

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

Evaluación de la Capacidad Protectora del Anticuerpo
Monoclonal 5G8.B5 Durante la Infección Intestinal por
Giardia lamblia en un Modelo Gerbil

TESIS EXPERIMENTAL

Para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Brenda Guadalupe Samaniego Soto

Hermosillo, Sonora

29 de Agosto de 2014

Repositorio Institucional UNISON



**“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora y a la División de Ciencias Químico Biológicas y de la Salud, por los años de educación que me otorgaron.

Al Departamento de Ciencias Químico Biológicas por brindarme el apoyo para realizar mi trabajo de tesis y al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA), por las facilidades brindadas en sus instalaciones, en particular al M. C. Rafael Canett por su apoyo en el Bioterio.

A mi familia, mis padres y mi hermano por el apoyo que me han brindado desde que inicie mi educación.

Al Dr. Carlos Velázquez por darme la oportunidad de crecimiento profesional al realizar este trabajo, por sus enseñanzas, su tiempo, su entera confianza y sobre todo la paciencia, consejos y creer en mí.

A mi comité de tesis, a la Dra. Adriana Garibay, a la Dra. Marina Arvayo por sus observaciones para hacer de este trabajo un producto de calidad y sobre todo a la M.C. Lucila Rascón, gracias maestra, por haberme brindado siempre su tiempo cuando lo requerí y sobre todo por las enseñanzas y consejos, además de haber sido para mí más que una guía en el laboratorio una entrañable amiga.

A mis compañeros de laboratorio, Alejandra, Ramses, Paola, Jael, Samuel, Lulú, Erika y Gloria. Gracias por enseñarme tantas cosas, siempre me escucharon, comprendieron, tuvieron paciencia, y sobre todo por su ayuda en la elaboración de este trabajo y por hacer del laboratorio un lugar tan agradable para trabajar.

Brenda Samaniego

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	6
LISTA DE FIGURAS	7
HIPÓTESIS	
OBJETIVOS	8
Objetivo General	8
Objetivos Particulares	8
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	12
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Animales de Experimentación	19
Cultivo de <i>G. lamblia</i>	19
Líneas celulares	19
Producción de Anticuerpos Monoclonales Específicos Contra <i>G. lamblia</i>	20
Purificación del Anticuerpo Monoclonal 5G8.B5 por Cromatografía de Afinidad	20
Enriquecimiento de la Población de <i>G. lamblia</i> 5G8 (+) Mediante la Técnica de Inmunoadsorción	21
Obtención de Proteínas Solubles de Trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	21
Cuantificación de Proteína en el Extracto Antigénico Soluble de <i>G. lamblia</i>	22
Inmunofluorescencia Indirecta de Trofozoítos	22
Electroforesis SDS-PAGE	23
Electrotransferencia e Inmunodetección por Western-Blotting	23
Inducción de Giardiasis en el Modelo Gerbil <i>Meriones unguiculatus</i>	24
Evaluación de la actividad protectora del Anticuerpo 5G8.B5 en el model gerbil <i>Meriones unguiculatus</i>	24
RESULTADOS	26
Producción y Purificación del Anticuerpo Monoclonal 5G8.B5	26
Perfil Electroforético (SDS-PAGE) del Anticuerpo Monoclonal 5G8.B5	26

Evaluación del Anticuerpo Monoclonal 5G8.B5 hacia Antígenos de Superficie de Trofozoítos de <i>G. lamblia</i> 5G8 (+) por Inmunofluorescencia Indirecta	30
Enriquecimiento de la Población de <i>G. lamblia</i> 5G8 (+) Mediante la Técnica de Inmunoadsorción	30
Obtención de Proteínas Solubles de Trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	33
Identificación de Proteínas Inmunorreactivas de <i>G. lamblia</i> Reconocidas por el Anticuerpo Monoclonal 5G8.B5	33
Evaluación del Papel Protector del Anticuerpo Monoclonal 5G8.B5 en un Modelo de Infección Intestinal con <i>G. lamblia</i> (cepa GS/M-83-H7, 5G8 (+)) Utilizando el Modelo Gerbil <i>Meriones unguiculatus</i>	36
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFÍA	43
ANEXOS	47

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Densidad óptica y concentraciones de fracciones recolectadas	27

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Cromatograma de la purificación del anticuerpo monoclonal 5G8.B5	28
2. Perfil Electroforético (SDS-PAGE) del anticuerpo monoclonal 5G8.B5 purificado específico para la proteína 5G8 de <i>G. lamblia</i>	29
3. Reconocimiento de antígenos de superficie de <i>G. lamblia</i> por el anticuerpo monoclonal 5G8.B5	31
4. Enriquecimiento de la población de <i>G. lamblia</i> 5G8 (+)	32
5. Patrón electroforético del extracto de proteínas de <i>G. lamblia</i> (Panning VIII)	34
6. Perfil de inmunorreconocimiento de antígenos de <i>G. lamblia</i> reconocidos por el anticuerpo monoclonal 5G8.B5	35
7. Evaluación del papel protector del anticuerpo monoclonal 5G8.B5 en un Modelo de Infección Intestinal con <i>G. lamblia</i>	37

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la capacidad protectora del anticuerpo monoclonal 5G8.B5 durante la infección intestinal por *Giardia lamblia* (GS/M-83-H7, 5G8 (+)) en el modelo gerbil *Meriones unguiculatus*.

Objetivos Particulares

- Producir y purificar el anticuerpo monoclonal 5G8.B5 a partir de sobrenadante de cultivo del hibridoma 5G8.B5 mediante cromatografía de afinidad.
- Enriquecer la población de *G. lamblia* que exprese la proteína 5G8 en la superficie del parásito (cepa GS/M-83-H7, 5G8 (+)).
- Caracterizar la inmunorreactividad del anticuerpo monoclonal 5G8.B5 purificado contra proteínas de *G. lamblia* mediante citometría de flujo, ensayos de Dot Blotting y Western Blotting.
- Evaluar el papel protector del anticuerpo monoclonal 5G8.B5 en un modelo de infección intestinal con *G. lamblia* (cepa GS/M-83-H7, 5G8 (+)) utilizando el modelo gerbil *Meriones unguiculatus*.

RESUMEN

G. lamblia es el agente causante de giardiasis, infección parasitaria que se produce por la contaminación fecal/ oral en un medio de higiene precario, siendo una de las enfermedades intestinales humanas más comunes en todo el mundo. La giardiasis se caracteriza por ser una infección grave, debilitante, que afecta a miles de personas cada año, especialmente en los países en desarrollo. Las manifestaciones clínicas van de portador asintomático hasta llegar a desarrollar una infección crónica, donde puede presentar síntomas como pérdida de peso continua, anorexia y malabsorción. En la actualidad, no se cuenta con una vacuna en humanos para controlar y erradicar la infección por *G. lamblia*. Para lograr desarrollar ésta, primeramente se deben identificar, caracterizar, purificar o sintetizar los componentes que confieren inmunogenicidad a la vacuna, los antígenos. En el presente trabajo se analizó el efecto protector del anticuerpo monoclonal 5G8.B5 en un modelo de infección intestinal (*Meriones unguiculatus*) utilizando trofozoítos de *G. lamblia* de la cepa GS/M-83-H7, 5G8 (+). El anticuerpo monoclonal 5G8.B5 purificado reconoció una proteína de aproximadamente 71 kDa de *G. lamblia*. Esta molécula se expresa tanto en el citoplasma como en la membrana de los trofozoítos GS/M-83-H7, 5G8 (+). La administración del anticuerpo 5G8.B5 a gerbiles infectados disminuyó de manera significativa la carga parasitaria de animales infectados. En conclusión, el presente trabajo, demuestra que el anticuerpo monoclonal 5G8.B5 tiene capacidad protectora durante la infección intestinal por *G. lamblia* en el modelo gerbil. La proteína 5G8 de *G. lamblia* es una molécula altamente inmunogénica la cual podría ser un candidato de estudio para el establecimiento de bases moleculares y celulares que conlleven al desarrollo de una vacuna contra la giardiasis.

INTRODUCCIÓN

El parásito *Giardia lamblia* (también conocida como *Giardia intestinalis*) fue descubierto por Leewenhoek en 1681, en sus propias heces fecales. Sin embargo, la primera descripción identificable fue realizada por Lambl en 1859, quien le proporcionó el nombre *intestinalis*. Posteriormente, en 1915, Stiles creó una denominación binomial nueva, *Giardia lamblia*, en honor al profesor A. Giard de París y del doctor F. Lambl, de Praga, Republica Checa (Romero, 2007). Es un protozooario binucleado y flagelado que habita el intestino delgado de su hospedero (Adam, 2001; Syed y Hill, 2003). Presenta dos estadios: el trofozoíto, que es el estadio vegetativo, y el quiste que es la forma infectiva, el cual tiene capacidad de sobrevivir fuera del hospedero (Gilles, 1999; Faubert, 2000). *G. lamblia* es el agente responsable de la giardiasis, parasitosis intestinal más común en todo el mundo, presentándose con mayor incidencia en niños en edad preescolar (Sotelo, 1998; Guilles, 1999; Eckmann, 2003; Palm et al., 2003). Esta patología puede presentar un curso asintomático, o bien, acompañarse de manifestaciones clínicas o subclínicas. Los síntomas que se pueden presentar van desde un cuadro diarreico agudo con deshidratación, o seguir un curso prolongado con evacuaciones diarreicas muy fétidas, dolor abdominal, náuseas, vómito, pérdida de peso, pudiendo manifestar signos y síntomas relacionados con anemia, diarreas crónicas asociadas al síndrome severo de mala absorción de nutrimentos (Lascurain et al., 1993; Sotelo, 1998, Faubert, 2000; Eckmann, 2003; Palm et al., 2003).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que aproximadamente 250 millones de personas en el mundo están infectadas y que se presentan 2.8 millones de nuevos casos por año, siendo una de las causas más comunes de diarrea en países industrializados, con una prevalencia del 15 - 30 % y del 20 - 60 % en países en vías de desarrollo (Muelles y Gottstein 1998; Guilles, 1999; Eckmann, 2003; Palm et al., 2003; Syed y Hill, 2003). México, es un país endémico con prevalencias que varían desde el 5 al 60 % y según el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, en el primer semestre del 2012, Sonora se ubicó en el quinto lugar con 654 casos (SSA, 2013).

