

1. Información General del Proyecto

Título: Estudio de la respuesta inmune inducida por el candidato vacunal *Vibrio cholerae* CVD103-HgR-SAG2 contra toxoplasmosis en un modelo animal.

Investigador Principal: Jhon Carlos Castaño Osorio

Total de Investigadores: 4

Nombre del Grupo de Investigación: Grupo Inmunología Molecular. (GYMOL)

Línea de Investigación: Respuesta Inmune

Representante Legal: Rafael Fernando Parra Cardona.

Cédula de Ciudadanía: 7.512.696 de Armenia.

Nombre de la Entidad: Universidad del Quindío

Tipo de Entidad: Universidad Pública

Dirección: Cra. 15 Calle 12 Norte **Teléfono:** 7460191 **Fax :** 7460168

Correo Electrónico: cibm@uniquindio.edu.co

Sede de la entidad: Armenia **Nit:** 890000432-8

Ciudad : Armenia **Departamento:** Quindío

Lugar de Ejecución del Proyecto: Centro de Investigaciones Biomédicas
Universidad del Quindío.

Ciudad: Armenia **Departamento:** Quindío

Duraciones del Proyecto: 18 meses **Tipo de Proyecto:** Investigación Básica

Tipo de Financiación Solicitada: Cofinanciación

Valor Solicitado a la Universidad \$ 30.000.000.00

Valor Total del Proyecto: \$ 30.000.0000.00

Descriptores/Palabras Claves: *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*), CVD103, SAG2, Inmunidad de mucosas.

INVESTIGADOR PRINCIPAL O COINVESTIGADOR

Apellidos: Castaño Osorio

Fecha de Nacimiento: 09 03 68

Nombre: Jhon Carlos

Nacionalidad: Colombiano

Correo electrónico: yiyuma@yahoo.com

Cédula de ciudadanía: 7.554.191

Títulos Obtenidos (Area, Universidad, Año):

Médico y Cirujano, Universidad del Quindío, 1993

Doctor en Ciencias Médicas, IPK - Cuba, 2001

Cargos Desempeñados (Tipo de posición, Institución, Fecha):

Docente tiempo completo, Universidad del Quindío desde 1995.

Director CIBM, Universidad del Quindío. 1996 y actualmente.

Publicaciones Recientes (Liste solamente las cinco publicaciones más importantes que haya hecho en los últimos cinco años. Artículos en proceso de publicación pueden aceptarse con la correspondiente aclaración). Por favor anote las referencias bibliográficas completas del autor (es), título, revista, volumen, página y año.

- **Castaño Osorio JC**, Marcet Sánchez R, Cox Iraola R, Sarracent Perez J. Inhibición de la invasión y multiplicación de *T. gondii* en células epiteliales de colon humano por un anticuerpo monoclonal contra la proteína SAG2. Revista Cubana de Medicina Tropical.2001; 53(3):161-9.
- **Castaño Osorio JC**, Sarracent Perez J. La inmunización intranasal de ratones con la proteína SAG2 de *Toxoplasma gondii* asociada con toxina colérica reduce la formación de quistes cerebrales después de la infección con la cepa 76K de *T. gondii*. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. 2002;21:35-45..

- Marcet R., I Méndez, **Castaño J.C.**, Otero O., Lastre M., Pérez O. y Sarracent. J. Obtención de Anticuerpos Monoclonales contra IgA secretora humana. Revista de Medicina Tropical.1999 Vol.51 pag 33-37.
- Gomez-Marín J E, Montoya-de Londoño MT, **Castaño Osorio JC**, Alvarado-Heine F, Duque AM, Chemla C, Aubert D, Bonhomme A, Pinon JM. Frequency of specific anti-*Toxoplasma gondii* IgM, IgA and IgE in Colombian patients with acute and chronic ocular toxoplasmosis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.2000, 95: 89-94.
- Gómez JE, Montoya MT and **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: 180-86.

Patentes o prototipos:

Solicitud de patente ante la Oficina Cubana de la Propiedad Industrial OCPI

Cepa de *Vibrio cholerae* CVD HgR modificada por inserción de un gen heterólogo que codifica la proteína SAG2 de *T. gondii* y *vacuna bivalente conteniendo dicha cepa*. No. de solicitud OCPI: 2001-0143. Fecha de solicitud: 20-06-01

DESCRIPCION DEL PROYECTO:

1. Planteamiento del Problema

La vía natural de infección de *T. gondii* generalmente es la vía oral, a través de la ingestión de quistes hísticos de este parásito contenidos en la carne de los hospederos intermediarios o de los ooquistes provenientes del hospedero definitivo. Una vez ocurre la digestión peptídica de unos u otros, se liberan los bradizoitos contenidos en los quistes hísticos o los esporozoitos del interior de los ooquistes. Estos rápidamente se convierten a la forma proliferativa e invasiva del parásito, el taquizoíto, cuya superficie está dominada por cinco proteínas, siendo las principales la SAG1(P30) y la SAG2 (P22). Estas proteínas se han implicado como ligandos importantes en el proceso de interacción durante la invasión del parásito a la célula hospedera y por ello son candidatos importantes en el desarrollo de un preparado vacunal con subcomponentes del parásito (Boothroyd et al 1998).

Nosotros hemos encontrado claras evidencias de la importancia de la proteína SAG2 tanto en los fenómenos de invasión y multiplicación intracelular en un modelo de células altamente diferenciadas, provenientes de carcinoma de colon humano cuando bloqueamos esta proteína con un anticuerpo monoclonal de ratón desarrollado en nuestro laboratorio (Castaño et-al 2001). De otra parte, demostramos su capacidad como inmunógeno y su capacidad protectora cuando se administró en su forma nativa por vía de mucosas sola o asociada a la toxina colérica (Castaño JC y Sarracent J, 2002) y cuando se suministró por vía oral expresada como una proteína heteróloga en una cepa viva atenuada de *V. cholerae* (Castaño JC, 2001). Estos resultados hacen importante determinar el tipo de patrón en la respuesta inmune tanto humoral como celular que esta estimulando esta bacteria recombinante para comprender el mecanismo que esta mediando su carácter protector en los animales inmunizados.

