes de los cultivos fueron ensayados por ELISA para detectar la presencia de MCP-1 y RANTES a diferentes tiempos post-infección de la línea celular MODE-K. Los resultados son representativos de al menos 2 experimentos distintos.

Para asegurarnos que las quemoquinas estaban siendo traducidas, se estudió la expresión de las proteínas en los sobrenadantes de los cultivos celulares mediante ensayos de ELISA a distintos tiempos de infección. MCP-1 mostró cantidades crecientes en los niveles de expresión, mientras que RANTES, al igual que la expresión de su ARNm, no mostró un aumento significativo en su expresión luego de la infección (Fig. 4.2B). Esto sugiere que la expresión de MCP-1 estaría mediada a través del aumento en la producción y/o estabilización del ARNm. La viabilidad de MODE-K no fue afectada por la infección con *T. gondii* y permaneció en 90,5% durante la infección por 24 h (datos no mostrados).

4.3 - Aumento en la expresión de quemoquinas luego de la infección con otras cepas relacionadas

Con el objeto de examinar la especificidad de la respuesta generada en MODE-K, se estudió la expresión de quemoquinas frente a la infección con taquizoitos PTG, una cepa de *T. gondii* no virulenta, y *Neospora caninum*, un parásito morfológicamente indistinguible de *T. gondii*, pero genéticamente distinto, que infecta a un amplio rango de mamíferos que incluyen perros, gatos, ratones y ganado vacuno. Al igual que en la toxoplasmosis, las células T CD4+, IL-12 e IFN- γ tienen un papel importante en el control de la infección aguda de ratones con este parásito (Tanaka y col, 2000; Baszler y col, 1999). Aunque los taquizoitos de *N. caninum* y de la cepa RH de *T. gondii* comparten pocos antígenos de reacción cruzada, los antígenos inmunodominantes de ambos parásitos no son reconocidos por sueros heterólogos de un amplio rango de especies animales (Bjerkas y col, 1994).

Como se observa en la Figura 4.3A, a las 6 h post-infección cuando la expresión de ARNm de quemoquinas es máxima frente a RH, la infección con PTG alcanza valores similares de expresión mientras que *N. caninum* induce niveles significativamente menores en todos los casos. A las 24 h post-infección, la expresión de quemoquinas en respuesta a la infección con RH y PTG se mantiene igual, menos para IP-10 la cual alcanza niveles significativamente mayores para PTG. Por otro lado, la respuesta a *N. caninum* aumenta a niveles similares a los obtenidos con RH para las quemoquinas MIP2, MCP3 y MCP1, mientras que los niveles de MIP1 β , IP-10 y RANTES resultan significativamente mayores (Figura 4.3B). Estos resultados demuestran que habría un retraso en la expresión de

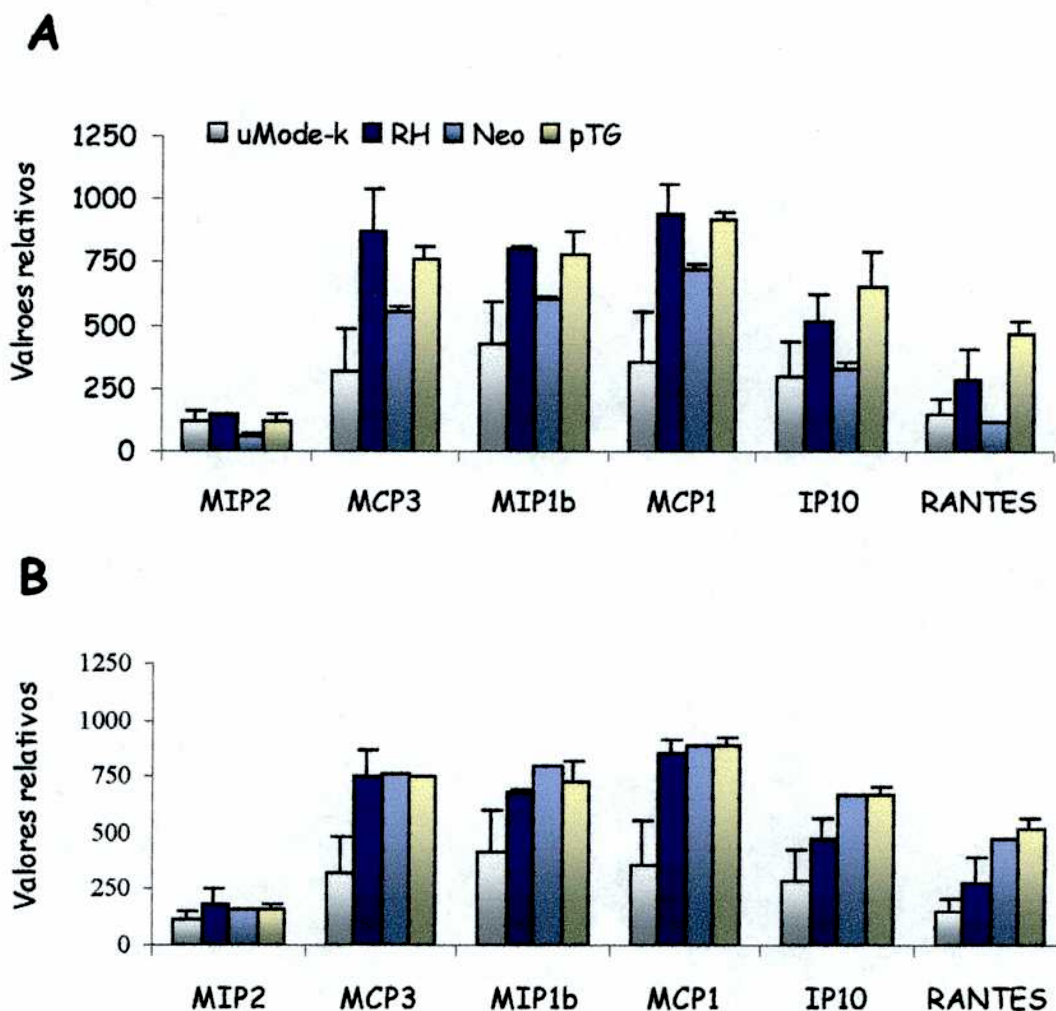


Figura 4.3: Expresión de ARNm de quemoquinas en células MODE-K infectadas con las cepas RH y pTG de *T. gondii* y taquizoitos de *N. caninum*. La expresión de ARNm de quemoquinas fue determinada por un ensayo de protección de ARNasa. Las células MODE-K fueron cultivadas como se describió previamente y se determinó la expresión de quemoquinas en células sin infectar (uMode-k), infectadas con taquizoitos de las cepas RH y pTG de *T. gondii* y con taquizoitos de *N. caninum* (Neo) durante A. 6 h, y B. 24 h. *P < 0,05 y **P < 0,01 con respecto a RH.

quemoquinas frente a la infección con *N. caninum* y que la respuesta a la infección es cepa-específica en el caso de la expresión de RANTES.

4.4 - *T. gondii* induce la expresión de citoquinas en células MODE-K

Los enterocitos juegan un papel crítico en la inmuno-fisiología de la mucosa que en parte consiste en una red paracrina entre enterocitos y células inmunes e inflamatorias adyacentes (Stenson y Alpers, 1994; Wang y col, 1997). Previas observaciones han demostrado que un aumento en la expresión del ARNm de iNOS ocurre luego de la infección oral de ratones C57BL/6 con *T. gondii* (Liesenfeld y col, 1996). También se sabe que el IFN- γ y el TNF- α son fuertes inductores de la síntesis de óxido nítrico (Drapier y col, 1988; Nathan y Hibbs, 1991). Para caracterizar la producción y secreción de citoquinas por enterocitos luego de la infección con taquizoitos, las células MODE-K fueron infectadas con la cepa RH y se estudió la expresión de ARNm y secreción en los sobrenadantes de los cultivos. Como se observa en la Figura 4.4A, la infección con *T. gondii* indujo un aumento en la expresión de ARNm de IL-5, GM-CSF, G-CSF e IFN- γ que resulta máximo a las 24 h post-infección. En cambio, la expresión de IL-7 y TGF- β presenta valores pico a las 6 h y estos valores se mantienen (Fig. 4.4A).

Para caracterizar la cinética de la producción de citoquinas frente a la infección con *T. gondii*, se estudió la secreción de IFN- γ y TNF- α en los sobrenadantes de los cultivos celulares. Como se muestra en la Figura 4.4B, la secreción de estas dos citoquinas aumenta gradualmente hasta llegar a un máximo a las 24 h. Por el contrario, no se pudo detectar IL-10 en los sobrenadantes de las células infectadas. Por otro lado, la infección de MODE-K con taquizoitos de *Neospora* y de la cepa PTG de *T. gondii* indujo un patrón de secreción de TNF- α similar a RH tanto a las 6 como a las 24 h post-infección (Fig. 4.4D). Es interesante notar que los niveles de IFN- γ inducidos por la infección con la cepa no virulenta PTG resultaron significativamente menores comparados con los obtenidos con la cepa virulenta RH (Fig. 4.4C).

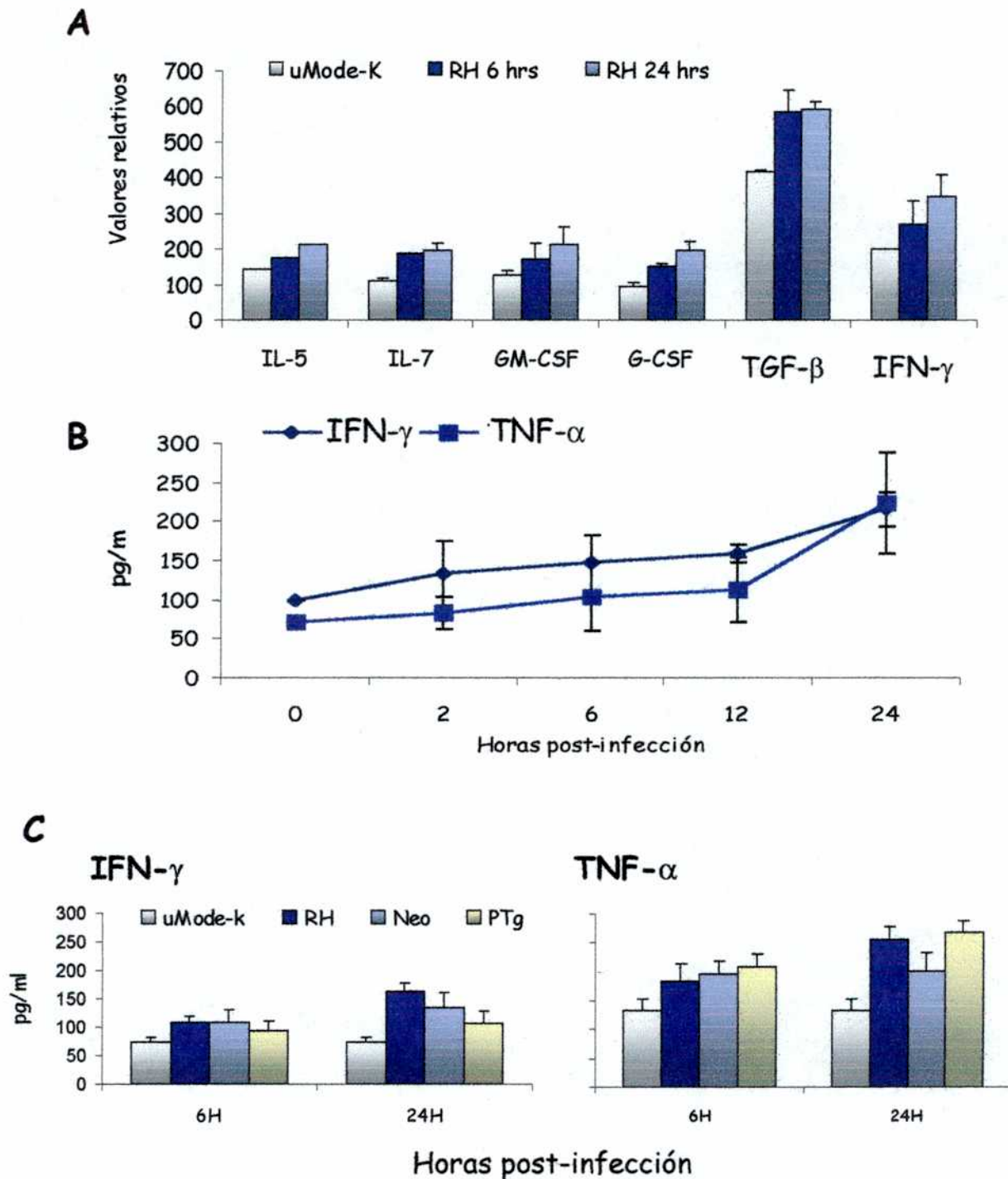


Figura 4.4: Expresión de ARNm de citoquinas en células MODE-K infectadas. Luego de la infección de las células MODE-K con taquizoitos de la cepa RH de *T. gondii*, se determinó **A.** la expresión de ARNm de citoquinas por un ensayo de protección de ARNasa luego de 6 y 24 h, y **B.** la cinética de expresión de IFN- γ y TNF- α en los sobrenadantes de los cultivos infectados por un ensayo de ELISA. **C.** Las células MODE-K fueron infectadas con taquizoitos de las cepas RH y PTG de *T. gondii* y *N. caninum* y se determinó la presencia de IFN- γ y TNF- α en los sobrenadantes de los cultivos a las 6 y 24 h post-infección. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

4.5 - La infección oral con *T. gondii* induce un aumento en la expresión de quemoquinas en los IELs

A partir de estudios experimentales de infección *in vivo* con *Toxoplasma* y *Cryptosporidium* spp., se ha obtenido evidencia de que la población de IEL en el intestino tiene un papel principal en la inmunidad. Los IELs proveen un número importante de funciones inmunológicas que incluyen actividad citotóxica (Gelfanov y col, 1996; Guy-Grand y col, 1996), secreción de citoquinas como IL-2, IL-3, IL-5, TNF- α , TGF- β , IL-10 e IFN- γ (Guy-Grand y col, 1998; Lefrancois y col, 1997), y modulación de la muerte y regeneración de células epiteliales. La transferencia adoptiva de IELs primados con antígeno de *T. gondii* a ratones naïve provee protección a largo plazo al hospedador luego de un desafío letal con el parásito como se determinó por la mortalidad reducida en ratones C57BL/6 y la reducción del número de quistes cerebrales en ratones CBA/J (Buzoni-Gatel y col, 1997). Estos IELs protectores pueden ir al intestino y este tráfico es dependiente de la expresión de integrinas apropiadas cuya inhibición, anula la resistencia al parásito (Buzoni-Gatel y col, 1999).

Partiendo de que la susceptibilidad está genéticamente determinada, dos cepas distintas de ratones fueron utilizadas para estudiar el patrón de quemoquinas generado por los IELs luego de la infección oral. Para esto se infectaron oralmente ratones C57BL/6 (altamente susceptibles) y CBA/J (resistentes) con quistes de la cepa 76K de *T. gondii* y se aislaron los IELs. Con el objeto de comparar la producción de ARNm de quemoquinas entre las dos cepas de ratones, los valores obtenidos fueron relativizados a los de los obtenidos con IELs provenientes de ratones naïve sin infectar de su respectiva cepa. Como se observa en la Figura 4.5, hay un leve aumento en la expresión de quemoquinas en IELs primados para las 2 cepas de ratones. Los IELs provenientes de ratones C57BL/6 infectados producen 1,51 veces más linfotactina (valores relativos: 554,4 vs 297,7) y 1,47 veces más IP-10 (400,3 vs 298) que los IELs no primados. En cambio los IELs de ratones CBA/J infectados muestran una expresión 1,99 veces mayor para linfotactina (958 vs 509,6), 2,06 veces más MIP-2 (536,7 vs 282,1) y 2,3 veces más MIP-1 β (655,8 vs 294,4) comparados con los IELs no primados y estos valores son mayores a los producidos por los IELs de ratones C57BL/6.

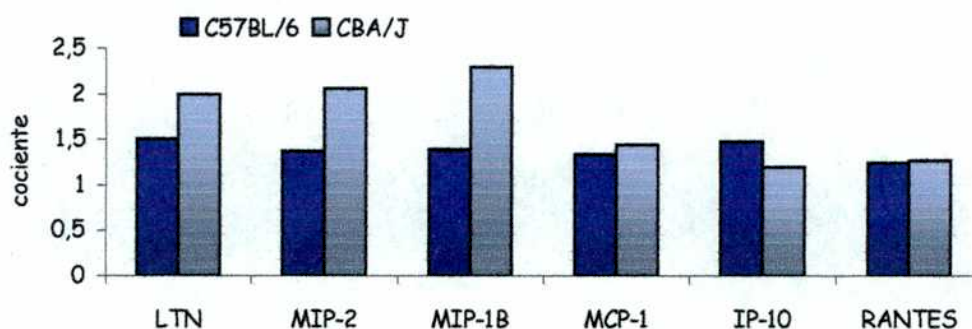


Figura 4.5: Expresión de ARNm de quemoquinas en IELs primados aislados de dos cepas distintas de ratones. Los IELs primados fueron purificados de ratones C57BL/6 el día 7 luego de la infección oral con quistes de *T. gondii* y el día 11 para CBA/J. La expresión de ARNm de un amplio rango de quemoquinas fue determinada por un ensayo de protección de ARNasa. Los resultados obtenidos fueron expresados como valores de densitometría relativos a la expresión del gen GAPDH. Para comparar la expresión de quemoquinas entre los IELs primados de las 2 cepas, los resultados se muestran como valores obtenidos para cada quemoquina por IELs primados dividido por los valores obtenidos por IELs provenientes de ratones sin infectar de su respectiva cepa.

4.6 - Los IELs primados inducen una disminución en la producción de ARNm de quemoquinas de las líneas celulares enterocíticas IC_{cl2} y MODE-K

Previamente se demostró que la infección de enterocitos de la línea IC_{cl2} (H-2^b) resulta en la expresión de una amplia variedad de quemoquinas que se hace evidente a partir de las 6 h luego de la infección y como se describió anteriormente, lo mismo se observa luego de la infección de la línea celular MODE-K (H-2^k). Para caracterizar en forma comparativa la interacción fisiológica entre los enterocitos infectados y los IELs en estos dos modelos con distinto "background" genético, utilizando el modelo de co-cultivo *in vitro*, se examinó la expresión de ARNm de quemoquinas de enterocitos infectados con el parásito luego de una co-incubación con IELs. Dado que en estudios previos se demostró que la actividad citotóxica específica contra células infectadas con *T. gondii* muestra una restricción genética a nivel esplénico (Hakim y col, 1991; Subauste y col, 1991; Kasper y col, 1992) y lo mismo se observó en la actividad CTL de IEL primados a nivel intestinal (Chardes y col, 1994), los IELs purificados de ratones CBA/J (H-2^k) fueron utilizados para el estudio de la interacción con la línea celular MODE-K. Como se muestra en la Figura 4.6, la línea celular MODE K

infectada presenta una baja expresión de quemoquinas luego de 6 h de cultivo tanto con IELs primados como con IELs no primados. Luego de 24 h, el nivel de expresión aumenta en el co-cultivo con IELs no primados, mientras que permanece bajo con los IELs primados. En cambio en las células ICCL2 se observa un efecto inhibitorio sobre la expresión de quemoquinas solo cuando se cultivan con los IELs primados, y este efecto se hace evidente luego de 6 h de co-cultivo.

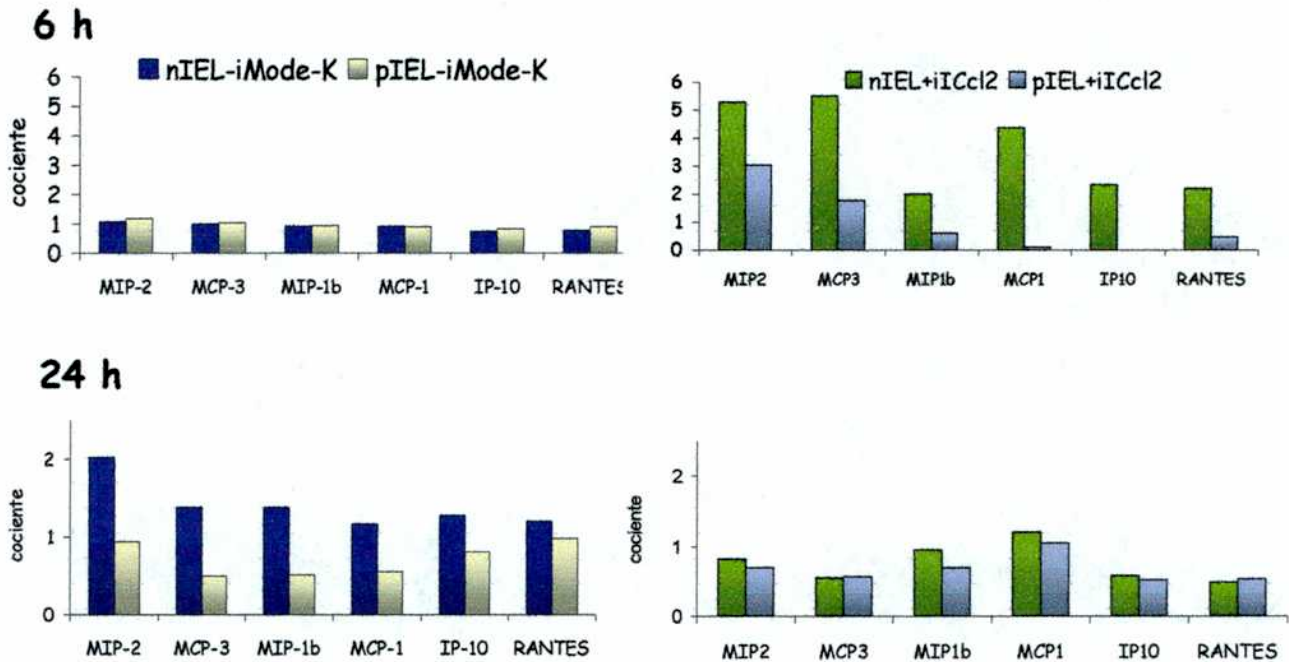


Figura 4.6: Producción de ARNm de quemoquinas por enterocitos infectados luego del co-cultivo con IELs. Los enterocitos de las líneas MODE-K e ICcl2 crecidos en la superficie inferior de filtros de Transwells, fueron infectados en la superficie apical con taquizoitos de la cepa RH de *T. gondii*. Para el co-cultivo de IELs con enterocitos, los IELs de ratones de la cepa CBA/J (H-2k) infectados (pIELs) fueron agregados a la cámara superior de los Transwells conteniendo la monocapa de células MODE-K (A y C), y los IELs de ratones de la cepa C57BL/6 (H-2b) fueron agregados a la monocapa de células ICcl2 (B y D). Luego de 6 (A y B) o 24 h (C y D) de co-cultivo, los IELs fueron removidos y la monocapa enterocítica fue examinada para la expresión de ARNm de quemoquinas. Los resultados fueron relativizados a los valores obtenidos en el co-cultivo de nIELs + enterocitos no infectados. Los resultados son representativos de al menos 2 experimentos independientes.

DISCUSIÓN PARTE I

5 - Interacción entre células epiteliales intestinales y linfocitos intraepiteliales durante la infección con *Toxoplasma gondii*

Luego de la infección oral, el *T. gondii* invade las células epiteliales del intestino (Dubey, 1998), y se observa una hiper-inflamación intestinal en monos (Dietz y col, 1997), conejos y en diferentes roedores como ratones y ratas (Liesenfeld, 1999). De esta manera, la superficie de la mucosa del intestino y el tejido linfático asociado al tracto gastrointestinal podrían jugar un rol fundamental en mantener la homeostasis intestinal luego de la infección primaria o recurrente con el parásito.

En este estudio se demostró que la transferencia adoptiva de IELs primados rescata a los ratones C57BL/6 de la muerte, y en contraste con ratones tratados con IELs no primados, esta protección está asociada con una histología intestinal casi normal. Los enterocitos están entre las primeras células en ser infectadas, y estas observaciones sugieren que su respuesta es crítica en el desarrollo de la inmunidad del hospedador. Estas células tienen la capacidad de producir quemoquinas que tienen un efecto profundo sobre varios tipos celulares. Además del efecto en la locomoción de leucocitos, las quemoquinas también están involucradas en la proliferación y diferenciación de linfocitos T, migración y activación de células NK y producción de IL-1 e IL-6 en macrófagos (Jiang y col, 1992). IP-10, una quemoquina que aumenta luego de la infección con *T. gondii*, ha sido recientemente implicada en la localización y función de células T efectoras en sitios con inflamación del tipo 1 (Khan y col, 2000). Mas aún, las β -quemoquinas promueven la liberación de NO en macrófagos. Aunque estos efectos son importantes en la actividad microbicida del hospedador, también pueden dañar el epitelio. Por esto es razonable concluir a partir del modelo *in vitro*, que la liberación de estas quemoquinas inflamatorias puede ser el primer evento inmunológico en el desarrollo de la inflamación devastadora observada en los ratones C57BL/6 luego de la infección oral con el parásito.

Los IELs tienen *in vitro* una actividad quimio-atrayente en respuesta a diferentes quemoquinas que incluyen IL-8, RANTES, MCP y MIP, crg-2 y MuMig, las cuales pueden ser producidas por enterocitos activados (Roberts y col, 1997). Más aún, tanto

IELs como LPLs del intestino expresan un arreglo específico de receptores de quemoquinas como CXCR3 y CCR5. Los ligandos para estas moléculas como RANTES, se expresan constitutivamente en el intestino y esta expresión aumenta durante la inflamación (Agace y col, 2000). La infección del intestino delgado con patógenos de la mucosa, puede resultar en la migración y activación de IELs (Chardes y col, 1994). En este estudio, se describió la interacción entre células intestinales epiteliales y IELs utilizando células IC_{cl2} crecidas en filtros permeables. Esta línea celular intestinal de ratón exhibe un número de propiedades importantes y funciones específicas de células intestinales de la cripta (Bens y col, 1996; Peng y col, 1999; Hornef y col, 2002). Utilizando el sistema de co-cultivo *in vitro*, la interacción entre IELs primados con *T. gondii* y enterocitos IC_{cl2} infectados resultó en una disminución en la producción de quemoquinas inflamatorias. Con el mismo modelo se realizó un ensayo de trans-migración, en el cual se observó que la población de IELs antígeno primados migra dentro de la monocapa de células enterocíticas IC_{cl2}. Dentro de la población de IELs primados, los CD8 α β TCR α β mostraron mayor migración comparados con los CD8 β -. Estos resultados son consistentes con el aumento en la migración de IELs primados observado luego de una transferencia adoptiva bajo condiciones inflamatorias (Buzoni-Gatel y col, 1999). Además, la población de IELs CD8 α β TCR α β demostró ser el principal grupo de IELs detectado en intestinos infectados con *T. gondii* (Chardes y col, 1994) y esta población es la responsable de conferir inmunidad a largo plazo (Lepage y col, 1998).

