

# Inducción de resistencia contra *Toxoplasma gondii* en ratones NIH tratados con concanavalina A

Carlos Ramón Bautista Garfias\*<sup>\*\*</sup>

Héctor Daza Frago\*<sup>\*</sup>

Olga Ixta Rodríguez\*

Federico Martínez Gómez\*

## Resumen

Se evaluó el efecto de la administración de concanavalina A (Con A) en ratones expuestos a *Toxoplasma gondii*. Cuarenta y ocho ratones, cepa NIH (hembras de 22 a 24 g), libres de parásitos, fueron distribuidos al azar en ocho grupos (A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1, D2) de seis animales cada uno. Estos, fueron inoculados por vía intraperitoneal (i.p.) de la siguiente manera: los de los grupos A, B y C recibieron 10, 20 y 40  $\mu\text{g}$  de Con A, respectivamente, mientras que los del grupo D recibieron 0.1 ml de solución salina fisiológica. Todos los ratones fueron confrontados por vía i.p. con 2 LD<sub>50</sub> DE *T. gondii*, cepa RH. Los de los grupos A1, B1, C1 y D1 fueron expuestos al protozooario dos días después del tratamiento; mientras que los de los grupos A2, B2, C2 y D2, siete días después de éste. Los porcentajes de animales sobrevivientes obtenidos 15 días después de la infección, fueron 16.66, 16.66, 0, 0, 33.33, 50, 16.66 y 0 para los grupos A1, B1, C1, D1, A2, B2, C2 y D2, respectivamente. Para corroborar los resultados obtenidos en los últimos cuatro grupos, se repitió el experimento, después del cual se observaron consecuencias similares, excepto que en el grupo tratado con 40  $\mu\text{g}$  de Con A, se obtuvo una sobrevivencia del 33.33%. Los datos obtenidos indican que la inyección i.p. de Con A en ratones NIH genera una protección parcial inespecífica contra *T. gondii* cepa RH, la cual aumenta si se aplican 20  $\mu\text{g}$  del mitógeno siete días antes de la confrontación.

## Introducción

*Toxoplasma gondii* es un parásito de casi todas las especies animales, incluyendo al hombre. La toxoplasmosis clínica en seres humanos está confinada básicamente a individuos inmunocomprometidos y a mujeres que contraen una infección primaria duran-

te el embarazo.<sup>4</sup> La toxoplasmosis en animales domésticos gestantes, como ovejas, cabras y cerdos, causa aborto y pérdidas neonatales, principalmente en los ovinos.<sup>4</sup> Sin embargo, la infección por este parásito en muchos animales adultos y humanos es asintomática debido a una inmunidad protectora efectiva; ésta involucra a anticuerpos que actúan extracelularmente y a factores derivados de las células T que actúan intracelularmente.<sup>8</sup> Con base en estudios *in vivo* e *in vitro* se ha establecido que el macrófago activado es la célula principal que produce inhibición de la proliferación o muerte de *T. gondii*.<sup>1,14</sup> También se ha demostrado que el interferón-gamma (INF- $\gamma$ ) es el principal factor que activa macrófagos durante la respuesta natural del huésped a la infección con *T. gondii*.<sup>18</sup> En ovejas, se ha demostrado que los linfocitos T CD4+ y los CD8+, así como el INF- $\gamma$  desempeñan un papel importante en la protección contra el parásito.<sup>4</sup>

Durante la toxoplasmosis aguda sintomática, se presentan niveles deprimidos de INF- $\gamma$  en ratones<sup>10</sup> y en el hombre.<sup>17</sup> Asimismo, en ratones infectados con *Toxoplasma*, la proliferación de esplenocitos en respuesta al mitógeno concanavalina A (Con A), se encuentra deprimida y comienza al tercer día posinfección, en comparación con ratones no infectados. La inmunodepresión es más significativa en los días siete y nueve tanto en la respuesta proliferativa como en la capacidad de las células del bazo para producir INF- $\gamma$ .<sup>7</sup>

Por otro lado, la Con A, administrada en altas concentraciones en ratones, es inmunodepresora,<sup>5,11</sup> pero a bajas concentraciones, también puede ser mitogénica para los linfocitos T murinos *in vitro*.<sup>6,7</sup>

El objetivo del presente estudio fue determinar el posible papel protector inespecífico de tres diferentes concentraciones de Con A en ratones, administradas dos o siete días antes de la infección experimental con *Toxoplasma gondii*.

