

Adaptación natural de rata blanca a *Toxoplasma gondii**

Misael Chinchilla**, M. Alfaro** y Olga M. Guerrero**

(Recibido para su publicación el 29 de mayo de 1981)

Abstract: White rats were found to be resistant to 3×10^7 *Toxoplasma gondii* organisms (RH strain) inoculated either sc or ip. That resistance was age-dependent since survival time of 1- or 5-day-old rats inoculated with 10^4 or 10^6 tachyzoites was lower as compared with those 10 or 15 days old. Organisms kept in contact with a lysate of white rat complete peritoneal exudate showed reduced capacity to infect mice. Peritoneal exudate of 5-day-old rats showed a stronger effect than that of 1, 2, 3, or 4 day-infected animals. After 10 days the anti-toxoplasma effect diminished and it almost disappeared after 15 days of infection. Apparently age and macrophage activity are very important factors in the natural adaptability of the white rat to *Toxoplasma gondii*.

Las variedades gris y albina de *Rattus norvegicus* y los pollos son huéspedes con gran capacidad de mantener latente la infección con *Toxoplasma gondii* (Harboe y Erichsen, 1954; Lainson, 1955; Perrin *et al.*, 1943; Jacobs, 1956; Lewis y Markel, 1958), lo que contrasta con la gran susceptibilidad de otros animales, especialmente a cepas virulentas tales como la RH (Frenkel, 1953). Sin embargo, existen varias interrogantes acerca de las razones por las cuales existe un equilibrio tan marcado entre el parásito y aquellos huéspedes considerados por los autores citados como resistentes a la toxoplasmosis.

Por ejemplo, no se conocen los factores responsables de tal fenómeno y la edad a que comienza a manifestarse. Se ha sugerido que la inmunidad humoral y la acción de los macrófagos son los principales responsables de tal resistencia. De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo parecen ser los macrófagos más que los anticuerpos los responsables o parte de los factores importantes en la defensa natural de la rata blanca contra el parásito. Esto resulta comprensible por el hecho de que el toxoplasma es un parásito intracelular y los anticuerpos en estos organismos tienen una acción de defensa relativa.

En este trabajo informaremos sobre algunos aspectos que podrían contribuir al mejor conocimiento de la relación huésped-parásito entre la rata blanca y el toxoplasma.

* Este trabajo fue realizado con la ayuda de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT).

** Centro de Investigación y Diagnóstico en Parasitología y Departamento de Parasitología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

MATERIAL Y METODOS

Estudio de la infección con *T. gondii* en la rata blanca: Se usó ratas hembras adultas (130-150g) y ratones de ambos sexos (20-30g) criados con un alimento concentrado (CalfManna, Albers Milling Company, Los Angeles, California) y agua *ad libitum*.

Para la inoculación de los animales se usó la cepa RH de *T. gondii*; se utilizó exudado peritoneal de ratones con 3 a 4 días de infección. El exudado fue extraído con medio para cultivo de tejido, Minimal Essential Medium (MEM), con 10% de suero fetal bovino inactivado más 100 U de penicilina y 100 μ g de estreptomina por ml (MEM-SFB); la suspensión se lavó por centrifugación y los taquizoitos fueron liberados pasando el sedimento con las células peritoneales a través de una aguja número 26. Los organismos se contaron en hemocitómetro y los animales fueron inoculados por vía intraperitoneal (i.p.) y subcutánea (s.c.) con 3×10^7 taquizoitos. Para observar el proceso infeccioso los animales fueron sacrificados después de 1 hora, 1, 2, 3, 4, 9, 16, 23 y 30 días. En cada caso se estudió la sangre, el exudado peritoneal y muestras del sitio de inoculación y de las vísceras.

La sangre se obtuvo por punción cardiaca y se dividió en 2 porciones: una se mezcló con EDTA a 0,1% para evitar la coagulación y se inoculó en ratones para determinar la posible parasitemia. La segunda porción fue usada para obtener suero que fue conservado a -20C hasta su estudio por medio de la prueba de Sabin y Feldman (1948).

