

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad de Ciencias Veterinarias

Trabajo de tesis realizado como requisito para obtener el título de
DOCTORA EN CIENCIAS VETERINARIAS

TITULO DEL TRABAJO

Estudios biológicos e inmunológicos de aislamientos de
Toxoplasma gondii provenientes de animales de zoológico en
Argentina

TESISTA: Lic. Mariana Bernstein

DIRECTORES: Dr. Gastón Andrés Moré / Dra. Lais Luján Pardini

ASESORA CIENTÍFICA: Dra. María Cecilia Venturini

Lugar de trabajo: Laboratorio de Inmunoparasitología, Departamento de Epizootiología y
Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

MIEMBROS DEL JURADO:

Dr. Eduardo Carlos Mórtola

Dr. Sergio Oscar Angel

Dr. Dadín Prando Moore

2019

Dedicatoria

A la ciencia de Argentina.

Agradecimientos

Agradezco en especial:

A Cecilia y Juan por permitirme realizar la investigación para mi tesis doctoral en el LAINPA.

A CONICET por becarme para poder realizar la carrera de doctorado.

A mis directores de tesis: Lais Pardini por enseñarme desde sostener una pipeta en adelante y Gastón Moré por ser super práctico y orientarme para tomar decisiones. Ambos por trabajar conmigo a la par, codo a codo en la mesada y en la escritura haciendo la tesis en equipo.

A Selva e Isidoro por prepararme toooooo el material para los ensayos.

A todo el equipo del LAINPA (Lucy, Lauri, Andre, Lore, Magda, Diego, Seba, Kevin, Marina, Bety, Eli) por compartir día a día la convivencia y ayudarme en las múltiples tareas de la investigación.

A Andrés Alonso por ayudarme a poner a punto el protocolo del ensayo *in vitro*.

A Chunlei Su por recibirme en su laboratorio y a la comisión *Fulbright*-Ministerio de Educación y Deportes por becarme para ir.

A Elisa, Estefania y Juan por asesorarme y ayudarme con la estadística cuando creí que mis datos eran inanalizables.

A Tranda y su equipo del laboratorio de Patología Especial por el análisis de HP.

A mi familia, amigas y amigos por su apoyo siempre y por esperarme para comer y tomar mate post-chequeo de ratones y cultivos los domingos.

Citas bibliográficas correspondientes a las publicaciones parciales del trabajo de tesis

- Publicaciones con referato

1. **Bernstein, M.**, Pardini, L., Moré, G., Unzaga, J.M., Su, C., Venturini, M.C. 2018. Population structure of *Toxoplasma gondii* in Argentina. Infection, Genetics and Evolution 65, pp. 72-79. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.07.018.

- Presentaciones a congresos

1. **Bernstein, M.**, Moré, G., Pardini, L., Venturini, M. C. 2014. Estudios biológicos e inmunológicos de aislamientos de *Toxoplasma gondii* de animales de zoológico en Argentina. Jornada de Ciencia y Técnica 2014 FCV-UNLP. Trabajo resumen. Analecta Veterinaria 2014; 34 (1-2) pag. 51.
2. **Bernstein M.**, Pardini L., Moré G., Samus S., Unzaga J.M., Venturini M. C. 2016. Red filogenética de aislamientos de *Toxoplasma gondii* de origen animal y humano en Argentina. Congreso Sociedad Argentina de Infectología - SADI, Mendoza, Argentina, 22 al 24 de mayo. Presentación oral.
3. **Bernstein, M.**, Pardini, L., Moré, G., Campero, LM., Unzaga, JM., Venturini, MC. 2017. A *Toxoplasma gondii* atypical isolate reveals similar behavior to the most virulent reference strain. 26th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP), 4-8 septiembre, Kuala Lumpur, Malasia. Poster y trabajo resumen.

4. **Bernstein, M.**, Pardini, L., Moré, G., Unzaga, J.M., Su, C., Venturini, M.C. 2018. Análisis de genotipos de *Toxoplasma gondii* presentes en Argentina. II Congreso Internacional de Zoonosis y el IX Congreso Argentino de Zoonosis. 5-7 de junio, Buenos Aires, Argentina. Poster y trabajo resumen.

Citas bibliográficas correspondientes a las publicaciones parciales relacionadas de modo indirecto al trabajo de tesis

- Publicaciones con referato

1. Pardini, L., Carral, L.A., **Bernstein, M.**, Gos, M.L., Olejnik, P., Unzaga, J.M., Kaufer, F.J., Durlach, R.A., Venturini, M.C. 2013. First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from a human placenta in Argentina. *Parasitology International* 63, 470-472. DOI: 10.1016/j.parint.2013.10.011.
2. Pardini, L., Moré, G., Rudzinski, M., Gos, M.L., Campero, L.M., Meyer, A., **Bernstein, M.**, Unzaga, J.M., Venturini, M.C. 2016. *Toxoplasma gondii* isolates from chickens in an area with human toxoplasmic retinochoroiditis. *Experimental Parasitology*, pp. 16-20. DOI: 10.1016/j.exppara.2016.03.006.
3. Pardini L., **Bernstein, M.**, Carral, L. A., Kaufer, F. J., Dellarupe, A., Gos, M. L., Campero, M. L., Moré, G., Messina, M. T., Schneider, M. V., Freuler, C. B., Durlach, R. A., Unzaga, J. M., Venturini, M. C. 2019. Congenital human toxoplasmosis caused by non-clonal *Toxoplasma gondii* genotypes in

Argentina. Parasitology International 68, pp. 48-52. DOI:
10.1016/j.parint.2018.10.002.

- Presentaciones a congresos

1. Venturini, M.C., Unzaga, J.M., Bacigalupe, D.R., Rambeaud, M., Moré, G., Pardini, L., Dellarupe, A., Campero, L., Eiras, D., De Felice, L., Gos, M.L., **Bernstein, M.** 2014. Estudios biológicos, inmunológicos y moleculares en infecciones producidas por protozoos apicomplexa en los animales. Jornada de Ciencia y Técnica FCV-UNLP. Poster y trabajo resumen. Analecta Veterinaria 2014; 34 (1-2) pag. 88.
2. Pardini L., Carral L.A., Dellarupe A., Moré G., **Bernstein M.**, Gos, M.L., Freuler C., Unzaga J.M., Kaufer F.J., Durlach R.A., Venturini M.C. 2015. Primer aislamiento y caracterización molecular de un genotipo atípico de *Toxoplasma gondii* en un caso de toxoplasmosis congénita en Argentina. Sociedad Argentina de Protozoología, XXVII Reunión Anual, Buenos Aires. 15 al 17 de noviembre. Poster y trabajo resumen.
3. Gos, M.L., Campero, L., Steffen, K., **Bernstein, M.**, Pardini L., Moré G., Unzaga J.M., Venturini, M.C. 2015. Identificación de antígenos inmunodominantes para la confirmación del diagnóstico de toxoplasmosis en caprinos. Sociedad Argentina de Protozoología, XXVII Reunión Anual, Buenos Aires. 15 al 17 de noviembre. Poster y trabajo resumen.

4. Gos, M.L., Campero, L.M., Samus, S., Pardini, L., **Bernstein, M.**, Rambeaud, M., Moré G.A., Unzaga J.M., Venturini M.C. 2015. Detección de anticuerpos para *Toxoplasma gondii* en cabras a través de dos pruebas inmunoserológicas. II Jornada Internacional - VIII Jornada y reunión Anual de la Asociación Argentina de Inmunología veterinaria. Tandil. 25 y 26 de noviembre. Poster y trabajo resumen.
5. Pardini L., Carral L., **Bernstein M.**, Moré G., Gos M. L., Dellarupe A., Freuler C.B., Unzaga J.M., Kaufer F.J., Durlach R.A., Venturini M.C. 2016. Toxoplasmosis congénita humana en Argentina: aislamientos atípicos de *Toxoplasma gondii*. Congreso Sociedad Argentina de Infectología - SADI 2016, Mendoza, Argentina, 22 al 24 de mayo. Poster y trabajo resumen.
6. **Bernstein M.**, Pardini L., Carral L.A., Gos, M.L., Moré G., Kaufer F.J., Dellarupe A., Freuler C., Unzaga J.M., Durlach R.A., Venturini M.C. 2017. Genotipos de *Toxoplasma gondii* en casos de toxoplasmosis aguda en mujeres gestantes en Argentina. XVII Congreso Sociedad Argentina de Infectología - SADI, 15- 17 junio, Mar del Plata, Argentina. Poster y trabajo resumen.
7. Pardini L., Carral L.A., **Bernstein M.**, Gos, M.L., Campero L.M., Moré G., Kaufer F.J., Freuler C., Unzaga J.M., Durlach R.A., Messina M., Schneider M.V., Venturini M.C. 2017. Nuevo aislamiento atípico de *Toxoplasma gondii* en un caso de toxoplasmosis congénita aguda. XVII Congreso Sociedad

Argentina de Infectología - SADI, 15-17 junio, Mar del Plata, Argentina.
Poster y trabajo resumen.

8. Pardini, L., **Bernstein, M.**, Campero, L.M., Moré, G., Unzaga, J.M., Venturini, M.C. 2017. Evaluation of biological behavior of atypical *Toxoplasma gondii* isolates. 26th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP), 4-8 Septiembre, Kuala Lumpur, Malasia. Poster y trabajo resumen.
9. Pardini, L., **Bernstein, M.**, Carral, L., Kaufer, F.J., Gos, M.L., Rambeaud, M., Moré, G., Mesina, M.T., Schneider, M.V., Freuler, C.B., Durlach, R.A., Unzaga, J.M., Venturini, M.C. 2018. Toxoplasmosis congénita humana: nuevos aislamientos atípicos de *Toxoplasma gondii* en Argentina. II Congreso Internacional de Zoonosis y el IX Congreso Argentino de Zoonosis. 5-7 de junio, Buenos Aires, Argentina. Poster y trabajo resumen.

INDICE DE CONTENIDOS

TÍTULO: Estudios biológicos e inmunológicos de aislamientos de <i>Toxoplasma gondii</i> provenientes de animales de zoológico en Argentina	01
PALABRAS CLAVE	01
RESUMEN	01
TITLE: Biological and immunological studies of isolates of <i>Toxoplasma gondii</i> from zoo animals in Argentina	04
KEYWORDS	04
ABSTRACT	04
1. INTRODUCCIÓN	07
1.1. Descubrimiento de <i>Toxoplasma gondii</i>	07
1.2. Ubicación taxonómica	07
1.3. Ciclo de vida e infección	08
1.4. Morfología y biología molecular	10
1.5. Población de <i>T. gondii</i>	12
1.6. Redes filogenéticas para análisis poblacional de <i>T. gondii</i>	17
1.7. Antecedentes de invasión y replicación <i>in vitro</i> de <i>T. gondii</i>	18
1.8. Respuesta inmune del hospedador.....	22
1.9. Evaluación de los niveles de producción de citoquinas.....	23
1.10. Antecedentes de ensayos en modelo murino.....	25
2.OBJETIVOS.....	30
3.HIPÓTESIS.....	31
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
4.1. OBJETIVO A	32
4.1.1. Diseño experimental	32
4.1.2. Muestras de ADN de <i>T. gondii</i> de Argentina	33

4.1.3. Genotipificación	33
4.1.4. Identificación de genotipos	35
4.1.5. Red filogenética	35
4.2 OBJETIVO B.....	36
4.2.1. Diseño experimental	36
4.2.2. Mantenimiento de la línea celular VERO.....	37
4.2.3. Mantenimiento de los taquizoítos	38
4.2.4. Ensayo <i>in vitro</i> en placas de 24 pocillos.....	39
4.2.5. Inmunofluorescencia sobre cultivos celulares	40
4.2.6. Análisis estadístico.....	41
4.3. OBJETIVO C	43
4.3.1. Diseño experimental	43
4.3.2. Ratones	44
4.3.3. Preparación de los taquizoítos de <i>T. gondii</i> para inoculación en ratones Swiss ...	45
4.3.4. Inoculación de ratones	45
4.3.5. Sacrificio y toma de muestras	45
4.3.6. Análisis histopatológico.....	46
4.3.7. Identificación de ADN para <i>T. gondii</i> por PCR.....	47
4.3.8. Análisis estadístico.....	48
4.4. OBJETIVO D	49
4.4.1. Diseño experimental	49
4.4.2. Cultivo de células esplénicas	49
4.4.3. Obtención de antígeno de lisado total parasitario (TLA).....	51
4.4.4. Desafío	51
4.4.5. Medición de IFN- γ	52
4.4.6. Detección de IgG por la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	53

4.4.7. Análisis estadístico.....	53
5. RESULTADOS	55
5.1. OBJETIVO A.....	55
5.1.1. Genotipificación por nPCR-RFLP de 29 aislamientos argentinos.....	55
5.1.2. Análisis filogenético.....	56
5.2. OBJETIVO B.....	64
5.1.1. Invasión	64
5.1.2. Replicación	65
5.1.3. Índice de invasión – replicación <i>in vitro</i>	71
5.3. OBJETIVO C	74
5.3.1. Morbilidad	74
5.3.2. Mortalidad	74
5.3.3. Observaciones en la necropsia	76
5.3.4. Histopatología	77
5.3.5. Detección de ADN parasitario por PCR	80
5.3.6. Correlación y regresión <i>in vitro-in vivo</i>	80
5.4. OBJETIVO D	81
5.4.1. ELISA para la detección de IFN- γ murino	81
5.4.2. Respuesta inmune humoral: detección de IgG por la prueba de IFI	85
5.4.3. Regresión invasión/replicación-producción de IFN- γ	86
6. DISCUSIÓN.....	87
7. ANEXO TÉCNICAS	111
7.1. OBJETIVO A.....	111
7.1.1. PCR anidada y corte con enzimas de restricción	111
7.2. OBJETIVO B.....	116
7.2.1. Solución buffer de fosfatos (PBS)	116

7.2.2. Cultivo de células VERO (células de riñón de mono verde africano)	117
7.2.3. Solución fisiológica (CINa al 0,85 %)	117
7.2.4. Tinción con DAPI	118
7.2.5. Líquido de montaje MOWIOL 4-88.....	118
7.3. OBJETIVO C	118
7.3.1. Técnica de coloración vital con Azul Tripán 0,4 %	118
7.3.2. Extracción de ADN: Kit comercial PROMEGA	119
7.3.3. PCR TOX5/TOX8.....	120
7.4. OBJETIVO D	121
7.4.1. Obtención de células esplénicas de ratones	121
7.4.2. Cuantificación de la concentración de proteínas	121
7.4.3. ELISA para IFN- γ	122
7.4.4. Prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI)	123
8. BIBLIOGRAFÍA.....	125

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS:

ADN: ácido desoxirribonucleico

ANOVA: *analysis of variance* (análisis de varianza)

ATB-ATM: antibióticos y antimicóticos

BSA: *bovine serum albumin* (albúmina sérica bovina)

dpi: días post infección

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (enzimoinmunoensayo)

h: hora/horas

HD: hospedador definitivo

HI: hospedador intermediario

hpi: horas post-infección

IFN- γ : interferón *gamma*

IL: interleuquina

LAINPA: Laboratorio de Inmunoparasitología, FCV-UNLP

min: minuto/minutos

MS: microsatélites

pb: pares de bases

PBS: *phosphate buffer solution* (solución buffer de fosfatos)

PCR: *polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)

nPCR: *nested PCR* (PCR anidada)

RFLP: *restriction fragment lenght polymorphism* (polimorfismos de longitud en los fragmentos de restricción)

s: segundo/segundos

SC: subcutánea

SF: solución fisiológica

SFB: suero fetal bovino

SNC: sistema nervioso central

SPF: *Specific Pathogen Free* (libre de patógenos específicos)

TLA: *Total Lysate Antigen* (antígeno de lisado total parasitario)

tq: taquizoíto

UTK: *University of Tennessee, Knoxville*

VP: vacuola parasitófora

TITULO

Estudios biológicos e inmunológicos de aislamientos de *Toxoplasma gondii* provenientes de animales de zoológico en Argentina.

PALABRAS CLAVE

Toxoplasma gondii, genotipos atípicos, invasión, replicación, respuesta inmune.

RESUMEN

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado que afecta a mamíferos y aves que posee un ciclo de vida indirecto. Su virulencia es variable de acuerdo con la susceptibilidad de la especie afectada y del genotipo involucrado en la infección. Los aislamientos de *T. gondii* se han identificado genéticamente a nivel mundial como “clonales” denominándose tipo I, II y III. Sin embargo, en Sudamérica se ha encontrado la presencia de aislamientos no clonales o “atípicos”.

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar el comportamiento biológico de dos aislamientos de *T. gondii*, identificados genéticamente como atípicos, provenientes de los animales de zoológico *Saimiri boliviensis* (mono ardilla boliviano) y *Macropus rufogriseus* (walaby de Bennet), (denominados *TgSb* y *TgMr*, respectivamente) en Argentina y evaluar la respuesta inmune de ratones infectados experimentalmente con estos.

Se realizó la genotipificación de 29 muestras de ADN de *T. gondii* de Argentina mediante nPCR-RFLP para 10 marcadores moleculares. Con los resultados obtenidos se realizó una red filogenética utilizando el *software* SplitsTree4.

Se evaluaron los aislamientos *TgSb* y *TgMr* en comparación con las cepas de referencia RH, ME49 y VEG (tipos clonales I, II y III respectivamente) en un

ensayo *in vitro*. Se realizaron seis ensayos independientes (tres de 6 h de duración y tres de 18 h de duración) con tres réplicas cada uno. A continuación, se realizó inmunofluorescencia indirecta sobre los cubreobjetos para contar la cantidad de vacuolas parasitóforas (invasión) y la cantidad de taquizoítos dentro de cada vacuola (replicación). Para evaluar la morbi-mortalidad se utilizaron ratones Swiss ($n = 30$) y se distribuyeron en 5 grupos inoculados con taquizoítos (dosis de infección 10^2 y 10^3) de *TgSb* y *TgMr*, las cepas ME49 y VEG y control negativo. Se evaluó la respuesta inmune celular por medio del cultivo de células esplénicas y desafío de los cultivos con antígeno de lisado total parasitario (TLA) producido a partir de las cepas RH, ME49, VEG y de los aislamientos *TgSb* y *TgMr*. Los sobrenadantes se analizaron con un kit de ELISA para la detección de IFN- γ murino.

Se identificaron 17 genotipos diferentes en Argentina, incluyendo 5 “nuevos” e incorporados a la base de datos ToxoDB (# 283, # 284, # 285, # 286, y # 287). La caracterización molecular completa de *TgSb* y *TgMr* confirmó su condición de atípicos siendo identificados como genotipos # 163 y # 14, respectivamente. Los resultados *in vitro* indicaron que los aislamientos *TgMr* y *TgSb* tienen un comportamiento más virulento que las cepas ME49 y VEG con semejanzas al tipo clonal virulento RH en su baja capacidad de invasión (*TgMr*) como en su alta capacidad de replicación (*TgSb*). La replicación y la velocidad de duplicación serían los factores más importantes para evaluar en estudios *in vitro* como indicadores de virulencia. Se estableció un índice *in vitro* de invasión – replicación y el resultado demostró que RH, *TgSb* y *TgMr* presentaron los menores valores, que se asociaron inversamente con la mayor virulencia. Ambos aislamientos

presentaron una morbi-mortalidad del 100 %, teniendo una virulencia mayor que las cepas de referencia II y III. Considerando los bajos índices invasión – replicación de *TgSb* y *TgMr* se postula la presencia y expresión de otros factores que se relacionen con su elevada virulencia. El estímulo con TLA de RH indujo la producción de niveles significativamente altos de IFN- γ en los sobrenadantes de los ratones infectados con los aislamientos *TgMr* y *TgSb*, indicando la presencia de una respuesta inmune adaptativa con la producción de linfocitos específicos orientados hacia un perfil Th1. La sobre producción de esta citoquina podría relacionarse con la expresión/secreción de moduladores de la respuesta inmune por parte de estos protozoos y se vincularía con la mayor virulencia detectada en el modelo *in vivo*. Ambos genotipos (# 163 y # 14) presentaron un fenotipo de alta virulencia, tanto *in vitro* como *in vivo*, aunque se agruparon en la red filogenética en cercanías del tipo clonal III.

Por lo dicho anteriormente, se propone el uso de estudios *in vitro* previo al estudio *in vivo* para minimizar la utilización de animales en estudios de caracterización de aislamientos de *T. gondii*. El establecimiento de un índice *in vitro* de invasión-replicación podría ser de utilidad para predecir virulencia de modo indirecto: bajo valor del índice se relaciona con alta virulencia (morbi-mortalidad) en modelo murino. La respuesta Th1 con sobre producción de IFN- γ sería el mecanismo preponderante en infecciones con genotipos virulentos.

TITLE

Biological and immunological studies of *Toxoplasma gondii* isolates from zoo animals in Argentina.

KEY WORDS

Toxoplasma gondii, atypical genotypes, invasion, replication, immune response

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an intracellular parasite with an indirect life cycle infecting mammals and birds. Its virulence is variable according susceptibility of host species and parasite genotypes. *Toxoplasma gondii* isolates have been genetically identified as "clonal" and named type I, II and III. However, in South America the presence of non-clonal or atypical isolates has been reported.

The aim of this study was to evaluate the biological behavior of two isolates of *T. gondii*, genetically identified as atypical, isolated from the zoo animals *Saimiri boliviensis* (bolivian squirrel monkey) and *Macropus rufogriseus* (Bennett's wallaby) (named as *TgSb* and *TgMr*, respectively) in Argentina and to evaluate the immune response of experimentally infected mice.

Genotyping of 29 DNA samples of *T. gondii* from Argentina was performed by nPCR-RFLP using 10 molecular markers. With the results, a phylogenetic network was made using the SplitsTree4 software. The isolates *TgSb* and *TgMr* were evaluated in comparison with the reference strains RH, ME49 and VEG (clonal types I, II and III, respectively) in an *in vitro* assay. Six independent trials were performed (three of 6 h and three of 18 h long) with three replicates each. Indirect immunofluorescence was performed over the coverslips to count the number of parasitophorous vacuoles (invasion) and the amount of tachyzoites within each

vacuole (replication). To evaluate the morbidity and mortality, Swiss mice ($n = 30$) were distributed in 5 groups inoculated with tachyzoites (doses of infection 10^2 and 10^3) of *TgSb* and *TgMr*, the strains ME49 and VEG and negative control. The cellular immune response was evaluated by culturing splenic cells and challenging the cultures with total lysate antigen of the parasite (TLA) from strains RH, ME49, VEG and isolates *TgSb* and *TgMr*. The supernatants were analyzed with an ELISA kit for the detection of murine IFN- γ .

We identified 17 different genotypes in Argentina, including 5 "new" and incorporated into the ToxoDB database (# 283, # 284, # 285, # 286, and # 287). The complete molecular characterization of *TgSb* and *TgMr* confirms its atypical condition as genotypes # 163 and # 14, respectively. The *in vitro* results indicate that the isolates *TgMr* and *TgSb* have a more virulent behavior than the strains ME49 and VEG, with similarities to the virulent clonal type RH in its low invasion capacity (*TgMr*) as well as in its high replication capacity (*TgSb*). Replication and duplication speed are the most important factors to evaluate in the *in vitro* studies as virulence indicators. An *in vitro* index of invasion-replication was performed, and the result showed that RH, *TgSb* and *TgMr* have the lowest values, which are inversely associated with greater virulence. Both isolates had a 100% morbidity in mice, having a higher virulence than the reference strains type II and III. Considering the low invasion-replication index identified for *TgSb* and *TgMr* we considered that presence and expression of other factors should be associated with their high virulence. The stimulation with TLA from RH induced the production of high levels of IFN- γ in the supernatants of the mice infected with the isolates *TgMr* and *TgSb*, indicating the presence of an adaptive immune response with the

production of lymphocytes with a Th1 profile. The overproduction of this cytokine could be related to the expression / secretion of modulators of the immune response by these protozoa and would be linked to the greater virulence detected in the *in vivo* model. Both genotypes (# 163 and # 14) present a high virulence phenotype, *in vitro* and *in vivo*, although they were grouped in the phylogenetic network in proximity with the clonal type III.

According to the obtained results, the use of *in vitro* studies before the *in vivo* studies is proposed to minimize the use of animals in the characterization of *T. gondii* isolates. The establishment of an *in vitro* index of invasion-replication could be useful to predict the virulence in an indirect mode: low index related with high virulence (morbidity-mortality) in murine model. The Th1 response with IFN- γ overproduction appears to be the predominant mechanism on infections with virulent genotypes.

INTRODUCCION

1.1. Descubrimiento de *Toxoplasma gondii*

En 1908, Charles Nicolle y Louis Manceaux encontraron un protozoo en los tejidos de un roedor parecido a un hámster, el gundi (*Ctenodactylus gundi*), que se estaba utilizando para investigación en leishmaniasis en el Instituto Pasteur de Túnez, África. Simultáneamente, Splendore (1908) encontró el mismo parásito en un conejo en Brasil. Inicialmente ambos clasificaron al parásito como *Leishmania* spp., sin embargo, pronto se dieron cuenta de que habían descubierto un nuevo microorganismo y Nicolle y Manceaux propusieron el nombre *Toxoplasma gondii* (*Toxoplasma* mod. L. *toxos* = arco, *plasma* = vida y *gondii* por su hospedador inexactamente identificado) (Weiss & Kim, 2014).

1.2 Ubicación taxonómica

Toxoplasma gondii es un protozoo del *phylum* Apicomplexa, orden Eucoccida, de localización intracelular que infecta a mamíferos y aves, y que se encuentra distribuido mundialmente (Dubey, 2010).

Ubicación taxonómica (Beck *et al.*, 2009):

Reino Protista

Subreino Protozoa

Phylum Apicomplexa (Levine 1970)

Clase Sporozoea (Leukart, 1879)

Orden Eucoccida (Leger, 1911)

Familia Sarcocystidae

Género *Toxoplasma* (Nicolle & Manceaux, 1909)

Especie *T. gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909)

1.3. Ciclo de vida e infección

Tiene un ciclo evolutivo indirecto facultativo; los félidos domésticos y silvestres son los hospedadores definitivos (HD) y numerosas especies de mamíferos y aves actúan como hospedadores intermediarios (HI). Presenta tres formas infectantes que aparecen en distintos momentos del ciclo biológico: los taquizoítos (tq) (multiplicación asexual rápida), los bradizoítos (contenidos en los quistes tisulares) y los esporozoítos (contenidos en los ooquistes) (Tenter *et al.*, 2000).

Cuando un felido ingiere quistes tisulares, se produce un ciclo intestinal con multiplicación asexual (estadios previos a la gametogonia) y sexual (gametogonia) del parásito, que concluye luego de 3 a 10 días con la formación de ooquistes inmaduros, los cuáles son eliminados al medio con las heces. En condiciones adecuadas de temperatura y humedad, en 1 a 3 días se forman en el interior de los ooquistes, dos esporocistos con cuatro esporozoítos cada uno (tipo 2X4). Los ooquistes esporulados o maduros (11 x 13 µm) son las formas infectantes y pueden permanecer viables hasta 18 meses. El período prepatente en el gato (tiempo entre que el animal se infecta hasta que elimina ooquistes) es de 3-10 días si la infección ocurre por la ingesta de quistes tisulares, y más de 18 días si se produce por la ingesta de ooquistes (Dubey, 2010) (**Figura 1**).

Los hospedadores intermediarios, entre ellos el hombre, se infectan a través de la ingesta de carne cruda o mal cocida de otros hospedadores intermediarios como

cabras, ovejas o cerdos que contienen alguna de las formas infectantes (quistes tisulares, taquizoítos), mediante la ingestión de agua o alimentos contaminados con ooquistes, o a través del pasaje transplacentario de taquizoítos. En los hospedadores intermediarios se produce un ciclo exclusivamente extraintestinal y del tipo asexual. Las formas infectantes penetran en distintas células nucleadas del organismo y se multiplican como taquizoítos dentro de las vacuolas parasitóforas (VPs). Este es el período de multiplicación rápida, durante el cual los taquizoítos destruyen a las células parasitadas y se diseminan dentro del hospedador, durante esta etapa pueden ocurrir manifestaciones clínicas. Pasado un período corto los parásitos se multiplican más lentamente y forman los quistes tisulares, conteniendo bradizoítos, que permanecen viables durante un tiempo indeterminado, incluso durante toda la vida del hospedador (Dubey, 2010). Los felinos pueden actuar a su vez como HI, presentando un ciclo extraintestinal.

La susceptibilidad al parásito varía para cada especie hospedadora; los bovinos, equinos, ratas y monos del Viejo Mundo son resistentes a la infección. Los animales susceptibles presentan diferentes signos clínicos como trastornos neuromusculares en caninos, aborto en pequeños rumiantes, natimortos en porcinos y toxoplasmosis fatal en marsupiales australianos y monos del Nuevo Mundo (Dubey, 2010). Los ratones de laboratorio (*Mus musculus*) son sensibles a la infección y son en general usados como el modelo de referencia para evaluar la virulencia del parásito (Saraf *et al.*, 2017). En salud humana los signos clínicos de infección incluyen lesiones retinianas (toxoplasmosis ocular), lesiones del sistema nervioso central (principalmente asociadas con toxoplasmosis congénita) y falla multisistémica en individuos inmunocomprometidos (Weiss & Kim, 2014). Sin

embargo, existe una variante que puede afectar a los adultos inmunocompetentes conocida como Toxoplasmosis Amazónica, que requiere intervención médica inmediata y puede ser fatal (Demar *et al.*, 2012). Las razones para estas diferencias de susceptibilidad entre especies no están claras, aunque podría ser consecuencia del proceso de coevolución hospedador-parásito (Dubey, 2010).

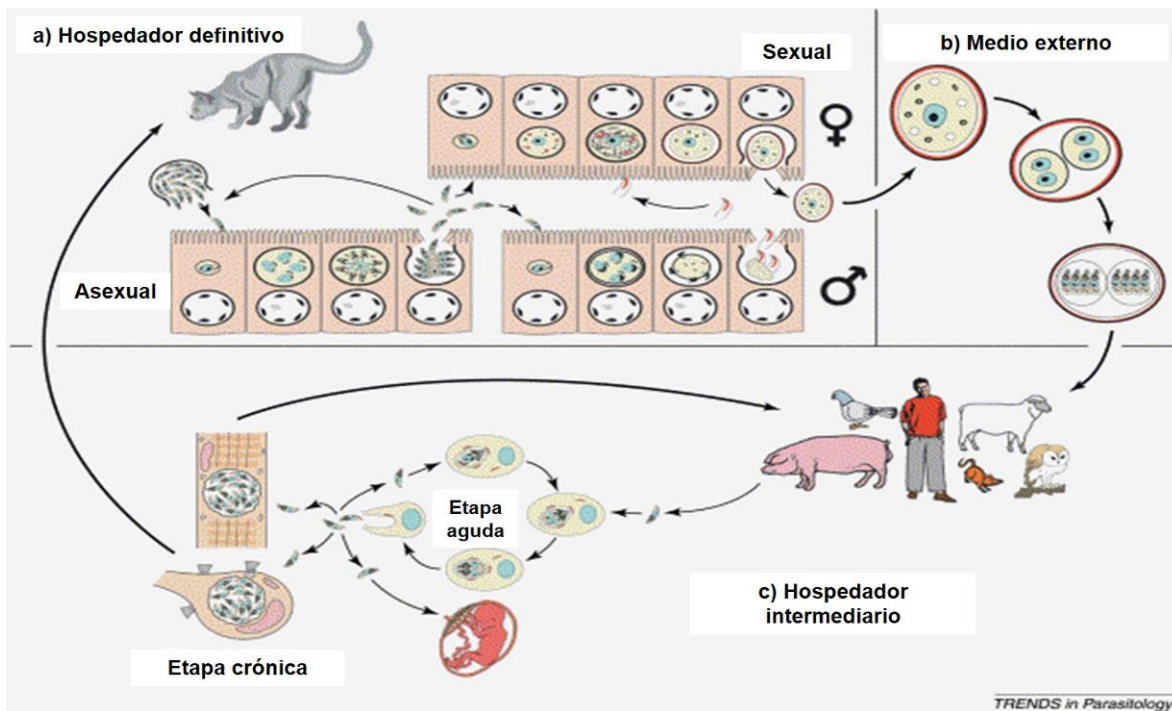


Figura 1. Ciclo de vida de *T. gondii*. Tomado y modificado de Ferguson D.P.J, 2002. *Toxoplasma gondii* and sex: essential or optional extra? Trends in Parasitology. 18 (8): 351–355.