## Material y métodos

**Animales.** Se utilizaron ratones hembras de 22 a 24 g, cepa NIH, de 7 a 8 semanas de edad, libres de parásitos.

**Parásito.** Se usó la cepa RH de *Toxoplasma gondii* que ha sido mantenida por pases seriados de ratones en el Departamento de Parasitología de la Escuela Na-

Recibido para su publicación el 10 de enero de 1994.

\* Departamento de Parasitología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala, Colonia Santo Tomás, 11340, México, D.F.

\*\* Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET), INIFAP-SARH. Apdo. Postal 206, 62500, CIVAC, estado de Morelos, México.

cional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

**Mitógeno.** Se empleó concanavalina A (Con A), lectina de *Canavalia ensiformis*.\*

### Diseño experimental

Los animales fueron distribuidos al azar en ocho grupos (A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1 y D2) de seis ratones por grupo. Los ratones fueron inoculados por vía intraperitoneal (i.p.) de la siguiente manera: los de los grupos A, B y C con 10, 20 y 40  $\mu\text{g}$  de Con A, respectivamente, y los de los grupos D con 0.1 ml de solución salina fisiológica (SSF). Todos los ratones fueron confrontados por vía i.p. con 2  $\text{LD}_{50}$  de taquizoitos de *Toxoplasma gondii*, cepa RH (1  $\text{LD}_{50}$  = 45 taquizoitos), obtenidos del exudado peritoneal de ratones con 48 h de infección. Los animales de los grupos A1, B1, C1 y D1 fueron expuestos al protozario dos días después del tratamiento; mientras que los roedores de los grupos A2, B2, C2 y D2, siete días después de éste. Posteriormente, se determinó el porcentaje de sobrevivencia de los ratones en un periodo de 15 días (Cuadro 1).

**Cuadro 1**  
DISEÑO EXPERIMENTAL UTILIZADO

Grupo <sup>1</sup>	Tratamiento (intra-peritoneal) <sup>2</sup>	Confrontación con <i>Toxoplasma gondii</i> <sup>3</sup>	Porcentaje de sobrevivencia <sup>4</sup>
A1	Con A 10 $\mu\text{g}$	Dos d.p.t.	16.66
B1	Con A 20 $\mu\text{g}$	Dos d.p.t.	16.66
C1	Con A 40 $\mu\text{g}$	Dos d.p.t.	0
D1	SSF 0.1 ml	Dos d.p.t.	0
A2	Con A 10 $\mu\text{g}$	Siete d.p.t.	33.33
B2	Con A 20 $\mu\text{g}$	Siete d.p.t.	50
C2	Con A 40 $\mu\text{g}$	Siete d.p.t.	16.66
D2	SSF 0.1 ml	Siete d.p.t.	0

<sup>1</sup>Seis ratones NIH por grupo.

<sup>2</sup>Con A = Concanavalina A; SSF = Solución salina fisiológica.

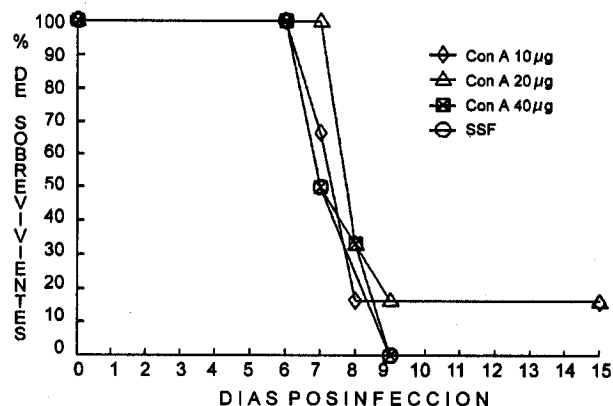
<sup>3</sup>Dos  $\text{LD}_{50}$  de la cepa RH; d.p.t. = días postratamiento.

<sup>4</sup>Determinado en un periodo de 15 días después de la exposición a *T. gondii*.