Para obtener el exudado peritoneal se inyectaron 8 ml de MEM-SFB en la cavidad peritoneal de las ratas infectadas; se extrajeron de 4 a 6 ml de fluido peritoneal y se probó su infectividad inoculando 1,8 ml en 1 ratón y 0,2 ml en otro. El resto del exudado fue centrifugado a 100 x g durante 8 minutos; el sedimento fue diluido con medio de cultivo y las células se contaron en hemocitómetro. Se hicieron preparaciones del sedimento, se fijaron en alcohol metílico y se tiñeron con Giemsa.

Tejidos del sitio de la inoculación y muestras de pulmón, corazón, hígado, bazo, timo, riñón, glándulas suprarrenales, ganglios linfáticos y ojos fueron removidos, macerados separadamente con permutita (Coleman y Bell), resuspendidos en solución salina al 0,85% e inoculados i.p. en 2 ratones. El resto de estos órganos se fijó en formalina al 10% y pH 7, y los cortes se tiñeron con Hematoxilina-Eosina.

Se determinó el tiempo de sobrevivencia de los ratones inoculados con los órganos de las ratas y la presencia de toxoplasmas en los animales muertos fue comprobada examinando preparados del exudado peritoneal y del pulmón.

Estudio de la susceptibilidad en ratas de diferentes edades: Grupos de 6 ratas de 1, 5, 10 y 15 días fueron inoculadas i.p. con 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , y 10^8 toxoplasmas/100 g de peso corporal. La infección en las ratas muertas fue determinada por medio de frotis teñidos del exudado peritoneal o en cortes histológicos.

Evaluación *in vitro* del efecto del exudado peritoneal sobre *T. gondii*: El exudado peritoneal obtenido de ratas con 1 hora, 1, 2, 3, 4 y 5 días de infección fue centrifugado a 100 x g por min. El sobrenadante (Sob) fue separado y las células en el sedimento fueron lisadas (Lis) mediante 10 ciclos de congelación y descongelación sucesivas (-70C y 37C). Este material (Lis y Sob) fue mantenido a 4 C por no más de 24 horas.

descongelación sucesivas (-70C y 37C). Este material (Lis y Sob) fue mantenido a 4 C por no más de 24 horas.

Los taquizoitos se pusieron en contacto con los productos activos de las ratas (Sob y Lis) a 37C por 1, 4, 6 y 8 horas. Después de estos períodos, 0,2 ml de la mezcla (toxoplasmas y productos del exudado peritoneal) fueron inoculados i.p. en ratones blancos para confirmar la presencia de taquizoitos viables. El tiempo de sobrevivencia de los ratones fue controlado y la presencia del parásito fue confirmada como se ha descrito previamente.

Para determinar en qué momento se manifestaba mejor el efecto inhibitor de los componentes del exudado peritoneal de la rata, 10^4 organismos fueron puestos en contacto por diversos períodos de tiempo con exudado completo, células adherentes, células no adherentes y sobrenadante de ratas infectadas, 1 h, y 1, 5, 10, y 15 días, determinando la viabilidad de los organismos por inoculación en ratones como en los experimentos anteriores. Los resultados fueron analizados mediante la prueba t de Student (Hill, 1966).

RESULTADOS

Infección en la rata blanca: En las ratas inoculadas i.p. y s.c. con la cepa RH de *T. gondii* los parásitos se encontraron en los órganos hasta 4 días después de la infección.

En los animales inoculados s.c. el toxoplasma se aisló del sitio de inoculación hasta 9 días después de la infección. El organismo estuvo presente en el exudado peritoneal de los animales inoculados por esta vía, hasta los 4 días. El parásito fue recobrado de la sangre de las ratas después de 1 hora de la inoculación i.p., pero no de los animales inoculados s.c. Uno, dos, tres, y cuatro días después de la infección, el parásito fue aislado de la sangre, independientemente de la vía de inoculación. Los órganos en que se observó o se aisló el parásito con más frecuencia fueron pulmón, bazo e hígado, independientemente de la ruta de inoculación. La prueba de Sabin-Feldman fue positiva en todas las ratas después de 15 días de infección.