La citoquina TGF- β producida por los IELs primados con antígenos de *T. gondii* puede ser un mediador esencial de esta actividad anti-inflamatoria. Resultados previos del laboratorio, demostraron que los IELs provenientes de ratones C57BL/6 infectados a diferencia de los IELs no primados, producen altos niveles de TGF- β , y la reconstitución de esta cepa susceptible con AdV-TGF β aumentó su resistencia a la infección aguda, con cambios histológicos nominales en sus intestinos delgados.

Previas observaciones habían mostrado que *in vitro*, los IELs provenientes de ratones previamente transferidos con IELs primados y posteriormente infectados, producen niveles elevados de TGF- β comparado con los ratones que recibieron IELs no primados. En cambio, se observó que la producción de IFN- γ en esplenocitos y LPLs de los ratones receptores de IELs primados, estaba varias veces disminuida. En nuestro

estudio, nosotros demostramos que la neutralización de TGF- β en el co-cultivo de IELs primados con enterocitos infectados resultó en la reversión del efecto inhibitorio de los IELs. La reducción en la secreción de quemoquinas luego de la exposición a IELs antígeno-primados probablemente limite el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos a los sitios inflamatorios y bloquee la sobre-producción de NO. El efecto aparente de esta interacción sería con los LPLs, ya que son células importantes en la producción de IFN- γ y principalmente responsables de la inflamación (Liesenfeld y col, 1996; 1999). Es posible entonces, que la susceptibilidad de los ratones C57BL/6 pueda deberse al tráfico insuficiente de linfocitos que expresan productos reguladores críticos como TGF- β . Estos datos sugieren que TGF- β tiene un efecto inhibitorio en la síntesis de IFN- γ , en particular sobre LPLs, cuya consecuencia es la disminución en la expresión de NO (Ding y col, 1990). Se debe lograr un balance entre la limitación de una sobre-producción y la producción suficiente de IFN- γ para controlar la multiplicación del parásito, con lo cual TGF- β jugaría un rol dicotómico.

Otra citoquina importante en la regulación de la respuesta hiper-inflamatoria en la mucosa del intestino, podría ser IL-10. En estudios previos se demostró que los IELs primados producen grandes cantidades de IL-10 (Buzoni-Gatel y col, 1997). En el presente estudio, la neutralización de esta citoquina en el co-cultivo de IELs primados con enterocitos infectados, resultó en la reversión parcial de la expresión de quemoquinas inflamatorias. Tanto ratones susceptibles como resistentes KO para IL-10 son altamente susceptibles a la infección y mueren por un proceso hiper-inflamatorio en sus intestinos (Suzuki y col, 2000). Sin embargo, el TGF- β no fue capaz de rescatar a estos ratones KO para IL-10, aún cuando varios efectos biológicos de TGF- β estén mediados por IL-10 en el modelo murino (Khan y col, 1997).

Finalmente en este estudio, se obtuvieron datos preliminares *in vitro* que indicarían que el antígeno SAG1 es una molécula importante en la iniciación de la respuesta inmune en el intestino, siendo en parte responsable de la inducción de quemoquinas pro-inflamatorias como MIP-2, MI-1 β , MCP-1, IP-10 y RANTES.

6 - Caracterización *in vitro* de la respuesta inducida en la línea celular enterocítica MODE-K frente a la infección con *Toxoplasma gondii*

En este estudio, se caracterizó la respuesta generada por *T. gondii* durante la invasión de una línea celular enterocítica (MODE-K), con el fin de estudiar su valor como un modelo *in vitro* de células derivadas de ratones resistentes a la infección aguda. *T. gondii* mostró inducir un aumento en la expresión de moléculas de superficie que incluyen moléculas MHC clase II, clase I (CD1d), CD40 e IFN- γ R, lo cual sugiere que estos enterocitos se activan frente a la infección. También se observó la inducción de un amplio número de quemoquinas inflamatorias de la familia CC y CXC y particularmente de citoquinas pro-inflamatorias asociadas a la respuesta Th1. La cinética de expresión de ciertas quemoquinas y citoquinas varió frente a la infección con cepas de *T. gondii* con distinta virulencia. Finalmente, se demostró que tanto los IELs de ratones naïve como de infectados tienen un efecto inhibitorio sobre la expresión de quemoquinas inflamatorias en las células MODE-K, mientras que en la línea IC_{cl2} este efecto fue observado sólo con IELs primados. En la figura 6.1 se sintetizan los eventos que se estarían produciendo en la mucosa intestinal de ratones C57BL/6 (como fue discutido anteriormente) y CBA/J frente a la infección toxoplásmica. También se muestran los modelos experimentales diseñados en este trabajo, derivados de ratones genéticamente susceptibles (H-2^b) que desarrollan ileitis frente a la infección o de ratones resistentes (H-2^k) que cursan una infección aguda normal. En el esquema se visualiza en ambos casos una respuesta orientada al tipo Th1, resultando diferente los patrones de expresión de algunas citoquinas/quimoquinas. La participación de estas citoquinas y quemoquinas en el curso de la infección es discutida abajo.

Previamente se demostró que la línea celular enterocítica IC_{cl2} derivada de ratones C57BL/6 (H-2^b), que presentan una alta susceptibilidad frente a la infección aguda con *T. gondii*, expresa una amplia variedad de quemoquinas luego de la infección con este parásito. Específicamente, la expresión de quemoquinas de la subfamilia β como MCP-3, MIP-1 β y MCP-1 que reclutan y activan leucocitos mononucleares y células linfáticas aumentó con la infección de las células IC_{cl2} y como se demostró en este estudio, también en las células MODE-K. Ambas líneas celulares mostraron la misma cinética de expresión frente a la infección con un pico a las 6 horas. RANTES es una quemoquina

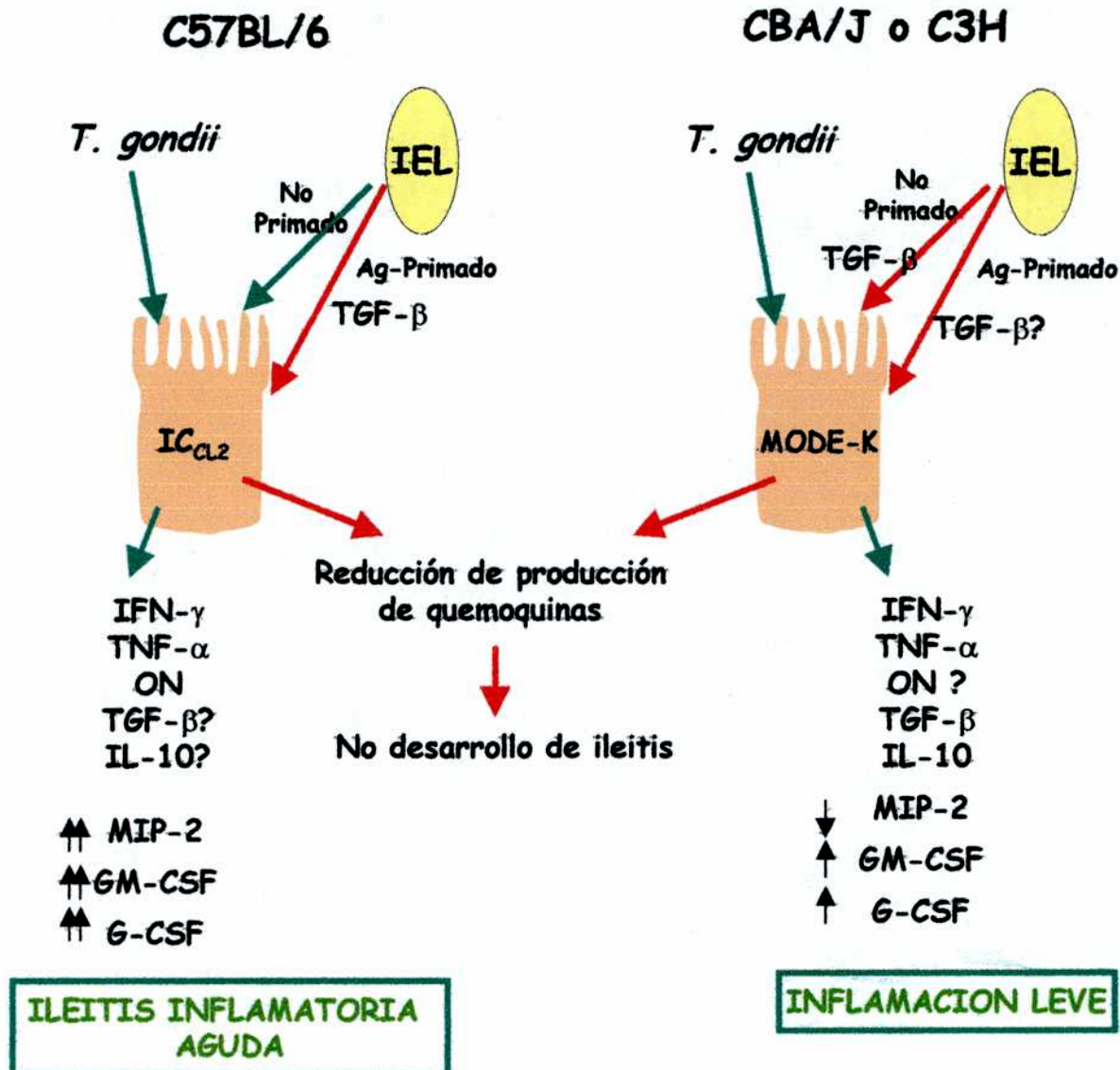


Figura 6.1: Representación esquemática de los dos modelos experimentales utilizados en este trabajo. La infección con taquizoitos de *T. gondii* induce en la línea celular enterocítica IC_{CL2}, derivada de ratones C57BL/6, la expresión de citoquinas y quemoquinas inflamatorias que *in vivo* producen una ileitis inflamatoria aguda. En cambio la infección de la línea celular MODE-K, derivada de ratones C3H que *in vivo* muestran solo una inflamación leve en el íleon, también induce la expresión de citoquinas inflamatorias, pero a diferencia de la línea IC_{CL2}, la expresión de quemoquinas inflamatorias resulta menor. Cuando ambas líneas celulares se co-cultivan con IELs primados, se produce una reducción de la expresión de quemoquinas que en el caso del modelo C57BL/6, se sabe que este efecto está mediado en parte por TGF-β (flechas rojas). En cambio, los IELs aislados de ratones C57BL/6 naïve, no protegen a los ratones de la ileitis aguda e *in vitro*, no reducen la expresión de quemoquinas inflamatorias en enterocitos infectados (flechas verdes). Por el contrario, los IELs aislados de ratones CBA/J naïve que producen TGF-β endógeno, reducen *in vitro* la expresión de quemoquinas inflamatorias (flechas rojas) evento que podría estar mediado por esta citoquina.

perteneciente a la familia CC que induce la migración de células T como IELs, LPLs y otros linfocitos, y está asociada a una respuesta inmune del tipo Th1. A diferencia del aumento en la expresión de esta quemoquina observado en células epiteliales intestinales luego de la infección con rotavirus (Casola y col, 1998), la infección con *T. gondii* no indujo un aumento significativo en las líneas celulares estudiadas. Por otro lado, no se observaron niveles significativos de expresión de MIP-2 en células MODE-K, a diferencia de la línea celular IC_{cl2}. Esta quemoquina está involucrada en el tráfico de neutrófilos al sitio de infección los cuales resultan esenciales para la supervivencia durante los primeros días de infección ya que están involucradas en el “clearance” de los parásitos. Adicionalmente, los neutrófilos son una importante fuente de IL-12 en respuesta a la infección (ver Denkers y col, 2003) la cual contribuye a la activación del Tejido Linfático Asociado al Intestino Delgado (GALT) que es crítica en el desarrollo de la respuesta inflamatoria por una directa activación de vías apoptóticas múltiples (Gavrilescu y col, 2003). Todos estos datos sugieren que la diferencia en la expresión de MIP-2 podría estar asociada al desarrollo de la IBD observado en los ratones C57BL/6 o quizás a una diferencia en el origen de estas dos líneas celulares. Para dilucidar esto, habría que estudiar la expresión de esta quemoquina en células epiteliales *ex vivo* con el mismo background genético.

Dado que la virulencia en el *T. gondii* está fuertemente influenciada por el genotipo del parásito, se estudió la producción de quemoquinas en las células MODE-K frente a la infección con la cepa RH (Tipo I, virulenta) y la cepa PTG (Tipo II, no virulenta). Ambas cepas mostraron la misma cinética de expresión para la mayoría de las quemoquinas, con excepción de IP-10 y RANTES cuya expresión fue mayor y más prolongada para PTG. Esto indicaría que al menos la expresión de estas dos quemoquinas sería cepa específica. El patrón de expresión de quemoquinas en respuesta a la infección de estos enterocitos con *N. caninum*, un parásito protozoario muy relacionado a *T. gondii*, mostró un retraso en la expresión de quemoquinas con respecto a RH, alcanzando un patrón similar a PTG a las 24 horas post-infección. Estudios comparativos de infección en líneas celulares de colon humanas, también muestran una diferencia en la cinética de expresión y secreción de quemoquinas como IL-8 en respuesta a diferentes patógenos invasores del intestino como *Salmonella spp* (Finlay y Falkow, 1988), *E. Histolytica* (Eckman y col, 1995) y *T. gondii* (Denney y col, 1999). La diferencia estaría dada por los cambios que estos organismos inducen en las células durante la invasión. De esta manera, la cinética de

inducción de quemoquinas inflamatorias de *T. gondii* es más lenta que la de *Salmonella*, ya que *T. gondii* provoca muy pocos cambios en la célula cuando la invade y el período de tiempo para la lisis celular es más prolongado.

La infección de las células MODE-K con este parásito también indujo un aumento en la expresión de un número de citoquinas inflamatorias como IFN- γ , GM-CSF, G-CSF y TNF- α . Este es el primer reporte que muestra la secreción de IFN- γ en células epiteliales intestinales infectadas *in vitro* con *T. gondii*. Esta citoquina es el principal mediador inmune en la infección con este parásito ya que controlaría la expresión del gen de la iNOS (Liesenfeld y col, 1996), y en el hospedador tendría un rol dicotómico ya que ejerce una función protectora, pero a su vez es un mediador de la hiperinflamación en cepas de ratones susceptibles como C57BL/6. Paralelamente, MODE-K también mostró expresar TNF- α en respuesta a la infección, la cual contribuiría a aumentar el efecto del IFN- γ a nivel local. Previamente se demostró que los enterocitos producen cantidades significativas de TGF- β en respuesta a la inflamación intestinal (Lionetti y col, 1999) y en este estudio, nosotros demostramos que la infección con *T. gondii* induce la expresión de esta quemoquina en MODE-K. TGF- β induce un aumento en la expresión de moléculas de adhesión en células T (Lim y col, 1998) las cuales están involucradas en el “homing” de IELs primados con *T. gondii* (Buzoni-Gatel y col, 1999). Entonces esta citoquina, podría estar involucrada en el tráfico de linfocitos que expresan productos inhibitorios críticos como TGF- β a nivel de mucosa. *T. gondii* también indujo la expresión de ARNm de G-CSF y GM-CSF en esta línea celular enterocítica, citoquinas que demostraron recientemente rescatar neutrófilos de apoptosis espontánea (Channon y col, 2002) lo cual sería un factor clave tanto para la resolución o persistencia de un estado inflamatorio (Frasch y col, 1998). Previas observaciones del laboratorio han demostrado que las células IC_{C12} luego de la infección con *T. gondii* *in vitro*, producen un gran aumento varias veces mayor comparado con MODE-K en la expresión de G-CSF y GM-CSF. Este hecho junto con el aumento en la expresión de MIP-2 en las células IC_{C12}, quemoquina que también demostró estar involucrada en prevenir la muerte celular programada, podrían contribuir con la repuesta proinflamatoria robusta observada en los ratones C57BL/6 altamente susceptibles. MODE-K por otro lado, mostró un aumento en la expresión de IL-7 frente a la infección con el parásito. Esta citoquina podría participar en la activación de IELs y LPLs y

subsecuentemente ser requerida por la memoria inmune para prevenir la re-infección y/o reactivación.

En este estudio también se caracterizó la producción de ARNm de quemoquinas en los IELs purificados a partir de 2 cepas de ratones infectados con *T. gondii*. Los IELs aislados de ratones CBA/J mostraron específicamente niveles de expresión mayores de linfotactina, MIP-2 y MIP-1 β comparados con los de la cepa C57BL/6. Estas tres quemoquinas estarían involucradas en la atracción de células T a tejidos epiteliales (Schall y col, 1993; Taub y col, 1993) y en particular está demostrado que las células T CD8⁺ son altamente respondedoras a linfotactina (Kelner y col, 1994). Esta quemoquina constituye un principal quimio-atrayente de células T α/β CD8⁺ (Boismenu y col, 1996), células que mostraron actuar directamente como efectoras con una actividad CTL específica a nivel intestinal y podrían indirectamente activar otros mecanismos efectores en la mucosa mediante la secreción de IFN- γ (Chardes y col, 1994).

Cuando los IELs fueron co-cultivados con los enterocitos, se observó una disminución en la producción de quemoquinas inflamatorias en células MODE K infectadas frente a IELs primados y no primados, mientras que en células ICCL2 la producción disminuyó sólo frente a IELs primados. Estos resultados estarían de acuerdo con previas observaciones del laboratorio, que demuestran que los IELs aislados de ratones C57BL/6 y de CBA/J infectados producen grandes cantidades de TGF- β cuando se los co-cultiva con macrófagos infectados. Contrariamente a lo observado en ratones C57BL/6, los IELs no primados de ratones CBA/J también producen cantidades significativas de TGF- β en co-cultivo con los macrófagos infectados. Además, también se observó que el tratamiento de ratones CBA/J con mAc anti-TGF- β produjo una extensiva inflamación del íleon distal frente a la infección con *T. gondii* comparado con el control. Por lo tanto, el efecto inhibitorio observado por los IELs no primados sobre las células MODE K infectadas podría deberse a esta expresión endógena de TGF- β . Esta producción temprana podría ser responsable de la prevención de la hiperinflamación en el intestino delgado, ya que parecería mantener un mejor control homeostático durante la fase aguda de la infección y resultaría crítica en la resistencia natural a la infección oral con este parásito. Restaría realizar ensayos *in vitro* de

inhibición de esta citoquina durante el co-cultivo con anticuerpos neutralizantes para ver si se observa una reversión del efecto inhibitorio de los IELs no primados.

Los presentes experimentos se centralizaron en la caracterización in vitro de la expresión regulada de quemoquinas y citoquinas por la línea celular epitelial intestinal MODE-K en respuesta a la infección con *T. gondii*. Estos resultados no pueden ser directamente extrapolados a la situación in vivo debido a que la bioactividad de quemoquinas y citoquinas in vivo refleja un número de factores, que incluyen gradientes de concentración dentro del micro ambiente y diferencias en la sensibilidad de las células blanco a las diferentes moléculas. Más aún, las quemoquinas expresadas por estas células pueden tener actividades que van más allá de gobernar la respuesta inflamatoria, como por ejemplo, efectos reguladores en la maduración de linfocitos, remodelamiento y reparación del tejido. Algunas de las propiedades de la expresión génica de quemoquinas y su secreción podrían simplemente reflejar características especiales de las células epiteliales transformadas. Sin embargo, las líneas IC_{C12} y MODE-K de diferente origen y con distinto grado de diferenciación mostraron similitudes en el patrón de quemoquinas producidas con lo cual se hizo posible una comparación en la respuesta inmune diferencial obtenida entre estas dos líneas celulares. El siguiente paso a seguir sería estudiar la respuesta de enterocitos ex vivo derivados de ratones con haplotipo H-2^K para comparar los resultados con los obtenidos en la línea celular MODE-K con el fin de establecer el valor de estas células como un modelo in vitro para esta infección.

PARTE II

Análisis del Valor Inmunogénico e Inmunoproláctico de Antígenos del *Toxoplasma gondii*

7 - Análisis Cinético de la Respuesta Inmune contra Antígenos de *Toxoplasma gondii* durante la Infección

En el presente estudio, se caracterizó la cinética de la respuesta generada contra los antígenos ROP2, GRA4 y TgPI de *T. gondii*, luego de una infección oral en el modelo murino. ROP2 es una proteína componente de las roptrias que se expresa en los tres estadios del ciclo de vida del parásito (Sadak y col, 1988; Saavedra y col, 1991; Herion y col, 1993). GRA4 es un antígeno de los gránulos densos que se expresa en los estadios de taquizoito y bradizoito (Mevelec y col, 1998). TgPI es una proteína de los gránulos densos que posee una actividad de inhibidor de serin-proteinasa (Pszenny y col, 2000; 2002). El interés de estas proteínas está basado en su posible uso como candidatos para vacunas. En particular se analizó la habilidad de estos antígenos en su forma recombinante de estimular *in vitro* una respuesta celular a nivel local y una respuesta humoral y celular sistémica. Con el fin de realizar un análisis más completo se analizó comparativamente la respuesta generada en dos cepas de ratones con diferente haplotipo y susceptibilidad frente a la infección con *T. gondii*. La cepa C57BL/6 ya fue presentada. La cepa BALB/c (H-2^d) se caracteriza por ser resistente a la infección, observándose una muy baja carga de quistes en cerebro (Suzuki y col, 1991a).

7.1 - Expresión de proteínas recombinantes de *T. gondii*

En la Figura 7.1A se muestra un esquema de las construcciones de las proteínas recombinantes utilizadas en este trabajo. rROP2 (Martin y col, 1998), contiene los 3 epitopes potenciales de células T previamente descritos (Saavedra y col, 1996). La proteína rGRA4 contiene todos los epitopes de células B así como el de células T de GRA4 (326-334) descrito previamente (Chardes y col, 1993; Mevelec y col, 1998). La proteína rTgPI contiene la región codificante de la proteína madura del gen *TgPI* (*T. gondii* serine proteinase inhibitor) (Pszenny y col, 2000). Estas proteínas fueron purificadas por cromatografía de afinidad utilizando una columna conteniendo una resina de níquel.

Las proteínas purificadas fueron resueltas en una electroforesis en gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) el cual fue teñido con azul de Coomassie (Figura 7.1B y C). rGRA4 resultó ser una proteína soluble que migra con un peso molecular aparente de 29-kDa (calle 2).

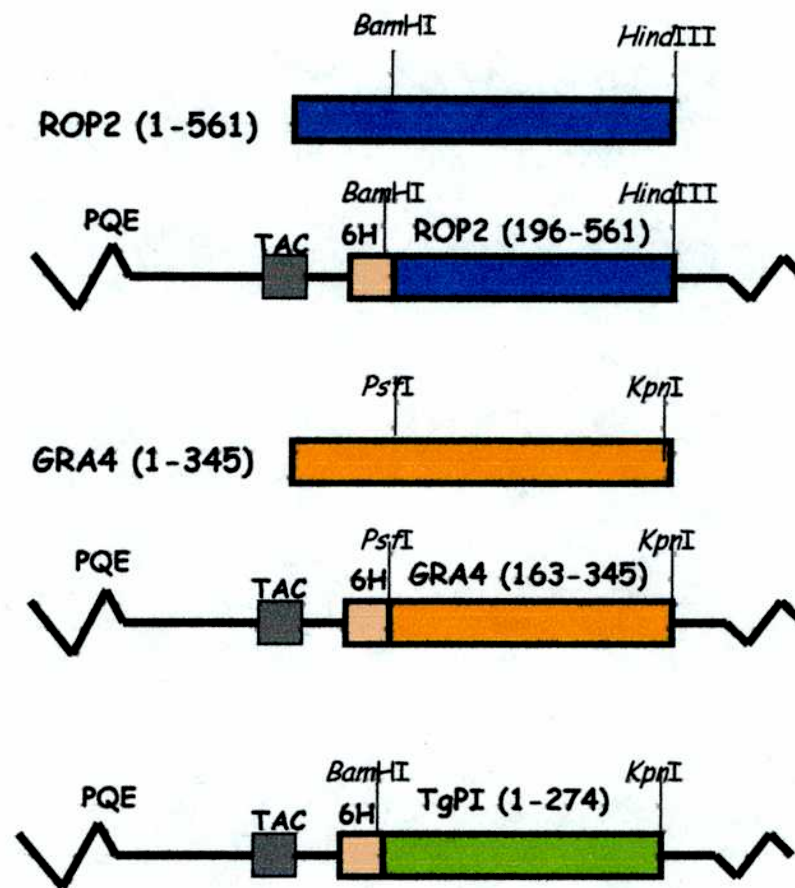
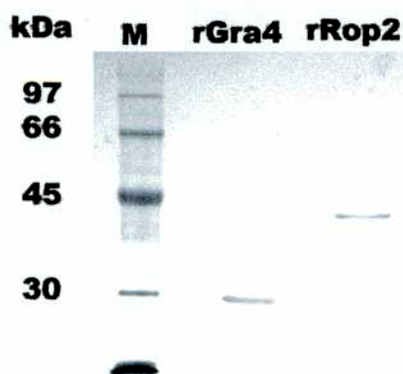
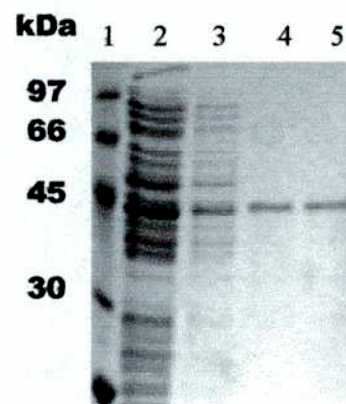
A**B****C**

Figura 7.1: A. Esquema de las construcciones de las proteínas recombinantes. B. Antígenos recombinantes rROP2 y rGRA4 de *T. gondii* resueltos por SDS-PAGE 10% y teñidos con Coomassie blue. C. Secuencia de purificación de la proteína recombinante TgPI. Calle 1: peso molecular, calle 2: extracto proteico total, calle 3: lavado y calles 4 y 5: TgPI purificada. A la izquierda se muestran los pesos moleculares en kilo-daltons.

rROP2 mostró un peso de 45-kDa (calle 3) y rTgPI migra con un peso molecular aparente de 42 kDa.