2. Impacto Esperado

Con la caracterización de la respuesta inmune se podrá explicar la forma como la cepa recombinante de *V. cholerae* que expresa la SAG2 como proteína heteróloga confiere protección contra la infección natural de *T. gondii*. Estos conocimientos serán de gran utilidad en el entendimiento de los fenómenos inmunes de mucosas en la infección por este parásito y además serán útiles para la realización de estudios posteriores en especies animales donde la infección por *T. gondii* causa grandes pérdidas económicas.

3. Usuarios directos e indirectos potenciales de los resultados de la investigación:

Investigadores del campo de la inmunidad de mucosas, parasitólogos, microbiólogos, biólogos, médicos y veterinarios.

4. Marco Teórico

La toxoplasmosis es una enfermedad producida por *T. gondii*, está ampliamente difundida en animales y humanos, y es responsable de grandes pérdidas económicas en la industria ganadera (Dubey JP, 1998). En el hombre, cuando la infección por *T. gondii* es adquirida durante el embarazo puede causar infección fetal grave (Grover et al 1990, Aubert et al 1996, Fuentes et al 1996). Igualmente, es causa de lesiones oculares irreversibles que pueden llevar a la ceguera y, en los pacientes inmunosuprimidos, es una de las principales causas de muerte (Brezein et al, 1994; Kasper LH and Buzoni-Gatel D, 1998).

Los taquizoítos de *T. gondii*, como protozooario intracelular obligado, necesitan de los mecanismos de invasión para poder establecerse en el interior de la célula hospedera e iniciar el proceso de multiplicación y diseminación. La invasión es un proceso activo

dirigido por el parásito y se basa en una serie de interacciones entre la membrana de la superficie del parásito y las moléculas localizadas en la superficie de la célula hospedera. Las proteínas de la superficie del parásito son los primeros candidatos para mediar el proceso de reconocimiento y adhesión hospedero – parásito. Hasta hoy se han descrito 5 proteínas de superficie: SAG1 (30kDa), SAG2 (22kDa), SAG3 (42kDa), SAG4 (23kDa) y SAG5 (35kDa) (Boothroyd et al, 1998).

La SAG1 y SAG2 son específicas del taquizoíto. La SAG1 se ha demostrado que es de crucial importancia en los procesos iniciales de la invasión, particularmente en el anclaje a la célula hospedera (Grimwood J and Smith JE, 1996).

La inmunidad protectora, estimulada por una infección natural por *T. gondii*, sugiere que el desarrollo de una vacuna efectiva es un objetivo alcanzable, y las proteínas de la membrana del parásito son los primeros candidatos para ser utilizados en la búsqueda de vacunas contra esta parasitosis (Kasper LH et al 1994, Grimwood J and Smith JE 1996; Sibley LD and Howe DK, 1996; Tomavo S, 1996; Boothroyd JC et al 1998).

Varios autores han tratado de dilucidar el potencial inmunoprotector de las proteínas SAG1 y SAG2 con resultados contradictorios. La SAG1 de *Toxoplasma*, cuando se ha utilizado como adyuvante los complejos inmunoestimulantes (ISCOM) y se ha administrado asociada a la toxina colérica por vía intranasal, ha producido una buena respuesta inmune tanto celular como humoral y provee alguna protección contra un reto letal en ratones. La falla de estas preparaciones para dar una protección completa a largo plazo puede deberse a su carácter temporal, pues en la infección natural, la latencia del parásito en los tejidos continua estimulando la inmunidad (Araujo FG, 1994).

La proteína de membrana SAG2 es la segunda en abundancia en la superficie de *T. gondii*, y al igual que la SAG1, sólo está presente en el estadio de taquizoíto. Grimwood y Smith sugieren que la SAG2 también puede estar involucrada en los procesos de invasión celular (Grimwood J and Smith JE, 1996).

La proteína SAG2 tiene un peso molecular aproximado de 22kDa, es codificada por un gen único de 1308 pares de bases que no posee intrones (Prince JB et al, 1990). Se han reportado dos alelos que producen proteínas con pequeñas variaciones antigénicas, y han permitido clasificar las cepas en virulentas o no virulentas según expresen el alelo 1 o el 2 (Parmely et al, 1994). La SAG2 se ha encontrado altamente conservada en todas las cepas aisladas en animales y humanos de diferentes regiones geográficas (Sibley LD and Boothroy JC, 1992; Parmely et al, 1994; Howe et al, 1995, 1996, 1997).

La importancia de la SAG2 se ha evidenciado a nivel serológico, en pruebas tanto de ELISA como Inmunotransferencia, por el reconocimiento de la proteína por paneles de sueros de individuos con Toxoplasmosis aguda o crónica, mostrando una respuesta más fuerte en los individuos en fase aguda (Bourguin et al, 1991).

Los ensayos de protección usando esta proteína en animales realizados antes de nuestro trabajo, utilizando SAG2 sola o asociada a la Glutation-S-Transferasa (GST) e ISCOM como adyuvante. En unos han encontrado un débil efecto protector y en otros se han atribuido propiedades inmunosupresoras a la proteína, dependiendo de la cepa de *T. gondii* y el estadio del parásito utilizado en el reto. Es de resaltar que en dichos ensayos, la vía de inoculación ha sido la intramuscular o subcutánea (Lunden A et al, 1993; 1997). Después de estos resultados, no se ha avanzado en el estudio de esta proteína de superficie con fines de inmunoprotección, y el interés se ha centrado en su utilidad como un marcador de virulencia de las cepas aisladas en humanos y animales, mediante un análisis rápido de los locus del SAG2 por Nested-PCR seguido de la digestión con HhaI y Sau3AI de los productos de la amplificación que permite la clasificación en los diferentes linajes clonales. (Howe et al, 1997).