Influencia de la edad de las ratas en su adaptabilidad a toxoplasma: En estudios previos observamos que los taquizoitos en concentraciones de 10^1 y 10^3 por 100 g de peso corporal no mataron ratas de 1, 11, 21 y 36 días de edad. Por esta razón aumentamos el número de organismos usados para inocular ratas de 1 a 15 días de edad. Los resultados de estos experimentos (Fig. 1) muestran que la sobrevivencia de las ratas inoculadas con 10^8 organismos fue igualmente corta para todos los grupos etarios. Todas las ratas de 15 días sobrevivieron a la infección con 10^7 taquizoitos pero los animales de 1, 5 y 10 días murieron con este inóculo. Las ratas de 1 y 5 días murieron con una dosis de 10^6 parásitos casi al mismo tiempo, pero no las de 10 y 15 días. Resultados similares se observaron al usar un inóculo de 10^5 taquizoitos. Todas las ratas que murieron presentaban graves lesiones pulmonares con gran cantidad de toxoplasmas. Los animales inoculados con 10^4 toxoplasmas sobrevivieron en su totalidad a la infección.

Efecto *in vitro* del exudado peritoneal de la rata contra *T. gondii* (cepa RH): Los resultados que se presentan se obtuvieron de por lo menos 3 experimentos en cada caso, así que la sobrevivencia que se indica en los gráficos es el promedio de no menos de 12 ratones.

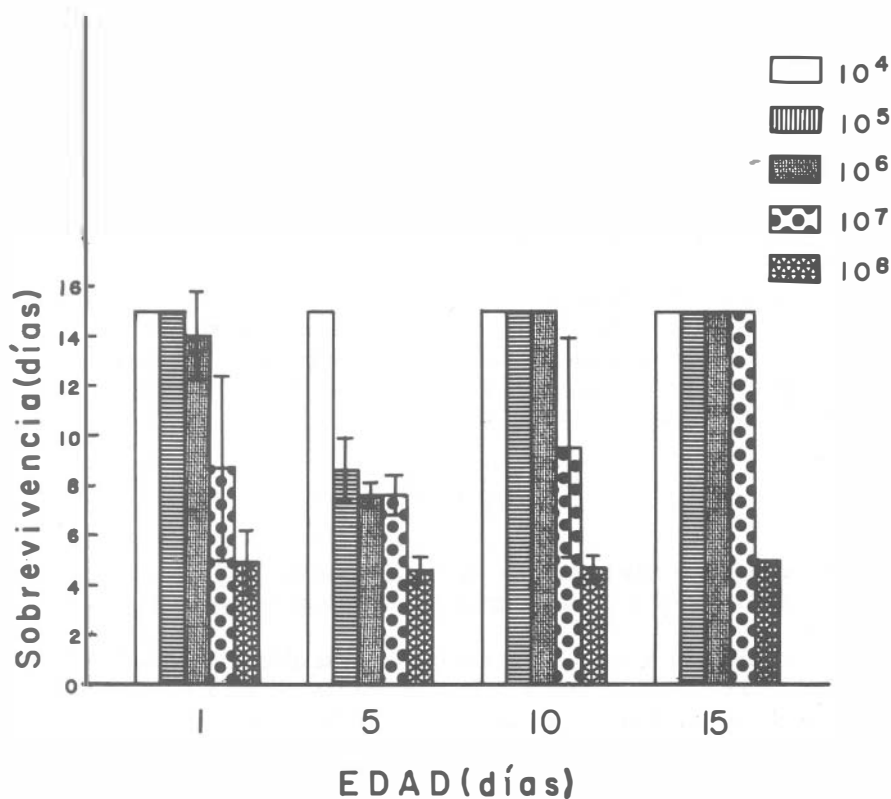


Fig. 1. Sobrevivencia en ratas blancas de edades diferentes inoculados con varias concentraciones de tachizoitos de *T. gondii*.

