

180  
2es.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"ESTUDIO DE LA INMUNIDAD CELULAR  
PROTECTORA CONTRA Toxoplasma gondii"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

JESUS VEGA ALLENDE



MEXICO, D. F.



1995

FACULTAD DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
SECRETARÍA DE ECONOMÍA

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE**  
Jefe de la División de Estudios Profesionales  
Facultad de Ciencias  
Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron el pasante(s) Jesús Vega Allende

con número de cuenta 8122867-2 con el Título: "Estudio de la Inmunidad Celular Protectora contra *Toxoplasma gondii*"

Otorgamos nuestro Voto Aprobatorio y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de Biólogo

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	
DR.	RAFAEL SIMITRIO	SAAVEDRA DURAN	<i>[Firma]</i>
Director de Tesis			
DR.	PASCAL RENE	HERION SCOHY	<i>[Firma]</i>
DRA.	BERTHA	ESPINOZA GUTIERREZ	<i>[Firma]</i>
DR.	GUILLELMO	SALGADO MALDONADO	<i>[Firma]</i>
Suplente			
QFB	FERNANDO	RAMOS REYES	<i>[Firma]</i>
Suplente			

"Lorsque j'étais dans ma cause première, Je n'avais point de Dieu...; Je me voulais moi-même et ne voulais rien d'autre, ce que j'étais, Je le voulais, et Je me tenais libre de Dieu et de toutes choses... C'est pourquoi nous supplions Dieu d'être délivrés de Dieu, et de concevoir la vérité et d'en jouir éternellement, là où Je voulais ce que j'étais ce que Je voulais..."

"Cuando estaba yo en mi causa primera, no tenía a Dios...: me quería a mi mismo y no quería nada más: era lo que quería, y quería lo que era, y estaba libre de Dios y de todas las cosas... Por eso suplicamos a Dios que nos libre de Dios, y que concibamos la verdad y gocemos eternamente de ella, allí donde los ángeles supremos, la mosca y el alma son semejantes, allí donde yo estaba y donde quería eso que era y era eso que quería..."

Meister Eckhardt, sermón *Beati pauperes spiritu*.

(Julio Cortázar, *Rayuela*. Cap.70)

***Dedico esta tesis a mi hermana Jenny  
Allende (qepd) y a mi hija Mariana.***

## **Agradecimientos**

**A mi madre y abuela por su apoyo y cariño: en cada página  
están ustedes.**

**A mis hermanas Elvia y Jenny quienes nunca dejaron de  
creer en mi.**

**A Adriana en recuerdo de lo vivido.**

**A mis amigos Ariel, Rocío, Samuel, Polo, Sergio,  
Roberto y Vietnica, los quiero mucho.**

**A Pascal Hérion y a Rafael Saavedra por su paciencia y  
dedicación.**

# Indice

I. Introducción	1
1 Características generales del parásito	1
2 Ciclo de vida	5
3 Mecanismos de transmisión de <i>T. gondii</i>	7
4 Toxoplasmosis humana	8
4.1 Toxoplasmosis congénita o neonatal	8
4.2 Toxoplasmosis adquirida	9
5 Diagnóstico	9
6 Respuesta inmune a <i>T. gondii</i>	11
6.1 Inmunidad humoral	12
6.2 Inmunidad celular	13
6.2.1 Papel de los linfocitos T CD4+ y CD8+	14
6.2.2 Macrófagos	17
6.2.3 Células NK y LAK	18
6.3 Citocinas	19
6.3.1 Interferón- $\gamma$	19
6.3.2 Interleucina 2	21
6.3.3 Otras citocinas	22
7 Cepas de <i>Toxoplasma</i>	23
7.1 Cepa ts-4	24
II. Objetivos	26
III. Métodos	27
A) <i>Técnicas de cultivo</i>	27
1 Medios de cultivo y soluciones	27
1.1 Medio para cultivo de taquizoítos y fibroblastos	27
1.2 Medios de cultivo para células de bazo	27

1.3 Solución de lisis de eritrocitos	27
2 Antígeno soluble de <i>Toxoplasma</i> (TSA2)	28
3 Determinación de viabilidad de células	28
4 Congelación de células	28
5 Descongelación de células	29
6 Cultivo de fibroblastos	29
7 Cultivo de <i>T. gondii</i>	30
7.1 Cepa ts-4	30
7.2 Cepa RH	30
7.2.1 Cultivo <i>in vivo</i>	30
7.2.2 Cultivo <i>in vitro</i>	31
8 Obtención de células de bazo	31
9 Ensayo de transformación blastoide	32
<b>B) Manejo de animales</b>	33
10 Ratones	33
11 Inmunización de ratones	33
12 Reto	33
13 Transferencia adoptiva de células de bazo	34
<b>IV. Resultados</b>	35
1 Inmunización y reto	35
1.1 Primer experimento	35
1.2 Segundo experimento	37
1.3 Tercer experimento	39
1.4 Resumen de los experimento de Inmunización y reto	42
2 Ensayo de transformación blastoide	43
2.1 Conclusiones de los experimentos de transformación blastoide	46
3 Transferencia de protección	46

<b>3.1 Transferencia de protección por vía i.p.</b>	<b>47</b>
<b>3.2 Transferencia de protección por vía i.v.</b>	<b>50</b>
<b>V. Discusión</b>	<b>54</b>
<b>VI. Conclusiones</b>	<b>59</b>
<b>VII. Perspectivas</b>	<b>60</b>
<b>VIII. Referencias</b>	<b>61</b>

## Resumen

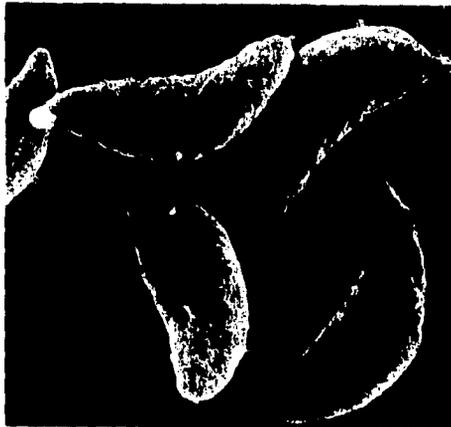
*Toxoplasma gondii* es un parásito intracelular que infecta aves y mamíferos. Es el agente causal de la toxoplasmosis, infección que puede afectar de manera importante a individuos inmunosuprimidos. En fetos humanos la infección transplacentaria por este coccidio provoca defectos congénitos que desembocan en secuelas neurológicas severas, mientras que en individuos con SIDA la toxoplasmosis es una de las enfermedades oportunistas más frecuentes.

Con el propósito de caracterizar la respuesta inmune generada por la utilización de una vacuna viva, ratones BALB/c fueron inoculados con la cepa mutante termosensible ts-4 de *T. gondii* y posteriormente retados con la cepa virulenta RH. Los resultados de este experimento muestran que la vacuna confiere a los ratones una inmunidad protectora frente al reto con una cepa altamente virulenta como lo es la RH. Se desarrolló un modelo de transferencia adoptiva de células de bazo inmunes para conocer el papel de la respuesta celular hacia la infección. De los resultados encontrados se deduce que la transferencia adoptiva de las células inmunes no se acompaña de una transferencia de protección hacia la cepa virulenta. Se discuten las posibles causas en la obtención de estos resultados.

# I. Introducción.

## 1 Características generales del parásito

*Toxoplasma gondii* es el parásito Intracelular obligatorio responsable de la toxoplasmosis, infección que puede afectar a casi todos los vertebrados de sangre caliente. Fue descrito inicialmente por Nicolle y Manceaux en 1909 [50], quienes lo aislaron del roedor africano *Ctenodactylus gondi* del cual tomaron el nombre específico. El género *Toxoplasma* proviene del griego *toxos* que significa arco y *plasma* que quiere decir forma, haciendo referencia a la silueta característica del taquizoíto (Fig. 1).



**Figura 1.** Micrografía electrónica de barrido de taquizoitos de *Toxoplasma gondii*. La flecha señala el conoide extendido en uno de los taquizoitos (tomado de [12]).

**El parásito se clasifica como sigue [11,12,41]:**

**Phylum:** Apicomplexa.

**Clase:** Sporozoa.

**Subclase:** Coccidiasina

**Orden:** Eimeriorina

**Familia:** Eimeridae <sup>1</sup>

**Género:** *Toxoplasma*

**Especie:** *gondii*

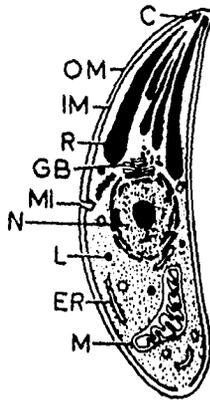
*T. gondii* posee una fase de reproducción sexual enteroepitelial circunscrita a la familia de los felinos que fungen como hospederos definitivos, y una fase asexual que ocurre en los hospederos intermediarios (así como en células no intestinales del hospedero definitivo). Este coccidio presenta tres estadios característicos, que son el taquizoíto, el bradizoíto y el esporozoíto.

Taquizoíto, o endozoíto o trofozoíto, son los términos utilizados para describir al estadio de rápida proliferación encontrado durante la fase aguda de la infección (Fig. 1). Mide 2-4 x 4-7  $\mu\text{m}$ . Si bien *T. gondii* es eucarionte con aparato de Golgi, ribosomas, mitocondrias y retículo endoplásmico, requiere de un habitat intracelular para su sobrevivencia y multiplicación. Las estructuras que lo caracterizan son: túnica

---

<sup>1</sup> En cuanto a su clasificación en familias y en subfamilias hay opiniones divergentes que han clasificado a este coccidio como miembro de las familias Eimeridae, Sarcocystidae o Toxoplasmatidae. He adoptado la clasificación propuesta por Levine (1977) y por Dubey y Beattie (1988).

o película formada por 3 membranas, citoesqueleto subpelicular compuesto por 22 microtúbulos, conoide anterior protráctil, 4 a 8 roptrias que terminan en el conoide, micronemas cercanos a las roptrias, y gránulos densos distribuidos en el citoplasma (Fig. 2) [53,80]. Su movimiento en espiral poco usual, la protrusión del conoide y la secreción de factores de las roptrias (factores facilitadores de penetración), permiten al parásito su entrada a la célula hospedera.



**Figura 2.** Diagrama esquemático del taquizoito. C, conoide; ER, retículo endoplásmico; GB, Aparato de Golgi; IM, membrana interna; L, lisosomas; M, mitocondria; MI, microporo; N, núcleo; OM, membrana externa; R, roptria, (tomado de [12]).

Se ha demostrado en macrófagos que mientras el parásito no se encuentre opsonizado con anticuerpos se genera una vacuola parasitófora. Sin embargo no hay unión de lisosomas a su membrana, ni se acidifica la vacuola (el taquizoito es sensible a los cambios de pH) [31]. Este forma de evasión a los mecanismos de defensa de

las células del hospedero, es compartido con otros parásitos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia psittaci* y *Legionella pneumophila* [3]. Una vez dentro de la célula hospedera el taquizoito se reproduce por endodiogenia, variante de la fisión binaria.

El término bradizoíto es usado para definir al estadio de proliferación lenta de *T. gondii*. El bradizoíto procede del taquizoito, si bien se desconoce el mecanismo de transformación. La vacuola parasitófora llena de bradizoítos da origen al quiste, forma infectiva usualmente presente en la infección crónica (latente). Al igual que los taquizoítos, los bradizoítos contienen vacuolas citoplasmáticas. Son relativamente resistentes a pepsina y tripsina, lo cual puede ser la causa de que aún cuando la pared quística se rompa, resistan el jugo gástrico después de la infección [80]. Los quistes generalmente se encuentran en músculo esquelético y cardíaco permaneciendo frecuentemente dentro de la célula hospedera, con lo cual no están expuestos al sistema inmune del hospedero. Se ha especulado que esta sea la razón por la cual no hay una respuesta inmune celular contra los quistes [14]. El bradizoíto es el único estadio capaz de iniciar una fase de diferenciación sexual en el hospedero definitivo para dar origen al esporozoíto infectivo. Así mismo es considerado como una posible fuente de recrudescencia de la infección en individuos inmunosuprimidos.

Por último, el esporozoíto es el estadio infectivo formado como resultado de la esporulación de un cigoto fertilizado dentro del oocisto, que es excretado en la

heces del felino. Mide aproximadamente  $2 \times 8 \mu\text{m}$ . Se ha comprobado que los ooquistes son resistentes a álcalis y detergentes comunes de laboratorio. Por otro lado se encontró que en condiciones favorables de humedad y temperatura han permanecido viables hasta por un año [14].

## **2 Ciclo de vida.**

El ciclo se inicia con la ingestión de bradizoítos o esporozoítos por parte del hospedero definitivo (cualquier miembro de la familia Felidae) (Fig. 3). En el epitelio intestinal del felino el parásito prolifera por esquizogonia y posteriormente ocurre la gametogonia. Una vez que los gametos han sido formados se fusionan para producir un cigoto que se rodea por una pared quística y es excretado en las heces como ooquiste. Ya en el ambiente, el cigoto se divide en dos esporoblastos binucleados y esporula bajo ciertas condiciones de humedad y temperatura para producir mediante una división esquizogónica 8 esporozoítos y dos cuerpos residuales, y se vuelve infectivo.

Cuando el hospedero intermedio ingiere un ooquiste esporulado su pared es digerida, liberando a los esporozoítos que inmediatamente infectan a las células intestinales para posteriormente diseminarse por torrente sanguíneo. El parásito ahora en forma de taquizoíto, estadio característico de una infección aguda, aparentemente entra a la célula por un receptor de laminina de la misma célula hospedera [32]. Esta podría ser la razón de que pueda invadir a casi cualquier célula nucleada

(se ha comprobado que también entra a eritrocitos pero no prolifera). El coccidio forma una vacuola parasitífera que no es acidificada, ni se fusiona con los lisosomas, por lo que el parásito no es eliminado. Se reproduce por una variante asexual denominada endodiogenia. Algunos taquizoítos se diferencian en bradizoítos, estadio en el que la velocidad de reproducción es menor a la observada en los taquizoítos; los bradizoítos forman los quistes y pueden permanecer a lo largo de la vida del hospedero produciendo una infección crónica latente. El ciclo se cierra cuando el hospedero definitivo ingiere quistes u oocistos [14].

