

UNIVERSIDAD DE QUINDÍO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Inhibición de la invasión y multiplicación de *Toxoplasma gondii* en células epiteliales de colon humano por un anticuerpo monoclonal contra la proteína SAG2

Dr. Jhon Carlos Castaño Osorio,¹ Lic. Ricardo Marcet Sánchez,² Téc. Raymundo Cox Iraola³ y Dr. Jorge Sarracent Pérez⁴

RESUMEN

Se demostró mediante un ensayo de incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU), que un anticuerpo monoclonal murino, de la subclase IgG1 contra la proteína de superficie SAG2 de *Toxoplasma gondii*, es capaz de reducir la invasión y multiplicación del parásito en células de la línea altamente diferenciada secretora de mucina HT29-18N2, proveniente de un adenocarcinoma de colon humano. Este resultado demuestra la importancia de la proteína de superficie SAG2 de *T. gondii* en la invasión y posterior multiplicación del parásito en la célula hospedera.

DeCS: TOXOPLASMA/crecimiento & desarrollo; BROMO-DESOXIURIDINA; ANTICUERPOS MONOCLONALES; PROTEINAS DE LA MEMBRANA; ANIMALES DE LABORATORIO; RATONES CONSANGUINEOS BALB/C; CELULAS EPITELIALES; TOXOPLASMOSIS; NEOPLASMAS DEL COLON.

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado, que presenta una alta distribución en la naturaleza. La enfermedad humana producida por *T. gondii* es una causa importante de morbilidad y mortalidad en neonatos y pacientes inmuno-deprimidos.¹⁻⁷

Este protozoario es capaz de replicarse en todas las células nucleadas. Como parásito intracelular obligado, el proceso de invasión celular es fundamental para su supervivencia y diseminación. Este es un proceso activo dirigido por el parásito y se basa en una serie de interacciones entre la membrana de superficie del parásito y las moléculas localizadas en la superficie del hospedero. Estas proteínas de la membrana

del parásito son los primeros candidatos para ser utilizados en la búsqueda de vacunas contra esta parasitosis.⁸⁻¹³

La superficie del taquizoíto de *T. gondii* está dominada por 5 proteínas mayoritarias, que han sido implicadas como ligandos mediante los cuales se realiza el reconocimiento celular y la adhesión del parásito a la célula hospedera. De estas la P30(SAG1) y la P22(SAG2) son las más abundantes.¹⁰⁻¹⁴ La proteína de membrana SAG2 es la segunda en abundancia en la superficie del taquizoíto de *T. gondii* y, al igual que la SAG1 solo está presente en este estadio.¹⁵⁻²⁰

Se ha sugerido que la SAG2 puede ser un ligando del parásito para acoplarse con los

¹ Máster en Ciencias.

² Licenciado en Bioquímica.

³ Técnico en Veterinaria.

⁴ Doctor en Ciencias Biológicas. Licenciado en Bioquímica.

receptores de la célula hospedera y que está involucrada en los procesos de invasión celular, específicamente en la reorientación apical del parásito.¹⁵ Estudios anteriores han obtenido resultados contradictorios en cuanto al papel de los anticuerpos monoclonales (AcM) dirigidos contra esta proteína en la invasión y multiplicación en las células del hospedero. *Grimwood* reportó que la utilización de 2 AcM contra la SAG2 favorecen la invasión,¹⁵ y sugiere que los anticuerpos que reconocen la proteína causaron una acumulación de los taquizoítos sobre la membrana de la célula hospedera; mientras que *Channon* demostró que cuando se bloquea esta proteína con otro AcM, disminuye claramente la invasión.¹⁴

El propósito en este trabajo fue primero validar un sistema *in vitro* con la utilización de un clon de células proveniente de la línea HT29, para estudiar los procesos de invasión y multiplicación intracelular de taquizoítos de *T. gondii* con el empleo de bromodeoxiuridina (BrdU), un análogo de la timidina como marcador, para después evaluar en estos eventos el efecto de un anticuerpo monoclonal (AcM) dirigido contra la SAG2.

MÉTODOS

ANIMALES

Ratones OF1 (Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorios-CENPALAB, La Habana).

Ratones BALB/c (CENPALAB, La Habana).

LÍNEAS CELULARES

La línea celular de mieloma murino Sp2/O-Ag14 (ATCC:CRL-1581), se cultivó en frasco de 125 mL en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino inactivado con calor (BFSHI) 10 % y solución de antibióticos-antimicóticos (Sigma, EE.UU.). Se utilizó para la obtención de los anticuerpos monoclonales (AcM).

La línea de células Vero (ATCC: CCL-81), se cultivó en frasco de 125 mL con medio 199 suplementado con BFSHI 2 % y solución de antibióticos hasta lograr la formación de una

monocapa. Se utilizó para la producción de los taquizoítos de *Toxoplasma gondii*.

