

Producción de Anticuerpos Policlonales IgG contra una Proteína con Actividad Oxido Nítrico Sintetasa de *Toxoplasma gondii* recombinante (NOS-Tg-r) e Inmunomarcaje en Taquizoitos.

JONATHAN MAURICIO PADILLA-LONDOÑO¹

Director: Jorge Enrique Gómez Marin ¹ MD, MSc, PhD

Centro de investigaciones en Biomédicas Universidad del Quindío

¹ Grupo de Estudio en Parasitología Molecular (GEPAMOL). Universidad del Quindío. Armenia, Colombia.

RESUMEN

La oxido nítrico sintetasa NOS es una enzima bien descrita en mamíferos, en los últimos años se ha estudiado en protozoos pero aún se desconoce aspectos importantes de su función en estos organismos. En este trabajo se logró producir anticuerpos policlonales con la proteína recombinante con actividad Oxido Nítrico Sintetasa (NOS-Tg-r) de *Toxoplasma gondii* e inmunomarcas sus taquizoitos. Se utilizó como modelo animal conejos Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*), dos como objeto de estudio (conejo 1 y conejo 2), cuatro como control negativo (conejo 3 al conejo 6). Se inmunizó por vía intramuscular con la proteína NOS-Tg-r, y dos tipos de adyuvantes: hidróxido de aluminio y adyuvante de Freund (completo e incompleto), se realizaron cuatro inoculaciones a cada uno, conejo 1 con hidróxido de aluminio y conejo 2 con adyuvante de Freund. Se comprobó la presencia de anticuerpos policlonales en diferentes diluciones del suero (1:20, 1:50 y 1:100) por medio de la técnica de Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) indirecto, el suero pre-inmune de los seis conejos fue el control negativo. Los resultados de las absorbancias obtenidas a 410 nm mostraron que la inoculación de la proteína NOS-Tg-r con Adyuvante de Freund tuvo mayor respuesta inmune que el de la NOS-Tg-r con hidróxido de aluminio y la dilución óptima del suero fue de 1:20 ($p \leq 0.005$). Para verificar la reacción cruzada con los adyuvantes o con otras proteínas recombinantes o no, se realizó una ELISA indirecta usando como antígeno: metaloproteasa de *T. gondii* recombinante, cisteína proteasa 5 de *Entamoeba histolytica* recombinante (EhCP5r), albúmina al 2%, hidróxido de aluminio y adyuvante de Freund, como anticuerpos primarios los sueros preinmunes y el suero obtenido en la octava semana post inoculación. Los valores en los sueros preinmune y de las proteínas no superaron el *cut-off* (0.069), indicando así que los anticuerpos policlonales obtenidos son específicos para la proteína NOS-Tg-r. Además se realizó inmunomarcaje en taquizoitos de *Toxoplasma gondii* por medio de la técnica de inmunofluorescencia indirecta con los sueros con mayor título de anticuerpos según valores de absorbancia (octava semana post inoculación) en diluciones 1:10, 1:50 mostrando un marcaje difuso a nivel de citoplasma sugiriendo la presencia de esta proteína en el taquizoito.

PALABRAS CLAVES: *Toxoplasma gondii*, Taquizoitos, NOS, policlonales, inmunofluorescencia indirecta, hidróxido de aluminio, adyuvante de Freund,

ABSTRACT

The nitric oxide synthase enzyme NOS is well described in mammals. In the past years has been studied in protozoa but it is still unknown important aspects of their role in these organisms. This aim of this work was to produce polyclonal antibodies against the recombinant nitric oxide synthetase protein (NOS-Tg-r) of *Toxoplasma gondii* and to immunolocalize this protein in tachyzoites. It was used as animal model New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), two as an object of study (1 bunny rabbit and 2), four as a negative control (3 rabbit to rabbit 6). It immunized intramuscularly with the NOS protein-Tg-r, and two types of adjuvants: aluminium hydroxide and Freund's adjuvant (complete and incomplete), four inoculations to everyone, rabbit 1 with aluminium hydroxide and rabbit 2 with Freund's adjuvant. We found the presence of polyclonal antibodies in different dilutions of serum (1:20, 1:50 and 1:100) through the technique of enzyme immundassay assay (ELISA), the pre-immune serum of six rabbits was control negative. The results obtained from the absorbance at 410 nm showed that the inoculation of the protein NOS-Tg-r with Freund's Adjuvant had increased immune response to the NOS-Tg-r with 0.005). To verify aluminium hydroxide and dilution optimal serum was 1:20 ($p \leq 0.002$) the cross-reaction with adjuvant or other recombinant proteins or not, we undertook an indirect ELISA using antigen: metaloproteasa *T. gondii* recombinant cysteine protease 5 of *Entamoeba histolytica* recombinant (EhCP5r), albumin 2%, aluminium hydroxide and Freund's adjuvant, as primary antibodies in the sera preinmunes serum obtained in the eighth week post-inoculation. The values in sera preinmune and proteins not exceeded the *cut-off* (0.069), thus indicating that earned polyclonal antibodies are specific to the NOS protein-Tg-r. In addition took place in immunemarked taquizoitos *Toxoplasma gondii* through the indirect immunofluorescence technique with serum antibody more title as absorbance values (eighth week after inoculation) in dilutions 1:10, 1:50 showing a marking diffuse level cytoplasm of suggesting the presence of this protein in the taquizoito .