7.2 - Cinética de anticuerpos IgA intestinales de ratones infectados con *T. gondii* contra los antígenos ROP2, GRA4 y TgPI

Para monitorear el desarrollo de la producción de anticuerpos IgA intestinales específicos contra los antígenos rROP2, rGRA4 y rTgPI de *T. gondii*, dos cepas de ratones con diferente haplotipo fueron infectadas oralmente con quistes de la cepa ME49 y se obtuvieron las secreciones intestinales a distintos tiempos. Como se muestra en la Figura 7.2,

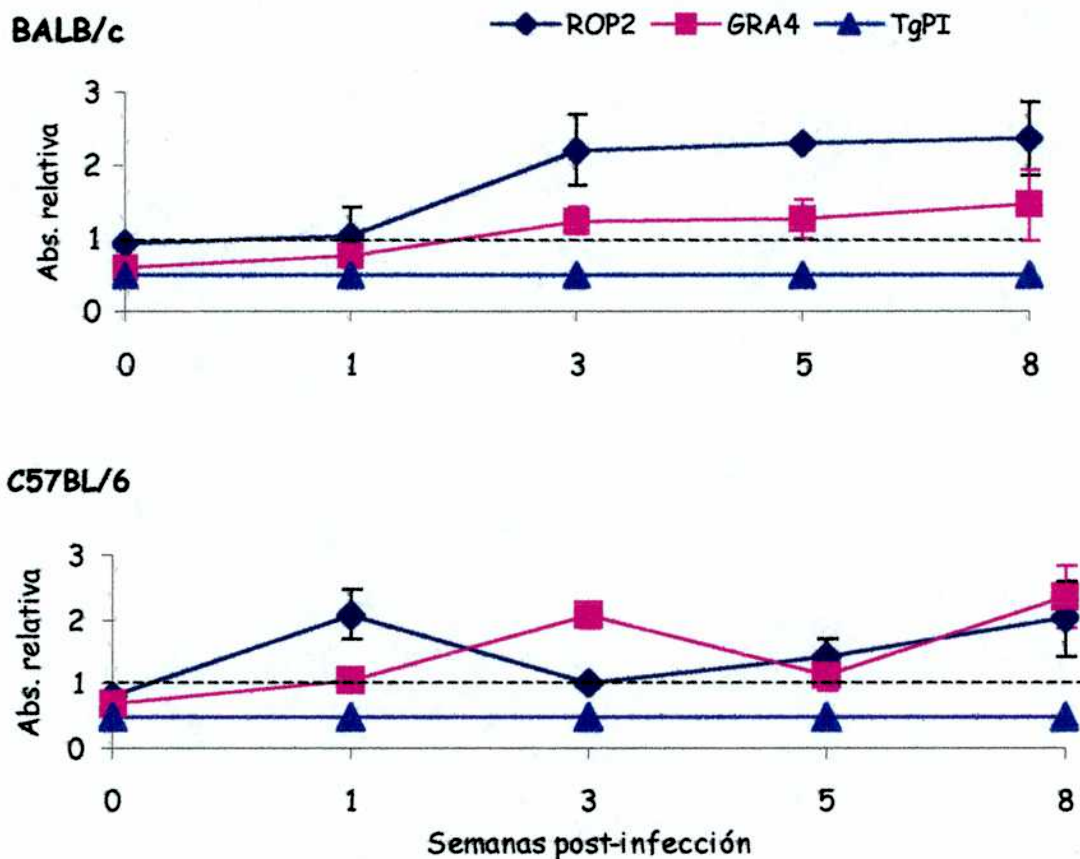


Figura 7.2: Cinética de la respuesta de anticuerpos IgA intestinales de ratones infectados contra antígenos de *T. gondii*. Los ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6 fueron sacrificados a distintos tiempos luego de la infección oral con quistes de *T. gondii* de la cepa ME49 y se midió en secreciones intestinales la producción de anticuerpos IgA específicos contra los antígenos ROP2, GRA4 y TgPI. Los fluidos fueron utilizados a una dilución 1:30. Los resultados están expresados como Absorbancia relativa (Absorbancia 450 nm dividido el valor de corte). El valor de corte está indicado como una línea punteada.

en ratones BALB/c (H-2^d) la producción de IgA específicas contra rROP2 y rGRA4 se evidenciaron a partir de la tercera semana. La producción de anticuerpos anti-rROP2 fue alta y sostenida comparada con rGRA4, que indujo una menor producción. La cepa C57BL/6 (H-2^b) mostró un patrón distinto de producción de anticuerpos IgA específicos. Se observó un pico de anticuerpos anti-rROP2 en la primera y octava semana de infección, mientras que para rGRA4, el primer pico fue durante la tercera semana y luego durante la octava. Los niveles de IgA anti-rROP2 fueron similares en ambas cepas de ratones, mientras que para rGRA4, la producción fue mayor en la cepa C57BL/6. No se pudieron detectar IgA específicas contra el antígeno rTgPI en ninguna de las dos cepas estudiadas.

7.3 - Cinética de anticuerpos séricos contra los distintos antígenos de *T. gondii*

Los ratones infectados con quistes de *Toxoplasma* fueron sangrados a distintos tiempos para estudiar la cinética de los anticuerpos específicos contra las proteínas recombinantes ROP2, GRA4 y TgPI. Como se muestra en la Figura 7.3, los anticuerpos IgG específicos se hicieron evidentes a partir de la tercera semana post-infección para ambas cepas de ratones. En la cepa BALB/c, los mayores niveles de IgG detectados fueron contra rROP2, mientras que las IgG anti-rTgPI mostraron niveles más bajos y las anti-rGRA4 resultaron igual al valor de corte. En cambio, en la cepa C57BL/6 la producción de IgG anti-rROP2 fue similar a la de rGRA4. Los niveles de anticuerpos anti-rROP2 en esta cepa fueron menores a los observados en BALB/c, mientras que los anti-rGRA4 resultaron mayores. La rTgPI presentó una producción de IgG específica más tardía con un pico durante la semana 5, y al igual que para rGRA4, los niveles observados fueron mayores que en la cepa BALB/c (Fig. 7.3).

La producción de anticuerpos IgA en ratones BALB/c fue similarmente baja para los antígenos rROP2 y rGRA4, mientras que no se pudieron detectar IgA anti-rTgPI (Fig. 7.3). Por el contrario, en la cepa C57BL/6 tanto rROP2 como rGRA4 indujeron mayores niveles. Los niveles de IgA anti-rGRA4 mostraron un pico durante la tercera semana, mientras las IgA anti-rROP2 fueron observadas a partir de la quinta semana de infección con niveles menores a los de rGRA4 (Fig 7.3). En contraste, la producción de anticuerpos IgM específicos contra rROP2 y rGRA4 resultaron similares en ambas cepas de ratones (Fig.7.3) y rROP2 indujo

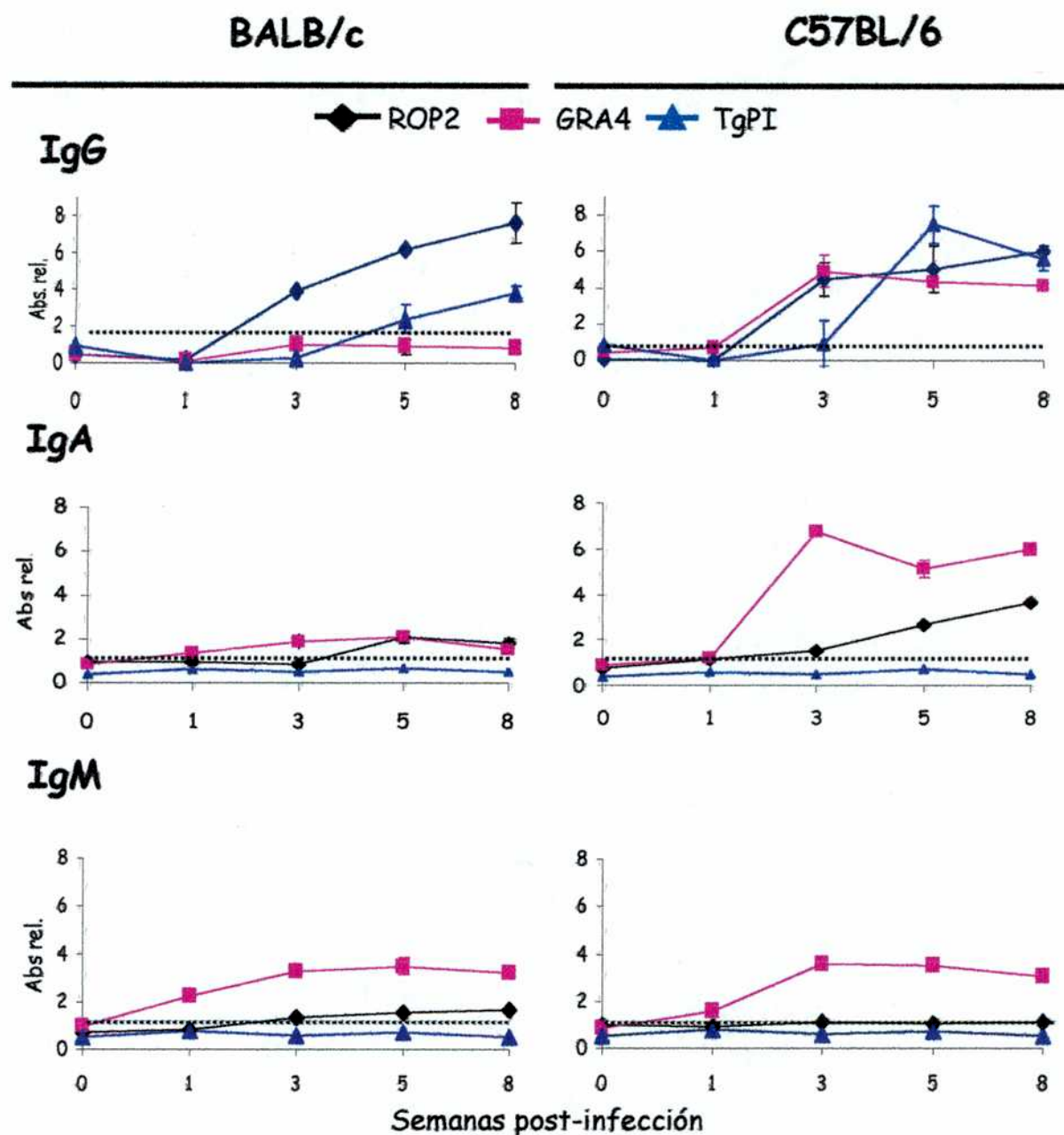


Figura 7.3: Cinética de la respuesta de respuesta humoral sérica en ratones infectados. Los ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6 fueron infectados y sangrados cada dos semanas por un período de ocho semanas. Los sueros fueron ensayados por ELISA antígeno-específicos para detectar anticuerpos IgG, IgA e IgM contra rROP2 (◆), rGRA4 (■) y rTgPI (▲) utilizando una dilución de los sueros de 1/2400 para IgG y 1/300 para IgA e IgM. Los valores se expresan como Absorbancia relativa (absorbancia a 450 nm / valor de corte). El valor de corte está indicado con una línea punteada.

mayores niveles comparados con los de rGRA4. Nuevamente, no se pudieron detectar IgM específicas contra el antígeno rTgPI.

7.4 - Análisis del perfil de isotipos de IgG contra los distintos antígenos de *T.gondii*

Con el fin de determinar el tipo de respuesta generada por cada uno de los antígenos utilizados en este estudio durante una infección oral, se estudió la producción de anticuerpos IgG1 e IgG2a en los sueros de los ratones infectados. Como muestra la Figura 7.4, en la cepa BALB/c se observa la presencia de IgG1 e IgG2a específicas anti-rTgPI recién en la octava semana. En el caso de rROP2 y rGRA4, estos antígenos indujeron una producción predominante de IgG2a a partir de semana 3, que para rROP2 los niveles se mantuvieron en el tiempo.

En la cepa C57BL/6, se observó un predominio del isotipo IgG2a para las tres proteínas (Fig. 7.4). Sin embargo, la cinética de cada uno de ellos resultó distinta observándose una inducción más temprana para los antígenos rGRA4 y rROP2.

7.5 - Respuesta inmune celular generada por los distintos antígenos de *T. gondii* en nódulos mesentéricos linfáticos

Para monitorear la cinética de la respuesta celular contra un sonicado de *T. gondii*, se aislaron las células de los NML de ratones sacrificados a distintos tiempos luego de una infección oral. Como se muestra en la Figura 7.5, se observó una proliferación específica temprana en células de NML, con un pico de respuesta en la primera semana post infección para las cepas C57BL/6 y BALB/c ($P < 0.01$). Las respuestas para ambos grupos de animales disminuyeron hasta niveles basales a partir de la semana 3.

Luego se determinó la respuesta proliferativa específica frente a la estimulación con los distintos antígenos de *T. gondii* en células aisladas de ratones con una semana de infección (Tabla 7.1). Los antígenos rROP2, rGRA4 y rTgPI indujeron respuestas significativas en ambas cepas de ratones comparadas con el control de células estimuladas con medio solo (Tabla 7.1A). La proliferación inducida por TSo resultó similar para ambas cepas al igual que la respuesta observada contra los antígenos ROP2 y GRA4, mientras que el antígeno TgPI indujo una mayor proliferación en la cepa C57BL/6. En la cepa BALB/c, rROP2 y rGRA4

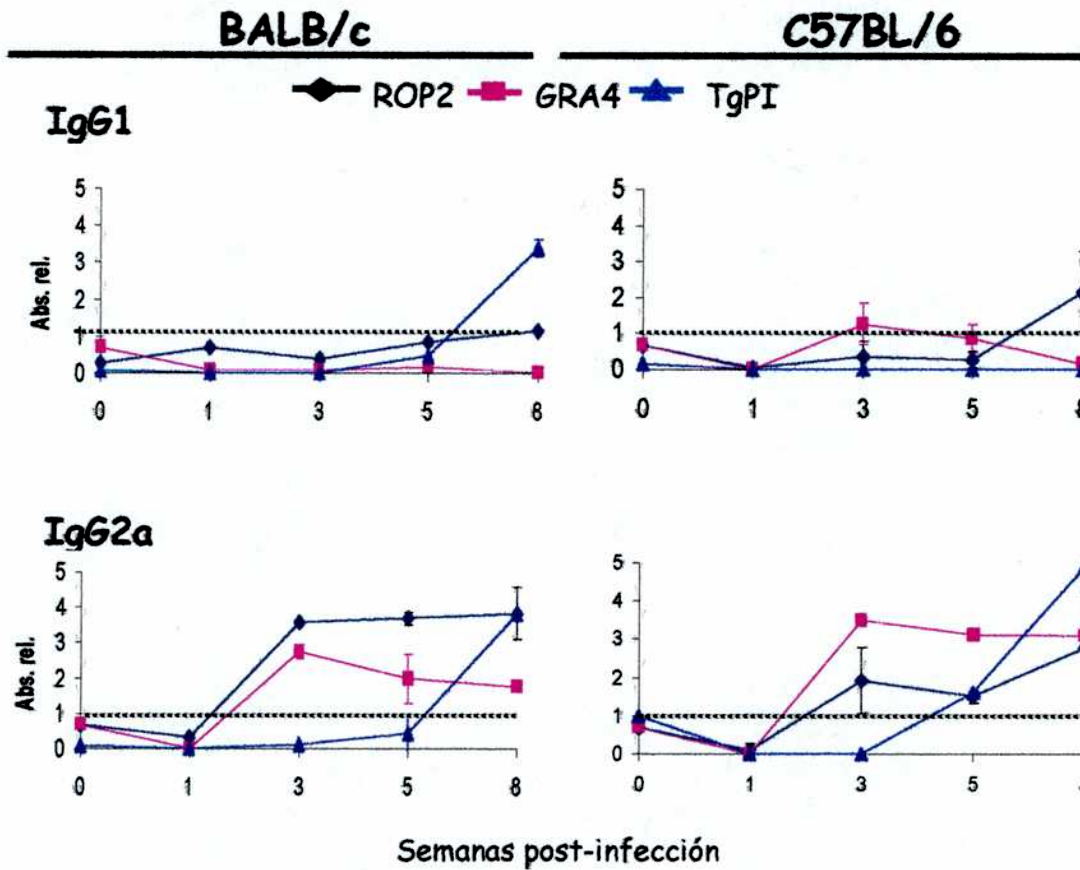


Figura 7.4: Perfil de isotipos de IgG contra antígenos de *T. gondii*. Comparación de los perfiles de IgG1 e IgG2a contra los antígenos rROP2 (◆), rGRA4 (■) y rTgPI (▲) entre las cepas BALB/c y C57BL/6 a distintos tiempos post-infección. Los sueros fueron usados a una dilución 1/300 y los valores se expresaron como absorbancia relativa (absorbancia a 450 nm / valor de corte). El valor de corte está indicado con una línea punteada.

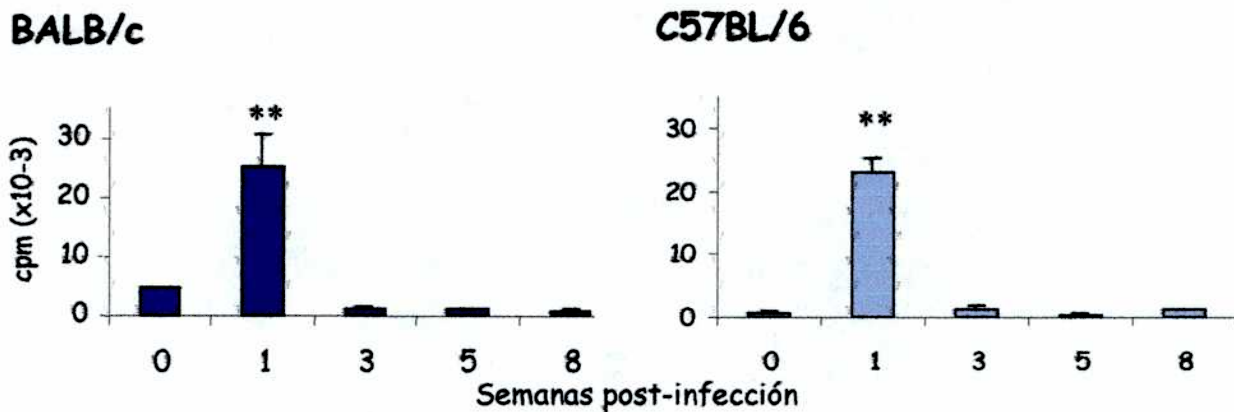


Figura 7.5: Cinética de proliferación específica de células de nódulos mesentéricos de ratones infectados. Los ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6 fueron infectados por vía oral con quistes de *T. gondii* y se midió la proliferación específica de células de nódulos mesentéricos a distintos tiempos post-infección. Las células fueron cultivadas durante 3 días en presencia de un sonicado de *Toxoplasma* y luego se les agregó [3 H]timidina durante 18 h. Los resultados fueron expresados como la media $\pm$ error estándar de triplicados. **P < 0,01 con respecto a los valores de la semana 0.

indujeron una respuesta significativamente mayor con respecto a la inducida por TgPI ($P > 0,05$ y $P < 0,05$ respectivamente), mientras que en los ratones C57BL/6 la respuesta inducida por rROP2 y rTgPI resultó mayor que la de rGRA4 ($P < 0,001$ y $P < 0,005$ respectivamente).

Tabla 7.1: Proliferación de células de nódulos mesentéricos inducida por los antígenos rROP2, rGRA4 y rTgPI. Los ratones de dos cepas fueron infectados por vía oral con quistes de *T. gondii* y las células de los nódulos mesentéricos fueron colectadas luego de 1 semana de infección. Los linfocitos fueron cultivados por 5 días en presencia de los diferentes inmunógenos y luego se les agregó [3H]timidina durante 18 h. **A.** Los resultados se expresan como la media $(10^{-3}) \pm$ desviación estándar de triplicados. El sonicado de *Toxoplasma* (TSO) y el medio solo fueron usados como controles positivos y negativos respectivamente. ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$ comparado con las células estimuladas con medio solo. **B.** Tabla con los valores P del test de Student entre los resultados de los antígenos. NS: no significativo

A			B			
Antígeno	Cepa de ratón		BALB/c	ROP2	GRA4	TgPI
	BALB/c	C57BL/6				
Medio	1,29 $\pm$ 0,06	0,59 $\pm$ 0,30				
TSO	27,96 $\pm$ 5,51**	33,29 $\pm$ 2,05**				
ROP2	12,64 $\pm$ 5,36**	18,35 $\pm$ 3,90**				
GRA4	8,63 $\pm$ 1,54**	7,58 $\pm$ 1,98*				
TgPI	5,54 $\pm$ 0,84**	16,88 $\pm$ 3,82*				

C57BL/6	ROP2	GRA4	TgPI
ROP2	--	0,0006*	NS
GRA4		--	0,0013**
TgPI			--

Luego de la estimulación *in vitro* con TSO, se observaron niveles significativos de IFN- γ fueron observados en los sobrenadantes de células primadas de NML para ambas cepas de ratones con una semana de infección (Tabla 7.2A). La proliferación inducida por la estimulación con las proteínas recombinantes produjo niveles de IFN- γ que variaron según la cepa de ratón. En BALB/c, las tres proteínas indujeron una cantidad significativa con respecto a las células control (Tabla 7.2A). rGRA4 indujo los mayores niveles de citoquina que resultaron significativos con respecto a los obtenidos con rROP2 y con rTgPI, esta última presentando niveles significativamente menores a los de rROP2 (Tabla 7.2B). La estimulación de células de ratones C57BL/6 con rROP2 generó una mayor producción de IFN- γ comparada con BALB/c, y significativamente mayor a los niveles obtenidos con GRA4

y TgPI (Tabla 7.2 A y B). Por el contrario, rGRA4 y rTgPI indujeron una menor respuesta en la cepa C57BL/6, que en ambos casos no fue mayor al control. No se pudo detectar IL-5 en los sobrenadantes de células de NML tratadas con estos antígenos.

Tabla 7.2: Perfil de respuesta específica de citoquinas de células de nódulos mesentéricos frente a antígenos de *T. gondii*. Las células fueron obtenidas 1 semana post-infección. **A.** Se detectó IFN- γ por un ensayo de ELISA con la construcción de una curva estándar usando una citoquina recombinante. El límite de detección fue de 15 pg/ml. **B.** Tabla con los valores P del test de Student entre los resultados de los antígenos. NS: no significativo

A			B			
Antígeno	IFN- γ (pg/ml)		BALB/c	ROP2	GRA4	TgPI
	BALB/c	C57BL/6				
Medio	<15	23 $\pm$ 10	ROP2	–	0,001**	0,001**
TSO	645 $\pm$ 94,5**	940 $\pm$ 357**	GRA4		–	0,000**
ROP2	173 $\pm$ 14**	482 $\pm$ 150**	TgPI			–
GRA4	338 $\pm$ 33 **	31 $\pm$ 13,3	C57BL/6	ROP2	GRA4	TgPI
TgPI	34 $\pm$ 6,4*	18 $\pm$ 3	ROP2	–	0,0001**	0,0001**
			GRA4		–	NS
			TgPI			–

7.6 - Respuesta específica de células de bazo frente a la estimulación *in vitro* con los antígenos definidos de *T. gondii*

Con el objetivo de estudiar la respuesta generada por estos antígenos a nivel esplénico, los ratones de estas dos cepas fueron infectados y los esplenocitos se aislaron a distintos tiempos. La estimulación de esplenocitos con TSO mostró una proliferación tardía en ambas cepas de ratones. En BALB/c se observó un pico en la semana 8 post infección ($P < 0,001$), mientras que en C57BL/6 hubo una baja estimulación durante la semana 1 ($P < 0,001$) y luego nuevamente en la semana 8 con mayores niveles ($P < 0,001$) (Fig. 7).

Cuando los esplenocitos aislados de ratones con 8 semanas de infección fueron estimulados *in vitro* con los antígenos definidos, se observó una respuesta proliferativa

significativa para las tres proteínas (Tabla 7.3). En BALB/c, las tres proteínas indujeron similares niveles de blastogénesis, mientras que en C57BL/6 rGRA4 y rTgPI mostraron niveles significativamente mayores a rROP2.

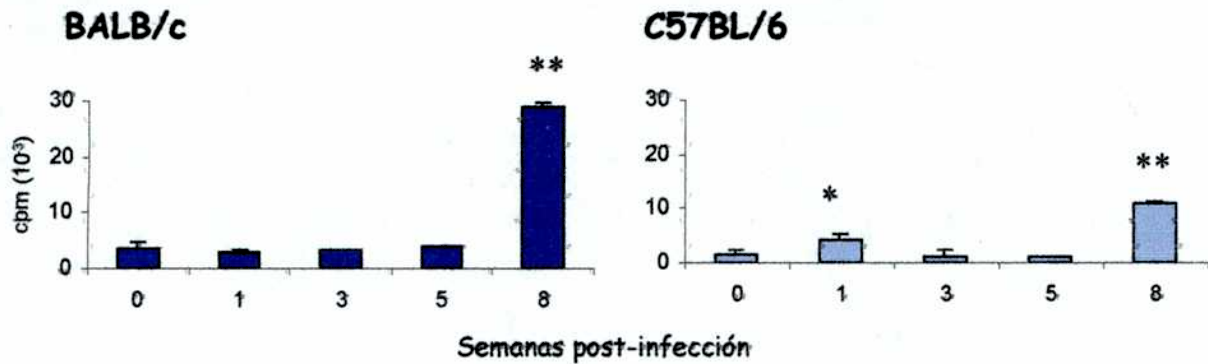


Figura 7.6: Cinética de proliferación específica de células de bazo de ratones infectados. Los ratones fueron infectados y se midió la proliferación específica de esplenocitos a distintos tiempos post-infección. Las células fueron cultivadas durante 3 días en presencia de un sonicado de *Toxoplasma* y luego se les agregó [³H]timidina durante 18 h. Los resultados fueron expresados como la media $\pm$ desviación estándar de triplicados. **P < 0,01; *P < 0,05 con respecto a los valores de la semana 0.

Tabla 7.3: Proliferación de células de bazo inducida por los antígenos rROP2, rGRA4 y rTgPI. Los ratones de dos cepas fueron infectados por vía oral con quistes de *T. gondii* y las células de los bazos fueron colectadas luego de 8 semanas de infección. Este estudio se realizó como se describió en la Tabla 1. **P < 0,01; *P < 0,05 comparado con las células estimuladas con medio solo. B. Tabla con los valores P del test de Student entre los resultados de los antígenos. NS: no significativo

A

Antígeno	Cepa de ratón	
	BALB/c	C57BL/6
Medio	1,07 $\pm$ 0,04	1,25 $\pm$ 0,88
TSo	24,72 $\pm$ 0,74**	32,04 $\pm$ 1,02**
ROP2	7,99 $\pm$ 3,00**	4,65 $\pm$ 1,39*
GRA4	7,21 $\pm$ 1,25**	19,70 $\pm$ 2,41*
TgPI	11,11 $\pm$ 4,00**	21,69 $\pm$ 5,02*

B

BALB/c	ROP2	GRA4	TgPI
ROP2	--	NS	NS
GRA4		--	NS
TgPI			--

C57BL/6	ROP2	GRA4	TgPI
ROP2	--	0,001**	0,001**
GRA4		--	NS
TgPI			--

Se prepararon suspensiones celulares de bazo de ratones con una semana de infección, tiempo en el cual se observó el pico de producción de citoquinas en ensayos previos. Luego de la estimulación *in vitro* con TSo, se observaron niveles significativos de IFN- γ e IL-5 en los sobrenadantes de esplenocitos primados para ambas cepas de ratones (Tabla 7.4A). Ambas citoquinas fueron también detectadas en los sobrenadantes de células estimuladas con ROP2, GRA4 y TgPI en la cepa C57BL/6, mientras que en BALB/c no se detectó la secreción de IL-5 en respuesta a estos antígenos. En esplenocitos de la cepa BALB/c, rGRA4 indujo cantidades significativamente mayores de IFN- γ comparadas con rROP2 y rTgPI, siendo este último el antígeno que menor respuesta generó (Tabla 7.4A y B). La producción de IFN- γ obtenida en esplenocitos de ratones C57BL/6 resultó similar a BALB/c pero con valores más altos para rROP2 y rGRA4, mientras que la secreción de IL-5 resultó significativa para los tres antígenos solo en la cepa BALB/c.