El clon HT29-18N2 donado gentilmente por el doctor Boris Luis Rodríguez del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, derivado de la línea HT29 (ATCC HTB38) obtenida a partir de un adenocarcinoma de colon humano y que tiene la capacidad de diferenciarse en un medio que contiene glucosa y libre de proteínas,²¹ se utilizó para realizar los ensayos de invasión y multiplicación intracelular de los taquizoítos de *T. gondii*. Estas células se cultivaron en placas de cultivo de 96 pozos de fondo plano (*Nunclon*[®], Suiza) en medio *medio eagle* modificado por Dulbecco (DMEM) glucosado (4,5 g/L), suplementado con BFSHI, hasta lograr una monocapa y ser después diferenciadas por la eliminación del suero mediante lavado con solución salina fisiológica (SSF) estéril y la adición de medio para hibridomas libre de proteínas (PFHM-II; Gibco) para inducir su diferenciación.

PARÁSITOS

La cepa RH de *T. gondii*, aislada por *Sabin* en 1941 de un caso de toxoplasmosis congénita,²¹ se caracteriza por ser altamente virulenta en ratones, con una dosis letal (LD100) a los 10 d que oscila entre 1-10 parásitos, cuando se administran los taquizoítos por vía intraperitoneal.²² Se utilizaron taquizoítos de la cepa RH para la obtención de antígeno a emplear en los esquemas de inmunización, ensayos inmunoenzimáticos, inmunofluorescencia, electroforesis e inmunotransferencia; los taquizoítos fueron mantenidos por pases intraperitoneales en ratones OF1 y subcultivados en células Vero.

Para obtener los taquizoítos de *T. gondii* marcados con BrdU, se infectó la monocapa de células Vero con taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii*, el cultivo se mantuvo en medio 199 suplementado con BFSHI 2 % antibióticos y BrdU (10 µmol), hasta que se logró una lisis total de la monocapa por los parásitos. Se procedió a recuperarlos por centrifugación del medio a 1 000 g por 10 min a 4°C; se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en medio PFHM-II para su posterior utilización en los ensayos de invasión intracelular.

La viabilidad de los parásitos antes de cada experimento se verificó por la coloración con azul de tripano y se utilizaron solo los lotes con viabilidad de 95 % o más.

ANTÍGENOS DE TOXOPLASMA

Un extracto total de antígenos solubles enriquecidos en proteínas de membrana se obtuvo por sonicación a 10 000 Hz en 5 ciclos de 30 s cada uno, de una suspensión en solución salina tamponada con fosfatos (SSTF) de 3×10^9 taquizoítos frescos de la cepa RH, obtenidos en células Vero y purificados por filtración a través de un filtro de policarbonato de 3 μm de tamaño de poro (*Nucleopore. Inc*, Cambridge, EE.UU.). El sonificado se centrifugó a 10 000 g por 30 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. Para enriquecer esta preparación en proteínas de membrana, se agregó Triton x 100 (sigma, EE.UU.) 0,1 %. Se adicionó una mezcla de inhibidores de proteasas (phenyl methyl sulfonyl fluoride 5 mmol, pepstatin A 1 μmol , EDTA 1 μmol), se filtró por membrana de 0,2 μm y se determinó la concentración de proteínas por el método de Smith.²³

ANTICUERPO MONOCLONAL CONTRA LA PROTEÍNA MAYORITARIA DE LA MEMBRANA SAG2 DE *T. gondii*

Los anticuerpos monoclonales de ratón contra las proteínas mayoritarias de la superficie del taquizoíto de *T. gondii*, SAG1 (3G9C9) y SAG2 (1B11C9) del isotipo IgG1, se produjeron en el laboratorio mediante fusión con polietilén glicol (hybri-max-sigma, EE.UU.) entre linfocitos del bazo de un ratón BALB/c previamente inmunizado con 3×10^6 taquizoítos formalizados de la cepa RH de *T. gondii* y las células de mieloma murino Sp2/0-Ag14 (ATCC Number:CRL-1581). Se emplearon los procedimientos generales de la tecnología de obtención de hibridomas.²⁴

Los híbridos productores seleccionados se inocularon intraperitonealmente en ratones BALB/c y a partri del líquido ascítico producido se purificaron los anticuerpos por cromatografía de afinidad en columnas de proteína A-Sepharosa (Amersham-Pharmacia Biotech) con las recomendaciones del productor. Una vez

purificados se dializaron contra SSTF y se estimó la concentración de proteínas por el método de Smith. La solución de anticuerpos se esterilizó mediante filtración en membra de 0,22 μm y la concentración se ajustó a 1 mg/mL para los diferentes ensayos.

VALIDACIÓN DE LAS CÉLULAS HT29-2N18 COMO MODELO *IN VITRO*

A continuación se hace la validación de estas células como modelo *in vitro* de la incorporación de la BrdU para medir la invasión y multiplicación de *T. gondii* sobre células epiteliales de intestino humano (HT29-18N2).