INTRODUCCIÓN

En Colombia la toxoplasmosis congénita se presenta cada año entre 2 a 10 por cada 1.000 recién nacidos, y por falta de intervención terapéutica, cada año nacen entre 800 a 3.000 bebés infectados con *Toxoplasma gondii* (1, 2). Como consecuencia del impacto sobre la salud visual, la toxoplasmosis en la segunda causa de ceguera infantil en nuestro país (3) y además presenta gran impacto sobre la población de inmunosuprimidos, ya que la toxoplasmosis cerebral es la causa más frecuente de lesiones cerebrales focales en las personas VIH positivo (4).

Una de las principales causas de la permanencia de la infección en las poblaciones es que aún hay desconocimiento de la biología del parásito y su interacción con el hospedero, un ejemplo de esto es la falta de información sobre la enzima oxido nítrico sintetasa (NOS) en este protozoo. Esta enzima está presente en todos los organismos vivos y cumple diferentes funciones como segundo mensajero de diversas rutas metabólicas celulares entre otras (5). Aunque su estudio ha abarcado ampliamente a los mamíferos, en los últimos años se ha empezado a estudiar en algunos invertebrados como moluscos, arácnidos y en microorganismos unicelulares como bacterias y protozoos. Existen reportes de las actividades de NOS en protozoarios tales como *Plasmodium* (6), *Trypanosoma cruzi* (7), *Leishmania* (8), *Tetrahymena* (9), *Toxoplasma gondii* (10) y *Entamoeba histolytica* (11).

En el 2005 Gutiérrez y Gómez (2005) identificaron un gen putativo para una oxido nítrico sintetasa atípica en el genoma de *Toxoplasma gondii*; posteriormente obtuvieron una proteína recombinante a partir del ADN de *T. gondii*, la cual presentó actividad NOS (datos por publicar). Por otro lado la literatura cita que *T. gondii* se ve afectado por la exposición al oxido nítrico (NO) proveniente de NOS inducible encontrada en los macrófagos del hospedero, llevándolo a un cambio de estadio de taquizoito a bradizoito, siendo este último el estado de latencia del parásito (12). Sin embargo no se conoce a profundidad el comportamiento biológico de dicha proteína dentro del parásito ni tampoco su inmunogenicidad.

La detección inmunoquímica, en general, se basa en la producción de anticuerpos específicos (policlonales o monoclonales) para una determinada especie, suponiendo que esta contenga grupos antigénicos diferenciados; estos anticuerpos son de gran interés en diagnóstico e investigación científica; por tanto, hoy en día se hace más exigente no solo su calidad sino también la metodología empleada para su producción (13). Los conejos son los animales más empleados en la obtención de anticuerpos policlonales, debido a que son de fácil manejo y mantenimiento, generan un buen número de anticuerpos en suero y responden bien contra una gran variedad de antígenos (14).

En la actualidad, el hidróxido de aluminio continúa siendo el adyuvante inmunológico más ampliamente utilizado (15). En 1936, Freund desarrolló una emulsión de agua en aceite mineral que contiene micobacterias muertas, lo que actualmente se conoce como adyuvante completo de Freund (ACF) (16). El ACF es uno de los adyuvantes más eficaces, pero es muy reactogénico para ser usado con fines clínicos (17).

Entre las técnicas para inmunodiagnóstico más empleadas son los ensayos inmuno enzimáticos (ELISA), inmunofluorescencia, Western Blot entre otras (18) las cuales son esencialmente de alta

sensibilidad, que aplicado a estudios taxonómicos, ofrece gran versatilidad y niveles de detección en el orden de hasta microgramos (19)

Los principales objetivos de este trabajo fueron la producción de anticuerpos policlonales contra la proteína NOS-Tg-r, la comparación de la actividad inmunogénica de ésta con dos tipos de adyuvantes: hidróxido de aluminio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) y adyuvante completo e incompleto de Freund en conejos Nueva Zelanda y la realización de inmunomarcaje con estos anticuerpos sobre taquizoitos de *Toxoplasma gondii*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimientos previos: La proteína fue cedida por el grupo de parasitología molecular GEPAMOL del Centro de Investigaciones Biomédicas, de la Universidad del Quindío. Ésta proteína se obtuvo a partir de la secuencia putativa (Genebank 16188255) para el gen de la enzima oxido nítrico sintetasa de *Toxoplasma gondii* de 237 pb. La proteína NOS-Tg-r producida por el sistema Baculovirus y purificada a una concentración de 339,75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (5), comprobada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-Tricina, indicando un peso de 11,6 kDa.

Inmunización de conejos Nueva Zelanda: Se trabajó con un total de seis conejos de laboratorio (*Oryctolagus cuniculus*) machos, de la misma camada, tres meses de edad, que pesaron 2,5 Kg aproximadamente cada uno. Se inmunizaron dos conejos así: conejo 1 con la proteína NOS-Tg-r e hidróxido de aluminio, conejo 2 con la proteína NOS-Tg-r y adyuvante de Freund (completo e incompleto). Los cuatro conejos restantes se tomaron como control negativos (20). Los ensayos con los dos tipos de adyuvantes se realizaron de la siguiente manera: hidróxido de aluminio $\text{Al}(\text{OH})_3$ en PBS (tampón fosfato salino de pH 7,2) y coadyuvante completo e incompleto de Freund emulsionados en una mezcla de partes iguales de la proteína (500 μl de proteína, 500 μl de adyuvante) por sitio de inoculación. Para la primera inoculación se utilizó el adyuvante completo (ACF) y en las siguientes inoculaciones incompleto (AIF) (14). Para el trabajo de animales en laboratorio se siguió lo estipulado en el artículo 87 del Decreto N° 1969 del Ministerio del Medio Ambiente y del Ministerio de Salud (Título V, la investigación biomédica con animales).