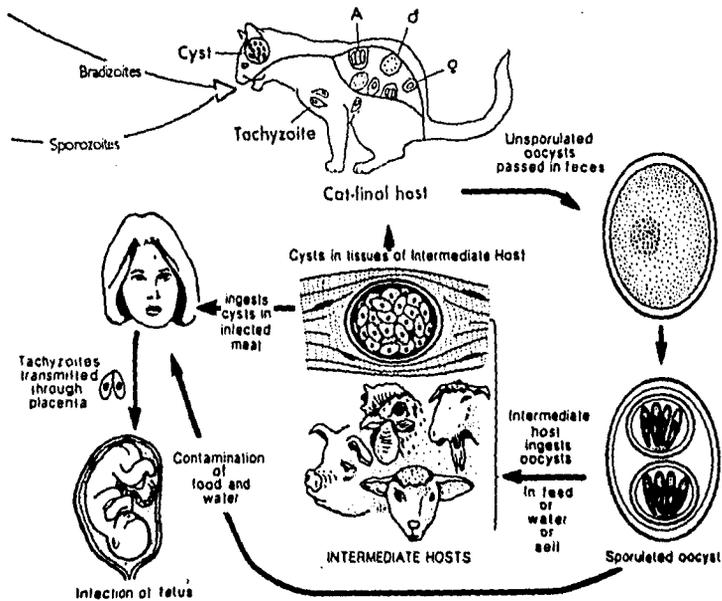


Figura 3. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. (Modificado de un esquema de [12]).

### 3 Mecanismos de transmisión de *T. gondii*.

Los mecanismos de transmisión intra e interespecies se resumen en la figura 4. Como resultado de este proceso se genera la toxoplasmosis adquirida o congénita.

La toxoplasmosis adquirida ocurre usualmente por la vía oral al ingerir carne cruda o mal cocida con quistes de toxoplasma (carnivorismo) así como agua o verduras con ooquistes (contaminación fecal). También puede ocurrir en el caso de trasplante de órganos, si este último proviene de una persona crónicamente infectada.

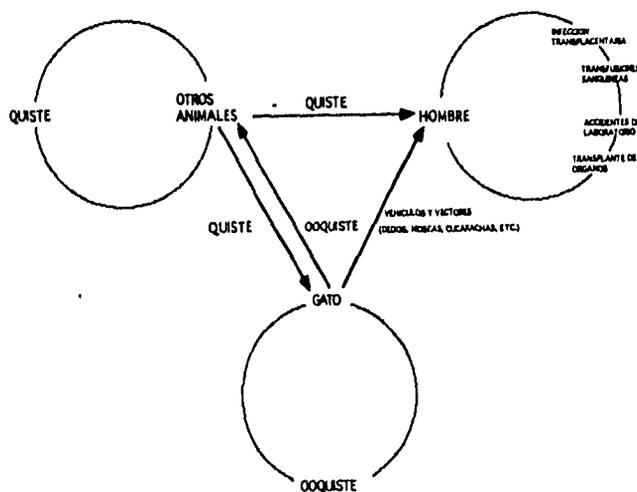


Figura 4. Mecanismos de transmisión de *T. gondii*. (Modificado de un artículo de Krick y Remington, 1978).

La toxoplasmosis congénita se produce cuando una madre se infecta con el parásito durante el curso del embarazo. El coccidio atraviesa la placenta e infecta al feto provocando en éste efectos clínicos variables que dependen del momento de la

infección [54].

#### **4 Toxoplasmosis humana**

Al igual que ocurre con otras infecciones, los síntomas de la toxoplasmosis incluyen un amplio espectro de manifestaciones clínicas que van desde una infección asintomática, hasta enfermedades con manifestaciones clínicas severas que en individuos inmunodeficientes pueden tener tasas de mortalidad elevadas. La infección humana es de dos tipos: toxoplasmosis congénita y adquirida.

##### **4.1 Toxoplasmosis congénita o neonatal**

La toxoplasmosis congénita o neonatal ocurre cuando una mujer se infecta por primera vez durante el curso del embarazo. Al cruzar la placenta, el parásito infecta también al feto, ocasionándole una serie de efectos clínicos que aparentemente están relacionados con el momento de la infección: mientras más temprano ocurra, más graves serán las consecuencias. Algunas evidencias sugieren que la infección puede dar lugar a abortos espontáneos, aunque esto no es concluyente. Por otro lado, se sabe que si la infección fetal ocurre después del tercer trimestre ésta generalmente es asintomática al momento del nacimiento pero se pueden presentar secuelas años más tarde. Los síntomas usualmente observados en la infección congénita son retinocoroiditis, fiebre, ictericia intensa, hepatoesplenomegalia, hidrocefalia, microcefalia, trastornos psicomotores u otros daños en el SNC y calcificación intracraneal [7, 27].

## **4.2 Toxoplasmosis adquirida**

En individuos inmunocompetentes la infección primaria es seguida por una respuesta inmune que usualmente controla la infección. La infección, en la mayor parte de tales individuos, es asintomática y persiste en forma de quistes de por vida. Cuando hay síntomas, estos son vagos e indefinidos e incluyen pirexia, encefalomielitis miálgica, linfadenopatía, retinocoroiditis grave (con uveítis posterior) y pérdida de peso [23]. Sin embargo se reconoce que el mayor porcentaje de personas infectadas son asintomáticas.

Si el sistema inmune del paciente presenta algún tipo de perturbación que altere sus funciones, entonces puede ocurrir una reactivación de la infección crónica. Esto es particularmente importante en individuos inmunosuprimidos, a consecuencia de tratamientos médicos específicos (por ejemplo, en casos de terapias de transplantes) o enfermos con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), ya que la infección puede diseminarse fácilmente con consecuencias fatales. Frecuentemente estos pacientes presentan encefalitis. Cuando ocurre una infección fulminante diseminada, también se pueden encontrar síntomas como erupción, fiebre alta, hepatitis miocarditis y neumonitis [24].

## **5 Diagnóstico**

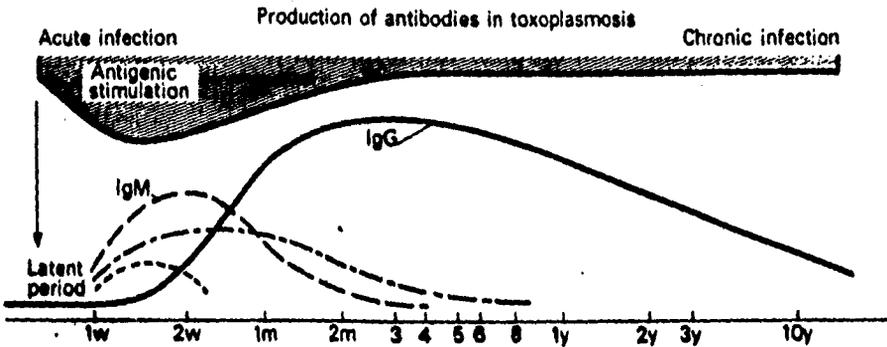
En vista de que no existen síntomas característicos que permitan diagnosticar

fácilmente la enfermedad, se ha hecho uso de pruebas serológicas para evidenciar la presencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma*. Las pruebas que actualmente se utilizan son: aglutinación de látex, hemaglutinación, ELISA (enzyme linked Immunosorbent assay), inmunofluorescencia y Sabin-Feldman.

La valoración de anticuerpos específicos en el suero del paciente puede proporcionar algunos indicios en relación al tiempo de ocurrencia de la infección. Por ejemplo, se sabe que después de una infección primaria, los primeros anticuerpos que aparecen son de clase IgM; poco más tarde se sintetizan anticuerpos IgG, que se pueden seguir detectando años más tarde (Figura 5). Las IgM usualmente dejan de detectarse después de 4 a 6 meses, de manera que su presencia indica una infección reciente o en curso [55]. Sin embargo, existen evidencias que sugieren que se pueden detectar IgM anti-*Toxoplasma* meses o incluso años después de la infección inicial, por lo cual este isotipo no se considera como un indicador absoluto de la fase aguda de la infección [75].

De todos los procedimientos anteriormente mencionados, el más informativo para el diagnóstico preliminar puede ser una combinación de pruebas de ELISA para IgG e IgM, que permite diagnosticar infecciones agudas y crónicas. Para el diagnóstico definitivo se utiliza la prueba de Sabin-Feldman, que mide el título de anticuerpos anti-*Toxoplasma* fijadores de complemento. Originalmente esta prueba implicaba la tinción del parásito con azul de metileno una vez que había sido expuesto al suero del

paciente [57]. Actualmente la prueba se ha modificado para observarse en microscopía de contraste de fases. Este procedimiento ha mostrado muy pocos resultados falsos negativos, por lo que es la prueba de referencia.



**Figura 5.** Cinética de la producción de anticuerpos anti-Toxoplasma. Anticuerpos IgM (— — —), detectables por la prueba IFA-IgM, alcanzan su título máximo a las pocas semanas después de la infección y pueden declinar a las pocas semanas (— — —) o persistir por meses (— · — · —). Anticuerpos IgG (————) detectables por las pruebas Sabin-Feldman o IFA convencional, alcanzan su máximo título a los 2 meses, permaneciendo constante por meses o años y después declinan, persistiendo usualmente como un pequeño título de por vida (w=semanas, m= meses, y= años). (Tomado de [38])

## 6 Respuesta inmune a *T. gondii*

Actualmente muchos de los mecanismos implicados en la respuesta inmune hacia *T. gondii* han sido estudiados de manera extensiva. Ello ha permitido reconocer que esta respuesta es muy compleja debido a la gran cantidad de componentes involucradas en ella. De manera general, se sabe que la infección con este coccidio induce una respuesta humoral y celular. Se ha probado que los anticuerpos anti-

*Toxoplasma* confieren sólo una protección parcial a la infección mientras que la inmunidad mediada por células juega un papel primordial como factor de resistencia en el hospedero afectado [16, 54].

### 6.1 Inmunidad Humoral

Aún cuando la toxoplasmosis da lugar a una respuesta inmune humoral, uno de los principales argumentos para cuestionar el papel de los anticuerpos como protagonistas en la resistencia hacia la infección es que el hábitat intracelular de este protozooario *in vivo*, lo protege de los efectos de los anticuerpos circulantes y del complemento [54]. Sin embargo, se ha podido demostrar en ratones que la transferencia pasiva de suero con altos títulos de anticuerpos anti-*T. gondii* confiere, a los animales inoculados, una protección parcial contra la infección [16]. Los anticuerpos usualmente detectados son IgM e IgG. Un estudio muy interesante [8], mostró la presencia de anticuerpos IgM, IgG e IgA en suero, leche y secreciones intestinales de ratón, después de una infección oral con una cepa no virulenta formadora de quistes.

A continuación se detallan algunas evidencias experimentales de aspectos funcionales de anticuerpos específicos anti-*Toxoplasma*. Con respecto a la IgM, se ha encontrado que estos anticuerpos naturales aislados de suero humano, aumentan la actividad fagocítica de neutrófilos a taquizoítos *in vitro* [37]. Los autores suponen que los anticuerpos IgM opsonizan al parásito, facilitando la eliminación del coccidio por estas células.

En relación con los anticuerpos IgA, se sabe que son abundantes en secreciones y que están relacionados particularmente con la protección de superficies mucosas constituyendo la primera línea de defensa inmune del hospedero contra cualquier organismo ajeno [74]. Mack y McLeod [43] encontraron que podían reducir la infección de enterocitos de intestino delgado de rata por *T. gondii*, en presencia de anticuerpos IgA1 aislados de suero de leche materna de mujeres infectadas. En un estudio posterior [48] se reportó la presencia de anticuerpos IgA anti-P30, antígeno de superficie mas abundante del taquizoito, en secreciones intestinales de ratones infectados perioralmente. Es conveniente mencionar sin embargo, que el antígeno P30 está presente únicamente sobre la superficie del taquizoito y no en bradizoitos y esporozoitos [29, 30] con lo cual el anticuerpo, de ejercer algún efecto, únicamente lo tendría durante el proceso de diseminación.

## **6.2 Inmunidad Celular**

La respuesta mediada por células a *T. gondii* es el principal componente de la inmunidad del hospedero a este parásito. Se ha demostrado la hipersensibilidad retardada en ratones y humanos crónicamente infectados y se ha observado una aparente correlación entre el desarrollo de la hipersensibilidad y el aumento en el título de anticuerpos anti-*Toxoplasma* [16, 31]. En hamsters y cobayos, la transferencia de fracciones completas de bazo y nódulos linfáticos de animales crónicamente infectados a animales virgenes, confiere a estos últimos, protección frente a un reto letal con

la cepa RH [31, 61]. En contraste, con este tipo de transferencia en el modelo murino, sólo se ha demostrado protección contra cepas de virulencia moderada [51, 61, 69].

### **6.2.1 Papel de los linfocitos T CD4+ y CD8+**

En general se reconoce que las infecciones parasitarias se encuentran frecuentemente asociadas a la estimulación preferencial de algunos subtipos de linfocitos T. Si bien la razón de que así ocurra no ha sido del todo esclarecida, existen suficientes evidencias experimentales que apuntan en esa dirección. Ello ha conducido de manera casi inevitable a modificar el papel que de manera tradicional se les ha asignado a las células CD4+ como cooperadoras, y a las CD8+ como células citotóxicas/supresoras. Esto ha sido posible después de reconocer que la citotoxicidad no es una función reservada a las células CD8+; que los subtipos T pueden caracterizarse en función de su producción de linfocinas, y que la supresión de las funciones efectoras, observada frecuentemente durante una enfermedad parasítica crónica, es un reflejo de la producción diferencial de citocinas [59].

De acuerdo a las linfocinas producidas, los linfocitos CD4+ se han dividido en células Th1 y Th2. Las células Th1 producen Interferón-gama (IFN- $\gamma$ ), interleucina-2 (IL-2) y factor de necrosis tumoral (TNF- $\beta$ ). Así mismo se favorece inmunidad mediada por células, y la producción de IgG2a en ratón. Las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, y participan en la regulación de la síntesis de IgE y en la eosinofilia.

Algunas citocinas como la IL-3, TNF- $\alpha$  y el factor de estimulación de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) son secretados en cantidades similares por ambos subtipos.

La mayoría de las células CD8<sup>+</sup> producen IFN- $\gamma$ . Estas células, además de tener una actividad citotóxica característica, juegan un papel activo en la regulación de la respuesta inmune. Evidencias muy recientes indican que se pueden distinguir dos subtipos de linfocitos CD8<sup>+</sup>: células tipo 1 y tipo 2. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> tipo 1 son citotóxicos, y están restringidos al MHC clase I. Las células T CD8<sup>+</sup> tipo 2 secretan IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5 e IL-10 y están restringidas al MHC clase II [33].

Diversos estudios han confirmado que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, están implicados en la respuesta inmune protectora a *T. gondii*. Un trabajo [69] mostró que la transferencia adoptiva de células de bazo de ratón inoculado con una cepa no virulenta de *T. gondii* inducía, en los animales receptores, una protección contra una infección subsecuente. Si las células transferidas eran pretratadas con anticuerpos monoclonales anti-CD8 y complemento, se eliminaba dicha protección. Por otra parte si se pretratan con anticuerpos anti-CD4, se disminuía parcialmente la actividad protectora de las células T inmunes. Las evidencias experimentales llevaron a los autores a concluir que el subtipo CD8<sup>+</sup> es el principal responsable de la resistencia hacia la infección producida por este coccidio, y que las células T CD4<sup>+</sup> participan en menor medida. Resultados similares fueron reportados en [12].