En 2 placas de 96 pozos se sembraron células HT29-18N2 en medio DMEM, 25 pozos en cada una a una concentración de 5×10^3 células por pozo. Se permitió la formación de una monocapa en medio DMEM y se diferenciaron a enterocitos con el medio libre de proteínas y con glucosa (PFHM II-Gibco) durante 96 h. Se trataron los pozos por quintuplicado con diferentes concentraciones de interferón gamma (INF γ) humano recombinante (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología [CIGB], Cuba) 0 (10 pozos), 5 (5 pozos), 50 (5 pozos) y 500 (5 pozos) U/mL mediante un protocolo similar al descrito por *Dimer* y *Bout* cuando utilizaron células Caco2 (ATCC:HTB37), también provenientes de un adenocarcinoma de colon humano.²⁵

A las 22 h de tratamiento con el INF γ , se lavó la capa de células 2 veces con solución salina fisiológica y se adicionaron a las 2 placas taquizoítos vivos de la cepa RH de *T. gondii* a una concentración de 50 000 taquizoítos por pozo, 3 h más tarde se lavó de nuevo la capa celular, y a una de las placas se le añadió el medio sin suero que contenía uracilo tritiado (*Amersham Pharmacia Biotech*). A las 16 h se detuvo el cultivo y se cosecharon los pozos en un cosechador SKATRON y se realizó la lectura en un contador de centelleo. A la otra placa se le adicionó BrdU, un análogo de la timidina que se utiliza para cuantificar la proliferación celular. A las 16 h se detuvo el cultivo y se procesó siguiendo las instrucciones del juego de reactivos para medir la proliferación celular por ELISA de *Boehringer Mannheim*. En un cultivo en paralelo en idénticas

condiciones, pero en placas de 24 pozos con laminillas redondeadas (*Nunc7*) en el fondo, después del tratamiento con el $\text{INF}\gamma$, se lavó la capa celular y se adicionaron los taquizoítos (250 000 por pozo), a las 3 h se retiró el medio, se lavaron las láminas con SSTF, se fijaron con metanol y se tiñeron con giemsa para contar el número de parásitos en el interior de cada célula.

Se realizó un análisis de regresión lineal y se calculó el coeficiente de correlación al comparar la media de los resultados obtenidos por las 2 técnicas.

DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CULTIVO DE CÉLULAS HT29-18N2

Para determinar las condiciones óptimas en cuanto al tiempo de incubación y la cantidad de parásitos para estudiar la invasión de los taquizoítos, se realizaron los experimentos siguientes: se cultivaron las células HT29-18N2 en placa de 96 pozos (20 pozos), hasta que formaron la monocapa y después se diferenciaron de la forma antes descrita.

Por otro lado, se obtuvieron taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii* de un ratón inoculado 4 d antes y se adicionaron a un frasco de 75 cm^2 con una monocapa de células Vero mantenidas en medio 199 suplementado con BFSHI 2 %, y se dejaron durante 3 h, se eliminó el medio de cultivo, se lavó la capa celular con SSTF A 37 °C y se adicionó medio fresco que contenía BrdU a concentración $1 \times (10 \mu\text{mol})$ del juego de reactivos para medir la proliferación celular (*Boehringer Mannheim*). Los taquizoítos en el interior de las células Vero, que son por las características del parásito los únicos que se están multiplicando, van a incorporar la BrdU y de esta forma quedan marcados con este

análogo de la timidina (fig. 1). Los taquizoítos se cosecharon una vez lisada toda la capa celular, se contaron en cámara de Neubauer y se determinó su viabilidad con azul de tripano; se utilizaron solo los lotes con una viabilidad superior a 95 %.

Los taquizoítos de *T. gondii* previamente marcados con BrdU, diluidos en 200 μL de medio PFHM-II fueron añadidos a las placas de cultivo de células HT29-18N2 a diferentes concentraciones, 0 taquizoítos por pozo (5 pozos), 10 000 taquizoítos por pozo (5 pozos), 50 000 taquizoítos por pozo (5 pozos) y 100 000 taquizoítos por pozo (5 pozos). Al cabo de 22 h de incubación en atmósfera de CO_2 5 % a 37 °C, se removió el medio y se adicionó la solución de fijación del juego de reactivos, para determinar la proliferación celular basado en la medición de la incorporación de BrdU durante la síntesis de DNA (*Boehringer Mannheim*). Se incubó por 30 min a temperatura ambiente, luego se removió esta solución y se adicionó el anticuerpo monoclonal anti BrdU-POD. Seguidamente, se incubó por 90 min adicionales, después se realizó el ciclo de lavados, se adicionó el sustrato y se detuvo la reacción a los 15 min con H_2SO_4 12,5 %. La lectura se efectuó a una longitud de onda de 450 nm.

Para determinar el tiempo óptimo para la invasión, se sembraron 30 pozos de una placa de 96 pozos, con células HT29-18N2, se les permitió formar monocapa y diferenciarse y se adicionó por tiempos variables desde 30 min hasta 24 h, por quintuplicado, una concentración de 10 000 taquizoítos marcados con BrdU por pozo. Al concluir cada tiempo experimental, se retiró el medio de cultivo y se procedió mediante las instrucciones del juego de reactivos para determinar la incorporación de BrdU al DNA.

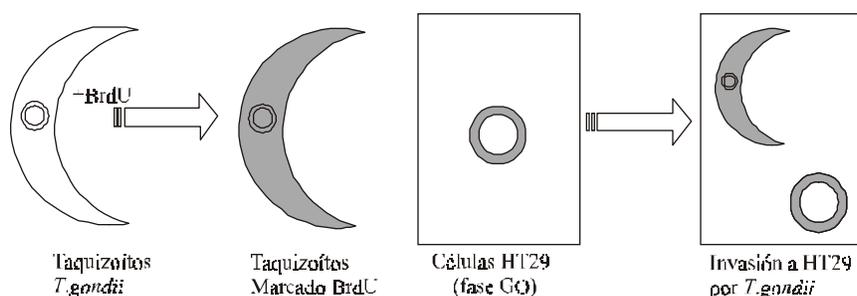


Fig. 1. Ensayo para determinar invasión de taquizoítos de *T. gondii* en células HT29, mediante un sistema de incorporación de BrdU.