La emulsión se inyectó intramuscular (i.m) en distintos lugares del dorso del animal siguiendo el método propuesto en "Guide for the care and use of laboratory animals" de la Oficina de Bienestar para Animales de Laboratorio (OLAW por sus siglas en inglés) (21). Dos semanas después se inocularon con adyuvante incompleto y dos veces más cada quince días. Igual procedimiento se realizó con el hidróxido de aluminio. Cada quince días intercalado a la inoculación se tomaron muestras de sangre para la extracción de suero (Tabla 1). La especificidad de respuesta inmune de la proteína NOS-Tg-r fue aumentada manteniendo los conejos en condiciones de esterilidad durante 30 días previos a las inoculaciones.

Extracción y almacenamiento de los sueros: Se tomó una muestra de sangre de cada conejo de la vena principal de la oreja usando la técnica de máxima aseptia. La sangre se colectó en tubos de ensayo sin anticoagulante se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos para facilitar la formación del coágulo, se

centrifugó durante 40 minutos a 4.000 rpm a -4 °C. El suero se dividió en alícuotas de 2 ml cada una, se almacenó en tubos de ensayo de 3 ml (ependorf) rotulados con fecha, tratamiento, semana y se guardó a -4°C hasta su uso y a -20°C para próximos ensayos.

Detección de anticuerpos por Ensayo Inmunoenzimático Indirecto: Los sueros obtenidos contra la proteína NOS-Tg-r se analizaron mediante ELISA indirecto utilizando el protocolo de Castaño y Sarracent (2002). Se realizó cada ensayo por duplicado.

El recubrimiento de los pozos de la microplaca (Maxisorp® Nunc, Suiza) se realizó con 339,75 µg/ml de proteína NOS-Tg-r a una dilución 1:100 en carbonato-bicarbonato 10 mM, pH 9.6 (STCB) y se incubó a 37°C por dos horas, se lavó 3 veces con solución fosfato salina (PBS) más Tween 20 al 0.05% (PBS-T). Como agente bloqueador se usó STCB-Albúmina al 1%, incubando a temperatura ambiente durante toda la noche. Seguidamente se realizó dos lavados con PBS-T. Adicionando 200 µl de cada muestra (preinmune, segunda, cuarta, sexta y octava semana post-inoculación) en diluciones 1:20, 1:50 y 1:100 en PBS-T. Incubando en cámara húmeda a 37°C por dos horas al cabo de las cuales se realizó dos lavados con PBS-T. Adicionando el anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (SIGMA, USA) dilución 1:10000 en STCB. Se incubó a 37°C por una hora y se lavó, posteriormente se adicionó el sustrato P-nitrophenyl phosphate (pNpp - SIGMA), finalmente se incubó a 37°C en oscuridad, deteniendo la reacción con NaOH (1 M). Los tiempos de lecturas fueron a 30, 45 y 60 minutos bajo una longitud de onda de 410 nm en lector de microplacas (Dynatech MR5000).

Prueba de reacción cruzada: Se analizó la reacción cruzada con distintas proteínas recombinantes obtenidas por el mismo método, como la metaloproteasa de *Toxoplasma* recombinante, y la cisteína proteasa 5 de *Entamoeba histolytica* recombinante con cola de histidina (EhCP5r). También se usó, albúmina al 2%, hidróxido de aluminio y adyuvante de Freund, bajo las mismas condiciones del ELISA indirecto.

Determinación del punto de corte: Los datos obtenidos fueron interpretados según su densidad óptica (DO). El punto de corte (*cut-off*) se calculó tomando el promedio de los sueros negativos ± 3 desviaciones estándar, para todos los muestras (23) Se consideró positivos aquellos sueros que presentaron valores de DO por encima del *cut-off*. Los sueros control negativos o verdaderos negativos fueron los sueros de conejo tomados previa inoculación de la proteína NOS -Tg-r.

Detección de anticuerpos por Inmunofluorescencia Indirecta (IFD): el inmunomarcaje se llevó a cabo mediante proceso estándar descrito previamente (24), se utilizó los taquizoitos de la cepa de referencia RH de *T. gondii* obtenidos a partir de cultivo celular en la línea THP1. Los taquizoitos de *Toxoplasma gondii* se fijaron en metanol al 100% a -20°C por 3 minutos en laminas de

vidrio, se lavó dos veces con PBS-SFB 1% por 5 minutos. Para permeabilizar la membrana de los taquizoitos y facilitar la entrada de los anticuerpos se utilizó Triton X-100 más suero fetal bovino (SFB) 1% en PBS pH 7.3 durante 5 minutos a -20°C. Se lavó con PBS más SFB 1% durante 5 minutos. Se adicionó 50 µl de anticuerpo primario a varias diluciones 1:10 y 1:50 en PBS-SFB 1%. Se incubó a 37°C en cámara húmeda por 1 hora. Luego se realizó dos lavados con PBS más SFB 1% por 5 minutos y se adicionó el conjugado anti-IgG de conejo marcado con isotiocianato de fluoresceína -FITC- (SIGMA, USA). Dilución 1:160 (En PBS-azul de Evans (1:10000)). Finalmente se lavó con PBS-SFB por 10 minutos y se observó cada una de las placas en un microscopio de fluorescencia con luz ultravioleta observando en 40X y 100X (Micromedica BA2000i).