1.4. Morfología y biología molecular

Toxoplasma gondii posee un complejo apical, por lo cual pertenece al Phylum Apicomplexa. Este complejo posee funciones esenciales tanto en la adhesión y penetración a la célula hospedadora como en la replicación del parásito (Hu *et al.*,

2006). El complejo apical presenta un conoide formado por microtúbulos enrollados en espiral que tienen movilidad durante la invasión. Otras estructuras del complejo apical asociadas al conoide son: 1) los anillos preconoidales en el extremo distal del conoide desde donde se originan sus fibras, 2) el anillo polar desde donde se originan los 22 microtúbulos subpeliculares y 3) dos pequeños microtúbulos intraconoidales que sirven para el transporte de vesículas secretorias importantes para la invasión (**Figura 2**). Además, la secreción de diversas proteínas desde esta región regula la adhesión, invasión y formación de la VP donde el parásito se alojará. Estas organelas secretorias incluyen: roptrias de forma tubular o sacular que se extienden hacia la región posterior por dentro del conoide, micronemas y gránulos densos (Hu *et al.*, 2006; Weiss & Kim, 2014). Como toda célula eucariota posee las organelas universales propias (núcleo, retículo endoplasmático, aparato de Golgi y ribosomas) y las organelas derivadas de endosimbiosis (mitocondrias y apicoplasto) (Weiss & Kim, 2014). Todas estas estructuras se encuentran englobadas en un complejo membranoso denominado “película”. La película se compone de una membrana externa, plasmalema, que encierra completamente al organismo y un complejo interno de 2 membranas formadas por vesículas aplanadas y fusionadas que derivan del aparato de Golgi y del retículo endoplasmático (**Figura 2**) (Weiss & Kim, 2014). Todos los estadios infectantes (taquizoítos, bradizoítos y esporozoítos) tienen la misma morfología básica, con diferencias menores.

Los taquizoítos (*tachos* (gr.) = rápido) con típica forma de medialuna son los estadios de multiplicación intracelular rápida (endodiogenia), miden aproximadamente 2 x 6 µm y poseen un núcleo de posición central (Dubey *et al.*,

1998). Los bradizoítos (*brady* (gr.) = lento) se desarrollan en el interior de un quiste tisular, miden aproximadamente 7 x 1,5 μm y a diferencia de los taquizoítos, la posición del núcleo es terminal, las roptrias son más electrodensas y poseen un mayor número de gránulos PAS positivos (Dubey *et al.*, 1998). Los esporozoítos están contenidos en el ooquiste, miden 2 x 8 μm y presentan una abundancia de organelas granulares y un núcleo subterminal (Dubey, 2010; Tenter *et al.*, 2000).

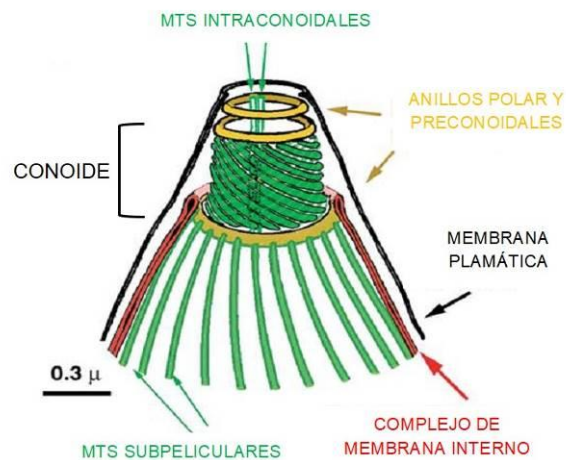


Figura 2. Complejo apical de *T. gondii*. Tomado y modificado de Hu *et al.*, 2006. Cytoskeletal components of an invasion machine--the apical complex of *Toxoplasma gondii*. PLoS Pathog 2(2): e13.

1.5. Población de *T. gondii*

Numerosos trabajos han revelado la diversidad genética de *T. gondii*, con una población clonal en los continentes del hemisferio norte, pero con una población

altamente diversa en América Central y del Sur (Dubey & Su, 2009; Shwab *et al.*, 2014; Weiss & Kim, 2014).

Howe y Sibley realizaron los primeros estudios sobre caracterización molecular de *T. gondii* basados en amplificación de fragmentos de ADN y cortes con enzimas de restricción, de diversos animales (incluyendo humanos) provenientes de Europa y América del Norte, y clasificaron a *T. gondii* en tres linajes (también llamados genotipos) denominados I, II y III, y vincularon estos linajes a las diferencias en virulencia observadas en ratones exocriados (Howe & Sibley, 1995). El tipo clonal I es letal para los ratones, independientemente de la dosis, mientras que los tipos clonales II y III son no virulentos estableciendo enfermedad crónica. La presencia de éstos tres linajes avaló la hipótesis sobre una población “clonal” de *T. gondii*, indicando que cada genotipo se replica como una unidad que persiste en el tiempo y el espacio (Tibayrenc *et al.*, 1991).

Existen diferentes técnicas para identificar y clasificar la estructura poblacional del parásito (Shwab *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2012; Weiss & Kim, 2014). La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa anidada – polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (nPCR-RFLP, por sus siglas en inglés) es uno de los métodos más usados para la genotipificación de *T. gondii* (Dubey *et al.*, 2005a; Howe *et al.*, 1997; Pardini *et al.*, 2014; Pena *et al.*, 2008). Mediante la mencionada técnica se estandarizaron protocolos para la identificación de diez marcadores moleculares con alto poder de discriminación, con la ventaja de verificar múltiples locus simultáneamente, estos son: SAG1, SAG2 (5'-3'SAG2, alt. SAG2), SAG3, BTUB, GRA6, C22-8, C29-2, L358, PK1, (ubicados en ocho cromosomas nucleares) y Apico (ubicado en el apicoplasto) (Sibley & Boothroyd, 1992; Su *et*

al., 2006). Diferentes genotipos identificados por este método se encuentran en la base de datos *online* ToxoDB (www.toxodb.org). Otra técnica también ampliamente utilizada es la del estudio de microsatélites (MS), que consta de 15 marcadores con alto poder de resolución que permiten identificar diferencias dentro de un mismo genotipo (Ajzenberg *et al.*, 2005). Los genotipos obtenidos por nPCR-RFLP y a partir de MS conforman 16 haplogrupos que se agruparían a su vez en 6 clados ancestrales (Shwab *et al.*, 2014; Weiss & Kim, 2014).

En América del Norte (Estados Unidos y Canadá), los genotipos predominantes son el tipo II (ToxoDB # 1 y # 3), el tipo III (ToxoDB # 2) y el haplogrupo 12 (ToxoDB # 4 y # 5), que se considera como un tipo clonal más en América del Norte. En Europa, predomina el tipo II seguido de aislamientos de tipo III (Dubey & Su, 2009; Howe & Sibley, 1995; Su *et al.*, 2012). En Asia, *Chinese 1* (identificado por MS, también conocido como ToxoDB # 9) es dominante en la región central y oriental del continente (Chaichan *et al.*, 2017). En África, el tipo II predomina en el norte y este del continente junto con el genotipo ToxoDB # 20, mientras que en la región central y oeste el genotipo *África 1* (identificado por MS, también conocido como ToxoDB # 6) es el dominante (Galal *et al.*, 2018).

Sin embargo, en América del Sur, sobre todo en Brasil y Argentina, se encontraron genotipos que no pertenecen a los tres linajes principales, con una diversidad genética mucho mayor a la descrita inicialmente para *T. gondii* (Shwab *et al.*, 2014; Weiss & Kim, 2014). Estos aislamientos poseen alelos tipo I, II y III (siendo principalmente combinaciones del tipo I / III) idénticos a aquellos hallados en los linajes clonales e incluso presentan nuevos alelos. Estos “nuevos” genotipos recientemente descubiertos, fueron designados, dependiendo los autores y las

hipótesis sobre su génesis, como atípicos, exóticos, recombinantes o genotipos no clonales (Darde, 2008). En Brasil, la diversidad de aislamientos no clonales hallados es muy elevada, mostrando una enorme diversidad de genotipos (Dubey *et al.*, 2008; Pena *et al.*, 2008). Se han descrito 4 genotipos, aislados de diversas especies hospedadoras, considerados linajes predominantes brasileños denominados: BrI, BrII, BrIII y BrIV (genotipos ToxoDB # 6, # 11, # 8 y # 17, respectivamente) con diferente virulencia en modelo de ratón (Pena *et al.*, 2008). De hecho, algunos de estos aislamientos son extremadamente virulentos y mortales para el ratón (BrI), similares a la cepa de referencia RH (clonal tipo I). En la Guayana Francesa se han reportado aislamientos de casos humanos de toxoplasmosis severa y con alta virulencia en ratón asociados a genotipos atípicos analizados por MS (Demar *et al.*, 2012).

En Argentina el grupo de trabajo del Laboratorio de Inmunoparasitología (LAINPA) de la FCV - UNLP realizó los primeros aportes en el país, en el aislamiento y tipificación de *T. gondii* proveniente de animales domésticos y de zoológico (Bacigalupe *et al.*, 2008; Basso *et al.*, 2009; Basso *et al.*, 2007; Dubey *et al.*, 2005b; Omata *et al.*, 1994; Pardini *et al.*, 2011a; Unzaga *et al.*, 1996). En el año 2014, en colaboración con el laboratorio de toxoplasmosis del Hospital Alemán de Buenos Aires, se realizó el primer aislamiento y caracterización molecular de *T. gondii* a partir de una placenta humana en Argentina (Pardini *et al.*, 2014). En particular, se obtuvieron varios aislamientos de casos fatales de toxoplasmosis en monos saimirí, canguros y suricatas de zoológico. La caracterización mediante nPCR-RFLP de aislamientos procedentes de monos Saimirí (*Saimiri boliviensis*), resultaron de genotipo atípico III / II y I y presentaron alta virulencia en ratones

(Pardini *et al.*, 2015). También se aisló *T. gondii* a partir de canguros wallabies (*Macropus rufogriseus*), identificándose un genotipo atípico (Basso *et al.*, 2007). Ambos aislamientos atípicos presentaron la mayoría de los alelos tipo III. En los canguros gigante, *Macropus giganteus*, y rojo, *Macropus rufus*, se identificaron genotipos clásicos tipo II y III, respectivamente (Moré *et al.*, 2010), ambos animales murieron a causa de la infección con estos genotipos de *T. gondii* que, según la clasificación general (Howe *et al.*, 1996), tendrían baja virulencia en modelo murino. Algo similar ocurrió en los casos fatales en suricatas (Basso *et al.*, 2009).

Ciertos genotipos pueden estar asociados a características biológicas o fenotipos; estos fenotipos pueden estar expresados en términos de virulencia, patogenicidad o desarrollo *in vitro* (Sibley *et al.*, 2002). Los fenotipos más virulentos tendrían una multiplicación *in vitro* más elevada que los poco virulentos (Sibley *et al.*, 2002). El tipo clonal I clásico tiene una DL100 de un único parásito, los tipos clonales II y III tienen dosis letales $\geq 10^3$ parásitos para el ratón (Dubey, 2010; Sibley *et al.*, 2002). Esta correlación entre linaje o tipo clonal y fenotipo sugiere que el fenotipo de un parásito podría determinar la severidad y progresión de la enfermedad.

Las cepas identificadas como atípicas, debido a sus diferencias génicas con los tipos clonales I, II y III, no permiten predecir las relaciones entre genotipo y fenotipo. Estos genotipos “atípicos” se han hallado con mayor frecuencia en aislamientos de animales en Sudamérica y en particular en animales silvestres (Darde, 2008).

La abundancia de genotipos que no clasifican dentro de los tres linajes clonales demuestra que la población de *T. gondii* es mucho más compleja de lo que se

pensaba en un principio. Las cepas identificadas como atípicas en Sudamérica, debido a sus diferencias génicas con los tipos clonales I, II y III, no permiten predecir las relaciones entre genotipo y fenotipo. Por lo tanto, es de vital importancia comprender los modos de invasión, replicación y la virulencia de estos aislamientos atípicos para continuar entendiendo la epidemiología de las infecciones por *T. gondii* en Sudamérica.

1.6. Redes filogenéticas para análisis poblacional de *T. gondii*

El análisis de filogenia a partir de redes de *Neighbor Joining* (Saitou & Nei, 1987) ha sido extensamente utilizado con *T. gondii*. *Neighbor Joining* es un método de agrupación en donde el algoritmo requiere del conocimiento de las distancias que existen entre cada par de taxones, ya sea a partir de secuencias de ADN, secuencias proteicas o, como en este caso, genotipos determinados por nPCR-RFLP y/o MS. De este modo se determina la pareja de secuencias más cercanas y se unen mediante nodos, la distancia de las ramas representa la distancia evolutiva (Huson & Bryant, 2006; Morrison, 2005). Se pueden generar redes filogenéticas (*networks*) no enraizadas que permiten agrupar taxones por su cercanía (Shwab *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2012). La asociación de aislamientos en la red filogenética debido a la similitud de sus genotipos también podría extenderse para otros rasgos fenotípicos. Se ha postulado que diferentes genotipos, que se encuentran cercanos en las redes filogenéticas, podrían presentar rasgos de virulencia similares (Morrison, 2005; Pena *et al.*, 2008).

1.7. Antecedentes de invasión y replicación in vitro de *T. gondii*

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado, eso significa que su capacidad para sobrevivir fuera de una célula es muy limitada. En consecuencia, la invasión de nuevas células hospedadoras es crucial para su supervivencia (Weiss & Kim, 2014). A medida que el taquizoíto penetra la célula hospedadora (mediante la liberación de enzimas proteolíticas producidas por sus propias) produce una invaginación de la membrana del hospedador que lo envuelve y se convierte en la VP que lo alojará. En el sitio de penetración, las membranas del parásito y del hospedador se yuxtaponen formando un complejo de unión en movimiento (*moving junction*) que sirve como tamiz para que sólo ciertas proteínas del hospedador puedan depositarse sobre la membrana de la VP. De este modo, la membrana de la VP queda formada por elementos tanto de la célula hospedadora como del protozoo y permite que la VP no se fusione a organelas lisosomales ni se acidifique y sea destruida (Dubey *et al.*, 1998; Weiss & Kim, 2014). Alrededor de la VP se depositan mitocondrias, retículo endoplasmático y elementos del citoesqueleto de la célula hospedadora que serán usados por el protozoo para su supervivencia (Dubey *et al.*, 1998; Weiss & Kim, 2014).

Finalizada la formación de la VP, los taquizoítos comienzan a multiplicarse asexualmente por endodiogenia, una forma especializada de división única de *T. gondii* en la cual dos células hijas se forman en el interior de la célula madre, consumiéndola. Este proceso implica la división de todas las organelas eucariotas, siendo el complejo apical retenido hasta el final y el último en dividirse, el complejo de membrana interno de la célula madre desaparece convirtiéndose en el

plasmalema de las células hijas (**Figura 3**). Cuando las divisiones son sincrónicas se puede ver la formación de una “roseta” (4 a 16 taquizoítos unidos por el extremo posterior) (**Figura 4**). Las divisiones continúan, resultando en una expansión geométrica de los parásitos hasta que se lisa la célula hospedadora (Dubey *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2004). Los índices de invasión y replicación varían dependiendo de la cepa o aislamiento de *T. gondii* y de la célula hospedadora (Dubey *et al.*, 1998). Luego de que el taquizoíto se establece en la VP y hasta que se divide por primera vez existe una fase o período de retraso (*lag phase*) que también depende del aislamiento (Dubey *et al.*, 1998).

La patogénesis observada en *T. gondii* se debe en mayor medida al daño celular/tisular generado por repetidos ciclos de invasión a las células hospedadoras, replicación del parásito, lisis de las mismas y re-invasión (Hu *et al.*, 2006). Comprender la invasión y la replicación de este parásito es esencial para comprender su virulencia (Hu *et al.*, 2006).

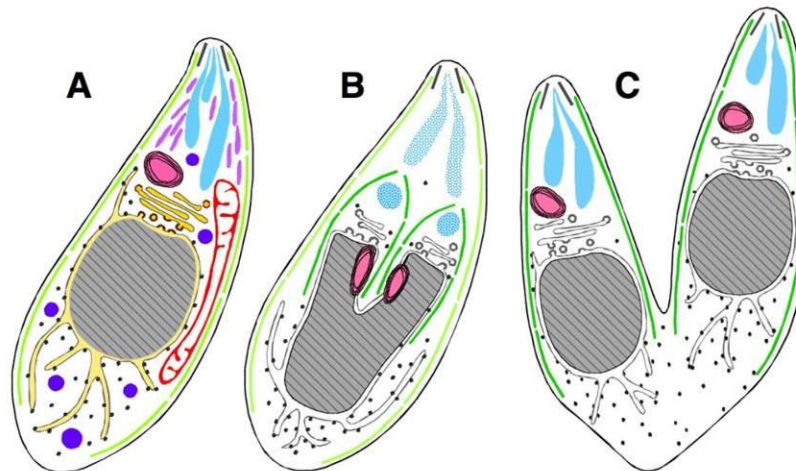


Figura 3. Taquizoítos de *T. gondii* dividiéndose por endodiogénesis. Modificado de Nishi *et al.*, 2008. Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. Journal

of Cell Science 121: 1559-1568. **A.** Taquizoíto en reposo. **B.** Taquizoíto en proceso de formación de las células hijas. **C.** Células hijas que crecen hasta establecerse como dos organismos independientes.



Figura 4. Taquizoítos de *T. gondii* en división con la formación de “rosetas”. Imagen del Dr. Boris Striepen, Georgia University.

Los primeros experimentos *in vitro* mostraron que los taquizoítos de la cepa RH (tipo clonal I) se multiplican intracelularmente (tiempo de duplicación: td) cada 6 a 9 horas (h) en células HFF (*human foreskin fibroblasts*) y VERO (células epiteliales de riñón de mono verde africano) (Radke *et al.*, 2001; Roos *et al.*, 1994; Saadatnia *et al.*, 2010). De acuerdo con Saadatnia *et al.*, 2010, RH tiene la tasa de multiplicación más alta comparado con otros aislamientos de *T. gondii*. Cañedo-Solares *et al.*, en el 2013 analizan la invasión de las cepas RH y ME49 (tipo clonal II) en células HUVEC (células endoteliales de cordón umbilical) y HMEC-1 (células endoteliales microvasculares) donde los resultados mostraron que la cepa no virulenta ME49 (tipo clonal II) tiene mayor tasa de invasión que la cepa virulenta RH. Algunos autores sugieren que la virulencia de las cepas depende más de la capacidad de replicación que de la capacidad de invasión (Cañedo-Solares *et al.*,

2013; Dubremetz & Lebrun, 2012; Lachenmaier *et al.*, 2011). Estudios realizados en células de astrocitos con la cepa RH mostraron la formación de 1 a 8 VP por célula, con 1 a 30 taquizoítos por vacuola y calcularon un tiempo de duplicación de 5 horas aproximadamente (Contreras-Ochoa *et al.*, 2012). Cuellar *et al.*, en el 2012 determinan el porcentaje de invasión y producción de taquizoítos de RH y del aislamiento CIBM1 (genéticamente no caracterizado; aislado de un caso de toxoplasmosis congénita) en las líneas celulares THP1 (monocitos humanos) y VERO. En ambos tipos celulares, el aislamiento CIBM1 tuvo mayor porcentaje de invasión que la cepa RH. Del mismo modo, el aislamiento CIBM1 se replicó más, generando mayor cantidad de parásitos totales en ambos tipos celulares (Cuellar *et al.*, 2012). Estudios comparativos en células VERO entre las cepas de referencia ME49 y NED (tipo clonal III) mostraron que ME49 tiene una replicación significativamente más alta que NED, sobre todo desde las 12 horas post infección (hpi) en adelante (Malkwitz *et al.*, 2018). Estos autores consideraron a la velocidad de replicación como un rasgo importante de la virulencia (Malkwitz *et al.*, 2018). Estudios similares se han llevado a cabo con el endoparásito protozoario *Neospora caninum*, también de la familia Sarcocystidae, y estrechamente relacionado con *T. gondii* (Dellarupe *et al.*, 2014b; Naguleswaran *et al.*, 2003; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2011). Se ha demostrado que la capacidad de invasión y la capacidad de proliferación *in vitro* pueden ser utilizados como rasgos de virulencia en *N. caninum* y correlacionados con la virulencia en modelo murino (Dellarupe *et al.*, 2014a, b). También se han comparado la invasión de ambos parásitos a través de PCR cuantitativa mostrando que los procesos de invasión son distintos (Naguleswaran *et al.*, 2003).

Los experimentos de invasión y replicación son muy heterogéneos. La mayoría de ellos utilizan la cepa RH y son muy pocos los ensayos que utilizan aislamientos no clonales. Por otro lado, la célula hospedadora, las dosis de infección, los tiempos de ensayo y los métodos para evaluar la invasión y replicación difieren en cada publicación, por lo que ha sido sugerida la necesidad de adoptar un protocolo estándar para poder comparar resultados (Contreras-Ochoa *et al.*, 2012).

1.8. Respuesta inmune del hospedador

El equilibrio entre la respuesta inmune del hospedador y los mecanismos de evasión de *T. gondii* le ha permitido a este protozoo desarrollar una infección crónica, que desde el punto de vista evolutivo benefició la supervivencia de este parásito en una gran diversidad de hospedadores distribuidos mundialmente. *Toxoplasma gondii* puede sobrevivir dentro de las células dendríticas (CD) y macrófagos e incluso utilizar las propiedades migratorias de estas células para distribuirse dentro del hospedador (Blader & Saeij, 2009; Gazzinelli & Denkers, 2006; Lang *et al.*, 2007; Melo *et al.*, 2011; Mennechet *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2009; Pollard *et al.*, 2008; Saeij *et al.*, 2006; Tait & Hunter, 2009). Las CD son las más eficientes productoras de IL-12 en la infección por este protozoo, esta citoquina es de vital importancia para la activación de las células NK las cuales producen Interferón *Gamma* (IFN- γ), así como para diferenciar las células TCD4⁺ en un perfil Th1 y activar a las células TCD8⁺ o citotóxicas, también productoras de IFN- γ (Miller *et al.*, 2009). La producción de IFN- γ activa el potencial microbicida de los macrófagos produciendo Factor de Necrosis Tumoral Alfa (FNT- α), que sinérgicamente con el IFN- γ inducen la producción de óxido nítrico (ON); también

es importante la producción de intermediarios reactivos del oxígeno (IROs), entre otros. El ON puede eliminar directamente los taquizoítos de *T. gondii* y el IFN- γ reduce la disponibilidad de hierro y triptófano, factores limitantes para el crecimiento de este protozoo (Fainboim & Geffner, 2011; Miller *et al.*, 2009).

Una vez instaurado el perfil Th1 de citoquinas inflamatorias, se inicia la activación de linfocitos TCD4⁺ con perfil de citoquinas Th folicular (IL-4, IL-10), que estimula la respuesta inmune humoral y además contribuye a la regulación negativa de los macrófagos, con lo cual se garantiza una respuesta inmune efectiva y autolimitada. La IL-4 ejerce numerosos efectos en distintos tipos celulares a saber: promueve la diferenciación de linfocitos T vírgenes hacia células de tipo Th2, inhibiendo la generación de células Th1; posee efectos inmunosupresores, ya que inhibe la producción de determinados mediadores inflamatorios por los macrófagos; por otra parte, promueve el desarrollo de las respuestas inmunes humorales a través de la inducción del crecimiento y diferenciación de linfocitos B. La producción de anticuerpos IgM, IgG e IgA específicos contra *T. gondii* ocurre como parte de la respuesta inmune al parásito y promueven la opsonización, la fagocitosis y la activación del complemento, sin embargo, no constituyen el mecanismo efector más eficiente contra la replicación del mismo en el medio intracelular (Fainboim & Geffner, 2011; Miller *et al.*, 2009).

1.9. Evaluación de los niveles de producción de citoquinas

En muchas infecciones producidas por protozoos intracelulares, es de particular interés la evaluación de la producción de citoquinas para comprender el balance

hospedador-parásito, como así también establecer mecanismos de evasión de la respuesta inmune y virulencia.

Con el fin de cuantificar los niveles de las diferentes citoquinas pueden emplearse enzimoimmunoensayos (ELISAs) de captura. Consisten en utilizar un anticuerpo monoclonal llamado anticuerpo de captura que tapiza las placas para ELISA. Luego se añade la solución con la proteína a detectar que se unirá al anticuerpo de captura. La presencia de la proteína se detecta por la adición secuencial de un segundo anticuerpo, el anticuerpo de detección, y una anti-inmunoglobulina marcada con una enzima. La adición del sustrato de la enzima genera un cambio de color proporcional a la cantidad de proteína unida. Existen ELISAs comerciales para la medición de citoquinas de ratones, y los mismos han sido utilizados en infecciones experimentales de ratones con protozoarios como *T. gondii* y *N. caninum* (Chen *et al.*, 2016; Dellarupe *et al.*, 2014a; Mordue *et al.*, 2001; Nischik *et al.*, 2001; Rodgers *et al.*, 2005; Sibley *et al.*, 2002; Tao *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016).

En modelo murino, la caracterización del perfil linfocitario se hace a partir de ensayos de linfoproliferación, en éstos se realiza el cultivo de células de bazo de ratones infectados y se procede a desafiarlos con antígeno de lisado total (TLA) de *T. gondii*. Habitualmente se utiliza la cepa RH para la producción del TLA (Chen *et al.*, 2016; Tao *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016), pero algunos autores han propuesto desafiar los cultivos contra los mismos TLA con los que han sido inoculados los ratones (Rodgers *et al.*, 2005). A continuación, se deben incubar los cultivos, los tiempos varían respecto a la IL que se desee buscar (Chen *et al.*, 2016; Tao *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016). La medición de las IL se realiza a partir

de los sobrenadantes de los cultivos, generalmente por la técnica de ELISA descrita en el párrafo anterior. También se pueden medir IL *in vivo* a partir del suero obtenido de los ratones infectados (Wang *et al.*, 2016), aunque no es el método utilizado con frecuencia. En general, estas mediciones se realizan frente al desafío de vacunas experimentales en murinos. La evaluación de la respuesta inmune celular y humoral se caracteriza mayormente por la medición de IFN- γ e IL-4, respectivamente. Ambas respuestas se ven estimuladas dando inmunidad parcial frente a *T. gondii*, sin embargo, en casos letales se ha registrado una sobre producción de la citoquina IFN- γ (Mordue *et al.*, 2001; Sibley *et al.*, 2002).

1.10. Antecedentes de ensayos en modelo murino

El ratón (*Mus musculus*) ha sido utilizado como el modelo principal para evaluar virulencia de *T. gondii* (Saraf *et al.*, 2017). La virulencia en ratones depende de varios factores: el estadio del parásito, la ruta de inoculación, la dosis, el genotipo de *T. gondii*, el número de pasajes del parásito en cultivo celular o ratón y las cepas de ratones utilizados (Dubey *et al.*, 2004). La variabilidad entre estos factores dificulta la comparación de resultados (Saraf *et al.*, 2017). La virulencia de diversos aislamientos de *T. gondii* en ratón parecería estar correlacionada con los signos clínicos de la toxoplasmosis en humanos (Xiao & Yolken, 2015).

La virulencia de los distintos genotipos de *T. gondii* ha sido definida como la tasa de mortalidad en ratones (Sibley & Boothroyd, 1992). Como se mencionó previamente, el tipo clonal I es altamente virulento en modelo murino, e independientemente de la genética del ratón, tiene una $DL_{100} = 1$ parásito (Sibley & Boothroyd, 1992). Por el contrario, el tipo clonal II se considera de virulencia

intermedia con una $DL_{50} \geq 10^3$ parásitos, y el tipo clonal III se considera no virulento con una $DL_{50} \geq 10^5$ parásitos, en ambos el resultado de la infección depende del genotipo del huésped (Dubremetz & Lebrun, 2012; Mordue *et al.*, 2001; Sibley & Boothroyd, 1992; Taniguchi *et al.*, 2018).

Mordue *et al.*, en el 2001, hicieron ensayos con la cepa RH y PTG (tipo clonal II) en ratones exocriados (CD1). El desafío con 10^2 taquizoítos de la cepa RH resultó en una mortalidad del 100 % a los 8-9 días post infección (dpi). Por el contrario, el 80 % de los ratones que recibieron la misma dosis de la cepa PTG sobrevivió más de 20 días. Al desafiar con 10^5 taquizoítos de PTG la mortalidad fue del 80 %. La virulencia observada se relacionaría a una sobreproducción de las citoquinas dependientes del perfil Th1 (IFN- γ , FNT- α e IL-12), que a su vez se requieren para la protección contra el parásito (Mordue *et al.*, 2001). En Brasil, se han hecho múltiples ensayos en ratones con aislamientos provenientes de diferentes hospedadores y caracterizados genéticamente como atípicos resultando en diversos grados de virulencia para el ratón (Dubey *et al.*, 2006; Dubey *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2018; Pena *et al.*, 2008; Shwab *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014). Aislamientos de *T. gondii* a partir de pollos asintomáticos de Brasil fueron patógenos para los ratones, independientemente del genotipo (Dubey *et al.*, 2006). El análisis de las tasas de mortalidad en ratones exocriados inoculados subcutáneo con las distintas formas infectantes del parásito (quiste tisular, ooquiste, taquizoítos), con los genotipos de referencia de Brasil indicó que la mayoría de los aislamientos del tipo BrI (# 6) tuvieron una mortalidad del 100 % siendo altamente virulentos, el tipo BrIII (# 8) no fue letal en ratones, por lo tanto se considera no virulento, mientras que los tipos BrII (# 11) y BrIV (# 17) tienen

virulencia intermedia con una mortalidad que varía entre 0 % y 100 %. Estos aislamientos se realizaron a partir de humanos, gallinas, caninos y felinos (Pena *et al.*, 2008).

Saraf *et al.*, (2017), proponen el uso de un protocolo estándar para determinar la virulencia de *T. gondii* en ratón que consiste en utilizar taquizoítos recolectados de la cavidad peritoneal de ratones inmunosuprimidos (3 a 7 días de infección) o de cultivo celular (2 días de infección). Utilizar ratones exocriados (CD1, CF1 o Swiss-Webster) e infectarlos IP o SC con distintas dosis parasitarias (2×10^1 a 2×10^4). Controlar los ratones diariamente por un período de 4 semanas y sacrificar en caso de tener signos compatibles. Para aquellos ratones que sobreviven las 4 semanas determinar el título de anticuerpos con un valor de corte positivo considerando la dilución 1/25. Se puede determinar la mortalidad acumulada si se han realizado al menos 3 dosis infectantes diferentes (Saraf *et al.*, 2017).

La morbilidad analizada en ratones infectados con *T. gondii* también puede indicar grados de virulencia variables. Las lesiones histopatológicas y la presencia de quistes en diversos órganos, así como la presencia de ADN parasitario dan cuenta de la patogenia de la infección por *T. gondii* (Costa *et al.*, 2018; Fuentes-Castro *et al.*, 2017). Cuando se observa por histopatología el SNC afectado por la infección con *T. gondii*, se han descrito lesiones compatibles con meningitis no supurativa y presencia de manguitos perivasculares. En la fase aguda las células inflamatorias incluyen monocitos y leucocitos. En ratones con infección crónica se encontraron quistes tisulares, detectables a partir de 10 dpi, y la presencia de abundantes células inflamatorias en la luz de vasos sanguíneos (Dubey *et al.*, 1998; Weiss & Kim, 2014). En estudios experimentales realizados en ratones

Swiss infectados con la cepa ME49 se observaron infiltrados mononucleares perivasculares focales y multifocales y la aparición de quistes 15 dpi (Pereira *et al.*, 2017). La misma cepa en ratones NIH generó infiltración mononuclear perivascular, nódulos gliales y numerosos quistes (Fuentes-Castro *et al.*, 2017). Las lesiones se hacen visibles a partir de los 7 a 9 dpi y se intensifican entre los 21 y 30 dpi (Pereira *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2010). En cuanto a las lesiones generadas por genotipos atípicos se observó leve meningoencefalitis en ratones BALB/c con infección crónica con la cepa de referencia no virulenta BrIII (Costa *et al.*, 2018). Las infecciones con los aislamientos TgCTBr5 (ToxoDB # 8, no virulento) y TgCTBr9 (ToxoDB # 11, virulento) en ratones BALB/c y C57BL/6 no generaron lesiones cuando se evaluaron a los 7 y 12 dpi (Pinheiro *et al.*, 2015). La ausencia de lesiones en SNC en la fase aguda de la infección por *T. gondii* ha sido registrada por varios investigadores (Djurkovic-Djakovic *et al.*, 2006; Mordue *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2015). Debido a que el SNC es un órgano inmunológicamente privilegiado se cree que es el último órgano al que acceden los taquizoítos durante la infección. La barrera hematoencefálica disminuye el flujo de células infectadas, anticuerpos y mediadores inmunes, que tendrán más importancia en la fase crónica de infección (Pinheiro *et al.*, 2015).