No hubo diferencia significativa entre el porcentaje de sobrevivencia de ratones inoculados con mezclas control (10^1 o 10^2 organismos más MEM-SFB) o mezclas de productos del exudado peritoneal de la rata, más los organismos (Fig. 2). Casi todos los ratones inoculados con mezclas que contenían 10^8 organismos murieron, independientemente del tipo de tratamiento a que fueron sometidos. Sin embargo cuando 10^4 , 10^5 y 10^6 organismos estuvieron en contacto con productos del exudado peritoneal de la rata, el tiempo de sobrevivencia de los ratones fue más largo que en aquellos inoculados con las mezclas control (toxoplasma más MEM-SFB). El análisis del grupo en que se usó 10^4 toxoplasmas (Fig. 3) muestra que el lisado ejerció el mayor efecto después de 4, 6, y 8 horas de contacto con el parásito. Resultados similares fueron observados cuando se usaron 10^6 organismos (Fig. 4) pero el efecto fue mayor después de 6 y 8 horas de contacto. Se notó además cierto efecto inhibitor en el líquido sobrenadante del exudado peritoneal de ratas con 3, 4 y 5 días de infección. El análisis estadístico de los datos indicó que las diferencias encontradas eran significativas ($P < 0.005$ y < 0.05). Fue después de 5 días de infección cuando los componentes peritoneales demostraron una mayor acción contra el toxoplasma ya que tanto el exudado completo como las células adherentes y el sobrenadante tuvieron un efecto letal contra el organismo *in vitro*, demostrado por la sobrevivencia de los ratones inoculados con las diferentes

mezclas (Fig. 5). A los 10 días el efecto de los productos activos de la rata comenzó a disminuir, desapareciendo casi por completo a los 15 días (Fig. 5 c y d).

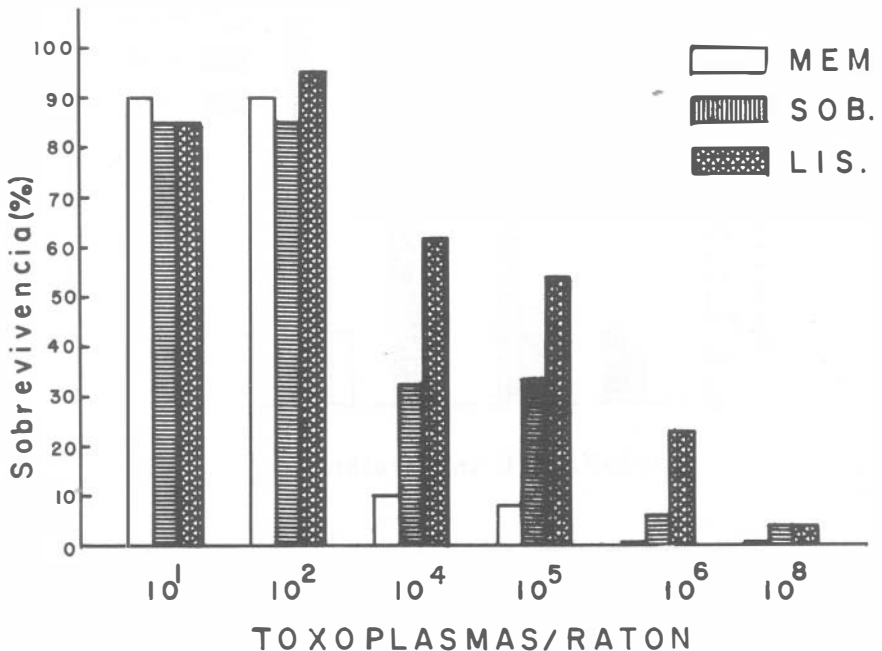


Fig. 2. Sobrevivencia de los ratones inoculados con toxoplasmas tratados con productos del exudado peritoneal de la rata blanca.
MEM: "Minimal essential medium"
Sob: Sobrenadante del exudado peritoneal
Lis: Lisado de células del exudado peritoneal