RESULTADOS

Determinación de los anticuerpos policlonales contra NOS-Tg-r en conejo: Los resultados de ELISA en las muestras de suero revelaron la presencia de anticuerpos específicos para la proteína NOS-Tg-r. Al analizar y relacionar los diferentes tipos de tratamientos, diluciones de los sueros y tiempos de revelado, se observó una diferencia significativa entre ellos ($p = 0,002$) para los dos tratamientos (hidróxido de aluminio y adyuvante de Freund) en dilución 1:50 y 1:100 de suero no se encontraron variaciones significativas en la absorbancia (DO), mientras que para la dilución 1:20 los valores de absorbancia fueron los mayores ($DO \pm 0,641$) (Figura 1). Con relación al tiempo de revelado, el mayor valor de absorbancia siempre se presentó después de 60 minutos para los dos tratamientos (Figura 2). El *cut-off* obtenido para las inoculaciones con Proteína NOS-Tg-r e Hidróxido de aluminio y adyuvante de Freund en dilución 1:20 y a 60 minutos fue de 0,069 (Figura 3).

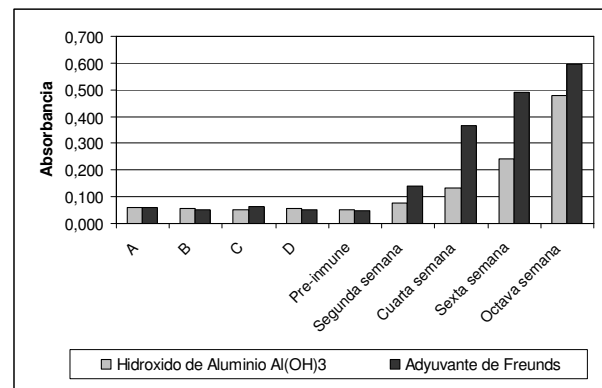


Figura 1. Valores de absorbancia obtenidos para los dos adyuvantes. Dilución del suero 1:20, y 60 minutos de revelado. Los sueros control negativo. A, B, C y D Son conejos control negativo sin inoculación.

Prueba de reacción cruzada. La reactividad de los sueros de conejo con metaloproteasa de *T. gondii* recombinante (DO:

Tabla 1: Protocolo de Inmunización y sangrado para la producción de anticuerpos policlonales para los dos tratamientos.

Semanas	0	1	2	3	4	5	6	7	8
INMUNIZACIÓN		X ^{Com}		X ^{Incom}		X ^{Incom}		X ^{Incom}	
SANGRADO	X (Suero-preinmune)		X		X		X		X

X^{Com} = Adyuvante Completo de Freund o Hidróxido de aluminio Al(OH)3

X^{Incom} = Adyuvante Incompleto de Freund o Hidróxido de aluminio Al(OH)3

0,05±0,03), cisteína proteasa 5 de *Entamoeba histolytica* recombinante (EhCP5r) (DO: 0,057±0,002), albúmina al 2%, (DO: 0,045±0,06), hidróxido de aluminio, (DO: 0,064±0,003) y adyuvante de Freund (DO: 0,056±0,002) a través del test de ELISA estuvo por debajo del *cut-off* (DO: 0,069). El promedio de los resultados de densidad óptica para los sueros negativos fue de 0,054±0,010 (Figura 3).

Determinación de la respuesta inmune por inmunofluorescencia indirecta. Para el inmunomarcaje de los anticuerpos policlonales en los taquizoítos se utilizaron los sueros con mayor absorbancia según los valores de ELISA (Octava semana). Como control negativo se utilizó suero preinmune a las mismas concentraciones.

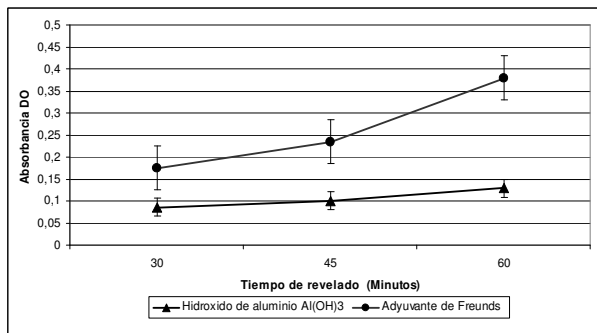


Figura 2. Valores de absorbancia obtenidos a los 30, 45 y 60 minutos para las inoculaciones con proteína NOS-Tg-r e hidróxido de aluminio y adyuvante de Freund en sueros post-inoculación.