Para los ensayos de multiplicación intracelular, se adicionaron los taquizoítos sin marcar previamente con BrUd (fig. 2), se incubaron con las células durante 2 h, se lavó la capa celular con medio PFHM-II (Gibco) y se adicionó medio fresco suplementado con BrUd $1 \times (10 \mu\text{mol})$. Se incubaron a 37°C por 16 h, al cabo de las cuales se retiró el medio, se lavó la capa celular 3 veces con SSTF estéril y se adicionó la solución de fijación. Se siguió el procedimiento descrito antes para el uso del juego de reactivos.

ENSAYOS *IN VITRO* DEL EFECTO DEL AcM ANTI SAG2 SOBRE LOS PROCESOS DE INVASIÓN Y MULTIPLICACIÓN DE *T. gondii* CON BrdU

Una vez obtenida la monocapa de las células HT29-18N2 en la placa de 96 pozos y realizada la diferenciación, se adicionaron 10 000 taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii* marcados con BrdU por pozo. Los ensayos se realizaron por quintuplicado.

Grupo 1: control de células que no fueron infectadas

Grupo 2: control de células y taquizoítos

Grupo 3: células y taquizoítos preincubados por 1 h a 37°C con 1 mg/mL de anticuerpo monoclonal anti-SAG2 diluido en medio de cultivo PFHM-II.

Grupo 4: células y taquizoítos preincubados por 1 h a 37°C con 1 mg/mL de un anticuerpo monoclonal no relacionado de la misma subclase IgG1, diluido en medio de cultivo PFHM-II (contra *Giardia lamblia*, desarrollado en el laboratorio de Parasitología del IPK).

Este ensayo se realizó 3 veces con resultados similares, se muestran los resultados de uno de los ensayos.

Para determinar el efecto sobre la multiplicación, se realizó como está descrito anteriormente, con la única diferencia de que solo los taquizoítos se incubaron por 1 h con el AcM anti SAG2 (TgB11) a una concentración de 1 mg/mL antes del experimento.

Se realizó un ensayo de multiplicación intracelular donde se adicionaron concentraciones crecientes de parásitos vivos tratados con el AcM anti SAG2 (10, 20, 30, 40 y 50 000 taquizoítos por pozo). Se compararon los resultados con un grupo de células infectadas con 10 000 taquizoítos vivos sin marcar incubados previamente con el AcM anti-*giardia*, del mismo subtipo. La BrdU a una concentración 1x se adicionó al cabo de 3 h cuando ya se había realizado la invasión de los taquizoítos a la célula hospedera HT29-18N2, para asegurar que la actividad encontrada cuando se realizó la lectura del ELISA, se deba a la incorporación de BrdU al DNA de los nuevos parásitos. Luego se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente.

El objetivo de este experimento fue descartar que el efecto del AcM anti-SAG2 sobre la multiplicación intracelular era producto de una inhibición en la penetración de los parásitos a las células HT29-18N2.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se analizaron con métodos de análisis no paramétricos como Kruskal Wallis y Mann-Whitney mediante el programa TRUE EPISTAT y STATGRAPHIC.

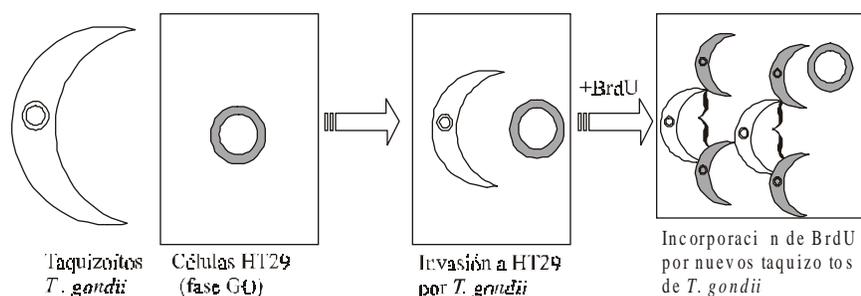


Fig. 2. Ensayo para determinar multiplicación de taquizoítos de *T. gondii* en células HT29, mediante un sistema de incorporación de BrdU.

RESULTADOS

Validación del modelo con la utilización de células HT29-18N2 y la bromodeoxiuridina como marcador del proceso de multiplicación del parásito

En el tratamiento con $\text{INF}\gamma$ no afectó la penetración de los taquizoítos a las células HT29-18N2. En las laminillas teñidas con giemsa, en todos los grupos se observó un número similar de parásitos en el interior de las células.

En el sistema de incorporación de uracilo tritiado como indicativo de la multiplicación intracelular de los taquizoítos de *T. gondii* en las células HT29, se encontró un efecto inhibitorio sobre este evento del $\text{INF}\gamma$ recombinante, en concordancia con los experimentos efectuados por *Dimer* y *Bout*, quienes realizaron un estudio similar pero con la utilización como modelo de células Caco-2 que se diferencian a células epiteliales intestinales en medio DMEM con 10 % de suero.