DISCUSION

La capacidad natural de la rata blanca para conservar infecciones latentes de *T. gondii* por largo tiempo sin presentar patología importante fue demostrada por Lainson (1955) y por Lewis y Marke (1958). Nosotros confirmamos estos hallazgos ya que animales infectados i.p. y s.c. con 3×10^7 organismos no murieron ni presentaron síntomas de enfermedad durante un período de 51 días. Se ha postulado la hipótesis de que esta particularidad biológica podría depender de la ruta de infección (Lainson, 1955), pero nosotros no encontramos ninguna diferencia entre las ratas inoculadas s.c. o i.p., rutas que no son las naturales, pero que por su violencia, resaltan mejor la capacidad de la rata de manejar las infecciones con *Toxoplasma*. Los organismos fueron aislados de varios órganos de la rata durante los primeros 4 días de infección independientemente de la ruta de inoculación.

La ausencia de parásitos en los tejidos del resto de las ratas infectadas podría deberse a una tasa muy baja de multiplicación de toxoplasma en este huésped. Ruchman y Fowler (1951) sin embargo, aislaron el parásito de ratas con 10 días de infección. Aunque Lainson (1955) indica que la rata adquiere la resistencia a los 21 días, no está claro a qué edad es capaz de defenderse de un cierto número de

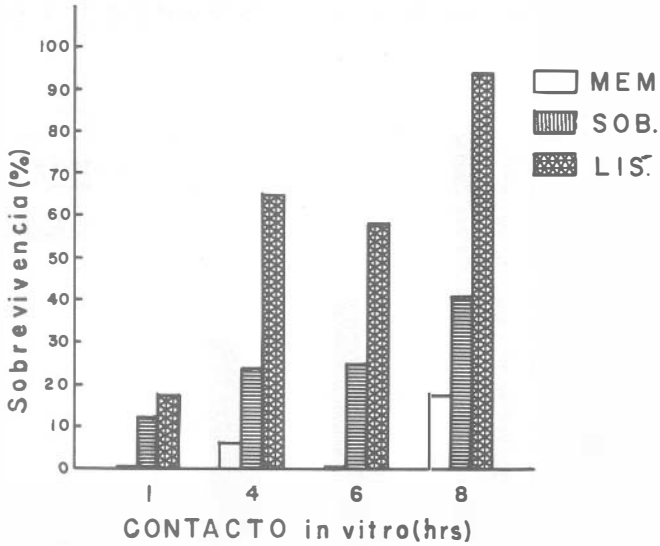


Fig. 3. Sobrevivencia de ratones inoculados con 10^4 toxoplasmas tratados previamente con productos del exudado peritoneal de rata blanca.
 MEM: "Minimal essential medium"
 Sob: Sobrenadante de exudado peritoneal
 Lis: Lisado de células del exudado peritoneal

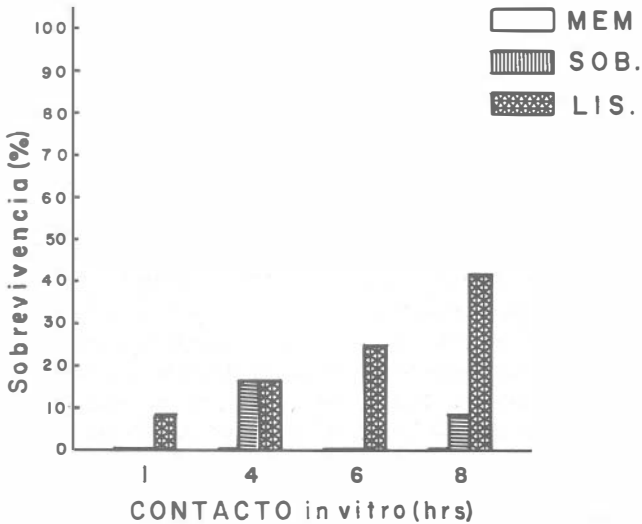


Fig. 4. Sobrevivencia de ratones inoculados con 10^6 toxoplasmas tratados previamente con productos del exudado peritoneal de rata blanca.
 MEM: "Minimal essential medium"
 Sob: Sobrenadante de exudado peritoneal
 Lis: Lisado de células del exudado peritoneal