El papel de estos dos subtipos celulares en el control de la infección ha sido

demostrado en [51]. Los autores mostraron que la transferencia adoptiva de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> provenientes de ratones infectados con quistes del parásito inhibía la formación de quistes en el cerebro de los ratones receptores. También encontraron que se inducía un aumento en el título de IgG1 e IgG2a. Sus estudios les permitieron concluir que si bien las células CD8<sup>+</sup> son las principales células involucradas en la resistencia a *T. gondii*, las células CD4<sup>+</sup> juegan un papel importante durante la fase aguda de la infección. El papel de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en la prevención de la reactivación de la infección crónica latente fue demostrado en [18] mediante el uso simultáneo de anticuerpos monoclonales anti-CD4 y anti-CD8. Así mismo encontraron que ambos subtipos producían IFN- $\gamma$ , pero que sólo las células CD4<sup>+</sup> producían IL-2 en respuesta a los antígenos del parásito. Por otra parte, estudios recientes demuestran que la transferencia adoptiva de una clona de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, que prolifera en respuesta a P-30 o SAG-1, confiere protección contra una infección letal [36].

Una de las funciones que clásicamente se les ha asignado a las células T CD8<sup>+</sup> es la actividad citotóxica. Por ejemplo, se ha demostrado que células de bazo de ratón inoculado con una cepa mutante de *T. gondii*, son capaces de lisar *in vitro* células de mastocitoma y macrófagos infectados con el parásito, actividad restringida por el MHC I [20, 66]. Sin embargo, existen reportes que hablan de la existencia de clonas T CD8<sup>+</sup> murinas y humanas específicas de P30, secretoras de IFN- $\gamma$  e IL-2 capaces de lisar taquizoítos extracelulares *in vitro* sin restricción aparente por el MHC I [34,35].

### 6.2.2 Macrófagos

De manera general se sabe que los macrófagos participan en reacciones inmunitarias como células presentadoras de antígenos (APC); son las células efectoras por excelencia en la resistencia en contra de agentes infecciosos y contra tumores, intervienen en respuestas inflamatorias, regulan la respuesta celular y reparan el daño ocasionado por los procesos inflamatorios [73].

Uno de los mecanismos de defensa inespecíficos asociados a la infección con *Toxoplasma* tiene que ver con la activación de macrófagos [68]. Un estudio realizado en 1985 [63] demostró que la activación de macrófagos *in vitro* daba lugar a dos mecanismos de eliminación intracelular del parásito, que podían ser dependientes o independientes de productos del metabolismo oxidativo. Los autores encontraron además que esta actividad también inhibía la replicación de aquellos organismos que sobrevivían la actividad microbicida inicial.

Se ha demostrado que el IFN- $\gamma$  es la linfocina responsable de la protección contra *T. gondii*. El mecanismo de acción es mediante la inducción de la actividad microbicida de los macrófagos. Black y cols. [4] reportaron que al incubar macrófagos alveolares con IFN- $\gamma$  recombinante *in vitro*, se inhibía la replicación intracelular de *T. gondii*. Encontraron resultados análogos al administrar esta citocina *in vivo*. Por otra parte, en un estudio [47] se menciona que las células T activadas son capaces de estimular tanto el metabolismo oxidativo como la actividad antimicrobiana de

macrófagos a través de la liberación de IFN- $\gamma$ .

### 6.2.3 Células NK y LAK

Las evidencias que actualmente existen en relación al papel de las células NK como mediadores de una actividad protectora contra *T. gondii*, indican que ésta se efectúa a través de la producción de IFN- $\gamma$ . Sher y cols. [62] trabajando con ratones con inmunodeficiencia severa combinada (ratones SCID), esto es, ratones sin células B ni T, encontraron que podían inducir la producción de IFN- $\gamma$  por las células NK *in vitro*. Esta respuesta requería de la presencia de células adherentes y de TNF- $\alpha$ . Un estudio similar [26] mostró que en estos ratones, la infección con *Toxoplasma* indujo un aumento tanto en los niveles de IFN- $\gamma$  como en la actividad de las células NK. Ambos estudios coinciden en señalar que una producción temprana de IFN- $\gamma$  por parte de estas células podría activar mecanismos de defensa no específicos como macrófagos. Esta actividad secretora de las células NK también podría jugar un papel importante en la selección del subtipo CD4<sup>+</sup> originado después del contacto inicial con el parásito. Según Sher y cols. [63], hay pruebas experimentales de que el IFN- $\gamma$  promueve la expansión de células Th1 y suprime la proliferación de las Th2, con lo que su presencia temprana como producto de las células NK, podría favorecer el desarrollo de linfocitos Th1 y la producción de las citocinas asociadas a la inmunidad mediada por células.

Por otra parte, en 1986 se publicó un trabajo [21] que prueba que células NK

de ratón infectado son citotóxicas hacia taquizoitos extracelulares *in vitro*. Los autores plantean que esta actividad podría ocurrir *in vivo*, actuando como factor de resistencia a la infección durante la fase aguda de la enfermedad. Un estudio publicado recientemente [26], mostró que no hay actividad citotóxica de células NK provenientes de ratones SCID hacia células infectadas *in vitro*.

En relación a las células LAK (células "asesinas" activadas por linfocinas), un estudio realizado por Subauste y cols. [67] mostró que al incubar linfocitos de sangre periférica de donadores seronegativos a *Toxoplasma* con IL-2. Encontraron precursores y efectores de células LAK con actividad citotóxica anti-*Toxoplasma* que eran linfocitos T y células NK. Característicamente estas células LAK mostraron propiedades adherentes.

### 6.3 Citocinas

Muchas funciones de las células T se encuentran mediadas a través de la producción de una serie de proteínas conocidas comúnmente con el nombre de citocinas. Estas se encuentran involucradas en fenómenos de crecimiento celular, inflamación, inmunidad, diferenciación y reparación [22]. El papel que desempeñan estas citocinas en la respuesta inmune a la toxoplasmosis ha sido profusamente investigado [1]. Ello ha permitido reconocer su importancia como reguladores de la respuesta inmune celular hacia este parásito.

### 6.3.1 Interferón- $\gamma$

Esta citocina ejerce diversos efectos sobre una gran variedad de células inmunocompetentes, destacando su papel como activador de monocitos y macrófagos. Además, se sabe que funciona como factor regulador de la expresión de los antígenos MHC I y MHC II, controla los isotipos de inmunoglobulinas producidos por las células B activadas y puede ejercer un efecto inmunomodulador en la generación de otras citocinas [76].

En 1991, Gazzinelli y cols. [17] mostraron que células de bazo de ratones inmunizados con una cepa atenuada de *T. gondii*, estimuladas *in vitro* con antígeno de este parásito, producían IFN- $\gamma$  y que estas células eran predominantemente linfocitos T CD4<sup>+</sup>; también encontraron que era producida por linfocitos T CD8<sup>+</sup>, aunque en cantidades significativamente menores. Recientemente se publicó un trabajo en el que se indujo la producción de IFN- $\gamma$  en células NK de ratones SCID [62]. Esta respuesta requería de la presencia de células adherentes y de TNF- $\alpha$ .

Se sabe que el IFN- $\gamma$  es capaz de activar a macrófagos que pueden matar al coccidio [4]. En un estudio elaborado por McCabe y cols. [44] en el que se administró IFN- $\gamma$  murino recombinante, se demostró que esta citocina es capaz de proteger a los animales en contra de un reto con una cepa no virulenta. Al infectar con taquizoítos de la cepa RH macrófagos peritoneales obtenidos de los ratones inoculados con esta citocina, se observó una inhibición de la replicación del parásito. Esta actividad

parece estar asociada con un aumento en la respuesta de anticuerpos hacia el parásito; según los autores este efecto podría ser producto de la activación de los macrófagos. En este sentido, estudios hechos en monocitos humanos apuntan a que esta citocina puede ser un activador importante de la fagocitosis mononuclear y su administración *in vivo* puede activar el metabolismo oxidativo de los macrófagos [31].

La importancia de la producción endógena de IFN- $\gamma$  fue examinada por Suzuki y cols. [70]. Estos autores encontraron que al tratar ratones infectados con una cepa no virulenta de toxoplasma con un anticuerpo monoclonal anti IFN- $\gamma$ , se inhibía la activación de macrófagos y los animales morían, mientras que los ratones no tratados con el anticuerpo sobrevivían desarrollando una infección crónica.

### **6.3.2 Interleucina-2**

La IL-2 es elaborada por células T activadas. Su función principal es la activación de una gran variedad de células del sistema inmune que incluyen a células T cooperadoras y citotóxicas, células B, NK, LAK y macrófagos. La activación de monocitos por la IL-2 induce la secreción de IL-1, aumenta la citotoxicidad mediada por monocitos, promueve la proliferación de los precursores de macrófagos e incrementa la fagocitosis. Por otro lado, la respuesta de las células NK a la IL-2 se caracteriza por la producción de IFN- $\gamma$ , proliferación, y un aumento en la actividad citolítica [10].

Beaman y cols. [1], citan un trabajo en el que la administración de IL-2 humana recombinante a ratones infectados con una cepa moderadamente virulenta de *T. gondii*, aumentó su supervivencia. También se observó un aumento en la actividad de las células NK y una proliferación específica de linfocitos, sin embargo esta respuesta no se acompañó de un aumento en la actividad parasiticida de los macrófagos. Gazzinelli y cols. [17] reportaron que células de bazo de ratón vacunado con una cepa atenuada del coccidio producen IL-2 cuando son estimuladas *in vitro* con antígeno soluble de *Toxoplasma* o concanavalina A, siendo estas células básicamente linfocitos T CD4+.

### 6.3.3 Otras citocinas

**IL-6:** Beaman y cols. [1] reportaron la existencia de algunos estudios que demuestran que la IL-6 aumenta la replicación intracelular de *Toxoplasma* después de la invasión de macrófagos *in vitro*. También mencionan un aumento en los niveles de esta citocina durante el curso de una infección letal con la cepa patógena RH. Un estudio muy reciente [71] muestra que al tratar ratones con encefalitis toxoplásmica con un anticuerpo monoclonal anti-IL-6, se reducen de manera importante los focos de inflamación aguda causados por la proliferación de taquizoítos y el número de quistes en el cerebro de los animales.

**TNF- $\alpha$ :** Según Subauste y Remington [68], los resultados de los estudios acerca del papel del TNF- $\alpha$  en la toxoplasmosis murina son contradictorios. Sin embargo,

mencionan un reporte en el que al administrar un anticuerpo neutralizante a ratones infectados con una cepa avirulenta de *Toxoplasma*, se originaba la muerte de los animales. Así mismo señalan que el TNF- $\alpha$  endógeno parece jugar un papel crítico en la inducción, por el IFN- $\gamma$ , de la actividad microbicida de los macrófagos hacia el coccidio.

**IL-10 e IL-12:** Un estudio publicado recientemente [26] mostró que células de bazo de ratones SCID infectados o no infectados con *Toxoplasma*, disminuyen su capacidad de producción de IFN- $\gamma$  en presencia de IL-10 exógena. Al agregar un anticuerpo anti-IL-10 a estas células *in vitro*, se aumentó la producción de IFN- $\gamma$ , en particular de las células provenientes de ratones infectados. Según los autores, esta podría ser la primera evidencia que sugiere el papel regulatorio de la IL-10 endógena en la producción de IFN- $\gamma$  por parte de células NK en la toxoplasmosis. Por otro lado encontraron que la combinación de IL-12 y TNF- $\alpha$  induce un aumento en la producción de IFN- $\gamma$  por células de bazo, especialmente aquéllas derivadas de ratones no infectados. Para valorar la importancia de la IL-12 endógena, trataron a los animales infectados con un anticuerpo policlonal anti IL-12, provocando una mortalidad temprana. Ello permitió a los autores suponer que esta citocina podría controlar la respuesta inmune protectora *in vivo* a *T. gondii* como reguladora de la producción de IFN- $\gamma$  por células NK.

## **7 Cepas de Toxoplasma**

Una de las propiedades más utilizadas para caracterizar a las distintas cepas

de *T. gondii* es su virulencia, entendida como la dosis con que un animal sucumbe a la infección [64]. Generalmente se considera que si una cepa es virulenta en ratones debería serlo también para otros animales [14]. Por ejemplo, se sabe que la cepa RH es altamente virulenta para cerdos, conejos, aves, monos rhesus, ratones e inclusive para el hombre [56], mientras que cepas como la Beverley, C56 o la Me49 son menos virulentas o francamente avirulentas produciendo usualmente infecciones crónicas o latentes.

### **7.1 Cepa ts-4**

Actualmente la posibilidad de elaborar una vacuna contra la toxoplasmosis parte del hecho de que una vez que un individuo inmunocompetente es infectado se vuelve resistente a la reinfección. En este sentido se ha probado el uso de vacunas vivas o muertas de *T. gondii* para generar una respuesta inmune del hospedero intermediario hacia el parásito. De estas dos, la vacunación con parásitos vivos induce una mayor protección, sin embargo tiene el inconveniente de originar una infección crónica que puede reactivarse posteriormente por algún efecto inmunosupresor en el hospedero y dar lugar a una infección aguda. De ahí proviene el interés de encontrar organismos que al ser inoculados no generen una infección crónica [25, 77].

Pfefferkorn [52] obtuvo una serie de mutantes termosensibles a partir de la cepa silvestre RH. Estas mutantes se generaron por mutagénesis con la *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina, que había probado su utilidad como inductor de mutaciones

termosensibles en cultivos de células de mamífero in vitro, y cultivo de los organismos tratados a 33 °C. Sorprendentemente, una de las siete clonas mutantes aisladas, la ts-4, no persistió en el huésped dos meses después de ser inoculada y tampoco se encontraron quistes de ella. La capacidad inmunogénica de la cepa no es alterada y al inocularla en ratones puede protegerlos en contra de un reto con la cepa RH, cuya característica principal es su alta virulencia [77].

La protección conferida por la cepa ts-4 al reto con cepas de distintos grados de virulencia depende del modelo animal y de su susceptibilidad a la infección, de la concentración y número de dosis de inoculación, de las vías de inmunización y reto así como del estadio del coccidio [46]. Por ejemplo, esta vacuna ha probado su eficacia en ratones, hamsters y conejos [78], sin embargo en cerdos [42] y especies filogenéticamente relacionadas al hombre como el mono *Aotus lemurinus* [13] no ha sido utilizada con éxito.

## **II. Objetivos**

a) Comprobar en nuestras condiciones de laboratorio que la inoculación de ratones con la cepa termosensible de *Toxoplasma gondii* ts-4 induce una respuesta inmune capaz de protegerlos de un reto con la cepa virulenta RH.

b) Desarrollar un modelo *in vivo* de transferencia de linfocitos anti-*Toxoplasma gondii* para el estudio de la inmunidad celular protectora contra la toxoplasmosis murina.

### **III. Métodos**

#### **A) Técnicas de Cultivo**

##### **1 Medios de cultivo y soluciones**

###### **1.1 Medio para cultivos de taquizoítos y fibroblastos**

El medio base utilizado para los cultivos de fibroblastos y taquizoítos fue el DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 1 mM de piruvato de sodio, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 50 U/ml de antibiótico (penicilina-estreptomicina), 2 mM de glutamina, y 10% (DMEM-10) ó 1% (DMEM-1) de suero fetal bovino (FCS) descomplementado (30 min., 56 °C).