Varios autores describen al hígado y los pulmones como los órganos más afectados durante la infección aguda con cepas clonales (Costa *et al.*, 2018; Djurkovic-Djakovic *et al.*, 2006). Incluso, se ha propuesto buscar ADN parasitario en pulmones, considerados como órganos marcadores de la diseminación sistémica (Costa *et al.*, 2018).

Las relaciones entre los genotipos no clonales de *T. gondii* y la virulencia expresada en términos de mortalidad y morbilidad en modelo murino e invasión y replicación en modelo celular no son claras hasta el momento (Costa *et al.*, 2018; Dubremetz & Lebrun, 2012; Hu *et al.*, 2006; Pena *et al.*, 2008; Pinheiro *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2014).

Este plan propone evaluar las características genotípicas y biológicas de dos aislamientos “atípicos” de *T. gondii* obtenidos a partir de casos fatales de toxoplasmosis en animales de zoológico en modelos *in vitro* e *in vivo*. Se espera con estos resultados poder establecer si existe una relación evidente entre genotipo y fenotipo que ayude a predecir más fácilmente las características de las cepas de *T. gondii* circulantes en Argentina. Como parte de este plan, se propone brindar información y protocolos que puedan estandarizarse en otros laboratorios para la comparación del comportamiento biológico de diferentes aislados de *T. gondii*.

Los aislamientos de *T. gondii* seleccionados para desarrollar los objetivos de esta tesis han sido aislados de los animales de zoológico *S. boliviensis* (mono ardilla boliviano) y *M. rufogriseus* (walaby de Bennet) y se denominarán *TgSb* y *TgMr*, respectivamente, a lo largo de este manuscrito.

2. OBJETIVOS

Objetivos generales

-Evaluar el comportamiento biológico de los aislamientos de *Toxoplasma gondii*, identificados genéticamente como atípicos, provenientes de animales de zoológico en Argentina.

-Evaluar la respuesta inmune de ratones infectados experimentalmente con estos mismos aislamientos.

Objetivos específicos

A- Caracterizar genética y filogenéticamente los aislamientos de *T. gondii* de animales y humanos de Argentina.

B- Evaluar la capacidad de **invasión** y **replicación** de los aislamientos locales de *T. gondii* provenientes de *S. boliviensis* y *M. rufogriseus* en un modelo ***in vitro***.

C- Evaluar la **morbilidad** y **mortalidad** de los aislamientos locales de *T. gondii* provenientes de *S. boliviensis* y *M. rufogriseus* en un **modelo murino**.

D- Evaluar los niveles de producción de las **citoquinas IL4, IL12 e INF- γ** de los ratones utilizados en el objetivo C.

3. HIPÓTESIS RELEVANTES

- Los aislamientos de *T. gondii* identificados genéticamente como atípicos, a partir de casos fatales de toxoplasmosis de *S. boliviensis* y *M. rufogriseus* en Argentina, se encuentran relacionados filogenéticamente con el tipo clonal de referencia III.
- Los aislamientos de *T. gondii*, identificados genéticamente como atípicos, a partir de casos fatales de toxoplasmosis de *S. boliviensis* y *M. rufogriseus* en Argentina, presentan tasas de invasión y replicación *in vitro* mayores que los tipos clonales de referencia II y III.
- Los aislamientos de *T. gondii*, identificados genéticamente como atípicos, a partir de casos fatales de toxoplasmosis de *S. boliviensis* y *M. rufogriseus* en Argentina, presentan tasas de morbilidad y mortalidad en modelo murino mayores que los tipos clonales de referencia II y III.
- Los aislamientos de *T. gondii*, identificados genéticamente como atípicos, a partir de casos fatales de toxoplasmosis de *S. boliviensis* y *M. rufogriseus* inducen un nivel de producción superior de IL4 e inferiores de IL12 e INF- γ al generado por la infección en ratones con los tipos clonales de referencia II y III.
- Existe correspondencia entre las tasas de invasión y replicación *in vitro* y las tasas de morbilidad y mortalidad *in vivo* de los aislamientos de *T. gondii*, identificados genéticamente como atípicos, a partir de casos fatales de toxoplasmosis de *S. boliviensis* y *M. rufogriseus*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. OBJETIVO A

Genotipificación por nPCR-RFLP y análisis de filogenia

Como parte de la caracterización de los aislamientos atípicos de *T. gondii* estudiados en esta tesis se realizó un proyecto financiado a través de una beca *Fulbright*-Ministerio de Educación y Deportes convocatoria 2017-2018. El ensayo descrito a continuación se llevó a cabo parcialmente en el Laboratorio de Parasitología Molecular y Patogénesis del Departamento de Microbiología de la Universidad de Tennessee, Knoxville, USA (LAB UTK). a cargo del Dr. Chunlei Su.

4.1.1. Diseño experimental

Se realizó la genotipificación de 29 muestras de ADN de *T. gondii* a través de nPCR-RFLP para los siguientes marcadores genéticos: SAG1, SAG2 (5'-3'SAG2, alt. SAG2), SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 y Apico, como fue descrito previamente por Su *et al.*, 2006. Los fragmentos de ADN específico fueron primero amplificados por PCR múltiple utilizando *primers* externos para todos los marcadores, seguido por una PCR anidada para cada marcador individual, los cuales fueron cortados con enzimas de restricción y analizados por electroforesis como fue descrito por Su *et al.*, 2006. Los productos fueron revelados en geles de agarosa (Su *et al.*, 2006).

Se realizó una red filogenética de *Neighbour Joining* utilizando el *software* SplitsTree4 para evaluar la cercanía de los aislamientos argentinos a otros genotipos de *T. gondii* y cepas de referencia.

4.1.2. Muestras de ADN de *T. gondii* de Argentina

Se seleccionaron 29 muestras de ADN de *T. gondii* obtenidas por el LAINPA, FCV, UNLP. Todas las muestras de ADN estaban genotipificadas para 9 marcadores moleculares por nPCR-RFLP (alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 y Apico). Se asignó un nombre a cada muestra; se denominaron con "Tg" aquellas que corresponden a aislamientos y con el nombre del HI a aquellas que corresponden a muestras de ADN. Las muestras se fraccionaron en alícuotas de 40 µl y se enviaron por correo postal al LAB UTK, con los correspondientes permisos de exportación de Argentina emitido por SENASA e importación a USA emitido por USDA.

Los aislamientos de ADN provienen de animales domésticos (gallinas $n = 10$, gatos $n = 3$, cerdos $n = 2$, cabra $n = 1$, conejo $n = 1$), humanos ($n = 6$), animales de zoológico ($n = 5$) y una rata ($n = 1$). Corresponden a las provincias de Buenos Aires ($n = 21$), San Luis ($n = 1$) y Misiones ($n = 7$).

4.1.3. Genotipificación

La genotipificación del ADN de *T. gondii* de las 29 muestras provenientes de Argentina se realizó a través de nPCR-RFLP para 10 marcadores genéticos: SAG1, SAG2 (5'-3'SAG2, alt. SAG2), SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 y Apico, como fue descripto previamente por Su *et al.*, 2006. Los fragmentos de ADN específico fueron primero amplificados por PCR múltiple utilizando *primers* externos para todos los marcadores (Su *et al.*, 2006). Se utilizó un programa que incluye un paso de desnaturalización inicial a 94 °C por 4 min,

seguido de 30 ciclos con desnaturalización (94 °C; 30 s), hibridación (*annealing*) (55 °C; 30 s) y extensión (72 °C; 2 min). Se continuó con una PCR anidada para cada marcador individual, con un programa que incluye un paso de desnaturalización inicial a 95 °C por 4 min, seguido de 35 ciclos con desnaturalización (94 °C; 30 s), hibridación (60 °C; 1 min) y extensión (72 °C; 1,5 min). Para el marcador Apico la hibridación se hizo a 55 °C. Los productos fueron cortados con enzimas de restricción y analizados por electroforesis como fue descrito por Su *et al.*, 2006. El patrón de bandeos fue revelado en un gel de agarosa al 2,5 % para todos los marcadores excepto para Apico que se usó al 3 %, teñidos con RedSafe (Sigma-Aldrich, USA) o SYBR® Safe DNA *gel stain* (Invitrogen, USA). Como controles de referencia de *T. gondii* se utilizó ADN extraído de taquizoítos de las cepas de referencia GT1, PTG y CTG (tipos clonales I, II y III respectivamente) (Khan *et al.*, 2007), TgCgCa1, MAS, TgCatBr5 (Khan *et al.*, 2007), TgCatBr64 (Pena *et al.*, 2008) y TgRsCr1 (Rajendran *et al.*, 2012). Para estimar el tamaño de los amplificadores, junto con las muestras se utilizó un marcador de pares de base (pb) (Ladder cada 100bp DNA, Invitrogen GmbH, Germany) (ver Anexo 7.1.1).

Los marcadores SAG1 y 5'3'SAG2 se procesaron solamente en el LAB UTK. Para el resto de los marcadores se realizó un consenso entre los resultados obtenidos en el LAB UTK y los genotipos obtenidos por el grupo de trabajo del LAINPA en Argentina.

4.1.4. Identificación de genotipos

Los genotipos finales obtenidos se buscaron en la base de datos *online* ToxoDB (www.toxodb.org) para identificarlos con su # y número correspondiente (haplotipo). Los genotipos que no se encontraron registrados se consideraron “nuevos” y se pidió su incorporación a la base de datos y asignación de número.

4.1.5. Red filogenética

La red filogenética de *Neighbour Joining* se realizó utilizando el *software* SplitsTree4 versión 4.14.6 (Huson & Bryant, 2006). Se utilizaron los 29 genotipos de Argentina obtenidos en el ensayo previo, 10 genotipos de Argentina obtenidos de la base de datos ToxoDB: TgCkAr1, 2, 6, 7, 16, 18, 24, 25, 27 y 28 (Rajendran *et al.*, 2012), 8 genotipos de referencia (los mismos usados en la genotipificación): tipo I (RH/GT1), tipo II (ME49/PTG), tipo III (VEG/CTG), MAS, TgCgCa1, TgCatBr5, TgCatBr64 y TgToucan (TgRsCr1), 4 genotipos de referencia de Brasil (Brl, BrII, BrIII y BrIV) (Pena *et al.*, 2008) y 4 genotipos diversos o no clonales: CASTELLS de Uruguay (Su *et al.*, 2006), TgCatBr3 de Brasil (Pena *et al.*, 2008), VAND de Guayana Francesa y BOF de Bélgica (Weiss & Kim, 2014). Los genotipos se codificaron para cada marcador con una combinación de 0s y 1s. El genotipo codificado concatenado para cada muestra se utilizó para inferir la red como fue descrito por Rajendran *et al.*, 2012 (Rajendran *et al.*, 2012).

4.2 OBJETIVO B

4.2.1. Diseño experimental

Ensayo de invasión y cantidad de taquizoítos producidos (replicación)

Se evaluaron los aislamientos de *T. gondii* provenientes de *S. boliviensis* y *M. rufogriseus* (*TgSb* y *TgMr*, respectivamente) en comparación con las cepas de referencia RH, ME49 y VEG (tipos clonales I, II y III respectivamente). Los parásitos que se utilizaron en estos ensayos *in vitro* fueron sometidos previamente a un re-aislamiento en ratones para mantener un número de pasajes similares y para minimizar el efecto de adaptación al cultivo celular.

La puesta a punto de los protocolos para el ensayo *in vitro* y la inmunofluorescencia de los taquizoítos de *T. gondii* se realizó a partir de la modificación de los trabajos de Alomar *et al.*, 2013 y Dellarupe *et al.*, 2014b.

Se hizo crecer una monocapa de células VERO sobre cubreobjetos circulares de 15 mm en placas de 24 pocillos. Una vez formada la monocapa celular con 80 % de confluencia, se infectó con los parásitos vivos en una dosis de infección 1 célula: 1 parásito. Se dejó un pocillo con monocapa celular VERO sin inocular como control negativo. Se realizaron seis ensayos independientes con tres réplicas cada uno; tres ensayos se finalizaron a las 6 hpi y tres a las 18 hpi, en ese momento cada pocillo se lavó con PBS estéril y se fijó con metanol.

Se realizó una técnica de inmunofluorescencia indirecta sobre los cubreobjetos para marcar específicamente los parásitos. Se incubó cada cubreobjeto con un suero hiperinmune de cabra policlonal contra *T. gondii* diluido en PBS-Tween20 más albúmina sérica bovina (BSA) por 45 minutos, se lavó e incubó con el conjugado de burro anti cabra IgG-Alexa 488 color verde (Life technologies, USA)

diluido en PBS-Tween20 más BSA por 45 minutos. Los núcleos se tiñeron con el colorante nuclear DAPI (Invitrogen, USA) según instrucciones del fabricante. Finalmente, los cubreobjetos fueron lavados con PBS, montados con líquido de montaje MOWIOL 4-88 (Sigma-Aldrich, USA) y observados en microscopio de fluorescencia (Leica DL 2000).

Se observaron 50 campos por cubreobjetos y se contó la cantidad de VPs y la cantidad de taquizoítos dentro de cada VPs. La invasión fue considerada como el número de VPs totales detectadas en el ensayo a las 6 hpi. La replicación fue considerada como el número total de taquizoítos que se dividieron contados en los ensayos de las 6 hpi y 18 hpi.

4.2.2. Mantenimiento de la línea celular VERO

Se utilizaron cultivos de células VERO que se mantuvieron criopreservadas en nitrógeno líquido y se cultivaron en botellas T25 (Greiner Bio-One, Alemania) con medio RPMI-1640 con glutamina (*Roswell Park Memorial Institute*, Gibco, USA), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) (Natocor, Argentina) y 1 % de una solución de antibióticos y antimicóticos (ATB-ATM) (10.000 unidades de penicilina/ ml, 10 mg de estreptomina/ ml y 0,25 mg de fungizona/ ml) (Gibco BRL, UK). Todos los cultivos se realizaron a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂ (estufa para cultivos Brand Bio-Labo, Japón). Una vez formada la monocapa, las células se mantuvieron con el mismo medio, pero suplementado con 3 % de SFB. A los 7 días de cultivo, la monocapa celular fue tratada con tripsina-EDTA (PAA Laboratories, Austria) en solución tampón de fosfatos (PBS) de pH 7,2 (ver Anexo 7.2.1) a 37 °C, con el fin de desprender las células adheridas y separarlas.

La suspensión celular se distribuyó en nuevas botellas de cultivo con medio con 10 % de SFB, continuando de esta manera los cultivos durante la ejecución del presente trabajo (ver Anexo 7.2.2).

4.2.3. Mantenimiento de los taquizoítos

Los taquizoítos de *T. gondii* se mantuvieron congelados en nitrógeno líquido, para descongelarlos se realizó una infección intraperitoneal en ratones deficientes para IFN- γ (GKO; C.129S7(B6)-ifng^{tm1Ts}/J, *The Jackson Laboratory*, UK). Se obtuvo el exudado peritoneal de los ratones (*post mortem*) mediante lavados con solución fisiológica (SF) estéril (ver Anexo 7.2.3.), se centrifugó, se resuspendió en medio de cultivo RPMI-1640-glutamina con 10 % de SFB y 1 % de antibiótico-antimicótico y se infectaron cultivos de células VERO, donde se mantuvieron el resto del trabajo. Todos los aislamientos se sometieron a no más de 10 pases en cultivo de células.

Se utilizaron cultivos de células VERO de tres días para infectar con taquizoítos de los aislamientos y cepas de *T. gondii* mencionados previamente. La cepa de referencia VEG (tipo clonal III) fue cedida gentilmente por el Dr. J. P. Dubey del *Animal Parasitic Diseases Laboratory, Agricultural Research Center (USDA), Beltsville, Maryland, USA* y mantenida en el LAINPA, FCV, UNLP. Los cultivos se mantuvieron como se indica en el punto 4.2.2. Se realizaron pasajes semanales de taquizoítos durante el desarrollo del plan de trabajo. Para esto se optimizaron las dosis infectantes de los aislamientos *TgSb* y *TgMr* y de las cepas de referencia tipo I (RH), II (ME49) y III (VEG), para su mantenimiento en cultivos de células VERO, previo a la inoculación para el ensayo. Las dosis de infección para

mantenimiento semanal fueron: 1×10^6 parásitos para RH, $2,5 \times 10^6$ para ME49, 4×10^6 para VEG y 3×10^6 para *TgSb* y *TgMr*. Para el ensayo los taquizoítos se cosecharon cuando la infección de la monocapa era del 80% y los parásitos se encontraban dentro de las VPs. Para ello se procedió a raspar la monocapa con un raspador (GBO, Alemania), y se pasó la suspensión por las agujas de calibre 22G, 25G y 27 ½ G, para liberar los parásitos del interior de las VPs. Se contaron en cámara de Neubauer y fueron resuspendidos en la dosis requerida para inocular el cultivo de células VERO de cada pocillo. Todas las infecciones se realizaron dentro de la hora de recolección.

4.2.4. Ensayo *in vitro* en placas de 24 pocillos

La invasión y la cantidad de taquizoítos producidos (replicación) fueron determinadas en un ensayo en placa de 24 pocillos. Se colocaron cubreobjetos circulares de 15mm (MATSUNAMI, Micro Cover Glass, USA) estériles en placas de 24 pocillos, donde se agregó una concentración de 1×10^5 células VERO por pocillo con los medios y condiciones que se describieron en el punto 4.2.2. Los cultivos se dejaron *overnight* (16 a 18 h) para llegar a una monocapa con 80 % de confluencia. Los taquizoítos se prepararon como se describió en el punto 4.2.3. y se sembraron 1×10^5 taquizoítos por pocillo (dosis de infección 1 parásito:1 célula). Una vez sembrados los parásitos se colocaron las placas infectadas por 10 minutos en hielo para sincronizar la invasión celular. Una hora después de la infección se procedió a cambiar el medio de cultivo. Al momento de corte de los ensayos (6 y 18 hpi) se lavaron los cultivos con PBS estéril y se fijaron con

metanol frío por 5 minutos a -20 °C. Se conservaron con PBS estéril a 4 °C. Se realizaron 3 ensayos independientes para cada tiempo de corte, con 3 réplicas.

4.2.5. Inmunofluorescencia sobre cultivos celulares

Se realizó la marcación de los protozoos mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando como anticuerpo primario un suero de cabra naturalmente infectada con *T. gondii*, seleccionado por presentar un título de anticuerpos ≥ 800 (IFI). Los procedimientos fueron adaptados de los descritos por Alomar *et al.*, 2013 y Dellarupe *et al.*, 2014. Brevemente, los pasos de permeabilización de las membranas celulares, bloqueo, agregado de anticuerpo primario y conjugado anti-IgG caprina-Alexa 488, se incubaron en cámara húmeda a 37 °C. Los cultivos fijados con metanol se permeabilizaron con 200 μ l de tritón al 0,25 % en PBS durante 10 minutos. Se bloqueó con 200 μ l de solución de bloqueo de SFB al 5 % en PBS durante 30 minutos. Se realizaron 3 lavados. Se incubó 45 minutos con 50 μ l de anticuerpo primario diluido 1:100 en PBS-Tween20 (0,5 %) más albúmina sérica bovina (0,5 % BSA). Se realizaron 3 lavados. Se incubó en la oscuridad 45 minutos con 50 μ l de suero anti-IgG de cabra como anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo Alexa 488 (Life technologies, USA) diluido 1:500 en PBS-Tween20 (0,5 %) más albúmina sérica bovina (0,5 % BSA). Se realizaron 3 lavados. Como tinción de contraste para visualizar los núcleos de las células se utilizó DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride, Molecular Probes, Invitrogen, USA) diluido 1:2000 en PBS 1X, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente (ver Anexo 7.2.4.). Para finalizar, se lavó y se montó con una gota de 10 μ l de líquido de montaje MOWIOL 4-88 (Sigma Aldrich, USA) invirtiendo cada

cubreobjetos sobre el líquido de montaje, se dejó a temperatura ambiente *overnight* y se mantuvieron a -20 °C hasta su visualización (ver Anexo 7.2.5). Cada cubreobjetos fue observado en un microscopio de fluorescencia (Leica DL 2000) a un aumento de 200x y cada VP que se observó por pocillo, fue interpretada como un taquizoíto que invadió y se multiplicó. Se cuantificaron las VPs y los taquizoítos presentes en 50 campos por cubreobjetos.

4.2.6. Análisis estadístico

Se seleccionaron al azar 50 campos de cada cubreobjetos y se realizó el conteo de VPs discriminando entre VPs de 1, 2, 4, 8, y 16 taquizoítos. La invasión fue analizada comparando el promedio/campo y la cantidad total de VPs producidas por cada cepa y aislamiento. La replicación fue analizada calculando la cantidad total de parásitos que evidenciaron al menos un evento de endodiogenia por cada cepa y aislamiento (VPs de 2 o más taquizoítos).

Los datos obtenidos son un conteo y se ajustan a la distribución Poisson (la homogeneidad entre réplicas se comprobó con la prueba de Kruskal Wallis). Por tanto, se aplicó un Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) con función de enlace "log" (Balzarini *et al.*, 2008; Zuur *et al.*, 2009). Se definió como factor fijo: cepas y aislamientos, y como variable respuesta: promedio y cantidad de VPs a las 6 hpi y cantidad total de taquizoítos a las 6 hpi y 18 hpi. Debido a que se realizaron 3 réplicas por ensayo y que éstas no son independientes, se consideró el efecto de ensayo como aleatorio. El grado de significancia se estableció en $p < 0,05$. En el caso de detectarse diferencias significativas, se utilizó como prueba a

posteriori LSD Fisher. Se utilizaron el *software* R asociado a la interfase InfoStat versión 2018 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) (Di Rienzo *et al.*, 2008) para el análisis y el *software* GraphPad Prism versión 6 (San Diego, USA) para la confección de un gráfico de barras utilizando los promedios de cantidad de parásitos.

4.3. OBJETIVO C

4.3.1. Diseño experimental

Ensayo de morbilidad y mortalidad

Se utilizaron ratones hembra Swiss (NLAE: NIH) exocriados SPF que se distribuyeron formando 5 grupos:

Grupo 1: infectados con taquizoítos de *TgSb*.

Grupo 2: infectados con taquizoítos de *TgMr*.

Grupo 3: infectados con taquizoítos de *T. gondii* del tipo clonal II (cepa ME49).

Grupo 4: infectados con taquizoítos de *T. gondii* del tipo clonal III (cepa VEG).

Grupo 5: inoculados con PBS (control negativo; CN).

No se utilizó la cepa clonal RH en el modelo *in vivo*, dada su elevada mortalidad ($DL_{100} = 1$ parásito) y en acuerdo a normativas internacionales de bienestar animal (ICLAS, 2012).

Cada grupo compuesto por 6 ratones se dividió en 2 subgrupos de 3 animales que fueron inoculados en forma subcutánea con dos dosis de infección (10^2 y 10^3 taquizoítos) obtenidos a partir de cultivo en células VERO. Cada subgrupo se alojó en una caja de policarbonato con tapa de acero inoxidable y cama de viruta estéril. Se controlaron diariamente por un período de 30 días para detectar signología compatible con toxoplasmosis: pelo hirsuto, paresia del tren posterior, ataxia, marcha circular, parálisis, debilidad y entumecimiento. Ante la aparición de signos los animales fueron sacrificados humanitariamente. De no mediar signología, los animales fueron sacrificados a los 30 dpi.

Al sacrificio, se recolectaron los bazos en condiciones estériles, bajo cabina de flujo laminar, para la recuperación de células esplénicas como se detalla en el

objetivo D. Se obtuvieron muestras de sangre por punción cardíaca, y el suero obtenido fue conservado a -20 °C para serología (IFI). Además, se tomaron muestras de SNC, hígado, corazón, bazo y pulmón que fueron submuestreados para estudios moleculares y fijados en formol bufferado al 10 % para estudios histopatológicos, procediendo acorde estudios previos (Basso *et al.*, 2009; Basso *et al.*, 2007; Moré *et al.*, 2010).

4.3.2. Ratones

El diseño experimental fue evaluado y aprobado por el CICUAL (Comité Internacional del Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio), Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP (protocolo 42.6.14T; 26/08/2014).

Se utilizaron 30 ratones hembra Swiss (*Mus musculus*) cuyos progenitores proceden del *National Institute of Health* (USA), de 8 semanas de edad y de 23-29 gr peso promedio, provistos por el Bioterio del Laboratorio de Animales de Experimentación, FCV, UNLP. Los ratones eran SPF: virales, parasitarios y bacterianos comunes, de acuerdo con los resultados de los procedimientos de diagnóstico de rutina y control sanitario realizados por el bioterio responsable. Los animales fueron alojados en el Bioterio del LAINPA, en cajas de policarbonato de 20 x 30 cm con cama de viruta estéril en un ambiente controlado con ciclos de 12 h de luz y 12 h oscuridad y con alimento balanceado específico para roedores y agua *ad libitum*. Se mantuvo una carga animal de 3 ratones por caja. Los animales fueron manejados de manera de minimizar las condiciones de estrés a lo largo de todo el experimento.

4.3.3. Preparación de los taquizoítos de *T. gondii* para inoculación en ratones Swiss

Las dosis de infección para este ensayo se definieron a partir de los resultados del ensayo *in vitro* llevado a cabo en el objetivo B y la bibliografía consultada. Se eligieron 2 dosis de infección: 10^2 y 10^3 taquizoítos. La vía de inoculación elegida fue subcutánea siguiendo recomendaciones de otros autores (Dubey, 2010; Saraf *et al.*, 2017). Los parásitos se mantuvieron en cultivos de células VERO como fue explicado en los apartados 4.2.2. y 4.2.3. Al momento del desafío, se cuantificaron los taquizoítos viables en cámara de Neubauer con azul tripán diluido 1:10 (ver Anexo 7.3.1.). Se realizaron las diluciones necesarias para llegar a una concentración de 10^2 y 10^3 parásitos en un volumen de 500 μ l de medio RPMI-1640-glutamina con 10 % de SFB y 1 % de antibiótico-antimicótico. Durante todo el proceso de preparación los taquizoítos se mantuvieron en hielo para asegurar su viabilidad.

4.3.4. Inoculación de ratones

Se formaron 5 grupos con 6 ratones cada uno, los que fueron inoculados vía subcutánea con 500 μ l con las dosis de infección, 10^2 taquizoítos (3 ratones) y 10^3 taquizoítos (3 ratones) en cada grupo.

Los ratones se controlaron diariamente por 4 semanas.

4.3.5. Sacrificio y toma de muestras

Los ratones se controlaron diariamente y aquellos que presentaron signología compatible con toxoplasmosis (pelo hirsuto, paresia del tren posterior, ataxia,

marcha circular, parálisis, debilidad y/o entumecimiento) se sacrificaron acorde normas establecidas por el CICUAL. Los ratones que no tuvieron signología se sacrificaron a los 30 dpi. Todos los ratones se pesaron al inicio del ensayo y al momento del sacrificio. Los ratones se necropsiaron dentro de una cabina de flujo laminar. Se tomaron muestras de sangre por punción cardíaca que se centrifugó para obtener el suero y conservó a -20 °C. Se muestrearon los siguientes órganos: SNC, hígado, bazo, pulmón y corazón. Todos, excepto el bazo, se dividieron en 2 partes iguales: una parte se guardó en formol bufferado al 10% para estudios histopatológicos a temperatura ambiente y otra parte se guardó en microtubos de 1,5 ml ADNasa *free* para estudios moleculares y fueron almacenados a -20 °C. El bazo se separó en 3 partes, la mitad para el Objetivo D y la otra mitad se dividió para histopatología y estudios moleculares. El procesamiento del bazo para el procesamiento de células esplénicas se detalla en el Objetivo D.

4.3.6. Análisis histopatológico

El SNC de los ratones fue conservado en formol bufferado al 10 % y procesado en el servicio de Anatomía Patológica, Laboratorio de Patología Especial Veterinaria “Dr. Bernardo Epstein”, FCV, UNLP (gentileza de la Dra. María Alejandra Quiroga). El análisis histopatológico se realizó mediante procedimiento de rutina con la tinción con hematoxilina y eosina (H/E). Se evaluó la aparición y severidad de las lesiones histopatológicas según el siguiente esquema de puntuación (Pereira *et al.*, 2017; Venturini *et al.*, 1996):

Puntaje asignado	Descripción histopatológica en SNC
0	Sin lesiones
1	Meningoencefalitis no supurativa leve, escasa gliosis focal y escasa degeneración neuronal
2	Meningoencefalitis no supurativa moderada, manguitos perivasculares
3	Meningoencefalitis no supurativa y necrotizante multifocal

4.3.7. Identificación de ADN para *T. gondii* por PCR

Se realizó la extracción de ADN total de las muestras de SNC de los ratones. Además, se realizó la extracción de ADN de las muestras de pulmón de los ratones, se seleccionó este órgano dado que es considerado un marcador de la diseminación sistémica de la infección (Costa *et al.*, 2018). Se utilizó el kit comercial Wizard® *genomic DNA purification* (Promega, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ver Anexo 7.3.2.). El ADN obtenido se conservó congelado a -20 °C hasta su utilización. Se realizó la amplificación mediante PCR de las muestras de ADN extraídas utilizando los *primers* TOX5 -TOX8 (Homan *et al.*, 2000; Reischl *et al.*, 2003) que amplifican un fragmento de la secuencia de 529 pb repetitiva de *T. gondii*. Se utilizó un programa que incluye un paso de desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos con

desnaturalización (94 °C; 60 s), *annealing* (60 °C; 60 s) y extensión (72 °C; 60 s) y un paso de extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos amplificados se corrieron en geles de agarosa al 1,5 % y se visualizaron luego de una electroforesis utilizando SYBR® Safe DNA *gel stain* (Invitrogen, USA) y transiluminador de luz azul (Invitrogen, USA). Los productos amplificados se visualizaron como se describió previamente utilizando un marcador de pb de 100 a 1000 pb (Cienmarker, Biodynamics, Argentina) (ver Anexo 7.3.3).

4.3.8. Análisis estadístico

La mortalidad se calculó como: total de animales muertos / total de animales infectados * 100. La morbilidad se calculó como: total de animales enfermos / total de animales infectados * 100.

Las variables lesiones en SNC, quistes, ADN en SNC y ADN en pulmón se calcularon como: total de animales con presencia de la variable / total de animales infectados * 100.

Los datos de la variable peso se analizaron con U Mann-Whitney para detectar diferencias significativas entre el peso al inicio y al final del ensayo. El grado de significancia se estableció en $p < 0,05$.

Se usó el Coeficiente de correlación de Pearson para evaluar la asociación entre los parámetros evaluados en el ensayo *in vitro* (invasión y replicación) y la mortalidad en el ensayo *in vivo*.

Se utilizó el *software* InfoStat versión 2018 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) (Di Rienzo *et al.*, 2008) para todos los análisis estadísticos.

4.4. OBJETIVO D

4.4.1. Diseño experimental

Ensayo de linfoproliferación y medición de anticuerpos anti *T. gondii*

Se obtuvieron células esplénicas a partir de los bazos de los ratones Swiss utilizados en el objetivo C, dentro de la hora posterior a su sacrificio. Se cultivaron y desafiaron con 4 tratamientos diferentes.

Para determinar la concentración de IFN- γ en los sobrenadantes de las células esplénicas se utilizó una prueba de ELISA de captura comercial específica para citoquinas de origen murino.

Para estimar la respuesta humoral generada por cada cepa y aislamiento se midió la producción de anticuerpos específicos. Los niveles de IgG específica anti *T. gondii* fueron evaluados mediante inmunofluorescencia indirecta sobre el suero obtenido de los ratones evaluados en el objetivo C.

4.4.2. Cultivo de células esplénicas

El cultivo de células esplénicas se realizó a partir de los bazos de los ratones sacrificados a los 30 dpi o al momento que presentaron signología compatible con toxoplasmosis.

El bazo fue extraído y se procesó bajo el flujo laminar. Un trozo del órgano (equivalente al tercio), se colocó en una placa de Petri con 6 ml de medio RPMI con 10 % de SFB. La muestra se procesó bajo el flujo laminar y se refrigeró a 4 °C mediante la inmersión en hielo para evitar la degradación celular. Con la ayuda de un par de portaobjetos esmerilados estériles se disgregó la muestra del bazo humedecido con el medio, hasta lograr la mayor desintegración posible del tejido.