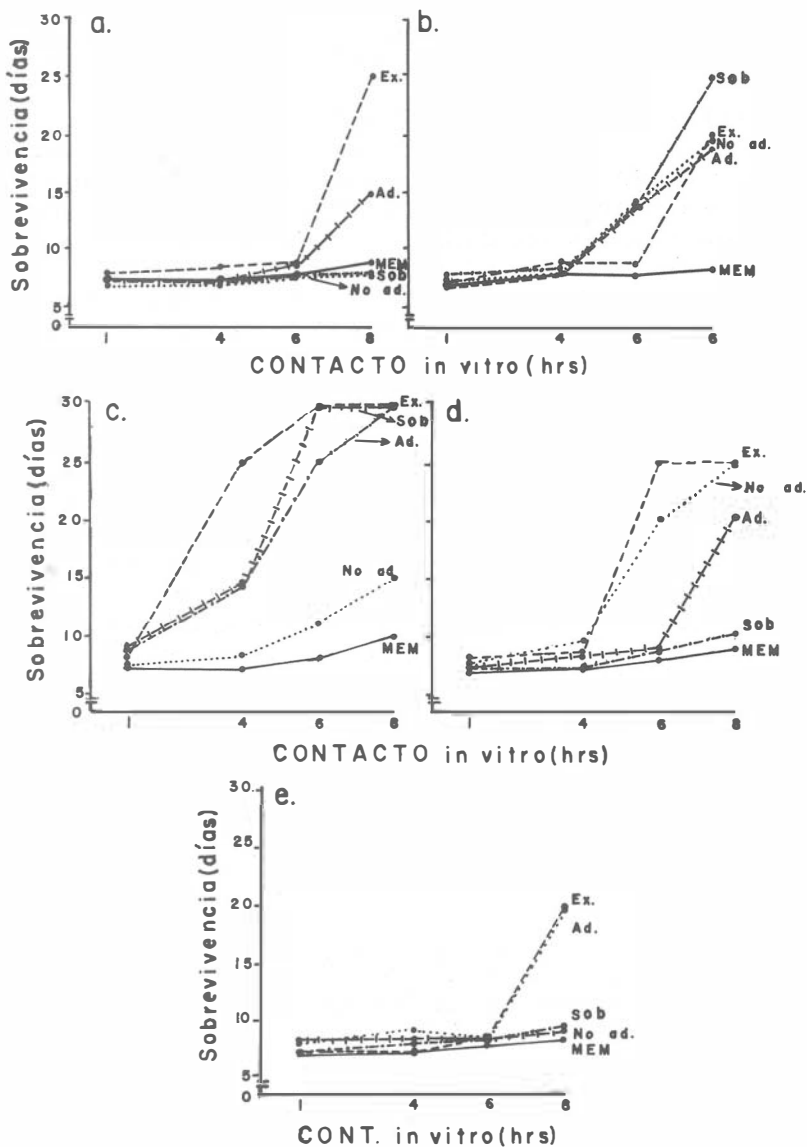


Fig. 5. Sobrevivencia de ratones inoculados con toxoplasmas tratados con productos del exudado peritoneal de ratas blancas después de varios períodos de infección.

- a) 1 hora de infección
- b) 1 día
- c) 5 días
- d) 10 días
- e) 15 días

MEM: "Minimal essential medium"

Ex: Exudado peritoneal completo

Sob: Sobrenadante

Ad: Células adherentes del exudado peritoneal

No ad: Células no adherentes

toxoplasmas. Usando inóculos cuidadosamente controlados hemos establecido que tal adaptación aparece en edad muy temprana ya que se requieren cantidades tan altas como 10^7 o 10^8 taquizoitos de la cepa RH para matar ratas recién nacidas (Fig. 1).