A pesar de la alta morbilidad asociada a *G. lamblia*, se conoce muy poco acerca de su complejión antigénica, especialmente su naturaleza bioquímica y su participación en la respuesta inmune del hospedero (Chaudhuri et al., 1997). El conocimiento y el papel que esos antígenos tienen en la respuesta inmune durante la infección son importantes para el entendimiento de la enfermedad. Por otro lado, se han identificado proteínas inmunogénicas

tanto internas como de superficie separándolas por diferentes métodos como son: electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) tanto en una (Faubert, 2000) como en doble dimensión (Palm y *col.*, 2003), cromatografía de extractos antigénicos solubles (Chaudhuri et al., 1997), entre otros.

El equilibrio inmunológico del organismo es desafiado por la presencia del parásito. La inmunidad innata, es la primer línea de defensa del sistema inmune, que involucra mecanismos bioquímicos y celulares no específicos presentes antes de que se produzca la infección y que están preparados para responder con rapidez ante ésta (Du Pasquer L, 2001) como lo son las barreras físicas (epitelios y mucosas) y químicas (moléculas antimicrobianas sintetizadas en superficies epiteliales), células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos), células linfocíticas (Natural Killer), el sistema del complemento, moléculas mediadoras de la inflamación, entre otras (Abbas y Lichtman, 2008). Contrastando con estos mecanismos, existe otra vía de defensa, en la cual la respuesta se debe a la exposición del agente infeccioso (*G. lamblia*), llamada inmunidad adaptativa. La cual se caracteriza por presentar gran especificidad por diferentes moléculas del parásito y capacidad de reconocer y responder con mayor intensidad a la exposición del agente, en donde participan tanto moléculas (anticuerpos) con alta especificidad contra el agente (inmunidad humoral), como células (linfocitos T, células presentadoras de antígeno, etc.) capaces de confrontar al agente infeccioso. Teniendo en cuenta estas bases, es importante conocer los mecanismos inmunológicos involucrados en el control de la giardiasis, así como los procesos de erradicación de la misma. Aún y cuando se ha documentado que durante la infección intestinal por *G. lamblia*, el hospedero monta tanto una respuesta inmune humoral como la celular, el conocimiento que se tiene acerca de los mecanismos de patogénesis, la respuesta inmune involucrados en la giardiasis humana, así como la identificación y caracterización de los antígenos de este parásito son limitados.

Los linfocitos B juegan un papel importante en la eliminación de la infección, al observarse un incremento en la producción de anticuerpos de la clase IgA, IgM e IgG tanto en secreciones mucosas, como en suero en humanos (Faubert, 2000; Eckmann, 2003).

Con base a lo anterior, es de nuestro interés evaluar la capacidad protectora de un anticuerpo monoclonal generado en nuestro grupo de investigación el cual es específico contra un antígeno inmunogénico de *G. lamblia*, que contribuirá de manera importante en la caracterización inmunológica de moléculas inmunogénicas del parásito.

ANTECEDENTES

Giardiasis: Aspectos clínicos

G. lamblia es un protozooario binucleado y flagelado que habita el intestino delgado de su hospedero (Adam, 2001; Syed y Hill, 2003). Presenta dos estadios: el trofozoíto, que es el estadio vegetativo, y el quiste que es la forma infectiva, el cual tiene capacidad de sobrevivir fuera del hospedero (Gilles, 1999; Faubert, 2000). La infección inicia cuando el hospedero ingiere los quistes usualmente contenidos en agua, alimentos o diferentes artículos contaminados (Lascurain et al., 1993; Sotelo, 1998, Faubert, 2000).

La giardiasis es una de las enfermedades intestinales humanas más comunes en todo el mundo. Siendo, *G. lamblia* la única especie reconocida que se encuentra en la mayoría de los seres humanos y otros mamíferos (Ropolo et al., 2005). Esta patología es considerada un problema de salud pública en diversos países, sobre todo en aquellos en vías de desarrollo entre los cuales se encuentra México y según datos de la Secretaría de Salud, Sonora se encuentra en el quinto lugar de prevalencia a nivel nacional, afectando principalmente a la niñez (SSA, 2013).

La infección origina una amplia variedad de manifestaciones clínicas, que van desde un estado de portador asintomático hasta la diarrea severa, dolor abdominal, náuseas, malabsorción y pérdida de peso (Astiazarán et al., 2009; Lascurain et al., 1993; Sotelo, 1998, Faubert, 2000; Eckmann, 2003; Palm et al., 2003), síntomas que por lo general se presentan dos semanas después de la infección (Rivero et al., 2010). Además, se ha reportado que infecciones crónicas por *Giardia* pueden ocasionar retraso del crecimiento, urticaria, colecistitis y pancreatitis. Síntomas poco frecuentes incluyen artritis, arteritis de la retina e iridociclitis, los cuales han respondido al tratamiento para la giardiasis (Wolfe, 1992).

Existen diversos factores que posiblemente contribuyen a la gran variedad de síntomas clínicos. Entre estos se encuentra la virulencia de la cepa de *Giardia*, el número de quistes ingeridos, la edad del hospedero y el estado del sistema inmune del mismo, en el momento de la infección. De igual manera la inmunidad humoral, así como celular, parecen ser importantes en la eliminación de la infección. Sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos implicados (Palm et al., 2003).

En la actualidad, el control de la infección se limita a productos químicos, pero se encuentran disponibles sólo algunas drogas. Además existen problemas como efectos secundarios, resistencia a los medicamentos y una alta tasa de reinfección después del tratamiento en áreas endémicas (Rivero et al., 2010). Entre los medicamentos que son ampliamente usados está el albendazol y secnidazol, sin embargo, no tienen una eficiencia del 100 % y pudieran, al igual que muchos antibióticos, generar cepas resistente, como ya se ha reportado para albendazol (Lemée et al., 2000), metronidazol (Müller et al., 2007) y furazolidona (Gamarro y Castanys, 1996).

La resistencia a los fármacos es sólo una de las posibles explicaciones que se pueden argumentar para explicar el fallo en el tratamiento antiparasitario. Así, el desarrollo de vacunas contra *G. lamblia* se considera un enfoque prometedor para el control de este parásito (Rivero et al., 2010).

Respuesta Inmune

La respuesta inmune de un hospedero inmunocompetente contra parásitos es un mecanismo complejo, en el cual intervienen las respuestas humoral y celular (Romagnani, 1995). Así diversos estudios sugieren que la respuesta inmune humoral y celular coordinadas son necesarias para controlar las infecciones por *G. lamblia* (Singer y Nash, 2000). Sin embargo, en el caso de los parásitos, éstos evitan la inmunidad protectora reduciendo su capacidad inmunogénica e inhibiendo las respuestas inmunitarias del hospedero (Abbas et al., 2008).

G. lamblia coloniza la porción superior del intestino delgado, en donde el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) juega un papel importante en la eliminación de la infección. Diferentes estudios clínicos experimentales indican la importancia de la inmunidad dependiente de las células B; se ha demostrado que las inmunoglobulinas del tipo IgA son muy importantes para el control y eliminación de la infección (Eckmann y Gillin, 2001), sin embargo, el mecanismo específico de la respuesta inmune para *G. lamblia* es pobremente entendido. Para ello, es necesario contar con las herramientas que nos permitan su evaluación como son: modelos animales, estudios *in vitro* (Faubert, 2000), la generación de herramientas biológicas como hibridomas de células T, así como de células B productoras de anticuerpos monoclonales.

En base a lo anterior, es menester comprender cómo es que el sistema inmune del ser humano trata de combatir esta parasitosis, para posteriormente tratar de desarrollar, de manera

racional, una vacuna que ayude a mejorar la respuesta inmune hacia dicho parásito, con la finalidad de lograr una total eliminación de este organismo. Diversos trabajos de investigación se han enfocado principalmente en evaluar la respuesta inmune humoral del hospedero en contra de *Giardia* y se ha demostrado que este mecanismo tiene cierta importancia en el control de la infección por este parásito, ya que durante la parasitosis se ha observado que aumentan los niveles de IgA e IgG principalmente. Por otro lado se ha visto que el aumento del título de anticuerpos está relacionado con la eliminación de la infección (Velazquez y col., 2005). De igual manera, gracias al estudio de este tipo de respuestas, se han podido encontrar ciertas proteínas que son inmunogénicas en el hospedero (Edson y col., 1986, Kanwar y col., 1986, Reiner & Gillin, 1992).

Sin embargo, al estudiar la respuesta humoral (principalmente IgG e IgA) y tratar de entender si ésta era la responsable de eliminar al parásito totalmente, se observó que esto no era así, más bien podía servir para en cierta forma controlar una infección crónica pero no erradicarla totalmente. La causa de esta falla en la eliminación de *G. lamblia* se ha propuesto que es debida a la variación antigénica que presenta el parásito, aspecto que comenzó a cobrar gran interés, pues al entenderlo en mejor manera, podría ser posible tratar de desarrollar algún tipo de terapia más eficiente en contra de giardiasis. Ahora bien, conforme se ha ido estudiando dicho proceso, se han ido proponiendo varias hipótesis de cómo puede ocurrir dicha variación de proteínas de superficie reconocidas por los anticuerpos (Singer & Nash., 2000)

De lo anterior expuesto se puede inferir que, para tener la capacidad de desarrollar una vacuna efectiva contra *G. lamblia* primero es necesario conocer qué proteínas de este parásito son inmunogénicas y cuáles inducen una respuesta inmune protectora. Adicionalmente, es sumamente necesario obtener más información acerca del papel que juegan estas moléculas en el parásito, es decir, si son antígenos de superficie, intracelulares, si son moléculas que son excretadas por *Giardia*, si pertenecen al grupo de las proteínas variantes de superficie o VSP's, las cuales son de gran importancia en los procesos de evasión de respuesta inmune por parte de *G. lamblia*, y por último conocer si dichas proteínas están presentes de manera constitutiva y si son conservadas entre las distintas cepas de este parásito. En base a lo anterior se han estudiado algunas proteínas de *G. lamblia* que son aparentemente inmunogénicas. Entre dichas moléculas proteicas es posible encontrar a α -giardina-1, misma que además de ser inmunodominante en análisis *in vitro*, también lo es en infecciones humanas (Weiland y col., 2003).

Proteínas Antigénicas de *Giardia lamblia*

En la actualidad, no existe una vacuna disponible para la giardiasis humana, por lo que es importante la identificación de antígenos inmunogénicos de *G. lamblia* que estimulan tanto anticuerpos protectores, como una respuesta inmune celular (Astiazarán et al., 2009). La caracterización de los antígenos de *G. lamblia* es importante para entender los mecanismos de defensa del hospedero así como también para entender los mecanismos de la patogenicidad del parásito. Aunque son muchos los antígenos que han demostrado su inmunoreactividad hacia anticuerpos de las clases IgM, IgG e IgA, sólo pocos de ellos se han caracterizado a nivel molecular.