Para la dilución 1:10 se observó fluorescencia de 70/100 y en dilución 1:50 de 30/100. (Figura 4)

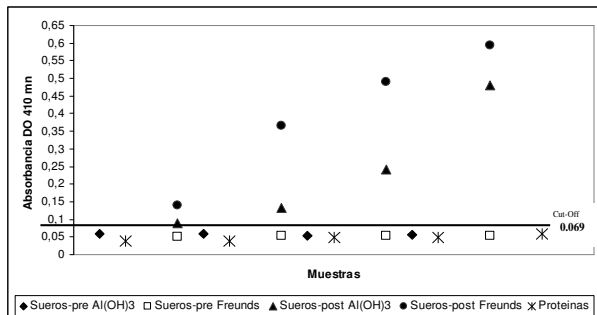


Figura 3 Valores de absorbancia obtenidos para las inoculaciones con Proteína NOS-Tg-r e hidróxido de aluminio y adyuvante de Freund en sueros pre y post inoculación y proteínas problema. Diluciones de suero 1:20 (punto de corte: 0,069)

DISCUSIÓN

Anteriormente se han desarrollado anticuerpos policlonales dirigidos contra proteínas de *Toxoplasma gondii* utilizando diferentes protocolos (25, 26) pero de difícil comparación y reproducibilidad, en este trabajo se logró estandarizar una metodología apropiada para la variedad correspondiente a antígenos recombinantes, para el sitio de inoculación y para diferentes tipos de adyuvantes. Los anticuerpos policlonales producidos en conejo se han usado ampliamente en microorganismos como *Toxoplasma gondii*, *Naegleria fowleri*, *Plasmodium falciparum*, *Pythium insidiosum*, *Tripanosoma brucei* y *Giardia duodenalis*, *Orientia tsutsugamushi* (22, 27-30,

31) por su fácil manejo y mantenimiento, porque generan una gran cantidad de suero y responden bien a una variedad de antígenos incluyendo los de tipo recombinante (32).

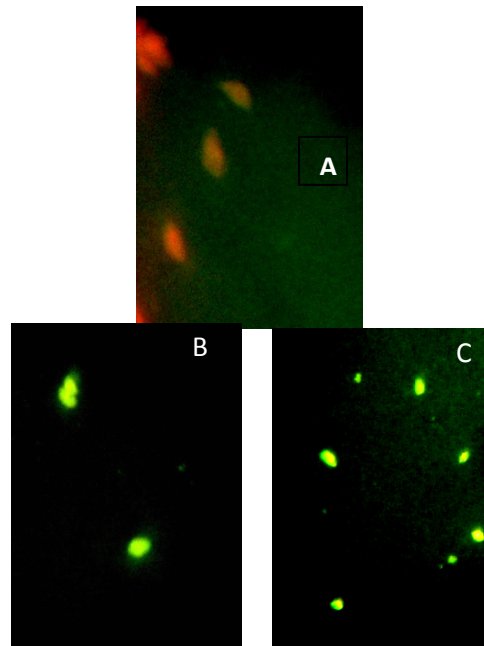


Figura 4: Inmunomarcaje de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* 100X. A- Suero pre-inmune (control negativo), B- suero octava semana dilución 1:10, C- suero octava semana dilución 1:50

Los esquemas de inmunización con largos períodos de tiempo y con refuerzos repetidos incrementan el desarrollo de anticuerpos afines al antígeno inoculado (33). Por ello, se inmunizaron los conejos hasta la octava semana de acuerdo a lo reportado por García y col en el 2005 quienes sugieren inmunizar con antígeno más de seis semanas, aplicando cuatro inmunizaciones con intervalo de dos semanas entre cada una de ellas (27).

Los resultados obtenidos para los dos tipos de adyuvantes muestran que el complejo adyuvante-proteína tuvo respuesta inmune siendo evidente según los valores de absorbancia detectados en la prueba de ELISA indirecta, mostrando mayores valores de absorbancia con el adyuvante de Freund tal como se muestra en la figura 1. Según Freund (34) el mecanismo de acción de este adyuvante se atribuye a la formación de un depósito en el sitio de inyección que posibilita la liberación lenta del antígeno, con lo que se estimulan las células productoras de anticuerpos. Aunque este adyuvante no se emplea actualmente en humanos debido a que ocasiona reacciones locales colaterales como la formación de granulomas e inflamación local, es un buen adyuvante para animales de laboratorio en dosis moderada (35, 36). En contraste, el hidróxido de aluminio es el único de aprobación general para uso clínico en humanos (37), una posible causa de los bajos valores de absorbancia en el tratamiento con hidróxido de aluminio comparado con el adyuvante de Freund es que los compuestos a base de aluminio, a pesar de ser considerados seguros, son adyuvantes a base de agua, débiles, ligeros y muy poco consistentes en su capacidad de estimular respuestas inmune (38, 39).

Al comparar los valores de absorbancia en la prueba ELISA de los sueros post inoculación proteína NOS-Tg-r y adyuvantes (hidróxido de aluminio , adyuvante de Freund) con otros trabajos como el de Trindade y col en el 2002 en donde se obtuvo anticuerpos policlonales IgG contra *Pythium insidiosum* en conejos nueva Zelanda se mostraron mayores valores de absorbancia en el tratamiento con adyuvante de Freund de 0,626 en la octava semana, mientras que para el tratamiento con hidróxido de aluminio fue de 0,47 (29), lo que concuerda con el presente trabajo donde los valores de absorbancia son similares: 0,641 para el adyuvante de Freund y 0,479 con hidróxido de aluminio. Una conclusión similar la obtuvieron Thomson y col en 1983, quienes compararon diferentes tipos de adyuvante, mostrando que el adyuvante de Freund indujo mayor respuesta inmune según los valores de absorbancia obtenidos (40).