11. Referencias bibliográficas.

- ❖ **Araujo FG.** Immunization against *Toxoplasma gondii*. Parasitology Today. **1994**; 10: 358-60.
- ❖ **Aubert D, Foudrinier F, Villena I and Pinon JM.** PCR for diagnosis and follow-up of two cases of disseminated toxoplasmosis after kidney grafting. J. Clin. Microbiol. **1996**; 34: 1347-50.
- ❖ **Boothroyd JC, Hehl A, Knoll LJ and Manger ID.** The surface of *Toxoplasma*: more and less. Int. J. Parasitol. **1998**; 28: 3-9.
- ❖ **Bourguin I, Chardés T, Mevelec M, Woodman JP and Bout D.** Amplification of the secretory IgA response to *Toxoplasma gondii* using chorela toxin. FEMS Microbiol Letters. **1991**; 81: 265-72.
- ❖ **Brezein AP, Kasner L, Thulliez Ph, Li Q, Daffos F, Nussenblatt RB and Chan C.** Ocular Toxoplasmosis in the fetus. Immunohistochemistry analysis and DNA amplification. Retina. **1994**; 14:19-26.
- ❖ **Brikman V., Remington J., Sharma S.D.** Protective immunity in toxoplasmosis: correlation between antibody response, brain cysts formation, T cells deficient activation and survival in normal and B cells deficient bearing the H-2K haplotype. Infect. Immun. 1987; 55: 990-994.
- ❖ **Castaño Osorio JC, Marcet Sánchez R, Cox Iraola R, Sarracent Perez J.** Inhibición de la invasión y multiplicación de *T. gondii* en células epiteliales de colon humano por un anticuerpo monoclonal contra la proteína SAG2. Revista Cubana de Medicina Tropical. 2001, 53:161-169.
- ❖ **Castaño Osorio JC, Sarracent Perez J.** La inmunización intranasal de ratones con la proteína SAG2 de *Toxoplasma gondii* asociada con toxina colérica reduce la formación de quistes cerebrales después de la infección con la cepa 76K de *T. gondii*. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. 2002; 21: 35-45.
- ❖ **Castaño Osorio JC.** Proteína SAG2 del taquizoíto de *T. gondii*: su importancia en la inmunidad de mucosa. Tesis de doctorado. IPK. La Habana, Cuba. 2001.
- ❖ **Cazevane J., Broussin B., Vein Ph., Bequerel J.** Approt de l'amplification genique an diagnostic biologique de la toxoplasmosu. La `pres medicale. 1994 ;23 :573-575.
- ❖ **Dubey JP.** Epidemiología de la infección por *Toxoplasma gondii* en animales. . Memorias segundo congreso internacional de Toxoplasmosis; **1998**. Junio 4-6; Santa fe de Bogotá. Universidad de los Andes.
- ❖ **Fuentes I, Rodríguez M, Domingo.C.J, Castillo. F, Juncosa. T, Alvar. J.** Urine sample used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. J. Clin. Microbiol. **1996**; 34: 2368-71.

- ❖ **Gómez JE, Castaño JC, Rios MP, Montoya MT.** Toxoplasmosis Congénita e Hidranencefalia.. Acta Médica Colombiana, vol.17 (6). 1992.
- ❖ **Gómez JE, Londoño M, Castaño JC, Pérez JC, Rios MP.** Epidemiología de la Infección por *Toxoplasma gondii* en Gestantes de Armenia, Quindío, Colombia. Colombia Médica. Vol 24(1), 1993
- ❖ **GómezMarín JE, Cataño Osorio JC, Montoya de Londoño MT.** Toxoplasmosis Congenita en Colombia: Un Problema Subestimado de Salud Pública.. Colombia Médica, Vol.26 (2), 1995.
- ❖ **Gómez Marín Jorge Enrique, Cataño Osorio JC, Montoya Londoño MT, Loango N. López C, Sarmiento MC, Navarro L, Alvarado F.** Toxoplasmosis Congénita en Colombia: Análisis Clínico y de Laboratorio en 27 Casos. Pediatría. Vol.35 (1), 2000.
- ❖ **Gómez-Marín JE, Montoya-De Lodoño MT, Castaño-Osorio JC.** A Maternal Screening Program Congenital Toxoplasmosis in Quindío, Colombia and Application of Mathematical Models to Estimate Incidences Using Age-Stratified Data. Am. J. Trop. Med. Hyg., 57(2), 1997, pp.180-6
- ❖ **Gomez-Marín JE, Montoya-De-Londono MT, Castano-Osorio JC, Heine FA, Duque AM, Chemla C, Aubert D, Bonhomme A, Pinon JM.** Frequency of specific anti-Toxoplasma gondii IgM, IgA and IgE in colombian patients with acute and chronic ocular toxoplasmosis. Mem Inst Oswaldo Cruz .2000; 95(1):89-94.
- ❖ **Grimwood J and Smith JE.** *Toxoplasma gondii*: the role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion. Int. J. Parasitol. **1996**; 26.:169-73.
- ❖ **Grover CM, Thulliez P, Remington JS and Boothroyd JC.** Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. J. Clin. Microbiol. **1990**; 28:2297-301.
- ❖ **Kasper LH.** Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. Infect Immun 1989 ;57:668-72.
- ❖ **Kasper LH and Mineo JR.** Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. Parasitol.Today. **1994**; 10: 184-88.
- ❖ **Kasper LH, and Buzoni-Gate D.** Some oportunic parasitic infections in AIDS :candidiasis, pneumocystosis, cryptosporidiosis, toxoplasmosis. Parasitol. Today. **1998**; 14: 150-56.
- ❖ **Letscher-Bru Valerie, Odile Villard, Bernhard Risse, Michael Zauke, Jean-Paul Klein, and Truong T. Kien** Protective Effect of Vaccination with a Combination of Recombinant Surface Antigen 1 and Interleukin-12 against Toxoplasmosis in Mice. Infect. Immun. 1998; 66: 4503-4506.