Tabla 7.4: Perfil de respuesta específica de citoquinas de células de bazo frente a antígenos de *T. gondii*. Las células fueron obtenidas luego de 1 semana de infección. A. IFN- γ e IL-5 fueron detectadas por ensayos de ELISA. Para cada ensayo, se hicieron curvas estándar

A

Antígeno	BALB/c		C57BL/6	
	IFN- γ	IL-5	IFN- γ	IL-5
Medio	< 15	< 15	< 15	< 15
TSo	826 $\pm$ 64**	269 $\pm$ 50**	>1000**	340 $\pm$ 46**
rROP2	80 $\pm$ 10**	< 15	>1000**	55 $\pm$ 15**
rGRA4	127 $\pm$ 21**	< 15	>1000**	46 $\pm$ 16**
rTgPI	40 $\pm$ 4*	< 15	30 $\pm$ 12**	51 $\pm$ 16**

usando citoquinas recombinantes. El límite de detección de cada ensayo fue de 15 pg/ml. Los resultados se expresaron como pg/ml. B. Tabla con los valores P del test de Student entre los resultados de los antígenos para IFN- γ y C. IL-5.

B. IFN- γ

BALB/c	rROP2	rGRA4	rTgPI
rROP2	—	0,001**	0,001**
rGRA4		—	0,001**
rTgPI			—

C57BL/6	rROP2	rGRA4	rTgPI
rROP2	—	0,001**	0,001**
rGRA4		—	0,001**
rTgPI			—

C. IL-5

BALB/c	rROP2	rGRA4	rTgPI
rROP2	—	NS	NS
rGRA4		—	NS
rTgPI			—

C57BL/6	rROP2	rGRA4	rTgPI
rROP2	—	NS	NS
rGRA4		—	NS
rTgPI			—

8 – ANÁLISIS INMUNOPROFILÁCTICO DE ANTÍGENOS DEL *TOXOPLASMA GONDII* EN EL MODELO MURINO

A pesar de que el aluminio como adyuvante demostró promover la producción de citoquinas del tipo Th2 con bajos niveles de activación de células T CD8⁺, contrariamente a los requerimientos para inducir inmunidad contra *T. gondii* en ratones (Alexander y col, 1996), Petersen y col (1998) lograron inducir protección en ratones inmunizados con una SAG1 recombinante utilizando aluminio como adyuvante.

En este estudio se examinó la eficacia de rROP2, rGRA4, rTgPI y una proteína recombinante quimérica rROP2-rGRA4 (Quim) en conferir inmunidad a dos cepas de ratones con distinta susceptibilidad cuando se las combinó con este adyuvante. En algunos casos se emplearon dos cepas de ratones, la ampliamente descrita C57BL/6 y C3H, una cepa de mediana resistencia que produce un gran número de quistes en cerebro a diferencia de la cepa BALB/c.

8.1 - Expresión de proteínas recombinantes de *T. gondii*

La construcción de las proteínas recombinantes rROP2 y rGRA4 fue descrita previamente. En la Figura 8.1A se muestra un esquema de la construcción de la proteína recombinante quimérica rROP2-rGRA4 (Quim). Las proteínas purificadas rROP2, rGRA4 y Quim fueron resueltas en una electroforesis en gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) teñido posteriormente con Coomassie Blue (Figura 8.1B). rGRA4 migró con un peso molecular aparente de 29-kDa (calle 2) mientras que rROP2 mostró un peso de 45-kDa (calle 3) y la proteína Quim se mostró como una banda de 70-kDa (calle 1). Aunque esta proteína se pudo purificar bien, la expresión en los cultivos bacterianos fue menor comparada con rROP2 y rGRA4 (datos no mostrados).

8.2 - Protección de ratones inmunizados frente al desafío con *T. gondii*

Se inmunizaron por vía intramuscular grupos de ratones de las cepas C57BL/6 (H-2^b) y C3H (H-2^k) con rROP2 y rGRA4 combinados con aluminio. Como controles negativos, se inmunizaron ratones con PBS-aluminio. La capacidad de estas formulaciones en conferir

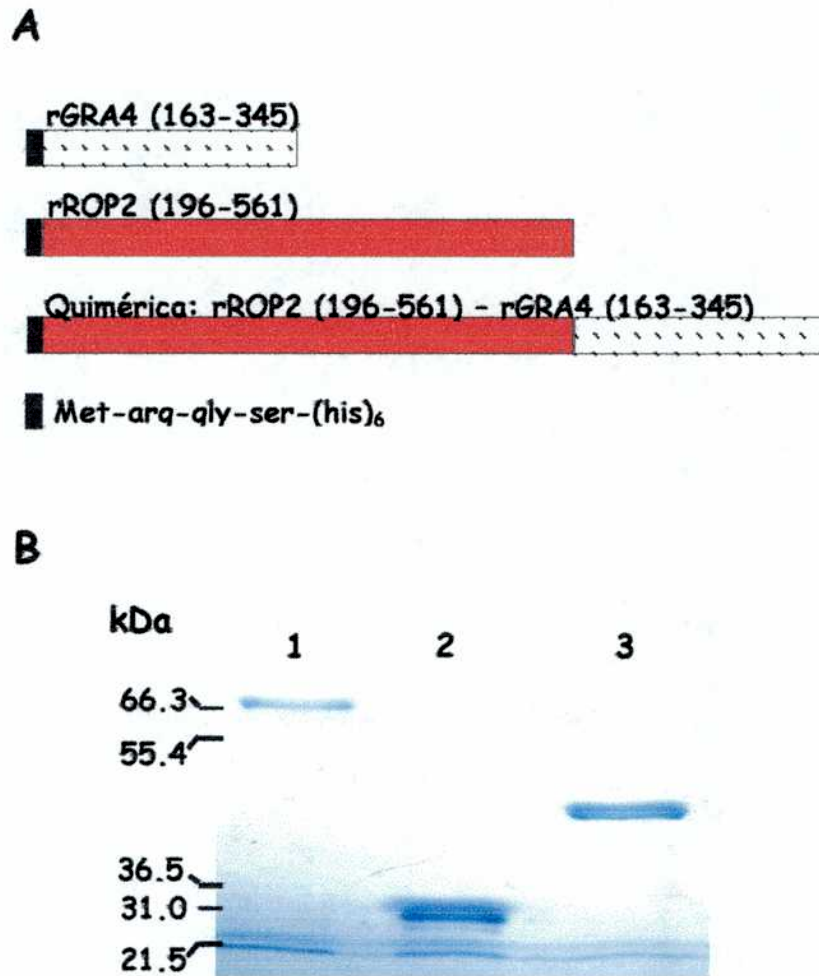


Figura 8.1: A. Esquema representativo de las construcciones de las proteínas recombinantes expresadas como proteínas de fusión con 6 residuos de histidina en el extremo N-terminal. B. Proteínas recombinantes resueltas por 10%-SDS-PAGE y teñidas con Coomassie blue. Calle 1, Quimérica; 2, rGra4; and 3, rRop2.

protección contra la infección con *T. gondii* fue determinada por el número de quistes en los cerebros de los ratones inmunizados, luego de un desafío oral no letal con quistes de la cepa ME49. Los ratones C57BL/6 que recibieron rGRA4-aluminio exhibieron una resistencia a la formación de quistes comparado con el grupo control (Fig. 8.2A) y esta protección resultó significativa ($P < 0,01$). En cambio la inmunización con rROP2-aluminio redujo ligeramente el número de quistes en cerebro pero esta reducción no fue significativa con respecto al grupo control ($P > 0,05$). La co-inmunización de rGRA4 y rROP2 al igual que la inmunización con la proteína quimérica rROP2-rGRA4 indujeron una reducción significativa en la carga

parasitaria cerebral con respecto al grupo control ($P < 0,01$ y $P < 0,05$ respectivamente), pero esta reducción no fue significativamente mayor a la inducida por rGRA4 sola ($P > 0,05$ para ambos grupos).

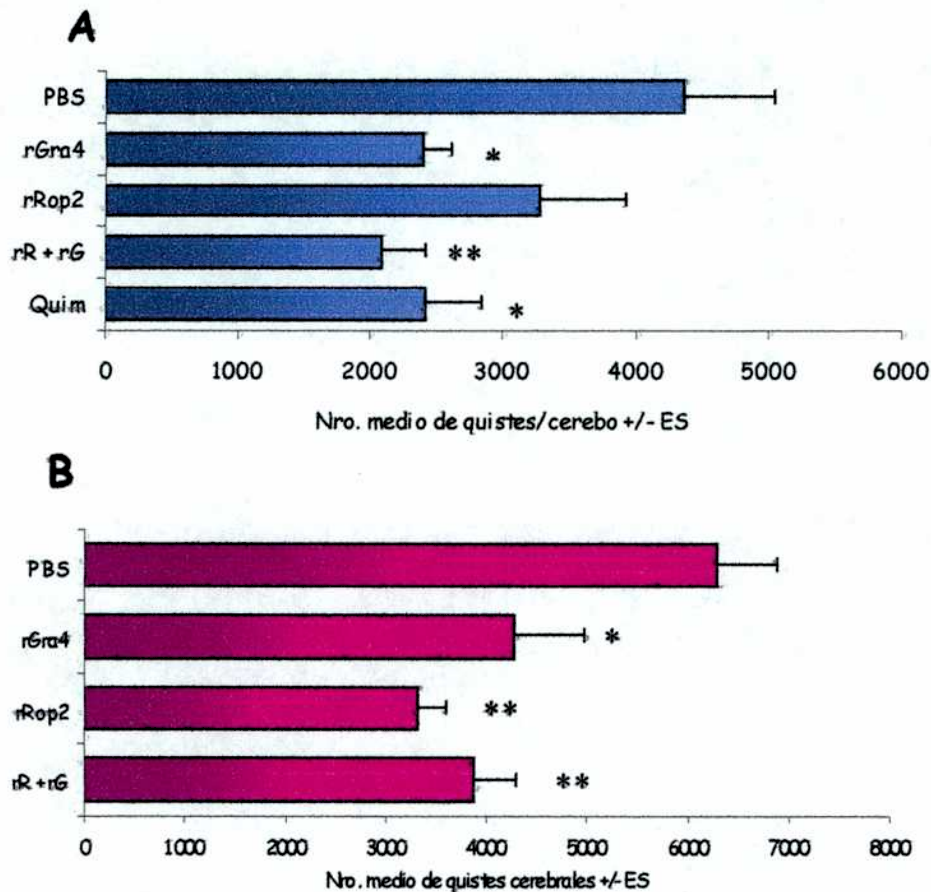


Figura 8.2. Ensayo de protección contra un desafío no letal. Los ratones de las cepas **A.** C57BL/6 y **B.** C3H recibieron cuatro inmunizaciones de PBS (control), rROP2, rGRA4, rR+rG (mezcla de rROP2 y rGRA4), y Quim (proteína de fusión rROP2-rGRA4) combinados con aluminio y luego fueron infectados por vía oral con 20 quistes de la cepa ME49 de *T. gondii* 14 días después del último refuerzo. Se evaluó la carga parasitaria cerebral un mes después de la infección. Los valores están expresados como número medio de quistes por cerebro $\pm$ SD de dos experimentos similares realizados con grupos de 5 ratones.

Por otro lado, la inmunización de ratones C3H con rGRA4, al igual que en ratones C57BL/6, indujo una disminución significativa en el número de quistes por cerebro comparada con el grupo control ($P < 0,05$) (Fig. 8.2B). A diferencia de lo observado en ratones C57BL/6, rROP2 indujo una reducción del número de quistes que resultó significativa

($P < 0,01$), y aunque el número de quistes por cerebro fue menor que en ratones inmunizados con rGRA4, la diferencia entre ambos grupos no fue significativa ($P = 0,2$). Los ratones inmunizados con la mezcla rROP2+rGRA4 también mostraron una protección significativa frente a la infección ($P < 0,01$) comparada con el control, y esta reducción fue similar a la observada para rROP2 sola. La proteína quimérica no fue ensayada en esta cepa de ratones. Un análisis paralelo de dos ratones infectados de ambas cepas mostró un número similar de quistes por cerebro que los animales inmunizados con PBS-Alum (datos no mostrados).

Se ensayó también la inmunidad conferida por estas inmunizaciones frente a desafíos con dosis letales (100 quistes orales) en ratones C57BL/6, no observándose diferencias en la tasa de supervivencia de los ratones inmunizados con los antígenos recombinantes comparados con los grupos controles (datos no mostrados).

8.3 - Respuesta inmune humoral contra los antígenos recombinantes

La eficiencia de la vacunación de ratones de las cepas C57BL/6 y C3H inmunizados y posteriormente desafiados por vía oral con quistes de *T. gondii*, se siguió mediante análisis serológicos por ensayos de rROP2- y rGRA4-ELISA. Luego del último refuerzo los sueros de los ratones de ambas cepas mostraron títulos altos de IgG que van desde 16.200 hasta 97.200 para rROP2 y rGRA4, mientras que los grupos controles no mostraron reactividad con ninguno de los 2 antígenos. Cuatro semanas luego del desafío, todos los animales inmunizados mostraron un aumento en los títulos específicos de IgG que van desde 145.800 hasta 874.800. Los grupos controles también mostraron reactividad frente a los antígenos recombinantes en este punto luego del desafío, con títulos que van desde 5.400 hasta 145.800.

La Figura 8.3 muestra que antes del desafío (día 28 luego de la primera inmunización), los ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados con rROP2 sola o con antígenos basados en rROP2, desarrollaron una respuesta específica de anticuerpos anti-rROP2 con predominio del subtipo IgG1, excepto en los ratones inmunizados con la proteína quimérica en donde no predominó ningún isotipo. Por el contrario, los animales inmunizados con rGRA4, R+G o con quimérica desarrollaron un perfil isotípico IgG1/IgG2a anti-rGRA4 similar. Luego del desafío, hubo un disparo importante del isotipo IgG2a anti-rROP2 (Figura 8.3). Similarmente, luego de la infección los niveles de las IgG2a anti-rGRA4 fueron mayores comparados con los de IgG1, salvo para el grupo inmunizado con Quim, en donde ambos isotipos aumentaron

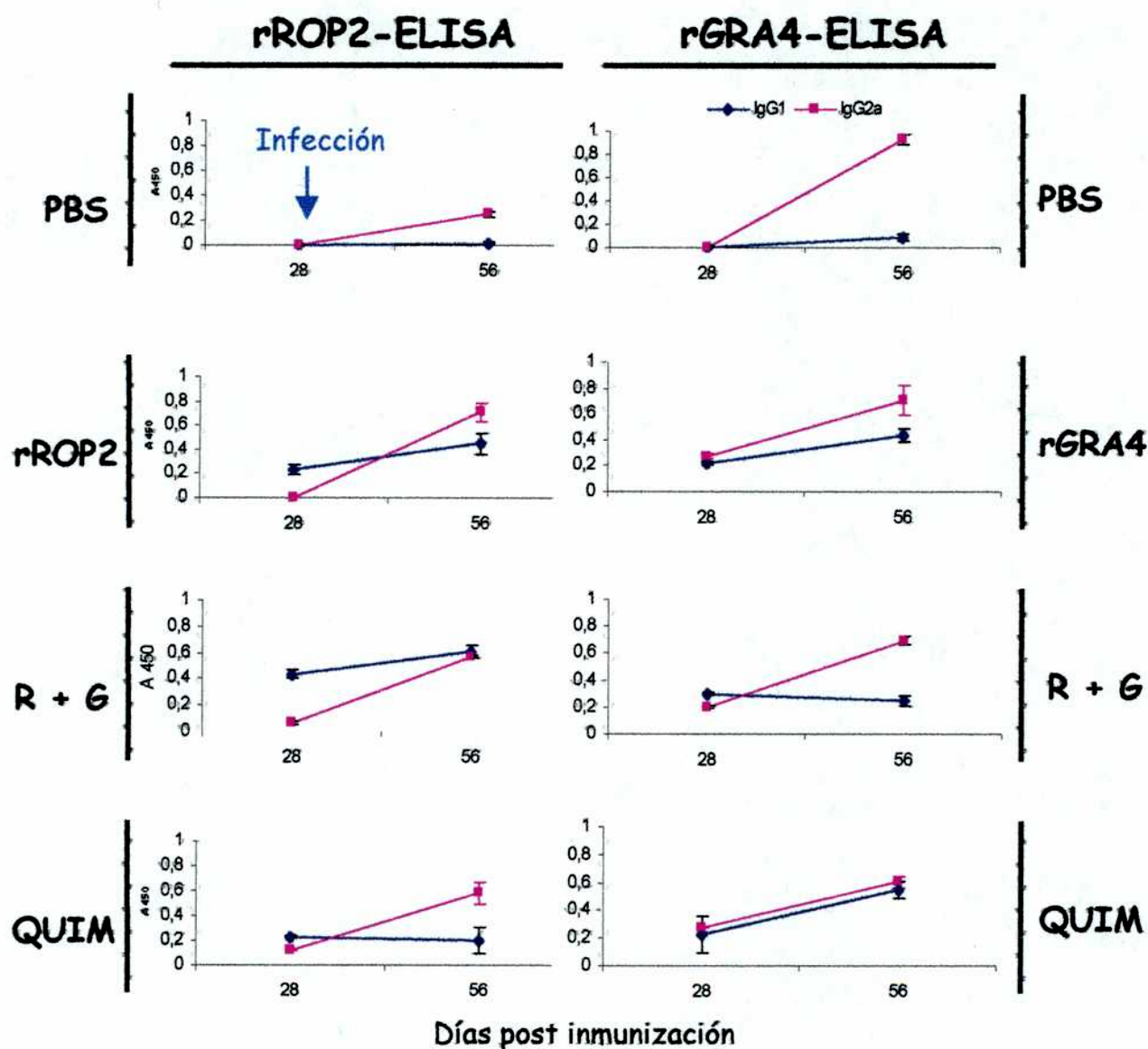


Figura 8.3: Perfil de subclases de IgG específicas anti-rROP2 y -rGRA4 en sueros de ratones C57BL/6 inmunizados. Catorce días luego del último refuerzo (día 28) se tomaron muestras de sueros de los ratones inmunizados con PBS, rROP2, rGRA4, R+G y proteína quimérica (indicado a los costados) combinados con aluminio y también cuatro semanas luego del desafío oral con quistes de *T. gondii* (día 56). Los sueros fueron analizados por rROP2- o rGRA4-ELISA para la presencia de IgG1 (triángulo negro) e IgG2a (cuadrado rosa). Los sueros fueron utilizados en una dilución óptima de 1:2000 según fue establecido en ensayos previos. Los sueros obtenidos al día 0 (pre-inmune) fueron testeados a una dilución 1:100 y no se encontró reactividad. Los resultados están expresados como absorbancia a 450 nm (A450) y son representativos de uno de dos experimentos similares.

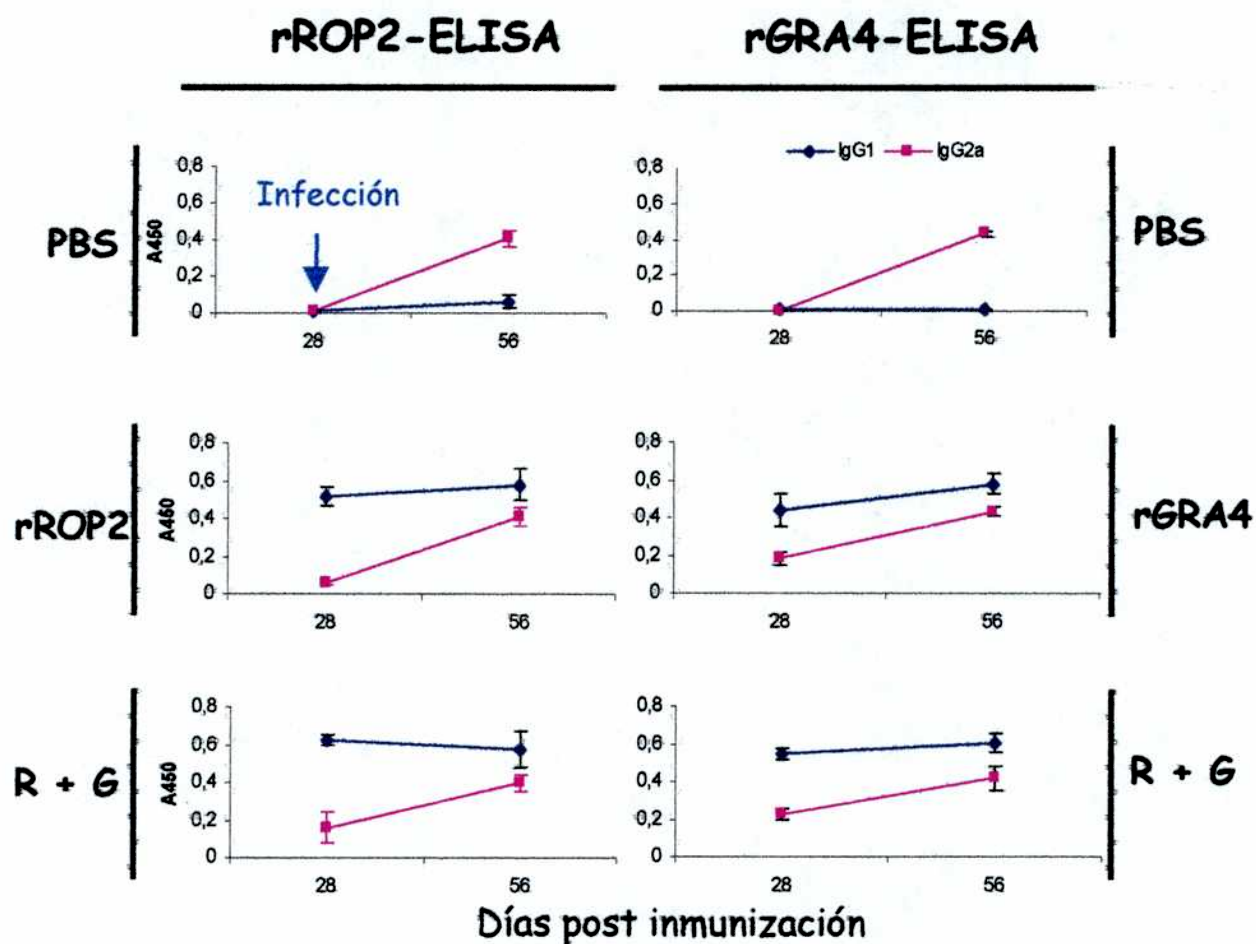


Figura 8.4: Perfil de anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos anti-rROP2 y -rGRA4 en sueros de ratones C3H inmunizados. Las muestras de suero fueron tomadas y ensayadas como se describió para la figura anterior.

en forma similar (Figura 8.3). El análisis de isotipos en ratones C3H generados por las inmunizaciones, mostró un predominio de IgG1 anti-rROP2 y anti-rGRA4 sobre IgG2a (Fig. 8.4). Luego del desafío los niveles de IgG1 no variaron, y hubo un aumento en la producción de IgG2a resultando en una respuesta mixta IgG1/IgG2a (Fig. 8.4). Los grupos controles de ambas cepas que fueron inmunizados con PBS, mostraron una respuesta predominante de tipo IgG2a anti-rROP2 y anti-rGRA4 solamente luego del desafío y los niveles de anticuerpo encontrados fueron mayores para rGRA4 solo en la cepa de ratones C57BL/6 (Fig. 8.3).

8.4 - Respuesta linfoproliferativa a los antígenos rROP2 y rGRA4

Catorce días luego del último refuerzo, se prepararon las células de bazo de los ratones C57BL/6 inmunizados con rROP2, rGRA4, R+G y proteína quimérica combinados con aluminio, para estudiar las respuestas inmunes proliferativas estimuladas *in vitro* por rROP2 y rGRA4. Los esplenocitos de los ratones inmunizados con rROP2 mostraron una respuesta proliferativa significativa frente a la estimulación con rROP2 (Fig. 8.5A). Cuando se analizó la respuesta proliferativa inducida por el antígeno rGRA4, los resultados mostraron una respuesta significativa en ratones inmunizados tanto con rGRA4, como con R+G y proteína quimérica (Fig. 8.5A). Estas proliferaciones fueron específicas, ya que no se observó expansión de células de bazo cuando se cultivaron en presencia de los antígenos heterólogos, y los ratones control vacunados con PBS-aluminio, no respondieron a la estimulación con ninguna de estas proteínas recombinantes.