La inhibición del toxoplasma por el exudado peritoneal de ratas inoculadas i.p. sugiere que las células peritoneales especialmente los macrófagos podrían jugar un papel muy importante en la primera fase del ataque contra el parásito, como fue demostrado en otras infecciones (Cline *et al.*, 1978). Con base en esta hipótesis se hicieron algunos estudios con células del exudado peritoneal. El número de taquizoitos usados fue crítico ya que la infectividad con un número bajo de organismos fue poca, independientemente del tratamiento (Fig. 2). Por otro lado los inóculos muy grandes no fueron inhibidos en su totalidad por ninguno de los componentes del exudado peritoneal como lo demuestra la mortalidad en los ratones. La acción de tales componentes contra el parásito sólo pudo ser observada al usar 10^4 , 10^5 y 10^6 taquizoitos. En efecto, los productos liberados de las células (Lis) así como el sobrenadante del exudado peritoneal (Sob) de la rata tuvieron efecto letal *in vitro* (Fig. 2) sobre los toxoplasmas ($P = <0.005$ a <0.05).

El líquido peritoneal libre de células (Sob) no inhibió siempre al parásito mientras que el lisado (Lis) si lo destruyó en todos los casos y en varios experimentos. Esto parece indicar una acción endógena de las células fagocíticas. Este efecto podría ser debido a enzimas como en el caso del sistema de Klebanoff (1968) o a otro de los mecanismos antimicrobianos independientes del oxígeno (Cline *et al.*, 1978). Cuando los macrófagos de animales susceptibles son activados artificialmente o provienen de un huésped inmune, ejercen un efecto letal contra el toxoplasma (Remington *et al.*, 1972; Anderson y Remington, 1974; Borges y Johnson, 1975; Shirahata *et al.*, 1976; Lindberg y Frenkel, 1977) o contra *Besnoitia jellisoni* (Hoff y Frenkel, 1974). En el caso de la rata blanca la situación es diferente puesto que los macrófagos son activados aún cuando provengan de animales no inmunes. Además, los macrófagos de la rata blanca son capaces de matar o inhibir *in vitro* la multiplicación del toxoplasma (cepa RH) sin previa estimulación antigénica.

La Fig. 5 muestra otros datos indicativos de que aparentemente la naturaleza del factor que evita la acción patológica del toxoplasma contra la rata no es estrictamente inmunológica. En efecto la mayor acción inhibitoria se encontró en exudados de ratas con 5 días de infección. Después de 10 ó 15 días el efecto disminuyó considerablemente manifestándose sólo en el exudado completo y en las células adherentes; por lo tanto, el efecto parece ser el resultado de características naturales de la rata blanca ya que es mayor entre el 1º y 5º día, desapareciendo luego. Al contrario, en el fenómeno inmunológico cuánto más largo es el contacto con el antígeno más fuerte es la respuesta.

En el caso de este modelo en que taquizoitos de la cepa RH de *Toxoplasma* fueron inoculados intraperitoneal y/o subcutáneamente, nosotros sugerimos como probables factores determinantes del equilibrio entre el *Toxoplasma* y la rata blanca la acción de los macrófagos quienes juegan un papel muy importante en el primer contacto del toxoplasma con la rata blanca. Esta acción es complementada más tarde con otros factores fisiológicos no conocidos. Otro factor es la edad que como hemos comprobado, es definitiva para la muerte o no de la rata infectada.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos profundamente a los Dres. Pedro Morera y Armando Ruiz por la cuidadosa revisión del manuscrito y al Dr. J.K. Frenkel por sus oportunos

consejos y sugerencias con relación a este trabajo. Nuestro especial reconocimiento a Zaida Umaña y Aleida Quirós por la asistencia secretarial, a Edwin Valenciano por su valiosa ayuda técnica y a Fabio Camacho por el cuidado de los animales.