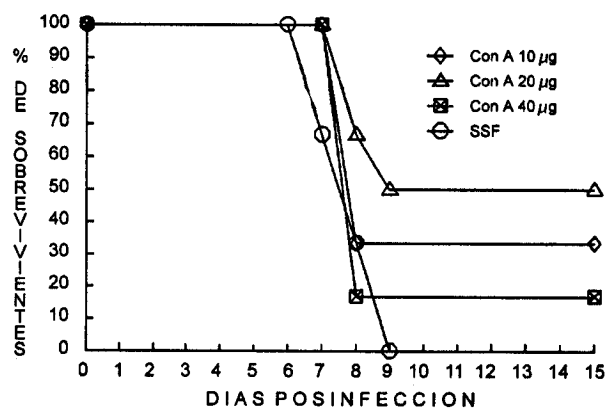
### Resultados

Los porcentajes de animales sobrevivientes obtenidos, 15 días después de la confrontación, fueron de 16.66, 16.66, 0, 0, (Figura 1), 33.33, 50, 16.66 y 0 (Figura 2) para los grupos A1, B1, C1, D1, A2, B2, C2 y D2, respectivamente. Los animales de los grupos tratados con SSF, murieron entre los siete y nueve

días posinfección. Con el objeto de corroborar los resultados obtenidos en los grupos tratados con Con A, siete días antes de la confrontación, se llevó a cabo un experimento más, en el cual se utilizaron 6 ratones por grupo. En esta prueba se obtuvieron resultados similares (datos no mostrados), excepto que en el grupo tratado con 40  $\mu\text{g}$  de Con A, se obtuvo una sobrevivencia de 33.33%.



**Figura 1.** Efecto de la concanavalina A contra la infección por *Toxoplasma gondii* en ratones NIH (seis por grupo). El tratamiento se aplicó por vía intraperitoneal dos días antes de la infección con 2  $\text{LD}_{50}$  de *T. gondii*, cepa RH.



**Figura 2.** Efecto de la concanavalina A contra la infección por *Toxoplasma gondii* en ratones NIH (seis por grupo). El tratamiento se aplicó por vía intraperitoneal siete días antes de la infección con 2  $\text{LD}_{50}$  de *T. gondii*, cepa RH.

### Discusión

Los resultados obtenidos indican que la inyección i.p. de Con A en ratones NIH, genera una protección parcial inespecífica contra *Toxoplasma gondii* cepa RH,

\* Sigma Chemical, St. Louis, MO.

la cual resulta mejor al aplicar 20  $\mu\text{g}$ , siete días antes de la confrontación. En estudios preliminares se observó que la aplicación i.p. de sobrenadantes de cultivos *in vitro* de linfocitos murinos, estimulados con Con A durante tres días seguidos en ratones susceptibles, confería protección (60-80%) contra el desafío con 2  $\text{LD}_{50}$  de *T. gondii* cepa RH.\* En este orden, se sabe que para la iniciación de la respuesta inmune específica son esenciales las células presentadoras de antígeno, particularmente los macrófagos, así como los linfocitos T cooperadores<sup>13</sup> de los cuales hay dos subclases: los T cooperadores 1 ( $\text{TH}_1$ ) y los T cooperadores 2 ( $\text{TH}_2$ ).<sup>13</sup> Los primeros son llamados también inflamatorios porque participan en la respuesta inflamatoria, producen preponderantemente interleucina 2 ( $\text{IL}_2$ ) e interferón gamma ( $\text{INF-}\gamma$ ); mientras que los segundos, producen básicamente  $\text{IL}_4$  e  $\text{IL}_5$ .<sup>15</sup> También se ha indicado que los linfocitos  $\text{TH}_1$  participan en respuestas protectoras en una variedad de infecciones por patógenos como virus (VIH), bacterias (*Mycobacterium* spp), protozoarios (*Plasmodium* spp y *T. gondii*), nematodos (*Trichinella spiralis*), trematodos (*Schistosoma mansoni*), entre otros; mientras que los  $\text{TH}_2$  generalmente están relacionados con la susceptibilidad a dichos patógenos.<sup>16</sup> En este sentido, se ha demostrado que el  $\text{INF-}\gamma$  es el principal factor que media la resistencia contra *T. gondii*<sup>18</sup> y que los anticuerpos anti- $\text{INF-}\gamma$  suprimen totalmente la inmunidad, tanto pasiva como activa, contra *T. gondii* en ratones inmunizados con la cepa vacunal TS-4.<sup>19</sup> De acuerdo con lo anterior, la explicación a la resistencia observada en el presente estudio probablemente se debió a que la aplicación i.p. de Con A en ratones, antes de la infección con *T. gondii*, estimuló la producción de linfocitos  $\text{TH}_1$ , que a su vez produjeron  $\text{INF-}\gamma$ , además de  $\text{IL}_2$  y otras citocinas, las cuales activaron macrófagos, células de importancia primordial en la resistencia contra *T. gondii*.<sup>4</sup> En este sentido, se ha sugerido que aunque los linfocitos T  $\text{CD}4+$ , productores de  $\text{INF-}\gamma$  y de  $\text{IL-2}$ , son inducidos por la vacunación contra *T. gondii* en ratones, las células T  $\text{CD}8+$  son las principales efectoras de inmunidad contra este protozoario *in vivo*;<sup>9</sup> sin embargo, los linfocitos T  $\text{CD}4+$  parecen desempeñar un papel sinérgico en la inmunidad inducida por vacunación, posiblemente debido al aumento de la síntesis de  $\text{INF-}\gamma$  por los linfocitos efectoras T  $\text{CD}8+$ .<sup>9</sup> En este orden, estudios recientes sugieren la participación de la síntesis del óxido nítrico (ON) en la destrucción de patógenos intracelulares, de acuerdo a la siguiente secuencia de eventos: el  $\text{INF-}\gamma$  activa al gene sintasa ON y regula la producción del factor de necrosis tumoral (TNF), estimulado por los agentes infecciosos;<sup>12</sup> el TNF entonces actúa de manera autócrina para amplificar la síntesis y liberación de ON de las células sensibiliza-