8.5 - Producción de citoquinas

Los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos de los ratones C57BL/6 inmunizados con rROP2, rGRA4, R+G y la proteína quimérica combinados con aluminio fueron recolectados luego de la estimulación con rROP2 y rGRA4 y se estudió la presencia de IL-4 e IFN- γ . Se detectaron altos niveles de IL-4 en los cultivos de esplenocitos de ratones inmunizados con rROP2, R+G y Quim estimulados con rROP2 (Figura 8.5B). Por el contrario, los niveles de esta citoquina observados frente a la estimulación con rGRA4 resultaron muy bajos en los grupos de ratones inmunizados con rGRA4 y R+G, mientras que el grupo vacunado con Quim mostró mayores niveles (Fig. 8.5B). Contrariamente a lo

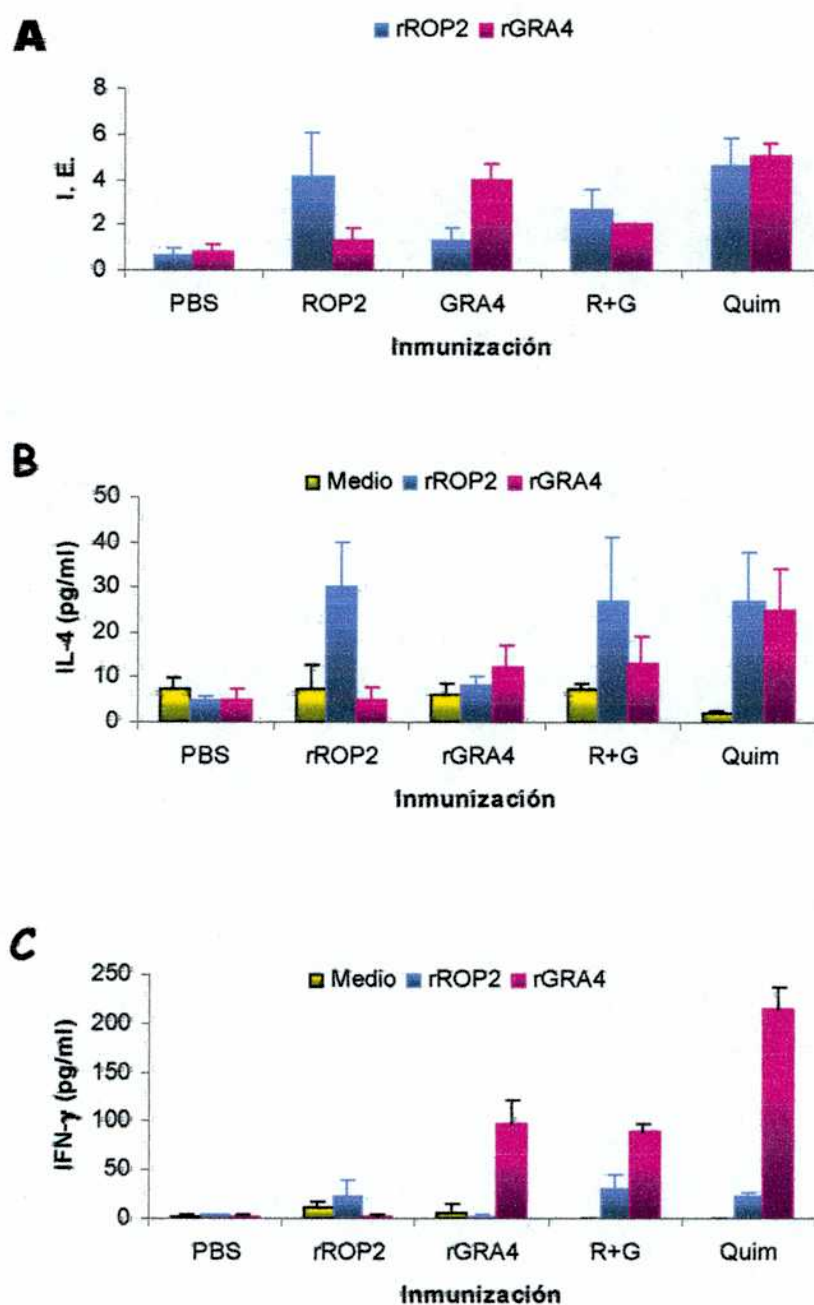


Figura 8.5: Respuesta celular de esplenocitos de ratones C57BL/6 inmunizados. A. Proliferación *in vitro* de esplenocitos de ratones inmunizados con PBS, rROP2, rGRA4, R+G y Quimérica combinados con aluminio en respuesta a la estimulación con Medio o 10 μ g de rROP2 o rGRA4. Los resultados están expresados como índice de estimulación (IE = media de cuentas por minuto [cpm] de células estimuladas con rROP2 o rGRA4 dividido la media de las cpm de las células estimuladas con medio). B. Producción de IL-4 y C. IFN- γ de esplenocitos luego de la estimulación *in vitro* con Medio, rROP2 o rGRA4. Estos son los resultados de uno de dos experimentos similares.

obtenido para IL-4, los mayores niveles de IFN- γ fueron inducidos por rGRA4 en los grupos inmunizados con rGRA4, R+G y Quim, con los mayores valores observados para este último grupo (Fig. 8.5C). La estimulación con rROP2 indujo niveles muy bajos de IFN- γ solo en los ratones inmunizados con R+G y Quim (Fig. 8.5C). No se pudieron detectar niveles significativos de IL-4 ni de IFN- γ en los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos de ratones C3H inmunizados.

8.6 - Vacuna de ADN del antígeno GRA4

Continuando con el estudio del antígeno Gra4 de *T. gondii*, el gen *gra4* fue clonado en el plásmido pcDNA3 y se investigó la síntesis de GRA4 en un sistema eucariota. La expresión de la proteína fue testada en células COS7 transfectadas con pGRA4 o pcDNA3 vacío. Los extractos proteicos fueron luego analizados por SDS-PAGE y Western blot. Los anticuerpos anti-GRA4 de ratón reconocieron una banda de 40-kDa en los extractos de células COS-7 transfectadas con el pGRA4 (Fig. 8.6), mientras que no se detectó ninguna banda en células transfectadas con el plásmido vacío.

Se procedió luego a analizar su valor inmunoprotectivo frente a la infección. Para esto, grupos de ratones de la cepa C3H fueron inmunizados con pGRA4, con el plásmido vacío como grupo control y se incluyó un grupo con la proteína recombinante Gra4 combinada con aluminio y su control (PBS-Alum). La capacidad de la inyección intramuscular del plásmido codificante para GRA4 de proteger a los ratones C3H contra la infección, fue determinada con un desafío oral de 20 quistes de la cepa ME49 luego de 2 semanas del último refuerzo. Un mes después la protección fue estudiada mediante el conteo de quistes en cerebro. Como se muestra en la Figura 8.7, la inmunización con el pGRA4 disminuyó significativamente la carga parasitaria cerebral ($P < 0.01$) al igual que la inmunización con rGRA4+Alum ($P < 0,01$) comparado con el grupo control inmunizado con pcDNA3 vacío y con el grupo PBS+Alum.

Los sueros de los ratones inmunizados fueron colectados antes y después del desafío, y se analizaron por un ensayo de ELISA para la respuesta de anticuerpos específicos anti-GRA4 (Fig. 8.8). La respuesta de anticuerpos IgG luego de la inmunización con pGRA4 mostró niveles muy bajos comparados con los niveles obtenidos con rGRA4+Alum, aumentando luego del desafío con *T. gondii* al igual que los grupos control inmunizados con PBS+Alum y

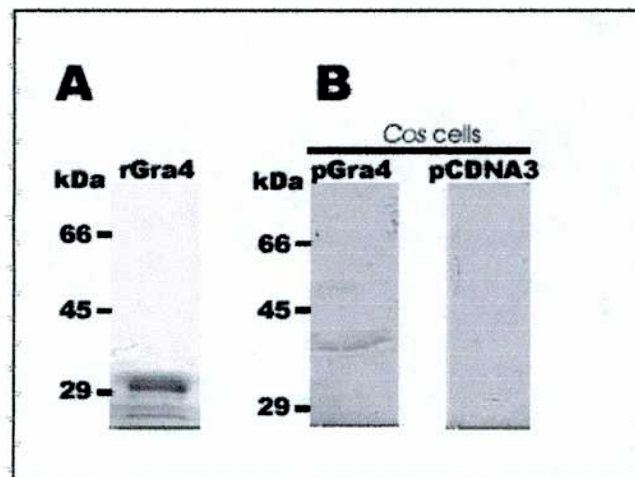


Figura 8.6: Análisis de la expresión e inmunogenicidad de la proteína GRA4. A. La proteína rGRA4 fue resuelta por SDS-PAGE 10% y teñida con Coomassie Blue. B. Los lisados de las células COS-7 transfectados con pGRA4 o pCDNA3 vacío fueron corridos en un SDS-PAGE 10%, transferidos a nitrocelulosa y luego resueltos con un suero anti-GRA4 de ratón. A la izquierda se indican las posiciones de las masas moleculares estándar.

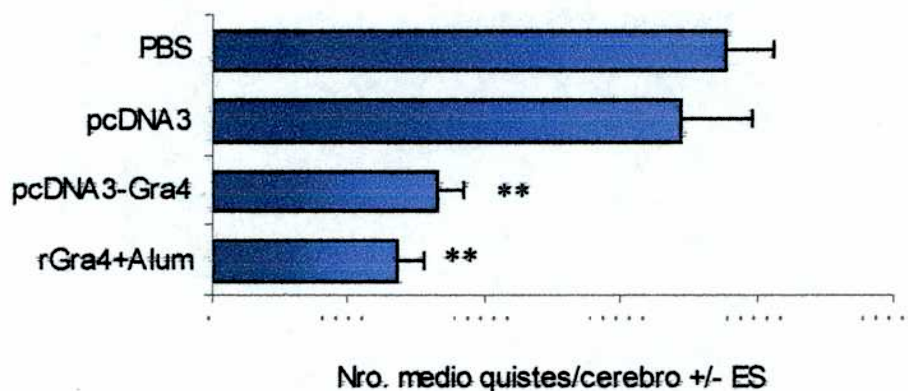


Figura 8.7: Ensayo de protección frente a un desafío no letal. Los ratones C3H inmunizados con la vacuna (pcDNA3-Gra4), el control (pcDNA3), la proteína recombinante (Gra4-Alum) y su control (PBS-Alum) fueron infectados con una dosis no letal de quistes de *T. gondii* de la cepa ME49 14 días luego del último refuerzo. Un mes después se contaron quistes en cerebro. Se utilizaron 5 ratones por grupo. **P < 0.01

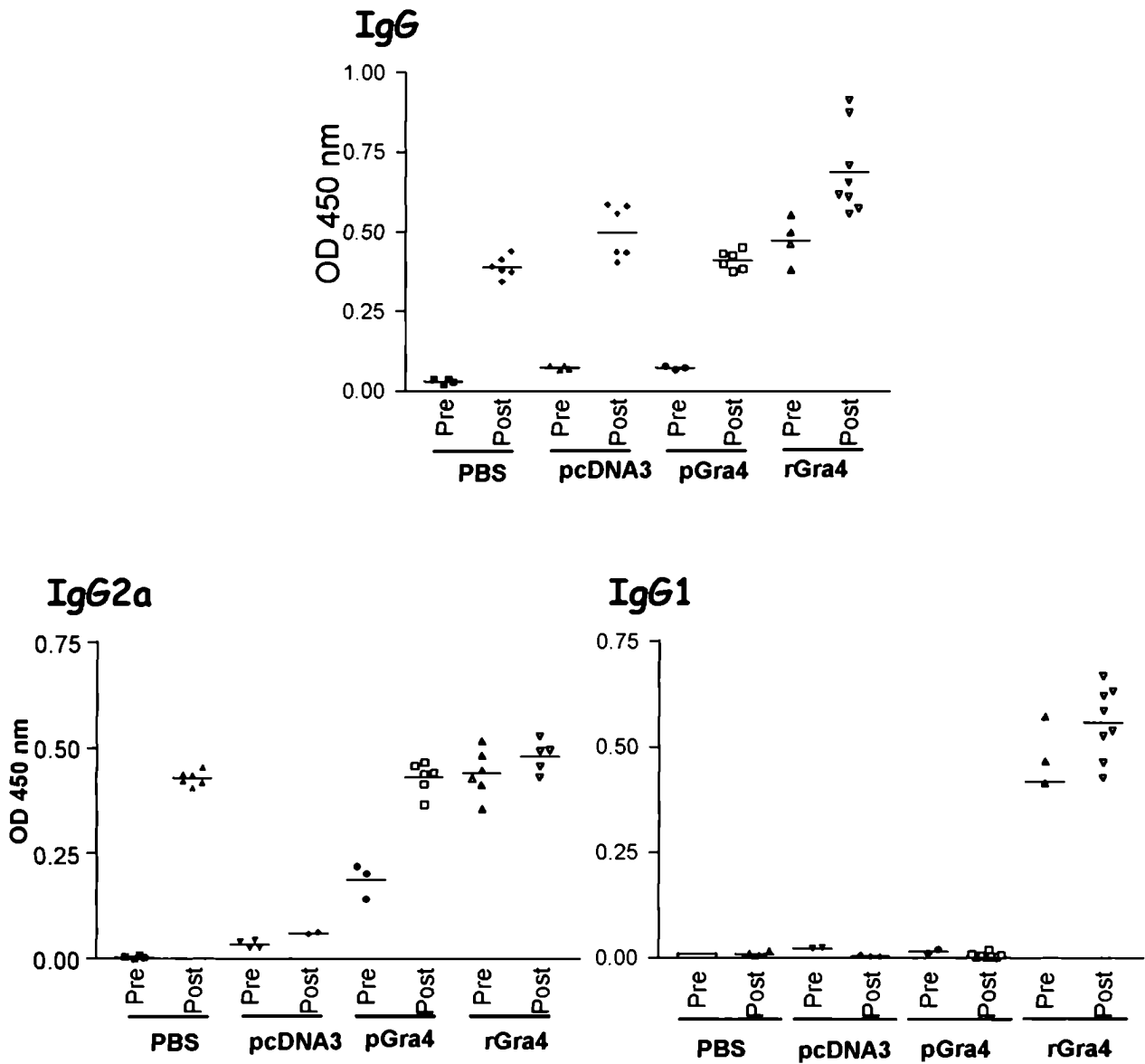


Figura 8.8: Determinación de IgG, IgG1 e IgG2a en sueros de ratones C3H inmunizados con la vacuna de ADN. Los sueros de los ratones inmunizados con pcDNA3, pGRA4 (pcDNA3-Gra4), rGRA4 (+Alum) o PBS (+Alum), fueron obtenidos 14 días luego del último refuerzo (Pre) y 4 semanas luego del desafío (Post). Los sueros fueron analizados para detectar anticuerpos anti-Gra4 específicos por ELISA. Cada punto representa el promedio de la OD a 450 nm de cada suero individual testeado por duplicado a una dilución 1/50. Las barras horizontales representan la media de los cinco ratones.

pcDNA3 vacío (Fig. 8.8A). El perfil isotípico mostró un predominio del tipo IgG2a antes del desafío en los ratones inmunizados con pGRA4, un marcador de la repuesta del tipo Th1, mientras que luego del desafío los niveles de IgG2a aumentaron también en los grupos controles (Fig. 8.8 B). Como se observa en la Figura 8.8 C, no se pudieron detectar anticuerpos específicos anti-Gra4 del subtipo IgG1 en los ratones inmunizados con la vacuna de ADN antes o después del desafío, pero sí en los que recibieron rGRA+Alum.

8.7 - Análisis del valor inmunoprotectivo del antígeno recombinante TgPI de *Toxoplasma gondii*

Recientemente se identificó en el laboratorio un inhibidor de serino-proteasas de *T. gondii* llamado TgPI (Pszenny et al, 2000). Debido a que esta proteína mostró ser una proteína de los gránulos densos que es secretada al lumen de la vesícula parasitófora y al medio luego de la lisis de la célula hospedadora, y que además tiene una actividad de elastasa anti-neutrófilo, todo esto sugiere un posible papel en la regulación de la respuesta pro-inflamatoria (Pszenny et al, 2002). A pesar de presentar un menor valor inmunogénico comparado con los antígenos ROP2 y GRA4, durante el seguimiento de una infección oral de ratones (ver capítulo 7), se analizó su valor inmunoprotectivo debido a su sugerido papel durante la infección toxoplásmica. Para esto, se inmunizaron ratones C3H hembras con la rTgPI combinada con aluminio siguiendo un esquema de cuatro inmunizaciones. Dos semanas luego del último refuerzo, los ratones fueron desafiados por vía intraperitoneal con taquizoitos de la cepa virulenta RH y se midió sobrevida con respecto al grupo control que fue inoculado con PBS-Alum. Los resultados preliminares demostraron que tanto los ratones inmunizados con TgPI como con PBS, murieron luego del desafío (Fig. 8.9). Sin embargo, en el caso de los ratones vacunados con rTgPI, se observó un aumento en el tiempo de vida y esta diferencia resultó significativa mediante el test de Mantel-Haenszel ($P < 0,0001$).

Con el objeto de estudiar el valor inmunoprotectivo de este antígeno frente a la infección con una cepa cistogénica de *T. gondii*, un grupo de ratones C3H inmunizado con rTgPI-Alum y su control fueron desafiados con una dosis de 50 quistes de la cepa ME49 (L_D50), y se chequeó la mortalidad diariamente por un período de un mes (Fig.8.10). La inmunización de los ratones con rTgPI indujo un aumento significativo en la sobrevida ($P < 0,05$) que fue del 87,5 % (7 ratones vivos de 8) con respecto al grupo control que fue de 50 % (4 ratones vivos

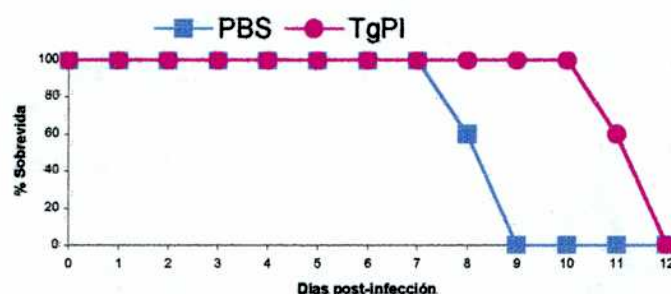


Figura 8.9: Medición de supervivencia de ratones inmunizados con rTgPI o PBS combinados con aluminio (Alum). Diez ratones por grupo de la cepa C3H fueron inmunizados con rTgPI- o PBS-Alum y posteriormente desafiados con una dosis letal de taquizoitos (10^5) de la cepa RH. Los resultados están expresados como porcentaje de ratones sobrevivientes.

de 8). Las cargas parasitarias de los ratones sobrevivientes fueron asignadas luego de un mes de infección. Los ratones inmunizados con rTgPI-Alum mostraron una disminución del 39 % en el número de quistes en cerebro, comparado con el grupo control, y esta diferencia resultó significativa ($P = 0,0182$).

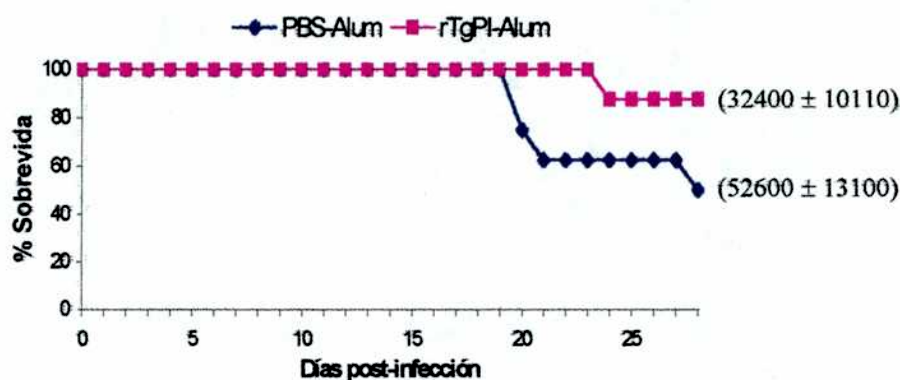


Figura 8.10. Ensayo de protección de ratones C3H frente a la infección con *T. gondii*. Un grupo de ratones fue inmunizado 4 veces por vía i.m. con rTgPI-Alum y otro inmunizado con PBS-Alum fue incluido como control. Los ratones fueron desafiados por vía oral con 50 quistes de la cepa ME49 dos semanas después del último refuerzo y se monitoreó la mortalidad diariamente. En cada grupo se incluyeron 8 ratones. Entre paréntesis se muestra la carga parasitaria en los cerebros de los ratones sobrevivientes luego de un mes de infección. Los resultados están expresados como la media $\pm$ error estándar.

Catorce días luego del último refuerzo, se extrajeron muestras de suero de los animales inmunizados. El análisis de isotipos en los sueros mostró que la inmunización con rTgPI adsorbida a aluminio, induce anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos sin predominio de ninguno en particular (Fig. 8.11).

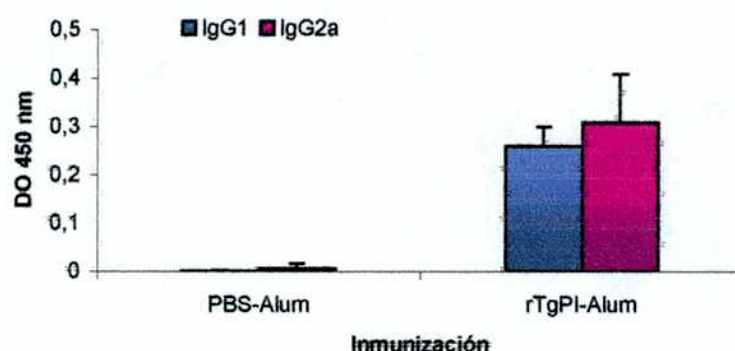


Figura 8.11: Perfil de isotipo de IgG en sueros de ratones inmunizados. Dos semanas luego del último refuerzo, se analizaron los sueros de los ratones inmunizados con rTgPI+Alum o PBS+Alum para la detección de anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos por un ensayo de rTgPI-ELISA. Los resultados están expresados en absorbancia a 450 nm.

DISCUSIÓN PARTE II

9 - Análisis cinético de la respuesta inmune contra antígenos de *Toxoplasma gondii* durante la infección

En el desarrollo de una vacuna contra la toxoplasmosis, el modelo murino ha sido ampliamente usado debido a que cursa un proceso infectivo semejante al del resto de los mamíferos, incluyendo el humano, y a que además existen diferentes niveles de resistencia o susceptibilidad frente a la infección. Asimismo, la respuesta inmune contra el *T. gondii* esta muy bien caracterizada en este modelo, conociéndose que una infección primaria es suficiente para generar inmunidad ante una re-infección (Gazzinelli y col, 1991). Sin embargo, muchos de los antígenos del parásito son propuestos como candidatos a vacunas por mostrar ser antigénicos en el humano, al menos a nivel de respuesta humoral. De los antígenos propuestos en este estudio (rROP2, rGRA4 y rTgPI) como candidatos para diseñar una vacuna multiantigénica, sólo el valor antigénico de una forma recombinante de GRA4 había sido estudiado en el ratón durante la infección toxoplásmica (Chardes y col, 1993). ROP2 en cambio, fue clonado a partir de su capacidad de estimular la proliferación de células humanas CD4⁺ (Saavedra y col, 1991) reconociéndose posteriormente un alto valor en estimular linfocitos B (Martin et al, 1998). TgPI es un antígeno de la fracción excretora/secretora, con función de inhibidor de serin-proteinasas, entre ellas la elastasa, que probablemente cumpla un papel importante durante la infección del parásito.

En el presente estudio, se demuestra que la infección oral de ratones C57BL/6 (H-2^b) y BALB/c (H-2^d) con quistes de la cepa ME49 de *T. gondii*, induce una importante respuesta inmune humoral y celular específica contra los antígenos rROP2 y rGRA4 a nivel de mucosas y sistémico, con algunas variaciones entre ellas dependiendo de la cepa de ratón. Por otro lado, rTgPI induce una pobre respuesta durante la infección. Esto indicaría que tanto ROP2 como GRA4 formarían parte del mosaico antigénico del *T. gondii* que induce inmunidad en los ratones.

En un período de estudio de 8 semanas de infección de ratones C57BL/6 y BALB/c, la respuesta proliferativa en NML frente a la estimulación *in vitro* con TSo se observó solo durante la primera semana como lo describió previamente Chardes y col (1993). Los tres

antígenos mostraron inducir una temprana respuesta blastogénica en células de NML en ambas cepas de ratones. A diferencia de nuestros resultados, Chardes y col (1993) utilizando distintas diluciones de una proteína GRA4 inmuno-purificada y electroeluida, no observaron una proliferación específica en NML de ratones C57BL/6 infectados pero sí en ratones BALB/c. La diferencia con respecto a nuestro estudio podría deberse a la cantidad de proteína utilizada en la estimulación de estas células.

La respuesta humoral sistémica generada contra estos antígenos luego de la infección parece estar relacionada con la cepa de ratón utilizada. En ambas cepas de ratones se generaron anticuerpos IgG anti-rROP2 y anti-rTgPI, mientras que rGRA4 resultó muy poco inmunogénica en la cepa BALB/c. Los anticuerpos generados por rTgPI mostraron una cinética más tardía con respecto a los otros dos antígenos. rGRA4 generó la producción de IgA e IgM más tempranamente comparado con rROP2 y los niveles fueron mayores en ambas cepas de ratones. Estos resultados sugieren que la respuesta humoral generada contra estas proteínas es específica de la cepa de ratón y que la proteína TgPI además de resultar menos inmunogénica que GRA4 y ROP2, se expresaría durante la fase crónica de la infección. Estos datos concuerdan con lo observado en humanos, donde se demostró que la rTgPI presenta una baja reactividad frente a muestras de sueros humanos con infección crónica o aguda (Nigro y col, 2003). Por el contrario, el antígeno rROP2 mostró ser detectado por un 80% de sueros humanos agudos y 54% de crónicos indicando que esta proteína genera una fuerte respuesta humoral durante ambas fases de la infección. En ese mismo estudio, rGRA4 mostró una mayor reactividad en sueros agudos con lo cual, al igual que en nuestro estudio, generaría una fuerte respuesta humoral preferentemente durante la fase aguda de la infección.

En este modelo de infección oral, se investigó la habilidad de estos antígenos de *T. gondii* de estimular la proliferación de esplenocitos durante la octava semana de infección, que es cuando se observó el pico de proliferación frente a la estimulación con TSo. Esta cinética de la respuesta tardía en bazo concuerda con la marcada reducción de la respuesta proliferativa durante la infección aguda debida en parte a citoquinas liberadas por las células inmunes (Channon y Kasper, 1996; Haque y col, 1996; Neyer y col, 1998). Este efecto solo es observado en esplenocitos, ya que las células de los NML no exhiben esta supresión (Neyer y col, 1998, Chardes y col, 1993). Los tres antígenos mostraron inducir *in vitro* una respuesta blastogénica específica en ambas cepas de ratones. En la cepa BALB/c, rROP2, rGRA4 y rTgPI generaron una respuesta similar, mientras que en ratones C57BL/6 las proteínas rGRA4

y rTgPI estimularon una proliferación significativamente mayor a rROP2 y mayor a la obtenida en BALB/c.

La estimulación *in vitro* de esplenocitos con TSo produjo la secreción de IFN- γ e IL-5 en ambas cepas luego de una semana de infección, con mayores niveles en la cepa C57BL/6. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Lee y col (1999), quienes observaron que los esplenocitos producen citoquinas del tipo Th1/Th2 luego de 7 días de infección oral, y que esto podría resultar en un evento controlador sistémico de una respuesta inmune Th1-polarizada hiperactiva (Gazzinelli y col, 1996; Khan y col, 1997). La estimulación *in vitro* con las proteínas rGRA4 y rROP2 indujo una respuesta predominantemente Th1, con altos niveles de IFN- γ en ratones C57BL/6 que resultó varias veces mayor a la observada en BALB/c y bajos niveles de IL-5. En cambio la respuesta inducida *in vitro* por rTgPI fue del tipo Th1 en ratones BALB/c y mixta en C57BL/6 con producción de ambas citoquinas. A diferencia de nuestro estudio, Charles y col (1993) no pudieron detectar IFN- γ luego de la estimulación *in vitro* con las proteínas GRA4 y SAG1 de esplenocitos de ratones CBA/J infectados. Esto puede deberse a que el estudio lo realizaron luego de 6 semanas de infección.

BALB/c es una cepa de ratones conocida por su tendencia a producir una respuesta inmune del tipo Th2, mientras que C57BL/6 tendería a producir una respuesta Th1 (Liesenfeld y col, 1996). La respuesta celular generada en ambas cepas de ratones fue del tipo Th1, tanto a nivel de mucosas como a nivel sistémico. Sin embargo, hubo notables diferencias en los niveles de producción de IFN- γ , citoquina relacionada a una respuesta Th1, siendo notablemente más alta en C57BL/6 que en BALB/c. Al mismo tiempo, la cepa BALB/c resulta resistente a infecciones con altas dosis de parásitos de cepas no virulentas como la ME49 presentando baja carga de quistes en tejidos, mientras que C57BL/6 resulta susceptible a bajas dosis con presencia de altas cargas de quistes tisulares (McLeod y col, 1989, Liesenfeld y col, 1996). Probablemente, a las 6 semanas (infección crónica), la baja carga parasitaria de *T. gondii* en BALB/c esté contribuyendo a mantener los niveles de citoquinas bajos, ocurriendo lo contrario en C57BL/6.