Se encontró una buena correspondencia entre el ensayo con BrdU para medir la multiplicación celular y el ensayo con uracilo tritiado con los mismos fines en las células HT29 (coeficiente de correlación: 0,98, análisis de varianza: $p < 0,01$) lo que permitió prescindir del uso del isótopo marcado (fig. 3).

Se adoptó como óptima la concentración de 10 000 parásitos por pozo y como tiempo de incubación 22 h para los ensayos de invasión, pues fue la cantidad de parásitos y el tiempo donde se logró una máxima incorporación de BrdU sin lisis de la monocapa (figs. 4 y 5).

Ensayos in vitro de inhibición de la invasión y multiplicación intracelular de taquizoítos de T. gondii a células HT29-18N2 con un anticuerpo monoclonal contra la proteína de superficie SAG2 del taquizoíto de T. gondii

Al incubar previamente los taquizoítos de *T. gondii* ya marcados con BrdU, con el anticuerpo monoclonal anti SAG2, se observó una

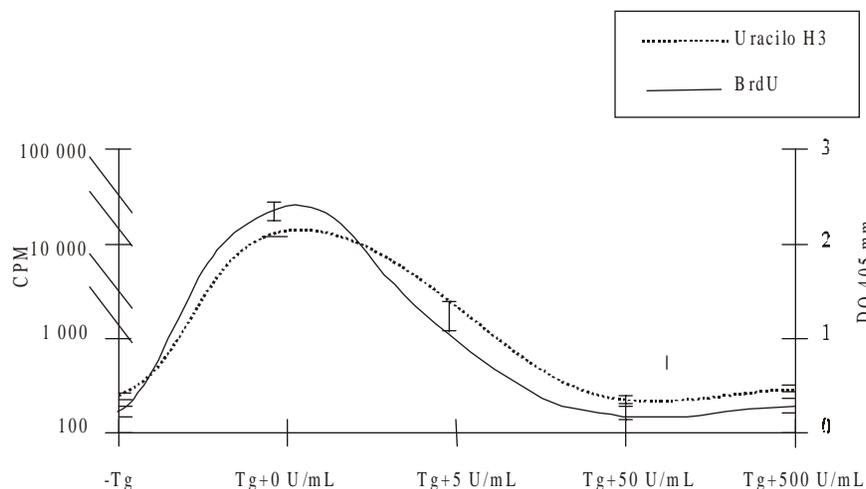


Fig. 3. Comparación del sistema de radiomarcaje con uracilo tritiado y con BrdU para determinar el efecto de diferentes concentraciones de $\text{INF}\gamma$ (0, 5, 50, 500 U/mL) sobre la multiplicación de los taquizoítos de *T. gondii* (50 000 parásitos/pozo) en el modelo de células HT29-18N2. Las barras representan la media \pm DE de quintuplicados. Coeficiente de correlación: 0,98, análisis de varianza, $p < 0,01$.

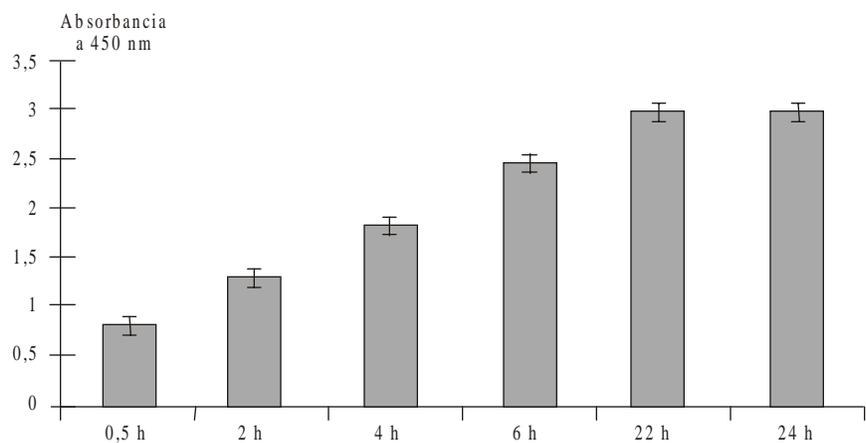


Fig. 4. Prueba de invasión con taquizoítos de la cepa RH de *T. gondii* en células HT29 a concentración de 10 000 parásitos por pozo a diferentes tiempos de incubación. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos hasta lograr la monocapa y su diferenciación en un medio libre de suero. Las barras representan el promedio \pm DE de quintuplicados de 1 de las experiencias.

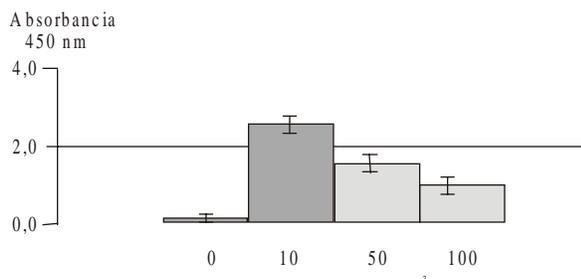


Fig. 5. Invasión de *T. gondii* en células HT29 con diferentes concentraciones de inóculo de taquizoítos a las 22 h de incubación. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pozos y se adicionaron diferentes concentraciones de taquizoítos (0, 10, 50, 100 x 10³) por pozo. Los datos presentados son el promedio ± DE de quintuplicados de una de las experiencias.

modificación estadísticamente significativa en la tasa de invasión al sistema de células epiteliales de colon humano HT29, en relación con los taquizoítos incubados con AcM no relacionado y con los incubados con SSTF. Se presentan los resultados de una de las experiencias (fig. 6). Este experimento se repitió 3 veces en iguales condiciones con resultados similares.