Los valores de absorbancia (Figura 3) para las proteínas de metaloproteasa de matriz de *T. gondii* recombinante, cisteína proteasa 5 de *Entamoeba histolytica* recombinante, hidróxido de aluminio, adyuvante de Freund y albúmina 2% se encuentran por debajo del punto de corte permitiendo descartar una posible reacción cruzada por parte de los anticuerpos policlonales obtenidos, indicando así que estos son específicos para la proteína NOS-Tg-r gracias a la alta especificidad característica típica de los anticuerpos (41).

Aunque este trabajo no demuestra la actividad inmunogénica de la proteína por si sola, si permitió obtener anticuerpos para uso en inmunomarcaje. Varios estudios han utilizando anticuerpos policlonales para ensayos en *Toxoplasma gondii* y el estudio de proteínas diferentes a la oxido nítrico sintetasa, entre ellos tenemos el de Stacey y col en el 2006 quienes utilizaron la pHL1, una proteína recombinante, localizada en citoesqueleto de *T. gondii* (42). Otro trabajo realizado es el de Kshitiz y col en el 2005 quienes usaron con dos isoformas de la enzima hipoxantina guanina- xantina- fosforibosil transferasa (HXGPRT), una de las cuales se inmunolocalizó a nivel de la membrana interna compleja del parásito (IMC) y la otra en citosol (43). Otras proteínas recombinantes pequeñas como las de choque térmico en *T. gondii* se localizaron en diferentes sitios. Hsp20 se encontró en el extremo apical del taquizoito, Hsp28 fue encontrada en el interior de la mitocondria, Hsp29 en membrana y Hsp21 en el citosol del parásito. Estas proteínas tienen un peso que va de 12 a 43 KD encontrándose algunas tanto en taquizoito como en bradizoito. El tamaño que más se acerca a la proteína NOS-Tg-r mediante el western blot realizados por De Miguel y col en el 2005 es la Hsp 20 inoculada en ratón 19KD (44), otras proteína como la GST-catalasa 57.5KD localizada en núcleo (45), TG-AMA1 54KD marcada en el extremo apical del taquizoito (30) ROP 18 56 KD encontrada en el extremo apical del taquizoito (46), pero en la actualidad no se ha reportado en protozoarios estudios de actividad inmunogénica de oxido nítrico sintetasa ni su localización en un estadio del protozoo en particular.

Con respecto a la inmunolocalización de la proteína oxido nítrico sintetasa han sido mas los estudios realizados en células eucariotas que en procariotas entre ellos tenemos la proteína iNOS granular en neutrófilos (47), iNOS marcada en citoesqueleto de macrófagos coinfectados con *Mycobacterium tuberculosis* (48); nNOS localizada en glándulas lagrimales de ratón y en filamentos nerviosos (49,50) y la NOS humana localizada a nivel apical subcelular en células epiteliales (51) demostrando así el amplio

rango de localización celular y subcelular de la proteína oxido nítrico sintetasa.

Los resultados obtenidos en el inmunomarcaje muestran la presencia de la proteína recombinante NOS-Tg-r dispersa en los taquizoitos de *T. gondii*, siendo esto de gran interés, puesto que partió de encontrar la secuencia de la proteína mediante herramientas bioinformáticas (5) para luego comprobar su inmunogenicidad y poder sugerir su presencia en el taquizoito así como la efectividad de la técnica para la detección de esta proteína.

RECOMENDACIONES

- Realizar ensayos de inmunolocalización con microscopio confocal, en diferentes estadios del parásito *Toxoplasma gondii*.
- Producir un anticuerpo monoclonal para realizar estudios más específicos sobre el epítipo causante de la inmunogenicidad de la proteína NOS-Tg-r.
- Continuar con los estudios sobre el papel que juega esta proteína en el metabolismo y virulencia de este protozoo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad del Quindío, al programa de Biología, a COLCIENCIAS, a mi familia, a mis amigos y a los grupos GEPAMOL y GYMOL de la Universidad del Quindio por la donación de la proteína cisteína proteasa 5 de *Entamoeba histolytica* recombinante (EhCP5r). y Grupo de Investigaciones Biomédicas.

REFERENCIAS

1. **Gómez J.E., Montoya M.T., Castaño J.C., Ríos M.P.,** 1993. Epidemiología de infección por *Toxoplasma gondii* en gestantes de Armenia, Quindío, Colombia. *Colombia Médica*, 24:14-18.
2. **Dubey, J.P.,** 1977. *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Besnotia*, *Sarcocystis*, and other tissue cystforming coccidia of man and animals. In *Parasitic Protozoa III* (Kreier, J.P., ed.), 101-237.
3. **Zuluaga C., Sierra M.V., Asprilla E.,** 2005. Causas de ceguera infantil en Cali, Colombia. *Colombia Médica*, Vol. 36 N° 4.
4. **Luft B.J. and Remington J.S.,** 1992. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis*, 15: 211-222.
5. **Gutierrez-Escobar A.J., Gómez-Marin J.E.,** 2005. *Toxoplasma gondii*: Identification of a putative nitric oxide synthase motif DNA sequence. *Exp Parasitology*, 111:211-218.
6. **Ghigo D., Todde R., Ginsburg H., Costamagna C., Gautret P., Bussolino F., et al** 1995. Erythrocyte stages of *Plasmodium falciparum* exhibit a high nitric oxide synthase (NOS) activity and release of an NOS- Inducing soluble factor. *J Exp Med*, 182: 677-678.
7. **Paveto C. Pereira C , Espinosa Joaquin, Montagna Andrea E., Farber Marisa , Esteva Mónica , et al** 1995 The nitric oxide transduction pathway in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*, 270: 16576-1679.
8. **Genestra M., Guedes-Silva D., Souza W., L. Cysne-Finkelstein, Soares-Bezerra R., et al** 2006. Nitric Oxide Synthase (NOS) Characterization in *Leishmania amazonensis*