10 – Análisis inmunoprolifáctico de antígenos del *Toxoplasma gondii* en el modelo murino

Con el objetivo de desarrollar una vacuna multiantigénica contra la toxoplasmosis, nosotros hemos utilizado tres proteínas del *T. gondii* para estudiar el valor inmunoproláctico cuando se las combinó con aluminio como fue previamente realizado con rSAG1 (Petersen y col., 1998). Las proteínas rROP2 y rGRA4 fueron elegidas en este trabajo en base a estudios inmunológicos y de inmunización previos (Chardes y col, 1990; 1993; Mevelec y col, 1998; Alexander y col, 1996; Nigro y col, 2001; Saavedra y col, 1991; 1996; Van Gelder y col, 1993). En el curso del trabajo de Tesis aparecieron algunos trabajos relacionados a la inmunización génica con ROP2 y GRA4 (Vercammen y col, 2000; Desolme y col, 2000). La proteína rTgPI fue incluida principalmente por su posible papel de interferir durante el desarrollo de la infección, más que por su papel en la inducción de una respuesta inmune a nivel humoral y celular generada en ratones infectados, la cual mostró bajos niveles. Las proteínas rROP2 y rGRA4 indujeron una respuesta inmune específica en ratones de las cepas C57BL/6 (H-2^b) y C3H (H-2^k), mientras rTgPI, que solo fue analizada en ratones C3H, estimuló al menos una respuesta humoral. La combinación de rGRA4 con aluminio confirió protección frente a la infección en ambas cepas de ratones, mientras que rROP2 resultó protectora sólo en C3H. Los resultados con rTgPI mostraron una inmunidad protectora en ratones C3H. Interesantemente, rGRA4+alum mostró niveles similares de protección que la vacunación con el gen *gra4* en ratones C3H.

Para la toxoplasmosis, hay distintos modelos murinos y de infección parasitaria para ensayar el valor protector de una proteína y/o adyuvante. Por esta razón, es muy difícil comparar nuestros resultados con aquellos obtenidos por otros investigadores. La inmunización con el gen *sag1* mostró una reducción en el número de quistes cerebrales en ratones C57BL/6 (Angus y col, 2000; Mohamed y col, 2003) luego de un desafío no letal. En cambio frente a un desafío letal, los resultados fueron variables. Por un lado se observó una protección completa frente a la cepa ME49 de *T. gondii* mientras que no se observó protección frente a la cepa altamente virulenta RH (Angus y col, 2000). Pero en otro estudio este mismo gen confirió una completa protección contra RH en ratones C3H y BALB/c (Nielsen y col, 1999). Todos estos estudios demuestran la complejidad de estudiar el valor inmunoproláctico de los antígenos de *T. gondii*.

Con respecto al antígeno ROP2, Vercammen y col (2000) demostraron que la inmunización con los genes *rop2*, *gal* y *gra7* induce una protección en ratones C3H frente a un desafío letal, pero no protege a ratones BALB/c ni C57BL/6, resaltando la importancia de

usar distintas cepas de ratones en el análisis de una vacuna contra la toxoplasmosis. Similarmente, en nuestro estudio la inmunización con rROP2+alum indujo una respuesta protectora en ratones C3H pero no en C57BL/6.

Respecto a GRA4, Desolme y col (2000) observaron que la vacunación con el gen *gra4* induce una inmunidad protectora en ratones C57BL/6 contra un desafío letal con quistes. En nuestro estudio con ratones C3H se observó una protección parcial contra un desafío no letal. Por otro lado, también observamos que la inmunización con rGRA4+alum de ratones C57BL/6 y C3H indujo una protección parcial frente a un desafío no letal, al igual que Mevelec y col (1998) cuando vacunaron ratones C57BL/6 por vía oral con una rGRA4 combinada con toxina del cólera.

La inmunización con una mezcla de rROP2 y rGRA4, resultó en un aumento significativo de la protección frente a un desafío no letal comparado con el control en ambas cepas de ratones, aunque en ningún caso los niveles de protección mejoraron significativamente con respecto a los inducidos por los antígenos por separado. En base al análisis usando la proteína Hsp83 de *Leishmania infantum*, en el cual una fusión a un antígeno reportero pero no la mezcla de ambas proteínas recombinantes induce un aumento en la respuesta inmune contra el antígeno reportero (Rico y col, 1999; Echeverría y col, 2001), se ensayó una fusión rROP2-rGRA4. Cuando esta proteína quimérica se probó en ratones C57BL/6, se obtuvo una inmunidad protectora comparada con el control, pero esta protección no fue mayor a la observada con el antígeno rGRA4 solo.

La respuesta inmunoprotectiva en los ratones C57BL/6 inducida por rGRA4 parecería correlacionarse con una respuesta predominante del tipo Th1 comparado con lo observado para rROP2. De hecho, mientras que la inmunización de ratones con rGRA4 indujo mayores niveles específicos de anticuerpos IgG2a y de IFN- γ comparado con rROP2, este último antígeno indujo mayores niveles de IL-4, citoquina relacionada con una respuesta del tipo Th2. Estos resultados concuerdan con el estudio de Vercammen y col (2000), quienes mostraron una baja producción de anticuerpos anti-ROP2 y de IFN- γ en ratones C57BL/6 inmunizados con pcDNA3-ROP2 comparado con los valores obtenidos en ratones BALB/c y C3H.

Sin embargo, debe haber otras posibles explicaciones para la inducción de la protección no basadas en la respuesta Th1 generada, por lo observado en la cepa C3H. Recientemente, se ha demostrado la contribución de las células B a la protección contra la infección con el

parásito (Johnson y col, 2002; Kang y col, 2000; Sayles y col, 2000). El aluminio también ha mostrado incrementar la expresión de MHC II y de moléculas de adhesión co-estimuladoras (ICAM-1, LFA-3 y CD40) asociadas a células dendríticas (DC) maduras (Ulanove y col, 2001). Adicionalmente, la estimulación de células monocíticas de sangre periférica con aluminio, indujo un aumento en la expresión de mRNA de IL-1 α , IL-1 β y TNF, así como de IL-4 e IL-6 (Ulanove y col, 2001). Dimier-Poisson y col (2003) demostraron que las DCs de nódulos mesentéricos pulsadas *ex vivo* con antígenos de *T. gondii* llevan a una secreción de citoquinas con un patrón Th2, induciendo una fuerte protección en ratones C57BL/6 y CBA/J, mientras que las DCs de bazo inducen un patrón de citoquinas Th1, también induciendo protección pero en menor grado. Parecería que una presentación antigénica más eficiente debida al efecto inmunoestimulador del aluminio, podría ser un factor importante en conferir inmunidad, permitiendo tal vez al hospedador inducir un disparo más rápido de la producción de IFN- γ luego de la infección.

Los adyuvantes son un componente esencial en el desarrollo de una vacuna, debido al efecto inmunoestimulador y/o al posible uso en animales y humanos. Las vacunas de ADN han mostrado inducir una respuesta Th1 predominante (Tighe y col, 1998), adecuada para los requerimientos en generar inmunidad contra la toxoplasmosis. De hecho, muchos estudios de vacunación sistémica con ADN fueron realizados en ratones (ver Bout y col, 2002). Sin embargo, estas vacunas demostraron no ser muy inmunogénicas en humanos (Scheerlinck y col, 2001). Por el contrario, los compuestos de aluminio han sido usados como adyuvantes en vacunas para humanos por más de 70 años, y están asociados a una inducción de respuestas del tipo Th2 (Grun y col, 1989). A pesar de esto, una rSAG1 combinada con aluminio (Petersen y col, 1998) y en nuestro estudio rGRA4, rROP2 y rTgPI, mostraron inducir una inmunidad parcial contra la infección de ratones con *T. gondii*. Interesantemente, rGRA4 combinada con aluminio presentó valores de protección similares a la inmunización génica con *gra4*.

También recientemente se demostró que 22 mujeres con exposición documentada a *T. gondii*, mostraron una respuesta estimuladora celular heterogénea contra los antígenos GRA1, GRA6, GRA7 y SAG1 (Fatoohi y col, 2002). Estos resultados, junto con el hecho de que un único antígeno excepcionalmente ha logrado conferir una inmunidad completa contra la infección, sugieren la necesidad de desarrollar una vacuna multiantigénica contra la toxoplasmosis. Nuestros resultados y los obtenidos por Petersen y col (1998) demuestran que

rGRA4, rROP2, rSAG1 y rTgPI combinados con aluminio producen inmunidad en al menos una cepa de ratón, y la mezcla de las proteínas no mostró interferencias en la respuesta sino más bien complementariedad (rGRA4 predominó en la inmunidad en C57BL/6 y rROP2 en C3H). Restaría ver si la mezcla con otros antígenos como rSAG1 y/o rTgPI mejora la protección conferida por los antígenos individuales. Recientemente, Fachado y col. (2003) demostraron que la inmunización con la mezcla de los genes *sag1* y *rop2* produce una mayor protección que la inmunización con los genes por separado. Asimismo se demostró para esos antígenos (este trabajo y Petersen y col. 1998) que podrían ser componentes de una vacuna basada en aluminio como adyuvante, con la ventaja de que este compuesto permitiría una amplia aplicación tanto en humanos como en animales. En el futuro, se debería tener en cuenta la combinación con otros antígenos con una buena eficacia en generar inmunidad usando diferentes estrategias (Mishima y col, 2001; Mohamed y col, 2003; Parmley y col, 2002; Vercammen y col, 2000). Finalmente, del presente trabajo en donde rGra4 demostró inducir inmunidad en dos modelos de ratones diferentes y en dos sistemas de inmunización distintos, y de los resultados obtenidos por Mevelec y col (1998) y Desolme y col (2000), se desprende que GRA4 podría considerarse como uno de los principales candidatos entre los antígenos de *T. gondii* para el desarrollo de una vacuna multiantigénica.

CONCLUSIONES

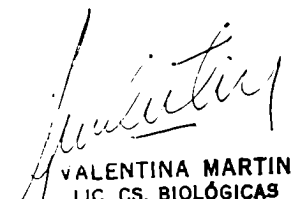
CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis, se llegó a las siguientes conclusiones:

- La ileitis inflamatoria aguda observada en ratones susceptibles de la cepa C57BL/6 por la infección oral con quistes de *Toxoplasma gondii*, estaría controlada en parte por TGF- β expresado por linfocitos intraepiteliales intestinales.
- Las células epiteliales intestinales de la línea IC_{CL2} (H-2^b) liberan quemoquinas inflamatorias frente a la infección con el parásito *in vitro* lo cual puede ser el primer evento inmunológico en el desarrollo de la inflamación observada en los ratones C57BL/6. Los IELs antígeno-primados, a diferencia de los no primados reducen la expresión de estas quemoquinas en los enterocitos IC_{CL2} infectados, efecto estaría mediado principalmente por TGF- β y en menor medida por IL-10.
- Los IELs (principalmente los CD8 $\alpha\beta$ TCR $\alpha\beta$) primados con antígeno migran dentro de la monocapa de células IC_{CL2} infectadas en un modelo de co-cultivo *in vitro*, al igual que la migración observada *in vivo* luego de una transferencia adoptiva bajo condiciones inflamatorias.
- El antígeno de membrana SAG-1 sería una molécula importante involucrada en la iniciación de la respuesta inmune en el intestino.
- La infección con *T. gondii in vitro* activa las células MODE-K (H-2^k), aumentando la expresión de varias moléculas de superficie que incluyen MHC clase I y II, CD-40 e IFN- γ R.
- Las células MODE-K infectadas expresan *in vitro* quemoquinas de la subfamilia β y citoquinas del tipo 1, las cuales jugarían un rol crítico en la iniciación y modulación de la respuesta inmune.

- A diferencia del patrón de expresión, la cinética de las quemoquinas en las células MODE-K resulta específica del parásito utilizado, mientras que el nivel de citoquinas inflamatorias del tipo 1 resultó cepa-específico.
- Los IELs aislados de ratones CBA/J (H-2^k) producen un nivel mayor de ciertas quemoquinas, especialmente reclutadoras de células T CD8+, comparado con los aislados de ratones C57BL/6 (H-2^b).
- Los IELs aislados de ratones CBA/J infectados o naïve inducen una inhibición en la expresión de quemoquinas en células MODE-K infectadas y esto podría deberse a una mayor producción endógena de TGF-β en estos ratones, con lo cual esta citoquina sería en parte responsable de la resistencia a la ileitis.
- La infección oral de ratones C57BL/6 (H-2^b) y BALB/c (H-2^d) con quistes de la cepa ME49 de *T. gondii* induce una respuesta específica del tipo Th1 contra los antígenos rROP2, rGRA4 y rTgPI tanto a nivel de mucosas como sistémica.
- Las proteínas ROP2 y GRA4 generan una respuesta humoral y celular del tipo Th1 con altos niveles de IFN-γ que resulta mayor en la cepa C57BL/6.
- La proteína TgPI muestra una pobre inmunogenicidad en comparación a ROP2 y GRA4.
- La inmunización con la proteína rGRA4 combinada con aluminio confiere una protección parcial frente a la infección en ratones de las cepas C57BL/6 (H-2^b) y C3H (H-2^k), que en el caso de ratones C3H resulta similar a la vacunación con el gen *gra4*. Este antígeno podría considerarse como uno de los principales candidatos entre los antígenos de *T. gondii* para el desarrollo de una vacuna multiantigénica.
- rROP2 combinada con aluminio resultó protectora sólo en la cepa C3H.

- La inmunización con una mezcla de rROP2 y rGRA4 como con la proteína quimérica rROP2-rGRA4, indujo una protección parcial frente a la infección pero los niveles fueron similares a los observados por la inmunización simple (rGRA4 en C57BL/6 y rROP2 en C3H).
- Los resultados utilizando la proteína rTgPI combinada con aluminio, mostraron una inmunidad protectora en ratones C3H y la estimulación de una respuesta humoral.



VALENTINA MARTIN
LIC. CS. BIOLÓGICAS
F.C.E.N. - UBA



SERGIO O. ANGEL
Doctor en Ciencias Biológicas
Universidad de Buenos Aires

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS

- **Abreu-Martin MT and Targan SR** (1996) Regulation of immune responses of the intestinal mucosa. *Critical Review in Immunology*. 16:277-309
- **Achbarou A, Mercereau-Puijalon O, Autherman JM, Fortier B, Camus D and Dubremetz JF.** (1991) Characterization of microneme proteins of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 47:223-234
- **Agace WW, Roberts AI, Wu L, Greineder C, Ebert EC, Parker CM.** (2000) Human intestinal lamina propria and intraepithelial lymphocytes express receptors specific for chemokines induced by inflammation. *Eur J Immunol*;30:819-826.
- **Alexander J, Jebbari H, Bluethmann H, Satoskar A, Roberts CW.** (1996) Immunological control of *Toxoplasma gondii* vaccine design. *Curr Top Microbiol Immunol*;219:183-195
- **Aliberti J et al.** (2000) CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8a+ dendritic cells. *Nat. Immunol.* 1: 83-87
- **Aliberti J, Hieny S, Reis e Sousa C, Serhan CN and Sher A** (2002) Lipoxin-mediated inhibition of IL-12 production by DCs: a mechanism for regulation of microbial immunity. *Nature Immunol.* 3:76-82
- **Aliberti J, Valenzuela J, Carruthers VB, Hieny S, Andersen J, Charest H, Reis de Sousa C, Fairlamb A, Ribeiro JM and Sher A** (2003) Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. *Nat. Immunol.* 4:485-490
- **Amichay D, Gazzinelli RT, Karupiah G, Moench TR, Sher A, Farber JM.** (1996) Genes for chemokines MIP-1 and MIP-2 are induced in protozoan and viral infections in response to IFN- γ with patterns of tissue expression that suggest nonredundant roles in vivo. *J Immunol.* 157:4511-4520.
- **Anderson SE, Bautista SC and Remington** (1976) Specific antibody-dependent killing of *Toxoplasma gondii* by normal macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 26:375
- **Angus CW, Klivington-Evans D, Dubey JP and Kovacs JA** (2000) Immunization with a DNA plasmid encoding the SAG1 (P30) protein of *Toxoplasma gondii* is immunogenic and protective in rodents. *J. Infect. Dis.* 181:317-324.
- **Araujo FG, Huskinson-Mark J, Gutteridge WE and Remington JS** (1992) In vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone 566C80 against the cyst form of *Toxoplasma gondii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 36:326-330
- **Ashburn D** (1992) History and general epidemiology. In *Human Toxoplasmosis*, Eds D. O. Ho-Hen y W.L. Joss, Oxford University Press, New York.
- **Assai T, O'Sullivan WJ and Tatibana M** (1983) A potent nucleoside triphosphate hydrolase from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 258:6818-6822
- **Baszler TV, Long MT, McElwain TF, Mathison BA.** (1999) Interferon- γ and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. *Int J Parasitol*; 29:1635-46.
- **Beckers C. J. M., J. F. Dubremetz, O. Mercereau-Puijalon, and K. A. Joiner.** (1994) The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. *J. Cell Biol.* 127:947-961.
- **Beckers C. J. M., T. Wakefield, and K. A. Joiner.** (1997). The expression of *Toxoplasma* proteins in *Neospora caninum* and the identification of a gene encoding a novel rhoptry protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* 89:209-223.

- **Bens, M., Bogdanova, A., Cluzeaud, F., Miquerol, L., Kerneis, S., Kraehenbuhl, J. P., Kahn, A., Pringault, E., and Vandewalle, A.** (1996). Transimmortalized mouse intestinal cells (m-ICc12) that maintain a crypt phenotype. *Am J Physiol.* 270:C1666
- **Biron CA, and Gazzinelli RT** (1995) Effects of IL-12 on immune responses to microbial infection: a key mediator in regulating disease outcome. *Curr. Opin Immunol.* 7:485-496
- **Bjerkas I, Jenkins MC and Dubey JP** (1994) Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoites antigens useful for diagnosis of neosporosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1:214
- **Black MW and Boothroyd** (2000) Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol. Mol. Biol. Reviews.* 64:607
- **Bohne W, Heesemann and Gross U.** (1993). Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon-treated mouse macrophages. *Infect. Immun.* 61:1141-1145
- **Bohne W. et al** (1994) Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: A possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. *Infect. Immun.* 62:1761-1767
- **Bohne W. et al** (1995) Cloning and characterization of a bradyzoite-specifically expressed gene (hsp30/bag1) of *Toxoplasma gondii*, related to genes encoding small heat-shock proteins of plants. *Mol. Microbiol.* 16:1221-1230
- **Boismenu R, Feng L, Xia Y, Chang J and Havran W** (1996) Chemokine expression by intraepithelial $\gamma\delta$ cells: Implications for the recruitment of inflammatory cells to damaged epithelia. *J. Immunol.* 157:385
- **Bonenfant C, Dimier-Poisson I, Velge-Roussel F, Buzoni-Gatel D, Del Giudice G, Rappuoli R and Bout D** (2001) Intranasal immunization with SAG1 nontoxic mutant heat labile enterotoxins protects mice against *Toxoplasma gondii*, *Infect. Immune.* 69:1605-1612.
- **Boothroyd JC, Hehl A, Knoll LJ, Manger ID.** (1998). The surface of *Toxoplasma gondii*: more and less. *Int. J. Parasitol.* 28, 3-9
- **Bourguin I, Chardes T and Bout D** (1993) Oral immunization with *Toxoplasma gondii* antigens in association with cholera toxin induces enhanced protective and cell mediated immunity in C57BL/6 mice, *Infect. Immun.* 61:2082-2088.
- **Bout, D. T., M. -N. Mévélec, F. Velge-Roussel, I. Dimier-Poisson, M. Lebrun.** (2002) Prospects for a human *Toxoplasma* vaccine. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* 2:227-234
- **Brecht S, Carruthers VB, Ferguson DJ, Giddings OK, Wang G, Jaquéle U, Harper JM, Sibley LD and Soldati D** (2001) The *Toxoplasma* protein MIC4 is an adhesin composed of six conserved apple domains. *J. Biol. Chem.* 276:4119-4127
- **Brown CR and McLeod** (1990) Class I MHC genes and CD8+ T cells determine cyst number in *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol.* 145:3438
- **Brown CR, Hunter CA, Estes RG, Beckman E, Forman J, David C, Remington JS and McLeod R** (1995) Definitive identification of a gene that confers resistance against *Toxoplasma* cyst burden and encephalitis. *Immunology.* 85:419
- **Brydges SD, Sherman GD, Noxkemann S, Loyens A, Daubener W, Dubremetz JF and Carruthers VB** (2000) Molecular characterization of TgMIC5, a proteolytically processed antigen secreted from the micronemes of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111:51-66

- **Bulow R and Boothroyd JC** (1991) Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with P30 antigen in liposomes, *J. Immunol.* 147:3496–3500.
- **Burg J. L., D. Perelman, L. H. Kasper, P. L. Ware, and J. C. Boothroyd** (1988). Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 141:3584–3591.
- **Burg JL, Grover CM, Pulety P and Boothroyd JC** (1989) Direct and selective detection of a pathogenetic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27:1787-1792
- **Butcher BA, Kim L, Johnson PF and Denkers EY** (2001) *Toxoplasma gondii* tachyzoites inhibit proinflammatory cytokine induction in infected macrophages by preventing nuclear translocation of the transcription factor NF- κ B. *J. Immunol.* 167:2193-2201
- **Buxton D, Thomson K, Maley S, Wright S, and Bos HJ** (1991) Vaccination of sheep with a live incomplete strain (S48) of *Toxoplasma gondii* and their immunity to challenge when pregnant. *Vet. Rec.* 129:89–93.
- **Buxton, D** (1998) Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis spp.*) in sheep and goats: recent advances. *Vet. Res.* 29:289–310.
- **Buzoni-Gatel D, Lepage AC, Dimier-Poisson IH, Bout DT and Kasper LH** (1997) Adoptive transfer of gut intraepithelial lymphocytes protects against murine infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 158:5883-5889
- **Buzoni-Gatel, D., Debbabi, H., Moretto, M., Dimier-Poisson, I. H., Lepage, A. C., Bout, D. T., and Kasper, L. H.** (1999) Intraepithelial lymphocytes traffic to the intestine and enhance resistance to *Toxoplasma gondii* oral infection. *Journal of Immunology* 162:5846.
- **Candolfi E, Hunter CA and Remington JS** (1995) Roles of gamma interferon and other cytokines in suppression of the spleen cell proliferative response to ConA and *Toxoplasma* antigen during acute toxoplasmosis. *Infect. Immun.* 63:751
- **Candolfi E, Hunter CA, and Remington JS** (1994) Mitogen- and antigen-specific proliferation of T cells in murine toxoplasmosis is inhibited by reactive nitrogen intermediates. *Infect. Immun.* 62:1995-2001
- **Carey K. L., C. G. Donahue, and G. E. Ward** (2000) Identification and molecular characterization of GRA8, a novel, proline-rich, dense granule protein of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol* 105:25–37.
- **Carroff B, Levacher-Clergeot M, Chau F, Pocidalo JJ and Derouin F** (1994) *Toxoplasma gondii*: kinetics of lymphocyte subsets in blood and spleen of perorally infected mice. *Exper Parasitol.* 78:410
- **Carruthers VB and Sibley LD** (1997) Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur. J. Cell. Biol.* 73:114-123
- **Carruthers VB, Giddings OK and Sibley LD** (1999) Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cells. *Cell. Microbiol.* 1:225-235
- **Carter AO, Frank JW** (1986) Congenital toxoplasmosis: Epidemiologic features and control. *Can Med. Assoc. J.* 135:618-623
- **Casciotti L, Ely KH, Williams ME and Khan IA** (2002) CD8 $^{+}$ -T-Cell immunity against *Toxoplasma gondii* can be induced but not maintained in mice lacking conventional CD4 $^{+}$ T cells. *Infect. Immun.* 70(2):434-443

- **Casola A, Estes MK, Crawford SE, Pearay LO, Ernst PB, Garofalo RP and Crowe SE** (1998) Rotavirus infection of cultured intestinal epithelial cells induces secretion of CXC and CC chemokines. *Gastroenterology*, 114:947-955
- **Cazenave J, Forestier F, Vessieres MH et al.** (1992) Contribution of a new PCR assay to the prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Prenat Diagn.* 12:119-127
- **Channon J, Miselis K, Minns L, Dutta C and Kasper L** (2002) *Toxoplasma gondii* Induces Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Secretion by Human Fibroblasts: Implications for Neutrophil Apoptosis. *I and Immun*; 70:6048
- **Channon JY and Kasper** (1996) *Toxoplasma gondii* induced suppression by human peripheral blood monocytes: role of gamma interferon. *Inf. Immun.* 64:1181
- **Chardes HR, Buxoni-Gatel D, Lepage A, Bernard F and Bout D** (1994) *Toxoplasma gondii* oral infection induces specific cytotoxic CD8 α /b+ Thy-1+ gut intraepithelial lymphocytes, lytic for parasite-infected enterocytes. *J. Immuno.* 153:4596-4603
- **Chardes T, Bourguin I, Mevelec MN, Dubremetz JF and Bout D** (1990) Antibody responses to *Toxoplasma gondii* in sera, intestinal secretions, and milk from orally infected mice and characterization of target antigens. *Infect. Immun.* 58:1240-1246
- **Chardes T, Buzoni-Gatel D, Lepage A, Bernard F, and Bout D.** (1994) *Toxoplasma gondii* oral infection induces specific cytotoxic CD8 α /b+ Thy-1+ gut intraepithelial lymphocytes, lytic for parasite-infected enterocytes. *J. Immunol.* 153:4596
- **Chardes T, Velge-Roussel F, Mevelec P, mevelec MN, Buzoni-Gatel D and Bout D** (1993) Mucosal and systemic cellular immune responses induced by *Toxoplasma gondii* antigens in cyst orally infected mice. *Immunology.* 78:421-429
- **Chen H, Chen G, Zheng H, Guo H.** (2003) Induction of immune responses in mice by vaccination with Liposome-entrapped DNA complexes encoding *Toxoplasma gondii* SAG1 and ROP1 genes. *Chin Med J (Engl)*; 116:1561
- **Ciacchi C, Mahida YR, Digmass A, Koizumi M and Podolsky, DK** (1993) Functional interleukin-2 receptors on intestinal epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 92:527
- **Curiel TJ, Krug EC, Purner MB, Pignard P and Berens RL** (1993) Cloned human CD4+ cytotoxic T lymphocytes specific for *Toxoplasma gondii* lyse tachyzoite-infected target cells. *J. Immunol.* 151:2024-2031
- **D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante N, Ma X, Kunbin M and Trinchieri G** (1993) Interleukin 10 inhibits human lymphocyte interferon-g production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J. Exp. Med.* 178:1041-1048
- **Debard N, Buzoni D and Bout D** (1996) Intranasal immunization with SAG1 protein of *Toxoplasma gondii* in association with cholera toxin dramatically reduces development of cerebral cysts after oral infection, *Infect. Immun*; 64:2158-2166.
- **Deckert-Schluter M, Bluethmann H, Rang A, Hof H and Schluter D** (1998) Crucial role of TNF receptor type 2 (p75), in murine toxoplasmosis. *J. Immunol.* 160:3427-36
- **Decoster A, Darcy F, Caron A, Vinatier D, Houze de l'Aulnoit D and Capron A** (1992) Anti-P30 IgA antibodies as prenatal markers of congenital *Toxoplasma* infection. *Clin. Exp. Immunol.* 87:310-315
- **Denkers EY, Caspar P and Sher A** (1994) *Toxoplasma gondii* possesses a superantigen activity that selectively expands murine T cell receptor Vb5-bearing CD8+ lymphocytes. *J. Exp. Med.* 180:985-995