###### **1.2 Medio de cultivo para células de bazo**

Para el ensayo de proliferación de linfocitos T se utilizó el medio de Iscove (Iscove's Modification Eagle's Medium-GIBCO) suplementado con 0.1 mM de aminoácidos no esenciales,  $5 \times 10^{-5}$  M de  $\beta$ -mercaptoetanol, 50 U/ml de penicilina-estreptomicina, 1 mM de piruvato de sodio y 10% de FCS.

###### **1.3 Solución de lisis de eritrocitos**

Se disuelven 2.08 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.25 g de  $\text{KHCO}_3$ , 0.009 g de EDTA 2Na en 250

ml de agua megapura. Posteriormente se pasa la solución por un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  (MILLIPORE) y se esteriliza en autoclave.

## **2 Antígeno soluble de *Toxoplasma* (TSA2).**

Se ajusta la concentración de taquizoítos de la cepa Wiktor de *T. gondii* a  $10^9$  células/5 ml en PBS a 4 °C . Después se sonica en un homogenizador ultrasónico (Cole-Parmer Instruments), sobre una mezcla de hielo y etanol, dándose 10 pulsos de 30 seg. a 40 W en intervalos de 30 seg. Se centrifuga a 10,000 g en un rotor JA20, 30 min. a 4 °C. Posteriormente se recupera el sobrenadante, se esteriliza por filtración sobre membrana con poros de 0.22  $\mu\text{m}$  y se cuantifica la concentración de proteínas por el método de Bradford. Se guardan alícuotas a -80 °C .

## **3 Determinación de viabilidad de células**

La viabilidad de los taquizoítos y células de bazo se determinó por tinción con azul tripano 0.2% (GIBCO) en un hemocitómetro.

## **4 Congelación de células**

Para preservar las células utilizadas en este proyecto, se conservan a -200 °C en N<sub>2</sub> líquido. Se centrifuga la suspensión celular a 469 g (1500 rpm) durante 5 min., el botón se resuspende a la concentración adecuada en medio de congelación (FCS-dimetil sulfóxido, 90 :10, v : v) a 4 °C y se pasa 1 ml por vial de congelación (COSTAR)

previamente etiquetado. La muestra se enfría en un ultracongelador dentro de una caja de unisel cerrada hasta llegar a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se pasa al tanque de  $\text{N}_2$  líquido, pudiendo mantenerse indefinidamente de esta manera.

### **5 Descongelación de células**

Para descongelar las células preservadas a  $-200\text{ }^{\circ}\text{C}$  se saca la muestra deseada del tanque de  $\text{N}_2$  y se descongela en baño María a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se adicionan 10 ml del medio de cultivo completo a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  correspondiente al del tipo de células descongeladas, y se centrifuga a 46 g durante 5 min. La muestra se lava otra vez, se resuspende en 5 ml de medio y se siembra.

### **6 Cultivo de fibroblastos**

Los fibroblastos humanos utilizados para el cultivo de los taquizoítos de las cepas RH y ts-4 fueron donados generosamente por el Dr. Lino Díaz de León del Departamento de Biología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Se cultivan en cajas de  $25\text{ cm}^2$  (COSTAR) en 5 ml de medio DMEM-10, a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  en presencia de 5% de  $\text{CO}_2$  hasta observar confluencia. Las células se separan con 1 ml de tripsina-EDTA (GIBCO) a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  en PBS o HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution-GIBCO) sin  $\text{Ca}^{++}$  ni  $\text{Mg}^{++}$  y se diluyen 1:3 en DMEM-10.

## **7 Cultivo de *T. gondii***

### **7.1 Cepa ts-4**

Los taquizoítos de la cepa ts-4 se cultivan en pasajes seriados en fibroblastos humanos confluentes, con medio DMEM-1. Su viabilidad fue confirmada antes de cada pasaje a fibroblastos o de su inoculación a los ratones, y siempre fue  $\geq 85\%$ . El cultivo se incuba a 33 °C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>. Se ha observado que los taquizoítos proliferan más rápido si se hace un cambio con medio fresco a los dos días de cultivo. Se resiembran al observar lisis de los fibroblastos con taquizoítos en suspensión.

### **7.2 Cepa RH**

#### **7.2.1 Cultivo *in vivo***

Los taquizoítos de la cepa RH conservados hasta el momento de su uso a -200 °C en N<sub>2</sub> líquido se descongelan en baño María a 37 °C, se lavan 2 veces en PBS centrifugando a 2000 rpm durante 10 minutos y se inoculan 5-10x10<sup>6</sup> de parásitos a ratones CD1 de 6 a 8 semanas vía i.p. en un volumen de 300 µl. Cinco días después se sacrifican y se hace un lavado i.p. con 5 ml de PBS-heparina. Se recupera la suspensión y se inoculan volúmenes iguales a otros dos ratones por la misma vía. A los dos días se recuperan los taquizoítos intraperitoneales por lavado con PBS y se

hace otro pasaje *in vivo* inoculando  $5-10 \times 10^6$  parásitos, como paso previo a su cultivo *in vitro*. La cepa RH se puede mantener *in vivo* por pasaje cada 2 días.

### **7.2.2 Cultivo *in vitro***

Los taquizoítos obtenidos por lavado de la cavidad peritoneal de ratones con 3 días de infección, se lavan con DMEM-1 y se cultivan *in vitro* en pasajes seriados en fibroblastos humanos, con el mismo medio suplementado. Se confirma su viabilidad antes de cada pasaje a fibroblastos o de su inoculación a los ratones, siendo siempre  $\geq 85\%$ . El cultivo se incuba a  $37^\circ\text{C}$  en presencia de  $5\%$  de  $\text{CO}_2$  hasta observar la lisis de los fibroblastos. Los taquizoítos de la cepa RH utilizados a partir del segundo experimento de inmunización fueron cultivados en pasajes seriados hasta alcanzar el pasaje #13 y se conservaron a  $-200^\circ\text{C}$ . Posteriormente se descongelan a conveniencia y se cultivan hasta alcanzar el pasaje #15 en que son utilizados para el reto.

### **8 Obtención de células de bazo**

Se sacrifican los ratones por dislocación. Se sumergen en alcohol de  $96^\circ$  y se seca el excedente. Se coloca al animal sobre su lado derecho y con instrumental flameado en alcohol, se hace una incisión en la piel de lado izquierdo de aproximadamente 2.5 cm de largo entre la última costilla y la articulación de la cadera. Se corta el peritoneo exponiendo el bazo y se saca suavemente de la cavidad visceral. Se corta el mesenterio y el tejido conectivo y se extrae el órgano colocándolo en una

caja de Petri con 5 ml de RPMI 1640 (GIBCO). Con una jeringa de 5 cc llena con el mismo medio se perfunde el bazo colectando el contenido en la caja. Se lava una vez a 1500 rpm durante 5 min. resuspendiendo en 1.5 ml de solución de lisis de eritrocitos por cada bazo. Se incuba otros 5 min agitando constantemente y posteriormente se hacen dos lavados con RPMI centrifugando en las mismas condiciones. Se resuspende en medio de Iscove completo y se determina viabilidad con azul tripano.

### **9 Ensayo de transformación blastoide.**

Después de determinar su viabilidad, las células de bazo se ajustan a una concentración de  $10^6$  y  $2 \times 10^6$  células/ml y se siembran por triplicado en un volumen de 100  $\mu$ l, en pozos de placas de 96 pozos (COSTAR). Se adicionan 100  $\mu$ l de TSA2 a la concentración adecuada diluido en medio de Iscove completo por pozo, o 100  $\mu$ l de concanavalina A (SIGMA) a 1  $\mu$ g/ml en medio de Iscove completo. Se incuba a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Se cosecha a los 3, 4, 5 y 6 días de iniciado el experimento agregando 0.5  $\mu$ Ci de <sup>3</sup>H-timidina (45 Ci/mmol, Amersham) en 20  $\mu$ l de medio de Iscove completo por pozo 18 horas antes de cosechar. Se adiciona líquido de centelleo y se mide la radioactividad en un contador  $\beta$  (Packard).

## **B) Manejo de animales**

### **10 Ratones**

Se utilizan ratones de las cepas BALB/c AnN y CD1 mayores de 6 semanas criados en el Bioterio del Instituto Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M.

### **11 Inmunización de ratones**

Se obtiene el sobrenadante del cultivo de la cepa ts-4 con taquizoítos en suspensión, se centrifuga a 2000 rpm 10 min. y el botón se resuspende en 15 ml de PBS. Se lava en las mismas condiciones con PBS y se ajusta la concentración de taquizoítos a las dosis de inmunización. Se inoculan ratones BALB/c hembras vía i.p. con  $2 \times 10^4$  taquizoítos en 100  $\mu$ l de PBS, dándose dos refuerzos más de  $2 \times 10^5$  taquizoítos a los 30 y 45 días posteriores.

### **12 Reto**

Los taquizoítos de la cepa RH cultivados en pasaje 15 se manipulan de manera similar que en el apartado anterior. El reto por vía s.c. se hace a los 60 días de iniciado el esquema de inmunización. Los ratones testigo se inyectan con PBS por esta misma vía. La calendarización de este protocolo dependió básicamente de la disponibilidad de las cepas de *T. gondii* y de los ratones.

### **13 Transferencia adoptiva de células de bazo**

Se obtienen las células de bazo de acuerdo a la metodología previamente descrita en el apartado 3.8. Las células se resuspenden en HBSS y se hace la transferencia inyectando dosis de  $3 \times 10^6$ ,  $10^7$  y  $3 \times 10^7$  células/ratón vía i.v., en un volumen no mayor de 250  $\mu$ l. Dos horas después de haber efectuado la transferencia adoptiva de células de bazo, se hace el reto por vía s.c con 6000 taquizoitos de la cepa RH en pasaje 15. La condición de los ratones se registró diariamente durante un mes.

## IV. Resultados

### 1 Inmunización y reto

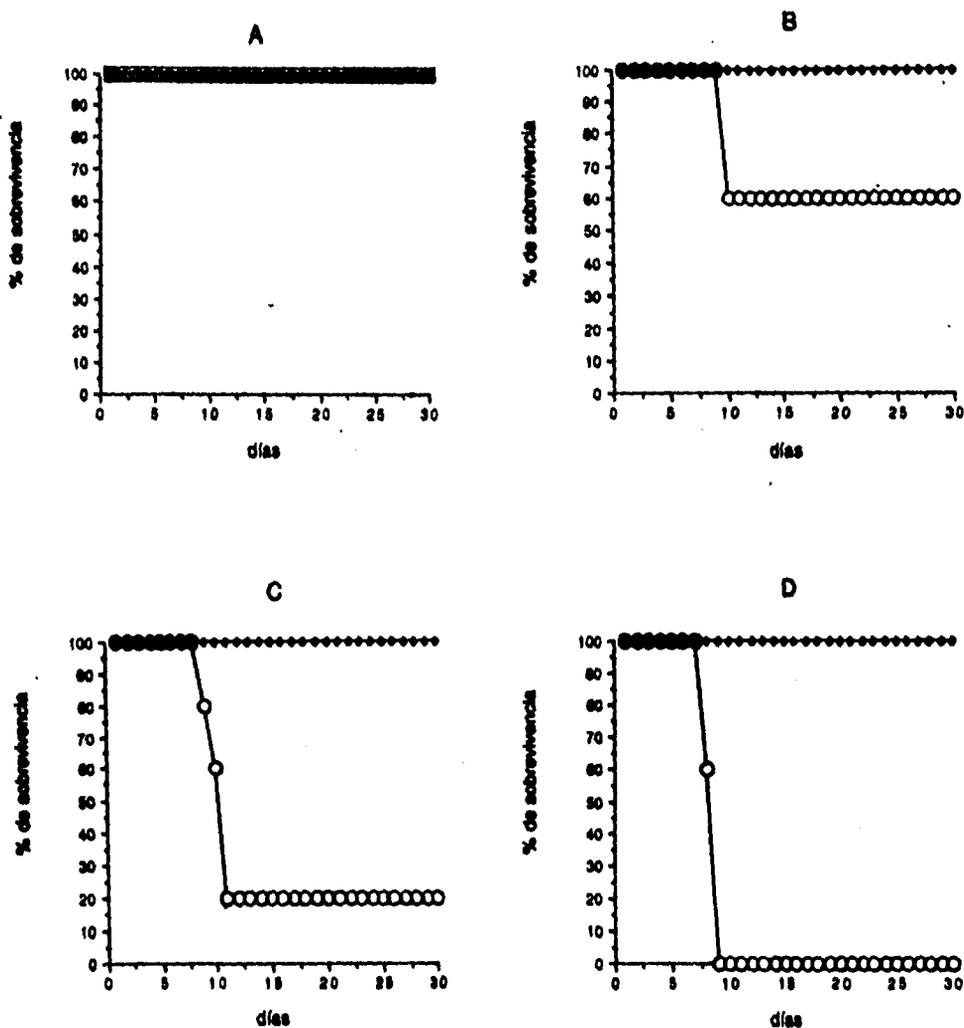
El objetivo de este experimento consistió en probar que la Inmunización de ratones con la cepa termosensible de *Toxoplasma gondii* ts-4, no virulenta, es capaz de inducir una respuesta inmune protectora contra un reto con la cepa virulenta RH. Así mismo se trató de establecer la dosis mínima de reto de la cepa RH en la que los ratones inmunizados resistieran el reto mientras que los no inmunizados perecieran.

#### 1.1 Primer experimento.

El primer experimento siguió el siguiente esquema de inmunización:

# de inmunización	día	Inóculo	
		Grupo vacunado	Grupo testigo
1a.	0	$2 \times 10^4$ taq. ts-4/100 $\mu$ lPBS	100 $\mu$ l PBS
2a.	35	$2 \times 10^5$ taq. ts-4/100 $\mu$ lPBS	100 $\mu$ l PBS
3a.	51	$2 \times 10^5$ taq. ts-4/100 $\mu$ lPBS	100 $\mu$ l PBS

Al día 72 se hizo el reto s.c. usando 3 dosis de taquizoítos RH: 200, 2,000 y 20,000 cuyo número de pasaje no fue registrado. Los resultados de este experimento



**Figura 6.** Efecto de la inmunización y reto en la sobrevivencia de ratones BALB/c (Experimento 1). Lotes de cinco ratones fueron inmunizados con la cepa ta-4 de *T. gondii*, y retados posteriormente con la cepa virulenta RH al día 72. A. —□—, ratones "inmunizados" con PBS y "retados" con PBS; —■— ratones inmunizados y "retados" con PBS. B. —●—, ratones inmunizados y retados con 200 taquizoítos RH; —○— ratones no inmunizados y retados a la misma dosis. C. —●—, ratones inmunizados y retados con 2,000 taquizoítos RH; —○— ratones no inmunizados y retados a la misma dosis. D. —●—, ratones inmunizados y retados con 20,000 taquizoítos RH; —○— ratones no inmunizados y retados a la misma dosis.

se muestran en la figura 6. Los ratones inmunizados con la cepa ts-4 sobrevivieron durante el curso del experimento al reto con las 3 dosis de taquizoitos RH. Todos los ratones testigos retados con la dosis de  $2 \times 10^4$  taquizoitos RH murieron al día 9; los ratones retados con  $2 \times 10^3$  taquizoitos presentaron un 20% de sobrevivencia, mientras que 60% de los animales retados con 200 taquizoitos sobrevivieron al reto con la cepa virulenta.