das por el  $\text{INF-}\gamma$ .<sup>12</sup> El  $\text{INF-}\gamma$  por sí solo es insuficiente para la destrucción y requiere del TNF producido por los macrófagos infectados como una segunda señal necesaria para la expresión de actividad antimicrobiana.<sup>12</sup>

Por otra parte, cabe señalar que la infusión intramamaria de Con A en bovinos productores de leche, cerca del secado de los animales, acelera la involución de la glándula mamaria, lo que da por resultado niveles elevados de factores protectores naturales.<sup>3</sup> Es posible que los resultados obtenidos por estos investigadores también se deban a la estimulación de linfocitos tipo  $\text{TH}_1$ .

Por otro lado, cabe hacer notar que la dosis y el tiempo de administración de la Con A antes de la infección son importantes. El mejor tiempo de administración fue de siete días (en comparación con dos días) antes de la infección y la mejor dosis del mitógeno fue de 20  $\mu\text{g}$ . Es probable que se necesite un periodo no menor a dos días y no mayor a siete días antes de la infección, para estimular linfocitos  $\text{TH}_1$  y activar apropiadamente macrófagos. También es probable que la dosis de mitógeno utilizada *in vivo* deba ser mayor a la empleada *in vitro* para inducir resistencia, pero no tan grande pues se puede generar inmunosupresión. En este sentido, se ha demostrado que las dosis altas de Con A y de otros mitógenos (50 y 150  $\mu\text{g}/\text{animal}$ , vía i.p.), aplicadas en ratones poco tiempo antes de la exposición a un antígeno timo-dependiente, generan inmunodepresión.<sup>5,11</sup>

Los resultados obtenidos indican que es posible inducir inmunidad inespecífica contra *T. gondii* en ratones tratados previamente con Con A en porcentajes de protección (50%) comparables a los obtenidos (40%) en ratones tratados conjuntamente con azithromicina (un antibiótico macrólido con propiedades antitoxoplasma) e  $\text{INF-}\gamma$  murino recombinante, durante 10 días después de la exposición a un inóculo letal de *T. gondii*, cepa RH.<sup>2</sup> No obstante, cabe aclarar que es necesario llevar a cabo más estudios para comprender mejor los mecanismos responsables de la resistencia inespecífica observada en el presente estudio.

Los resultados obtenidos en este trabajo, en el modelo ratón-*T. gondii*, sugieren la posibilidad de utilizar la Con A y otros inmunoestimulantes como alternativa para el control de enfermedades parasitarias, como la coccidiosis aviar y la triquinelosis murina, por ejemplo.

## Abstract

The effect of Concanavalin A (Con A) inoculation in mice on the induction of resistance against *Toxoplasma gondii* infection, was evaluated. Forty eight, parasite free, NIH mice (females weighing 22-24 g), were randomly distributed into eight groups (A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1 and D2) of six animals each. These animals were treated intraperitoneally (i.p.) as fo-

\*Martínez, F. Comunicación personal, 1992.