Se recolectó el macerado en un tubo de 15 ml estéril, sin incluir los restos de tejidos y material fibroso y se centrifugó a 250 g durante 10 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 ml de medio con 10 % de SFB, hasta su completa homogeneización. Se le adicionó 1 ml de solución de buffer de lisis (cloruro de amonio al 0,83 %; ver Anexo 7.4.1) con el fin de hemolizar los glóbulos rojos. Se invirtió suavemente el tubo un par de veces, con el fin de mezclar las soluciones y se recubrió con papel aluminio para protegerlo de la luz dejándolo reposar 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 4 ml de medio con 10 % de SFB y se lo centrifugó a 250 g por 10 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 6 ml de medio con SFB al 10 %. Se centrifugó y el pellet resultante se resuspendió en 1 ml de medio con 10 % de SFB. Se obtuvieron 10 µl de dicha suspensión y se diluyeron con 90 µl de azul tripán al 0,5 % realizando el conteo de las células esplénicas viables en la cámara de Neubauer. Se sembraron en placas para cultivo de 96 pocillos a una concentración de 2×10^5 células viables, en 200 µl de medio, por pocillo (Wang *et al.*, 2016).

Una porción del bazo y una concentración de 1×10^7 células esplénicas fueron conservadas en viales con 1 ml de solución preservante de ARN (RNA^{later}® Solution, Life Technologies; Thermo Fisher Scientific Inc., USA) para la eventual medición de citoquinas por *Reverse transcription-Real Time-PCR*. Dicho material fue conservado 24 h a 4 °C, se centrifugó y luego se descartó la solución y se congeló a -20 °C hasta su uso.

4.4.3. Obtención de antígeno de lisado total parasitario (TLA)

El antígeno de proteínas totales utilizado para el desafío de las células esplénicas de los ratones derivó de la cepa de referencia RH de *T. gondii* mantenida en cultivo celular como se detalla en los apartados 4.2.2 y 4.2.3. Del mismo modo, se obtuvo un TLA de las cepas ME49 y VEG y de los aislamientos *TgMr* y *TgSb*, mantenidos en cultivo celular como se describe en los apartados 4.2.2 y 4.2.3. Los taquizoítos de cada cepa y aislamiento se centrifugaron y se resuspendieron en 500 µl de PBS estéril. Luego se sonicaron (Omni International, USA) en 3 ciclos, 1 min/ciclo, con potencia 3. El lisado total se cuantificó con el kit comercial (BCA; Pierce, USA) según las indicaciones del fabricante (ver Anexo 7.4.2). Se realizaron las diluciones necesarias en PBS para una concentración proteica final de 10 µg/ml, acorde a la bibliografía consultada (Chen *et al.*, 2016; Tao *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016).

4.4.4. Desafío

Se realizaron por triplicado los siguientes tratamientos para cada bazo de ratón procesado de los 5 grupos experimentales siguiendo protocolos adaptados de los de otros autores (Chen *et al.*, 2016; Tao *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016):

- 1- Estimulación con lisado total de taquizoítos de la cepa RH: estimulación con 10 µg/ml de lisado total/pocillo.
- 2- Estimulación con lisado total de taquizoítos homólogos (mismas cepas y aislamientos): estimulación con 10 µg/ml de lisado total/pocillo obtenido a partir del sonicado de taquizoítos de las cepas ME49, VEG y los aislamientos *TgMr* y *TgSb* (Rodgers *et al.*, 2005).

3- Control positivo: estimulación con Concanavalina A (Biorad, USA) en una concentración final de 5 µg/ml.

4- Control negativo: sin tratamiento, células de bazo sembradas en medio con 10 % de SFB.

Se mantuvieron las placas en una estufa de cultivo a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 72 h (Chen *et al.*, 2016; Tao *et al.*, 2013) y luego se recolectaron los sobrenadantes y se conservaron a -20 °C hasta su uso.

Todo el procesamiento se realizó en condiciones de esterilidad.

4.4.5. Medición de IFN- γ

A partir de los sobrenadantes recolectados a las 72 h del cultivo de esplenocitos se midió la producción de la citoquina IFN- γ . Se utilizó el kit de ELISA comercial: Mouse IFN- γ ELISA Kit (Nº catálogo: BMS606) (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) y se siguieron las instrucciones del proveedor. Previo a la medición de IFN- γ se midió la concentración de proteínas de cada triplicado con un kit comercial (BCA; Pierce, USA) para corroborar concentraciones homogéneas antes de preparar un pool con los sobrenadantes de cada tratamiento (ver Anexo 7.4.2). La medición de IFN- γ se realizó sobre el pool de los triplicados de cada tratamiento por ratón. Se evaluaron diferentes diluciones (1:10; 1:50 y 1:100) de 3 muestras en pool de sobrenadantes (uno de infección con aislamiento clonal, uno de infección con aislamiento atípico y uno del grupo CN) y se eligió una dilución de 1:50 de cada muestra para evitar que la medición excediera el rango del kit. Se estimó la concentración de cada muestra utilizando la ecuación de la recta en base a los estándares de concentración (pg/ml) provistos en el kit. El resultado fue ajustado

multiplicando por la inversa de la dilución. Por detalles del procesamiento y medición ver anexo 7.4.3.

4.4.6. Detección de IgG por la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Los sueros de los ratones obtenidos por punción cardíaca *post-mortem* al finalizar el ensayo, fueron diluidos en PBS a partir de 1:25 hasta título final. Las diluciones se colocaron en las áreas de los portaobjetos que contenían antígeno de *T. gondii* de la cepa de referencia RH (ver Anexo 7.4.4.1). Se utilizaron sueros controles de ratones positivos y negativos experimentalmente infectados. Se incubaron a 37 °C durante 30 min en cámara húmeda. Se hicieron 3 lavados con PBS durante 10, 5 y 3 min en agitación. Se colocó un conjugado anti-IgG de ratón (Sigma, USA) unido al fluorocromo isotiocianato de fluoresceína diluido 1:100 en PBS y se incubó por 30 min a 37 °C, en cámara húmeda. Se hicieron 3 lavados con PBS durante 10, 5 y 3 min en agitación y se montó con solución de montaje (ver Anexo 7.4.4.2). Se consideró positiva hasta la última dilución del suero donde se observó fluorescencia completa en todo el borde del parásito (Pardini *et al.*, 2014).

4.4.7. Análisis estadístico

Los datos de concentración de IFN- γ estimados con la prueba de ELISA, se sometieron a la prueba de Shapiro-Wilk y a la prueba de Levene para comprobar su tipo de distribución y homocedasticidad. En caso de no ser paramétricos, se aplicó la transformación log₁₀. Los valores en producción de IFN- γ que se encontraron por fuera de los valores establecidos por el estándar de producción del kit fueron eliminados del análisis debido a su poca exactitud (menores a 0

pg/ml y mayores a 1000 pg/ml). Se realizó un ANOVA para analizar las diferencias entre los grupos. El grado de significancia se estableció en $p < 0,05$. En el caso de detectarse diferencias significativas, se utilizó como prueba *a posteriori* LSD Fisher.

Los títulos de IgG murina anti *T. gondii* se sometieron a la prueba de Shapiro-Wilk y a la prueba de Levene para comprobar su tipo de distribución y homocedasticidad. Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis para detectar diferencias entre los grupos. El grado de significancia se estableció en $p < 0,05$. En el caso de detectarse diferencias significativas, se realizaron las comparaciones de a pares de Kruskal-Wallis.

Se utilizó el *software* InfoStat versión 2018 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) (Di Rienzo *et al.*, 2008) para todos los análisis estadísticos.

5. RESULTADOS

5.1. OBJETIVO A

5.1.1. Genotipificación por nPCR-RFLP de 29 muestras de ADN de *T. gondii* de Argentina

Un total de 29 muestras de ADN de Argentina fueron genotipificadas por nPCR-RFLP para 10 marcadores moleculares y clasificadas acorde a los genotipos registrados en ToxoDB.

Los genotipos se agruparon en 17 combinaciones de alelos, los tipos de alelos para dos muestras no se determinaron en dos loci y se consideraron caracterizadas de modo incompleto (TgHm16-01Arg y TgCk14-5Arg). Las 29 muestras genotipificadas fueron identificadas y pertenecen a 17 genotipos, que incluyen: ToxoDB # 2 o tipo clonal III ($n = 5$) y ToxoDB # 14, # 19 y # 48 (cada uno con $n = 2$). La mayoría de estos genotipos tienen un predominio de alelos tipo III. Ocho genotipos fueron representados por una sola muestra (# 1, # 3, # 8 # 116, # 123, # 138, # 163, # 182). Seis muestras con diferentes combinaciones de alelos (TgCk14-6Arg y TgCk14-7Arg, TgGtArg, TgHum12-1Arg, chicken 13-3Arg y TgHum16-02Arg) no se encontraron en ToxoDB y se identificaron como cinco nuevos genotipos (# 283, # 284, # 285, # 286 y # 287, respectivamente). Además, dos muestras (TgPig10Arg y TgKg2Arg) carecen de SAG1 y / o 5'3'SAG2, y podrían representar genotipos ya identificados o incluso nuevos (**Tabla 1**).

El aislamiento de *T. gondii* proveniente de *S. boliviensis* se identificó como # 163, presenta el alelo tipo I para SAG1 y C29-2, el alelo tipo II para C22-8 y el alelo tipo III para el resto de los marcadores.

El aislamiento de *T. gondii* proveniente de *M. rufogriseus* se identificó como # 14, presenta el alelo tipo I para SAG1 y C29-2 y el alelo tipo III para el resto de los marcadores.

La genotipificación completa confirma su estatus de aislamientos “atípicos”.

5.1.2. Análisis filogenético

El análisis filogenético agrupó a la mayoría de las muestras en 3 grupos, teniendo cada uno de ellos una cepa clonal como referencia (I, II, III) y nombrados grupos 1, 2 y 3, respectivamente (**Figura 5**). El genotipo # 163 (muestra TgMy1Arg) se halla englobado en el grupo 3, sin embargo, es la muestra que se encuentra en el límite del grupo y la más alejada del tipo canónico III. Próxima a ésta muestra hay 2 aislamientos de *T. gondii* provenientes de gallina: 1 de la provincia de Misiones (TgCk13-5Arg; # 116) y 1 de la provincia de Buenos Aires (TgCkN21Arg; # 8), y 2 cepas de Brasil (cepa de referencia BrIII y TgCatBr3; # 8). El genotipo # 14 (muestra TgWb1Arg) también forma parte del grupo 3 y comparte el nodo con 1 aislamiento proveniente de humano del mismo genotipo (TgHm17-01Arg). Próxima a ésta muestra hay 2 aislamientos: 1 aislamiento de una gallina de la provincia de Misiones (TgCk14-5Arg; genotipo incompleto) y otro proveniente de humano de la provincia de Buenos Aires (TgHm14-4Arg; # 138). El nodo con el genotipo # 14 también está en el límite del grupo 3, opuesto al nodo con el aislamiento TgMy1Arg, aunque sólo difieren en el alelo para un marcador (C22-8).

Tabla 1: Descripción detallada de las muestras de ADN de Argentina y cepas de referencia de *T. gondii* usadas en este estudio.

Hospedador	Cepa / aislamiento	Genotipo de ToxoDB PCR-RFLP	Genotipo de ToxoDB PCR-RFLP											Origen	Referencia	
			SAG1	5'-3'SAG2	alt. SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	C22-8	C29-2	L358	PK1	Apico			
Humano (<i>Homo sapiens</i>)	RH ¹	#10	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	USA	Khan <i>et al.</i> , 2007
Oveja (<i>Ovis aries</i>)	ME49 ²	#1	II o III	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	USA-CA	Khan <i>et al.</i> , 2007
Humano (<i>Homo sapiens</i>)	VEG ³	#2	II o III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	USA-CA	Khan <i>et al.</i> , 2007
Humano (<i>Homo sapiens</i>)	MAS	#17	u-1	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	Francia	Khan <i>et al.</i> , 2007	
Puma (<i>Puma concolor cougar</i>)	TgCgCa1	#66	I	II	II	III	II	II	II	u-1	I	u-2	I	Canadá	Khan <i>et al.</i> , 2007	
Gato (<i>Felis silvestris catus</i>)	TgCatBr5	#19	I	III	III	III	III	III	I	I	I	u-1	I	Brasil	Khan <i>et al.</i> , 2007	
Gato (<i>Felis silvestris catus</i>)	TgCatBr64	#111	I	I	u-1	III	III	III	u-1	I	III	III	I	Brasil	Pena <i>et al.</i> , 2008	
Tucán (<i>Ramphastidae</i>)	TgToucan (TgRsCr1)	#52	u-1	I	II	III	I	III	u-2	I	I	III	I	Costa Rica	Rajendran <i>et al.</i> , 2012	
Oveja (<i>Ovis aries</i>)	CASTELLS	#15	u-1	I	II	III	III	III	III	I	I	III	I	Uruguay	Su <i>et al.</i> , 2006	
Humano (<i>Homo sapiens</i>)	VAND	#60	I	I	II	I	III	III	III	I	III	III	I	Guiana Francesa	Weiss & Kim, 2014	
Gato (<i>Felis silvestris catus</i>)	TgCatBr3	#8	I	III	III	III	III	III	II	III	III	III	III	Brasil	Pena <i>et al.</i> , 2008	

Humano (<i>Homo sapiens</i>)	BOF	#6	I	I	I	III	I	II	u-1	I	I	I	I	Bélgica	Weiss & Kim, 2014
Diversas especies	type BrI	#6	I	I	I	III	I	II	u-I	I	I	I	I	Brasil	Pena <i>et al.</i> , 2008
Diversas especies	type BrII	#11	I	I	II	III	III	III	I	III	I	II	III	Brasil	Pena <i>et al.</i> , 2008
Diversas especies	type BrIII	#8	I	III	III	III	III	III	II	III	III	III	III	Brasil	Pena <i>et al.</i> , 2008
Diversas especies	type BrIV	#17	u-1	I	II	III	III	III	u-I	I	I	III	I	Brasil	Pena <i>et al.</i> , 2008
Gallina (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	TgCkP22Arg	#1	II o III	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	Provincia de Buenos Aires (Las Flores)	Moré <i>et al.</i> , 2012
Cerdo (<i>Sus scrofa</i>)	TgPig10Arg	#1 likely	II o III	nd	II	II	II	II	II	II	II	II	II	Provincia de Buenos Aires	Pardini <i>et al.</i> , 2011
Cerdo (<i>Sus scrofa</i>)	TgPig15Arg	#3	II o III	II	II	II	II	II	II	II	II	II	I	Provincia de Buenos Aires	Pardini <i>et al.</i> , 2011
Suricata (<i>Suricata suricatta</i>)	TgMk1Arg	#2	II o III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	Provincia de Buenos Aires (La Plata Zoo)	Basso <i>et al.</i> , 2009
Canguro (<i>Macropus rufus</i>)	TgKg1Arg	#2	II o III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	Provincia de Buenos Aires (La Plata Zoo)	Moré <i>et al.</i> , 2010
Gato (<i>Felis silvestris catus</i>)	TgCat1Arg	#2	II o III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	Provincia de Buenos Aires	Bernstein <i>et al.</i> , 2018
Gato (<i>Felis silvestris catus</i>)	TgCat2Arg	#2	II o III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	Provincia de Buenos Aires	Bernstein <i>et al.</i> , 2018
Gato (<i>Felis silvestris catus</i>)	Cat 14-1Arg	#2	II o III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	Provincia de Buenos Aires	Bernstein <i>et al.</i> , 2018
Gallina (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	TgCkAr2	#2	II o III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	Provincia de Buenos Aires (alrededores ciudad de La	Dubey <i>et al.</i> , 2003

Gallina (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	TgCkAr24	#2	II o III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	Provincia de Entre Ríos (Ceibas)	Dubey <i>et al.</i> , 2005
Gallina (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	TgCkAr6	#2	II o III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	Provincia de Buenos Aires (alrededores ciudad de La Plata)	Dubey <i>et al.</i> , 2003
Gallina (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	TgCkAr16	#7	I	III	III	III	III	III	III	III	III	III	I	Provincia de Entre Ríos (Gualeguaychu)	Dubey <i>et al.</i> , 2005	
Gallina (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	TgCkAr18	#7	I	III	III	III	III	III	III	III	III	III	I	Provincia de Entre Ríos (Gualeguaychu)	Dubey <i>et al.</i> , 2005	
Gallina (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	TgCkN21Arg	#8	I	III	III	III	III	III	II	III	III	III	III	Provincia de Buenos Aires (Las Flores)	Moré <i>et al.</i> , 2012	
Gallina (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	TgCkAr1	#11	I	I	II	III	III	III	I	III	I	II	III	Provincia de Buenos Aires (alrededores ciudad de La Plata)	Dubey <i>et al.</i> , 2003	
Wallaby de Benet (<i>Macropus rufogriseus</i>)	TgWb1Arg	#14	I	III	III	III	III	III	III	I	III	III	III	Provincia de Buenos Aires (Zoológico de La Plata)	Basso <i>et al.</i>, 2007	
Humano (<i>Homo sapiens</i>)	TgHm17-01Arg	#14	I	III	III	III	III	III	III	I	III	III	III	Provincia de Buenos Aires	Pardini <i>et al.</i> , 2019	
Gallina (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	TgCk14-5Arg	incompleto	nd	nd	III	III	III	III	III	I	III	III	III	Provincia de Misiones	Pardini, <i>et al.</i> 2016	
Gallina (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	TgCkAr25	#15	u-1	I	II	III	III	III	III	I	I	III	I	Provincia de Entre Ríos (Ceibas)	Dubey <i>et al.</i> , 2005	

Gallina (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	TgCkAr27	#17	u-1	I	II	III	III	III	u-I	I	I	III	I	Argentina (se desconoce la provincia)	Rajendran <i>et al.</i> , 2012
Gallina (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	TgCkAr28	#17	u-1	I	II	III	III	III	u-I	I	I	III	I	Argentina (se desconoce la provincia)	Rajendran <i>et al.</i> , 2012
Gallina (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	TgCk11-9Arg	#19	I	III	III	III	III	III	I	I	I	u-1	I	Provincia de Misiones	Pardini <i>et al.</i> , 2016
Gallina (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	chicken 11-12Arg	#19	I	III	III	III	III	III	I	I	I	u-1	I	Provincia de Misiones	Pardini <i>et al.</i> , 2016
Conejo (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	Rabbit 2Arg	#48	I	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	Provincia de Buenos Aires	Bacigalupe <i>et al.</i> , 2011
Rata (<i>Rattus rattus</i>)	Rat1Arg (Reti4)	#48	I	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	Provincia de Buenos Aires	Dellarupe <i>et al.</i> , 2019c.
Gallina (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	TgCkAr7	#48	I	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	Provincia de Buenos Aires (alrededores ciudad de La Plata)	Dubey <i>et al.</i> , 2003
Gallina (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	TgCk13-5Arg	#116	I	III	III	III	I	III	II	III	III	III	III	Provincia de Misiones	Pardini <i>et al.</i> , 2016
Gallina (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	TgCkC25Arg	#123	I	III	III	III	III	III	I	III	III	III	III	Provincia de Buenos Aires (Las Flores)	More <i>et al.</i> , 2012
Humano (<i>Homo sapiens</i>)	TgHm14-4Arg	#138	u-1	III	III	III	III	III	III	I	III	III	III	Provincia de Buenos Aires	Pardini <i>et al.</i> , 2019
Mono ardilla (<i>Saimiri boliviensis</i>)	TgMy1Arg	#163	I	III	III	III	III	III	II	I	III	III	III	Provincia de Buenos Aires (Zoológico de La Plata)	Pardini <i>et al.</i>, 2015

Humano (<i>Homo sapiens</i>)	TgHm15-02Arg	#182	I	III	III	III	III	III	III	I	I	I	III	Provincia de Buenos Aires	Pardini <i>et al.</i> , 2019
Gallina (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	TgCk14-6Arg	#283, nuevo	u-1	I	II	III	III	II	I	I	III	I	I	Provincia de Misiones	Pardini <i>et al.</i> , 2016
Gallina (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	TgCk14-7Arg	#283, nuevo	u-1	I	II	III	III	II	I	I	III	I	I	Provincia de Misiones	Pardini <i>et al.</i> , 2016
Cabra (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	TgGtArg	#284, nuevo	I	III	III	III	II	III	III	III	I	III	III	Provincia de San Luis	Unzaga <i>et al.</i> , 2014
Humano (<i>Homo sapiens</i>)	TgHm12-1Arg	#285, nuevo	u-1	I	II	II	II	II	II	II	II	II	II	Provincia de Buenos Aires	Pardini <i>et al.</i> , 2014
Canguro (<i>Macropus giganteus</i>)	TgKg2Arg	#285 likely	nd	I	II	II	II	II	II	II	II	II	II	Provincia de Buenos Aires (Zoológico de La Plata)	More <i>et al.</i> , 2010
Gallina (<i>Gallus gallus domesticus</i>)	chicken 13-3Arg	#286, nuevo	u-1	nd	II	III	III	III	I	I	III	III	III	Provincia de Misiones	Pardini <i>et al.</i> , 2016
Humano (<i>Homo sapiens</i>)	TgHm16-02Arg	#287, nuevo	u-1	nd	III	III	III	III	III	III	III	III	I	Provincia de Buenos Aires	Pardini <i>et al.</i> , 2019
Humano (<i>Homo sapiens</i>)	TgHm16-01Arg	incompleto	nd	nd	III	III	III	III	III	III	I	II	III	Provincia de Buenos Aires	Pardini <i>et al.</i> , 2019

Referencias tabla 1:

Combinación alélica idéntica para las cepas de referencia ¹GT1, ²PTG y ³CTG. Las muestras argentinas que son aislamientos se denominaron con "Tg" más el hospedador y únicamente con el nombre en inglés del hospedador las que son sólo ADN. Los aislamientos utilizados en esta tesis se marcan en negrita.

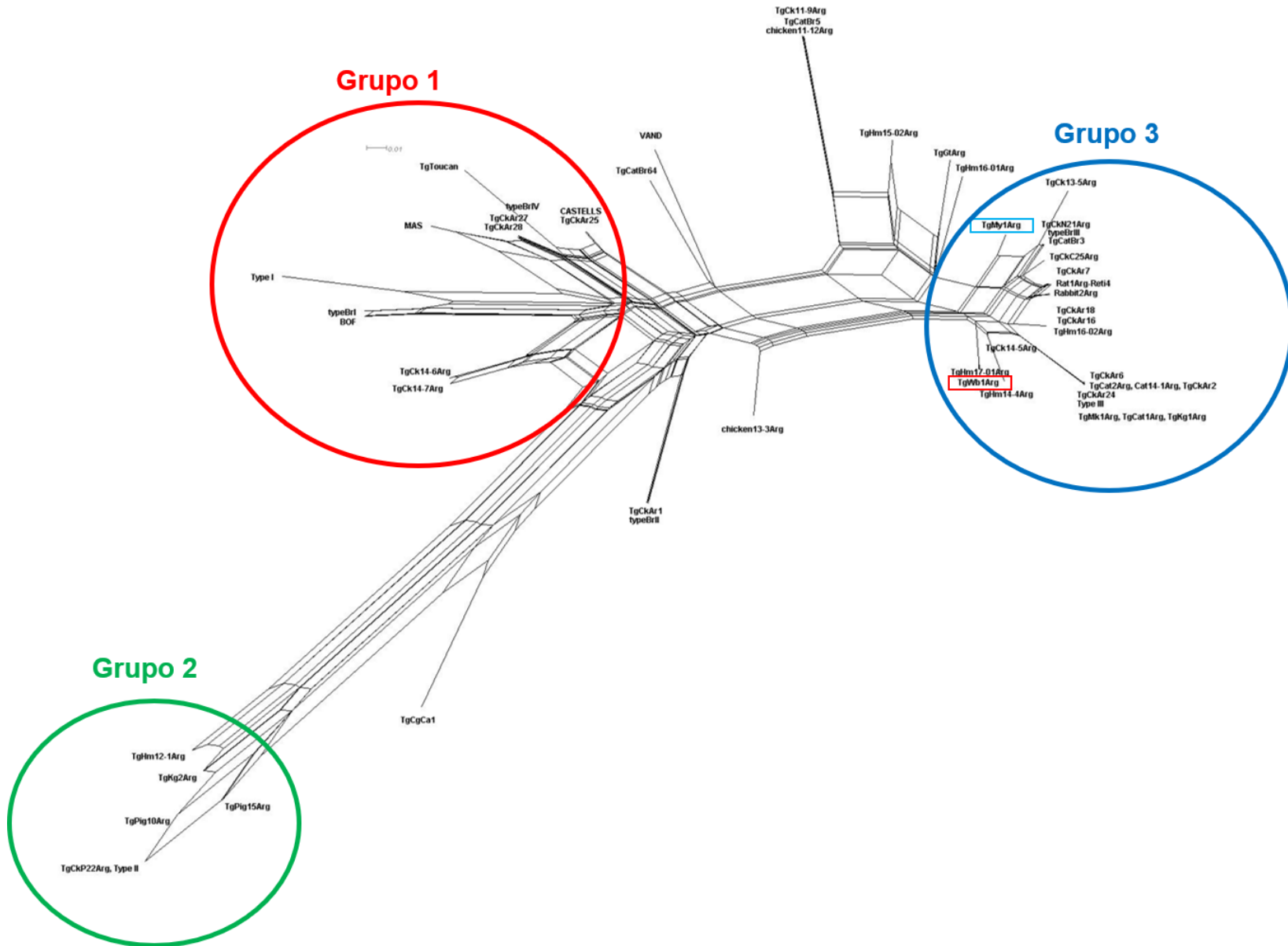


Figura 5. Análisis filogenético de muestras de ADN de *T. gondii* de Argentina y cepas de referencia (SplitsTree software v.4.16.4). Los grupos 1, 2 y 3 se encuentran englobados en círculos rojo, verde y azul respectivamente. Los aislamientos provenientes de *S. boliviensis* (TgMy1Arg) y *M. rufogriseus* (TgWb1Arg) se encuentran recuadrados en celeste y rojo, respectivamente.

5.2. OBJETIVO B

5.1.1. Invasión

Se seleccionaron 50 campos al azar por triplicado, en 3 ensayos independientes de 6 h de duración. No hubo diferencias significativas entre las réplicas a las 6 hpi ($p > 0,05$, prueba de Kruskal Wallis).

Se encontraron diferencias significativas en la capacidad de invasión entre las cepas de referencia y los aislamientos atípicos analizados, utilizando tanto los promedios / campo como la cantidad total de VPs ($p < 0.0001$, GLMM).

En las comparaciones múltiples de a pares utilizando los promedios / campo se detectó que la cepa ME49 presentó una invasión significativamente mayor al resto ($p < 0,05$); el aislamiento *TgSb* y las cepas VEG y RH presentaron valores de invasión intermedios sin diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$); el aislamiento *TgMr* presentó una invasión significativamente más baja que el resto ($p < 0,05$) (**Gráfico 1A**). En las comparaciones utilizando la cantidad total de VPs, las cepas y aislamientos se ubicaron en el mismo orden que en el análisis anterior, pero además se detectaron diferencias significativas entre los parásitos con invasión intermedia, siendo: *TgSb* > VEG > RH ($p < 0,05$) (**Gráfico 1B**).

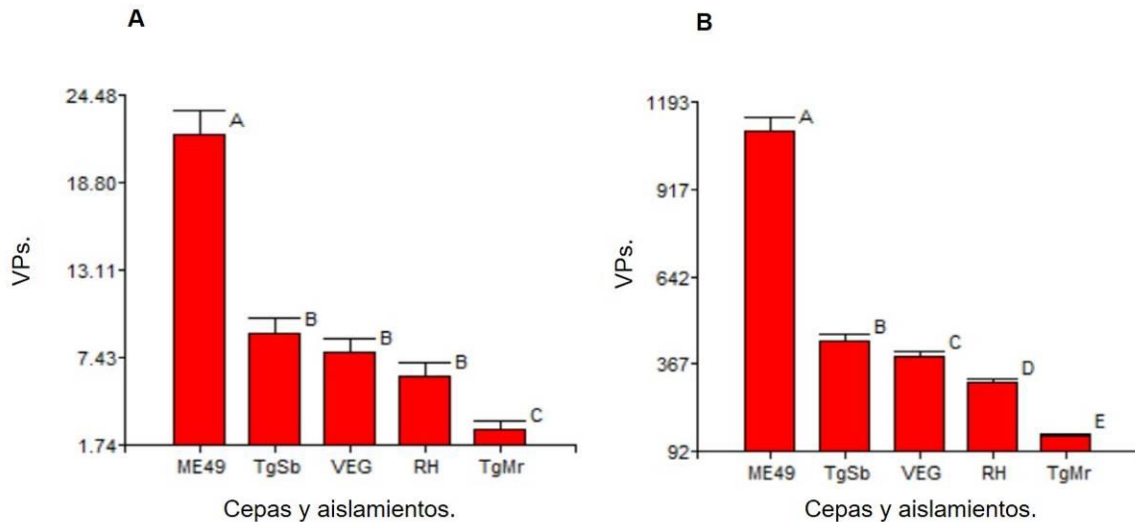


Gráfico 1. Comparación del promedio y de la cantidad total de VPs producidas por las cepas y aislamientos a las 6 hpi, (A y B, respectivamente). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$, LSD Fisher).

5.1.2. Replicación

Se seleccionaron 50 campos al azar por triplicado, en 6 ensayos independientes (3 ensayos de 6 h de duración y 3 ensayos de 18 h de duración). Se calculó la producción total de taquizoítos para cada cepa y aislamiento a las 6 hpi y 18 hpi, y la cantidad total de VPs de 1, 2, 4, 8, y 16 taquizoítos a las 18 hpi. Para la producción parasitaria se calculó la producción total a las 6 hpi y 18 hpi, pero se tuvieron en cuenta sólo aquellos taquizoítos que se dividieron (VPs con 2 o más taquizoítos) (**Figuras 6 y 7**).

No se detectaron diferencias significativas entre las réplicas de cada ensayo en el número total de taquizoítos en ninguno de los tiempos ($p > 0,05$, prueba de Kruskal Wallis).

Se encontraron diferencias muy significativas a ambos tiempos ($p < 0.0001$, GLMM). Tanto a las 6 hpi como a las 18 hpi, todas las cepas y aislamientos tuvieron diferencias significativas entre ellas ($p < 0,0001$). El **gráfico 2, A y B**, muestra el promedio de parásitos totales entre las réplicas de cada cepa y aislamiento a las 6 hpi y 18 hpi, respectivamente. La cepa clonal ME49, fue la que produjo mayor cantidad de parásitos (promedios 1243 y 1343), seguida del aislamiento *TgSb* (promedios 448 y 967). Las cepas clonales VEG y RH, se ubicaron a continuación (promedios 398 y 911 y 316 y 808, respectivamente). Último en cantidad de parásitos se encontró siempre el aislamiento *TgMr* (promedios 144 y 439). Se observó un aumento en cantidad de taquizoítos significativo en cada cepa y aislamiento a las 6 hpi y 18 hpi ($p < 0,05$), excepto ME49 quien no incrementó significativamente el número de taquizoítos en ambos tiempos ($p > 0,05$, promedios 1243 y 1343, respectivamente) (**Gráfico 3**).

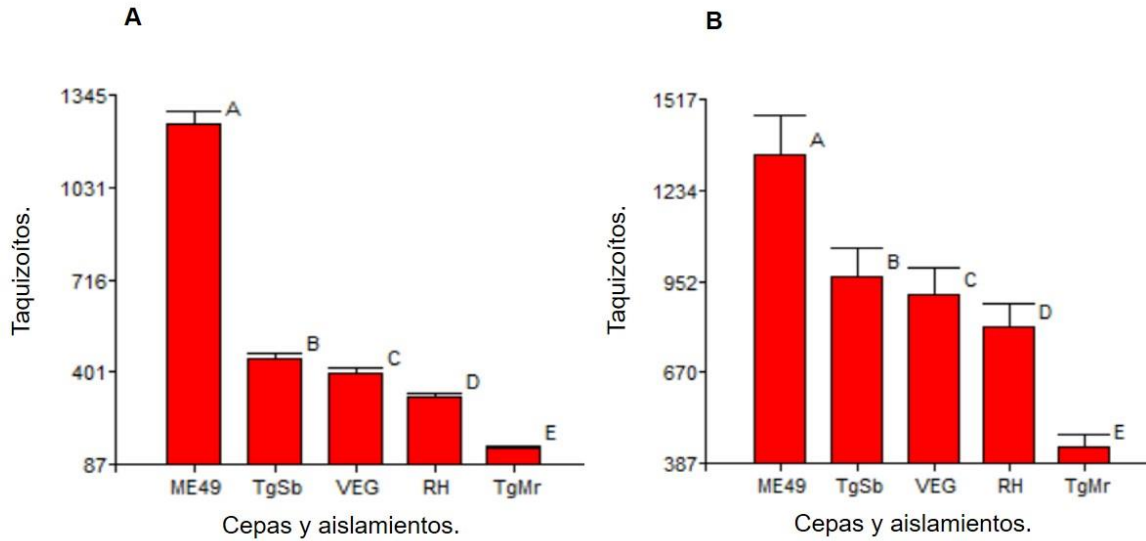


Gráfico 2. Cantidad total de parásitos contados para cada cepa y aislamiento a las 6 hpi y 18 hpi, (A y B, respectivamente). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$, LSD Fisher).