## 1.2 Segundo Experimento

Con el propósito de confirmar los resultados obtenidos, se repitió el protocolo del experimento anterior quedando el esquema de inmunización como sigue:

# de inmunización	día	Inóculo	
		Grupo vacunado	Grupo testigo
1a.	0	$2 \times 10^4$ taq. ts-4/100 $\mu$ IPBS	100 $\mu$ l PBS
2a.	30	$2 \times 10^5$ taq. ts-4/100 $\mu$ IPBS	100 $\mu$ l PBS
3a.	44	$2 \times 10^5$ taq. ts-4/100 $\mu$ IPBS	100 $\mu$ l PBS

Para contar con condiciones de reto que fueran reproducibles, se escogió de manera arbitraria el pasaje *in vitro* #15 de taquizoitos RH para este experimento y los subsecuentes. Esto se decidió en base a que hay antecedentes que mencionan una

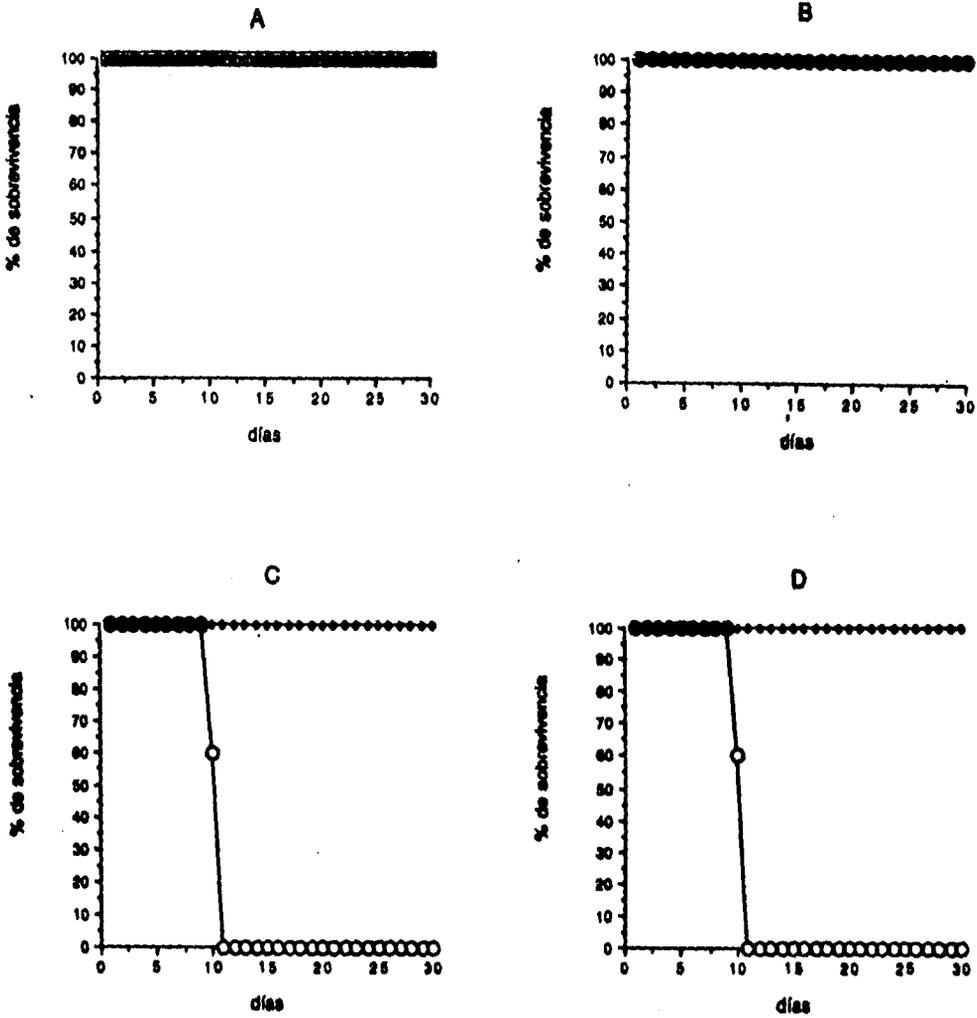


Figura 7. Efecto de la inmunización y reto en la sobrevivencia de ratones BALB/c (Experimento 2). Lotes de cinco ratones fueron inmunizados con la cepa Ia-4 de *T. gondii*, y retados posteriormente con la cepa virulenta RH al día 63. A. —□—, ratones "inmunizados" con PBS y "retados" con PBS; —●—, ratones inmunizados y "retados" con PBS. B. —◆—, ratones inmunizados y retados con 600 taquizoitos RH; —○— ratones no inmunizados y retados a la misma dosis. C. —◆—, ratones inmunizados y retados con 20,000 taquizoitos RH; —○— ratones no inmunizados y retados a la misma dosis. D. —◆—, ratones inmunizados y retados con 600 taquizoitos RH; —○— ratones no inmunizados y retados a la misma dosis.

disminución en la virulencia de esta cepa a medida que aumenta el número de pasaje *in vitro*. Con este fin se expandió la cepa RH y se congeló en el pasaje #13. Posteriormente se descongeló y se cultivó en fibroblastos humanos hasta alcanzar el pasaje #15, mismo que fue utilizado en todos los retos subsecuentes. En este experimento se hizo el reto al día 63 usándose dosis de  $6 \times 10^2$ ,  $6 \times 10^3$  y  $2 \times 10^4$  taquizoítos RH. Se registró la condición de los ratones diariamente durante un mes.

Los resultados en la figura 7 muestran que la sobrevivencia de los ratones inmunizados y retados es de un 100% a lo largo del experimento, independientemente de la dosis del reto. Los ratones no inmunizados y retados con las dosis de  $6 \times 10^3$  y  $2 \times 10^4$  taquizoítos RH murieron 11 días después de haber sido retados. El comportamiento de sus curvas de sobrevivencia es idéntico pues ambos lotes decayeron a un 60% al día 10 hasta llegar a 0% al día 11. Los ratones no inmunizados y retados con la dosis de 600 taquizoítos RH sobrevivieron a lo largo del experimento. Así mismo se obtuvo el 100% de sobrevivencia en los lotes testigos "inmunizados y retados" con PBS (PBS/PBS) e inmunizados con ts-4 y "retados" con PBS (ts-4/PBS).

### 1.3 Tercer experimento

Se hizo una repetición más del experimento de inmunización con el propósito de definir claramente una dosis de reto mínima, en vista de lo encontrado en el lote de

ratones no inmunizado y retado con 600 taquizoítos RH del experimento anterior. El esquema de inmunización tuvo la siguiente calendarización:

# de inmunización	día	Inóculo	
		Grupo vacunado	Grupo testigo
1a.	0	$2 \times 10^4$ taq. ts-4/100 $\mu$ IPBS	100 $\mu$ l PBS
2a.	30	$2 \times 10^5$ taq. ts-4/100 $\mu$ IPBS	100 $\mu$ l PBS
3a.	45	$2 \times 10^5$ taq. ts-4/100 $\mu$ IPBS	100 $\mu$ l PBS

El reto se hizo al día 80 con dosis de  $2 \times 10^3$ ,  $6 \times 10^3$  y  $2 \times 10^4$  taquizoítos RH. En la figura 8 se muestran los resultados de este experimento. Todos los lotes de ratones inmunizados y retados tuvieron una sobrevivencia del 100% a lo largo del experimento. La sobrevivencia en el lote de ratones no inmunizados y retados con  $2 \times 10^4$  taquizoítos RH disminuyó a 20% al día 8 y a 0% al día 9. En el lote de ratones no inmunizados y retados con  $6 \times 10^3$  taquizoítos RH la sobrevivencia decayó a un 80% 7 días después del reto, se mantuvo a este nivel por un día y bajó al 0% al día 9. En cuanto al lote de ratones no inmunizados y retados con  $2 \times 10^3$  taquizoítos RH su sobrevivencia decayó a un 80% durante los días 7 y 8, bajó a un 40% en el día 9 y se redujo a 0% al día 10.

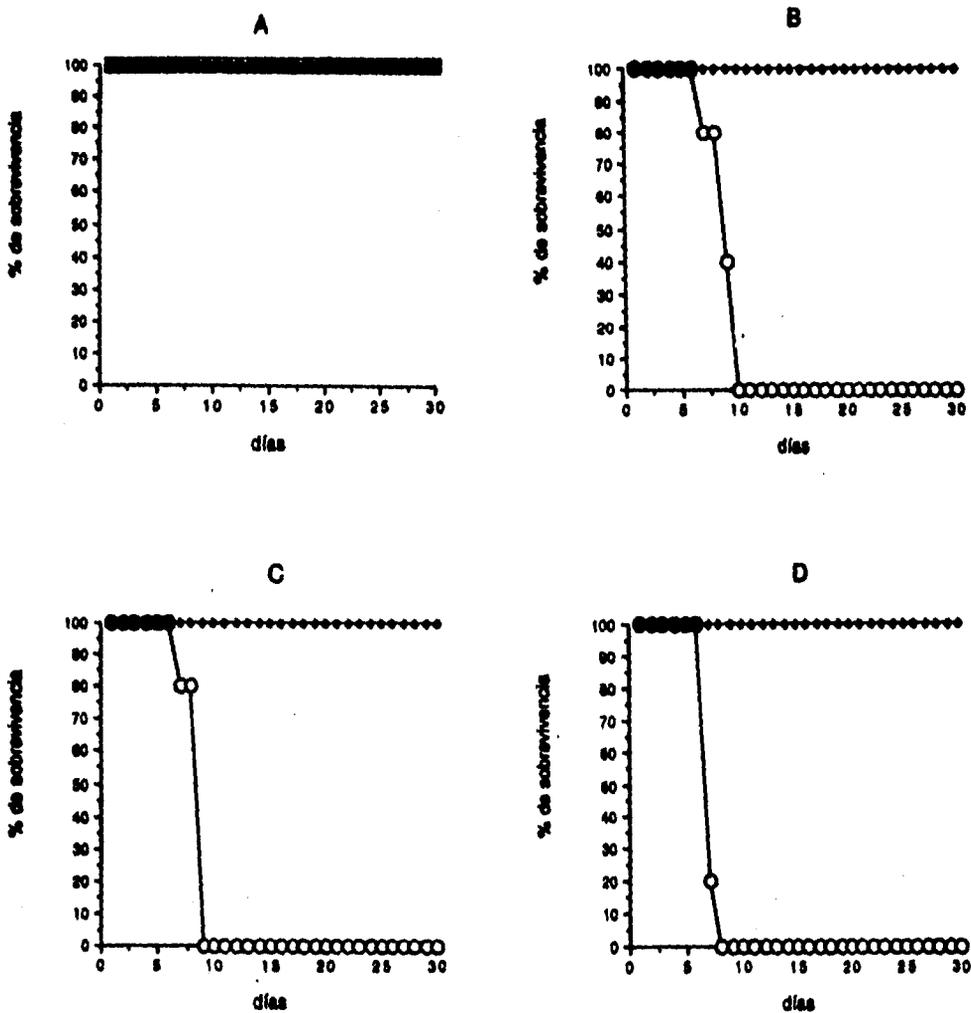


Figura 8. Efecto de la inmunización y reto en la sobrevivencia de ratones BALB/c (Experimento 3). Lotes de cinco ratones fueron inmunizados con la cepa ta-4 de *T. gondii*, y retados posteriormente con la cepa virulenta RH al día 60. A. —□—, ratones "inmunizados" con PBS y "retados" con PBS; —●—, ratones inmunizados y "retados" con PBS. B. —●—, ratones inmunizados y retados con 2,000 taquizoitos RH; —○— ratones no inmunizados y retados a la misma dosis. C. —●—, ratones inmunizados y retados con 6,000 taquizoitos RH; —○— ratones no inmunizados y retados a la misma dosis. D. —●—, ratones inmunizados y retados con 20,000 taquizoitos RH; —○— ratones no inmunizados y retados a la misma dosis.

#### 1.4 Resumen de los experimentos de inmunización y reto

Los resultados de los 3 experimentos muestran que la vacunación de ratones BALB/c con la cepa termosensible ts-4 de *T. gondii* les confiere una inmunidad protectora frente al reto con una cepa altamente virulenta como lo es la RH. En todos los casos hubo un 100% de sobrevivencia de los ratones inmunizados, independientemente de la dosis de reto (de  $2 \times 10^2$  a  $2 \times 10^4$  taquizoítos). Los ratones testigos no inmunizados exhibieron una mortalidad variable a concentraciones de reto menores a  $6 \times 10^3$  taquizoítos RH y una mortalidad reproducible del 100% con dosis  $\geq 6 \times 10^3$  taquizoítos, tal y como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Porcentaje de mortalidad de ratones no inmunes retados con *Toxoplasma gondii* RH.

Dosis taq. RH	1er. Experimento	2o. Experimento	3er. Experimento
200	40	ND	ND
600	ND	0	ND
2000	80	ND	100
6000	ND	100	100
20000	100	100	100

ND: no determinado

En resumen, se pudo demostrar la inmunidad protectora contra una cepa virulenta, conferida por la cepa atenuada de *T. gondii* ts-4. Así mismo, se determinó que 6,000 taquizoítos RH era la dosis mínima a utilizar en los subsecuentes experimentos.

## 2 Ensayo de transformación blastoide.

El objetivo de este ensayo consistió en determinar la presencia de linfocitos T anti-*T.gondii* en el bazo de los ratones inmunizados con la cepa ts-4 para comprobar la presencia de células sensibilizadas al antígeno, como paso previo al experimento de transferencia de protección. En vista de que desconocíamos las condiciones de proliferación de las células inmunes hacia los antígenos solubles de *Toxoplasma* (TSA2), decidimos probar 3 variables: concentración de células de bazo, concentración de TSA2 y día de cosecha. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 9 y 10.