llows: Those in groups A, B and C received 10, 20 and 40  $\mu\text{g}$  of Con A, respectively; while those in groups D received 0.1 ml of phosphate buffered saline solution. All mice were confronted i.p. with 2 LD<sub>50</sub> of *T. gondii*, RH strain. Animals in groups A1, B1, C1 and D1 were exposed to the protozoan two days after the treatment with Con A; while those in groups A2, B2, C2 and D2, seven days later. The percentages of survivors obtained in a period of 15 days after the infection were: 16.66, 16.66, 0, 0, 33.33, 50, 16.66 and 0 for groups A1, B1, C1, D1, A2, B2, C2, and D2, respectively. To corroborate the results observed in the last four groups, the assay was repeated obtaining similar results, except that the percentage of survivors was 33.33 in the group treated with 40  $\mu\text{g}$  of Con A. Data obtained indicates that Con A injected i.p. in NIH mice induces non-specific resistance against *T. gondii*. The highest protection was obtained applying 20  $\mu\text{g}$  of the mitogen seven days before the exposition to the protozoan.

### Literatura citada

- Anderson, S.R., Bautista, S. and Remington, J.S.: Induction of resistance to *Toxoplasma gondii* in human macrophages by soluble lymphocyte products. *J. Immunol.*, **117**: 381-387 (1976).
- Araujo, F.G. and Remington, J.S.: Synergistic activity of azithromycin and gamma interferon in murine toxoplasmosis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35**: 1672-1673 (1991).
- Breau, W.C. and Oliver, S.P.: Accelerated bovine mammary involution induced by infusion of concanavalin A or phytohemagglutinin. *Am. J. vet. Res.*, **46**: 816-820 (1985).
- Buxton, D.: Toxoplasmosis: The first commercial vaccine. *Parasitol. Today*, **9**: 335-337 (1993).
- Calderon, R.A. and Cordoba, F.: Immunosuppressive activity of *Phaseolus coccineus* and *Phaseolus vulgaris* extracts in mice. *Eur. J. Immunol.*, **6**: 522-525 (1976).
- Cunningham, B., Selon, A., Yahara, I. and Edelman, G.: Mitogens in Immunobiology. *Academic Press*, New York, 1979.
- Diez, B., Galdeano, A., Nicolas, R. and Cisterna, R.: Relationship between the production of interferon- $\alpha/\beta$  and interferon- $\gamma$  during acute toxoplasmosis. *Parasitology*, **99**: 11-15 (1989).
- Frenkel, J.K.: Pathophysiology of toxoplasmosis. *Parasitol. Today*, **4**: 273-278 (1988).
- Gazzinelli, R.T., Hakim, F.T., Hieny, S., Shearer, G.M. and Sher, A.: Synergistic role of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in IFN- $\gamma$  production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J. Immunol.*, **146**: 286-292 (1991).
- Jones, T.C., Alkan, S. and Erb, P.: Spleen and lymph node cell populations, *in vitro* cell proliferation and IFN- $\gamma$  production during the primary immune response to *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.*, **8**: 619-629 (1986).
- Martínez-Cruz, M.A.: Comparación de los efectos biológicos de los productos de parásitos con los de algunas lectinas vegetales. Tesis de maestría. *Fac. de Cienc. Agropec.* Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos, 1991.
- Masihi, K.N.: Cytokines and immunomodulators: Promising therapeutic agents. *Parasitol. Today*, **10**: 1-2 (1994).
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A. and Coffman, L.: Two types of murine helper T cell clones. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.*, **136**: 2348-2357 (1986).
- Murray, H.W., Spitalny, G.L. and Nathan, C.F.: Activation of mouse peritoneal macrophages *in vitro* and *in vivo* by interferon- $\gamma$ . *J. Immunol.*, **134**: 1619-1622 (1985).
- Romagnani, S.: Human TH1 and TH2 subsets: Doubt no more. *Immunol. Today*, **12**: 256-257 (1991).
- Scott, P. and Kaufmann, H.E.: The role of T-cell subsets and cytokines in the regulation of infection. *Immunol. Today*, **12**: 346-348 (1991).
- Sklenar, I.J., Jones, T.C., Alkan, S. and Erb, P.: Association of symptomatic human infection with *Toxoplasma gondii* with imbalance of monocytes and antigen-specific T cell subsets. *J. Infect. Dis.*, **153**: 315-324 (1986).
- Suzuki, Y., Orellana, M.A., Schreiber, R.D. and Remington, J.S.: Interferon- $\gamma$ : The major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science*, **240**: 516-518 (1988).
- Suzuki, Y. and Remington, J.S.: The effect of anti-IFN- $\gamma$  antibody on the protective effect of Lyt-2 immune T cells against toxoplasmosis in mice. *J. Immunol.*, **144**: 1954 (1990).