Las VSP que cubren toda la superficie del parásito son los antígenos más estudiados en *G. lamblia*. Estas proteínas sufren variación antigénica, por lo que se ha cuestionado su valor como blancos moleculares de diagnóstico (Palm et al., 2003) y en el desarrollo de vacunas (Singer, 2011). Los antígenos de superficie diferentes a las VSPs que se han descrito, son pocos, entre los más estudiados se encuentran: proteínas de la superficie (polipéptidos de 82 kDa y 65 kDa), las giardinas en el citoesqueleto, proteínas de choque térmico, lectinas y tubulina en el disco y flagelos (Singer, 2011); una glicosilfosfatidilinositol anclada a la proteína de 49 kDa, varias proteínas entre 30 y 34 kDa y una proteína de unión a ácidos grasos de 8 kDa (Palm et al., 2003).

El laboratorio de Inmunología y Biología Celular del Departamento de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad de Sonora se ha dedicado a la identificación y caracterización bioquímica e inmunológica de antígenos capaces de inducir una respuesta inmune humoral y celular. Velázquez et al. (2005), realizaron el análisis de muestras fecales y de sueros de ratones C3H/HeJ después de ser infectados y re-infectados con trofozoítos de *G. lamblia*, teniendo como resultado que la IgA intestinal y las respuestas de anticuerpos IgG en suero se dirige a un número limitado de bandas proteicas, con pesos moleculares de 48, 55, 63, 71, 86, 106, 131 y 159 kDa. Al utilizar hibridomas de células T específicos contra *G. lamblia* se observó que reconocían una fracción antigénica de 71 kDa; al analizar esta fracción mediante espectrometría de masas, se identificaron las siguientes proteínas: subunidad catalítica A vacuolar sintetasa (71537Da), proteína de choque térmico citosólica 70 (71633Da), proteína de unión a anticuerpos o BiP (BIP del inglés; Binding Immunoglobulin Protein) (74360Da), Complejo B IFT (75562Da), proteínas inducidas por estrés como la HSP-90 y la HSP-70

citósica localizadas en las bandas proteicas de 71 kDa, y 63 kDa (Quintero, 2008; Rascón, 2008).

Ávila (2008), generó 5 hibridomas de células B específicos hacia proteínas que se encuentran solamente en la superficie de la clona GS/M 83 H7 de *G. lamblia*, los cuales en su mayoría reconocieron una banda de 71 kDa (proteína 5G8). Esta banda proteica también es reconocida por anticuerpos IgG generados durante la infección en el modelo murino. En estudios posteriores, se caracterizó parcialmente la proteína reconocida por la mayoría de estos monoclonales. Se realizaron ensayos de citometría de flujo en los cuales se observó que solo el 5 % de la población de la cepa GS/M-83-H7 de *G. lamblia* expresaban en la superficie del parásito la proteína 5G8. Basados en esta observación se enriqueció la población de trofozoítos de la cepa GS/M-83-H7, que expresa en la superficie celular este antígeno, mediante la técnica de inmunoadsorción o panning, dando como resultado un incremento en la población que expresan la proteína en la membrana plasmática del parásito (aproximadamente 70 %) (Quintero et al.). Análisis de espectrometría de masas de esta proteína purificada sugirieron fuertemente que la proteína 5G8 pudiera ser la proteína BiP de *G. lamblia* (Quintero et al., 2013; Rascón, 2008).

Modelo Experimental

Se han utilizado varios modelos animales para describir la biología y / o inmunidad a las infecciones por *Giardia*, lo que permite estudiar las interacciones dinámicas que se producen entre el hospedero y el parásito (Byrd et al., 1994).

Basado en análisis genético, se pueden distinguir siete conjuntos distintos de *G. lamblia* (A-G). Los conjuntos A y B son responsables de la infección humana (Ali y Hill, 2003, Rivero et al., 2010) y así mismo se encuentran en una amplia variedad de mamíferos. Las asociaciones restantes muestran rangos de hospederos más restringidos: C y D se encuentra en los cánidos, E en el ganado, F en los gatos y G en roedores (Sprong et al., 2009).

El conjunto B predomina en los humanos; los animales domésticos juegan un papel importante en la gama de hospederos del conjunto A (Sprong et al., 2009). Estos conjuntos están representados por aislados humanos GS y WB, respectivamente. El aislado GS es significativamente más patogénico en infecciones de humanos que lo que es el aislado WB (Adam, 2001), probablemente sea causado por su variación antigénica, ya que Aggarwal y

Nash (1988) demostraron que *in vitro* sus antígenos de superficie cambian más rápidamente que los antígenos de superficie de WB. GS/M-83-H7 (Conjunto B) expresa VSP H7 (72kDa) como su antígeno de superficie principal (Bienz et al., 2001; Müller et al., 1996; Rivero et al., 2010).

Los ratones son infectados naturalmente por *G. muris*, el cual también se somete a la variación antigénica, pero no infecta a humanos y no puede ser cultivada *in vitro* (Prucca y Luján, 2009). La cepa GS/M-83-H7 de *G. lamblia* puede infectar a roedores y a humanos. Esta cepa presenta la ventaja de poder ser cultivada *in vitro*, por lo que es ampliamente utilizada para estudiar la inmunología de la giardiasis (Rivero et al., 2010).

Se ha evaluado la capacidad infectiva de la cepa GS/M-83-H7 tanto en el modelo gerbil *Meriones unguiculatus*, como en el modelo murino C3H/HeJ, encontrando que la cepa GS/M-83-H7 es capaz de inducir giardiasis en ambos modelos de forma estable por varios días. Los resultados concuerdan con lo descrito previamente en la literatura (Byrd et al., 1994). Tanto el modelo murino como el gerbil son una poderosa herramienta para estudiar los mecanismos inmunes efectoros que se producen durante la infección por *Giardia* y tienen considerables ventajas sobre otros modelos animales. El sistema inmune del roedor está bien caracterizado y existe una extensa variedad de reactivos y tecnologías para el estudio de su sistema inmune (Velázquez et al., 2005).

HIPÓTESIS

El anticuerpo monoclonal 5G8.B5 tiene capacidad protectora durante la infección intestinal por *G. lamblia* en el modelo gerbil.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de Experimentación

Para el modelo experimental gerbil, se utilizaron roedores de la cepa *Meriones unguiculatus* de 8 a 14 semanas de edad, éstos fueron obtenidos del bioterio de CINVESTAV. Los animales fueron mantenidos en el Bioterio del Departamento de Investigaciones de Posgrado en Alimentación de la Universidad de Sonora (DIPA), con fotoperíodos de 12 horas a 25 °C y alimentados con una dieta comercial para ratones (2018S de Teklad global diets 18 % protein Rodent diet sterilizable).

La selección de esta cepa se basó en estudios previos que reportan una mayor susceptibilidad a la infección intestinal por *G. lamblia* en este modelo (Byrd et al., 1994).

Cultivo de *G. lamblia*

Se utilizaron cultivos axénicos de trofozoítos de la cepa de *G. lamblia*, clona GS/M-83-H7 obtenidos de American Type Culture Collection (ATCC). Los cultivos se mantuvieron en medio TYI-S33, suplementado con 10 % de suero de ternera recién nacida (NBCS.MICROLAB SU540). Los trofozoítos fueron incubados a una temperatura de 37 °C en condiciones microaerofílicas.

Líneas Celulares

Se utilizaron cultivos del hibridoma 5G8.B5 generados en el laboratorio de Inmunología y Biología Celular en la Universidad de Sonora. Los cultivos se mantuvieron en Medio Eagle Modificado Dulbecco (DMEM), suplementado al 5 % con suero fetal bovino (SFB) (GIBCO, USA), inactivado por calentamiento. El hibridoma se mantuvo a 37 °C en una atmósfera de 5 % CO₂ con una humedad relativa de 80 – 90 % en incubadora Isoterm (Fisher Scientific, USA).

Producción de Anticuerpos Monoclonales Específicos Contra *G. lamblia*

El hibridoma de células B 5G8.B5 productoras de anticuerpos específicos contra la proteína 5G8 de *G. lamblia* fue cultivado en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), suplementado al 5 % con suero fetal bovino (SFB. MICROLAB SU440), inactivado por calentamiento. Las líneas celulares se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de 5 % CO₂, con una humedad relativa del 80-90 % en incubadora Isoterm (Fisher Scientific, USA) (Velázquez et al. 2005).

Una vez que se estableció el cultivo del hibridoma 5G8.B5, se dejó crecer continuamente en medio DMEM con antibióticos y suero fetal bovino produciendo el anticuerpo de interés. Se realizaron recolecciones periódicas de sobrenadante para proceder a la purificación del anticuerpo monoclonal 5G8.B5.

Purificación del Anticuerpo Monoclonal 5G8.B5 por Cromatografía de Afinidad

La purificación del anticuerpo monoclonal 5G8.B5 se llevó a cabo por medio de una columna de afinidad con esferas de sefarosa unidas a proteína A de *Staphylococcus aureus* (Protein A-Sepharose® 4B, Fast Flow from *Staphylococcus aureus* P9424). Para lograr lo anterior, primeramente se hidrataron las esferas de sefarosa con HCl 1 mM por 15 minutos a temperatura ambiente. Después, dichas esferas fueron lavadas con 500 mL de HCl 1 mM, 50 mL de glicina ácida 0.1 M (pH 2.5) y con 250 mL de PBS (pH 7.2) con la finalidad de eliminar cualquier residuo del tratamiento previo de la columna y así evitar algún tipo de contaminación de las futuras fracciones cromatográficas. Posteriormente se ajustó el pH del sobrenadante y se agregó azida de sodio (0.05 %).

Se agregó el sobrenadante del hibridoma 5G8.B5 de manera constante en la columna (flujo promedio de 60 gotas/minuto). Dicho sobrenadante se pasó tres veces por la columna antes de comenzar el proceso de elución. Se obtuvieron 15 fracciones cromatográficas por medio de elución con 700 µL de glicina 0.1 M (pH 2.5), recolectados en microtubos conteniendo 300 µL de Trizma 1M (pH 8). Dicho proceso de cromatografía fue repetido 3 veces con el objetivo de recuperar la mayor cantidad de anticuerpo.