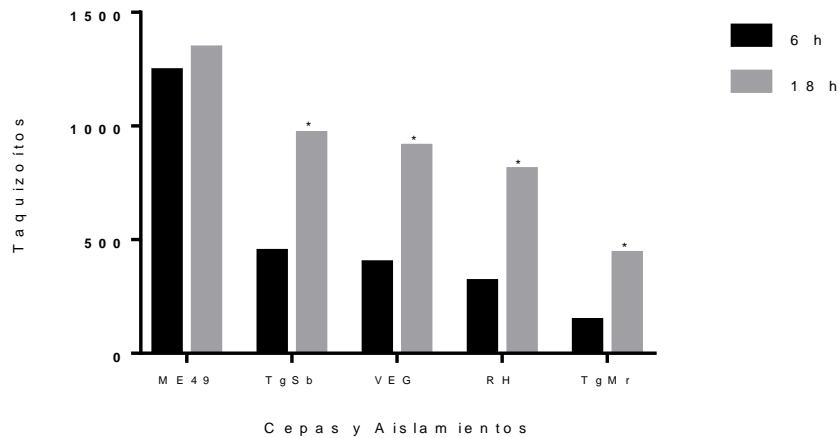
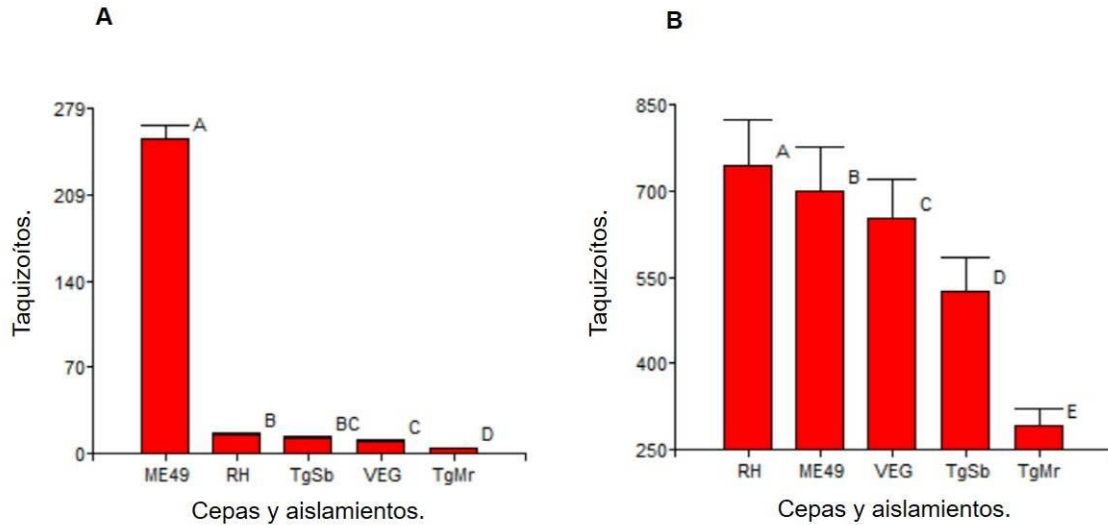


Gráfico 3. Comparación de la cantidad de parásitos promedio para cada cepa y aislamiento a las 6 hpi y 18 hpi, (negro y gris, respectivamente). * = indica diferencias significativas ($p < 0.05$, LSD Fisher).

Se detectaron diferencias significativas tanto a las 6 hpi como a las 18 hpi respecto a la producción total de parásitos ($p < 0.0001$, GLMM). A las 6 hpi, la cepa ME49 tuvo la mayor cantidad de taquizoítos divididos (promedio 254), presentando diferencias significativas con el resto ($p < 0,05$). Por el contrario, la cepa RH (promedio 16) y el aislamiento *TgSb* (promedio 12) difirieron del resto ($p < 0,05$), pero no entre sí ($p > 0,05$), al tener una cantidad mucho menor de taquizoítos divididos. La cepa clonal VEG (promedio 10) se diferenció del resto ($p < 0,05$), pero no de *TgSb* ($p > 0,05$). Por último, el aislamiento *TgMr* presentó el menor valor (promedio 4) diferenciándose de los demás ($p < 0,05$) (**Gráfico 4A**). A las 18 hpi, todas las cepas y aislamiento se diferenciaron significativamente entre sí ($p < 0,05$). La cepa RH (promedio 744) presentó la mayor producción de parásitos, a continuación y en orden decreciente, se ubicaron: la cepa ME49 (promedio 700), la cepa VEG (promedio 651), y los aislamientos *TgSb* (promedio 526) y *TgMr*, este último con una cantidad mucho menor al resto (promedio 290) (**Gráfico 4B**).



Gráficos 4. Producción de parásitos para cada cepa y aislamiento a las 6 hpi y 18 hpi, (A y B, respectivamente). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$, LSD Fisher).

Se encontraron diferencias significativas en la cantidad de VPs con diferente número de taquizoítos en su interior a las 18 hpi ($p < 0,0001$), que explican las diferencias en producción parasitaria analizadas en el párrafo anterior. Las diferencias se encontraron en la cantidad de VPs de 2, 4 y 8 parásitos ($p < 0,0001$). La cepa ME49 tuvo la mayor cantidad de VPs de 2 taquizoítos ($p < 0,05$) (**Gráfico 5A**). Respecto a las VPs de 4 taquizoítos, RH presentó la mayor cantidad diferenciándose del resto ($p < 0,05$) y la cepa ME49 se diferenció de todos ($p < 0,05$), con la menor cantidad (**Gráfico 5B**). Las cepas RH y VEG presentaron los valores más altos de VPs de 8 taquizoítos, diferenciándose del resto ($p < 0,05$). Por último, se agruparon *TgMr* y ME49 con los valores más bajos ($p < 0,05$)

(**Gráfico 5C**). Únicamente la cepa RH y el aislamiento *TgSb* llegaron a producir VPs de 16 taquizoítos sin diferencias significativas entre ellas ($p > 0,05$) (**Gráfico 5D**). En resumen, la cepa RH y el aislamiento *TgSb* mostraron alta capacidad de replicación (VPs de 16 tq. / 4 eventos de endodiogenia), mientras que la cepa VEG, ME49 y el aislamiento *TgMr* mostraron menor capacidad de replicación (VPs de 8 tq. / 3 eventos de endodiogenia). Los tiempos de duplicación fueron en promedio de 4,5 h aproximadamente para RH y *TgSb* (4 eventos de división / 18 h) y de 6 h aproximadamente para VEG, ME49 y *TgMr* (3 eventos de división / 18 h). Sin embargo, todos las cepas y aislamientos presentaron VPs con parásitos que no se replicaron o tuvieron menos eventos de endodiogenia.

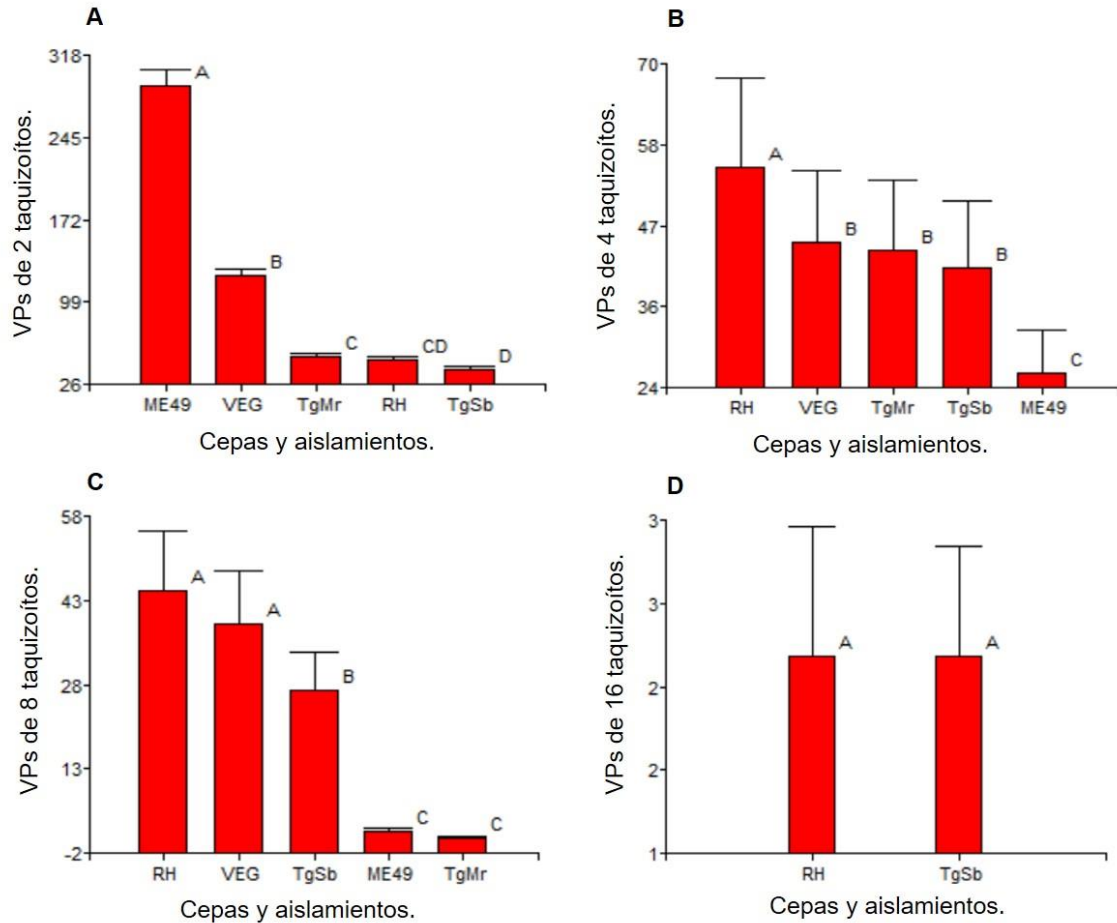


Gráfico 5. Comparación de la cantidad de VPs de 2, 4, 8 y 16 taquizoítos para todas las cepas y aislamientos a las 18 hpi, (A, B, C, y D, respectivamente). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$, LSD Fisher).

5.1.3. Índice de invasión – replicación *in vitro*

Se estableció un índice de relación entre la invasión (número total de VPs a las 6 h) y la replicación (producción total de parásitos a las 18 h) para cada cepa y aislamiento, utilizando la siguiente fórmula: (media invasión 6 h * media producción 18 h) / 1000.

Índice de invasión/producción:

ME49: 772

VEG: 254

TgSb: 231

RH: 229

TgMr: 41

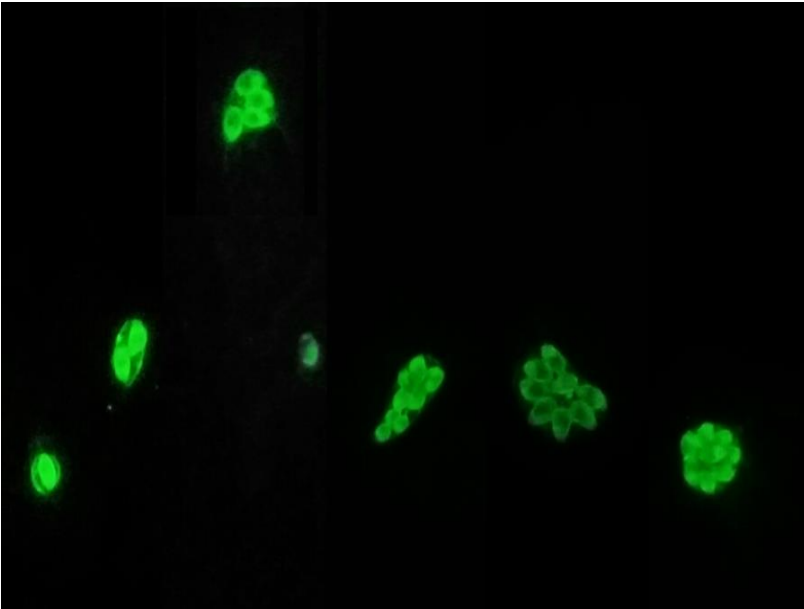


Figura 6. Inmunofluorescencia de *T. gondii* cepa RH. VPs de la cepa RH en microscopio de fluorescencia (200x) marcadas con verde (conjugado-Alexa 488), foto compaginada donde se pueden observar VPs de 1, 2, 4 y 8 taquizoítos.

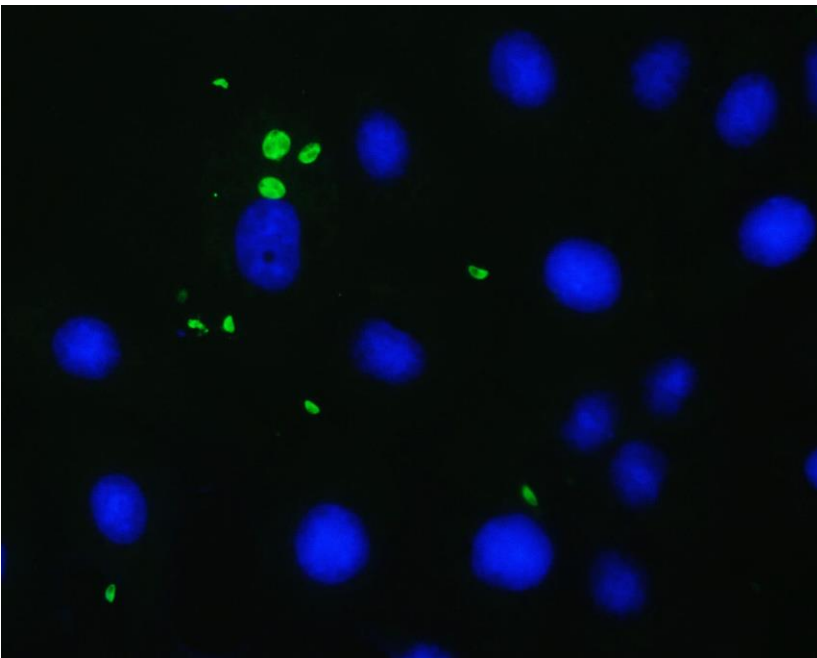


Figura 7. Inmunofluorescencia de *T. gondii* cepa ME49. VPs de la cepa ME49 en microscopio de fluorescencia (200x) marcadas con verde (conjugado-Alexa 488) y núcleos de las células VERO marcados con la tinción nuclear DAPI.

5.3. OBJETIVO C

5.3.1. Morbilidad

Se observaron signos clínicos compatibles con la infección por toxoplasmosis en todos los ratones inoculados (ambas dosis) con los aislamientos *TgSb* (grupo 1) y *TgMr* (grupo 2), por lo tanto, la tasa de morbilidad fue del 100 %. Por otro lado, no se observaron signos en todos los ratones inoculados con la cepa ME49 (grupo 3), VEG (grupo 4) y el grupo CN (grupo 5) (**Tabla 2**). Los signos incluyeron: cifosis, pelo hirsuto, conjuntivitis, decaimiento y taquipnea. El grupo 1 y 4 registraron pérdida de peso corporal ($n = 6/6$ y $n = 2/6$, respectivamente), aunque no se observaron diferencias significativas entre el peso al inicio del ensayo y el peso al sacrificio ($p > 0,05$, prueba U Mann-Whitney). En el grupo 2 los ratones inoculados con 10^3 taquizoítos presentaron signos clínicos un día antes que los inoculados con 10^2 taquizoítos.

5.3.2. Mortalidad

Todos los ratones que presentaron signología severa se sacrificaron de acuerdo con las recomendaciones del CICUAL y para evitar sufrimiento y alteraciones severas de los órganos. Por lo tanto, todos los animales con signos severos fueron considerados como parte del índice de mortalidad. La mortalidad fue del 100 % para los ratones inoculados con ambas dosis de *TgMr* y *TgSb*. Los ratones se sacrificaron a los 10 dpi (*TgSb*, ambas dosis) y a los a los 8 dpi los animales con 10^3 tq y 9 dpi los animales con 10^2 tq (*TgMr*). Las cepas de referencia ME49 y VEG no produjeron mortalidad en el tiempo del ensayo y se sacrificaron al final junto con el grupo CN (30 dpi) (**Tabla 2**).

Tabla 2. Resumen de las cepas y aislamientos utilizados y resultados.

Grupo	Morbilidad ^a (%)	Mortalidad ^b (%)	Sacrificio		Genotipo	Virulencia
			Por signos	Al término del ensayo		
1-TgSb	6/6 (100)	6/6 (100)	X ^c		# 163	alta
2-TgMr	6/6 (100)	6/6 (100)	X ^d		# 14	alta
3-ME49	0/6 (0)	0/6 (0)		X	# 3	baja
4-VEG	0/6 (0)	0/6 (0)		X	# 2	baja
5-CN	0/6 (0)	0/6 (0)		X	-	-

^a: cantidad de ratones con signos clínicos / cantidad de ratones inoculados.

^b: cantidad de ratones que se sacrificaron por signos graves / cantidad de ratones inoculados.

^c: sacrificio por presencia de signos a los 10 dpi.

^d: sacrificio por presencia de signos a los 8 dpi en los animales con 10³ tq y 9 dpi. en los animales con 10² tq.

5.3.3. Observaciones en la necropsia

Al momento de la necropsia se observó hepatomegalia en los ratones inoculados con *TgMr* ($n = 6/6$) y *TgSb* ($n = 6/6$) y esplenomegalia en los ratones inoculados con *TgMr* ($n = 6/6$), *TgSb* ($n = 6/6$), ME49 ($n = 6/6$) y VEG ($n = 6/6$) e hígado friable (*TgMr*, $n = 6/6$) (**Figuras 8 y 9**). En ningún caso se observaron diferencias entre las dosis de inoculación. En el grupo CN no se observaron cambios macroscópicos.



Figura 8. Esplenomegalia observada en la necropsia de ratón inoculado con la cepa VEG.

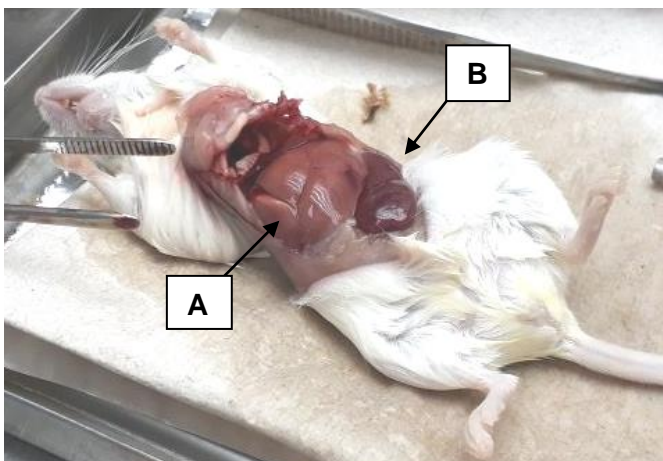


Figura 9. Hepatomegalia (A) y esplenomegalia (B) observada en la necropsia de un ratón inoculado con taquizoítos del aislamiento *TgSb*.

5.3.4. Histopatología

De los 30 SNC de ratones analizados, 30 % presentaron lesiones grado 1, 10 % grado 2 y 6,67 % grado 3, 55,33 % no presentó lesiones. No se observaron lesiones histopatológicas en los cortes de SNC del grupo 2 (*TgMr*), quienes fueron sacrificados en la etapa aguda de la infección (8 y 9 dpi). Sin embargo, el grupo 1 (*TgSb*), también sacrificado en la etapa aguda (10 dpi), presentó lesiones de grado 1 que incluyeron: meningoencefalitis no supurativa leve, escasa gliosis focal y escasa degeneración neuronal (**Figura 10A**). Por otro lado, los grupos 3 y 4, sacrificados al término del ensayo, presentaron diversos grados de lesión (1 a 3), siendo la cepa VEG la única en alcanzar el grado 3 de lesión con meningoencefalitis no supurativa y necrotizante multifocal y la única en la que se observaron quistes ($n = 4/6$) (**Figuras 10B, C y D**) (**Tabla 3**). En ningún grupo se observaron diferencias entre las dosis.

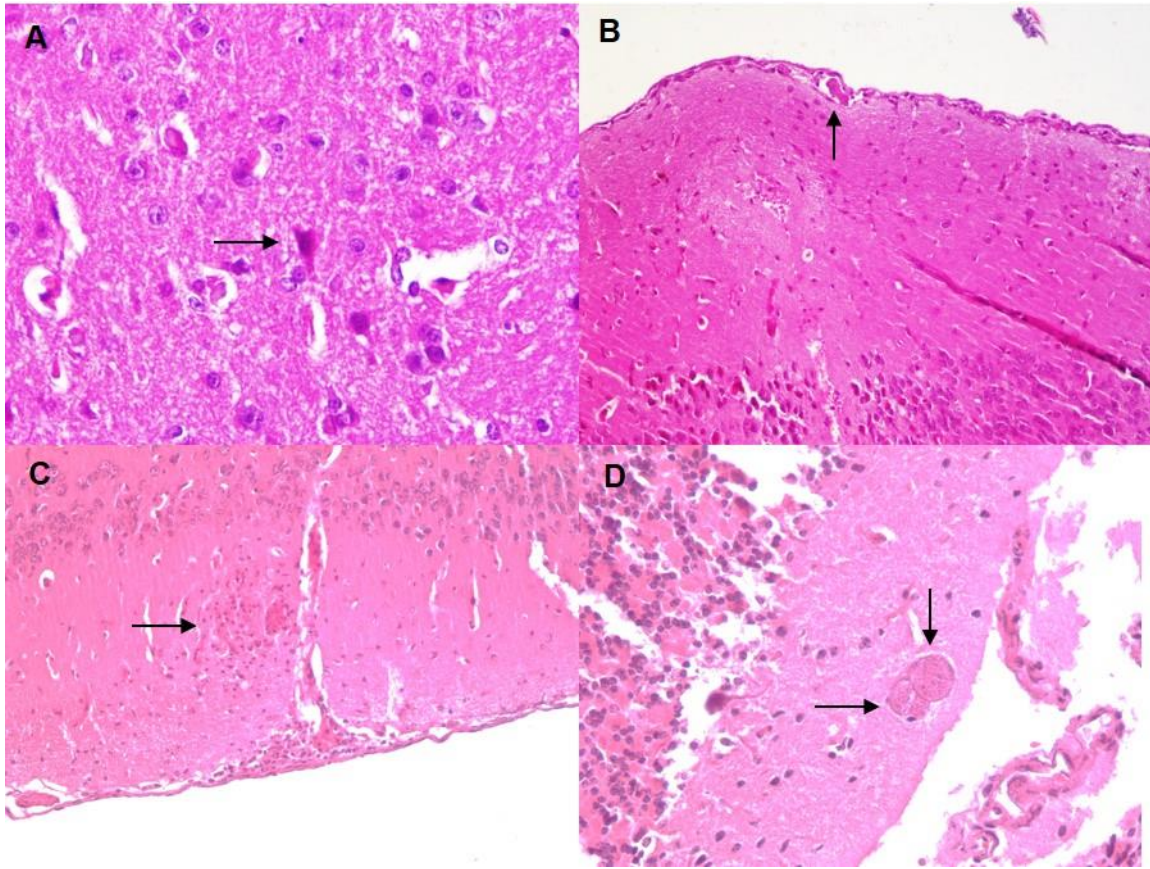


Figura 10. Lesiones en SNC. Lesión de grado 1: Necrosis neuronal (flecha) y satellitosis, 60x (**10A**, ratón inoculado con *TgMr*). Lesión de grado 2: leve meningitis no supurativa focal, 40x (**10B**, ratón inoculado con VEG). Lesión de grado 3: numerosas células mononucleares, gliosis focal, 20x (**10C**, ratón inoculado con VEG). Dos quistes grandes en cerebelo sin reacción inflamatoria, 40x (**10D**, ratón inoculado con VEG).

Tabla 3. Registro de la severidad de lesiones en los SNC, de la presencia de quistes de *T. gondii*, ADN en SNC y en pulmón de los 5 grupos experimentales.

Grupo	Lesiones ^a (%)	Severidad de la lesión			Quistes ^b (%)	ADN en SNC ^c (%)	ADN en pulmón ^d (%)
		Grado 1 leve (n)	Grado 2 moderado (n)	Grado 3 severo (n)			
1-TgSb	5/6 (83,3)	5 ^e	-	-	0/6 (0)	6/6 (100)	6/6 (100)
2-TgMr	0/6 (0)	-	-	-	0/6 (0)	6/6 (100)	6/6 (100)
3-ME49	5/6 (83,3)	4 ^f	1 ^g	-	0/6 (0)	5/6 (83,3)	2/6 (33,3)
4-VEG	4/6 (66,6)	-	2 ^h	2 ^h	4/6 (66,6)	5/6 (83,3)	5/6 (83,3)
5-CN	0/6 (0)	-	-	-	0/6 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)

^a: cantidad de ratones con lesiones en SNC / cantidad de ratones inoculados.

^b: cantidad de ratones con quistes de *T. gondii* en SNC / cantidad de ratones inoculados.

^c: cantidad de ratones con detección de ADN de *T. gondii* en SNC / cantidad de ratones inoculados.

^d: cantidad de ratones con detección de ADN de *T. gondii* en pulmón / cantidad de ratones inoculados.

^e: 3/5 dosis 10² tq; 2/5 dosis 10³ tq.

^f: 2/4 dosis 10² tq; 2/4 dosis 10³ tq.

^g: 1/1 dosis 10³ tq.

^h: 1/2 dosis 10² tq; 1/2 dosis 10³ tq.

5.3.5. Detección de ADN parasitario por PCR

La detección de ADN para *T. gondii* fue positiva tanto para SNC como para pulmón en todos los grupos, confirmando la infección. El grupo 1 y el grupo 2 fueron positivos en el 100 % de las muestras (6/6 para SNC y 6/6 para pulmón), incluso la intensidad del amplificado fue notoriamente mayor. El grupo 3 fue positivo en el 83,3 % de las muestras de SNC (5/6) y el 33,3 % en pulmón (2/6) mientras que el grupo 4 fue positivo en el 83,3 % de las muestras en ambos órganos (5/6) (**Tabla 3**).

5.3.6. Correlación y regresión *in vitro-in vivo*

Se correlacionaron los parámetros obtenidos *in vitro*: invasión (cantidad de VPs producidas a las 6 h) y replicación (producción de parásitos a las 18 h) con la mortalidad obtenida en este ensayo. No se observó correlación entre la invasión y la mortalidad (coeficiente de Pearson 0,19, $p > 0,05$), ni entre la replicación y la mortalidad (coeficiente de Pearson 0,04, $p > 0,05$). Las mismas variables (invasión y replicación) se tomaron como regresoras para realizar una regresión lineal. En ningún caso fue significativo ($p > 0,05$), excepto para *TgMr* (R^2 0,96), indicando que en un 96 % de ajuste el modelo explicaría que una baja producción parasitaria se asocia a una alta mortalidad y a menor tiempo de supervivencia en los ratones. El índice *in vitro* de invasión - replicación (apartado 5.1.3.) se relaciona inversamente con la mortalidad registrada en este ensayo: a menor valor del índice *in vitro* (aislamiento *TgMr* < cepa RH < aislamiento *TgSb*) alta mortalidad (alta virulencia) en modelo murino.

5.4. OBJETIVO D

5.4.1. ELISA para la detección de IFN- γ murino

Los esplenocitos sin estimular mostraron diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$, ANOVA). Los esplenocitos de ratones inoculados con las cepas clonales y los del grupo PBS se diferenciaron del resto ($p < 0.05$) pero no entre sí ($p > 0.05$), y presentaron valores de bajos a intermedios en producción de IFN- γ . Los sobrenadantes de esplenocitos de ratones inoculados con *TgMr* presentaron los valores más elevados de IFN- γ ($p < 0.05$) (**Gráfico 6A**). Los esplenocitos estimulados con Concanavalina A también mostraron diferencias entre los grupos ($p < 0.05$, ANOVA), aunque éstas fueron únicamente entre el grupo PBS (menor producción) y el resto ($p < 0.05$). Todos los datos del aislamiento *TgMr* excedieron los valores de la curva estándar del kit y por lo tanto quedaron excluidos del análisis de este apartado (**Gráfico 6B**).

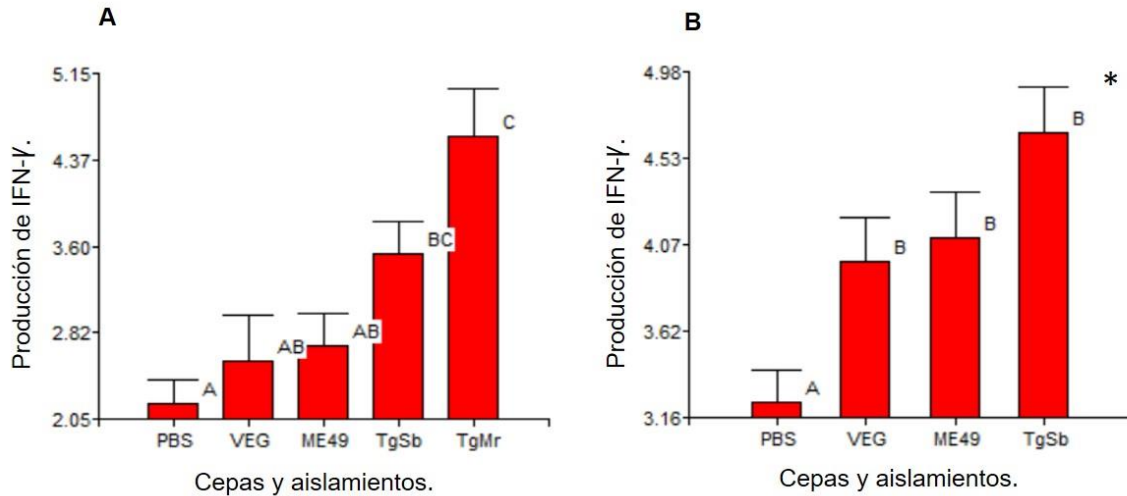
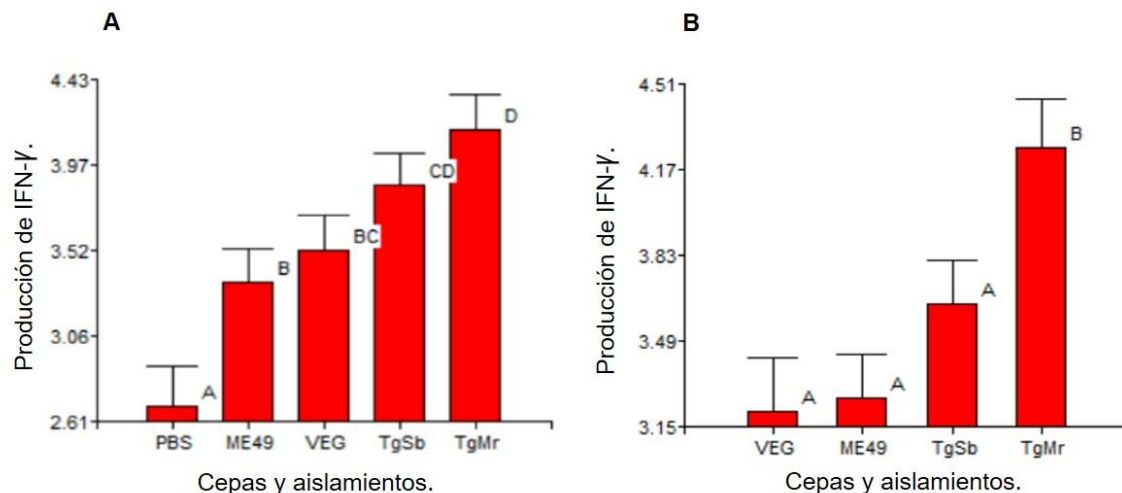


Gráfico 6. Producción de IFN- γ por esplenocitos de ratones inoculados con las diferentes cepas y aislamientos, sin estimular y estimulados con Concanavalina A (A y B, respectivamente). Los datos se encuentran transformados para poder aplicar un ANOVA con la transformación log10. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$). * **Nota:** los valores del tratamiento con Concanavalina A de los esplenocitos de los ratones infectados con *TgMr*, excedieron los valores de detección del kit comercial, y no se encuentran graficados.