El efecto en la multiplicación intracelular del parásito en este sistema celular evidenció una inhibición de este evento, cuando se infectaron con taquizoítos previamente incubados con el anticuerpo monoclonal anti SAG2 (fig. 7). Se obtuvieron resultados similares en otros 2 experimentos realizados en las mismas condiciones.

En el experimento para descartar que el efecto sobre la multiplicación fuera producto de que una menor cantidad de parásitos tratados con el AcM penetraran a las células, se encontró de forma consistente valores menores de absorbancia en los grupos tratados con el monoclonal, lo que permitió verificar un claro efecto del AcM anti SAG2 sobre la multiplicación intracelular, el cual se mantiene a pesar del incremento de la carga parasitaria (fig. 8).

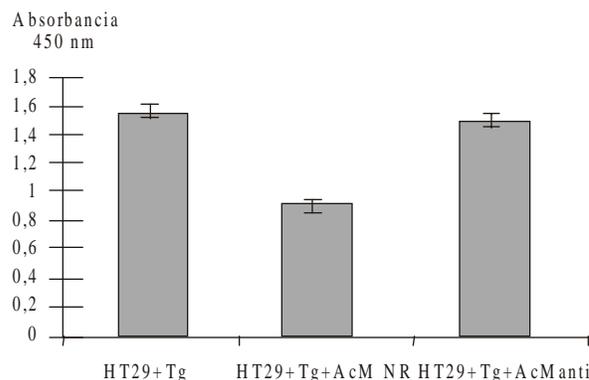


Fig. 6. Efecto del anticuerpo monoclonal contra la proteína de superficie SAG2 (1 mg/mL) de *T. gondii* en la invasión de células HT29. Los datos presentados son el promedio ± DE de quintuplicados de 1 de las experiencias. Se calcularon K Wallis, $p < 0,05$. Prueba de Mann-Whitney: *T. gondii* vs AcM anti SAG2 $p < 0,01$, *T. gondii* vs AcM no relacionado, $p > 0,05$; AcM antiSAG2 vs AcM no relacionado $p < 0,01$.

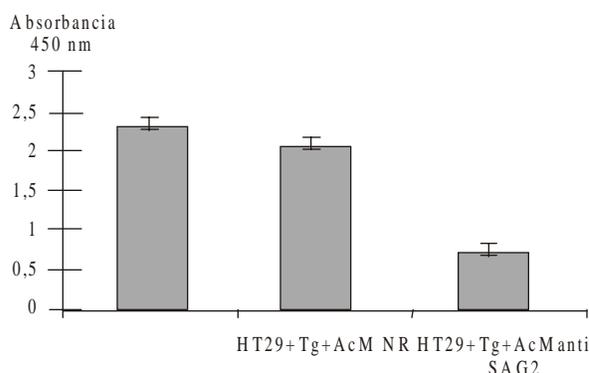


Fig. 7. Efecto del anticuerpo monoclonal contra la proteína de superficie SAG2 (1 mg/mL) de *T. gondii* en la multiplicación de los taquizoítos de *T. gondii* en las células HT29. Las células fueron cultivadas en placa de 96 pozos y se utilizaron 1 000 células por pozo y 10 000 taquizoítos. Los datos presentados son el promedio ± DE de quintuplicados de 1 de las experiencias. Krushall Wallis: $p < 0,01$ Mann-Whitney: células infectadas con *T. gondii* vs células infectadas con *T. gondii* incubadas con anticuerpo monoclonal anti SAG2 $p < 0,01$. Células infectadas con *T. gondii* e incubadas con AcM no relacionado vs células infectadas con *T. gondii* incubadas con AcM anti SAG2 $p < 0,01$. Células infectadas con *T. gondii* vs células infectadas con *T. gondii* incubadas con AcM no relacionado $p > 0,05$.