- Denkers EY, Del Rio L and Bennouna S (2003) Neutrophil production of IL-12 and other cytokines during microbial infection. *Chem Immunol Allergy, Review*; 83:95-114
- Denkers EY, Gazzinelli RT, Hieny S, Caspar P and Sher A (1993) Bone marrow macrophages process exogenous *Toxoplasma gondii* peptides for recognition by parasite-specific cytolytic T lymphocytes. *J. Immunol.* 150:517-526
- Denkers EY, Scharton-Kersten T, Barbieri S, Caspar P and Sher A (1996) A role for CD4+NK1.1+ T lymphocytes as MHC class II independent helper cells in the generation of CD8+ effector function against intracellular infection. *J. Exp. Med.* 184:131-139
- Denkers EY, Yap G, Scharton-Kersten T, Charest H, Butcher B, Caspar P, Heiny S and Sher A (1997) Perforin-mediated cytolysis plays a limited role in host resistance to *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 159:1903-1908
- Denney CF, Eckman L and Reed S (1999) Chemokine secretion of human cells in response to *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun.* 67:1547-1552
- Denton H. *et al* (1996) Enzymes of energy metabolism in the bradyzoites and tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 137:103-108
- Desmont G, Courvreur J. (1974) Congenital toxoplasmosis: a prospective study of 378 pregnancies. *N. Engl. J. Med.* 290:1110-1116
- Desolme B, Mevelec MN, Buzoni-Gatel D and Bout D (2000) Induction of protective immunity against toxoplasmosis in mice by DNA immunization with a plasmid encoding *Toxoplasma gondii* GRA4 gene, *Vaccine*; 18:2512-2521.
- Dietz HH, Henriksen P, Bille-Hansen V, Henriksen SA. (1997) Toxoplasmosis in a colony of New World monkeys. *Vet Parasitol*;68:299-304.
- Dimier-Poisson, I., F. Aline, M. -N. Mévélec, C. Beauvillain, D. Buzoni-Gatel, and D. Bout. (2003) Protective mucosal Th2 immune response against *Toxoplasma gondii* by murine mesenteric lymph node dendritic cells. *Infect. Immun*; 71:5254-5264.
- Ding A, Nathan CF, Graycar J, Derynck R, Stuehr DJ, Srinivas S. (1990) Macrophage deactivating factor and transforming growth factor beta 1 -beta 2 and -beta 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN-gamma. *J Immunol.* 145:940-944.
- Dobbin A, Smith NC and Jonson AM. (2002) Heat shock protein 70 is a potential virulence factor in murine *Toxoplasma* infection via immunomodulation of host NF-kB and nitric oxide. *J. Immunol.* 169:958-965
- Dobrowolski, J. M., and L. D. Sibley (1996) *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell.* 84:933-939.
- Donahue CG, Carruthers VB, Gilk SD and Ward GE (2000) The *Toxoplasma* homolog of plasmodium apical membrane antigen-1 (AMA-1) is a microneme protein secreted in response to elevated intracellular calcium levels. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111:15-30
- Drapier J, Wietzerbin J and Hibbs J (1988). Interferon-g and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.* 18:1587
- Dubey JP (1977) *Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia, Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of man and animals, p 101-237. In JP Kreier (ed.), *Parasitic protozoa*, 3rd ed. Academic Press, Inc., New York, NY
- Dubey JP (1988) Long term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T. gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. *Am. J. Vet. Res.*; 49:910

- **Dubey JP** (1993) *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of humans and animals, p. 1-158. In JP Kreier (ed) Parasitic protozoa, vol. 6. Academic Press, Inc. New York, NY
- **Dubey JP** (1998) Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. *Vet Parasitol*;74:75-77.
- **Dubey JP** (1998). Advances in the life cycle of *Toxoplasma*. *Int. J. Parasitol.* 28:1019-1024.
- **Dubey JP** (2000) The scientific basis for prevention of *Toxoplasma gondii* infection: studies on tissue cyst survival, risk factors and hygiene measures, p. 271-275 In P. Ambroise-Thomas and E. Petersen (ed.), Congenital toxoplasmosis: scientific background, clinical management and control. Springer-Verlag, Paris, France
- **Dubey JP and Beattie CP** (1988). Toxoplasmosis of animals and man. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- **Dubey JP, and Frenkel JK.** (1972). Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J. Protozool.* 19:155-177.
- **Dubey JP, Lindsay DS, and Speer CA.** (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:267-299.
- **Dubey J P, Speer CA, and Fayer R.** (1989) Sarcocystosis of animals and man. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla
- **Dunn D, Wallon M, Peyron F et al** (1999) Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: Risk estimates for clinical counseling. *Lancet.* 353:1829-1833
- **Dzierszinski F, Mortuaire M, Cesbron-Delauw MF, Tomavo S** (2000) Targeted disruption of the glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigen SAG3 gene in *Toxoplasma gondii* decreases host cell adhesion and drastically reduces virulence in mice. *Mol. Microbiol.* 37:574-82
- **Ebert, E. C.** (1995) Human intestinal intraepithelial lymphocytes have potent chemotactic activity. *Gastroenterology* 109:1154.
- **Echeverria P, Dran G, Pereda G, et al.** (2001) Analysis of the adjuvant effect of recombinant *Leishmania infantum* Hsp83 protein as a tool for vaccination. *Immunol Lett*;76:107-10.
- **Eckman L, Reed SL, Smith JR and Kagnoff MF** (1995) *Entamoeba histolytica* trophozoites induce an inflammatory cytokine response by cultured human cells through the paracrine of cytolytically released interleukin 1a. *J. Clin. Investig.* 96:1269-1279.
- **Eckmann L, Jung HC, Schurer-Maly C, Panja A, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF.** (1993) Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8 [comment]. *Gastroenterology.* 105:1689-1697.
- **Eckmann, L., Kagnoff, M. F., and Fierer, J.** (1993) Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect. Immun.* 61:4569.
- **Elson CO, Ealting W and Iefkowitz J** (1984) A lavage technique allowing repeated measurement of IgA antibody in mouse intestinal secretion. *J. Immunol. Methods.*; 67:101
- **Fachado A, Rodriguez A, Angel SO, Pinto DC, Vila I, Acosta A, Amendoeira RR and Lannes-Vieira J.** (2003) Protective effect of a naked DNA vaccine cocktail against lethal toxoplasmosis in mice. *Vaccine*; 21:1327
- **Fagard R, Van Tan H, Creuzet C and Pelloux H.** (1999) Differential development of *Toxoplasma gondii* in neural cells. *Parasitol. Today* 15:504-507

- **Fatoohi, A. F., G. J. N. Cozon, T. Greenland, J. Ferrandiz, J. Bievenu, S. Picot, and F. Peyron.** (2002). Cellular immune responses to recombinant antigens in pregnant women chronically infected with *Toxoplasma gondii*. Clin. Diagn. Lab. Immunol; 9:704-707
- **Ferguson D. J. P., Hutchison, W. M., and Siim, J. C.** (1975). The ultrastructural development of the macrogamete and formation of the oocyst wall of *Toxoplasma gondii*. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B. 83:491-505.
- **Ferguson DJP and Hutchison WM** (1987) An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. Parasitol. Res. 73:483-491
- **Fermin Z, Bout D, Ricciardi-Castagnoli P and Hoebeke J** (1999) Salbutamol as an adjuvant for nasal vaccination, Vaccine; 17:1936-1941.
- **Fierer J, Eckmann L, Kagnoff M.** (1993) IL-8 secreted by epithelial cells invaded by bacteria. Infect Agents Dis. 2:255-258.
- **Filmus J, Zhao J and Buick RN** (1992) Overexpression of H-ras oncogene infuces resistance to the growth-inhibitory action of transforming growth factor beta-1 (TGF-b1) and alters the number and type of TGF-b1 receptors in rat intestinal epithelial cell clones. Oncogene. 7:521
- **Finlay BB and Falkow S** (1988) Comparison of the invasion strategies used by *Salmonella choleraesuis*, *Shigella flexneri* and *Yersinia enterocolitica* to enter cultured animal cells: endosome acidification is not required for bacterial invasion or intracellular replication. Biochimie. 70:1089-1099
- **Foulon W, Pinon JM, Stray-Pedersen B et al.** (1999) Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: A multicenter evaluation of different diagnostic parameters. Am. J. Obstet Gynecol. 181:843-847
- **Foulon W, Villena I, Stray-Pedersen B et al.** (1999) Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: A multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. Am J Obstet Gynecol. 180:410-415
- **Fourmaux MN, Garcia-Reguet N, Mercereau-Puijalon O and Dubremetz JF.** (1996b) *Toxoplasma gondii* microneme proteins: gene cloning and possible function. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 219:55-58
- **Frasch, S, Nick J, Fadok V, Bratton D, Worthen G and Henson P** (1998) p38 mitogen-activated protein kinase-dependent and independent intracellular signal transduction pathways leading to apoptosis in human neutrophils. J. Biol. Chem. 273:8389-8397.
- **Frenkel J.K., J.P. Dubey and N.L. Miller.** (1970) *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. Science. 167:893-896.
- **Frenkel JK** (1967) Adoptive immunity to intracellular infection. J. Immunol. 98:1309-1319
- **Frenkel JK and Taylor DW** (1982) Toxoplasmosis in immunoglobulin M-suppressed mice. J. Immunol. 38:360
- **Freyre A, Bonino J, Falcon J, Castells D, Correa O, Casaretto A.** (1997) The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. Vet Parasitol; 73:13-15
- **Frixione E., R. Mondragon, and I. Meza.** (1996). Kinematic analysis of *Toxoplasma gondii* motility. Cell Motil. Cytoskeleton 34:152-163.
- **Fuhrman SA and Joiner KA** (1989) *Toxoplasma gondii*: mechanism of resistance to complement-mediated killing. J. Immunol. 142:940
- **Furtado G. C., M. Slowik, H. K. Kleinman, and K. A. Joiner** (1992b) Laminin enhances binding of *Toxoplasma gondii* tachyzoites to J774 murine macrophage cells. Infect. Immun. 60:2337-2342.

- **Furtado G. C., Y. Cao, and K. A. Joiner** (1992a) Laminin on *Toxoplasma gondii* mediates parasite binding to the b1 integrin receptor $\alpha 6 \beta 1$ on human foreskin fibroblasts and Chinese hamster ovary cells. *Infect. Immun.* 60:4925–4931.
- **Gagne, S S** (2001). Toxoplasmosis. *Prim. Care Update Ob/Gyn.* 8:122–126.
- **Garcia-Reguet N, Lebrun M, Fourmaux MN, Mercereau-Puijalon O, Mann T, Beckers CJM, Samyn B, Van Beeumen J, Bout D and Dubremetz JF.** (2000) The microneme protein MIC3 of *Toxoplasma gondii* is a secretory adhesin that binds to both the surface of the host cells and the surface of the parasite. *Cell. Microbiol.* 2:353-364.
- **Gavrilescu LC and Denkers EY** (2003). Apoptosis and the balance of homeostatic and pathologic responses to protozoan infection. *Infect Immun.*; 71(11):6109-15
- **Gavrilescu LC and Denkers EY** (2001) IFN- γ overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol.* 167:902-909
- **Gazzinelli RT, Amichay D, Scharon-Kersten T, Grunvald E, Farber JM and Sher A.** (1996) Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 219:127-140
- **Gazzinelli RT, Denkers EY, Hakim FT and Sher A** (1993) Immunologic control of *Toxoplasma gondii* infection by CD8⁺ lymphocytes: a model for class I restricted recognition of intracellular parasites, p 370-377. In M. Sitkovsky and P. Henkart (ed) *Cytotoxic cells: generation, triggering, effector functions, methods.* Birkhauser Press, Boston, Mass
- **Gazzinelli RT, Eltoun IA, Wynn T and Sher A** (1993) Acute cerebral toxoplasmosis is induced by *in vivo* neutralization of TNF- α and correlates with down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. *J. Immunol.* 151:3672-81
- **Gazzinelli RT, Hakim FT, Hieny S, Shearer GM and Sher A** (1991) Synergistic role of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in IFN- γ production and protective immunity induced by an attenuated *T. gondii*. *Vaccine. J. Immunol.* 146:286-292
- **Gazzinelli RT, Hakim FT, Hieny S, Shearer GM and Sher A.** (1991) Opportunistic infections and retrovirus-induced immunodeficiency: studies of acute and chronic infections with *Toxoplasma gondii* in mice infected with LP-BM5 murine leukemia viruses. *Infect. Immun.* 60:4394-4401
- **Gazzinelli RT, Oswald IP, James S and Sher A** (1992) IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- γ activated macrophages. *J. Immunol.* 148:1792-96
- **Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers E, Hieny S, Caspar P, Trinchieri G and Sher A** (1994) Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 153:2533-2543
- **Gazzinelli RT, Xy Y, Hieny S, Cheever A and Sher A** (1992) Simultaneous depletion of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 149:175-180
- **Gelfanov V, Gelfanova V, Lai YG and Liao NS** (1996) Activated alpha beta CD8⁺ but not alpha alpha CD8⁺, TCR-alpha-beta⁺ murine intestinal intraepithelial lymphocytes can mediate perforin-based cytotoxicity, whereas both subsets are active in Fas-based cytotoxicity. *J. Immunol.* 156:35-41
- **Grigg ME, Bonnefoy S, Hehl AB, Suzuki Y and Boothroyd JC** (2001a) Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science*; 294:161

- **Grigg ME, Ganatra J, Boothroyd JC and Margolis TP** (2001b) Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 184:633
- **Grimwood J, Mineo JR, Kasper LH.** (1996). Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells is host cell cycle dependent. *Infect. Immun.* 64:4099-4104
- **Grimwood J, Smith JE** (1992). *Toxoplasma gondii*: the role of a 30 kDa surface protein in host cell invasion. *Exp. Parasitol.* 74:106-111
- **Grimwood J, Smith JE.** (1996). *Toxoplasma gondii*: the role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion. *Int. J. Parasitol.* 26:169-73
- **Gross U, Luder CG, Hendgen V, Heeg C, Sauer I, Weidner A, Krezal D and Enders G.** (2000) Comparative immunoglobulin G antibody profiles between mother and child (CGMC test) for early diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 38:3619-3622
- **Grover CM, ThulliezP, Remington JS.** (1990) Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. *J. Clin. Microbiol.* 28:2297-2301
- **Grun, J. L., and P. H. Maurer.** (1989) Different T helper cell subsets elicited in mice utilizing two different adjuvant vehicles: the role of endogenous IL-1 in proliferative responses. *Cell Immunol*; 121:134-145.
- **Guy-Grand D, Cuenod-Jabri B, Malassis-Seris M, Selz F and Vassalli P** (1996) Complexity of the mouse gut T cell immune system: identification of two distinct natural killer T-cell intraepithelial lineages. *Eur. J. Immunol.* 26:2248-2256
- **Guy-Grand D, DiSanto JP, Henchoz P, Malassis-Seris M and Vasalli P** (1998) Small bowel enteropathy: role of intraepithelial lymphocytes and of cytokines (IL-12, IFN- γ , TNF) in the induction of epithelial cell death and renewal. *Eur. J. Immunol.* 28:730-744
- **Guy-Grand D, Griscelli C and Vassalli P** (1978) The mouse gut T lymphocyte, a novel type of T cell. Nature, origin and traffic in mice in normal and graft-versus-host conditions. *J. Exp. Med.* 148:1661
- **Guy-Grand D, Malassis-Seris M, Briottet C and Vassali P** (1991) Cytotoxic differentiation of mouse gut thymodependent and independent intraepithelial T lymphocytes is induced locally. Correlation between functional assays, presence of perforin and granzyme transcripts, and cytoplasmic granules. *J. Exp. Med.* 173:1549
- **Hakansson S., H. Morisaki, J. Heuser, and L. D. Sibley** (1999) Time-lapse video microscopy of gliding motility in *Toxoplasma gondii* reveals a novel, biphasic mechanism of cell locomotion. *Mol. Biol. Cell.* 10:3539-3547.
- **Hakim FT, Gazzinelli RT, Denkers E, Hieny S, Shearer GM and Sher A** (1991) CD8+ T cells from mice vaccinated against *Toxoplasma gondii* are cytotoxic for parasite-infected or antigen-pulsed host cells. *J. Immunol.* 147:2310-16
- **Haque S, Haque A and Kasper LH** (1995) *Toxoplasma gondii* derived factor(s) stimulates immune downregulation: An in vitro model. *Inf. Immun.* 63:3442
- **Haumont M, Delhay L, Garcia L, Jurado M, Mazza P, Daminet V, Verlant V, Bollen A, Biemans R and Jacquet A** (2000) Protective immunity against congenital toxoplasmosis with recombinant SAG1 protein in a Guinea pig model, *Infect. Immun*; 68:4948-4953.
- **Hedman K, Lappalainen M, Seppaia I et al** (1989) Recent primary *Toxoplasma* infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J. Infect. Dis.* 159:736-740

- **Hehl AB, Lekutis C, Grigg ME, Bradley PJ, Dubremetz JF, Orgega-Barria E and Boothroyd JC** (2000) *Toxoplasma gondii* homologue of plasmodium apical membrane antigen 1 is involved in invasion of host cells. *Infect. Immun.* 68:7078-7086
- **Hibbs JB, Lambert LH and Remington JS** (1971) Resistance to murine tumours conferred by chronic infection with intracellular protozoa. *J. Infect. Dis.* 124:587-592
- **High KP, Joiner KA and Handschumacher RE.** (1994) Isolation, cDNA sequences, and biochemical characterization of the major cyclosporin-binding proteins of *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem.*; 269(12):9105-12.
- **Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM et al.** (1994) Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. *N. Engl. J. Med.* 331:695-699
- **Holliman RE.** (1995) Congenital toxoplasmosis: prevention, screening and treatment. *J. Hosp. Infect.* 30 (Suppl):179-190
- **Holpert M. et al** (2001) Bradyzoite-specific expression of a P-type ATPase in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 112:293-296
- **Hornef MW, Frisan T, Vandewalle A, Normark S, Richter-Dahlfors A.** (2002) Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. *J Exp Med*;195:559-570.
- **Howe DK, Sibley LD** (1995) *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human diseases. *J. Infect. Dis.* 172:1561-1566
- **Howe DK, Summers BC and Sibley LD** (1996) Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 64:5193-5198
- **Hunter CA and Remington JS** (1994) Immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis. *J. Infect. Dis.* 170:1057-1067
- **Hunter CA, Bermudez L, Beernink H, Waegell W and Remington JS** (1995) Transforming growth factor-beta inhibits IL-12 induced production of IFN-g by NK cells: a role for TGF- β in regulation of T cell-independent resistance to *Toxoplasma gondii*. *Eur. J. Immunol.* 25:994-1000
- **Jacobs L, Remington JS and Melton ML** (1960) The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 46:11
- **Jenum PA, Holberg-Peterson M, Melby KK et al.** (1998) Diagnosis of congenital *Toxoplasma gondii* infection by polymerase chain reaction (PCR) on amniotic fluid samples: The Norwegian experience. *APMIS* 106:680-686
- **Jenum PA, Stray-Petersen B, Gundersen AG.** (1997) Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of anti-toxoplasma immunoglobulin G avidity. *J. Clin. Microbiol.* 35:1972-1977
- **Jiang Y, Beller DI, Frendl G, Graves DT.** (1992) Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol*;148:2423-2428.
- **Johnson A** (1984) Strain-dependent, route of challenge-dependent, murine susceptibility to toxoplasmosis. *Zentralbl. Parasitenkunde.* 70:4682
- **Johnson LL, Sayles PC.** (2002) Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-deficient mice. *Infect Immun*;70:185-91.
- **Johson AM, McDonald PJ and Neoh SH** (1983) Monoclonal antibodies to *Toxoplasma* cell membrane surface antigens protect mice from toxoplasmosis. *J. Protozool.* 30:351
- **Joss AWL** (1992) In Human Toxoplasmosis. Oxford Medical Publications, Eds: HO-Yen D.O. and A.W.L. Joss, Oxford University Press, New York.

- **Kang H, Remington JS, Suzuki Y.** (2000) Decreased resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN-gamma, TNF-alpha, and inducible nitric oxide synthase. *J Immunol*;164:2629-34.
- **Kasper L, Khan I, Ely K, Buelow R and Boothroyd J** (1992) Antigen-specific (P30) mouse CD8+ T cells are cytotoxic against *Toxoplasma gondii*-infected peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 148:1493
- **Kasper L. H., and J. C. Boothroyd.** (1993). *Toxoplasma gondii*: immunology and molecular biology, p. 269–301. In K. S. Warren (ed.), *Immunology and molecular biology of parasitic infections*. Blackwell, Cambridge, Mass.
- **Kasper L. H., and J. R. Mineo** (1994) Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Today* 10:184–188.
- **Kasper L. H., J. H. Crabb, and E. R. Pfefferkorn** (1983) Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsorption with a monoclonal antibody. *J. Immunol.* 130:2407–2412.
- **Kelner G, Kennedy J, Bacon K, Kleyensteuber S, Largaespada D, Jenkins N, Copeland N, Bazan J, Morre K, Schell T and Slotnik A** (1994) Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokines. *Science*; 266:1395
- **Kelsall B and Strober W** (1997) Dendritic cells of the gastrointestinal tract. *Semin. Immunopathol.* 18:409-420
- **Khan I. A. and L. H. Kasper** (1996) IL-15 augments CD8+ T cell-mediated immunity against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J. Immunol.* 157:2103–2108.
- **Khan IA, Ely KH and Kasper LH** (1991) a purified parasite antigen (p30) mediates CD8+ T cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J. Immunol.* 147:3501-3506
- **Khan IA, MacLean JA, Lee FS, Casciotti L, DeHaan E, Schwartzmann JD, Luster AD.** (2000) IP-10 is critical for effector T cell trafficking and host survival in *Toxoplasma gondii* infection. *Immunity*;12:483–494.
- **Khan IA, Schwartzmann JD, Matxuura T and Kasper LH** (1997) A dichotomous role for nitric oxide during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:1355-13960
- **King C. A** (1988) Cell motility of sporozoan protozoa. *Parasitol. Today* 4:315–319.
- **Krahenbuhl JL, Ruskin J and Remington JS** (1972) The use of killed vaccines in immunization against an intracellular parasite: *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 108:425
- **Labruyere E., M. Lingnau, C. Mercier, and L. D. Sibley.** (1999) Differential membrane targeting of the secretory proteins GRA4 and GRA6 within the parasitophorous vacuole formed by *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 102:311–324.
- **Lee YH, Channon JY, Matsuura T, Schwartzman JD, Shin DW and Kasper LH** (1999) Functional and quantitative analysis of splenic T cell immune responses following oral *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Exper. Parasitol.*; 91:212
- **Lee YH, Shin DW and Kasper LH** (2000) Sequential analysis of cell differentials and IFN-g production of splenocytes from mice infected with *Toxoplasma gondii*. *The Korean J. Parasitol.*; 38:85
- **Lefrancois L, Fuller B, Huleatt J, Olson S and Puddington L** (1997) On the front lines: intraepithelial lymphocytes as primary effectors of intestinal immunity. *Semin. Immunopathol.* 18:463

- **Lepage AC, Buzoni-Gatel D, Bout DT, Kasper LH.** (1998) Gut-derived intraepithelial lymphocytes induce long term immunity against *Toxoplasma gondii*. J Immunol. 161:4902–4908.
- **Leriche M. A., and J. F. Dubremetz.** (1991). Characterization of the protein contents of rhoptries and dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies. Mol. Biochem. Parasitol. 45:249–260.
- **Leriche MA and Dubremetz JR** (1990) Exocytosis of *Toxoplasma* dense granules into the parasitophorous vacuole after invasion. Parasitol. Res. 76:359–362
- **Letscher Bru V, Villard O, Risse B, Zauke M, Klein JP and. Kien TT** (1998) Protective effect of vaccination with a combination of recombinant surface antigen 1 and interleukin 12 against toxoplasmosis in mice, Infect. Immun; 66:4503–4506.
- **Liesenfeld O, Kang H, Park D, Nguyen TA, Parkhe CV, Watanabe H, Abo T, Sher A, Remington JS, Suzuki Y.** (1999) TNF-alpha, nitric oxide and IFN-gamma are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected perorally with *Toxoplasma gondii*. Parasite Immunol. 21:365–1376.
- **Liesenfeld O, Kosek JC and Suzuki** (1997) Gamma inteferon induces Fas-dependent apoptosis of Peyer's patch T cells in mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. Infect. Immun. 65:4682–4689
- **Liesenfeld, O** (1999) Immune Responses to *Toxoplasma gondii* in the gut. Immunobiology 201:229
- **Liesenfeld, O., Kosek, J., Remington, J. S., and Suzuki, Y.** (1996) Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. J Exp Med 184:597.
- **Lim S, Leung E, Krissansen G.** (1998) The beta 7 integrin gene (Itgb-7) promoter is responsive to TGF-beta 1: defining control region, Immunogenetics; 48:184
- **Lindsay D. S., J. P. Dubey, J. M. Butler, and B. L. Blagburn.** (1997). Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs. Vet. Parasitol. 73:27–33.
- **Lingelbach K., and K. A. Joiner** (1998) The parasitophorous vacuole membrane surrounding *Plasmodium* and *Toxoplasma*: an unusual compartment in infected cells. J. Cell Sci. 111:1467–1475.
- **Lionetti, P., Pazzaglia, A., Moriondo, M., Azzari, C., Resti, M., Amorosi, A., and A., V.** (1999). Differing patterns of transforming growth factor-beta expression in normal intestinal mucosa and in active celiac disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 29:308.
- **Lodolce J. P., D. L. Boone, S. Chai, R. E. Swain, T. Dassopoulos, S. Trettin, and A. Ma.** 1998. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. Immunity 9:669–676.
- **Luder CG, Giraldo-Velasquez M, Sendtner M and Gross U.** (1999) *Toxoplasma gondii* in primary rat CNS cells: differential contribution of neurons, astrocytes, and microglial cells for the intracerebral development and stage differentiation. Exp. Parasitol. 93:23–32
- **Luft B and Remington JS** (1992) AIDS commentary: toxoplasmic encephalitis in AIDS. Clin. Infect. Dis. 15:211–222
- **Lunden A, Lovgren K, UgglA A and Araujo FG** (1993) Immune responses and resistance to *Toxoplasma gondii* in mice immunized with antigens of the parasite incorporated into immunostimulating complexes, Infect. Immun; 61:2639–2643.