Se encontraron diferencias significativas en la producción de IFN- γ entre los grupos cuando las células esplénicas se desafiaron con TLA de la cepa RH ($p < 0,05$, ANOVA). Los valores de IFN- γ del grupo control PBS (no infectados) fueron los más bajos (promedio 825 pg/ml) y se diferenciaron de los 4 grupos restantes ($p < 0,05$, LSD Fisher). Los valores del grupo 3 (cepa clonal ME49, promedio 2977,78 pg/ml) fueron mayores a los del grupo PBS, pero menor al resto, mostrando diferencias significativas con todos ($p < 0,05$), excepto con el grupo infectado con la cepa clonal VEG (promedio 3811,11 pg/ml) ($p > 0,05$). El grupo

TgSb (promedio 12542,59 pg/ml) presentó valores mayores a los del grupo ME49 ($p < 0,05$) y VEG ($p > 0,05$). Por último, el grupo *TgMr* fue el que registró la producción más alta de IFN- γ (promedio 17333.33 pg/ml) con diferencias significativas al resto de los grupos ($p < 0,05$), (**Gráfico 7A**).

Cuando se comparó la producción de IFN- γ al ser estimulados con TLA homólogos (mismas cepas y aislamientos), también se encontraron diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$, ANOVA). Estas diferencias se registraron entre los sobrenadantes de los grupos inoculados con las cepas VEG, ME49 y el aislamiento *TgSb* ($p > 0,05$, valores intermedios de producción y similares) respecto al grupo inoculado con el aislamiento *TgMr*, donde se registraron los valores más altos ($p < 0,05$) (**Gráfico 7B**).



Gráficos 7. Producción de IFN- γ por esplenocitos de ratones inoculados con las diferentes cepas y aislamientos, estimulados con TLA de RH y TLA homólogo (A y B, respectivamente). Los datos se encuentran transformados para poder aplicar un

ANOVA con la transformación log10, por eso no coinciden con los valores promedios reales citados en el texto. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En todos los tratamientos se registraron niveles crecientes y diferentes de producción de IFN- γ , siendo el grupo inoculado con *TgMr* el que registró niveles más altos, incluso excediendo el límite de detección del kit ante el estímulo con Concanavalina A. Al comparar la producción de IFN- γ de cada cepa y aislamiento estimulados con TLA homólogos y con TLA de RH, se observó que en el caso de los sobrenadantes de las cepas clonales VEG, ME49 y el aislamiento *TgSb* la producción fue menor frente al estímulo con sus propios TLA que frente al TLA de RH. Al contrario, los sobrenadantes del aislamiento *TgMr* frente al estímulo con sus propios TLA registraron valores iguales o mayores a los producidos con los TLA de RH. No obstante, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los grupos ($p > 0,05$). Además, se evaluaron las diferencias teniendo en cuenta las dosis de parásitos inoculados y éstas no fueron significativas ($p > 0,05$) **(Gráfico 8)**.

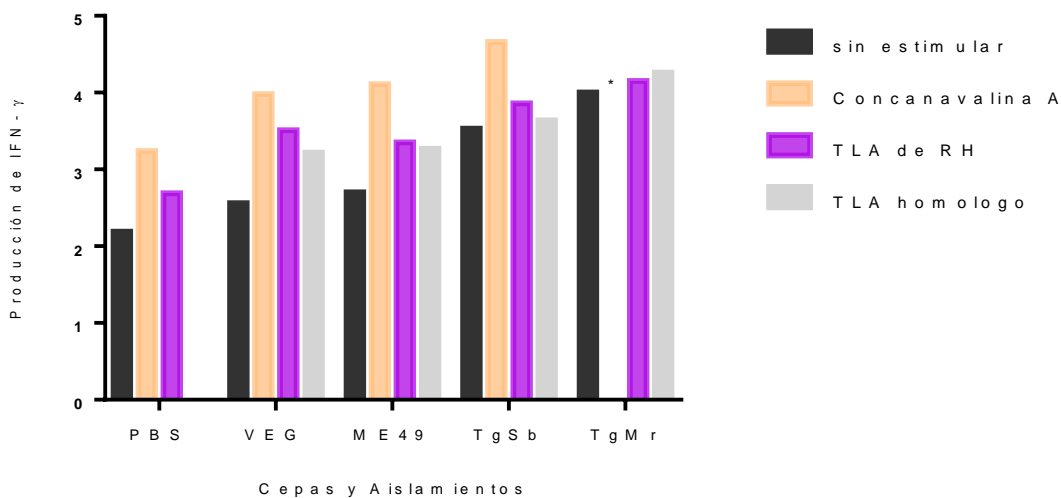


Gráfico 8. Comparación de la producción de IFN- γ por esplenocitos de ratones inoculados con cada cepa y aislamiento, ante los 4 tratamientos. Negro: sin estimular (Negativo); naranja: estimulados con Concanavalina A (Positivo); violeta: estimulados con TLA de RH; y gris: estimulados con TLA homólogos. * **Nota:** los valores del tratamiento con Concanavalina A de los esplenocitos de los ratones infectados con *TgMr*, excedieron los valores de detección del kit comercial, y no se encuentran graficados.

5.4.2. Respuesta inmune humoral: detección de IgG por la prueba de IFI

Todos los ratones inoculados fueron positivos a la prueba de IFI, excepto el grupo CN. Los títulos de anticuerpos fueron elevados en las cepas ME49 (título final 6400 *n* 4/6 y 3200 *n* 2/6) y VEG (título final 12800 *n* 6/6), mientras que estuvieron cerca del límite de corte para los aislamientos *TgMr* (título final 50 *n* 4/6 y 25 *n* 2/6) y *TgSb* (título final 100 *n* 4/6 y 50 *n* 2/6). Estas diferencias fueron significativas ($p < 0,05$, prueba de Kruskal Wallis). Las comparaciones por pares mostraron que los

ratones inoculados con *TgMr* presentaron los menores niveles de anticuerpos y los inoculados con VEG presentaron los niveles más altos ($p < 0,05$).

5.4.3. Regresión invasión/replicación-producción de IFN- γ

Se realizaron regresiones lineales utilizando como variable regresora la invasión (cantidad de VPs producidas) y la replicación (producción de parásitos) y como variable dependiente la producción de IFN- γ estimulado con TLA de RH.

Los resultados mostraron que ME49, VEG y *TgSb* no asociaron linealmente la producción de IFN- γ con la variación en la invasión (R^2 0,18, 0,05 y 0,01, respectivamente). Sin embargo, el aislamiento *TgMr* se asoció de modo directo (R^2 0,98), indicando que en un 98 % de ajuste el modelo explica que la baja invasión influye o se relaciona con la alta producción de IFN- γ .

Respecto a la variable regresora replicación, los resultados muestran que en ningún caso la producción de IFN- γ se explica con la variable regresora producción de parásitos (R^2 0,42, ME49; R^2 0,01, VEG; R^2 0,05, *TgMr*; R^2 0,15, *TgSb*).

6. DISCUSIÓN

Como parte de este trabajo se caracterizaron molecularmente por nPCR-RFLP 29 muestras de *T. gondii* provenientes de diversos hospedadores en Argentina, los genotipos se clasificaron acorde ToxoDB. Se identificaron 17 genotipos diferentes, la mayoría de estos genotipos se encuentran representados por un único aislamiento, lo que sugiere una alta diversidad poblacional para Argentina, al igual que en otros países de América Central y del Sur (Pena *et al.*, 2008; Rajendran *et al.*, 2012; Shwab *et al.*, 2014). Muestras que previamente se consideraban clonales fueron identificadas como “no clonales o atípicas” al completar el análisis para 10 marcadores moleculares (Moré *et al.*, 2010; Pardini *et al.*, 2011b; Pardini *et al.*, 2014), resaltando la importancia de realizar genotipificaciones completas para obtener resultados comparables (Su *et al.*, 2006). Además, 5 nuevos genotipos fueron identificados en este trabajo de tesis e incorporados a ToxoDB (# 283, # 284, # 285, # 286, y # 287).

Los aislamientos de *T. gondii* elegidos para esta tesis fueron obtenidos de animales de zoológico y se seleccionaron especialmente por su condición de atípicos caracterizados para 9 marcadores (Moré *et al.*, 2010; Pardini *et al.*, 2015). En este estudio se completó su caracterización molecular incorporando los marcadores SAG 1 y 5'3'SAG2 y se confirmó su condición de atípicos. El aislamiento proveniente de *S. boliviensis*, *TgSb*, fue identificado como genotipo # 163, el cual ha sido frecuentemente detectado en el sur de Brasil, donde se aisló de gallinas y un burro, considerado de virulencia intermedia en modelo ratón (Gennari *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2014). Además, en el noreste de Brasil, también

se aisló el genotipo # 163 de dos cerdos los que fueron caracterizados uno como no virulento y otro de virulencia alta, ambos en modelo murino (Rego *et al.*, 2017). El aislamiento proveniente de *M. rufogriseus*, *TgMr*, se identificó como genotipo # 14 al igual que otro aislamiento proveniente de humano (TgHm17-01Arg) de Argentina. Además, en el LAINPA se realizó el aislamiento y genotipificación del aislamiento TgHm17-02Arg, con genotipo # 14 *likely* (incompleto para el marcador 5'3'SAG2), proveniente de la provincia de Buenos Aires (Pardini *et al.*, 2019). El genotipo # 14 también fue aislado de gallinas de otros países Sudamericanos (Brasil, Colombia, Chile y Venezuela), perros y gatos de Brasil y Colombia y coyotes de USA (Dubey *et al.*, 2007a; Dubey *et al.*, 2007b; Dubey *et al.*, 2011; Pena *et al.*, 2008; Rajendran *et al.*, 2012), mostrando una amplia distribución. En Brasil, el aislamiento a partir de gatos generó una mortalidad del 100 % en modelo ratón considerándose altamente virulento (Pena *et al.*, 2008; Rajendran *et al.*, 2012). Del mismo modo, TgHm17-01Arg y TgHm17-02Arg fueron letales para los ratones utilizados para su aislamiento una semana posinfección (Pardini *et al.*, 2019). Es interesante que ambos aislamientos mencionados fueron obtenidos a partir de placentas de madres seropositivas a toxoplasmosis, en el caso de TgHm17-02Arg el recién nacido presentó signología severa asociada a toxoplasmosis congénita (Pardini *et al.*, 2019). Este genotipo, seleccionado para este estudio por su estatus de atípico aislado en Argentina, resultó ser frecuente en la región, más específicamente en la provincia de Buenos Aires, y aislado de casos madre-neonato con toxoplasmosis congénita, demostrando así su circulación en la población humana con consecuencias severas en la salud.

Además, como mencionamos anteriormente, se aisló de animales domésticos, silvestres y de zoológico (*TgMr*) de diversos países del continente americano.

Estudios previos demostraron que la toxoplasmosis en animales de zoológico puede ser severa y fatal en especies consideradas altamente susceptibles, principalmente en condiciones de estrés por cautiverio, incluso cuando son afectadas por los genotipos clonales II y III que demuestran baja virulencia en ratón (Dubey, 2010). Es probable que la mayoría de los animales se hayan infectado con cepas locales durante su estancia en el Zoológico de La Plata, ya que los aislamientos obtenidos se agruparon en la red filogenética con otras muestras originarias de la provincia de Buenos Aires (Basso *et al.*, 2009; Basso *et al.*, 2007; Moré *et al.*, 2010; Pardini *et al.*, 2015). Ambos aislamientos caracterizados en este trabajo se agruparon filogenéticamente con otras muestras con predominio de alelos tipo III y el tipo clonal III de referencia. Sin embargo, el genotipo # 163 (*TgSb*) se ubicó en el límite del grupo y relacionada con 2 aislamientos de *T. gondii* provenientes de gallinas: 1 de la provincia de Misiones (TgCk13-5Arg; # 116) y 1 de la provincia de Buenos Aires (TgCkN21Arg; # 8), y 2 cepas de Brasil (cepa de referencia BrIII y TgCatBr3; # 8). El genotipo # 14 (*TgMr*) comparte el nodo con dos aislamientos provenientes de humanos (TgHm17-01Arg y TgHm17-02Arg; # 14 y # 14 *likely*, respectivamente), se relacionó con 1 aislamiento de una gallina de la provincia de Misiones (TgCk14-5Arg; genotipo incompleto) y otro proveniente de humano de la provincia de Buenos Aires (TgHm14-4Arg; # 138). Ambos aislamientos usados en este estudio se ubicaron en sectores opuestos del grupo y relacionados estrechamente con diferentes aislamientos a pesar de que sólo difieren en el alelo para un marcador (C22-8).

Como ha sido indicado por otros autores (Huson & Bryant, 2006), es posible suponer un comportamiento fenotípico similar en aislamientos emparentados filogenéticamente. Por lo tanto, estudios de comportamiento biológico en aislamientos emparentados podrían ser parcialmente extrapolados. Como ha sido estudiado en otros aislamientos con las combinaciones alélicas # 163 y # 14, estos genotipos se expresarían con diferente virulencia, siendo más virulento el genotipo # 14 que el # 163, este último variando de baja a alta virulencia en modelo ratón (Gennari *et al.*, 2015; Pardini *et al.*, 2019; Pena *et al.*, 2008; Rajendran *et al.*, 2012; Rego *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2014).

En este trabajo se evaluó la capacidad de invasión y replicación de aislamientos de *T. gondii* genotipificados como atípicos y cepas de referencia en células VERO. A pesar de no existir consensos ni protocolos estandarizados para la evaluación de diferentes aislamientos de *T. gondii in vitro*, adoptamos una metodología similar a la utilizada por otros autores en la caracterización biológica del protozoo *N. caninum* y otro tipo de estudios sobre *T. gondii* (Alomar *et al.*, 2013; Dellarupe *et al.*, 2014b; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2011). Una vez optimizados los protocolos se llevaron adelante ensayos en réplicas que evidenciaron una elevada repetibilidad. Con estos ensayos optimizados las cepas clonales de referencia presentaron un comportamiento *in vitro* muy similar al descrito en otros trabajos o estudios con diferente metodología (Cañedo-Solares *et al.*, 2013; Radke *et al.*, 2001; Roos *et al.*, 1994; Saadatnia *et al.*, 2010). Como resultado, el tipo clonal I (RH = virulento) demostró baja capacidad de invasión pero alta capacidad de replicación, mientras que el tipo clonal II (ME49 = virulencia intermedia) evidenció alta capacidad de

invasión, pero baja capacidad de replicación (Cañedo-Solares *et al.*, 2013; Radke *et al.*, 2001; Roos *et al.*, 1994; Saadatnia *et al.*, 2010). Por otro lado, el tipo clonal III (VEG = no virulento), presentó invasión intermedia (menor que ME49 y mayor que RH) y baja replicación, similar a lo descrito previamente (Malkwitz *et al.*, 2018). El tiempo de duplicación de la cepa RH resultó levemente menor que el registrado en trabajos previos (Cañedo-Solares *et al.*, 2013; Radke *et al.*, 2001; Roos *et al.*, 1994), esto podría estar relacionado al pasaje previo en ratón y poca adaptación a la línea celular VERO (bajo pasaje) (Chatterton *et al.*, 2002). Esta alta velocidad de duplicación se vio reflejada en una altísima producción de taquizoítos, siendo la mayor de los parásitos estudiados y llegando a formar VPs de 16 tq a las 18 hpi (4 eventos de endodiogenia). Por el contrario, la cepa ME49 mostró resultados llamativos dado que se dividió activamente en las primeras hpi, y luego se mantuvo constante con pocas divisiones, teniendo la mayoría de sus VPs únicamente 2 tq. Esto demuestra un comportamiento más activo al inicio de la infección, con alta invasión y una alta velocidad de replicación, que luego se enlentece y prácticamente se detiene, lo cual es un resultado que contrasta con el reportado por otros estudios (Malkwitz *et al.*, 2018). Este tipo de multiplicación podría asociarse a su menor virulencia, dado que la replicación lenta luego de las 6 hpi permitiría una mayor sobrevivencia de las células infectadas y la instauración de una respuesta inmune efectiva. La cepa VEG, siempre mostró valores intermedios de producción parasitaria, siendo la de menor producción de las cepas clonales, lo que podría relacionarse también con su menor virulencia en modelos murinos (Dubremetz & Lebrun, 2012; Mordue *et al.*, 2001; Sibley & Boothroyd, 1992; Taniguchi *et al.*, 2018).

El aislamiento atípico *TgMr* (# 14) tuvo un comportamiento *in vitro* similar a la cepa RH respecto a su baja capacidad de invasión (incluso menor que RH), y además baja replicación teniendo divisiones cada 6 h aproximadamente, llegando a producir unas pocas VPs de 8 tq. Esto generó que su producción parasitaria fuera la menor de todas las cepas y aislamientos utilizados en el ensayo. Por el contrario, el aislamiento atípico *TgSb* (# 163) tuvo una capacidad de invasión intermedia, similar a la cepa VEG, y a su vez alta capacidad de replicación como la cepa RH llegando a producir VPs de 16 tq a las 18 hpi. Sin embargo, su producción parasitaria, al igual que *TgMr*, fue notoriamente menor a las tres cepas de referencia, indicando que posiblemente haya otros factores de virulencia no asociados directamente con la invasión y replicación. Lo que podría relacionarse con la virulencia, en base al modelo de la cepa virulenta RH, es la replicación y la “velocidad” de división, siendo los aislamientos RH y *TgSb* los que demostraron las mayores velocidades o menores tiempos de división. Si bien la capacidad y el mecanismo intrínseco de invasión por parte de cepas de referencia (mayormente RH) ha sido estudiado ampliamente (Contreras-Ochoa *et al.*, 2012; Dubey *et al.*, 1998; Dubremetz & Lebrun, 2012; Hu *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2004; Weiss & Kim, 2014), los resultados del presente trabajo indicarían que se relaciona negativamente con la virulencia, puesto que la cepa con mayor capacidad de invasión fue la cepa ME49 considerada de baja virulencia. Además, considerando los resultados de este y otros trabajos, la capacidad de invasión y posiblemente su mecanismo intrínseco, no sería totalmente extrapolables entre distintas cepas de *T. gondii*.

En este estudio los resultados indican que los aislamientos atípicos *TgMr* (# 14) y *TgSb* (# 163) tienen un comportamiento *in vitro* diferente a las cepas ME49 y VEG con semejanzas a la cepa clonal tipo I (RH) en su baja capacidad de invasión (*TgMr*) como en su alta capacidad de replicación (*TgSb*). Se ha postulado previamente que la virulencia de las cepas depende sobre todo de la capacidad de replicación (Cañedo-Solares *et al.*, 2013; Dubremetz & Lebrun, 2012; Lachenmaier *et al.*, 2011; Malkwitz *et al.*, 2018), sin embargo, en este trabajo la baja capacidad de invasión, resultó ser también un potencial indicador de virulencia. Ambas características (capacidad de invasión y capacidad de replicación) son utilizadas como rasgos fenotípicos de virulencia en *N. caninum* (Dellarupe *et al.*, 2014b) y fueron útiles en este trabajo para evaluar el comportamiento de *T. gondii*. Además, en este trabajo podemos ver que la baja producción parasitaria (cantidad de parásitos que se dividen post-ingreso a la célula) es una característica propia de los aislamientos atípicos estudiados en esta tesis, diferente al comportamiento *in vitro* de las cepas clonales. En resumen, los aislamientos atípicos de *T. gondii* provenientes de *S. boliviensis* y *M. rufogriseus* tienen un comportamiento *in vitro* distinto a las cepas clonales de referencia, mostrando características de invasión y replicación similares al tipo clonal virulento RH. Finalmente, se estableció un índice *in vitro* de invasión-replicación que se correlacionaría inversamente con la virulencia y mortalidad. Tanto la cepa RH como los dos aislamientos atípicos analizados en esta tesis presentaron los menores índices, dados principalmente por una baja invasión. Es posible sugerir que los menores índices invasión-replicación se asocian a una mayor virulencia, aunque un mayor número de cepas y aislamientos debieran ser evaluados para confirmar esta aseveración. Como se

menciona anteriormente, la replicación y la velocidad de duplicación serían los factores más importantes para evaluar en estudios *in vitro*; sin embargo, acorde al índice antes mencionado, otros factores son evidentemente necesarios para explicar la elevada virulencia de cepas y aislamientos con bajo índice invasión - replicación.

Sería importante comprobar el comportamiento *in vitro* de otros aislamientos atípicos relacionados filogenéticamente y/o incluso del mismo genotipo, pero aislados de otras especies, como así también identificar otros genes cuya expresión se asocie a la virulencia para así confirmar la utilidad de los ensayos aquí presentados como complementos/sustitutos de los ensayos en modelo murino. Asimismo, realizar los ensayos en diferentes líneas celulares utilizando protocolos optimizados como el descrito en esta tesis, permitirá comprobar diferencias en la susceptibilidad de células que provengan de especies diversas en las que el parásito tenga efectos más virulentos *in vivo* y elegir un protocolo estandarizado que permita establecer diferencias comparables entre los distintos estudios (Cañedo-Solares *et al.*, 2013; Contreras-Ochoa *et al.*, 2012; Cuellar *et al.*, 2012; Malkwitz *et al.*, 2018; Saadatnia *et al.*, 2010).

En este trabajo de tesis se evaluó la morbilidad y la mortalidad en modelo murino con los aislamientos atípicos *TgMr* y *TgSb* y las cepas de referencia tipo II y III. Como se mencionó en la introducción la virulencia de los distintos genotipos de *T. gondii* ha sido definida como la tasa de mortalidad en ratones (Sibley & Boothroyd, 1992). Ambos aislamientos atípicos presentaron una morbilidad expresada en signos clínicos severos del 100 %, aun utilizando dosis tan bajas como 10^2

taquizoítos. Es importante mencionar que, basados en las normas internacionales de bienestar animal, se decidió el punto final humanitario al momento que los ratones presentaron signos severos. Por consiguiente, la tasa de morbilidad coincide con la de mortalidad para ambos aislamientos. Como ha sido descrito en estudios previos utilizando aislamientos atípicos similares, la virulencia resultó mayor que los tipos clonales de referencia II y III (Gennari *et al.*, 2015; Pardini *et al.*, 2019; Pena *et al.*, 2008; Rajendran *et al.*, 2012; Rego *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2014). Al análisis *post-mortem* se confirmó la presencia de ADN en SNC y pulmón de todos los ratones infectados. Además, se observaron lesiones en SNC de nula (*TgMr*) o baja severidad (*TgSb*), posiblemente producto de la mortalidad en la etapa aguda de la infección (8 a 10 dpi), coincidiendo con otros trabajos (Djurkovic-Djakovic *et al.*, 2006; Mordue *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2015). Por otro lado, los ratones infectados con cepas clonales presentaron una morbimortalidad del 0 % considerándose no virulentos (Mordue *et al.*, 2001; Sibley & Boothroyd, 1992; Taniguchi *et al.*, 2018). La detección de ADN se redujo en SNC y aún más en pulmón, en especial para ME49 donde se detectó en 5/6 y 2/6, respectivamente, posiblemente debido a la ubicación preferencial en SNC de los estadios crónicos de la infección (Costa *et al.*, 2018; Dubey, 2010). La cepa VEG generó lesiones más severas en el SNC de los ratones e incluso fue la única en la que se visualizaron quistes (estadios crónicos de la infección del parásito) (Dubey, 2010). Es posible suponer que la multiplicación inicial de las cepas clonales es minimizada por el sistema inmune y que los protozoos se recluyen en células del SNC, dadas sus condiciones inmunológicas privilegiadas, y tienden a la cronicidad (Pinheiro *et al.*, 2015). Las lesiones observadas en el SNC de los animales

inoculados con ME49 y VEG no generaron signos evidentes lo que podría relacionarse con una respuesta celular que controla la multiplicación excesiva de los protozoos (Gazzinelli & Denkers, 2006; Miller *et al.*, 2009; Tait & Hunter, 2009). Del mismo modo, la ausencia de ADN en el tejido pulmonar de algunos ratones podría vincularse con la eliminación de los estadios de división asexual rápida por parte de una respuesta inmune efectiva (Costa *et al.*, 2018; Djurkovic-Djakovic *et al.*, 2006). Aunque no se presentaron signos observables en los ratones, ambas cepas generaron esplenomegalia, dando cuenta de una fuerte activación del sistema inmune adaptativo (Fuentes-Castro *et al.*, 2017; Mordue *et al.*, 2001). Sin embargo, la esplenomegalia fue detectada en todos los ratones inoculados con *T. gondii* en este trabajo (grupos 1 a 4), indicando que ésta importante activación del sistema inmune se genera ante todas las variables genotípicas del protozoo.

Es importante resaltar que las dosis de inoculación se seleccionaron en base a la bibliografía, al comportamiento observado en los ratones utilizados para el aislamiento y a los resultados de los ensayos *in vitro*. Aunque no se encontraron diferencias entre las dosis empleadas, el aislamiento *TgMr* ocasionó signología severa en los ratones, a menor tiempo que el aislamiento *TgSb*. Debido a ello, se propone utilizar dosis con mayor diferencia de carga parasitaria entre ellas, como fue sugerido por otros autores (Ferreira *et al.*, 2018; Saraf *et al.*, 2017), con el fin de detectar posibles diferencias ante distintas cargas parasitarias o dosis de infección. Estudios de este tipo (con rangos de dosis mayores y utilizando incluso 1 y 10 parásitos por ratón) podrían indicar que en casos de brotes de toxoplasmosis con signología severa no solo tendría que ver el genotipo/fenotipo del parásito y la susceptibilidad de la especie animal afectada, sino también la

carga inicial en la fuente de infección (Dubey, 2010; Pardini *et al.*, 2019; Saraf *et al.*, 2017).

A diferencia de lo descrito previamente para el aislamiento con el genotipo # 163 (Gennari *et al.*, 2015; Rego *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2014), nuestros resultados lo caracterizan como virulento, tanto en los ensayos *in vitro* como *in vivo* en concordancia con lo reportado por Rego *et al.*, (2017) en uno de sus aislamientos con éste genotipo. En lo relativo al aislamiento con el genotipo # 14 nuestros ensayos también lo caracterizan como virulento, y esto se corresponde con otros estudios (Pardini *et al.*, 2019; Pena *et al.*, 2008; Rajendran *et al.*, 2012).

Como último objetivo de esta tesis, se evaluó la inmunidad celular (IFN- γ) y humoral (IgG anti *T. gondii*), ambas a partir de los ratones utilizados en el ensayo de morbi-mortalidad. Como se mencionó en la introducción, las infecciones con *T. gondii* se caracterizan por una respuesta inmune celular del hospedador dada por una fuerte activación y predominio de linfocitos Th1, con la consecuente liberación de IL-12, FNT- α e IFN- γ (Gazzinelli & Denkers, 2006; Tait & Hunter, 2009). El IFN- γ es el principal mediador de la infección contra *T. gondii*, producido en primera instancia por las células NK de la inmunidad innata y luego por las células Th1 y TCD8⁺ de la inmunidad adaptativa, cuya producción es inducible (Fainboim & Geffner, 2011). La medición de la producción de estas citoquinas puede realizarse en muestras de suero o preferentemente en cultivos primarios de células esplénicas (linfoproliferación) o glóbulos blancos sanguíneos (Chen *et al.*, 2016; Rodgers *et al.*, 2005; Tao *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016).

Es importante mencionar que en el ensayo de linfoproliferación, el procesamiento de los bazos se realizó inmediatamente después del sacrificio, ya sea por signos (*TgMr* y *TgSb*) o al término del ensayo (ME49, VEG y CN), esto implicó tiempos de corte distintos para cada cepa y aislamiento debido a las diferencias en mortalidad que presentó cada grupo de ratones. Especialmente para el caso de los aislamientos estudiados que causaron signos severos (condicionaron el sacrificio humanitario de los animales) y por consiguiente resultó imposible trabajar con los mismos tiempos post infección para todas las cepas y aislamientos. Sin embargo, se aplicó un mismo protocolo de trabajo a todos los bazos, en el cual las células cultivadas fueron tratadas e incubadas por igual de acuerdo con trabajos de otros investigadores, y luego estimuladas con TLA, igualando las condiciones experimentales para la posterior medición del IFN- γ producido por células de la inmunidad adaptativa (Chen *et al.*, 2016; Rodgers *et al.*, 2005; Tao *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016). Por lo tanto, los resultados obtenidos para los controles positivos y negativos de cada ensayo permitieron validar las diferencias observadas entre las distintas cepas de referencia y aislamientos. Los esplenocitos de los animales del grupo CN, produjeron niveles basales mínimos de IFN- γ , ya sea con el estímulo con Concanavalina A como con el TLA de la cepa RH. Esto podría interpretarse como el nivel basal de producción inespecífica de IFN- γ . El estímulo con TLA de RH indujo la producción de niveles significativamente altos de IFN- γ en los sobrenadantes de los ratones infectados con los aislamientos *TgMr* y *TgSb*. En ambos casos, más allá de la mortalidad en la etapa aguda de la infección, los aislamientos indujeron en los ratones una respuesta inmune adaptativa con proliferación de linfocitos específicos orientados

hacia un perfil Th1 y una producción de IFN- γ mayor y estadísticamente significativa a la de las cepas clonales ME49 y VEG, similar a lo descrito por otros autores (Chen *et al.*, 2016; Sibley *et al.*, 2002; Tao *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016). La producción sumamente elevada de IFN- γ cuantificada en los sobrenadantes, en especial de *TgMr*, podría indicar una sobre producción de la citoquina asociada a la respuesta Th1. Además, en los sobrenadantes del grupo *TgMr* estimulados con Concanavalina A, los niveles de IFN- γ fueron tan elevados que excedieron el límite superior de detección del kit, indicando una mayor cantidad de linfocitos efectores con respecto a las cepas de referencia y al aislamiento *TgSb*. Estos resultados coinciden con los reportados por otros investigadores en dónde se detectaron niveles muy elevados de IFN- γ en infecciones letales (cepa RH), mientras que en infecciones no-letales los niveles de IFN- γ fueron moderados (cepa PTG) (Mordue *et al.*, 2001; Sibley *et al.*, 2002). Por consiguiente, la respuesta inmune adaptativa generada como protección y control de la multiplicación de estos aislamientos atípicos podría contribuir con la patogenia y el desenlace fatal de la toxoplasmosis (Mordue *et al.*, 2001; Sibley *et al.*, 2002; Weiss & Kim, 2014). Otra citoquina proinflamatoria que se reportó como relacionada con la patogenia de la toxoplasmosis al expresarse en niveles elevados fue la IL-18, que podría tenerse en cuenta en la evaluación de futuros ensayos (Sibley *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2018).

Rodgers *et al.*, en el 2005, sugieren que el genotipo de *T. gondii* utilizado para preparar el TLA afecta las citoquinas producidas por los linfocitos *in vitro* (Rodgers *et al.*, 2005). Es por ello, que se propuso agregar un cuarto tratamiento a este ensayo y desafiar los cultivos de esplenocitos con su TLA homólogo. El único

desafío con TLA homólogo que produjo una respuesta diferente fue el TLA de *TgMr*, produciendo niveles más elevados en los cultivos comparado al desafío con TLA de RH. Es probable que el aislamiento *TgMr* exprese antígenos diferentes reconocidos como factores de virulencia, como por ejemplo alguna proteína secretada por las roptrias, lo que induciría en los animales infectados la sobre producción de IFN- γ (Dubremetz & Lebrun, 2012; Rodgers *et al.*, 2005; Shwab *et al.*, 2016).

En resumen, la sobre producción de IFN- γ asociada a la respuesta Th1 en ratones infectados con *TgMr* y *TgSb* podría relacionarse con la expresión/secreción de moduladores de la respuesta inmune por parte de éstos protozoos y se vincularía con la mayor virulencia detectada en el modelo *in vivo* (Dubremetz & Lebrun, 2012; Rodgers *et al.*, 2005; Sibley *et al.*, 2002).

Respecto a la IL-12, no fue posible su medición en este trabajo. Pero de acuerdo con los resultados obtenidos para el IFN- γ , podríamos pensar que sus valores hubieran resultado elevados en las infecciones con los aislamientos atípicos, mostrando también una sobre producción. Sin embargo, en estudios experimentales no se han registrado diferencias entre infecciones letales y no letales como con el IFN- γ (Mordue *et al.*, 2001; Sibley *et al.*, 2002).