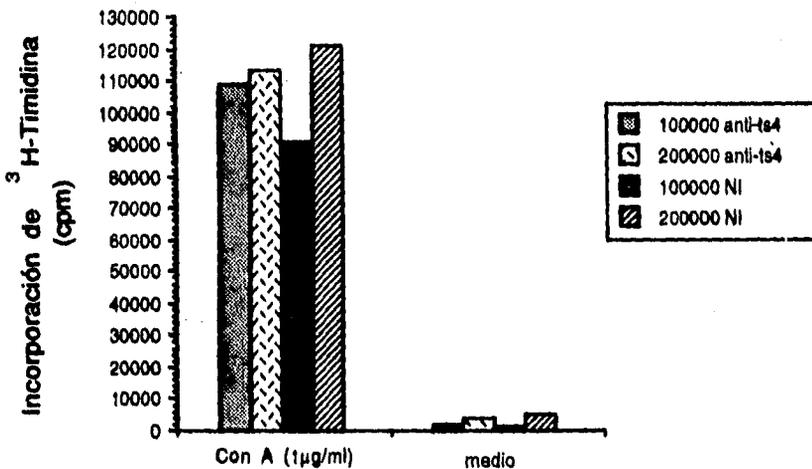


Figura 9. Proliferación de las células de bazo inmunes y no inmunes inducida por Concanavalina A. Se obtuvieron células de bazo de ratón inmunizado con la cepa ts4 (anti-ts4) y no inmunizado (NI) y se incubaron en presencia de Con A o medio de cultivo, a concentraciones de  $1 \times 10^5$  y  $2 \times 10^5$  células por pozo por 72 horas agregando  $0.5 \mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H}$ -timidina a cada pozo 16 horas antes de cosechar las células.

La figura 9 muestra los resultados del ensayo de proliferación de las células de bazo inmunes y no inmunes en respuesta a Con A. Como era de esperarse sólo las células estimuladas con el mitógeno proliferan, en comparación con las mismas células sin mitógeno, que incorporaron muy poca radioactividad. Las células de bazo provenientes de ratones inmunes y no inmunes se comportan de manera similar. Por tanto las células empleadas están en condiciones que les permiten proliferar.

Las gráficas A y B de la figura 10 muestran las curvas de proliferación de células de bazo de ratón no inmune e inmune en presencia de TSA2 a la concentración de  $10^5$  células por pozo. La gráfica A muestra que durante los 4 días de cosecha, las células de bazo de ratón no inmunizado no proliferan en presencia del antígeno soluble de *T. gondii*. La gráfica B muestra que las células de bazo de ratón inmune proliferan en presencia del antígeno en forma dosis-dependiente, observándose el máximo de proliferación a una concentración de TSA2 de  $1 \mu\text{g/ml}$  en los días 4 y 5.

Las gráficas C y D de la misma figura muestran las curvas de proliferación de células de bazo, no inmunes e inmunes respectivamente, a la concentración de  $2 \times 10^5$  células por pozo en presencia de TSA2. La gráfica C, al igual que la A, muestra que el antígeno no induce proliferación en células no inmunes si bien el ruido de fondo (proliferación en ausencia de antígeno), es casi el doble al encontrado con  $10^5$  células de bazo. La gráfica D muestra igual correspondencia con la B obteniendo el máximo de proliferación en los días 4 y 5 a la concentración de TSA2 de  $1 \mu\text{g/ml}$ , pero con un

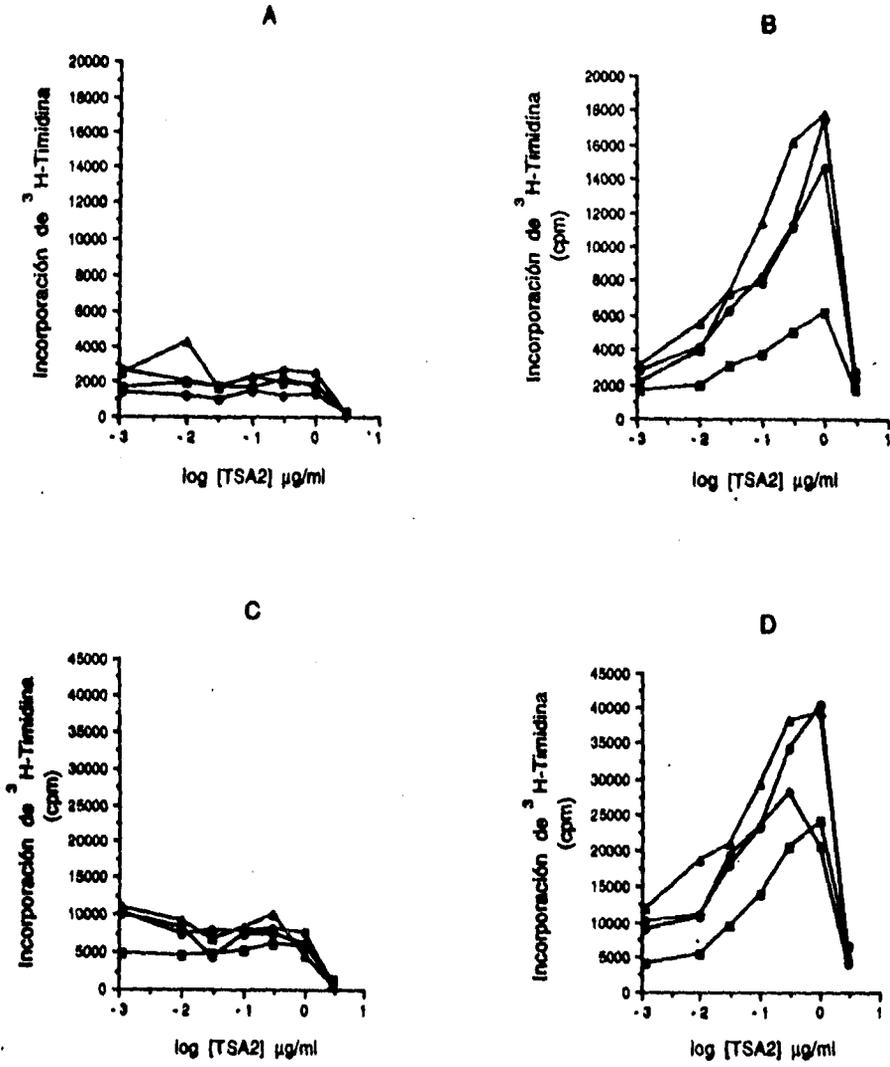


Figura 10. Proliferación de células de bazo de ratón inmunizado y no inmunizado en presencia de TSA2. Cosecha a los días 3, 4, 5 y 6. A. Células no inmunes ( $10^5$  células por pozo). B. Células inmunes ( $10^5$  células por pozo). C. Células no inmunes ( $2 \times 10^5$  células por pozo). D. Células inmunes ( $2 \times 10^5$  células por pozo).

ruido de fondo 4 veces más alto al encontrado con  $10^5$  células por pozo. En todas las gráficas de este experimento se observa que la curva cae cuando la [TSA2] alcanza 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , lo cual podría explicarse por un efecto tóxico del antígeno.

### **2.1 Conclusiones de los experimentos de transformación blastoide.**

Estos resultados muestran que las células de bazo de ratones inmunizados con la cepa ts-4 proliferan en presencia de TSA2 *in vitro*, lo cual se garantiza la presencia de células sensibilizadas al parásito en dicho órgano. Los datos adicionales que arroja esta sección, concentración de TSA2, día de cosecha y concentración de células de bazo como factores que optimizan la proliferación de células T anti-*Toxoplasma*, no son particularmente relevantes para los objetivos de este estudio sin embargo, pudieran ser útiles para el montaje de la técnica de obtención de clones T.

### **3 Transferencia de protección.**

Este experimento se hizo con el propósito de determinar si la transferencia adoptiva de células de bazo de donadores inmunes hacia receptores no inmunes es capaz de proteger a estos últimos de un reto con la cepa virulenta RH. Los antecedentes encontrados en la literatura en relación a esta clase de experimentos reportan la transferencia adoptiva de células de bazo por vía i.v. En vista de que se tenían algunas limitaciones en cuanto al número de ratones receptores y a las dificultades

técnicas que plantea el mismo procedimiento, se decidió probar inicialmente la transferencia por vía i.p.

### 3.1 Transferencia de protección por vía i.p.

Los ratones donadores de bazo fueron inmunizados de la siguiente manera:

# de inmunización	día	Inóculo	
		Grupo vacunado	Grupo testigo
1a.	0	$2 \times 10^4$ taq. ts-4/100 $\mu$ IPBS	100 $\mu$ l PBS
2a.	27	$2 \times 10^5$ taq. ts-4/100 $\mu$ IPBS	100 $\mu$ l PBS
3a.	63	$2 \times 10^5$ taq. ts-4/100 $\mu$ IPBS	100 $\mu$ l PBS

A los 88 días de iniciado el esquema de inmunización se llevó a cabo la transferencia i.p. de  $3 \times 10^7$ ,  $10^7$  y  $3 \times 10^6$  células de bazo de ratones del grupo vacunado y del grupo testigo, a ratones vírgenes singénicos. Dos horas después se hizo el reto s.c. con 6000 taquizoítos RH y se registró la sobrevivencia de los ratones. Los resultados de este experimento se muestran en las figuras 11 y 12. La figura 11 muestra el porcentaje de sobrevivencia en ratones pertenecientes al grupo donador vacunado y al grupo donador testigo, que fueron retados al mismo tiempo que los lotes experimentales. El lote de ratones inmunizados con la cepa ts-4 de *T. gondii*, sobrevivió al reto

con la cepa virulenta (ts-4/reto) mientras que los no inmunizados murieron entre el día 9 y 10 (PBS/reto). Por tanto, los ratones donadores inmunizados estaban perfectamente protegidos contra la cepa virulenta del parásito.

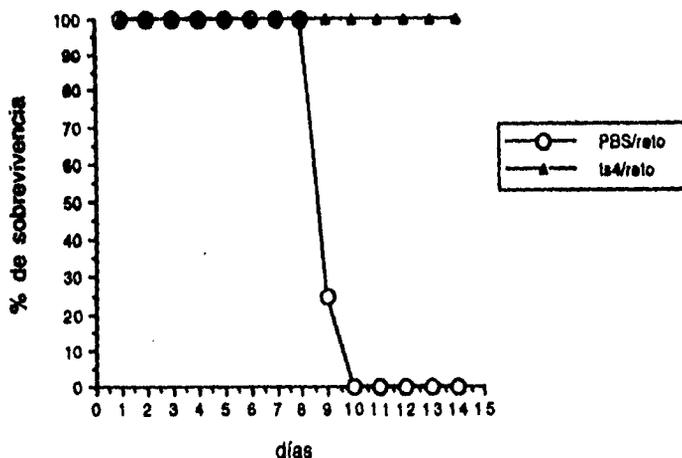


Figura 11. Porcentaje de supervivencia de ratones de los grupos donadores. Lotes de 5 ratones pertenecientes al grupo de los donadores vacunados (ts4/reto) y al grupo de los donadores testigo (PBS/reto), fueron retados con 6,000 taquizoítos RH al mismo tiempo que los ratones receptores por vía a.c.

La figura 12 muestra el porcentaje de supervivencia de los lotes experimentales a los que se les transfirió células de bazo de ratones no inmunizados e inmunizados, respectivamente. Como se puede observar en los dos casos, los ratones murieron entre los días 9 y 10 posteriores al reto, incluso antes que los ratones testigo inyectados únicamente con PBS (PBS/reto\*). Esto significa que no hubo transferencia de protección a *T. gondii* por las células de bazo de ratón inmunizado. Estos resultados podrían deberse a que la vía de transferencia utilizada (i.p.) no es adecuada. Por lo tanto, se repitió este experimento haciendo la transferencia adoptiva por vía i.v.

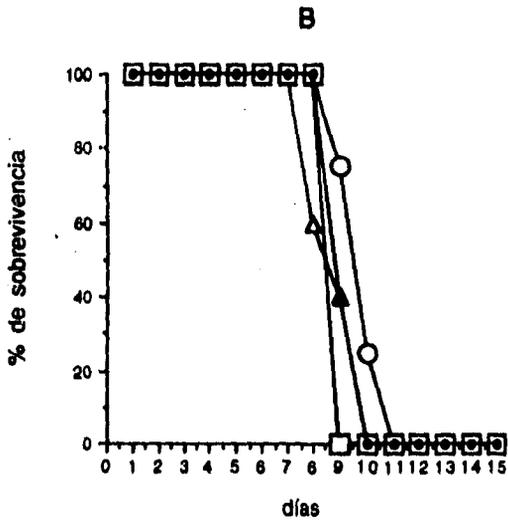
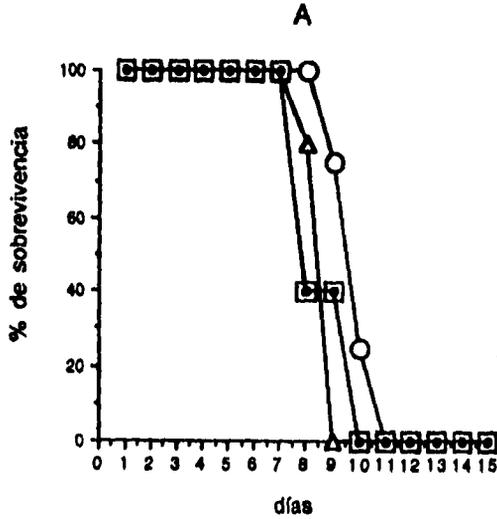


Figura 12. Porcentaje de sobrevivencia de ratones transferidos por vía i.p. con células de bazo de ratón inmunizado o no inmunizado y relados vía: a.c. con  $6 \times 10^3$  tequicoitos de la cepa RH. Lotes de 5 ratones fueron transferidos con dosis de 0, ○ ; 3, △ ; 10, □ y 30 millones de células ◇ . A. Sobrevivencia de ratones transferidos con células inmunes. B. Sobrevivencia de ratones transferidos con células no inmunes.

### 3.2 Transferencia de protección por vía i.v.

Para comprobar si la transferencia de protección dependía de la ruta utilizada, se hizo una repetición del experimento anterior pero inoculando las células de bazo por vía intravenosa (i.v.). El esquema de inmunización de ratones fué el siguiente:

# de inmunización	día	Inóculo	
		Grupo vacunado	Grupo testigo
1a.	0	$2 \times 10^4$ taq. ts-4/100 $\mu$ lPBS	100 $\mu$ l PBS
2a.	22	$2 \times 10^5$ taq. ts-4/100 $\mu$ lPBS	100 $\mu$ l PBS
3a.	37	$2 \times 10^5$ taq. ts-4/100 $\mu$ lPBS	100 $\mu$ l PBS

Ciento veinticuatro días después de iniciado el esquema de inmunización se hizo la transferencia adoptiva de  $10^7$  y  $3 \times 10^7$  células de bazo de ratón de los grupos vacunado y testigo a ratones vírgenes singénicos. Dos horas después se hizo el reto s.c. con  $6 \times 10^3$  taquizoítos RH. Los resultados de este experimento se muestran en las figuras 13 y 14.

La figura 13 muestra el porcentaje de sobrevivencia de ratones pertenecientes a los grupos de donadores, inmunizados y no inmunizados, y retados al mismo tiempo que los lotes experimentales. El lote de ratones inmunizados con la cepa ts-4

de *T. gondii* sobrevivió al reto con la cepa virulenta (ts-4/RH), mientras que los no inmunizados (PBS/RH) murieron al día 9. Esto garantiza que los donadores son inmunes y están protegidos en del reto utilizado.