- ❖ **Lumley JS, Green CJ, Lear P, Angell-James je.** Essentials of Experimental Surgery.1990.
- ❖ **Montoya Londoño MT, Loango Chamorro N, Sierra Infante M, Castaño Osorio JC.** Infección por *Toxoplasma gondii* en Gatos de Dos Barrios del Sur de Armenia y su Importancia en la Toxoplasmosis Humana.
- ❖ **Montoya MT, Gómez JE, Castaño JC, Marx C, Aubert D, Bonhomme A, Pinon JM.** Avances Diagnósticos en Toxoplasmosis. PCR, nuevos marcadores de infección evolutiva y otras técnicas. Acta Médica Colombiana, Vol.21 (3) 1996.
- ❖ **Montoya MT, Gómez JE, Loango N, Castaño JC, Marx C, Foundrinier F, Aubert D, Bonbonme A , Pinon JM.** Utilidad de Dos Técnicas Serológicas para IgA Humana Antitoxoplasma como Pruebas de Referencia para Toxoplasmosis Materna Reciente.. Acta Médica Colombiana. Vol.23(5), 1998.
- ❖ **T. D. Nguyen, G. Bigaignon, J. Van Broeck, M. Vercammen, T. N. Nguyen, M. Delmee, M. Turneer, S. F. Wolf, and J. P. Coutelier.** Acute and Chronic Phases of *Toxoplasma gondii* Infection in Mice Modulate the Host Immune Responses **Infect. Immun.** 1998; **66:** 2991-2995.
- ❖ **Parmely SF, Gross W, Sucharczuck A, Windeck T, D.Sgarlato G and Remington JS.** Tow alleles of the gene encoding surface antigen P22 in 25 strains of *Toxoplasma gondii*.J.Parasitol. 1994; 80: 293-301.
- ❖ **Sayles P, and Johnson LL.** Intact immune defenses are required for mice to resist the ts-4 vaccine strain of *Toxoplasma gondii*.Infect. Immun. 1996 64: 3088-3092.
- ❖ **Parmely SF, Gross W, Sucharczuck A, Windeck T, D.Sgarlato G and Remington JS.** Tow alleles of the gene encoding surface antigen P22 in 25 strains of *Toxoplasma gondii*.J.Parasitol. 1994; 80: 293-301.
- ❖ **Sibley LD and Bothroyd JC.** Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. Nature. 1992; 359: 82-85.
- ❖ **Sibley LD and Howe DK.** Genetic basis of pathogenicity in toxoplasmosis. Curr. Top. Micro. Immunol. 1996; 219: 3-16.
- ❖ **Sibley LD and Howe DK.** Genetic basis of pathogenicity in toxoplasmosis. Curr. Top. Micro. Immunol. 1996; 219: 3-16.
- ❖ **Tomavo S.** The major surface proteins of *Toxoplasma gondii*: structures and functions. Curr.Top. Micro. Immunol. 1996; 219: 82-89.

5. Objetivos:

Objetivo General:

Determinar el tipo de respuesta inmune en ratones de laboratorio cepa Balb/c desencadenada por la inmunización por vía de mucosas con una cepa de *V. cholerae* atenuada que expresa de forma heteróloga la proteína SAG2 de *T. gondii*.

Objetivos Específicos

1. Implementar un esquema de inmunización por vía de mucosas en ratones de laboratorio Balb/c con la cepa de *V. cholerae* CDV103-HgR-SAG2.
2. Determinar el patrón de citoquinas en ratones de laboratorio Balb/c, inmunizados con la cepa *V. cholerae* CDV103-HgR-SAG2.
3. Caracterizar la respuesta inmune humoral a nivel de las subclase de IgG inducida por la inmunización con la cepa *V. cholerae* CDV103-HgR-SAG2 en los animales de laboratorio

6. Metodología

1. Cultivo de cepas atenuadas de *V. cholerae* CVD103-HgR y CVD-SAG2 liofilizadas: se resuspenderán en 1 ml de solución salina para cada cepa, se cultivarán en medio LB líquido (Luria-Bertani Medium: por 1000 ml: 950 ml de agua destilada, 10g beta Tryptone, 5g Extracto de Levaduras, 10g NaCl, pH 7.0), suplementado con Ampicilina a 50 ug/ml. Dicho medio con

las bacterias en suspensión se someterán a incubación a 37°C bajo agitación continua por 16 horas, al cabo de las cuales se alcance la fase logarítmica de crecimiento, se realizara conteo mediante el método de dilución limitante para determinar el número de unidades formadoras de colonias por ml, a través de repique en cajas de petri con medio LB sólido (LB, con agar al 1%), Suplementado con Ampicilina a 50 ug/ml. Posteriormente, se ajustará la concentración de bacterias al número requerido para las inmunizaciones.