- Axenic Amastigotes. Archives of Medical Research, vol 37, 328-333.
9. **Cristensen S.T., Kemp D., Quie H., et al** 1996. Cell death, survival and proliferation in *Tetrahymena thermophila*. effects of insulin, Sodium nitoprusside, 8- bromocyclic GMP, N-methyl-L-arginine and methylene blue. Cell Bio Intern, 20: 653-666.
 10. **Gómez-Marin J.E.**, 2000. NO production during human Toxoplasma infection. Parasitol Today, 16:131-133.
 11. **Hernandez-Campos M., Campos-Rodríguez R., Tsutsumi V., Shibayama M., et al** 2003. Nitric oxide synthase in *Entamoeba histolytica*: its effect on rat aortic rings. Exp Parasitol, 1004:87-95.
 12. **Wolfgang B, Jurgen H, Uwe G.**, 1994. Reduced Replication of Toxoplasma gondii Is Necessary for Induction of Bradyzoite-Specific Antigens: a Possible Role for Nitric Oxide in Triggering Stage Conversion. Infect Immun, 62:1761-1767.
 13. **Schade, R , Staak C., Hendriksen C., Erhard M., Hugel H., Koch G., et al**, 1996. The Production of Avian (Egg Yolk) Antibodies: IgY. European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), 24: 925-934.
 14. **Vogel F.R., Powell M.F.**, 1995. A summary compendium of vaccine adjuvants and excipients. In: Powell MF, Newman MJ, editors. Vaccine design: the subunit and adjuvant approach. New York: Plenum Publishing Corp, 234-50.
 15. **Freund J., Casals J., Hosmer E.P.**, 1937. Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and parafin oil. Proc Soc Exp Biol Med, 37:509-13.
 16. **Stuart-Harris C.H.**, 1969. Adjuvant influenza vaccines. Bull who, 41:617-21.
 17. **Hahn A., Göbel C. y Hock B.**, 1999. Immunochemical properties of mycorrhizas. Mycorrhiza, 2 ed. Berlin: Springer-Verlag,
 18. **Mariko-Koga P.C., Menezes C.A., Lima F.A, Mítico N., Arantes C., Marques C.A., et al** 2003 Polyclonal anti-intimin antibody: immunological characterization and its use in epec and ehc diagnosis Brazilian. Journal of Microbiology, 34:5-7.
 19. **Cedeño D., Lugo L., Muñoz J., Maldonado J.**, 1994. Guía para el uso de animales de experimentación. Santafé de Bogotá, D.C. Instituto Nacional de Salud.
 20. **Brewer, J. Brewer, Conacher M., Hunter C.A., Mohrs M., Frank B.** et al, 1999. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigenspecific Th2 responses in the absence of IL-4 or IL-13-mediated signaling. J. Immunol, 163:6448-6454.
 21. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals Institute of Laboratory Animal Resources** 1996 Commission on Life Sciences National Research Council National Academy Press Washington, D.C. Copyright ©by the National Academy of Science.
 22. **Castaño J.C., Sarracent P.**, 2002. Inmunización intranasal de ratones con la proteína sag2 de toxoplasma gondii asociada con la toxina colérica. Rev Cubana Invest Biomed, 21(1):35-45.
 23. **Cardona N.L., Lora F., Gomez J.E.**, 2005 Estandarización del inmunoensayo ELISA para la detección de IgG anti-*Toxoplasma gondii* en ratón. Parasitol Latinoam, 60: 97 – 101.
 24. **López M.C., Corredor A., Reyes P. et al**, 2001. Estandarización de una prueba de inmunofluorescencia indirecta para IgG anti-*Toxoplasma* en ratón. Biomédica, 21:79-82.
 25. **Lundén A., Lovgren K., Uggla A., Araujo F.G.**, 1993. Immune responses and resistance to *Toxoplasma gondii* in mice immunized with antigens of the parasite incorporated into immunostimulating complexes. Infect Immun, 61:2639-43.
 26. **Bourguin I**, 1993, P. Oral Immunization with *Toxoplasma gondii* Antigens in Association with Cholera Toxin Induces Enhanced Protective and Cell-Mediated Immunity in C57BL/6 Mice Infection And Immunity P. 2082-208
 27. **García D.A., Nicholls R.S., Arévalo A., Torres O., Duque S.**, 2005. Obtención, purificación y caracterización de anticuerpos policlonales IgY desarrollados en gallina, dirigidos contra aislamientos colombianos de *Giardia duodenalis*. Biomédica, 25:451-63.
 28. **Su-Yeon Kang et al** 2005 Role of the Nfa1 Protein in Pathogenic *Naegleria fowleri* Cocultured with CHO Target Cells clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, p. 873–876 Vol. 12, No.
 29. **Trindade L.A., Morais J., Monteiro A.B., et al** 2002. Serological response in rabbits immunized with *pythium insidiosum* antigens associated with different adjuvants. Alexandre Ciência Rural, 32:1027-1032,
 30. **Hehl A.B., Lekutis C., Grigg M.E., Bradley P.J., Jean-Francois D., et al**. 2000. *Toxoplasma gondii* Homologue of *Plasmodium* Apical Membrane Antigen 1 Is Involved in Invasion of Host Cells. Infection And Immunity, 68:7078-7086.
 31. **Yeau-Ching Wang, Ting-Yu Jian, Lih-Jeng Tarn, et al** 2003. Development of a Recombinant Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Its Applications in Field Surveillance of Rodent Mice for Presence of Immunoglobulin G against. Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology, 451-458
 32. **Dumbar B.S. & Schwoebel E.D.**, 1990, Preparation of polyclonal antibodies. En Methods in Enzymology 182:49 M. P. Deustcher (ed.) Academic press Inc Londres. 663 – 670.
 33. **Rangel L.E., Perera G., Lassala A., et al** 1999. LA. Desarrollo de un método de radioinmunoanálisis para cortisol, utilizando anticuerpos obtenidos y purificados de la yema de huevo de gallinas inmunizadas. Vet Mex, 30:289-95.
 34. **Freund J.** 1956. The mode of action of immunological adjuvants. Adv Tuberc Res, 7:50-5.
 35. **Aguilar J.C., Leal M.J.**, 2000, Aduyuvantes vacunales: estado actual y nuevas tendencias. Biotecnología Aplicada; 17:147.
 36. **Restifo N.P.**, 1996. The new vaccines: building viruses that elicit antitumor immunity. Curr Opinion Immunol, 8:658-63.
 37. **Lindblad E.B.**, 1995. Aluminium adjuvants. In: Stewart-Tull DES, editor. The theory and practical application of adjuvants. John Wiley & Sons Ltd 21-35.
 38. **Schirmbeck R., Melber K., Mertens T., Reimann J.**, 1994. Antibody and cytotoxic T-cell responses to soluble hepatitis B virus (HBV) S antigen in mice: implications for the pathogenesis of HBV-induced hepatitis. J Virol, 68:1418-25.
 39. **Brewer J.M., Conacher M., Satoskar A., Bluethmann H., Alexander J.**, 1996. In interleukin- 4-deficient mice, alum not only generates T helper 1 responses equivalent to Freund's complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production. Eur J Immunol, 26:2062-66.
 40. **Thomson T.A., Hilfenhaus J.M., H and Morahanlt S.**, 1983. Comparison of Effects of Adjuvants on Efficacy of Virion Envelope Herpes Simplex Virus Vaccine Against Labial Infection of BALB/c Mice T. Infection And Immunity, 556-562.
 41. **McCullough K.C., Hendriksen C.F., Seeback T.**, 1997. In vitro methods in Vaccinology. In: Pastoret P.P., Blancou J., Vannier P., Verschuere C., eds. Veterinary Vaccinology. Amsterdam: Elsevier 69.
 42. **Stacey D. G., Yossef R., Hu K., Murray J.M., et al** 2006 Identification of P hIL1, a Novel Cytoskeletal Protein of the *Toxoplasma gondii* Pellicle, through Photosensitized Labeling with 5- [125I]Iodonaphthalene-1-Azide. Eukaryotic Cell, 1622-1634
 43. **Kshitiz C., Robert G.K., Nishi M., Carter D., Ullman B. and Roos D.S.**, 2005. Differential Localization of Alternatively Spliced Hypoxanthine-Xanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase Isoforms in *Toxoplasma gondii*. The Journal Of Biological Chemistry vol. 280, 22053-22059.
 44. **De Miguel N., Echeverria P.C. and Angel S.O.**, 2005. Differential Subcellular Localization of Members of the