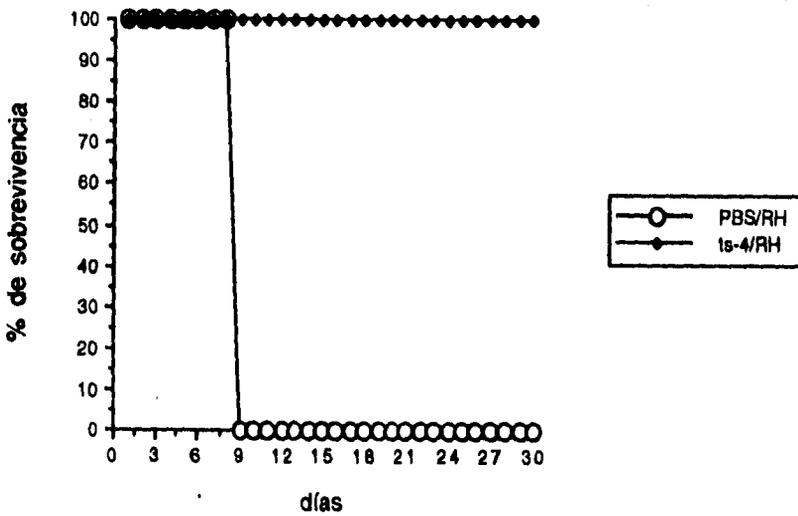


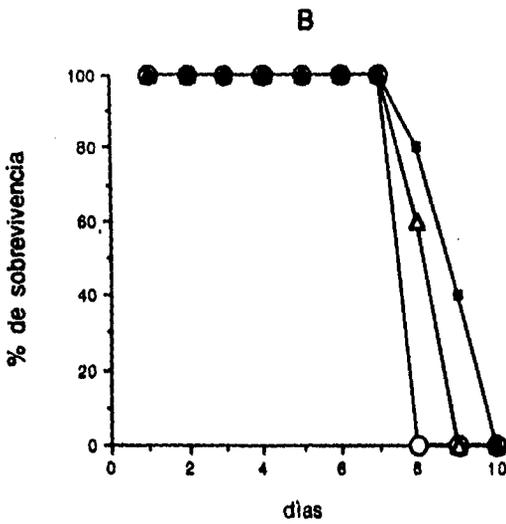
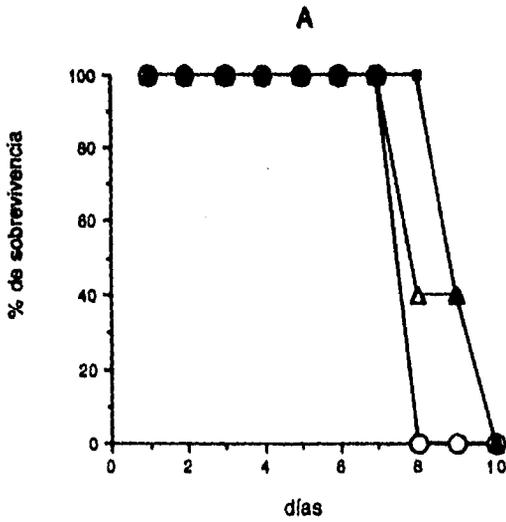
Figura 13. Porcentaje de supervivencia de ratones de los grupos donadores. Lotes de 5 ratones pertenecientes al grupo de los donadores vacunados (ts4/RH) y al grupo de los donadores testigo (PBS/RH), fueron retados con 6,000 taquizoitos RH al mismo tiempo que los ratones receptores por vía s.c.

La gráfica A de la figura 14 muestra el porcentaje de supervivencia de los ratones transferidos con 10<sup>7</sup> células inmunes o no inmunes y retados el mismo día con la cepa virulenta. Los ratones testigo inoculados con HBSS vía i.v y retados murieron al día 8 post-reto. En los lotes experimentales transferidos con la misma

concentración de células Inmunes y no Inmunes, se observa un ligero retraso en la muerte de los animales (2 días). En animales transferidos con células Inmunes y no Inmunes, la mortalidad alcanzó el 100% al día 10.

La gráfica B de la figura 14 muestra el porcentaje de sobrevivencia asociado a la transferencia de  $3 \times 10^7$  de células Inmunes y no Inmunes. Los ratones del lote testigo inoculados con HBSS y retados murieron al día 8 post-reto; los ratones transferidos con células no Inmunes murieron al día 9, mientras que los inoculados con células Inmunes murieron dos días más tarde que el lote testigo.

En resumen, estos experimentos muestran que no se puede conferir protección contra la cepa RH a ratones vírgenes por transferencia adoptiva de células de bazo de ratones vacunados con la cepa ts-4 de *T. gondii*, aunque hay un ligero retraso de la muerte en los animales transferidos.



**Figura 14.** Porcentaje de sobrevivencia de ratones transferidos por vía i.v. solo con HBSS sin células  $\circ$ , con células de bazo de ratón inmunizado  $\blacktriangle$  y no inmunizado  $\bullet$ , que fueron retados con  $6 \times 10^3$  taquizoitos de la cepa RH por vía s.c. **A.** Sobrevivencia de ratones transferidos con 10 millones de células. **B.** Sobrevivencia de ratones transferidos con 30 millones de células.

## V. Discusión

Los resultados de los tres experimentos de inmunización y reto confirman que la inoculación de ratones con la cepa ts-4 de *Toxoplasma gondii* induce una inmunidad protectora al reto con la cepa virulenta RH. En todos los casos la sobrevivencia de los ratones inmunizados fue del 100%. Los datos de mortalidad encontrados en los lotes de ratones no inmunizados y retados muestran que para garantizar un 100% de mortalidad, se tiene que utilizar una dosis mínima de reto de 6,000 taquizoítos (Tabla 1). Esto fue particularmente evidente en los últimos dos experimentos. Los resultados obtenidos son consistentes con los encontrados por Gazzinelli y cols. [17]. De hecho, el esquema de inmunización empleado por estos autores fue usado como modelo de protocolo a seguir en este trabajo. Sin embargo, ellos reportan una dosis de reto de  $2 \times 10^3$  taquizoítos, cantidad 3 veces menor a la hallada en nuestros experimentos. Hakim y cols. [20] también han utilizado este mismo esquema con buenos resultados.

En relación a la cepa RH de *T. gondii* utilizada para el reto, fue escogida debido a que si el procedimiento de inmunización es efectivo en contra de esta cepa, que es altamente virulenta, debería serlo para la mayoría de las otras cepas.

Para garantizar que el procedimiento de inmunización empleado generara linfocitos T anti-*T. gondii*, se montó un ensayo de proliferación blastoide. Este ensayo

*in vitro* mostró que las células de bazo provenientes de ratón inmunizado con la cepa ts-4 proliferan específicamente en presencia de antígeno soluble del parásito.

En vista de los resultados encontrados, era importante determinar si la propiedad protectora encontrada en los experimentos de inmunización y reto, se conservaba al transferir células de bazo obtenidas de estos ratones hacia receptores singénicos. Los resultados de estos experimentos muestran que no hubo transferencia de protección al reto con la cepa virulenta, por ninguna de las vías de inoculación probadas (i.p. e i.v.) en ninguna de las 3 dosis de células de bazo transferidas (3, 10 y 30 millones). Esto pudo deberse fundamentalmente a que los ratones receptores de células de bazo debieron de irradiarse antes de la transferencia. Un artículo publicado en 1966 por Celada [6], prueba que la transferencia de células inmunes a ratones irradiados no afecta sus funciones efectoras, sin embargo, mientras menor sea la dosis de irradiación aplicada a los animales receptores, menor será la actividad de las células inmunes transferidas. Si bien este autor determinó dicha actividad en términos de producción de anticuerpos por las células plasmáticas transferidas, existe la posibilidad de que un efecto análogo haya ocurrido en nuestros experimentos de transferencia, de tal suerte que hizo imposible determinar la existencia de algún efecto protector en contra de la cepa virulenta. En este punto es necesario aclarar que la razón de que en nuestros experimentos no se hayan irradiado a los ratones antes de la transferencia, es que existe literatura a este respecto, en este y otros sistemas, donde no ha sido una condición necesaria [2, 5, 36, 40, 45, 51, 72 79].

Aún cuando en apariencia la vía de inoculación empleada no influyó en los resultados obtenidos en los experimentos de transferencia adoptiva, la i.v. es la ruta que ordinariamente se usa en los protocolos que involucran el traspaso de células inmunes de un animal a otro [5, 36, 40, 51, 69, 72]. Esto se debe básicamente a que esta forma de inoculación implica el acceso directo a las vías de migración utilizadas usualmente por las células T y B, en su camino de un órgano linfóide a otro. En este sentido, existen estudios que muestran que la recirculación de linfocitos T marcados con radioisótopos e inyectados vía i.v. es muy rápida: las células marcadas comienzan a aparecer en los ductos linfáticos torácicos a las 6 horas, y llegan a su concentración máxima en esta localización a las 18 o 24 horas posteriores a la implantación. Cuarenta y ocho horas después, alrededor de un 50% alcanzan la linfa, mientras que el 100% lo hace hasta los 5 días. Así mismo se sabe que las células B también recirculan, pero a una velocidad menor que las células T [65]. Por otro lado, la inoculación por la vía i.p implica que las células de bazo implantadas tendrían que salvar muchos obstáculos como serían la presencia de uniones intercelulares y los tejidos subyacentes a los vasos sanguíneos capilares, antes de acceder a ellos. Por lo tanto, en los subsecuentes experimentos se debe conservar la ruta i.v. como vía de transferencia adoptiva de células de bazo.

Estudios publicados en los que se ha demostrado con éxito inmunidad adoptiva contra la toxoplasmosis, han utilizado cepas distintas a la RH al momento del reto, como la C56 [69], la Beverley [51], o la cepa P [36]. El hecho de que este procedi-

miento no funcione con la cepa RH podría explicar, al menos en parte, los resultados encontrados y la falta de literatura a este respecto. Por ejemplo, Suzuki y Remington transfirieron  $4 \times 10^7$  células de bazo de ratón inmunizado con la cepa ts-4 a ratones singénicos vírgenes no irradiados e hicieron el reto con  $1 \times 10^3$  taquizoítos de la cepa C56. Ningún ratón del lote receptor murió, ocurriendo lo contrario con el lote testigo correspondiente. Estos resultados indican que se puede lograr la transferencia de protección pero utilizando una cepa de *Toxoplasma* menos virulenta que la RH. Sin embargo, es importante seguir utilizando esta cepa en otras condiciones experimentales debido a que si se puede lograr la inmunidad adoptiva con ella, en teoría debería de ocurrir lo mismo con otras cepas igual o menos virulentas. De acuerdo a lo anterior, sería conveniente realizar algunas modificaciones al protocolo con el propósito de mejorar el proyecto de transferencia adoptiva:

a) *Los ratones deben ser irradiados a dosis subletales antes de recibir la transferencia i.v. Sugiero que la dosis sea de 500 rads de acuerdo a lo reportado por Celada [6].*

b) *Propongo que además de contar con células de ratones inmunizados y no inmunizados para hacer la transferencia adoptiva, esta también se lleve a cabo con células de ratón inmunizado y retado. Ello tiene el propósito de evaluar, en los animales receptores, el efecto protector de los linfocitos T o de las células de bazo inmunes que han tenido contacto previo con la cepa virulenta antes de su transferencia a ratones*

singénicos. Otros experimentos que han utilizado protocolos de transferencia adoptiva similares al descrito [40], han probado exitosamente el papel protector de la fracción esplénica inmune.

*c) Si bien dentro de los objetivos del proyecto está contemplado evaluar el efecto de la transferencia adoptiva de la fracción completa de las células de bazo, considero que sería conveniente evaluar simultáneamente el papel de algún subtipo celular involucrado en la respuesta inmune a la toxoplasmosis. Sería interesante saber si existe algún efecto protector al transferir fracciones de linfocitos T puros en vista de la importancia de este subtipo en la respuesta inmune a la toxoplasmosis. Ello puede conseguirse pasando la suspensión de células de bazo por una columna de nylon para eliminar los macrófagos y linfocitos B. Así mismo se puede determinar el fenotipo de las células purificadas, por citofluorometría con anticuerpos específicos a marcadores antigénicos de linfocitos T.*

## VI. Conclusiones

1. Se comprobó que en nuestras condiciones de laboratorio, la inoculación de los ratones con la cepa ts-4 de *Toxoplasma gondii* induce una inmunidad protectora al reto con la cepa virulenta RH.
2. Se determinó una dosis mínima de reto de 6000 taquizoítos de la cepa RH que garantiza una mortalidad del 100% en el lote testigo correspondiente a los ratones no inmunizados con la cepa ts-4.
3. Los resultados del ensayo de transformación blastoide demostraron que las células de bazo de ratón inmunizado proliferan en presencia del antígeno soluble de *Toxoplasma*, lo cual garantizó que el bazo de los ratones inmunizados con la cepa ts-4, están sensibilizados a los antígenos de este parásito.
4. La transferencia adoptiva de la fracción completa de células de bazo de ratón inmunizado con la cepa ts-4, a dosis de 3, 10 y 30 millones de células, por vía i.p. o i.v. no confirió protección al reto con la cepa RH.

## **VII. Perspectivas**

1. Se propone seguir utilizando la vía i.v. como ruta de transferencia bajo otras condiciones experimentales. Estas incluyen la irradiación previa a la implantación de los animales receptores, a una dosis 500 rads.
2. Se propone también realizar la transferencia adoptiva con células de ratón inmunizado y retado, con el propósito de evaluar en los animales receptores, el efecto de la transferencia de células inmunes que provienen de animales que han tenido un contacto previo con la cepa virulenta.
3. Por último, sería deseable evaluar el efecto de la transferencia adoptiva de linfocitos T purificados, dada la importancia de este subtipo en la respuesta inmune a la toxoplasmosis.