2. Inmunización oral con sonda nasogástrica: ratones hembras recién destetos Balb/c con las cepas de *V. cholerae* CVD103-HgR y CVD-SAG2 resuspendidas en NaHCO₃ 0,1M. A dosis 50ul a una concentración de 10⁸ bacterias por ml mediante la técnica de gavage (Siguiendo las recomendaciones de experimentación animal. Lumley et al 1990).
3. Recolección de muestras de sangre, saliva y heces: se colectarán estas muestras en los animales preinoculados y semanalmente por 1mes después de la inoculación oral. La recolección de sangre se realizara mediante cortes transversales en la cola bajo anestesia y siguiendo las medidas de asepsia y antisepsia recomendadas, colectandose sangre se de 50 ul por animal en tubos capilares con anticoagulante, posteriormente las muestras se centrifugaran a 2500 r.p.m en una microcentrifuga para obtener el suero, el cual se almacenara a -20°C en una dilución con PBS 1/10 hasta su uso. Las muestras de saliva se tomaran de la cavidad oral del animal con puntas de micropipeta de 100 ul. Para estimular la secreción de saliva se aplicarán 5 minutos antes por vía intraperitoneal o subcutánea pilocarpina a una concentración de 0.2 mg por animal. La materia fecal se recolectara de cada animal después de cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente debido a que los mismos producen expulsión

espontanea de este material. (Siguiendo las recomendaciones de experimentación animal. Bourguin et al 1991, Lumley et al 1990).

4. Determinación mediante ELISA de la respuesta inmune humoral (IgG) específica anti-SAG2 a nivel local de mucosas (IgAs). Se recubrirán los pozos de placas Maxisorp® (Nunc,Suiza)con 100 µl de solución de 5 µg/ml de lisado total de taquizoitos de *T.gondii* diluidos en solución tamponada de carbonato y bicarbonato (STCB) 10mM, pH 9,6 (CO₃Na₂: 1,59 g, CO₃HNa:2,93g para un litro de H₂O, ajustar pH a 9,6 con NaOH) y se incubaran a 37° C por 2 horas luego de las cuales se lavaran tres veces con solución salina tamponada de fosfato(PBS), pH 7.4, 0.05M (Na₂HPO₄ 16,7g , NaH₂PO₄ 5.7g, NaCl 85g y 100mg de NaN₃ en agua destilada.que contiene 0,05% de Twenn 20 (SSTF-T) luego se bloquearan los sitios de unión inespecíficos con 300µl por pozo de una solución de STCB-leche descremada al 5%. Se incubaran las placas de ELISA a 37° C por 1 hora, posteriormente se adicionara 100µl de las muestras a una dilución de 1:5 para la saliva y 1: 200 para los sueros en SSTF-T, albúmina al 0,1%. Se incubará en cámara húmeda a 37° C por 2 horas al cabo de las cuales se realizara un nuevo ciclo de lavados con SSTF-T. Luego se adicionara 100 µl de solución de conjugado de anti-inmunoglobulinas de ratón- fosfatasa en SSTF-T, albúmina al 0,1%. Se incuba a 37° C por 1 hora, luego se realizaran lavados y se adicionan a cada pozo 100ul de solución tamponada de diethanolamina (STD) pH 9.8, 0,5M (MgCl₂ :101mg en 800 ml de H₂Od, diethanolamina al 99%: 97ml, adicinar 200 mg de NaN₃ y ajustar volumen a 1 litro) conteniendo p-nitrofenil fosfato (PNP) como sustrato. Tras la incubación a 37°C por 2 horas, la reacción se detendrá mediante la adición de 50 µl por pozo de NaOH 3M. La lectura se realizara en un espectrofotómetro Dynatech MR5000 a una longitud de onda de 405nm. (Johnstone PA y Turner MW,1997).

5. Determinación de subclases de inmunoglobulinas específicas mediante ELISA (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) a nivel sistémico: El protocolo para esta determinación es igual al descrito anteriormente, únicamente varían los conjugados adicionados para cada subclase de Inmunoglobulina (Johnstone PA y Turner MW,1997).
6. Medición de la respuesta de citoquinas (relación expresión IFN γ /IL4) : Los animales inmunizados se sacrificarán mediante sobredosis de anestésicos, y se realizará previa asepsia y antisepsia una laparotomía para extraer el bazo y a través de lavados por perfusión de este órgano se obtendrán los esplenocitos en cinco tiempos diferentes después de la inmunización(día 5, 10, 15, 20, 25, 30) , se procederá a extracción del RNAm con trizol (Gibco) y mediante RT-PCR(Access RT-PCR system.Promega) se obtendrá el cDNA, a partir del cual se realizará la amplificación mediante PCR de los genes de actina como control positivo, IL-12, INF-g e IL-4 utilizando las siguientes secuencias de nucleótidos con iniciadores (Nguyentd et al 1998,Letscher-Bru et al, 1998). :
- actina: 59-ATGGAT GAC GAT ATC GCT GC-39 y 59-GCT GGA AGG TGG ACA GTG AG-39
 - IL-12 (p40) 59-CTC ACA TCT GCT GCT CCA CAA-39 y 59-CTC CTT
 - CAT CTT TTC TTT CTT-39
 - IFN-g: 59-GAC AAT CAG GCC ATC AGC AAC-39 and 59-CGC AAT CAC AGT CTT GGC TAA-39
 - IL-4 : 59-ATG GGT CTC AAC CCC CAG CTA-39 and 59-GCA TGG TGG CTC AGT ACT ACG-39

El procedimiento seguido para la amplificación de cada gen se realizara siguiendo la metodología general para esta técnica, brevemente: se utilizaran 25 μ l de la mezcla (1.5U Taq Pol., 10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 0.2mM dNTP. Sigma, USA), adicionando 5 μ l de MgCl 25mM (concentración final en la mezcla de 2.5mM), 50 ng de ADNc obtenido mediante la reacción de reverso transcripción a partir del RNA extraído de las esplenocitos y 0,5 μ M de los juegos de primers antes descritos, Se ajustara el volumen a 50 μ l, se correrá el siguiente programa: desnaturalización: 94° C/1min, anillado: 60° C/1min, extensión: 72° C/1min 30 ciclos y fase final de extensión a 72° C/10min en un termociclador Amplitrom®II.(Thermolyne. USA). Después de completado el programa se corroborará la amplificación mediante electroforesis en agarosa de alta resolución al 1% en tampón tris acetato EDTA (TAE) y usando como marcadores de peso molecular el pUC18 ADN digerido con DpnI (Sigma.USA). Al gel se le adicionara bromuro de etidio para visualización de las bandas bajo luz ultravioleta.