Enriquecimiento de la Población de *G. lamblia* 5G8 (+) Mediante la Técnica de Inmunoadsorción

El enriquecimiento de la población de *G. lamblia* que expresa en su superficie la proteína 5G8 se llevó a cabo incubando en una placa de 6 pozos 50 µg de anticuerpo monoclonal 5G8.B5 en cada pozo durante una hora a 37 °C. Posteriormente se retiró la solución de anticuerpo utilizando una micropipeta y se bloquearon los sitios libres de anticuerpo del pozo con 1 mL de PBS-BSA 1 % estéril en cada pozo durante una hora a 37 °C. Se realizaron cinco lavados suaves con PBS estéril, para después agregar 2×10^6 trofozoítos de *G. lamblia* de la cepa GS/M-83-H7 en cada pozo previamente resuspendidos en PBS-BSA al 1 %. Se incubó durante 20 minutos a 4 °C en agitación constante. Se decantó de manera suave utilizando una micropipeta y se realizaron cinco lavados con PBS estéril. Se adicionó medio de cultivo TYI-S33 suplementado con 10 % de suero de ternera recién nacida (NBCS.MICROLAB SU540) y se incubó por 10 minutos a 4 °C. Se recuperaron los trofozoítos con una micropipeta y se mantuvieron en cultivo durante siete días para después realizar una inmunotinción indirecta utilizando el anticuerpo monoclonal 5G8.B5 y se evaluó el patrón de reconocimiento antigénico mediante citometría de flujo.

Obtención de Proteínas Solubles de Trofozoítos de *G. lamblia*

Los extractos antigénicos solubles de trofozoítos de *G. lamblia* se obtuvieron utilizando el método descrito por Gottstein et al., (1991) con ligeras modificaciones. A partir de un cultivo confluyente, es decir trofozoítos de *G. lamblia* en fase logarítmica de crecimiento, se colocaron los tubos de vidrio en agua-hielo por 15 minutos para promover que los trofozoítos adheridos a las paredes de los tubos se despeguen. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS a un pH 7.2 a 4 °C. A continuación los trofozoítos se resuspendieron en 1800 µL de PBS. De igual manera, éstos fueron lisados mediante tres ciclos de congelación-descongelación en nitrógeno líquido (o congelador de -80 °C) y a temperatura ambiente (o 37 °C) respectivamente. Con la finalidad de prevenir la degradación de proteínas se adicionaron inhibidores de proteasas (4-(2-aminoetil) bencenosulfonilfluoruro (AEBSF), bestatina, leupeptina, pepstatina A, E-64 y 1,10-fenantrolina), 10 µL/microtubo (P2714, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Para asegurar la lisis completa, el contenido celular fue sonificado (Brandson sonifer 250, Shelton, CT, USA) por tres ciclos de dos minutos a 30 ciclos/seg. Por último, el extracto sonificado fue centrifugado a 14,000 g por 15 minutos a 4 °C (Chaudhuri et al., 1997). El sobrenadante con el antígeno soluble de *G. lamblia* se mantuvo en congelación a -80 °C hasta su uso (Rascón, 2008).

Cuantificación de Proteína en el Extracto Antigénico Soluble de *G. lamblia*

La estimación de proteína en la muestra se llevó a cabo mediante el micrométodo de Bradford (BIO-RAD). La concentración de proteína por mililitro se estimó a partir de curvas de calibración, utilizando albúmina sérica bovina (BSA) (concentración 1 mg/mL) como estándar. Una vez obtenida la curva, se preparó la muestra antigénica a analizar en una dilución 1:10 con PBS, se hizo reaccionar con reactivo Bradford y posteriormente se determinó la densidad óptica (D.O.) de esta solución a 595 nm en un lector de microplaca.

Inmunofluorescencia Indirecta de Trofozoítos

Para el análisis por citometría de flujo se utilizaron cultivos confluentes de trofozoítos de *G. lamblia* GS/M-83-H7, 5G8 (+) (aprox. 8×10^6 trofozoítos), los cuales fueron lavados (cada lavado consistió en centrifugar por 5 min a 4 °C a 14000 g y resuspender con PBS, pH 7.2, a 4 °C. Se depositaron 5×10^5 trofozoítos en cada pozo y se incubaron con el anticuerpo monoclonal purificado 5G8.B5 (IgG2b) (5 µg/mL diluido en D5F-0,05 % NaN₃) y con el anticuerpo monoclonal control de isotipo aBDC.2 (IgG2b) (5 µg/mL diluido en D5F-0,05 % NaN₃), durante 1 hora a 4 °C. Después de dos lavados que consistieron en resuspender la pastilla de trofozoítos con 200 µL de PBS frío y centrifugar a 1800 rpm a 4 °C por 5 minutos, los trofozoítos se incubaron con anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a isocianato de fluoresceína (FITC) (diluido 1:200 con D5F-0,05 % NaN₃) durante una hora a 4 °C. Después los trofozoítos se lavaron nuevamente, se centrifugaron y se resuspendieron en 200 µL de D5F- NaN₃-0,05 % y se fijaron con 200 µL de paraformaldehído al 2 %. Su análisis se llevó a cabo utilizando el equipo FACS (Canto II, Becton Dickinson, CA, EE.UU.) (Quintero et al., 2013).

Electroforesis SDS-PAGE

Para observar el patrón electroforético de las proteínas solubles obtenidas de trofozoítos de *G. lamblia*, se realizó una electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras y desnaturizantes (0.2 % de SDS y 0.2 % β -mercaptoetanol). Se llevó a cabo en una cámara de electroforesis para minigeles (Mini-PROTEAN® 3 Electrophoresis Cell., BIO-RAD). Las muestras se corrieron a 110 voltios constantes.

Electrotransferencia e Inmunodetección (Western-Blotting)

Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE a 12 % y transferidas a una membrana de nitrocelulosa en un sistema semiseco de electrotransferencia a corriente constante. Enseguida, las proteínas transferidas fueron teñidas con rojo de Ponceau. Después de desteñir la membrana, ésta se bloqueó con una solución de leche Svelty semidescremada 5 %-BSA 1 %-PBS por una hora. Posteriormente, se removió el exceso de solución bloqueadora, mediante un lavado con PBS y la membrana de nitrocelulosa fue incubada con el sobrenadante del anticuerpo monoclonal 5G8.B5, con anticuerpo monoclonal purificado 5G8.B5 (IgG2b) (0.5 μ g/mL en PBS-BSA 0.1 %), con el anticuerpo monoclonal control de isotipo aBDC.2 (IgG2b) (0.5 μ g/mL en PBS-BSA 0.1 %) y con suero de ratón C3H/HeJ (dil.1:40 con PBS-BSA 0.1 %) como control interno por una hora a temperatura ambiente y en agitación constante. A continuación, se realizaron cinco lavados de cinco minutos cada uno lavados con PBS. Al término de éstos, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario (1:7500) (Goat anti-IgG Mouse HRPO, en PBS-BSA 0.1 %) por una hora a temperatura ambiente en agitación constante. Después, se llevaron a cabo cinco lavados de cinco minutos cada uno lavados con PBS como se mencionó anteriormente. Finalmente, se colocó sobre la membrana una mezcla 1:1 de luminol y peróxido de hidrógeno por diez minutos (Super Signal, West Pico Signal Chemiluminescent, Thermo scientific 34080). Al término, se procedió a revelar la reacción antígeno-anticuerpo por quimioluminiscencia, utilizando soluciones reveladoras y fijadoras (Fujifilm) (Ávila, 2008).

Inducción de Giardiasis en el Modelo Gerbil *Meriones unguiculatus*

Para evaluar el establecimiento de la giardiasis se formaron dos grupos de tres gerbiles cada uno. Al grupo 1, considerado grupo control negativo, se le administró 200 μ L de PBS, pH 7.2, y al grupo 2 se le administró 5×10^6 trofozoítos de *G. lamblia* GS/M-83-H7, 5G8 (+) suspendidos en 200 μ L de PBS estéril a un pH 7.2. Después de 7 días los ratones fueron sacrificados y se diseccionaron 10 cm de la parte alta de intestino (duodeno), esta parte del intestino fue abierta longitudinalmente y se realizó un ligero lavado con medio de cultivo para *G. lamblia*, se recolectó y se incubó en tubos de vidrio con tapa de rosca de 2 mL en agitación constante por una hora a 4°C. Posteriormente el tejido fue retirado y el medio se centrifugó a 1800 rpm por 5 minutos a 4°C. Se contó el número de trofozoítos presentes en el precipitado por microscopía óptica utilizando una cámara de Neubauer.

Evaluación de la actividad protectora del Anticuerpo 5G8.B5 en el Modelo Gerbil *Meriones unguiculatus*

Para evaluar la actividad protectora del anticuerpo monoclonal 5G8.B5 purificado, se formaron cuatro grupos de cuatro gerbiles cada uno. Al grupo uno, considerado el control de infección, no se le administró ningún tratamiento. Al grupo dos, considerado grupo control negativo, se le administró 200 μ L de PBS, pH 7.2. Al grupo tres se les administraron 100 μ g de anticuerpo monoclonal control de isotipo aBDC.2 resuspendidos en 200 μ L de PBS. Al grupo cuatro se les administraron 100 μ g de anticuerpo monoclonal 5G8.B5 resuspendidos en 200 μ L de PBS. Dos horas después se inocularon los 4 grupos con 1.5×10^6 trofozoítos de *G. lamblia* GS/M-83-H7, 5G8 (+), suspendidos en 200 μ L de PBS estéril a un pH 7.2. Posteriormente al día 1, 3 y 5 se reforzaron cada grupo con la misma cantidad de PBS (grupo 2) o anticuerpo monoclonal (grupo 3 y 4) administrada anteriormente. Después de 7 días los gerbiles fueron sacrificados y se diseccionaron 10 cm de la parte alta de intestino (duodeno), esta parte del intestino fue abierta longitudinalmente y se realizó un ligero lavado con medio de cultivo para *G. lamblia*, y se incubó en tubos de vidrio con tapa de rosca de 2 mL en agitación constante por una hora a 4°C. Posteriormente el tejido fue retirado y el medio se centrifugó a 1800 rpm por 5 minutos a 4°C.

Se contó el número de trofozoítos presentes en el precipitado por microscopía óptica utilizando una cámara de Neubauer.

RESULTADOS

Producción y Purificación del Anticuerpo Monoclonal 5G8.B5

Con la finalidad de producir y purificar el anticuerpo monoclonal 5G8.B5 a partir de recolecciones periódicas de sobrenadante del cultivo del hibridoma 5G8.B5, la purificación se llevó a cabo por medio de una columna de afinidad con esferas de sefarosa unidas a proteína A de *Staphylococcus aureus* (ver sección de materiales y métodos). Para conocer la concentración de las fracciones cromatográficas recolectadas, éstas se analizaron mediante espectrofotometría a 280 nm (Figura 1). La tabla 1 muestra la densidad óptica y concentración de las fracciones recolectadas. A partir de a partir de 3 litros de sobrenadante recolectado, se obtuvieron aproximadamente 20 mg de anticuerpo purificado, esto nos maraca la pauta para en futuros ensayos tener una idea de qué cantidad de anticuerpo se está produciendo por mililitro de sobrenadante.