- Toxoplasma gondii* Small Heat Shock Protein Family. Eukaryotic Cell, 1990–1997
45. **Achim J.K. and Keith A.J.**, 2000. Targeting and Subcellular Localization of *Toxoplasma gondii* Cabalase. the Journal of Biological Chemistry, vol. 275, 2-14.
 46. **Hajj H., Lebrun M., Arold S.T., Henri V., Labesse G., et al** 2007. ROP18 Is a Rhoptry Kinase Controlling the Intracellular Proliferation of *Toxoplasma gondii*. PLoS Pathogens 3:200-206
 47. **Evans T.J., Buttery L.D., Carpenter A., Springall D.R., Polakt J.M., et al** 1996. Cell Biology Cytokine-treated human neutrophils contain inducible nitric oxide synthase that produces nitration of ingested bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci., 93:9553-9558.
 48. **Barbara H.M., Rutilio A.F., Jens F.P., Graham S.T., Sharon S.M.**, 2004. Mycobacteria Inhibit Nitric Oxide Synthase Recruitment to Phagosomes during Macrophage Infection Infection And Immunity, 72:2872–2878.
 49. **Ding C., Walcott B., Keyser K.T.**, 2001. Neuronal nitric oxide synthase and the autonomic innervation of the mouse lacrimal gland. Invest Ophthalmol Vis Sci, 42:2789–2794.
 50. **Yago M.D., Manas M., Ember Z., Singh J.**, 2001. Nitric oxide and the pancreas: morphological base and role in the control of the exocrine pancreatic secretion. Mol Cell Biochem, 219(1–2):107–120.
 51. **Navarro-Lerida I., Martinez-Moreno M., Ventoso I., Alvarez-Barrientos A. and Rodriguez-Crespo I.**, 2007 Binding of CAP70 to Inducible Nitric Oxide Synthase and Implications for the Vectorial Release of Nitric Oxide in Polarized Cells. Molecular Biology of the Cell, 18:2768–2777.