- **Mack DG and McLeod** (1992) Human *Toxoplasma gondii*-specific secretory immunoglobulin-A reduces *T. gondii* infection of enterocytes in vitro. J. Clin. Invest. 90:2585-2592
- **Mahmoud AAF, Warren KS and Strickland GT** (1976) Acquired resistance to infection with *Schistosoma mansoni* induced by *Toxoplasma gondii*. Nature 263:56-57
- **Manger ID, Hehl AB, Boothroyd JC** (1998) The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1. Infect. Immun. 66, 2237-44
- **Markowitz SD, Molkenin K, Gerbic C, Jackson J, Stellato T and Wilson JKV** (1990) Growth stimulation by coexpression of transforming growth factor- α and epidermal growth factor-receptor in normal and adenomatous human colon epithelium. J. Clin. Invest. 86:356
- **Martin V, Arcavi M, Amendoeira MRR, de Souza Neves E, Santillán G, Guarnera E, Garberi JC, Angel SO** (1998) Detection of human anti-*Toxoplasma* specific immunoglobulins A, M and G by a recombinant *Toxoplasma gondii* Rop2 protein. Clin Diagn Lab Immunol; 5:627-631.
- **Martins GA, Cardoso MGA, Aliberti JCS and Silva JS** (1995) Modulation of apoptosis by nitric oxide in *Trypanosoma cruzi* infected mice. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 90 (Suppl):171
- **McLeod R and Mack DG** (1986) Secretory IgA specific for *Toxoplasma gondii*. J. Immunol. 136:2640-2643
- **McLeod R, Eisenhauer P, Mack D, Brown C, Filice G and Spitalny** (1989) Immune response associated with early survival after peroral infection with *Toxoplasma gondii*. J. Immunol; 142:3247
- **McLeod R, Estes R, Mack D and Cohen H** (1984) Immune responses of mice to ingested *Toxoplasma gondii*: a model of *Toxoplasma* infection acquired by ingestion. J. Inf. Dis.; 149:234
- **McLeod R, Frenkel JK, Estes RG, Mack DG, Eisenhauer PB and Gibori** (1988) Subcutaneous and intestinal vaccination with tachyzoites of *Toxoplasma gondii* and acquisition of immunity to peroral and congenital toxoplasma challenge. J. Immunol. 140:1632-1637
- **McLeod R, Skamene E, Brown CR, Eisenhauer PB and Mack DG** (1989) Genetic regulation of early survival and cyst number after peroral *Toxoplasma gondii* infection of AxB/BxA recombinant inbred and B10 congenic mice. J. Immunol. 143:3031
- **Mevelec MN, Chardes T, Mercereau-Puijalon O et al** (1992) Molecular cloning of GRA4, a *Toxoplasma gondii* dense granule progein, recognized by mucosal IgA antibodies. Mol. Bioch. Parasitol. 56:227
- **Mevelec MN, Mercereau-Puijalon O, Buzoni-Gatel D, Bourguin I, Chardes T, Dubremetz JF and Bout D** (1998) Mapping of B epitopes in GRA4, a dense granule antigen of *Toxoplasma gondii* and protection using recombinant proteins administered by the oral route. Parasite Immunol.; 20:183
- **Mineo J. R., and L. H. Kasper** (1994). Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30). Exp. Parasitol. 79:11-20.
- **Mineo JR, McLeod R, Mack D, Smith J, Khan IA, Ely KH, Kasper LH** (1993) Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. J. Immunol. 150:3951-64

- **Minkoff H, Remington JS, Holman S et al.** (1997) Vertical transmission of *Toxoplasma* by human immunodeficiency virus-infected women. *Am. J. Obstet Gynecol.* 176:555-559
- **Mishima, M., X. Xuan, A. Shioda, Y. Omata, K. Fujisaki, H. Nagasawa, and T. Mikami.** (2001) Modified protection against *Toxoplasma gondii* lethal infection and brain cyst formation by vaccination with SAG2 and SRS1. *J. Vet. Med. Sci.*; 63:433-438.
- **Mitchell CD, Erlich SS, Mastrucci MT et al.** (1990) Congenital toxoplasmosis occurring in infants perinatally infected with human immunodeficiency virus 1. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 9:512-518
- **Mohamed, R. M., F. Aosai, M. Chen, H. -S. Mun, K. Norose, U. S. Belal, L. -X. Piao, and A. Yano.** (2003) Induction of protective immunity by DNA vaccination with *Toxoplasma gondii* HSP70, HSP30 and SAG1 genes. *Vaccine*; 21:2852-2861.
- **Montoya JG, Lowe KE, Clayberger C, Moody D, Do D, Remington JS Talib S and Subauste CS** (1996) Human CD4+ and CD8+ T lymphocytes are both cytotoxic to *Toxoplasma gondii*-infected cells. *Infect. Immun.* 64:176-181
- **Mordue DG, Desai N, Dustin M and Sibley LD.** (1999) Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J. Exp. Med.* 190:1783-1792.
- **Mordue DG, Monroy F, La Regina M, Dinarello CA and Sibley LD** (2001) Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *J. Immunol.* 167:4574-4584
- **Morrisette N. S., J. M. Murray, and D. S. Roos.** (1997). Subpellicular microtubules associate with an intramembranous particle lattice in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci.* 110:35-42.
- **Nagel SD, Boothroyd JC.** (1989) The major surface antigen, P30, of *Toxoplasma gondii* is anchored by a glycolipid. *J. Biol. Chem.* 264, 5569-74
- **Nathan C and Hibbs J** (1991). Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Op. Immunol.*; 3:65
- **Neyer LE, Kang h, Remington J and Suzuki Y** (1998) Mesenteric lymph node T cells but not splenic T cells maintain their proliferative response to Concanavalin-A following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *Par. Immunol.*; 20:573
- **Nichols B. A., and M. L. Chiappino.** (1987). Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *J. Protozool.* 34:217-226.
- **Nichols BA, Chiappino ML and O'Connor GR** (1983) Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host cell invasion. *J. Ultrastr. Res.* 83:85-98
- **Nielsen HV, Lauemoller SL, Christiansen L, Buus S, Fomsgaard A and Petersen E** (1999) Complete protection against lethal *Toxoplasma gondii* infection in mice immunized with a plasmid encoding the SAG1 gene. *Infect. Immun.*; 67:6358-6363.
- **Nigro M, Martin V, Kaufer F, Carral L, Angel SO, Pszeny V.** (2001) High level of expression of the *Toxoplasma gondii*-recombinant Rop2 protein in *Escherichia coli* as a soluble form for optimal use in diagnosis. *Mol Biotechnol*; 18:269-73.
- **Nigro M, Gutierrez A, Hoffer A, Clemente M, Kaufer F, Carral L, Martin V, Guarnera E and Angel SO** (2003) Evaluation of *Toxoplasma gondii* proteins for the diagnosis of recently acquired toxoplasmosis by an immunoglobulin G analysis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*; en prensa.
- **Ossorio P. N., J. D. Schwartzman, and J. C. Boothroyd.** (1992) A *Toxoplasma gondii* rhoptry protein associated with host cell penetration has unusual charge asymmetry. *Mol. Biochem. Parasitol.* 50:1-15.

- **Ossorio P. N., J. F. Dubremetz, and K. A. Joiner.** (1994) A soluble secretory protein of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* associates with the parasitophorous vacuole membrane through hydrophobic interactions. *J. Biol. Chem.* 269:15350–15357.
- **Oswald IP, Gazzinelli RT, Sher A and James SL** (1992) IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor- β to inhibit macrophage cytotoxic activity. *J. Immunol.* 148:3578-3582
- **Parmley S, Slifer T, Araujo F** (2002). Protective effects of immunization with a recombinant cyst antigen in mouse models of infection with *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *J Infect Dis*;15:90-5
- **Parmley SF. et al** (1995) Cloning of a bradyzoite-specific gene of *Toxoplasma gondii* encoding a cytoplasmic antigen. *Mol. Biochem. Parasitol.* 73:253-257
- **Pavia CS** (1986) Protection against experimental toxoplasmosis by adoptive immunotherapy. *J. Immunol.* 137:2985
- **Peng KC, Cluzeaud F, Bens M, Van Huyen JP, Wioland MA, Lacave R, Vandewalle A.** (1999) Tissue and cell distribution of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in mouse intestine and kidney. *J Histochem Cytochem*;47:757–768.
- **Perrotto J., D. B. Keister, and A. H. Gelderman.** (1971) Incorporation of precursors into *Toxoplasma* DNA. *J. Protozool.* 18:470–473.
- **Petersen E, Henrik VN, Christiansen L and Spenter J** (1998) Immunization with *E. coli* produced recombinant *T. gondii* SAG1 with alum as adjuvant protect mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*, *Vaccine*; 16:1283–1289.
- **Pfefferkorn E.R.** (1984) Interferon- γ blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:908-912
- **Pfefferkorn E.R., Eckel M and Rebhun S** (1986) Interferon- γ suppresses the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts through starvation for tryptophan. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20:215-224
- **Pinon JM, Thoannes H and Gruson N** (1985) An enzyme-linked immuno-filtration assay used to compare infant and maternal antibody profiles in toxoplasmosis. *J. Immunol. Meth.* 77:15-23
- **Prochet-Hennere, E., and G. Nicolas.** (1983) Are rhoptries of Coccidia really extrusomes? *J. Ultrastruct. Res.* 84:194–203.
- **Pszenny V, Angel SO, Duschak VG, Paulino M, Ledesma V, Yabo MI, Guarnera E, Ruiz AM and Bontempi EJ** (2000) Molecular cloning, sequencing and expression of a serine proteinase inhibitor from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.*; 107:241
- **Pszenny V, Ledesma BE, Matrajt M, Duschak VG, Bontempi EJ, Dubremetz JF and Angel SO.** (2002) Subcellular localization and post-secretory targeting of TgPI, a serine proteinase inhibitor from *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 121:283-286.
- **Purner MB, Berens RL, Nash PB, van Linden A, Ross E, Kruse C, Krug EC and Curiel TJ** (1996) CD4-mediated and CD8-mediated cytotoxic and proliferative immune response to *Toxoplasma gondii* in seropositive humans. *Infect. Immun.* 64:4330-4338
- **Rabenau KE, Sohrabi A, Tripathy A, Reitter C, Ajioka JW, Tomley FM and Carruthers VB** (2001) TgM2AP participates in *Toxoplasma gondii* invasion of host cells and is tightly associated with the adhesive protein TgMIC2. *Mol. Microbiol.* 41:1-12
- **Radke J. R., and M. W. White.** (1998). A cell cycle model for the tachyzoite of *Toxoplasma gondii* using the *Herpes simplex* virus thymidine kinase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 94:237–247.

- **Reinecker HC and Podolsky DK** (1995) Human intestinal epithelial cells express functional cytokine receptors sharing the common gamma chain of the interleukin 2 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92:8353
- **Reis e Sousa C et al** (1999) Paralysis of dendritic cell IL-12 production by microbial products prevents infection-induced immunopathology. *Immunity*. 11:637-647
- **Remington JS and Desmont G** (1976). *Toxoplasmosis*. In *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*, Eds. J.S. Remington y J.O. Klein, W.B. Saunders, 2nd ed, Philadelphia. P. 191-332
- **Remington JS and Desmont G** (1995) *Toxoplasmosis*. In *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*, Eds J.S. Remington and JO Klein, W.B. Saunders, 3rd ed, Philadelphia. p. 140-267
- **Remington JS, McLeod R, Thulliez P et al.** (2001) *Toxoplasmosis*. In: Remington JS, Klein JO, eds. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*, 5th Ed. Philadelphia: Saunders. 205-346
- **Remington, J, Desmonts G and McLeod** (1995) *Toxoplasmosis*, in : Remington, J, Klein: *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*, 4. ed., WB Saunders, Philadelphia.
- **Rico AI, Angel SO, Alonso C, Requena JM.** (1999) Immunostimulatory properties of the *Leishmania infantum* heat shock proteins Hsp70 and Hsp83. *Mol Immunol*; 36:1131-9.
- **Robert R., P. L. DeLaJarrige, C. Mahaza, J. Cottin, A. Marot-Leblond, and J. M. Senet** (1991). Specific binding of neoglycoproteins to *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Infect. Immun.* 59:4670-4673.
- **Roberts AI, Bilenker M, Ebert EC.** (1997) Intestinal intraepithelial lymphocytes have a promiscuous interleukin-8 receptor. *Gut*;40:333-338.
- **Rosenzvit M, Angel SO, Alvarez L, Mellare V, Blanco JC, Pszeny V and Garberi JC.** (1995) A simple and economic slide micro-immunoenzymatic (Micro-SIA) test for epidemiological studies of toxoplasmosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz-Rio* 89: 47-51, 1995
- **Russell D. G., and R. E. Sinden** (1981) The role of the cytoskeleton in the motility of Coccidian sporozoites. *J. Cell Sci.* 50:345-359.
- **Saavedra R, Becerril MA, Dubeaux C, Lippens R, Vos MD, Herion P and Bollen A** (1996) Epitopes recognized by human T lymphocytes in the ROP2 protein antigen of *Toxoplasma gondii*, *Infect. Immun*; 64:3858-3862.
- **Saavedra R, de Meuter F, Decourt J -L, Hérion P.** (1991) Human T cell clone identifies a potentially partially protective 54-kDa protein antigen of *Toxoplasma gondii* cloned and expressed in *Escherichia coli*. *J Immunol*;147:1975-82.
- **Sabin AB** (1941) Toxoplasmic encephalitis in children. *J. Am. Med. Assoc.* 116:801-807
- **Sabin AB and Feldman** (1948) Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science* 108:660-663
- **Sacks D and Sher A** (2003) Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat. Immunol. Review.* 3:1041-47
- **Saddak A, Taghy Z, Fortier B and Dubremetz JF** (1988) Characterization of a family of rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol*; 29:203
- **Saffer L. D., and J. D. Schwartzman.** (1991) A soluble phospholipase of *Toxoplasma gondii* associated with host cell penetration. *J. Protozool.* 38:454-460.
- **Saffer L. D., O. Mercereau-Puijalon, J. F. Dubremetz, and J. D. Schwartzman.** (1992) Localization of a *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and after host cell penetration. *J. Protozool.* 39:526-530.

- **Saito S, Aosai F, Rikihisa N, Mun HS, Norose K, Chen M, Kuroki T, Asano T, Ochiai T, Hata H, Ischinose M and Yano A** (2001) Establishment of gene vaccinated skin grafting against *Toxoplasma gondii* infection in mice, *Vaccine*; 19:2172–2180.
- **Santiago H. C., M. A. P. Oliveira, E. A. Bambirra, A. M. C. Faria, L. C. C. Afonso, L. Q. Vieira, and R. T. Gazzinelli.** (1999) Coinfection with *Toxoplasma gondii* Inhibits Antigen-Specific Th2 Immune Responses, Tissue Inflammation, and Parasitism in BALB/c Mice Infected with *Leishmania major*. *Infect Immun.*; 67:4939-4944.
- **Santoro F, Afchain D, Pierce R, Cesbron JY, Olvaque G and Capron A** (1985) Serodiagnosis of *Toxoplasma* infection using a purified parasite protein (P30). *Clin. Exp. Immunol.* 62:262-269
- **Sayles P, Gibson GW and Johnson LL** (2000) B cells are essential for vaccination-induce resistance to virulen *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 68:1026-1033
- **Scanga CA et al.** (2002) Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J. Immunol.* 168:5997-6001
- **Schall T, Bacon K, Camp D, Kaspari J and Goeddel D** (1993) Human macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) and MIP-1 β attract distinct populations of lymphocytes. *J. Exp. Med.*; 177:1821
- **Scharton-Kersten TM, Yap G, Magram J and Sher A** (1997) Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.* 185:1261-73
- **Scharton-Kersten, TM, Wynn TA, Denkers EY, Bala S, Grunvald E, Hieny S, Gazzinelli RT and Sher A** (1996) In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. *J. Immunol.* 167:4045-54
- **Scheerlinck, J. P., G. Casey, P. McWaters, J. Kelly, D. Woollard, M. W. Lightowlers, J. M. Tennent, P. J. Chaplin.** (2001) The immune response to a DNA vaccine can be modulated by co-delivery of cytokine genes using a DNA prime-protein boost strategy. *Vaccine*; 19:4053-4060.
- **Schreiber RD and Feldman HA** (1980) Identification of the activator system for antibody to *Toxoplasma* as the classical complement pathway. *J. Infect. Dis.* 141:366
- **Shapira S, Speirs K, Gerstein A, Caamano J and Hunter CA.** (2002) Suppression of NF-kB activation by infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.* 185 (Suppl) 66-72
- **Shaw SK, Hermanowski-Vosatka A, Shibahara T, McCormick BA, Parkos CA, Carlson SL, Ebert EC, Brenner MB, Madara JL.** (1998) Migration of intestinal intraepithelial lymphocytes into a polarized epithelial monolayer. *Am J Physiol.*; 275(3 Pt 1):G584-91.
- **Sheffield H. G., and M. L. Melton.** (1968) The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 54:209–226.
- **Sher A, Gazzinelli RT, Oswald IP, Clerici M, Kullberg M, Pearce EJ, Berzovsky JA, Mosmann TR, James SL, Morse HR and Shearer GM** (1992) Role of T cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. *Immunol. Rev.* 127:183-204
- **Sher A, Oswald IO, Hieny S and Gazzinelli RT** (1993) *Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN-g response in NK cells which requires both adherent accessory cells and TNF-a. *J. Immunol.* 150:3982-3989

- **Shwartzman J. D., and E. R. Pfefferkorn.** (1982) *Toxoplasma gondii*: purine synthesis and salvage in mutant host cells and parasites. *Exp. Parasitol.* 53:77–86.
- **Sibley L. D., J. L. Krahenbuhl, G. M. W. Adams, and E. Weidner.** (1986) *Toxoplasma* modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins. *J. Cell Biol.* 103:867–874.
- **Sibley LD and Andrews NW.** (1999) Cell invasion by un-palatable parasites. *Parasitol.* 104:271–283
- **Sibley, L. D., E. Weidner, and J. L. Krahenbuhl.** (1985). Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature* 315:416–419.
- **Sibley, L. D., I. R. Niesman, S. F. Parmley, and M. F. Cesbron-Delauw.** (1995) Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host-cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci.* 108:1667–1677.
- **Silva NM, Gazzinelli RT, Silva DAO, Ferro EAV, Kasper LH and MineoJR** (1998) Expression of *Toxoplasma gondii*-Specific Heat Shock Protein 70 during In Vivo Conversion of Bradyzoites to Tachyzoites, *Infect. Immun.* 66(8):3959–3963
- **Sinai A.P., and K.A. Joiner.** (1997). Safe haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles. *Annu. Rev. Microbiol.* 51:415–462.
- **Sinai A.P., P. Webster, and K.A. Joiner.** (1997). Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J. Cell Sci.* 110:2117–2128.
- **Sinai AP, Joiner KA.** (2001) The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *J. Cell. Biol.* 154:95–108
- **Smith,, J. E.** (1995) A ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 25:1301–1309.
- **Soete M, Fortier B, Camus D and Dubremetz JF** (1993) *Toxoplasma gondii*: kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 76:259–264
- **Soete M. et al** (1994) Experimental induction of bradyzoite-specific antigen expression and cyst formation by the RH strain of *Toxoplasma gondii* *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 78:361–370
- **Speer CA and Dubey JP** (1998) Ultrastructures of early stages of infections in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Parasitology*; 116:35–42
- **Stenson, W. and Alpers, D.** (1994) A parable on the dangers of overclassification. Can an enterocyte assume immune functions? *Cur Op in Gastroenterology* 10:121.
- **Stewart M. J., and J. P. Vanderberg** (1988) Malaria sporozoites leave behind gliding trails of circumsporozoite protein during gliding motility. *J. Protozool.* 35:389–393.
- **Su CL, Evans D, Cole RH, Kissinger JC, Ajioka JW and Sibley LD** (2003) Enhanced oral transmission acquired through recent recombination led to widespread expansion of *Toxoplasma*. *Science* 299, 414–416
- **Su CL, Howe DK, Dubey JP, Ajioka JW, Sibley LD** (2002) Identification of quantitative trait loci controlling acute virulence in *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:10753
- **Subauste CS, Koniaris AH and Remington JS** (1991) Murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii*-infected cells. *J. Immunol.* 147:3955–59
- **Sumyuen MH, Garin FYJ and Derouin F** (1995) Early kinetics of *Toxoplasma gondii* infection in mice infected orally with cysts of an avirulent strain. *J. Parasitol.* 81:327

- **Supply P, Sutton P, Coughlan SN, Bilo K, Saman E, Trees AJ, Delauw MC and Locht C** (1999) Immunogenicity of recombinant BCG producing the GRA1 antigen from *Toxoplasma gondii*, Vaccine; 17:705–714.
- **Suzuki Y, Conley FK and Remington** (1989a) Treatment of toxoplasmic encephalitis in mice with recombinant gamma interferon. Infect. Immun. 58:3050
- **Suzuki Y, Conley FK and Remington JS** (1989b) Importance of endogenous IFN- γ for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. J. Immunol. 143:2045-2050.
- **Suzuki Y, Joh K, Orellana MA, Conley FK and Remington JS** (1991) A gene(s) within the H-2D region determines the development of toxoplasmic encephalitis in mice. Immunology. 74:732
- **Suzuki Y, Remington JS.** (1990b) The effect of anti-IFN- γ antibody on the protective effect of Lyt-21 immune T cells against toxoplasmosis in mice. J Immunol. 144:1954–1956.
- **Suzuki Y, Sher A, Yap G, Park D, Neyer LE, Liesenfeld O, Fort M, Kang M, Gufwoli E.** (2000) IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. J Immunol;164:5375–5382.
- **Suzuki Y, Thulliez P, Desmonts G and Remington** (1988a). Antigen(s) responsible for immunoglobulin G responses specific for the acute stage of *Toxoplasma gondii* infection in humans. J. Clin. Microbiol.
- **Swain SL, Weinberg AD, English M and Huston G** (1990) IL-4 directs the development of Th2-like helper effector. J. Immunol. 145:3796-3806
- **Tanaka T, Hamada T, Inoue N, Nagasawa H, Fujisaki K, Suzuki N, Mikami T.** (2000) The role of CD4(+) or CD8(+) T cells in the protective immune response of BALB/c mice to *Neospora caninum* infection. Vet Parasitol; 90:183-91.
- **Taub D, Conlon K, Lloyd A, Oppenheim J and Delvin D** (1993). Selective chemoattraction of CD4 and CD-8 subsets of human T cells by MCP-1 α and MCP-1 β . Science; 60:355
- **Tenter A. M., A. R. Heckeroth, and L. M. Weiss.** (2000) *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int. J. Parasitol. 30:1217-1258.
- **Tighe, H., M. Corr, M. Roman, and E. Raz.** (1998) Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint. Immunol. Today; 19:89-97.
- **Tomavo S, Schwarz RT, Dubremetz JF.** (1989) Evidence for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. Mol. Cell. Biol. 9, 4576-80
- **Tomavo S.** (2001) The differential expression of multiple isoenzyme forms during stage conversion of *Toxoplasma gondii*: and adaptive developmental strategy. Int. J. Parasitol. 31:1023-1031
- **Tomley F and Soldati D** (2001) Mix and match modules: structure and function of micronemes from apicomplexan parasites. Trends Parasitol. 17:81-96
- **Toursel C. et al** (2000) Molecular cloning, organellar targeting and developmental expression of mitochondrial chaperone HSP60 in *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol. 111:319-332
- **Trotter FM and Voelker DR** (1994) Lipid transport processes in eukaryotic cells. Biochim. Biophys. Acta. 1213:241-262
- **Tsunawaki S, Sporn M, Ding A and Nathan CF** (1988). Deactivation of macrophages by transforming growth factor- β . Nature 344:260-263

- **Ulanova, M., A. Tarkowski, M. Hahn-Zoric, and L. A. Hanson.** (2001) The common vaccine adjuvant aluminum hydroxide up-regulates accessory properties of human monocytes via an interleukin-4-dependent mechanism. *Infect. Immun*; 69:1151-1159.
- **van de Ven E, Melchers W, Galama J et al.** (1991) Identification of *Toxoplasma gondii* infections by BI gene amplification. *J. Clin. Microbiol.* 29:2120-2124
- **Van Gelder F, Bosman F, De Meuter F, Van Heuverswyn H, Hérion P.** (1993) Serodiagnosis of toxoplasmosis by using a recombinant form of the 54-kilodalton rhoptry antigen expressed in *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*;31:9-15.
- **Velge-Roussel F, Marcelo P, Lepage AC, Buzoni-Gatel D and Bout DT** (2000) Intranasal immunization with *Toxoplasma gondii* SAG1 induces protective cells into both NALT and GALT compartments, *Infect. Immun*; 68:969–972.
- **Velge-Roussel F, Moretto M, Buzoni-Gatel D, Dimier-Poisson I, Ferrer M, Hoebeke J and Bout D** (1997) Differences in immunological response to a *T. gondii* protein (SAG1) derived peptide between two strains of mice: effect on protection in *T. gondii* infection. *Mol. Immunol.* 34:1045
- **Vercammen M, Scorza T, Huygen K, De Braekeleer J, Diet R, Jacobs D, Saman E and Verschuere H** (2000) DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7 and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice, *Infect. Immun*; 68:38–45.
- **Vidal K, Grosjean I, Revillard J, Gespach C and Kairserlian D.** (1993) immortalization of mouse intestinal epithelial cells by the SV40-large T gene. Phenotypic and immune characterization of the MODE-K cell line. *J. Immunol Methods.* 166:63
- **Vogel N, Kirisits M, Michael E et al.** (1996) Congenital toxoplasmosis transmitted from an immunologically competent mother infected before conception. *Clin Infect Dis.* 23:1055–1060
- **Wan KL, Carruthers VB, Sibley LD and Ajioka JW** (1997) Molecular characterization of an expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* encoding the micronemal protein MIC2. *Mol. Biochem. Parasitol.* 84:203-214
- **Wang, J., Whetsell, M., and Klein, J. R.** (1997). Local hormone networks and intestinal T cell homeostasis. *Science* 275:1937.
- **Werk R., R. Dunker, and S. Fischer.** (1984) Polycationic polypeptides: a possible model for the penetration-enhancing factor in the invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *J. Gen. Microbiol.* 130:927–933.
- **Wong SY and Remington JS** (1994) Toxoplasmosis in pregnancy. *Clin. Inf. Dis.* 18:853-862
- **Wong SY and Remington JS.** (1993). Biology of *Toxoplasma gondii*. *AIDS* 7:299–316.
- **Wu HY and Russell MW** (1997) Nasal lymphoid tissue, intranasal immunization and compartmentalization of the common mucosal immune system, *Immunol. Res*; 16:187–201.
- **Yap GS, Shcarton-Dersten T, Charest H and Sher A** (1998) Decreased resistance of TNF receptor P55 and p75 deficient mice to chronic toxoplasmosis despite normal activation of inducible nitric oxide synthase in vivo. *J. Immunol.* 160:1340-45
- **Zhang X., S. Sun, I. Hwang, D. F. Tough, and J. Sprent.** (1998) Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8_T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 8:591–599.