Perfil Electroforético (SDS-PAGE) del Anticuerpo Monoclonal 5G8.B5

La purificación del anticuerpo monoclonal 5G8.B5 se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE). En la figura 2 se observa el patrón electroforético de la proteína purificada, encontrándose proteínas con masa moleculares relativas de ≈ 25 y ≈ 70 kDa, correspondiendo a la cadena ligera y pesada del anticuerpo monoclonal.

Tabla 1. Densidad óptica y concentración de fracciones recolectadas.

Fracción	D.O.	Concentración (mg/mL)
1	0.321	0.234
2	2.807	2.06
3	1.009	0.723
4	0.303	0.227

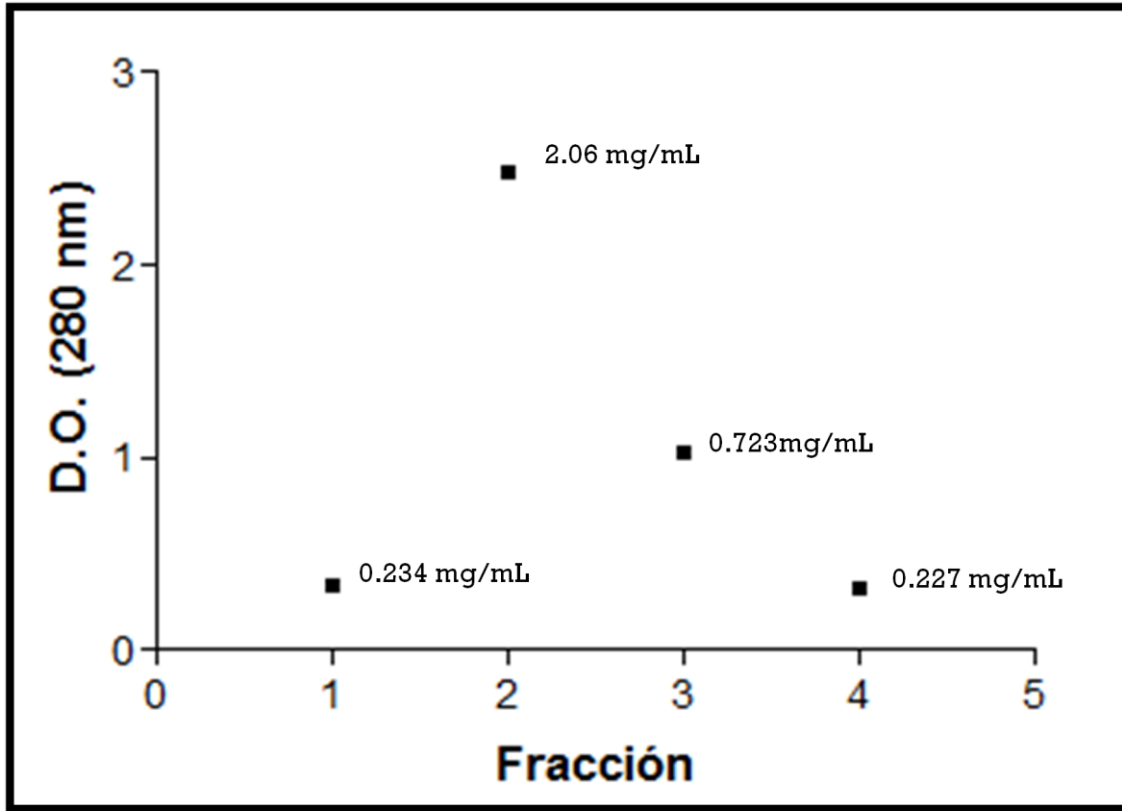


Figura 1. Cromatograma de la purificación del anticuerpo monoclonal 5G8.B5.

Las fracciones recolectadas se analizaron en un espectrofotómetro, obteniendo diferentes lecturas de absorbancia (280 nm).

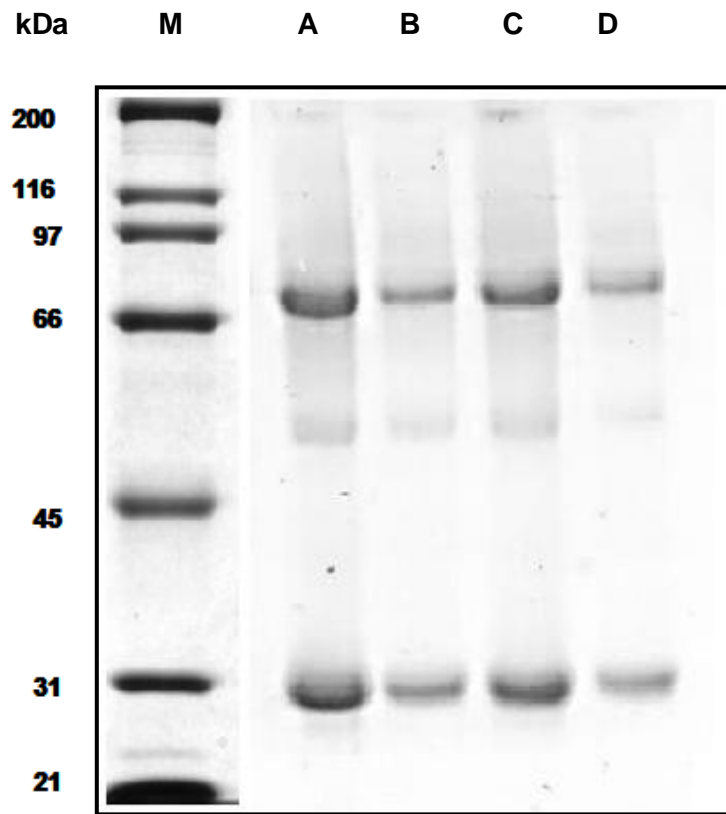


Figura 2. Perfil Electroforético (SDS-PAGE) del anticuerpo monoclonal 5G8.B5 purificado específico para la proteína 5G8 de *G. lamblia*.

El carril M corresponde al marcador de masas moleculares, el carril A a la fracción 1 de anticuerpo monoclonal 5G8.B5 purificado (2.06 $\mu\text{g/mL}$), el carril B a la fracción 2 de anticuerpo monoclonal 5G8.B5 purificado (0.723 $\mu\text{g/mL}$), el carril C a la fracción 3 de anticuerpo monoclonal 5G8.B5 purificado (0.227 $\mu\text{g/mL}$), y por último el carril D a la fracción 4 de anticuerpo monoclonal 5G8.B5 purificado (0.234 $\mu\text{g/mL}$).

Evaluación del Anticuerpo Monoclonal 5G8.B5 hacia Antígenos de Superficie de Trofozoítos de *G. lamblia* 5G8 (+) por Inmunofluorescencia Indirecta

Con la finalidad de analizar la actividad del anticuerpo monoclonal 5G8.B5 purificado, se realizó una inmunotinción indirecta de superficie de trofozoítos de *G. lamblia* 5G8 (+) utilizando mediante citometría de flujo. El anticuerpo monoclonal 5G8.B5 reconoció al ≈ 5 % de los trofozoítos de *G. lamblia* 5G8+ (Figura 3C). El anticuerpo control de isotipo aBDC.2 no reconoció a esta población celular.

Enriquecimiento de la Población de *G. lamblia* 5G8 (+) Mediante la Técnica de Inmunoadsorción

Con el objetivo de enriquecer la población de *G. lamblia* de la cepa GS/M-83-H7 que expresa la proteína 5G8 en su superficie celular, se realizó un ensayo de inmunoadsorción, a partir de aproximadamente 2×10^6 trofozoítos de *G. lamblia* (ver sección de materiales y métodos) para posteriormente llevar a cabo una inmunotinción indirecta utilizando el anticuerpo monoclonal 5G8.B5. La figura 4 expone que aproximadamente el 5 % de la población de *G. lamblia* de la cepa GS/M-83-H7 expresa la proteína 5G8 en su superficie. La población de trofozoítos resultante del proceso de inmunoadsorción fue enriquecida en la expresión de la molécula en la membrana plasmática (aproximadamente 80.9 % de la población).

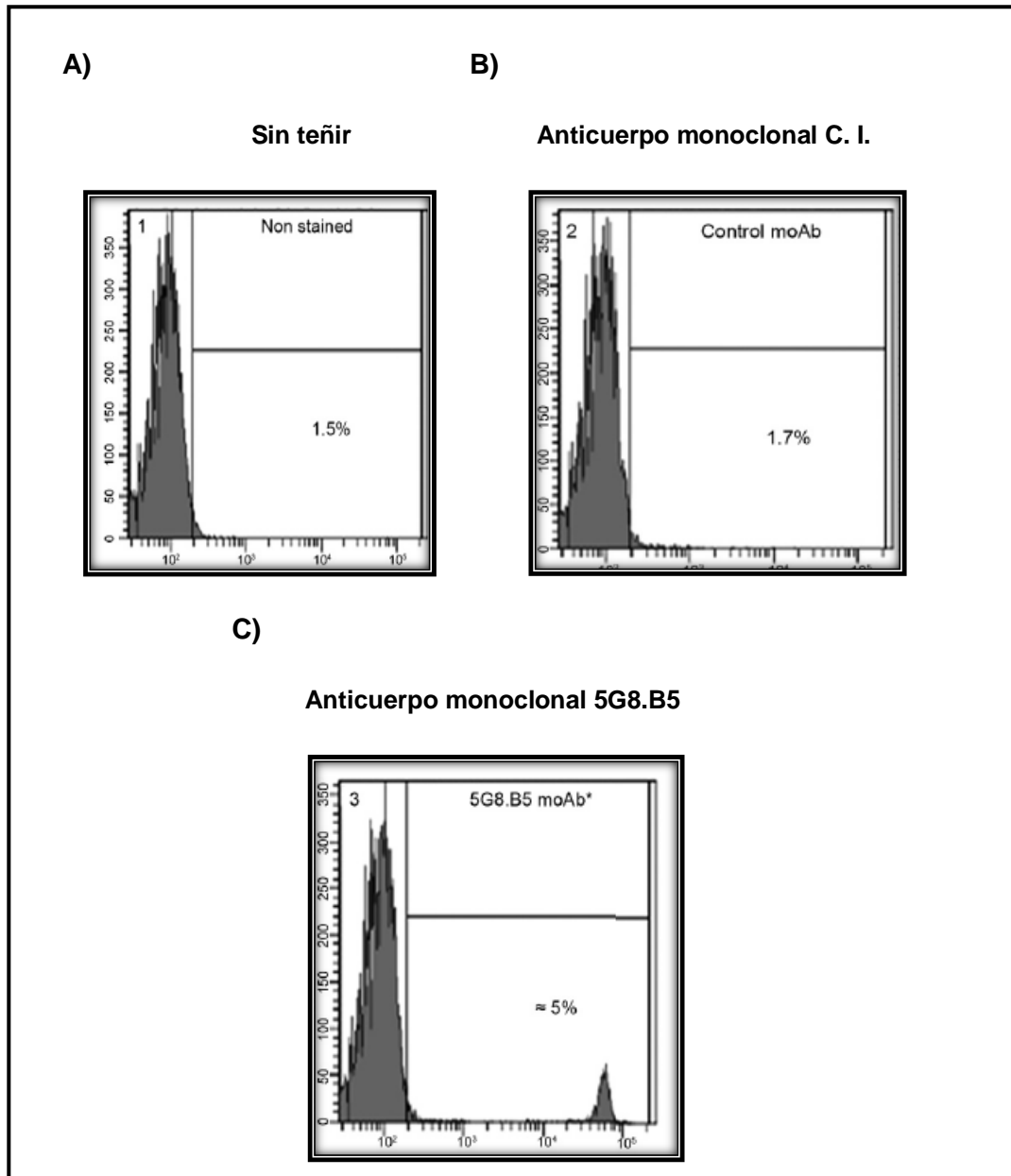


Figura 3. Reconocimiento de antígenos de superficie de *G. lamblia* por el anticuerpo monoclonal 5G8.B5.