7. Determinación de perfiles de linfocitos por citometría de flujo (CD3, CD4, CD8, CD 30) (Sayles P y Jonson, 1996): Se colectara sangre periférica de la cola de los animales preinmunizados (día 0), y en 5 tiempos post inmunización (día 5, 10, 15, 20, 25, 30) , se sometera a lisis hiposmótica (erithocytes lysis buffer. Sigma) para eliminar los eritrocitos, los leucocitos remanentes, se incubaran con anticuerpos monoclonales anti CD CD3, CD4, CD8, CD 30 conjugados con fluorocromos diferentes para detectar mediante citometría de flujo estas poblaciones de linfocitos (Este análisis se realizara en el INAS o en la Fundación Instituto Nacional de inmunología en Bogotá)

8. Determinación de la protección conferida por la cepa de *V. cholerae* atenuada que expresa la proteína heteróloga SAG2(CVD103-HgR-SAG2): una vez completado el esquema de inmunización, se someterán a los animales a un reto por vía oral en una suspensión de SSN con 100 quistes hísticos de la cepa 76K de *T. gondii* , un mes después de este reto se sacrificaran los animales mediante sobredosis con éter y se extraerá el cerebro, el cual se homogenizara con mortero en SSN(Brinkman et al ,1987), se determinara mediante conteo microscópico en cámara de Neubauer el número de quistes cerebrales en cada uno de los ratones previamente inmunizados por vía oral y se comparara con el número de quistes en los animales sin inmunización pero infectados con la misma cepa (grupo control).

9. Bioensayo: A partir de los cerebros de los animales antes mencionados con presencia de quistes hísticos de *T.gondii*, se realizara el aislamiento de los mismos a partir del homogenizado de cerebro mediante gradiente de densidad centrifugación con una solución de dextran al 30% (Mr, 229.000.Sigma) a 1.400 xg por 20 minutos(Kasper L, 1989) . Los quistes recuperados del sobrendante se suministrarán a ratones sanos y se realizara un seguimiento serológico específico anti *T.gondii* para determinar la presencia de infección en estos ratones (esto permitirá confirmar que los quistes observados previamente en los animales inmunizados son de *T.gondii*) además al cabo de un mes post inoculación estos animales se sacrificarán y se realizara igualmente búsqueda mediante visualización microscopica de la presencia de quistes cerebrales de *T.gondii*.

- 10.Verificación de los hallazgos de competencia conferida por la inmunización mediante PCR de anidado con el gen B1 de *T. gondii* a partir del ADN del

tejido cerebral de los animales inmunizados con la bacteria transgénica y retados con la cepa 76K: A partir del tejido cerebral extraído de los animales del grupo control e inmunizados, se realizara la extracción de ADN total utilizando un kit comercial según las especificaciones del fabricante (Wizard genomic DNA purification Kit. Promega), el cual se utilizara como molde para la amplificación mediante PCR del gen B1 de *T.gondii* con el siguiente juego de iniciadores (Cazevane et al, 1994):

El procedimiento seguido para la amplificación del gen B1 se realizara de forma similar al descrito por Cazevane (Cazevane et al, 1994). Se amplificara un fragmento de 160pb del gene B1, se utilizaran 25 µl de la mezcla (1.5U Taq Pol., 10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 0.2mM dNTP. Sigma, USA), adicionando 5µl de MgCl 25mM (concentración final en la mezcla de 2.5mM), 50 ng de ADN genómico extraido del tejido cerebral y 0,5 µM de los siguientes primers:

- Oligo1: 5'-AAC GGG CGA GTA GCA CCT GAG GAG A-3'
- Oligo2: 5'-TGG GTC TAC GTC GAT GGC ATG ACA AC-3'

Se ajustara el volumen a 50µl, se correrá el siguiente programa: desnaturalización: 94° C/1min, anillado: 60° C/1min, extensión: 72° C/1min 30 ciclos y fase final de extensión a 72° C/10min en un termociclador Amplitrom®II.(Thermolyne. USA).Después de completado el programa se corroborará la amplificación mediante electroforesis en agarosa de alta resolución al 1% en tampón tris acetato EDTA (TAE) y usando como marcadores de peso molecular el pUC18 ADN digerido con DpnI (Sigma.USA).Al gel se le adicionara bromuro de etidio para visualización de las bandas bajo luz ultravioleta.

11. Análisis estadístico: Se realizarán análisis de varianza de una sola vía así como la prueba de Student-Newman-Keuls. Se determinará la existencia de diferencia estadística en el número de quistes cerebrales entre los animales inmunizados y no inmunizados mediante análisis de estadística no paramétrica como la prueba de Kruskal-Wallis.

7. Resultados Esperados

Establecimiento del patrón inmune estimulado por la inmunización oral con la cepa de *V. cholerae* transgénica que expresa la proteína SAG2 de *T. gondii* y el grado de competencia brindado por ésta en ratones Balb/c.

Determinar los mecanismos de inmunidad adquirida contra la toxoplasmosis luego de la inmunización con la cepa de *V. cholerae* CVD103-HgR-SAG2.