La inmunidad humoral contra *T. gondii* es importante, aunque no sería activa contra estadíos intracelulares, si es útil para controlar estadíos libres especialmente durante la parasitemia (Fainboim & Geffner, 2011; Miller *et al.*, 2009). En esta tesis se propuso realizar la medición de IL- 4 dado que promueve el desarrollo de la respuesta inmune humoral a través de la inducción de la expansión clonal y diferenciación de linfocitos B específicos (Fainboim & Geffner,

2011; Miller *et al.*, 2009; Tao *et al.*, 2013). Sin embargo, y debido a los inconvenientes ya mencionados, se decidió medir por la técnica de IFI la concentración de anticuerpos murinos IgG específicos anti *T. gondii* en suero, desde la dilución 1/25 hasta título final. Del mismo modo que en los resultados previos, se debe resaltar que la medición de la inmunidad humoral se realizó con el suero obtenido del sangrado *post-mortem*, esto implica que los tiempos de obtención fueron diferentes para cada grupo de ratones de acuerdo con los tiempos en que fueron sacrificados. Por lo tanto, los títulos de IgG obtenidos en este ensayo reflejan, sobre todo, los estadios agudos y crónicos de la infección por *T. gondii* (Dubey, 2010). En ese sentido, cabe aclarar también, que se consideran ratones con infección crónica aquellos que superan los 20 dpi (Dubey, 2010). Los resultados de este ensayo muestran una elevada inmunidad humoral en los ratones infectados con las cepas clonales que alcanzaron el término del ensayo (30 dpi, infección crónica) y títulos cercanos al límite de detección en los sueros de los ratones infectados con los aislamientos atípicos (8-10 dpi, infección aguda). En los primeros (infección crónica), las diferencias de 1 o 2 títulos registradas entre ellos se deben a una mayor o menor activación de la respuesta por anticuerpos, siendo VEG la cepa que generó mayores títulos de anticuerpos. Mientras que, en los últimos (infección aguda), se detectó una diferencia de 1 a 2 títulos entre los grupos que podría asociarse con una diferencia de 1 a 2 días en mortalidad. Así pues, para realizar comparaciones respecto a si fue mayor o menor la respuesta humoral generada contra *T. gondii* entre los 4 grupos infectados, se propone sangrar a tiempo fijo a todos los animales del ensayo como en trabajos de otros investigadores (Chen *et al.*, 2016; Tao *et al.*, 2013).

La IL-4 estimula el perfil de respuesta Th2, y es antagonista del perfil Th1 (Tao *et al.*, 2013). Sería de esperar que los niveles de IL-4 sean bajos en los ratones infectados con los genotipos atípicos, quedando de manifiesto que el perfil de respuesta generado por *T. gondii* en estos ratones fue predominantemente Th1 (Chen *et al.*, 2016; Tao *et al.*, 2013). Por el contrario, en los animales con infección crónica es posible suponer que la respuesta inmune fue modulada, resultando en menores niveles de IFN- γ y elevados niveles de anticuerpos. Este tipo de modulación podría relacionarse con la virulencia, de modo que los genotipos virulentos desencadenan una respuesta esencialmente Th1 con sobre producción de IFN- γ , los poco virulentos modularían la respuesta inmune logrando un equilibrio con el hospedador, sin el desarrollo de signos relacionados al exceso de IFN- γ y permitiendo la cronicidad de la infección (Mordue *et al.*, 2001; Sibley *et al.*, 2002).

Analizando el conjunto de resultados de esta tesis podemos inferir que el agrupamiento en la red filogenética de los aislamientos *TgSb* y *TgMr* en cercanías del tipo clonal III, no se traduce en similitudes fenotípicas con éste. La presencia de 7/10 (*TgSb*) y 8/10 alelos tipo III (*TgMr*) no demostró tener relación directa con la virulencia *in vivo*, dado que en el ensayo en ratones los aislamientos fueron letales como la cepa RH. Estos pocos marcadores con alelos diferentes hacen que las muestras se ubiquen lejos del tipo clonal III de referencia y, como ya mencionamos, en los “bordes” del grupo. La ubicación de estos genotipos en la red filogenética parecería ser un camino de transición justo en el límite del grupo 3, hacia otros genotipos con media a alta virulencia. El genotipo # 163 de *TgSb* se

ubicó solo en una única rama de la red, cercano al genotipo # 116 que no fue virulento cuando se aisló en ratones según Pardini *et al.*, 2016 (aislamiento TgCk13-5Arg) y al genotipo # 8 que tampoco fue virulento en modelo murino según los estudios de Pena *et al.*, (cepa BrIII y TgCatBr3). Como ya mencionamos, otros autores han definido al genotipo # 163 como de virulencia baja a intermedia (Gennari *et al.*, 2015; Rego *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2014), y al igual que nosotros como de alta virulencia (Rego *et al.*, 2017). El genotipo # 14 de *TgMr* coincide en su alta virulencia con los aislamientos que comparten su nodo (TgHm17-01Arg y TgHm17-02Arg; # 14 y # 14 *likely*, respectivamente) y con lo reportado por otros autores para ese mismo genotipo (Pena *et al.*, 2008; Rajendran *et al.*, 2012). Próximo a éste, se encuentra el genotipo # 138 reportado como de baja virulencia en ratones según Pardini *et al.*, 2019, (aislamiento TgHm14-4Arg). Nuevamente, se genera una transición desde genotipos de baja (# 138) a alta virulencia (# 14) hacia el extremo del grupo. ¿Acaso los genes que pertenecen a los marcadores con alelos diferentes (SAG1, C29-2 y C22-8) codifican para proteínas de alta virulencia? En un principio se pensó que SAG1 era un factor de virulencia por ser una proteína inmunodominante, pero actualmente se sabe que no es esencial en la morbi-mortalidad (Dubremetz & Lebrun, 2012). Los marcadores C29-2 y C22-8 son secuencias genómicas aleatorias que no codifican para ningún gen conocido hasta el momento, y se supone que no tendrían un efecto sobre la virulencia (comunicación personal Chunlei Su).

Los aislamientos estudiados filogenéticamente en esta tesis se asociaron al tipo clonal III por la presencia de varios marcadores tipo III, y a su vez se asociaron

entre ellos. Sin embargo, fueron pocas las similitudes fenotípicas compartidas con la cepa VEG (similar invasión con el aislamiento *TgSb*). Esto se relaciona directamente con que la distancia que separa ambos aislamientos de la cepa VEG en la red es mucho mayor que la distancia que separa a los aislamientos entre ellos. Esto se ve reflejado en que han sido más parecidos *in vivo*, *in vitro* y en la producción de IFN- γ los aislamientos entre sí que con la cepa VEG. Hay que recordar que la red filogenética representa múltiples nodos de filogenia simultáneamente y las reticulaciones dan cuenta de posibles áreas de conflicto entre los datos (Huson & Bryant, 2006; Morrison, 2005; Pena *et al.*, 2008). Es por ello que, si tuviéramos más marcadores moleculares, quizás estos aislamientos presentarían una ubicación diferente.

Si asumimos los estudios de virulencia como comparables, parecería que el mismo genotipo podría presentar diferencias en virulencia y por consiguiente no sería 100 % predecible el comportamiento biológico a partir de los marcadores moleculares usados en esta tesis (Rego *et al.*, 2017). Posiblemente, otros genes y su expresión diferencial tengan una alta significancia en la virulencia de los aislamientos de *T. gondii* aquí estudiados.

La correlación *in vitro* – *in vivo* planteada en esta tesis, entre la invasión y la producción parasitaria en células con la morbi-mortalidad en ratones, parecería no indicar una clara asociación entre estos dos modelos, quizás condicionada por la respuesta inmune del hospedador en el modelo *in vivo*. La invasión baja de *TgMr* (similar al tipo virulento RH *in vitro*), la invasión elevada de *TgSb* (similar al tipo no virulento VEG *in vitro*) y la baja producción parasitaria de ambos aislamientos

atípicos *in vitro* (diferente a las cepas clonales) se manifestaron con una morbimortalidad del 100 % *in vivo*. Posiblemente, estemos desconociendo algún otro factor que influya sobre la virulencia y que no fue medido en el ensayo *in vitro* como es la expresión de las proteínas ROP (Dubremetz & Lebrun, 2012; El Hajj *et al.*, 2007; Fleckenstein *et al.*, 2012; Saeij *et al.*, 2006; Shwab *et al.*, 2016). Estas proteínas son liberadas al citosol de la célula hospedadora e inhiben la acción de las IRG (IFN- γ - *inducible GTPases*) producidas por el hospedador en defensa contra el parásito (Fleckenstein *et al.*, 2012). Actualmente, se sabe que la combinación alélica de los genes que codifican para las proteínas ROP 18 y ROP 5 de *T. gondii* explicarían las diferencias en virulencia que se registran en ratones dadas por diversas cepas y aislamientos (Melo *et al.*, 2011; Shwab *et al.*, 2016). Dependiendo del alelo, la combinación ROP 18 / ROP 5 puede actuar como virulenta o no (Shwab *et al.*, 2016). Los hallazgos demuestran que esto se aplica a todo tipo de genotipos (clonales y no clonales) y puede ser una excelente herramienta para determinar la virulencia de aislamientos desconocidos (Shwab *et al.*, 2016). Rego *et al.*, (2017), analizan la combinación de alelos para ROP 18 / ROP 5 presentes en los 2 aislamientos de *T. gondii* provenientes de cerdos de genotipo # 163 e identificados uno como virulento y otro como no virulento, siendo el resultado 4 / 3 y 3 / 3, respectivamente (Rego *et al.*, 2017; Shwab *et al.*, 2016). Posiblemente, los aislamientos atípicos usados en esta tesis presenten un perfil alélico de ROP 18 / ROP 5 que se vincule a su alta virulencia. De modo similar, Silva *et al.*, realizaron la PCR-RFLP para el locus CS3 del cromosoma VIIa de *T. gondii* a partir de aislamientos de animales y humanos del estado de Minas Gerais (Silva *et al.*, 2014). Se demostró que los aislamientos con los alelos tipo I y II son

de alta virulencia en modelo murino, mientras que el alelo tipo III es de baja virulencia. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos (Howe *et al.*, 1997; Howe & Sibley, 1995) y permiten confirmar que CS3 es un marcador útil para predecir la virulencia de *T. gondii* en los aislamientos “atípicos” provenientes de Brasil (Silva *et al.*, 2014). Uno de los aislamientos de *T. gondii* descritos en el trabajo de Silva *et al.*, 2014, se realizó a partir de una gallina y fue de genotipo # 163, la PCR-RFLP para el gen CS3 lo identificó con el alelo tipo III no virulento. Del mismo modo, Rego *et al.*, 2017, también analizaron el gen CS3 en los aislamientos virulento y no virulento antes mencionados e identificaron los alelos II y III, respectivamente. Estos resultados podrían indicar que nuestro aislamiento (*TgSb*, # 163) podría presentar el alelo virulento para este gen. Otros autores también han reportado diferencias dentro de genotipos particulares, por ejemplo, con *Chinese 1* (ToxoDB # 9) y con cepas clonales tipo III (Cheng *et al.*, 2015; Taniguchi *et al.*, 2018). Sería importante en próximos estudios agregar el análisis de los alelos de ROP 18, ROP 5 y CS3 para completar la caracterización genética de los aislamientos *TgSb* y *TgMr* y otros obtenidos en Argentina. También sería interesante medir *in vitro* la expresión de las proteínas derivadas de ROP 18 y ROP 5 en comparación con la de los genotipos clonales.

Como enfatizamos previamente, habría que recordar que la asociación genotipo de *T. gondii*-hospedador (especie y susceptibilidad individual) es la que en última instancia termina definiendo el resultado de la infección (Dubey, 2010), en este caso se trabajó con la línea celular VERO (células epiteliales de mono *Chlorocebus* sp.) *in vitro* y con ratones Swiss (*Mus musculus*) *in vivo*, esta relación

puede haber influido también en el resultado por lo que el ensayo *in vitro* se expresa como un predictor parcial del ensayo *in vivo*.

Por lo dicho anteriormente, se propone el uso de estudios *in vitro* previo al estudio *in vivo* para minimizar la utilización de animales en estudios de caracterización biológica de aislamientos de *T. gondii*. El establecimiento de un índice *in vitro* de invasión-replicación podría ser de utilidad para predecir virulencia de modo indirecto: bajos valores del índice se asocian a alta virulencia. La evaluación del perfil de citoquinas preponderante permite asociar a la respuesta Th1 con sobre producción de IFN- γ con los genotipos virulentos.

CONCLUSIONES:

- Argentina posee una alta diversidad poblacional de *T. gondii* al igual que otros países de América Central y del Sur. Se identificaron 17 genotipos diferentes, incluyendo 5 nuevos genotipos incorporados a ToxoDB.
- Los aislamientos *TgSb* y *TgMr* se asociaron en la red filogenética al tipo clonal III por la presencia de varios marcadores tipo III, y a su vez se asociaron entre ellos por la similitud de sus genotipos (sólo difieren en el marcador C22-8). La distancia que separó ambos aislamientos de la cepa VEG en la red fue mucho mayor que la distancia que separó a los aislamientos entre sí. Las similitudes fenotípicas fueron mayores entre *TgSb* y *TgMr* (*in vivo*, *in vitro* y en la producción de IFN- γ) que con la cepa VEG. Entonces, cuanto más cercanos se ubican los genotipos en la red filogenética mayor similitud sería esperable en sus rasgos fenotípicos.
- La hipótesis planteada al comienzo de este trabajo proponía para los aislamientos atípicos *TgMr* (# 14) y *TgSb* (# 163) una invasión y replicación *in vitro* mayores que los tipos clonales de referencia II y III. Dado que para el aislamiento *TgMr* la invasión fue baja, similar a la cepa de referencia tipo I, y para *TgSb* fue intermedia entre las cepas de referencia II y III, no sería válida la aseveración respecto a la invasión. Por otro lado, aunque *TgSb* llegó a producir hasta 16 tq / VP en 18 h y *TgMr* llegó a producir 8 tq / VP, la producción de parásitos fue menor en ambos aislamientos en relación con las cepas tipo II y III (incluso a la cepa tipo I), rechazando la hipótesis. Una baja capacidad de

invasión y alta capacidad y velocidad de replicación *in vitro* serían características que se asocian a una alta virulencia.

- La morbilidad y la mortalidad en modelo murino de *TgMr* y *TgSb* son superiores a las cepas de referencia II y III, incluso a dosis tan bajas como 10^2 parásitos.
- La producción de IFN- γ medida en los cultivos de esplenocitos murinos desafiados con TLA de RH provenientes de los ratones infectados con aislamientos atípicos *TgSb* y *TgMr*, fue significativamente mayor a la producción medida en iguales condiciones de los ratones infectados con las cepas clonales VEG y ME49. En conclusión, la respuesta mediada por células Th1 generó una sobre producción de IFN- γ asociada a los genotipos atípicos virulentos.
- La correlación *in vitro* – *in vivo* planteada en esta tesis, no asoció de modo directo ambos modelos, quizás condicionada por la respuesta inmune del hospedador en el modelo *in vivo*. El ensayo *in vitro* resultó un predictor parcial del ensayo *in vivo*, posiblemente haya otros factores de virulencia no asociados directamente con la invasión y replicación actuando en simultáneo, como es la expresión de las proteínas ROP.
- Se propone el uso de estudios *in vitro* previo al estudio *in vivo* para minimizar la utilización de animales en estudios de caracterización de aislamientos de *T. gondii*.
- El índice *in vitro* de invasión-replicación se asocia inversamente con la mortalidad en modelo murino, y se propone como predictor de virulencia.

- Mismos genotipos acorde ToxoDB, pero aislados en diferentes regiones geográficas pueden ser fenotípicamente diferentes. El genotipo descrito acorde Su *et al.*, 2006, no es capaz de predecir la virulencia por completo. Futuros estudios para comprobar los alelos de ROP 18, ROP 5 y CS3 serían necesarios para completar la caracterización genética de los aislamientos *TgSb* y *TgMr*.

7. ANEXO TÉCNICAS

7.1. OBJETIVO A

7.1.1. PCR anidada y corte con enzimas de restricción.

Se especifican las diferencias entre los protocolos de ambos laboratorios donde se realizaron las genotipificaciones.

7.1.1.1. Multiplex PCR

LAINPA:

1. Para realizar la genotipificación de *T. gondii* se realizó el análisis de los aislamientos por PCR-RFLP con dos grupos de marcadores denominados nuevos y viejos.

Marcadores nuevos: C22-8, L358, PK1, C29-2 y Apico,

Marcadores viejos: alt. SAG2, BTUB, GRA6 y SAG3.

Se realizaron dos multiplex con *primers* externos para cada grupo de marcadores.

2. Se preparó el PCR multiplex master mix (muestras + 1):

H2O ultrapura csp 24ul/muestra

PCR buffer 10x 2,5 µl

BSA 20 µg/ml

MgCl₂ 1,50 mM

Concentración del primer (Fext) 0,30 µM

Concentración del primer (Rext) 0,30 µM

Concentración de los dNTPs 250,00 µM

Taq-polimerasa (5 U/100 µl)

3. Se alicuotaron 24 µl del PCR multiplex *master mix* en tubos de 0,2 ml. Se agregó 1 µl de las muestras de ADN extraídas.

4. Se colocaron los tubos en el termociclador y se utilizó el siguiente programa: 94 °C/4 min; 35 ciclos de 94 °C/30 s, 55 °C/ 1 min, 72 °C/2 min y una extensión final a 72 °C/5 min.

LAB UTK:

1. Se prepararon los *primers forward* y *reverse* de los marcadores moleculares: SAG1, 3'-SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, C22-8, C29-2, L358, PK1, Apico, en una concentración 25 µM.

2. Se preparó el PCR multiplex *master mix* (muestras + 1):

H2O ultrapura	16,5	µl
10x PCR buffer (Mg-)	2,5	µl
dNTPs (2,5 µM cada uno)	2,0	µl
25 µM MgCl ₂	2,0	µl
Mezcla de <i>primers forward</i> externos	0,15	µl
Mezcla de <i>primers reverse</i> externos	0,15	µl
FastStart Taq (5 U/ µl)	0,20	µl
Total:	23,5	µl

3. Se alicuotaron 23,5 µl del PCR multiplex *master mix* en placas de 96 pocillos. Se agregaron 1,5 µl de las muestras de ADN extraídas.

4. Se colocaron los tubos en el termociclador y se utilizó el siguiente programa: 95 °C/4 min; 30 ciclos de 94 °C/30 s, 55 °C/1 min, 72 °C/2 min y una extensión final de 15 °C.

5. Se agregaron 25 µl de H2O ultrapura para diluir los productos amplificados de la PCR.

7.1.1.2. Nested PCR

LAINPA:

1. Se preparó el PCR nested *master mix* para cada marcador individual (muestras + 1):

H2O ultrapura
PCR buffer 10x 2,5 µM
BSA 20 µg/ml
MgCl ₂ 0,75 mM
Concentración del primer (Fint) 0,50 µM
Concentración del primer (Rint) 0,50 µM
Concentración de los dNTPs 250,00 µM
Taq-polimerasa (5 U/100 µl)

2. Se alicuotaron 24 µl del PCR multiplex *master mix* en tubos de 0,2 ml. Se agregaron 1 µl de las muestras de ADN extraídas.

3. Se colocaron los tubos en el termociclador y se agruparon las reacciones de la siguiente manera:

- marcadores nuevos internos (C22-8, C29-2, Apico, PK1 y L358): 95 °C/4 min; 35 ciclos de 94 °C/30 s, 60 °C/1 min, 72 °C/2 min y una extensión final de 15 °C.

- alt. SAG2: 95 °C/4 min; 35 ciclos de 94 °C/30 s, 60 °C/1 min, 72 °C/2 min y una extensión final de 15 °C.

- BTUB y GRA6: 95 °C/5 min; 39 ciclos de 94 °C/1 min, 55 °C/1 min, 72 °C/1 min; 72 °C/5 min y una extensión final de 15 °C.

- SAG3: 95 °C/5 min; 39 ciclos de 94 °C/1 min, 63 °C/1 min, 72 °C/1 min; 72 °C/5 min y una extensión final de 15 °C.

LAB UTK:

1. Se preparó el PCR nested *master mix* para cada marcador individual (muestras + 1):

H2O ultrapura	18,5 µl
10x PCR buffer (Mg+)	2,5 µl
dNTPs (2.5 µM cada uno)	2,0 µl
<i>Primer forward</i> (50 µM)	0,15 µl
<i>Primer reverse</i> (50 µM)	0,15 µl
Paq5000 polimerasa (5 U/ µl)	0,20 µl
Total:	23,5 µl

2. Se alicuotaron 23,5 µl del PCR multiplex *master mix* en placas de 96 pocillos. Se agregaron 1,5 µl del producto amplificado en el paso anterior.

3. Se colocaron las placas en el termociclador y se utilizó el siguiente programa: 95 °C/4 min; 35 ciclos de 94 °C/30 s, 60 °C/1 min, 72 °C/1,5 min. y una extensión final de 15 °C. Para el marcador Apico se utilizó el ciclo: 94 °C/30 s, 55 °C/1 min, 72 °C/2 min y una extensión final de 15 °C.

7.1.1.3. Digestión enzimática de los productos de PCR

LAINPA:

1. Se preparó el *mix* de digestión para cada marcador (**Tabla 4, LAINPA**):

H2O ultrapura	3,7 µl
TaqI buffer	1 µl

Enzima de restricción 1 0,1 µl

Enzima de restricción 2 (si aplica) 0,1 µl

2. Al *mix* de digestión se agregó 5 µl del producto de la nested PCR, se incubó a la temperatura correspondiente (**Tabla 4, LAINPA**).

3. Se agregaron 2 µl de buffer de corrida (5x) a las muestras, y se cargaron en un gel de agarosa al 2,5 % diluido en 0,5x TBE buffer con la presencia de SYBR® Safe DNA (Invitrogen, USA). Se corrió a 120 V durante ~ 30 min. Para el marcador Apico se utilizó un gel de agarosa al 3 %.

LAB UTK:

1. Se preparó el *mix* de digestión para cada marcador (**Tabla 4, LAB UTK**):

H2O ultrapura 14,6 µl

10 x NEB buffer 2,0 µl

100 x BSA 0,2 µl

Enzima de restricción 1 0,1 µl

Enzima de restricción 2 (si aplica) 0,1 µl

Total: 17,0 µl

2. Se alicuotaron 17 µl del *mix* de digestión en placas de 96 pocillos, se agregó 3 µl del producto de la nested PCR, se incubó a la temperatura correspondiente (**Tabla 4, LAB UTK**).

3. Se agregaron 5 µl de buffer de corrida (5x) a las muestras, y se cargaron en un gel de agarosa al 2,5 % diluido en 1x SB buffer con la presencia de RedSafe (Sigma-Aldrich, USA). Se corrió a 80-120 V durante ~ 1,5 h. Para el marcador Apico se utilizó un gel de agarosa al 3 %.

Tabla 4. Resumen de *primers* y enzimas para nPCR-RFLP

Marcadores	<i>Primers</i> externos	<i>Primers</i> internos	Enzimas de restricción, buffers, temperatura y tiempo de incubación
SAG1	SAG1-Fext: GTTCTAACCACGCACCCTGAG SAG1-Rext2: AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA	SAG1-S2: CAATGTGCACCTGTAGGAAGC SAG1-Rext: GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG	LAB UTK: Sau96I + HaeII + NEB4 + BSA, 37 °C 1 h. 2,5 % gel.
5'-SAG2	No es necesario	5-SAG2F:	LAB UTK:

		GAAATGTTTCAGGTTGCTGC 5-SAG2R: GCAAGAGCGAACTTGAACAC	MboI + NEB4 + BSA, 37 °C 1 h. 2,5 % gel.
3'-SAG2	3'-SAG2-Fext: TCTGTTCTCCGAAGTGAAGTCC 3'-SAG2-Rext: TCAAAGCGTGCATTATCGC	3-SAG2F: ATTCTCATGCCTCCGCTTC 3-SAG2R: AACGTTTCACGAAGGCACAC	LAB UTK: HhaI + NEB4 + BSA, 37 °C 1 h. 2,5 % gel.
SAG3	SAG3-Fext: CAACTCTCACCATTCCACCC SAG3-Rext: GCGCGTTGTTAGACAAGACA	P43S2: TCTTGTCCGGTGTTCACCTCA P43AS2: CACAAAGGAGACCGAGAAGGA	LAINPA: H2O + Tango Y + BcnI, 37°C, 1 h. 2,5 % gel. LAB UTK: NciI + NEB4 + BSA, 37 °C 1 h. 2,5 % gel.
BTUB	BTUB -Fext: TCCAAAATGAGAGAAATCGT BTUB -Rext: AAATTGAAATGACGGAAGAA	Btub-F: GAGGTCATCTCGGACGAACA BtubR: TTGTAGGAACACCCGGACGC	LAINPA: H2O + TaqI Puffer + TaqI + Bsh1285I, 37 °C, 1 h, 65 °C, 1 h. 2,5 % gel. LAB UTK: BsiEI + TaqI, + NEB4 + BSA, 60 °C 1 h. 2,5 % gel.
GRA6	GRA6-Fext: ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT GRA6-Rext: GCACCTTCGCTTGTGGTT	GRA6-F1: TTTCCGAGCAGGTGACCT GRA6-R1x: TCGCCGAAGAGTTGACATAG	LAINPA: H2O + R + Tru1I, 65 °C, 1 h. 2,5 % gel. LAB UTK: MseI + NEB2 + BSA, 37 °C 1 h. 2,5 % gel. Nota: usar 0,2 ul/rxn de MseI
C22-8	C22-8-Fext: TGATGCATCCATGCGTTTAT C22-8-Rext: CCTCCACTTCTTCGGTCTCA	C22-8F: TCTCTCTACGTGGACGCC C22-8R: AGGTGCTTGGATATTCGC	LAINPA: H2O + Tango + Alw26I + MboII, 37 °C, 30 min. 2,5 % gel. LAB UTK: BsmAI (o BCoDI) + MboII + NEB2 + BSA, 37 °C 30 min, 55 °C 30 min. 2,5 % gel.
C29-2	C29-2-Fext: ACCCACTGAGCGAAAAGAAA C29-2-Rext: AGGGTCTCTTGCGCATACAT	C29-2F: AGTTCTGCAGAGTGTCGC C29-2R: TGTCTAGGAAAGAGGCGC	LAINPA: H2O + Tango + RsaI + Tail, 37 °C, 1 h, 65 °C, 1 h. 2,5 % gel. LAB UTK: HpyCH4IV + RsaI + NEB1 +

			BSA, 37 °C 1 h. 2,5 % gel. Nota: se puede usar 0,2 ul/rxn de ambas enzimas.
L358	L358-Fext: TCTCTCGACTTCGCCTCTTC L358-Rext: GCAATTTCTCGAAGACAGG	L358-F2: AGGAGGCGTAGCGCAAGT L358-R2: CCCTCTGGCTGCAGTGCT	LAINPA: H2O + R + BsuRI + Hin1II, 37 °C, 1 h. 2,5 % gel. LAB UTK: HaeIII + NlaIII + NEB4 + BSA, 37 °C 1 h. 2,5 % gel. Nota: usar 0.2 ul/rxn de NlaIII
PK1	PK1-Fext: GAAAGCTGTCCACCCTGAAA PK1-Rext: AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT	PK1-F: CGCAAAGGGAGACAATCAGT PK1-R: TCATCGCTGAATCTCATTGC	LAINPA: H2O + Tango + Eco88I + RsaI, 37 °C, 1 h. 2,5 % gel. LAB UTK: AvaI + RsaI + NEB4 + BSA, 37 °C 1 h. 2,5 % gel.
alt. SAG2	alt. SAG2-Fext: GGAACGCGAACAATGAGTTT alt. SAG2-Rext: GCACTGTTGTCCAGGGTTTT	SAG2-Fa: ACCCATCTGCGAAGAAAACG SAG2-Ra: ATTTGACCAGCGGGAGCAC	LAINPA: H2O + TaqI Puffer + TaqI + Bsh1285I, 37 °C, 30 min, 65 °C, 30 min. 2,5 % gel. LAB UTK: HinfI + TaqI + NEB3 + BSA, 37 °C 30 min, 65 °C 30 min. 2,5 % gel.
Apico	Apico -Fext: TGGTTTTAACCTAGATTGTGG Apico -Rext: AAACGGAATTAATGAGATTTGAA	Apico-F: TGCAAATCTTGAATTCTCAGTT Apico-R: GGGATTCTGAACCCTTGATA	LAINPA: H2O + Tango + BspTI + HpyF3I + DNA, 37 °C, 1 h. 3 % gel. LAB UTK: AflII + DdeI + NEB2 + BSA, 37 °C 1 h. 3 % gel. Nota: se puede usar 0,2 ul/rxn de ambas enzimas.

7.2. OBJETIVO B

7.2.1. Solución buffer de fosfatos (PBS)

Solución madre (10X):

Cloruro de sodio (NaCl)..... 40 g

Cloruro de potasio (KCl)..... 1 g

Di-sodio hidrogeno fosfato (Na₂HPO₄)5,75 g

Potasio di-hidrogeno fosfato (KH₂PO₄) 1 g

Agua destilada.....500 ml

Solución de trabajo (1X): utilizar la solución madre diluida 1:10 en agua destilada. El pH final será de 7,2.

7.2.2. Cultivo de células VERO (células de riñón de mono verde africano)

Reactivos y materiales utilizados

- Medio RPMI 1640 con glutamina (GIBCO, USA), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Natocor, Argentina) para crecimiento o 3% SFB para mantenimiento y con 1 % de solución de ATB-ATM (10.000 unidades de penicilina/ ml, 10 mg de estreptomicina/ ml y 0,25 mg de fungizona/ ml) (Gibco BRL, UK).
- Botellas de cultivo, 25 cm² (Cellstar, Greiner Bio One, USA).

Procedimiento

1. Se descongeló una ampolla de células VERO conservada en nitrógeno líquido y se colocó en una botella de cultivo de 25 cm² con 5 ml de medio RPMI.
2. Una vez observada la formación de la monocapa se eliminó el medio de la botella.
3. Se agregó PBS pH 7,2 para enjuagar y se descartó.
4. Se agregó 2,7 ml de PBS y 0,3 ml de Tripsina-EDTA (PAA Laboratories, Austria) sol. 10x (5 g de tripsina/l 1:250, 2g EDTA/l) y se incubó a 37 °C por 30 min.
5. Una vez desprendidas las células se completó hasta 5 ml con medio de cultivo.
6. Se transfirió 1 ml de esa suspensión en cada nueva botella de cultivo con 5 ml de medio con 10 % de SFB colocado previamente.
7. Se incubó a 37 °C bajo una atmósfera con 5 % de CO₂.
8. Las células se multiplicaron una vez por semana.

7.2.3. Solución fisiológica (CINa al 0,85 %)

CINa..... 0,85 g

Agua destilada..... 100 ml

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 30 minutos.

7.2.4. Tinción con DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride, Molecular Probes, Invitrogen, USA)

Reactivos y materiales utilizados

- DAPI.
- PBS.

Procedimiento

1. Se lavaron las células 3 veces con PBS.
2. Se adicionó la solución de DAPI (solución de trabajo 1:2000 diluida en PBS).
3. Se incubó a temperatura ambiente en oscuridad 5 minutos.
4. Se descartó el DAPI.
5. Se lavó con PBS.

7.2.5. Líquido de montaje MOWIOL 4-88 (Sigma Aldrich, USA)

Reactivos y materiales utilizados

- Glicerol.
- Mowiol 4-88.
- Agua destilada.
- Tris clorhídrico 0,2 M.

Procedimiento

1. Se pesaron 24 gr de glicerol, 9,6 gr de Mowiol 4-88 y se midieron 24 ml de agua destilada y 48 ml de tris clorhídrico 0,2 M, pH 8.5.
2. Se mezcló en agitación sobre una platina térmica templada alrededor de 4 a 5 horas hasta que el Mowiol 4-88 se disolvió completamente.
3. Se fraccionó en tubos de centrifuga de 50 ml y se centrifugó a 5000 g por 15 min.
4. Se retiró el sobrenadante y se fraccionó en tubos de 15 ml para su conservación a -20 °C.

7.3. OBJETIVO C

7.3.1. Técnica de coloración vital con Azul Tripán 0,4 %

Reactivos y materiales utilizados

- PBS estéril.

- Azul tripán.

Procedimiento

1. Se pesaron 0,4 gr de azul tripán y se diluyeron en 100 ml de PBS (solución de trabajo 1:10).
2. Se mezcló en agitación.
3. Se pasó por el filtro de 0,45 μm (humedecido previamente).
4. Se tomaron 10 μl de la suspensión de taquizoítos a evaluar y se mezclaron con 90 μl de azul tripán (dilución 1:10) en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
5. Se contó en cámara de Neubauer: se consideraron vivos aquellos taquizoítos transparentes con la membrana refringente, se consideraron muertos aquellos taquizoítos teñidos de color azul (membrana permeable). Se estableció el porcentaje de viabilidad contando todo el cuadrante central en ambas zonas de conteo de la cámara y aplicando la siguiente fórmula: $n \text{ tq} * 5 * 10^4 * \text{factor de dilución}$.

7.3.2. Extracción de ADN: Kit comercial PROMEGA

Preparación del tejido y lisis (x muestras + 1 control de extracción)

1. Se tomaron unos 25-50 μg de homogenato de cada tejido a extraer, luego de descongelarlo a temperatura ambiente.
2. Se adicionó 600 μl de la solución de lisis nuclear + 20 μl de proteinasa-K por muestra a extraer.
3. Se incubó *overnight* a 55 $^{\circ}\text{C}$ con regulares agitaciones.