Análisis de citometría de flujo utilizando trofozoítos de la cepa GS/M-83-H7 (5G8 (+)). A) Control sin teñir, B) Anticuerpo monoclonal control de isotipo (IgG2b) y C) Anticuerpo monoclonal 5G8.B5 (IgG2b) purificado.

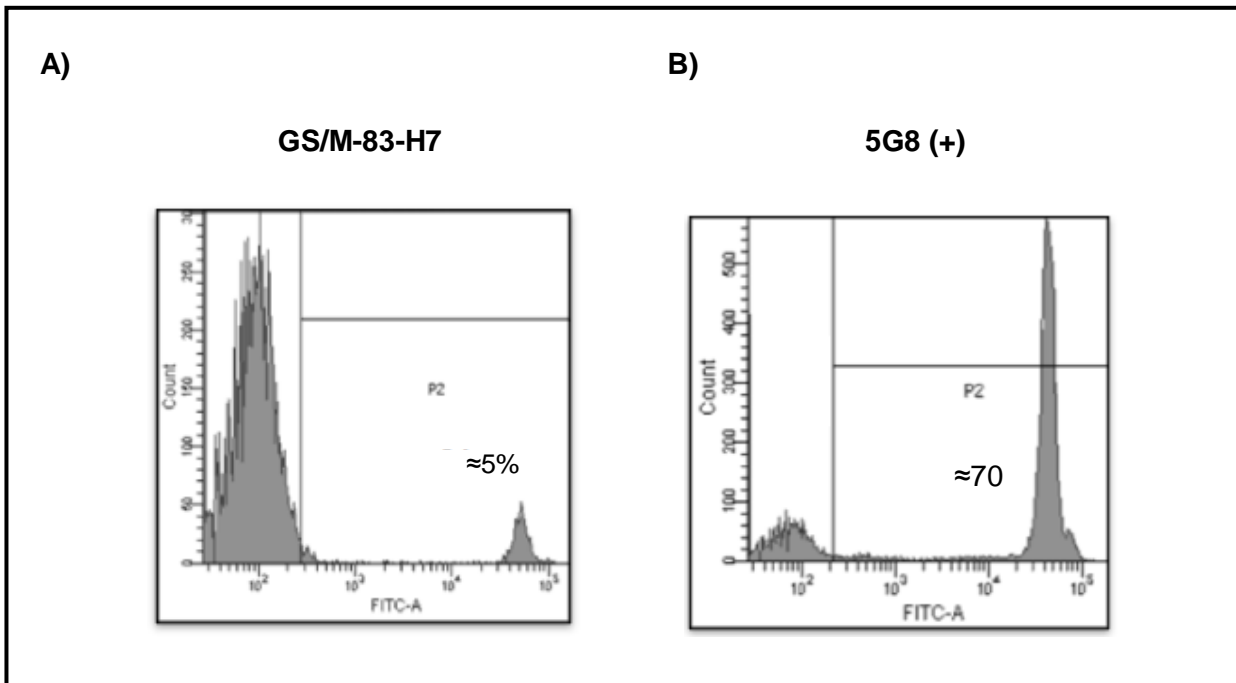


Figura 4. Enriquecimiento de la Población de *G. lamblia* 5G8 (+).

Análisis de citometría de flujo utilizando trofozoítos de la cepa GS/M-83-H7. A) Población 5G8 (+) antes del ensayo de inmunoadsorción (5 %) y B) Población 5G8 (+) después del ensayo de inmunoadsorción (70%) (Quintero et al., 2013).

Obtención de Proteínas Solubles de Trofozoítos de *G. lamblia*

Con la finalidad de obtener extractos antigénicos solubles de trofozoítos de *G. lamblia* se utilizó el método descrito por Gottstein et al., (1991) con ligeras modificaciones. Se cultivaron axénicamente trofozoítos de *Giardia* en fase logarítmica de crecimiento, con el objetivo de obtener una mezcla final de proteínas antigénicas de *G. lamblia*. A partir de aproximadamente 100×10^6 de trofozoítos se recuperaron 10 mg de proteína. El extracto proteico de *G. lamblia* se sometió a electroforesis (SDS-PAGE) en condiciones desnaturalizantes y reductoras, obteniéndose un perfil de bandas separadas en base a su peso molecular, observándose una mezcla antigénica heterogénea de proteínas de diferentes masas moleculares entre 20-200 kDa (Figura 5).

Identificación de Proteínas Inmunorreactivas de *G. lamblia* Reconocidas por el Anticuerpo Monoclonal 5G8.B5

Con la finalidad de conocer el perfil de reconocimiento antigénico del anticuerpo monoclonal 5G8.B5 se realizó un ensayo de Western-blotting utilizando proteínas solubles de *G. lamblia* 5G8 (+). Como se muestra en la figura 6, el mayor reconocimiento del anticuerpo 5G8.B5 fue hacia una banda de 71 kDa (Proteína 5G8). Adicionalmente este anticuerpo también reconoció pero en menor intensidad a una banda de ≈ 120 kDa. El anticuerpo monoclonal control de isotipo aBDC.2 (IgG2b).

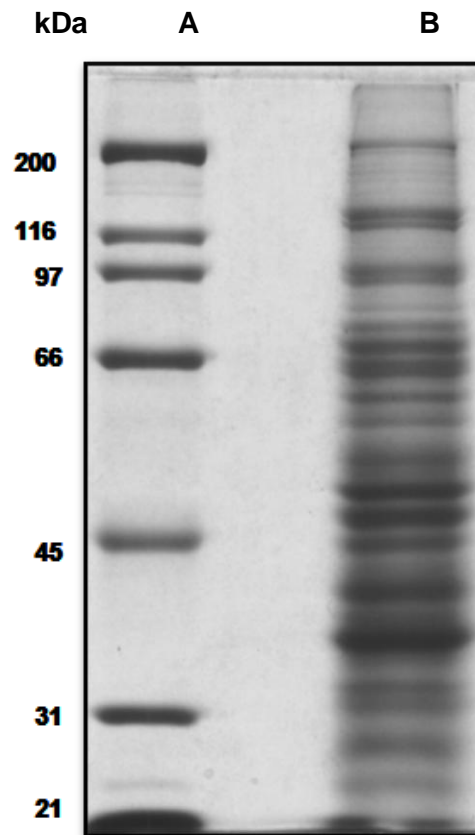


Figura 5. Patrón electroforético del extracto de proteínas de *G. lamblia* (Panning VIII).

El carril A corresponde al marcador de peso molecular y el carril B al extracto soluble de proteínas de *G. lamblia* (Panning VIII).

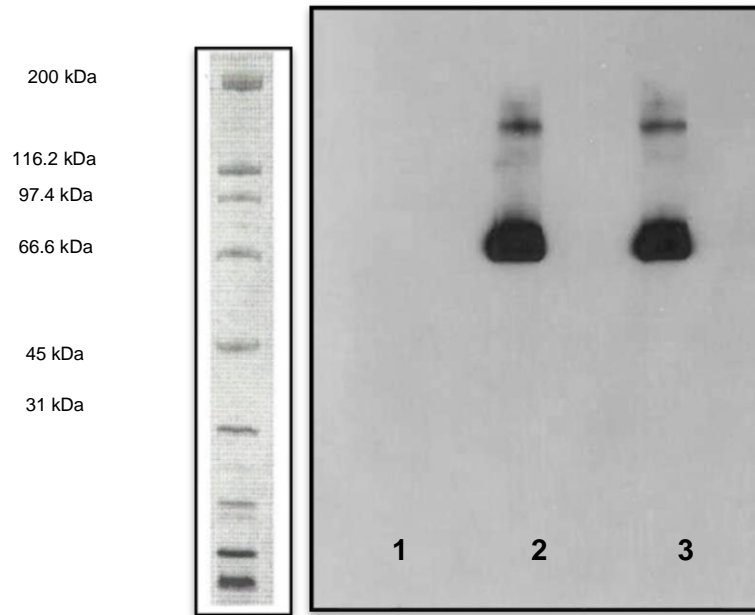


Figura 6. Perfil de inmunorreconocimiento de antígenos de *G. lamblia* reconocidos por el anticuerpo monoclonal 5G8.B5.

Análisis de Western-blotting que muestra el inmunorreconocimiento del anticuerpo monoclonal 5G8.B5 hacia proteínas solubles de *G. lamblia* GS/M-83-H7, 5G8 (+). Carriles: 1) Anticuerpo monoclonal control de isotipo aBDC.2 (IgG2b), 2) anticuerpo monoclonal 5G8.B5 (IgG2b) purificado y 3) sobrenadante del hibridoma 5G8.B5 (IgG2b).