Fortalecimiento de la línea de investigación en toxoplasmosis e Inmuología molecular del CIBM-UQ.

Capacitación de un estudiante de pregrado en las tecnologías de biología molecular y ensayos inmunoenzimáticos que se utilizarán para el desarrollo del presente proyecto.

Adecuación de espacio físico en vivario del programa de biología de la Universidad del Quindío.

8. Estrategia a utilizar para la transferencia de los resultados (conocimiento básico, aplicado o tecnológico) a los usuarios potenciales

Difusión de los resultados en congresos y publicación de los resultados y conferencias a grupos de interés.

9. Estrategias de Comunicación

Los resultados parciales alcanzados se presentaran en congresos relacionados con la inmunología y medicina tropical, los resultados finales se publicaran en revistas nacionales e internacionales relacionadas con el campo de trabajo.

10. Justificación:

La realización del presente proyecto se justifica dada la necesidad de conocer el tipo de respuesta inmune desencadenado por el candidato vacunal contra *T. gondii* CVD103-HgR-SAG2, para poder continuar con los procesos de evaluación de este candidato y abrir la posibilidad de la implementación de medidas preventivas de inmunización en las poblaciones susceptibles.

11. Trayectoria del grupo

El Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Quindío es un grupo escalafonado en la categoría C en la convocatoria de Colciencias del año 2000.

Entre 1984 y 1985 se emprendieron dos proyectos en el programa de medicina de la Facultad Ciencias de la Salud de la Universidad del Quindío, los que luego se consolidaron como dos grupos, con la presencia de varios proyectos de investigación. La continuidad de la labor ha permitido su presencia científica nacional e internacional, los dos grupos, finalmente adoptan un común denominador: las enfermedades infecciosas.

En 1992 se presenta la propuesta de creación de un Centro de Investigaciones, la que fue aprobada en 1993 y el 9 de Diciembre de ese año se realizó la inauguración oficial del Centro en las instalaciones del Edificio de la Facultad. Los proyectos iniciales fueron realizados durante la época de estudiantes de pregrado de la mayoría de sus integrantes (1987-1992). Al egresar de los programas de pregrado, la universidad propició y apoyó la vinculación de los miembros del grupo como docentes. En 1992, un integrante del Grupo obtiene una beca de la Administración general de Cooperación para el Desarrollo del Reino de Bélgica y parte a realizar su formación de Maestría. Entre tanto otros terminan su internado en la Universidad de Antioquía y son vinculados a la Universidad del Quindío

inicialmente como investigadores en año de servicio social obligatorio y luego como docentes.

Los resultados de la tesis de Maestría en Bélgica son presentados en el VII Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical en Bucaramanga y se obtiene el Premio Nacional en Medicina Tropical.

Posteriormente este líder del grupo es beneficiado con beca de Colciencias e inicia tesis de doctorado en la Universidad de Reims en Francia. El grupo organiza el VIII Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical en noviembre de 1995. Posteriormente dos integrantes obtienen becas para doctorado en el exterior: uno en el Instituto de Medicina Tropical "Príncipe Leopoldo" de Bélgica y otro en el Instituto Pedro Kouri de La Habana, Cuba. De otro lado se realizan las primeras publicaciones con trabajo enteramente realizado en el CIBM en revistas internacionales indexadas lo cual demuestra que el grupo ha logrado nivel internacional.

Otros docentes se vinculan al CIBM y nacen dos líneas de investigación: Bioquímica de Enfermedades Cardiovasculares y Citogenética. De esta manera se amplió la temática de trabajo del CIBM. Estos grupos han realizado trabajos con publicaciones a nivel internacional y trabajos de cooperación nacional e internacional. La dotación del CIBM se realizó con perspectiva de trabajo de alto nivel lo cual en la actualidad permite tener un centro con una excelente infraestructura de investigación básica (equipos para cultivo celular, inmunoquímica, biología celular y molecular).

El CIBM cuenta en la actualidad con seis investigadores de tiempo completo (Jorge Enrique Gómez, Arley Gómez López, Alfonso Londoño, María Mercedes González, Martha Lucia Gallego y Nelsy Loango), dos investigadores en formación de doctorado (Jhon Carlos Castaño y Patricia Landazury) un docente de medio tiempo (Beatriz Restrepo C) y tres jóvenes investigadores (estudiantes de pregrado realizando trabajos de grado con el grupo). Siendo el director Jhon Carlos Castaño Osorio.

El grupo a nivel regional (eje cafetero) representa uno de los desarrollos consolidados más importantes en investigación biomédica. Este cuenta con el personal con mayor nivel en formación, experiencia y productividad científica, en el departamento y la región, en el área del estudio de las enfermedades infecciosas y la medicina tropical. A finales del presente año, dos de sus integrantes terminarán su nivel de doctorado.

Los temas de investigación del CIBM corresponden a temáticas identificadas como las de mayor impacto sobre el bienestar humano en Colombia. La fortaleza mayor de esta propuesta es que las soluciones que se obtengan con los trabajos de investigación desarrollados por los estudiantes de la maestría serán soluciones universales por definición, pues se basan en el método científico.