## VIII. Referencias

1. Beaman, M.H., S. Wong and J.S. Remington. 1993. Cytokines, *Toxoplasma* and intracellular parasitism. *Immun. Rev.* (127): 97-117
2. Benten, W.P.M. U. Bettenhaeuser, F. Wunderlich, E.V.Villet and H. Mossmann. 1991. Testosterone-induced abrogation of self-healing of *Plasmodium chabaudi* malaria in B10 mice: mediation by spleen cells. *Infect. Immun.* 59(12): 4486-4490
3. Bermudes, D. and K.A. Joiner. 1993. The role of parasites in generating evolutionary novelty. *Parasitology Today.* 9 (12):458-463
4. Black C.M., J.R. Catteral and J.S. Remington. 1987. In vivo and in vitro activation of alveolar macrophages by recombinant IFN- $\gamma$ . *J. Immunol.* 138(2): 491-495
5. Cavacini, L.A., C.A. Long and W.P. Weidanz. 1986. T cell immunity in murine malaria: adoptive transfer of resistance to *Plasmodium chabaudi adami* in nude mice with splenic T cells. *Infect. Immun.* 52(3): 637-643
6. Celada, F. 1966. Quantitative studies of adoptive immunological memory in mice. I. An age dependent barrier to syngeneic transplantation. *J. Exp. Med.* 124: 1-15
7. Chatterton, J.M. 1992. Pregnancy. In *Human Toxoplasmosis* (D.O. Ho-Yen and A. L. Joss, eds.). Oxford Medical Publications, U.S.A. pp 145-183

8. Chardès, T., I. Bourguin, M.N. Mevelec, J.F. Dubremetz and D. Bout. 1990. Antibody responses to *Toxoplasma gondii* in sera, intestinal secretions, and milk from orally infected mice and characterization of target antigens. *Infect. Immun.* 58(5):1240-1246
9. Dardé, M.L., B. Boutelle and M. Pestre-Alexandre. 1992. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *J. Parasitol.* 78(5): 786-794
10. Delves, P.J. and I.M. Roitt. 1992. Interleukin 2. In *Encyclopedia of Immunology*. (Ivan M. Roitt and Peter J. Delves eds.) Academic Press, U.S.A. pp 903-905
11. Dubey, J.P. and C.P. Beattie. 1988. *Toxoplasmosis of animals and man*. CRC Press, Florida.
12. Dubey, J.P. 1993. *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of humans and animals. In *Parasitic Protozoa* (Julius P. Kreier, ed.). Academic Press, London. pp 1-6
13. Escajadillo, A. and J.K. Frenkel. 1991. Experimental toxoplasmosis and vaccine tests in *Aotus* monkeys. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44(4): 382-389
14. Evans, R. 1992. Life cycle and animal infection. In *Human Toxoplasmosis* (D.O. Ho-Yen and A. L. Joss, eds.). Oxford Medical Publications, U.S.A. pp 27-55

15. Frenkel, J.K. 1967. Adoptive immunity to intracellular infection. *J Immunol.* 98(6): 1309-1319.
16. Frenkel, J.K. and D.W. Taylor. 1982. Toxoplasmosis in immunoglobulin M-suppressed mice. *Infect. Immun.* 38(1):360-367
17. Gazzinelli, R.T., F.T. Hakim, S. Hieny, G.M. Shearer and A. Sher. 1991. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN- $\gamma$  production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J. Immunol.* 146(1): 286-292
18. Gazzinelli, R., Y. Xu, S. Hieny, A. Cheever and A. Sher. 1992. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 149(1): 175-180
19. Grimwood, J. and J. E. Smith. 1992. *Toxoplasma gondii*: The role of a 30-kDa surface protein in host cell invasion. *Exp. Parasitol.* 74: 106-111
20. Hakim, F.T., R.T. Gazzinelli, E. Denkers, S. Hieny, G.M. Shearer and A. Sher. 1991. CD8+ T cells from mice vaccinated against *Toxoplasma gondii* are cytotoxic for parasite-infected or antigen-pulsed host cells. *J. Immunol.* 147(7): 2310-2316
21. Hauser, W. E Jr. and Van Tsai. 1986. Acute *Toxoplasma* infection of mice induces spleen NK cells that are cytotoxic for *T. gondii* *in vitro*. *J. Immunol.* 136(1): 313-319.
22. Howard, M.C., A. Miyajima and R. Coffman. 1993. T cell derived cytokines and their

- receptors. In *Fundamental Immunology* (William E. Paul, ed.) pp 763
23. Ho-Yen, D.O. 1992. (a) Clinical features: In *Human Toxoplasmosis* (D.O. Ho-Yen and A. L. Joss, eds.). Oxford Medical Publications, U.S.A. pp 56-78
24. Ho-Yen, D.O. 1992. (b) Immunocompromised patients. In *Human Toxoplasmosis* (D.O. Ho-Yen and A. L. Joss, eds.). Oxford Medical Publications, U.S.A. pp 184-203
25. Ho-Yen, D.O. 1992. (c) The future. In *Human Toxoplasmosis* (D.O. Ho-Yen and A. L. Joss, eds.). Oxford Medical Publications, U.S.A. pp 232-248
26. Hunter, C.A., C.S. Subauste, V.H. Van Cleave and J.S. Remington. 1994. Production of gamma Interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. *Infect. Immun.* 62(7): 2818-2824
27. Jackson, M.H. and W.M. Hutchison. 1989. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. *Adv. Parasitol.* 28: 55-103
28. Joss, A.W.L. 1992. Diagnosis. In *Human Toxoplasmosis* (D.O. Ho-Yen and A. L. Joss, eds.). Oxford Medical Publications, U.S.A. pp 79-118
29. Kasper, L.H., J.H. Craab and E.R. Pfefferkorn. 1983. Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsortion with a monoclonal antibody. *J. Immunol.* 130: 2407

30. Kasper, L.H. 1989. Identification of stage specific antigens of *T. gondii*. *Infect. Immun.* 59:3750
31. Kasper, L.H. and J.C. Boothroyd. 1993. *Toxoplasma gondii* and toxoplasmosis. In *Immunology and molecular biology of parasitic infections*. (K.S. Warren, ed.). Blackwell Scientific Publications, U.S.A. pp 269-301
32. Kasper, L.H. and J.R. Mineo. 1994. Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Today*. 10(5): 184-187
33. Kemeny, D., A. Noble, B.J. Holmes and D. Díaz-Sánchez. 1994. Immune regulation: a new role for the CD8<sup>+</sup> T cell. *Immun. Today*. 15(3):107-110
34. Khan, I.A., K.A. Smith and L.H. Kasper. 1988. Induction of antigen-specific parasitocidal cytotoxic T cell splenocytes by a major membrane protein (P30) of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 141(10): 3600-3605
35. Khan, I.A., K.A. Smith, and L.H. Kasper. 1990. Induction of antigen-specific human cytotoxic T cells by *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Invest.* 85:1879-1886
36. Khan, I.A., K.H. Ely and L.H. Kasper. 1994. Antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell clone protects against acute *Toxoplasma gondii* in mice. *J. Immunol.* 152:1856-1860
37. Konishi, E. and M. Nakao. 1992. Natural occurring immunoglobulin M antibodies: enhancement of phagocytic and microbial activities of human neutrophils against *Toxoplasma*

*gondii*. *Parasitology*. 104:427-432

38. Krahenbuhl J.L. and J.S. Remington. 1982. Immunology of *Toxoplasma* and toxoplasmosis. In: *Immunology of parasitic infections*. (S.Cohen and S. Warren eds.) Blackwell, England. pp 356
39. Krick, J. A. and J.S. Remington. 1978. Toxoplasmosis in the adult, an overview. *N. Eng. J. Med.* 298 (10): 550-553
40. Lal, W.C., M. Bennet, Y.S. Lu and S.P. Pakes. 1991. Vaccination of Lewis rats with temperature-sensitive mutants of *Mycoplasma pulmonis*: adoptive transfer of immunity by spleen cells but not by sera. *Infect. Immun.* 59(1): 346-350
41. Levine, N.D. 1977. Taxonomy of toxoplasma. *J. Protozool.* 24: 36-41
42. Lindsay, D.S., B.L. Blagburn and J.P. Dubey. 1993. Safety and results of challenge of weaned pigs given a temperature-sensitive mutant of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 79(1): 71-76
43. Mack, D.G. and R. McLeod. 1992. Human *Toxoplasma gondii*-specific secretory immunoglobulin A reduces *T. gondii* infection of enterocytes in vitro. *J. Clin. Invest.* 90:2585-2592.
44. McCabe, R.E., B.E. Luft and J.S. Remington. 1984. Effect of murine interferon gamma on murine toxoplasmosis. *J. Inf. Dis.* 150(6): 961-962

45. McKeever, D.J., E.L.N. Taracha, E.L. Innes, N.D. MacHugh, E. Awino, B.M. Goodeeris and W.I. Morrison. 1994. Adoptive transfer of immunity to *Theileria parva* in the CD8<sup>+</sup> fraction of responding efferent lymph. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 1959-1963
46. McLeod, R., J.K. Frenkel, R.G. Estes, D.G. Mack, P.B. Eisenhauer and C. Gibori. 1988. Subcutaneous and intestinal vaccination with tachyzoites of *Toxoplasma gondii* and acquisition of immunity to peroral and congenital toxoplasma challenge. *J. Immunol.* 140(5): 1632-1637
47. Mellors, J.W., A.H. Bartiss and D.L. Coleman. 1987. Stimulation of macrophages H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by resident thymocytes effect of a soluble factor distinct from IFN- $\gamma$ . *Cell. Immunol.* 110(2): 391-399
48. Mineo, J.R., R. McLeod, D. Mack, J. Smith, I.A. Khan, K.H. Ely and L.H. Kasper. 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 (9):3951-3964
49. Nagasawa, H., T. Manabe, Y. Maekawa, M. Oka and K. Himeno. 1991. Role of L3T4<sup>+</sup> and Lyt-2<sup>+</sup> T cell subsets in protective immune responses of mice against infection with a low or high virulent strain of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 35(3): 215-222
50. Nicolle, C. and L. Manceaux. 1909. Sur un protozoaire nouveau du gondi. *C.R. Heb. Seances Acad. Sci.* 148: 369-372

51. Parker, S.J., C.W. Roberts and J. Alexander. 1991. CD8<sup>+</sup> T cells are the major lymphocyte subpopulation involved in the protective immune response to *Toxoplasma gondii* in mice. *Clin. Exp. Immunol.* 84:207-212
52. Pfefferkorn, E.R. and L.C. Pfefferkorn. 1976. *Toxoplasma gondii*: isolation and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants. *Exp. Parasitol.* 39: 365-376
53. Pfefferkorn, E.R. 1990. Cell Biology of *Toxoplasma gondii*. In *Modern parasite biology: cellular, immunological and molecular aspects*. (D.J. Wyler, ed.) U.S.A. pp 26-50
54. Remington, J.S. and J.L. Krahenbuhl. 1982. (a). immunology of *Toxoplasma gondii*. In: *Immunology of human Infection, Part II*. (A.J. Hahmias and R.J. O' Reilly, eds.). Plenum Publishing, New York. pp 327-371
55. Rott, I.M., J. Brostoff and D.K. Male. 1993. *Immunology*. Mosby, U.S.A. pp 7.14
56. Sabin, A.B. 1941. Toxoplasmic encephalitis in children. *JAMA.* 116: 801-807
57. Sabin, A.B. and H.A. Feldman. 1948. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science.* 108: 660-663
58. Scott, P.A., C. Patricia and A. Sher. 1990. Protection against *Leishmania major* in BALB/c mice by adoptive transfer of a T cell clone recognizing a low molecular weight antigen released by promastigotes. *J. Immunol.* 144(3): 1075-1079

59. Scott, P.A. and A. Sher. 1993. Immunoparasitology. In *Fundamental Immunology*. Raven Press, U.S.A. pp 1179-1210
60. Sethi, K.K., T. Endo and H. Brandis. 1981. *Toxoplasma gondii* trophozoites with specific monoclonal antibodies survive within normal murine macrophages. *Immunol. Lett.* 2: 343-346
61. Sharma, S.D. 1990. Immunology of Toxoplasmosis. In *Modern Biology: cellular, immunological, and molecular aspects*. (David J. Wyler, ed.). W.H. Freeman and Co., U.S.A. pp 184-199
62. Sher, A., I.P. Oswald, S. Hieny and R.T. Gazzinelli. 1993. *Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN- $\gamma$  response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Immunol.* 150(9): 3982-3989
63. Sibley, L.D., J.L. Krahenbuhl and E. Weldner. 1985. Lymphokine activation of J774G8 cells and mouse peritoneal macrophages challenged with *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 49(3): 760-764
64. Sibley, L.D. and J.C. Boothroyd. 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature.* 359: 82-85
65. Sprent, J. 1993. T Lymphocytes and the thymus. In *Fundamental Immunology* (William E. Paul, ed.) pp 87-88

66. Subauste, C.S., A.H. Koniaris and J.S. Remington. 1991. Murine CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii*-infected cells. *J. Immunol.* 147(11):3955-3959
67. Subauste, C.S., L. Dawson and J.S. Remington. 1992. Human lymphokine-activated killer cells are cytotoxic against cells infected with *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.* 176: 1511-1519
68. Subauste, C.S. and J.S. Remington. 1993. Immunity to *Toxoplasma gondii*. *Curr. Op. Immun.* 5: 532-537
69. Suzuki, Y. and J.S. Remington. 1988. (a) Dual regulation of resistance against *Toxoplasma gondii* infection by Lyt-2<sup>+</sup> and Lyt-1<sup>+</sup>, L3T4<sup>+</sup> T cells in mice. *J. Immunol.* 140(11): 3943-3946
70. Suzuki, Y, M.A. Orellana, R.D. Schreiber, J.S. Remington. 1988. (b) Interferon- $\gamma$ : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science.* 240: 516-518
71. Suzuki, Y., Q. Yang, F.K. Conley, J.S. Abrams, J.S. Remington. 1994. Antibody against interleukin-6 reduces inflammation and number of cyst brains of mice with toxoplasmic encephalitis. *Infect. Immun.* 62: 2773-2776
72. Taylor-Robinson, A.W. and R.S. Phillips. 1994. Th<sub>1</sub> and Th<sub>2</sub> CD4<sup>+</sup> T cell clones specific for *Plasmodium chabaudi* but not for an unrelated antigen protect against blood stage *P. chabaudi* infection. *Eur. J. Immunol.* 24: 158-164

73. Unanue, E.R. 1993. Macrophages, antigen-presenting cells, and the phenomena of antigen handling and presentation. In *Fundamental Immunology*. (William E. Paul, ed.). Raven Press, U.S.A. pp 117-118
74. Underdown, B.J. 1992. IgA. In *Encyclopedia of Immunology*. (Ivan M. Roitt and Peter J. Delves eds.) Academic Press, U.S.A. pp 733
75. Vendrell, J.P., F. Pratlong, A. Decoster, P. Boulot, F. Darcy, M. Segondy, M. F. Huguet and A. Serre. 1992. Secretion of *Toxoplasma gondii*-specific antibody *in vitro* by peripheral blood mononuclear cells as a new marker of acute toxoplasmosis. *Clin. Exp. Immunol.* 89: 126-130
76. Vilcek J. and J. Le. 1992. Interferon- $\gamma$ . In *Encyclopedia of Immunology*. (Ivan M. Roitt and Peter J. Delves eds.) Academic Press, U.S.A. pp 892-895
77. Waldeland, W. and J.K. Frenkel. 1983. Live and killed vaccines against toxoplasmosis in mice. *J. Parasitol.* 69 (1): 60-65
78. Waldeland, W., E.R. Pfefferkorn and J.K. Frenkel. 1983. Temperature-sensitive mutants of *Toxoplasma gondii*: pathogenicity and persistence in mice. *J. Parasitol.* 69 (1): 171-175
79. Weiss, W.R., J.A. Berzofsky, R.A. Houghton, M. Sedegah, M. Hollindale and S.L. Hoffman. 1992. A T cell clone directed at the circumsporozoite protein which protects mice

against both *Plasmodium yoelli* and *Plasmodium berghei*. *J. Immunol.* 149(6): 2103-2109.

80. Wong, S-Y. and J.S. Remington. 1993. Biology of *Toxoplasma gondii*. *AIDS* 7:299-316