Evaluación del Papel Protector del Anticuerpo Monoclonal 5G8.B5 en un Modelo de Infección Intestinal con *G. lamblia* (cepa GS/M-83-H7, 5G8 (+)) Utilizando el Modelo Gerbil *Meriones unguiculatus*

Con el objetivo de evaluar la actividad protectora del anticuerpo monoclonal 5G8.B5 purificado, se realizó un ensayo *in vivo* utilizando trofozoítos de *G. lamblia* GS/M-83-H7, 5G8 (+) y gerbiles *Meriones unguiculatus* como modelo de infección intestinal. El diseño experimental consistió en formar cuatro grupos de animales (n=4). Los 4 grupos fueron infectados con 1.5×10^6 trofozoítos y tratados de la siguiente manera: Grupo 1 (control de infección) no recibió ningún tratamiento. El grupo 2 fue tratado con PBS. El grupo 3 fue tratado con el anticuerpo monoclonal control de isotipo aBDC.2 y finalmente el grupo 4 fue tratado con el anticuerpo monoclonal 5G8.B5 purificado (ver sección de materiales y métodos). Como se muestra en la figura 7, el análisis de las cargas parasitarias obtenidas del duodeno de los gerbiles infectados mostró los siguientes resultados: Grupo 1 ($7.01 \times 10^6 \pm 3.8 \times 10^6$ trofozoítos), Grupo 2 ($3.36 \times 10^6 \pm 1.9 \times 10^6$ trofozoítos), Grupo 3 ($2.4 \times 10^6 \pm 5.55 \times 10^6$ trofozoítos) y finalmente el Grupo 4 ($0.72 \times 10^6 \pm 0.2 \times 10^6$ trofozoítos). La evaluación de la actividad protectora del anticuerpo monoclonal 5G8.B5 en el último grupo que recibió tratamiento con dicho anticuerpo mostró una disminución significativa de la carga parasitaria en comparación con los grupos controles.

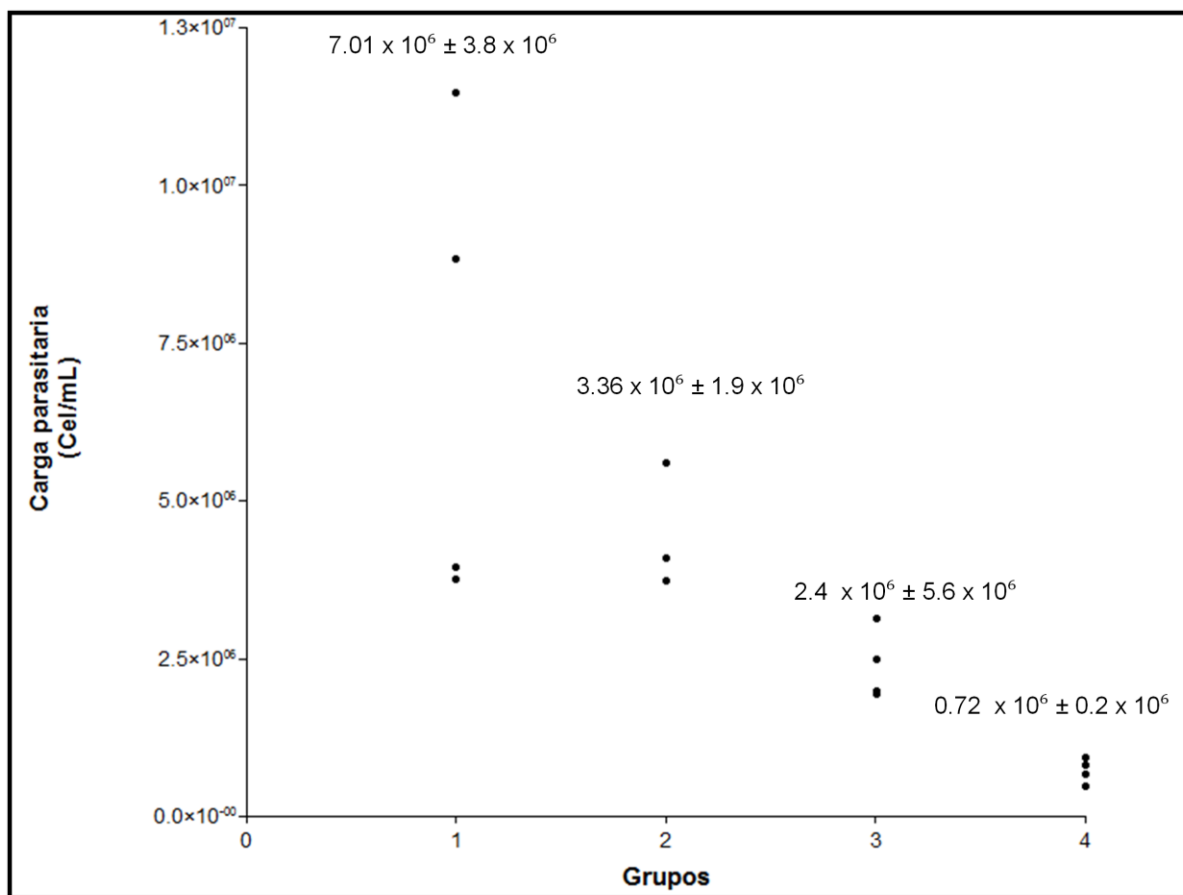


Figura 7. Evaluación del Papel Protector del Anticuerpo Monoclonal 5G8.B5 en un Modelo de Infección Intestinal con *G. lamblia*.

Análisis de protección que muestra el efecto del anticuerpo monoclonal 5G8.B5 hacia el parásito *G. lamblia* GS/M-83-H7, 5G8 (+) en un modelo de infección intestinal. Se analizaron cargas parasitarias de cuatro ratones por grupo. Grupo 1 (Control de infección). Grupo 2 (Control PBS). Grupo 3 (Anticuerpo monoclonal control de isotipo aBDC.2 IgG2b) y Grupo 4 (anticuerpo monoclonal 5G8.B5 IgG2b purificado).

DISCUSIÓN

Con la finalidad de evaluar la capacidad protectora del anticuerpo monoclonal 5G8.B5 durante la infección intestinal por *G. lamblia* en el modelo gerbil, el presente estudio describe un análisis tanto del inmunorreconocimiento de este anticuerpo contra proteínas inmunogénicas del parásito, así como el efecto que tiene la administración del anticuerpo 5G8 sobre la carga parasitaria en gerbiles infectados.

Diversos estudios sugieren que la respuesta inmune humoral y celular coordinadas son necesarias para controlar las infecciones por *G. lamblia* (Singer y Nash, 2000). Sin embargo, en el caso de los parásitos, éstos pueden evadir la inmunidad protectora reduciendo su capacidad inmunogénica e inhibiendo las respuestas inmunitarias del hospedero (Abbas et al., 2008). Trabajos de investigación se han enfocado principalmente en evaluar la respuesta inmune humoral del hospedero en contra de *G. lamblia* y se ha demostrado que este mecanismo tiene cierta importancia en el control de la infección por este parásito, ya que durante la parasitosis se ha observado que aumentan los niveles de IgA e IgG, principalmente. Por otro lado, se ha visto que el aumento del título de anticuerpos está relacionado con el aclaramiento de la infección (Velazquez y col., 2005). En el presente trabajo, se evidencia de una manera clara el papel protector que posee la respuesta inmune humoral en la infección intestinal por *G. lamblia*. Asimismo, al utilizar un anticuerpo monoclonal que disminuye significativamente la carga parasitaria de animales infectados, y ser éste específico contra un solo epítipo del antígeno 5G8, sugiere fuertemente que la molécula 5G8 es una proteína inmunogénica candidato para el estudio racional de antígenos de *G. lamblia* que pudieran ser considerados como constituyentes potenciales de vacunas.

Es muy probable que el anticuerpo monoclonal 5G8 haya favorecido la aglutinación de trofozoítos de *G. lamblia* 5G8 (+) en gerbiles infectados, y de ese modo, aunado con la acción mecánica del peristaltismo del intestino, evitara que el parásito colonice el intestino delgado, contribuyendo a la disminución en la carga parasitaria. Fue notorio que el grupo de gerbiles tratados con el anticuerpo control de isotipo aBDC.2 presentó una disminución en la carga parasitaria significativa comparada con el grupo control al cual se administró solamente PBS. Sin embargo, los niveles de disminución de carga parasitaria, no fueron tan evidentes como los observados en el grupo de gerbiles tratados con el anticuerpo 5G8. El anticuerpo control de isotipo no reconoce ni se une a la superficie de *G. lamblia*. Por lo tanto, es probable que la administración del anticuerpo control de isotipo tenga una acción indirecta, promoviendo

condiciones en el intestino delgado del gerbil que promueva condiciones desfavorables para la colonización de parásito. Futuros estudios deben de realizarse con el propósito de establecer las condiciones experimentales óptimas de evaluación de la capacidad protectora del anticuerpo monoclonal 5G8, así como también para investigar el mecanismo de acción del efecto protector de este anticuerpo.

Los anticuerpos monoclonales constituyen una tecnología que abre enormes perspectivas tanto en la investigación básica como aplicada. En todos aquellos procesos en que ya se estaba utilizando la reacción antígeno/anticuerpo, los anticuerpos monoclonales agregan especificidad y reproducibilidad, con lo que permiten estudiar mejor el fenómeno. De allí que una de las primeras aplicaciones prácticas, ha sido en ensayos de caracterizaciones inmunológicas y bioquímicas, diagnóstico clínico, e incluso en procesos industriales que necesiten de purificación de productos naturales. El efecto protector del anticuerpo monoclonal 5G8.B5 en la infección por *G. lamblia* ponen de manifiesto uno de los usos de esta valiosa herramienta biológica como son los monoclonales. En tratamientos utilizados para el control de diversas enfermedades o situaciones clínicas se emplean exitosamente la administración tanto anticuerpos monoclonales como policlonales, por ejemplo en enfermedades neoplasias como es el cáncer de mama (uso de trastuzumab) (Hortobagyi G. 2005. *New England Journal Medicine* 353; 16) picaduras de animales ponzoñosos (alacrán entre otros), entre otras.

En base al evidente efecto protector del anticuerpo 5G8, es menester profundizar en la caracterización inmunoquímica del reconocimiento que tiene el anticuerpo 5G8, como es conocer cuál epítotope reconoce el anticuepo dentro de la molécula 5G8, cuál es la afinidad de la interacción antígeno/anticuerpo, qué características experimentales favorecen o desfavorecen esta interacción (pH, fuerza iónica, presencia de detergentes, agentes desnaturalizantes, entre otras).

Para realizar la infección experimental por *G. lamblia* en este estudio, se utilizó el modelo gerbil *Meriones unguiculatus*. Se ha reportado por diversos autores que el gerbil es un modelo experimental susceptible a la infección por *G. lamblia* (Astiazarán-García et al., 2000. *Experimental Parasitology* 95, 128-135). En nuestro trabajo de tesis, se observó que gerbiles se infectaron eficientemente con la cepa de *G. lamblia* 5G8 (+), adicionalmente, este modelo permitió analizar adecuadamente el efecto protector del anticuerpo monoclonal 5G8.B5. Una desventaja que posee el modelo gerbil, es que el sistema inmune de este roedor es poco conocido y la disponibilidad de reactivos biológicos para evaluar la respuesta inmune en este modelo son muy limitados comparado con el modelo murino (ratón, *Mus musculus*). En base a lo anterior, surge la necesidad de conocer y caracterizar de manera sistemática la infección que

se establece por la cepa de *G. lamblia* 5G8 (+) en el gerbil y evaluar la respuesta inmune que se induce, así como los cambios histológicos asociados con la infección. Futuros estudios en nuestro grupo de investigación abordarán estos aspectos.