12. Producción de los Grupos en los Últimos 5 Años y Proyectos en Curso

1. **Montoya MT, Gómez Marín JE, Loango N, Castaño JC, Marx C, Foudrinier F, Aubert D, Bonhomme A, Pinon JM.** Utilidad de dos pruebas serológicas para IgA humana antitoxoplasma como pruebas de referencia para toxoplasmosis materna reciente. Acta Médica Colombiana 23:275-282; 1998
2. **Gómez Marín JE, Montoya MT, Castaño JC, Alvarado F, Duque AM, Chemla C, Aubert D, Bonhomme A, Pinon JM.** Frequency of specific anti-*Toxoplasma gondii* IgM, IgA and IgE in Colombian patients with acute and chronic ocular toxoplasmosis. Mem Inst Oswaldo Cruz 95 (1): 89-94; 2000
3. **Gómez-Marín JE, Castaño JC, Montoya-Londoño MT, Loango N, López C, Sarmiento MC, Navarro L, Alvarado F.** Toxoplasmosis congénita en Colombia: Análisis clínico y de laboratorio en 27 casos. Pediatría 35: 52-57; 2000

4. **Gómez JE, Corredor A, Murcia M, López MC, Alvarado F, Anzola A, Saravia J.** Valor diagnóstico de la medición de IgG, IgM e IgA anti-*Toxoplasma* en pacientes infectados por VIH. Infectio 4: 4-10; 2000
5. **Castaño Osorio JC,** Marcet Sánchez R, Cox Iraola R, Sarracent Perez J. Inhibición de la invasión y multiplicación de *T. gondii* en células epiteliales de colon humano por un anticuerpo monoclonal contra la proteína SAG2. Revista Cubana de Medicina Tropical.2001; 53(3):161-9.
6. **Castaño Osorio JC, Sarracent Perez J.** La inmunización intranasal de ratones con la proteína SAG2 de *Toxoplasma gondii* asociada con toxina colérica reduce la formación de quistes cerebrales después de la infección con la cepa 76K de *T. gondii*. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. 2002;21:35-45.
7. **Marcet R., I Méndez, Castaño J.C., Otero O., Lastre M., Pérez O. y Sarracent. J.** Obtención de Anticuerpos Monoclonales contra IgA secretora humana. Revista de Medicina Tropical.1999 Vol.51 pag 33-37.
8. **Gomez-Marín J E, Montoya-de Londoño MT, Castaño Osorio JC, Alvarado-Heine F, Duque AM, Chemla C, Aubert D, Bonhomme A, Pinon JM.** Frequency of specific anti-*Toxoplasma gondii* IgM, IgA and IgE in Colombian patients with acute and chronic ocular toxoplasmosis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.2000, 95: 89-94.
9. **Gómez JE, Montoya MT and 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: 180-86.

13. Proyectos en curso

1. La educación en salud en el control de la ascariosis intestinal en familias que habitan los asentamientos temporales de la ciudad de Armenia
2. Caracterización por la técnica RFLP del gen SAG2 de aislados colombianos de *Toxoplasma*

TABLA 1. PRESUPUESTO GENERAL

RUBROS	VALORES	
	EFFECTIVO	ESPECIE/ RECURRENTE
PERSONAL	2590	14100
EQUIPO	Compra	4000
	Arriendo	
	Uso	
Termociclador		12000
Sala de cultivo (caméra de flujo laminar, incubadora, microscopio invertido).		50000
Congeladores		20000
Lector de ELISA		10000
Equipos de Electroforesis		8000
SOFTWARE		
MATERIALES E INSUMOS	22.000	
SERVICIOS TECNICOS		
BIBLIOGRAFIA		
VIAJES	2000	
SALIDAS DE CAMPO		
OTROS (ADECUACIONES FISICAS)		
TOTAL	30590	114100

Rubros	I semestre	II semestre	III semestre
Personal	830	880	880
Equipos	4000		
Software			
Materiales e insumos	12000	5000	5000
Servicios Tecnicos			
Bibliografia			
Viajes	500		1500
Salidas de campo			
Otros(adecuaciones físicas)			
Total	17330	5880	7380

SOFTWARE QUE SE PLANEA ADQUIRIR /(Miles de pesos)

DESCRIPCION	Justificación de uso dentro del proyecto	Valor	Cantidad	Valor total

MATERIALES E INSUMOS (Miles de pesos)

DESCRIPCION	Justificación de uso dentro del proyecto	Valor unitario	cantidad	Valor total
Anticuerpos monoclonales anti IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3. Sustratos enzimaticos para ELISA	Se requieren para la determinación de la respuesta inmune	1000	4	4000
Kit de extracción ARN, kit RT-PCR,secuencias de INF gamma, IL4, AcM anti CD3, CD4, CD30 marcados con fluorocromos, tampones.	Son necesarios para la realización de la citometria de flujo, PCR.			14000

Material Plastico: Puntas, viales, tubos para PCR, Placas de ELISA.	Se requieren para las diferentes fases del proyecto	2000		2000
				20000

DESCRIPCION DE GASTOS DE PERSONAL (Miles de pesos)

Nombres y apellidos	titulo	Funcion en el proyecto	Dedicacion horas/semana	N° de meses	Valor total
	Basica posgrado				
Jhon Carlos Castaño	Medico PhD	Investigador principal	10	18	7560
Alejandra María Giraldo	Bióloga	Co-investigador	20	18	4230
	Estudiante	Joven Investigador	17	18	
	Estudiante	Auxiliar de Investigación	300/semestre	18	2590
		TOTAL			14380

EQUIPOS QUE SE PLANEA ADQUIRIR				
DESCRIPCION	JUSTIFICACION DE USO DENTRO DEL PROYECTO	VALOR UNITARIO	CANTIDAD	VALOR TOTAL
Jaulas, bebederos	Mantenimiento de ratones			1000
Equipos de aire acondicionado	Adecuación cuarto de cultivo			2000
Micro pipetas	Trabajo de Elisis			1000
	TOTAL			4000

DESCRIPCION DE VIAJES (Miles de pesos)

lugar	justificación	Costo pasaje por persona	Costo estadía por persona	N° de días	Valor total
INAS. Bogotá	Realización de Citometria de flujo	50	450	10	500
Ciudad Colombiana	Congreso para presentación de resultados	700	800	4	1500
		750	1250		2000