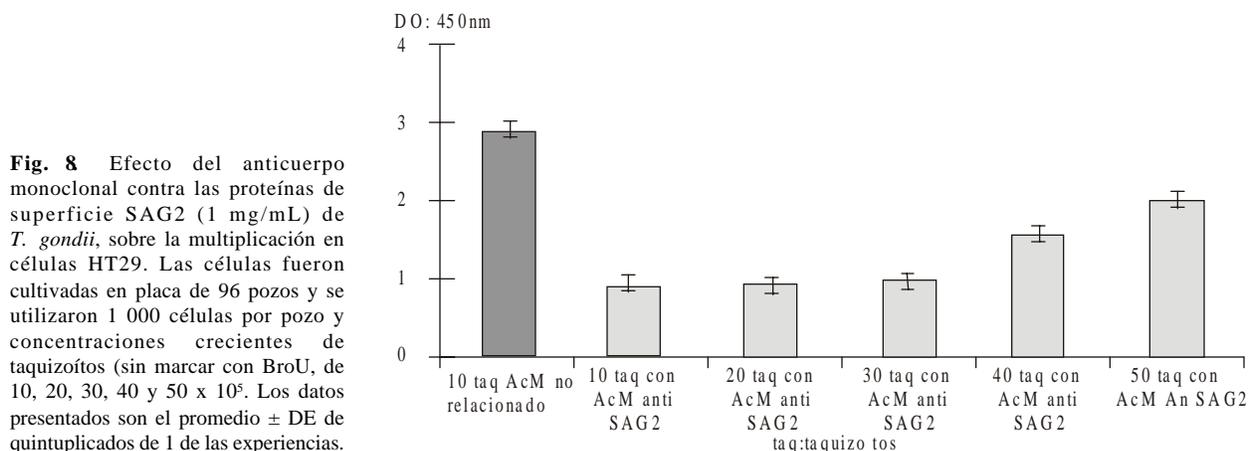


Fig. 8 Efecto del anticuerpo monoclonal contra las proteínas de superficie SAG2 (1 mg/mL) de *T. gondii*, sobre la multiplicación en células HT29. Las células fueron cultivadas en placa de 96 pozos y se utilizaron 1 000 células por pozo y concentraciones crecientes de taquizoítos (sin marcar con BroU, de 10, 20, 30, 40 y 50 x 10⁵). Los datos presentados son el promedio ± DE de quintuplicados de 1 de las experiencias.

DISCUSIÓN

La utilización de los modelos *in vitro* para el estudio de los fenómenos de interacción hospedero parásito es de gran utilidad. *Dimier y Bout* utilizaron como modelo para medir la multiplicación de los taquizoítos de *T. gondii* las células epiteliales intestinales Caco-2 provenientes de un adenocarcinoma de colon humano, que en condiciones de cultivo son moderadamente diferenciadas y se mantienen todo el tiempo en medio DMEM con 10 % de suero fetal de ternero.²⁵ La célula HT29 es una línea moderadamente diferenciada obtenida a partir de tejido epitelial de un adenocarcinoma de colon humano. El clon HT29-18N2 derivado de esta línea en un medio libre de proteínas y con glucosa se diferencia en monocapas de células con forma de cáliz invertido, llenas de gránulos de *mucus* y segregan al medio componente secretor.

Si se tiene en cuenta que la mucosa intestinal humana está recubierta por una capa epitelial de enterocitos y células en forma de cáliz invertido y que con estas células altamente diferenciadas es posible trabajar con medio libre de la influencia del suero de otra especie, se puede afirmar que el modelo de este estudio es mucho más cercano a lo que en realidad puede ocurrir en el epitelio intestinal que el empleado por *Dimer y Bout*.²⁵

Hasta el presente se han realizado muchos estudios con la utilización de proteína SAG1, a pesar de la SAG2 ser la segunda proteína más abundante en la superficie. Después de los experimentos de *Luden* y otros, 1997,¹⁹ quedó en parte relegada al olvido. Sin embargo, hay algunos antecedentes que apuntan a que la SAG2 es una proteína importante en la fisiología del parásito. La proteína SAG2 en su forma nativa o recombinante ha sido reconocida por paneles de sueros de individuos con toxoplasmosis aguda o crónica, que muestra una respuesta fuerte en los individuos en fase aguda.^{17,18}

Grimwood y Smith reportaron que la utilización de 2 AcM contra la SAG2 favorece la invasión,¹⁵ esto sugiere que los anticuerpos que reconocen la proteína causaron una acumulación de los taquizoítos sobre la membrana de la célula

hospedera y que cuando la presión del anticuerpo se retira, esta población de parásitos entra a la célula y resulta en un incremento global de la invasión, esto sugiere que la entrada de los parásitos "inmovilizados" sobre la superficie de la célula hospedera puede ser por causa de la regeneración de la SAG2 o a la fagocitosis por la célula hospedera. Hace poco, *Channon* demostró que cuando se bloquea esta proteína con otro AcM, disminuye claramente la invasión.¹⁴

Los resultados obtenidos en este trabajo con el anticuerpo monoclonal contra la proteína de superficie SAG2 del taquizoíto de *T. gondii* reafirman los reportes previos sobre el importante papel de esta proteína en los procesos de invasión y multiplicación a la célula hospedera.¹⁰⁻¹²

Los efectos observados pueden explicarse por la acción directa de interferencia del anticuerpo monoclonal sobre la proteína de superficie contra la que fue desarrollado. Este anticuerpo podría estar modificando los mecanismo de anclaje del parásito a la célula hospedera así como impedir la penetración activa por bloqueo de la actividad de esta proteína.

El efecto en la multiplicación intracelular del parásito por el AcM TgB11 puede explicarse en primera medida por una disminución en el número de parásitos que penetran a la célula hospedera; sin embargo, como se pudo corroborar, el efecto en la inhibición de la multiplicación se mantuvo aún con grandes variaciones en la carga del parásito, lo que podría estar mostrando la importancia de la proteína de superficie SAG2, pues el efecto de la inhibición sobre la multiplicación persistió después del fenómeno de invasión celular en los procesos biológicos subsecuentes a la invasión por *T. gondii* y contrario a los sugerido por *Channon* y otros,¹⁴ no se encontraron evidencias de regeneración de la proteína SAG2.

El análisis de estos resultados incita a realizar nuevos experimentos para profundizar el papel de esta proteína en los mecanismos inmunes que desarrolla el hospedero contra el parásito.