Lisis del ARN y precipitación proteica

1. Se adicionó 3 μl de la solución RNAsa.
2. Se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 a 30 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente.
3. Se adicionaron 200 μl de la solución de precipitación proteica. Se agitó por 20 s y se enfrió en hielo por 5 min.
4. Se centrifugó a 16,000 rpm por 4 min.

Precipitación del ADN y rehidratación

1. Se transfirió el sobrenadante a un microtubo de 1,5 ml conteniendo 600 μl de isopropanol a temperatura ambiente.
2. Se mezcló por inmersión.
3. Se centrifugó a 16,000 rpm por 1 min.

4. Se descartó el sobrenadante y se agregó 600 µl de etanol 70 %. Se lavó el pellet por inversión del tubo.
5. Se centrifugó a 16,000 rpm por 1 min.
6. Se descartó el etanol y se dejó secar el pellet durante 15 min con la tapa del microtubo abierta.
7. Se adicionó 100 µl de la solución de rehidratación de ADN *overnight* a 4 °C.

7.3.3. PCR TOX5/TOX8

Se realizó la amplificación mediante PCR de las muestras de ADN extraídas utilizando los *primers* TOX5 (CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT) / TOX8 (CCCAGCTGCGTCTGTCTGGGAT) específicos para *T. gondii*.

Procedimiento

1. Se preparó el PCR *master mix* (muestras + 1):

H2O ultrapura

PCR buffer 10x 2,5 µM

BSA 20 µg/ml

MgCl₂ 0,75 mM

TOX5 0,4 µM

TOX8 0,4 µM

Concentración de los dNTPs 200,00 µM

Taq-polimerasa (1 U/25 µl)

2. Se alicuotaron 24 µl del PCR *master mix* en tubos de 0,2 ml. Se agregaron 1 µl de las muestras de ADN extraídas.
3. Se colocaron los tubos en el termociclador y se utilizó el siguiente programa: 94 °C/2 min; 35 ciclos de 94 °C/1 min, 60 °C/ 1 min, 72 °C/1 min y una extensión final a 72 °C/10 min.
4. Los productos amplificados se corrieron en geles de agarosa al 1,5 % y se visualizaron luego de una electroforesis utilizando SYBR® Safe DNA (Invitrogen, USA). Como referencia para comparar el tamaño de los amplificados se utilizó un marcador de 100 a 1000 pares de bases (Cienmarker, Biodynamics, Argentina).

7.4. OBJETIVO D

7.4.1. Obtención de células esplénicas de ratones

Reactivos y materiales utilizados

- RPMI con 10 % de SFB.
- Placas de Petri.
- Portaobjetos esmerilados.

Solución buffer de lisis de glóbulos rojos (mantener a 37 °C al momento de su uso)

- Cloruro de amonio al 0,83 % (pH 7,2)

Tetracloruro de Amonio:

Cloruro de amonio.....0,83 g

Tris clorhídrico (0,01 M)100 ml

Procedimiento

El procedimiento se detalla en la sección 4.4.3. de Materiales y Métodos.

7.4.2. Cuantificación de la concentración de proteínas (Bicinchoninic acid assay, BCA; Pierce, USA)

Reactivos y materiales utilizados

Para la determinación de la concentración de proteínas se siguieron las instrucciones recomendadas por la empresa elaboradora.

Procedimiento

1. Se prepararon las diluciones seriadas del estándar de albumina sérica bovina (0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 y 2000 µg/ml).
2. Se preparó la solución reactiva de trabajo (ST) mezclando 50 partes de reactivo A con 1 parte del reactivo B.
3. Se utilizó protocolo para trabajar con microplacas:
 - 3.1. Se agregó 25 µl de cada estándar de albúmina sérica bovina y de cada muestra por duplicado en una microplaca.
 - 3.2. Se adicionó 200 µl de la ST a cada pocillo y me mezcló la microplaca por 30 s en agitador.
 - 3.3. Se cubrió la microplaca y se incubó a 37 °C por 30 min.
 - 3.4. Se dejó enfriar la microplaca a temperatura ambiente.

3.5. Se midió la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro.

3.6. Se sustrajo el promedio de la DO del blanco del estándar de albúmina sérica bovina a cada muestra.

7.4.3. ELISA para IFN- γ (Mouse IFN- γ ELISA Kit, N.º catálogo: BMS606, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)

Reactivos y materiales utilizados

Para la determinación de la concentración de IFN- γ a partir de un pool de los triplicados de cada tratamiento de los sobrenadantes de los esplenocitos, se siguieron las instrucciones recomendadas por la empresa elaboradora.

Procedimiento

1. Se lavó 2 veces los pocillos de la microplaca con el buffer de lavado.
2. Se prepararon las diluciones seriadas del estándar de IFN- γ (0, 15,6, 31,3, 62,5, 125, 250, 500 y 1000 pg/ml) reconstituido en agua destilada.
3. Se adicionó 100 μ l del diluyente de muestra a los estándares de dilución.
4. Se adicionó 50 μ l del diluyente de muestra a los pocillos de muestra.
5. Se adicionó 50 μ l de las muestras a analizar.
6. Se adicionó 50 μ l del conjugado de biotina anti-IFN- γ de ratón a todos los pocillos.
7. Se cubrió la microplaca y se incubó por 2 h a temperatura ambiente en leve agitación.
8. Se vaciaron y se lavaron los pocillos 3 veces con buffer de lavado.
9. Se adicionó 100 μ l del conjugado Streptavidina-HRP a todos los pocillos.
10. Se cubrió la microplaca y se incubó por 30 min a temperatura ambiente en leve agitación.
11. Se vaciaron y se lavaron los pocillos 3 veces con buffer de lavado.
12. Se adicionó 100 μ l de la solución sustrato TMB todos los pocillos.
13. Se incubó la microplaca en oscuridad por 10 min a temperatura ambiente.
14. Se adicionó 100 μ l de la solución de detención a todos los pocillos.
15. Se midió la DO a 450 nm (Espectrofotómetro Labsystems Multiskan MS).
16. Se estimó la concentración de IFN- γ de las muestras mediante una recta obtenida a partir de las DO de las diluciones seriadas de los estándares de IFN- γ .

7.4.4. Prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI)

7.4.4.1. Preparación del antígeno para inmunofluorescencia indirecta para *T. gondii*

1. Se infectó una botella de cultivo con 1 millón de taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii*.
2. Se recolectó el sobrenadante de la botella infectada cuando se observó que los taquizoítos habían roto el 80% de la monocapa celular, y se pasó la suspensión por las agujas de los calibres 18G, 21G, 25G, 27G para romper completamente las células y liberar los parásitos.
3. Se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos.
4. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió en PBS y se volvió a centrifugar. Se repitió la operación tres veces.
5. Se inactivaron los taquizoítos con 1% de formol e incubaron en heladera durante 15 minutos. Se lavó con PBS tres veces, centrifugando y resuspendiendo el pellet cada vez.
6. Se suspendieron los taquizoítos en PBS en una dilución aproximada de 10^7 taquizoítos/ml.
7. Se colocaron 10 μ l de la suspensión en cada pocillo del portaobjetos para inmunofluorescencia y se secó a temperatura ambiente.
8. Se conservó a -20 °C.

7.4.4.2. Prueba de IFI

Materiales y reactivos

- Antígeno.
- Conjugado especie específico.
- PBS.
- Placas de 96 pocillos fondo "U".
- Estufa.
- Agitador.
- Micropipetas de diferentes volúmenes.

Procedimiento

1. Se realizaron las diluciones del suero en PBS (1:25, 1:50, 1:100, 1:200, etc.) en placas de 96 pocillos fondo en "U".

2. Se incubó el antígeno con el suero problema a 37 °C durante 30 minutos.
3. Se hicieron 3 lavados con PBS durante 10, 5 y 3 min en agitación.
4. Se incubó con el conjugado anti-especie específica (Anti-IgG murina, Sigma, USA) 30 minutos a 37 °C.
5. Se hicieron 3 lavados con PBS durante 10, 5 y 3 min en agitación.
6. Se montó con glicerina al 10 % en PBS.
7. Se observó con microscopio de fluorescencia.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Ajzenberg, D., Dumetre, A., Darde, M.L., 2005. Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*. J Clin Microbiol 43, 1940-1943.
- Alomar, M.L., Rasse-Suriani, F.A., Ganuza, A., Coceres, V.M., Cabrerizo, F.M., Angel, S.O., 2013. In vitro evaluation of beta-carboline alkaloids as potential anti-*Toxoplasma* agents. BMC Res Notes 6, 193.
- Bacigalupe, D., Quiroga, M., Basso, W., Unzaga, J., Moré, G., Pardini, L., 2008. Toxoplasmosis aguda en *Saimiri boliviensis*. In: III Congreso Latinoamericano de Zoonosis y VI Congreso Argentino de Zoonosis Buenos Aires, Argentina.
- Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Casanoves F., Di Rienzo J.A., Robledo C.W. 2008. Manual del Usuario, Editorial Brujas, Córdoba, Argentina.
- Basso, W., More, G., Quiroga, M.A., Pardini, L., Bacigalupe, D., Venturini, L., Valenzuela, M.C., Balducchi, D., Maksimov, P., Schares, G., Venturini, M.C., 2009. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from captive slender-tailed meerkats (*Suricata suricatta*) with fatal toxoplasmosis in Argentina. Vet Parasitol 161, 201-206.
- Basso, W., Venturini, M.C., More, G., Quiroga, A., Bacigalupe, D., Unzaga, J.M., Larsen, A., Laplace, R., Venturini, L., 2007. Toxoplasmosis in captive Bennett's wallabies (*Macropus rufogriseus*) in Argentina. Vet Parasitol 144, 157-161.
- Beck, H.P., Blake, D., Darde, M.L., Felger, I., Pedraza-Díaz, S., Regidor-Cerrillo, J., Gomez-Bautista, M., Ortega-Mora, L.M., Putignani, L., Shiels, B., Tait, A., Weir, W., 2009. Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites. Int J Parasitol 39, 175-189.
- Blader, I.J., Saeij, J.P., 2009. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. APMIS, Journal Compilation 117, 458-476.
- Cañedo-Solares, I., Calzada-Ruiz, M., Ortiz-Alegria, L.B., Ortiz-Muniz, A.R., Correa, D., 2013. Endothelial cell invasion by *Toxoplasma gondii*: differences between cell types and parasite strains. Parasitol Res 112, 3029-3033.
- Contreras-Ochoa, C.O., Lagunas-Martinez, A., Belkind-Gerson, J., Correa, D., 2012. *Toxoplasma gondii* invasion and replication in astrocyte primary cultures and astrocytoma cell lines: systematic review of the literature. Parasitol Res 110, 2089-2094.
- Costa, J.G.L., Tavares, A.T., Silva, D.R.C., Pinto, L.V., Baraviera, R.C.A., Noviello, M.L.M., Arantes, R.M.E., Vitor, R.W.A., 2018. Kinetics of parasite distribution after reinfection with genetically distinct strains of *Toxoplasma gondii*. Exp Parasitol 184, 22-30.
- Cuellar, J.A., Hernandez, A., Villegas, E., Gomez, J.E., 2012. [Efficiency of *in vitro* culture of *Toxoplasma gondii* in THP1 and Vero cell lines]. Biomedica 32, 461-466.
- Chaichan, P., Mercier, A., Galal, L., Mahittikorn, A., Ariey, F., Morand, S., Boumediene, F., Udonsom, R., Hamidovic, A., Murat, J.B., Sukthana, Y., Darde, M.L., 2017. Geographical distribution of *Toxoplasma gondii* genotypes in Asia: A link with neighboring continents. Infect Genet Evol 53, 227-238.
- Chatterton, J.M., Evans, R., Ashburn, D., Joss, A.W., Ho-Yen, D.O., 2002. *Toxoplasma gondii* in vitro culture for experimentation. J Microbiol Methods 51, 331-335.
- Chen, J., Li, Z.Y., Petersen, E., Liu, W.G., Zhu, X.Q., 2016. Co-administration of interleukins 7 and 15 with DNA vaccine improves protective immunity against *Toxoplasma gondii*. Exp Parasitol 162, 18-23.
- Cheng, W., Liu, F., Li, M., Hu, X., Chen, H., Pappoe, F., Luo, Q., Wen, H., Xing, T., Xu, Y., Shen, J., 2015. Variation detection based on next-generation sequencing of type Chinese 1 strains of *Toxoplasma gondii* with different virulence from China. BMC Genomics 16, 888.
- Darde, M.L., 2008. *Toxoplasma gondii*, "new" genotypes and virulence. Parasite 15, 366-371.
- Dellarupe, A., Regidor-Cerrillo, J., Jimenez-Ruiz, E., Schares, G., Unzaga, J.M., Venturini, M.C., Ortega-Mora, L.M., 2014a. Clinical outcome and vertical transmission variability among canine *Neospora caninum* isolates in a pregnant mouse model of infection. Parasitology 141, 356-366.
- Dellarupe, A., Regidor-Cerrillo, J., Jimenez-Ruiz, E., Schares, G., Unzaga, J.M., Venturini, M.C., Ortega-Mora, L.M., 2014b. Comparison of host cell invasion and proliferation among

- Neospora caninum* isolates obtained from oocysts and from clinical cases of naturally infected dogs. *Exp Parasitol* 145, 22-28.
- Dellarupe, A., Fitte, B., Pardini, L., Campero, L.M., Bersntein, M., Robles, R., Moré, G., Venturini, M.C., Unzaga, J.M. 2019c. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in synanthropic rodents from Argentina. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. *Accepted*.
- Demar, M., Hommel, D., Djossou, F., Peneau, C., Boukhari, R., Louvel, D., Bourbigot, A.M., Nasser, V., Ajzenberg, D., Darde, M.L., Carme, B., 2012. Acute toxoplasmoses in immunocompetent patients hospitalized in an intensive care unit in French Guiana. *Clin Microbiol Infect* 18, E221-231.
- Djurkovic-Djakovic, O., Klun, I., Khan, A., Nikolic, A., Knezevic-Usaj, S., Bobic, B., Sibley, L.D., 2006. A human origin type II strain of *Toxoplasma gondii* causing severe encephalitis in mice. *Microbes Infect* 8, 2206-2212.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. (2008). *InfoStat*, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dubey, J.P., 2010. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*, Second Edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, 313 p.
- Dubey, J.P., Cortes-Vecino, J.A., Vargas-Duarte, J.J., Sundar, N., Velmurugan, G.V., Bandini, L.M., Polo, L.J., Zambrano, L., Mora, L.E., Kwok, O.C., Smith, T., Su, C., 2007a. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in dogs from Colombia, South America and genetic characterization of *T. gondii* isolates. *Vet Parasitol* 145, 45-50.
- Dubey, J.P., Gennari, S.M., Labruna, M.B., Camargo, L.M., Vianna, M.C., Marcet, P.L., Lehmann, T., 2006. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Amazon, Brazil. *J Parasitol* 92, 36-40.
- Dubey, J.P., Gennari, S.M., Sundar, N., Vianna, M.C., Bandini, L.M., Yai, L.E., Kwok, C.H., Suf, C., 2007b. Diverse and atypical genotypes identified in *Toxoplasma gondii* from dogs in Sao Paulo, Brazil. *J Parasitol* 93, 60-64.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Speer, C.A., 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* 11, 267-299.
- Dubey, J.P., Marcet, P.L., Lehmann, T., 2005a. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Argentina. *J Parasitol* 91, 1335-1339.
- Dubey, J.P., Marcet, P.L., Lehmann, T., 2005b. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Argentina. *J Parasitol* 91, 1335-1339.
- Dubey, J.P., Navarro, I.T., Sreekumar, C., Dahl, E., Freire, R.L., Kawabata, H.H., Vianna, M.C., Kwok, O.C., Shen, S.K., Thulliez, P., Lehmann, T., 2004. *Toxoplasma gondii* infections in cats from Parana, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. *J Parasitol* 90, 721-726.
- Dubey, J.P., Su, C., 2009. Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and where did they come from. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104, 190-195.
- Dubey, J.P., Velmurugan, G.V., Chockalingam, A., Pena, H.F., de Oliveira, L.N., Leifer, C.A., Gennari, S.M., Bahia Oliveira, L.M., Su, C., 2008. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. *Vet Parasitol* 157, 299-305.
- Dubey, J.P., Velmurugan, G.V., Rajendran, C., Yabsley, M.J., Thomas, N.J., Beckmen, K.B., Sinnett, D., Ruid, D., Hart, J., Fair, P.A., McFee, W.E., Shearn-Bochsler, V., Kwok, O.C., Ferreira, L.R., Choudhary, S., Faria, E.B., Zhou, H., Felix, T.A., Su, C., 2011. Genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* in wildlife from North America revealed widespread and high prevalence of the fourth clonal type. *Int J Parasitol* 41, 1139-1147.
- Dubremetz, J.F., Lebrun, M., 2012. Virulence factors of *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect* 14, 1403-1410.
- El Hajj, H., Lebrun, M., Arold, S.T., Vial, H., Labesse, G., Dubremetz, J.F., 2007. ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog* 3, e14.
- Fainboim, L., Geffner, J., 2011. *Introducción a la Inmunología Humana*, 6 Edition. Editorial Médica Panamericana.

- Ferreira, A.M., Martins, M.S., Vitor, R.W., 2001. Virulence for BALB/c mice and antigenic diversity of eight *Toxoplasma gondii* strains isolated from animals and humans in Brazil. *Parasite* 8, 99-105.
- Ferreira, T.C.R., Buery, J.C., Moreira, N.I.B., Santos, C.B., Costa, J.G.L., Pinto, L.V., Baraviera, R.C.A., Vitor, R.W.A., Fux, B., 2018. *Toxoplasma gondii*: isolation, biological and molecular characterisation of samples from free-range *Gallus gallus domesticus* from countryside Southeast Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.*
- Fleckenstein, M.C., Reese, M.L., Konen-Waisman, S., Boothroyd, J.C., Howard, J.C., Steinfeldt, T., 2012. A *Toxoplasma gondii* pseudokinase inhibits host IRG resistance proteins. *PLoS Biol* 10, e1001358.
- Fuentes-Castro, B.E., Reyes-Garcia, J.G., Valenzuela-Vargas, M.T., Martinez-Gomez, F., 2017. Histopathology of murine toxoplasmosis under treatment with dialyzable leukocyte extract. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 112, 741-747.
- Galal, L., Ajzenberg, D., Hamidovic, A., Durieux, M.F., Darde, M.L., Mercier, A., 2018. Toxoplasma and Africa: One Parasite, Two Opposite Population Structures. *Trends Parasitol* 34, 140-154.
- Gazzinelli, R.T., Denkers, E.Y., 2006. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nature reviews Immunology AOP* (advance online publishing).
- Gennari, S.M., Esmerini Pde, O., Lopes, M.G., Soares, H.S., Vitaliano, S.N., Cabral, A.D., Pena, H.F., Horta, M.C., Cavalcante, P.H., Fortes, K.P., Villalobos, E.M., 2015. Occurrence of antibodies against *Toxoplasma gondii* and its isolation and genotyping in donkeys, mules, and horses in Brazil. *Vet Parasitol* 209, 129-132.
- Homan, W.L., Vercammen, M., De Braekeleer, J., Verschueren, H., 2000. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int J Parasitol* 30, 69-75.
- Howe, D.K., Honore, S., Derouin, F., Sibley, L.D., 1997. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 35, 1411-1414.
- Howe, D.K., Sibley, L.D., 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis* 172, 1561-1566.
- Howe, D.K., Summers, B.C., Sibley, L.D., 1996. Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun* 64, 5193-5198.
- Hu, K., Johnson, J., Florens, L., Fraunholz, M., Suravajjala, S., DiLullo, C., Yates, J., Roos, D.S., Murray, J.M., 2006. Cytoskeletal components of an invasion machine--the apical complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog* 2, e13.
- Hu, K., Roos, D.S., Angel, S.O., Murray, J.M., 2004. Variability and heritability of cell division pathways in *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci* 117, 5697-5705.
- Huson, D.H., Bryant, D., 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol* 23, 254-267.
- ICLAS, C., 2012. International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals CIOMS.
- Khan, A., Fux, B., Su, C., Dubey, J.P., Darde, M.L., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., Sibley, L.D., 2007. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 14872-14877.
- Lachenmaier, S.M., Deli, M.A., Meissner, M., Liesenfeld, O., 2011. Intracellular transport of *Toxoplasma gondii* through the blood-brain barrier. *J Neuroimmunol* 232, 119-130.
- Lang, C., Gross, U., Lüder, C.G.K., 2007. Subversion of innate and adaptive immune responses. *Parastology Research* 100, 191-203.
- Malkwitz, I., Berndt, A., Dausgies, A., Bangoura, B., 2018. Characterisation of susceptibility of chicken macrophages to infection with *Toxoplasma gondii* of type II and III strains. *Exp Parasitol* 187, 22-29.
- Melo, M.B., Jensen, K.D.C., Saeij, J.P.J., 2011. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. *Trends in Parasitol.* 27, 487-495.
- Mennechet, F., Kasper, L., Rachinel, N., Minns, L.A., Luangsay, S., Vandewalle, A., Buzone-gatel, D., 2004. Intestinal intraepithelial lymphocytes prevent pathogen driven inflammation and

- regulate the Smad/T-bet pathway of lamina propria CD4+ T cells. *Eur J. Immunol* 34, 1059-1067.
- Miller, C.M., Boulter, N.R., Ikin, R.J., Smith, N.C., 2009. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology* 39, 23-39.
- Mordue, D.G., Monroy, F., La Regina, M., Dinarello, C.A., Sibley, L.D., 2001. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *J Immunol* 167, 4574-4584.
- Moré, G., Pardini, L., Basso, W., Machuca, M., Bacigalupe, D., Villanueva, M.C., Schares, G., Venturini, M.C., Venturini, L., 2010. Toxoplasmosis and genotyping of *Toxoplasma gondii* in *Macropus rufus* and *Macropus giganteus* in Argentina. *Vet Parasitol* 169, 57-61.
- Morrison, D.A., 2005. Networks in phylogenetic analysis: new tools for population biology. *Int J Parasitol* 35, 567-582.
- Naguleswaran, A., Muller, N., Hemphill, A., 2003. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*: a novel adhesion/invasion assay reveals distinct differences in tachyzoite-host cell interactions. *Exp Parasitol* 104, 149-158.
- Nischik, N., Schade, B., Dytnerka, K., Dlugonska, H., Reichmann, G., Fischer, H.G., 2001. Attenuation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* parasites is associated with a decrease in interleukin-12-inducing tachyzoite activity and reduced expression of actin, catalase and excretory proteins. *Microbes Infect* 3, 689-699.
- Omata, Y., Dilorenzo, C., Venturini, C., Venturini, L., Igarashi, I., Saito, A., Suzuki, N., 1994. Correlation between antibody levels in *Toxoplasma gondii* infected pigs and pathogenicity of the isolated parasite. *Vet Parasitol* 51, 205-210.
- Pardini, L., Bacigalupe, D., Moré, G., Rambeaud, M., Basso, W., Perfumo, C.J., Hermann, D.C., Schares, G., Venturini, M.C., 2011a. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* strains in slaughtered pigs from Argentina. In: The 23rd International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology Buenos Aires, Argentina, p. 336.
- Pardini, L., Bacigalupe, D., Moré, G., Rambeaud, M., Basso, W., Perfumo, C.J., Hermann, D.C., Schares, G., Venturini, M.C. 2011b. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* strains in slaughtered pigs from Argentina. In The 23rd International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (Buenos Aires, Argentina), p. 336.
- Pardini, L., Bernstein, M., Carral, L.A., Kaufer, F.J., Dellarupe, A., Gos, M.L., Campero, L.M., More, G., Messina, M.T., Schneider, M.V., Freuler, C.B., Durlach, R.A., Unzaga, J.M., Venturini, M.C., 2019. Congenital human toxoplasmosis caused by non-clonal *Toxoplasma gondii* genotypes in Argentina. *Parasitol Int* 68, 48-52.
- Pardini, L., Carral, L.A., Bernstein, M., Gos, M.L., Olejnik, P., Unzaga, J.M., Kaufer, F.J., Freuler, C.B., Durlach, R.A., Venturini, M.C., 2014. First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from a human placenta in Argentina. *Parasitol Int* 63, 470-472.
- Pardini, L., Dellarupe, A., Bacigalupe, D., Quiroga, M.A., More, G., Rambeaud, M., Basso, W., Unzaga, J.M., Schares, G., Venturini, M.C., 2015. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* in a colony of captive black-capped squirrel monkeys (*Saimiri boliviensis*). *Parasitol Int* 64, 587-590.
- Pena, H.F., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Su, C., 2008. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int J Parasitol* 38, 561-569.
- Pereira, A.V., Gois, M.B., Lera, K.R., Falkowski-Temporini, G.J., Massini, P.F., Drozino, R.N., Aleixo, D.L., Miranda, M.M., da Silva Watanabe, P., Conchon-Costa, I., da Costa, I.N., Dos Anjos Neto Filho, M., de Araujo, S.M., Pavanelli, W.R., 2017. Histopathological lesions in encephalon and heart of mice infected with *Toxoplasma gondii* increase after *Lycopodium clavatum* 200dH treatment. *Pathol Res Pract* 213, 50-57.
- Pinheiro, B.V., Noviello Mde, L., Cunha, M.M., Tavares, A.T., Carneiro, A.C., Arantes, R.M., Vitor, R.W., 2015. Pathological changes in acute experimental toxoplasmosis with *Toxoplasma gondii* strains obtained from human cases of congenital disease. *Exp Parasitol* 156, 87-94.
- Pollard, A.M., Onatulu, K.N., Hiller, L., Haldar, K., Knoll, L.J., 2008. Highly polymorphic family of glycosylphosphatidylinositol- anchored surface antigens with evidence of developmental regulation in *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. 173, 2725-2735.

- Radke, J.R., Striepen, B., Guerini, M.N., Jerome, M.E., Roos, D.S., White, M.W., 2001. Defining the cell cycle for the tachyzoite stage of *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 115, 165-175.
- Rajendran, C., Su, C., Dubey, J.P., 2012. Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations. *Infect Genet Evol* 12, 359-368.
- Regidor-Cerrillo, J., Gomez-Bautista, M., Sodupe, I., Aduriz, G., Alvarez-Garcia, G., Del Pozo, I., Ortega-Mora, L.M., 2011. In vitro invasion efficiency and intracellular proliferation rate comprise virulence-related phenotypic traits of *Neospora caninum*. *Vet Res* 42, 41.
- Rego, W.M.F., Costa, J.G.L., Baraviera, R.C.A., Pinto, L.V., Bessa, G.L., Lopes, R.E.N., Vitor, R.W.A., 2017. Association of ROP18 and ROP5 was efficient as a marker of virulence in atypical isolates of *Toxoplasma gondii* obtained from pigs and goats in Piauí, Brazil. *Vet Parasitol* 247, 19-25.
- Reischl, U., Bretagne, S., Kruger, D., Ernault, P., Costa, J.M., 2003. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infect Dis* 3, 7.
- Rodgers, L., Wang, X., Wen, X., Dunford, B., Miller, R., Suzuki, Y., 2005. Strains of *Toxoplasma gondii* used for tachyzoite antigens to stimulate spleen cells of infected mice in vitro affect cytokine responses of the cells in the culture. *Parasitol Res* 97, 332-335.
- Roos, D.S., Donald, R.G., Morrissette, N.S., Moulton, A.L., 1994. Molecular tools for genetic dissection of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Methods Cell Biol* 45, 27-63.
- Saadatnia, G., Haj Ghani, H., Khoo, B.Y., Maimunah, A., Rahmah, N., 2010. Optimization of *Toxoplasma gondii* cultivation in VERO cell line. *Trop Biomed* 27, 125-130.
- Saeij, J.P., Boyle, J.P., Collier, S., Taylor, S., Sibley, L.D., Brooke-Powell, E.T., Ajioka, J.W., Boothroyd, J., 2006. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science* 314, 1780-1783.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406-425.
- Saraf, P., Shwab, E.K., Dubey, J.P., Su, C., 2017. On the determination of *Toxoplasma gondii* virulence in mice. *Exp Parasitol* 174, 25-30.
- Shwab, E.K., Jiang, T., Pena, H.F., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Su, C., 2016. The ROP18 and ROP5 gene allele types are highly predictive of virulence in mice across globally distributed strains of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 46, 141-146.
- Shwab, E.K., Zhu, X.Q., Majumdar, D., Pena, H.F., Gennari, S.M., Dubey, J.P., Su, C., 2014. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology* 141, 453-461.
- Sibley, L.D., Boothroyd, J.C., 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 359, 82-85.
- Sibley, L.D., Mordue, D.G., Su, C., Robben, P.M., Howe, D.K., 2002. Genetic approaches to studying virulence and pathogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357, 81-88.
- Silva, L.A., Andrade, R.O., Carneiro, A.C., Vitor, R.W., 2014. Overlapping *Toxoplasma gondii* genotypes circulating in domestic animals and humans in Southeastern Brazil. *PLoS One* 9, e90237.
- Silva, N.M., Manzan, R.M., Carneiro, W.P., Milanezi, C.M., Silva, J.S., Ferro, E.A., Mineo, J.R., 2010. *Toxoplasma gondii*: the severity of toxoplasmic encephalitis in C57BL/6 mice is associated with increased ALCAM and VCAM-1 expression in the central nervous system and higher blood-brain barrier permeability. *Exp Parasitol* 126, 167-177.
- Su, C., Khan, A., Zhou, P., Majumdar, D., Ajzenberg, D., Darde, M.L., Zhu, X.Q., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M., Dubey, J.P., Sibley, L.D., 2012. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 5844-5849.
- Su, C., Zhang, X., Dubey, J.P., 2006. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. *Int J Parasitol* 36, 841-848.

- Tait, E.D., Hunter, C.A., 2009. Advances in understanding immunity to *Toxoplasma gondii*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 104, 201-210.
- Taniguchi, Y., Appiah-Kwarteng, C., Murakami, M., Fukumoto, J., Nagamune, K., Matsuo, T., Masatani, T., Kanuka, H., Hoshina, T., Kitoh, K., Takashima, Y., 2018. Atypical virulence in a type III *Toxoplasma gondii* strain isolated in Japan. Parasitol Int 67, 587-592.
- Tao, Q., Fang, R., Zhang, W., Wang, Y., Cheng, J., Li, Y., Fang, K., Khan, M.K., Hu, M., Zhou, Y., Zhao, J., 2013. Protective immunity induced by a DNA vaccine-encoding *Toxoplasma gondii* microneme protein 11 against acute toxoplasmosis in BALB/c mice. Parasitol Res 112, 2871-2877.
- Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M., 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol 30, 1217-1258.
- Tibayrenc, M., Kjellberg, F., Arnaud, J., Oury, B., Breniere, S.F., Darde, M.L., Ayala, F.J., 1991. Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. Proc Natl Acad Sci U S A 88, 5129-5133.
- Unzaga, J., Venturini, L., Lizziero, M., Venturini, M., Lorenzo, C.D., DBacigalupe, 1996. Abortos en cabras por *Toxoplasma gondii*. . In: XI Reunión Anual de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico., Azul, Argentina, p. Póster 16.
- Venturini, M.C., Quiroga, M.A., Risso, M.A., Lorenzo, C.D., Omata, Y., Venturini, L., Godoy, H., 1996. Mycotoxin T-2 and aflatoxin B1 as immunosuppressors in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. J Comp Pathol 115, 229-237.
- Wang, H.L., Wen, L.M., Pei, Y.J., Wang, F., Yin, L.T., Bai, J.Z., Guo, R., Wang, C.F., Yin, G.R., 2016. Recombinant *Toxoplasma gondii* phosphoglycerate mutase 2 confers protective immunity against toxoplasmosis in BALB/c mice. Parasite 23, 12.
- Weiss, L.M., Kim, K., 2014. *Toxoplasma gondii* The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods, First Edition. ELSEVIER, Ed., United Kingdom, 1085 p.
- Xiao, J., Yolken, R.H., 2015. Strain hypothesis of *Toxoplasma gondii* infection on the outcome of human diseases. Acta Physiol (Oxf) 213, 828-845.
- Xu, Y., Wang, X., Liu, J., Fu, Y., Xu, J., Liu, Q., 2018. *Toxoplasma gondii* rhoptry protein38 (TgROP38) affects parasite invasion, egress, and induces IL-18 secretion during early infection. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 50, 766-775.
- Zuur, A., Ieno, E.N., Walker, N., Saveliev, A.A., Smith, G.M., 2009. Mixed Effects Models and Extensions in Ecology with R. Springer, 608 p.