RESUMEN

En el estudio de algunos factores relacionados con la adaptación natural de la rata blanca al *Toxoplasma gondii* (cepa RH), se encontró que soportaron a 3×10^7 taquizoitos inoculados s.c. o i.p. y que su susceptibilidad fue dependiente de la edad, ya que la sobrevivencia de animales con 1 o 5 días de edad inoculados con 10^4 o 10^6 organismos fue más baja que en animales de 10 y 15 días. Toxoplasmas que estuvieron en contacto con un lisado de las células peritoneales de la rata blanca perdieron siempre su viabilidad ya que no infectaron ratones blancos. El sobrenadante sólo inhibió al parásito en pocos casos, por todo lo cual el factor inhibidor es probablemente endógeno en las células peritoneales. El exudado de animales con 5 días de infección mostró el efecto más notorio. Después de 10 días la acción contra el toxoplasma disminuyó y casi desapareció en los animales con 15 días de infección. La edad y la acción de los macrófagos parecen ser algunos de los factores importantes en la capacidad natural de la rata blanca a soportar infecciones tan violentas con toxoplasma como lo son las inoculaciones s.p. y s.c. de taquizoitos de la cepa RH.

REFERENCIAS

- Anderson, S.E., & J.S. Remington
1974. Effect of normal and activated human macrophages on *Toxoplasma gondii*. J. Exp. Med., 139: 1154-1174.
- Borges, J.S., & W.D. Johnson
1975. Inhibition of multiplication of *Toxoplasma gondii* by human monocytes exposed to T-lymphocyte products. J. Exp. Med., 141: 483-496.
- Cline, M.J., R.I. Lehrer, M.C. Territo & D.W. Golde
1978. Monocytes and macrophages: Functions and diseases. Ann. Int. Med., 88: 78-88.
- Frenkel, J.K.
1953. Host, strain and treatment variation as factors in the pathogenesis of toxoplasmosis. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 2: 390-415.
- Harboe, A., & S. Erichsen
1954. Toxoplasmosis in chickens 3. Attempts to provoke a systemic disease in chickens by infection with a chicken strain and a human strain of toxoplasma. Acta. Path. Microbiol. Scand., 35: 495-502.
- Hill, A.B.
1966. Principles of medical statistics. 8th ed. Oxford University Press, New York p. 143-151.
- Hoff, R.L. & J.K. Frenkel
1974. Cell mediated immunity against *Besnoitia* and *Toxoplasma* in specifically and cross immunized hamsters and in cultures. J. Exp. Med., 139: 560-580.
- Jacobs, L.
1956. Propagation, morphology and biology of *Toxoplasma*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 64: 154-179.

Klebanoff, S.J.

Myeloperoxidase halide-hydrogen peroxide antibacterial system. *J. Bacteriol.*, 95: 2131-2138.

Lainson, R.

1955. Toxoplasmosis in England II. Variation factors in the pathogenesis of *Toxoplasma* infections: the sudden increase in virulence of a strain after passage in multimammate rats and canaries. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 49: 384-416.

Lewis, W.P., & E.K. Markel

1958. Acquisition of immunity to toxoplasmosis by the newborn rat. *Exp. Parasit.*, 7: 463-467.

Lindberg, R.E., & J.K. Frenkel

1977. Cellular immunity to *Toxoplasma* and *Besnoitia* in hamsters: specificity and the effects of cortisol. *Infect. Immun.*, 15: 855-862.

Perrin, T.L., G.D. Brighman, & E.G. Pickens

1943. Toxoplasmosis in wild rats. *J. Inf. Dis.*, 72: 91-96.

Remington, J.S., J.L. Krahenbuhl, & J.W. Mendenhall

1972. A role for activated macrophages in resistance to infection with *Toxoplasma*. *Infect. Immun.*, 6: 829-834.

Ruchman, T., & J.C. Fowler

1951. Localization and persistence of *Toxoplasma* in tissues of experimentally infected white rats. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 76: 793-796.

Sabin, A.B., & H.A. Feldman

1948. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science*, 108: 660-663.

Shirahata, T., K. Shimizu, & N. Suzuki

1976. Effect of immune lymphocyte products and serum antibody on the multiplication of *Toxoplasma* in murine peritoneal macrophages. *Z. Parasitenk.*, 49: 11-23.