AGRADECIMIENTOS

A BID-COLCIENCIAS y a la Universidad del Quindío por la financiación para la realización de este trabajo.

SUMMARY

By an bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation assay, it was proved that an IgG1 subclass, murine monoclonal antibody to surface protein SAG2 of *Toxoplasma gondii* is capable of reducing the invasion and multiplication of the parasites in highly differentiated mucine secretory HT29-18N2 line cells from a human colon adenocarcinoma. This result shows the importance of surface protein SAG2 of *T.gondii* in invasion and further multiplication of parasites in the host cell.

Subject headings: TOXOPLASMA/growth & development; BROMO-DESOXYURIDINE; ANTIBODIES, MONOCLONAL; MEMBRANE PROTEINS; ANIMALS, LABORATORY; MICE, INBRED BALB C/immunology; EPITHELIAL CELLS; TOXOPLASMOSIS; COLONIC NEOPLASMS.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Frenkel JK. Epidemiología de la infección por *Toxoplasma gondii* en humanos. Memorias Segundo Congreso Internacional de Toxoplasmosis; 1998. Junio 4-6; Santa Fe de Bogotá: Universidad de los Andes, 1998.
- Kasper LH, Buzoni-Gate D. Some opportunistic parasitic infections in AIDS: candidiasis, pneumocytosis, cryptosporidiosis, toxoplasmosis. *Parasitol Today* 1998;14:150-6.
- Gómez JE, Montoya MT, Castaño JC. A Maternal Screening Program for Congenital Toxoplasmosis in Quindío, Colombia and application of mathematical models to estimate incidences using age-stratified data. *Am J Trop Med Hyg* 1997;57:180-6.
- Hunter D, Remington JS. Immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis. *J Infect Dis* 1994;170:1054-67.
- Kapperud G, Jenum P, Stray, Melby K, Eskild A, Eng J Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. *Am J Epidemiol* 1996;144:405-12.
- Brezein AP, Kasner L, Thulliez PH, Li Q, Daffos F, Nussenblatt RB et al. Ocular toxoplasmosis in the fetus. Immunohistochemistry analysis and DNA amplification. *Retina* 1994;14:19-26.
- Wong SY, Remington JS. State of the art clinical article. Toxoplasmosis in pregnancy. *Clin Infect Dis* 1994;18:853-62.
- Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis* 1992;15:211-22.
- Kasper LH, Mineo JR. Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Today*. 1994;10:184-8.
- Tomavo S. The major surface proteins of *Toxoplasma gondii*: structures and functions. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;219:82-9.
- Boothroyd JC, Hehl A, Knoll LJ, Manger ID. The surface of *Toxoplasma*: more and less. *Int J Parasitol* 1998;28:3-9.
- Smith JE. An ubiquitous intracellular parasite: the cellular biology of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 1996;25:1301-9.
- Channon JY, Suh EI, Seguin RM, Kasper LH. Attachment ligands of viable *Toxoplasma gondii* induce soluble immunosuppressive factors in humans monocytes. *Infect Immun* 1999;67:2547-51.
- Grimwood J, Smith JE. *Toxoplasma gondii*: the role of a 30 kDa surface and secreted proteins in host cell invasion. *Exp Parasitol* 1992;74:106-11.
- Grimwood J, Smith JE. The role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion. *Int J Parasitol* 1996;26:169-73.
- Parmely SF, D Sgarlato G, Mark J, Prince JB, Remington JS. Expression, characterization, and serological reactivity of recombinant surface antigen P22 of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* 1992;30:1127-33.
- Prince JB, Auer KL, Huskinson J, Parmely SF, Aruajo FG, Remington JS. Cloning, expression and cDNA sequence of surface antigen P22 from *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 1990;43:97-106.
- Parmley SF, Gross U, Sucharczurk A, Windeck T, Sgarlato GD, Remington JS. Two alleles of the gene encoding surface antigen P22 in 25 strains of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol*. 1994;80:293-301.
- Lundén A, Parmely SF, Lövgren Bengtsson K, Aruajo FG. Use of a recombinant antigen, SAG2, expressed as glutathione-S-transferase fusion protein to immunize mice against *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res* 1997;83:6-9.
- Phillips TE, Ramos R, Ducan SL. Differentiation of the HT29-18N2 human adenocarcinoma cell line in a protein-free medium: effect of insulina and transferrin. *In vitro Cell Dev Biol* 1995;31:421-3.
- Sabin AB. Toxoplasmic encephalitis in children. *JAMA* 1941;116:801-7.
- Howe DK, Summers BC, Sibley LD. Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 1996;64:5193-8.
- Smith PK, Krohn RI, Hemanson GT. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150:76-85.
- Gavilondo Cowley J. Anticuerpos monoclonales. Teoría y práctica. Elfos Scientiae La Habana: 1995.
- Dimier IH, Bout DT. Inhibition of *Toxoplasma gondii* replication in INF-g-activated human intestinal epithelial cells. *Immunol Cell Biol* 1997;75:511-4.

Recibido: 4 de marzo del 2001. Aprobado: 9 de mayo del 2001.
Dr. Jhon Carlos Castaño Osorio. Universidad del Quindío. Carrera 15 Calle 12 Norte. Armenia. Quindío. Colombia. SA. Correo electrónico:jhonc@multi.net.co,yiyuma@yahoo.com