Con el fin de demostrar la actividad del anticuerpo monoclonal 5G8.B5 purificado contra la proteína inmunogénica 5G8, en el presente estudio, se realizaron análisis de dot y western-blotting. El perfil de inmunorreconocimiento hacia proteínas de *G. lamblia* de la cepa 5G8 (+), indica un reconocimiento predominante hacia la banda de 71 kDa y en una menor proporción hacia una banda de ≈ 120 kDa. El reconocimiento hacia esta proteína 5G8 (proteína de 71 kDa) ha sido reportada en trabajos anteriores (Velázquez et al., 2005; Quintero et al., 2013). Posiblemente, el reconocimiento débil por la banda de ≈ 120 kDa se deba a que la proteína de 71 kDa se asocie consigo misma (forma agregada de la proteína) o con otras proteínas. En la literatura se reporta que proteínas como la VSPH7, la cual es la proteína variable de superficie característica de la cepa GS/M-83-H7, es un antígeno muy inmunogénico y presenta una movilidad relativa en geles cercano a 72 kDa (Bienz et al., 2003), sin embargo, se ha demostrado por medio de espectrometría de masas y citometría de flujo que existen diferencias significativas entre la proteína de estudio y la VSPH7 (Quintero et al., 2013), estos mismos análisis sugirieron fuertemente que la proteína 5G8 es la proteína BiP, la cual aparece aproximadamente en la banda de 70 kDa (Soltys et al., 1996, Lujan y Mowatt, 1996). Adicionalmente, El análisis por citometría de flujo reveló que la proteína 5G8 se expresa dentro de los trofozoítos de *G. lamblia* ($> 90\%$ del total de la población celular), y sólo un bajo porcentaje ($\approx 5\%$) de esos trofozoítos expresan altos niveles de la proteína 5G8 en la superficie celular. El patrón de expresión de este antígeno indica que la proteína 5G8 está siendo transportada por el sistema de tráfico vesicular hacia la membrana. Futuros estudios son necesarios para poder localizar el sitio específico de la proteína, y su relación con el tráfico vesicular en el interior de *G. lamblia* (Quintero et al., 2013).

Es un gran reto para la investigación en inmunología y parasitología el desarrollo de estrategias que favorezcan la inmunidad contra parásitos protozoarios (Lopes et al., 2012). La importancia que se le da a *Giardia* como problema de salud (Eckman, 2003; Edson et al., 1986), ha llevado a diversos investigadores a realizar estudios enfocados en el desarrollo de una vacuna capaz de estimular la producción de anticuerpos protectores (Lee et al., 2011). Los resultados obtenidos en este estudio contribuyen en la caracterización bioquímica e inmunológica de antígenos altamente inmunogénicos del parásito *G. lamblia*, lo cual es importante para el establecimiento de bases científicas sólidas para en el desarrollo de una vacuna contra la infección intestinal provocada por este parásito. Posiblemente trabajando más

con otras condiciones experimentales tales como diferentes dosis de anticuerpo monoclonal, diferentes vías de administración, incluso ampliar el estudio a otros modelos animales podríamos lograr una mejor protección y así mejorar el conocimiento que se tiene sobre los mecanismos inmunológicos involucrados durante un proceso infeccioso, permitiendo el entendimiento de la interacción huésped-parásito, y sentando las bases moleculares para el futuro desarrollo de medidas profilácticas contra *G. lamblia*.

CONCLUSIONES

El método de cromatografía de afinidad permitió purificar anticuerpos monoclonales funcionales a partir de cultivos del hibridoma de células B 5G8.B5 específico para la proteína 5G8 de *G. lamblia*.

Se enriqueció la población de trofozoítos de *G. lamblia* (cepa GS/M-83-H7) que expresa la proteína 5G8 en la superficie del parásito mediante la técnica de inmunoadsorción.

El anticuerpo monoclonal 5G8.B5 reconoció fuertemente una banda proteica de 71 kDa y con menor intensidad una banda de 120 kDa. Adicionalmente este reconoce proteínas de superficie del parásito.

El anticuerpo monoclonal 5G8.B5 específico para la proteína inmunodominante 5G8 de *G. lamblia* mostró una fuerte capacidad protectora en la infección en el modelo gerbil.

RECOMENDACIONES

- Evaluar diferentes condiciones experimentales (diferentes vías de administración, diferentes dosis, entre otros) para el estudio del papel protector del anticuerpo monoclonal 5G8.B5.
- Continuar la caracterización de la proteína inmunogénica 5G8 de *G. lamblia*:
 - Determinar la función biológica que juega la proteína 5G8 en el parásito *G. lamblia*.
 - Identificar la estructura primaria de la proteína inmunogénica de *G. lamblia* 5G8.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas A., Lichtman A., Pillai S. 2008. Inmunología Celular y Molecular. Sexta edición. El sevier. Estados Unidos.
- Astiazarán G. H., Quintero J., Vega R., Briceño P., Oviedo C., Rascón L. Garibay E. A. Castillo Y. F., Robles Z., Hernández J. y Velázquez C. 2009. Identification of T-cell stimulating antigens from *Giardia lamblia* by using *Giardia* -specific T-cell hybridomas. *Parasite Immunology* 31: 132–139.
- Ávila Barceló, J R. 2008. Generación de anticuerpos monoclonales específicos contra antígenos inmunodominantes de *Giardia lamblia*. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias Químico-Biológicas. Hermosillo, Sonora, México.
- Bienz M., Siles-Lucas M., Wittwer P. y Müller N. 2001. *vsp* Gene Expression by *Giardia lamblia* Clone GS/M-83-H7 during Antigenic Variation In Vivo and In Vitro. *Infection and Immunity* 69: 5278–5285.
- Byrd L. G., Conrad J. T. y Nash T. T. 1994. *Giardia lamblia* Infections in Adult Mice. *Infection and Immunity* 62: 3583-3585.
- Chaudhuri, P. P, Das, Sarkar, S. y Munoz, M. L., 1997. Biochemical and immunological characterization of soluble antigens of *Giardia lamblia*. *Parasitology Res.* 83: 604-10.
- Cisneros N. y Glaus J., 2010. Purificación y Caracterización Parcial de la Proteína 5G8 de *Giardia lamblia* GS/M-83-H7. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias Químico-Biológicas. Hermosillo, Sonora, México.
- Edson, C., Farthing, M., Thorley-Lawson, D. & Keusch, G. 1986. An 88,000-Mr *Giardia lamblia* surface protein wich is immunogenic in humans. *Infect Immun.*, 54, 621-625.
- Faubert, G. 2000. Immune Response to *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol.* 13(1): 35-54.
- Gamarro F. y Castanys S. 1996. Mecanismos de Resistencia a fármacos en parásitos. En: Rivas López y López- López. *Parasitología Molecular*. CSIC. España.
- Gilles, H. M., 1999. Giardiasis. Protozoal diseases. Oxford University Press Inc. U.S.A. P. Cap. 10, 563-584. Primera edición.
- Gottstein, B. y Nash, T. E., 1991. Antigenic variation in *Giardia lamblia*: infection of congeniallity athymic nude and scid mice. *Parasite immunology.* 13: 649-59.
- Hortobagyi G. 2005. Trastuzumab in the Treatment of Breast Cancer. *New England Journal Medicine* 353; 16

- Lascurain, R., Mora, M. E., Acosta, G. y Santos, J. I., 1993. Prevalencia de anticuerpos contra *Giardia lamblia* en suero de cordón umbilical y en sangre periférica materna. *Biología Médica del Hospital Infantil Mexicano*. 50: 27-30.
- Lemée V., Zaharia I., Nevez G., Rabodonirina M., Brasseur P., Ballet J y Favennec L. 2000. Metronidazole and albendazole susceptibility of 11 clinical isolates of *Giardia duodenalis* from France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46:819-821
- Lopes M., Zamboni D., Luján H. y Rodrigues M. 2012. Immunity to Protozoan Parasites. *Journal of Parasitology Research* 2012:1-3
- Lujan, H. D. 2006. Giardia and giardiasis. *Medicina (Buenos Aires)*, 66, 70-74.
- Müller, N., Sterk, M., Hemphill, A. & Müller, N. 2007. Characterization of *Giardia lamblia* WB C6 clones resistant to nitazoxanide and to metronidazole. *J Antimicrob Chemother*, 60, 280-287.
- Palm, D., Weiland, M., Griffiths, J., Ljungstrom, I. y Svard, S., 2003. Identification of immunoreactive proteins during acute human giardiasis. *The journal of infectious diseases*. 187: 1849-59.
- Quintero J., Figueroa D., Barcelo R., Breci L., Astiazaran-Garcia H. Rascon L. Robles-Zepeda R., Garibay-Escobar A., Velazquez-Contreras E., Leon A., Hernandez-Hernandez J. y Velazquez C. 2013. Identification of an immunogenic protein of *Giardia lamblia* using monoclonal antibodies generated from infected mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro 108:1-7.
- Rascón Durán, M. L. 2008. Caracterización bioquímica parcial de antígenos inmunodominantes de *Giardia lamblia* capaces de inducir una respuesta inmune humoral en un modelo Murino. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias Químico-Biológicas. Hermosillo, Sonora, México.
- Rivero F., Saura A., Pucca C., Carranza P., Torri A. y Lujan H. 2010. Disruption of antigenic variation is crucial for effective parasite vaccine. *Nature medicine* 16(5):551-557.
- Rojas Montoya W. 2004. Inmunología. Décima tercera edición. Corporación para Investigación Biológica. 13 ed. Colombia.
- Romero Cabello, r. 2007. Microbiología y parasitología humana : bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias, México, D.F. [etc.], Editorial Médica Panamericana.
- Ropolo A., Saura A., Carranza P. y Lujan H. 2005. Identification of Variant-Specific Surface Proteins in *Giardia muris* Trophozoites. *Infection and Immunity* 73: 5208-5211.
- Samuelson J. 2002. What *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* tell us about the evolution of eukaryotic diversity. *Journal of Biosciences (Suppl. 3)* 27: 559–565.
Secretaría de salud.

Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/Dirección General de Epidemiología/SSA. Incidencia de Giardiasis (A07.1) por grupos de edad. Estados Unidos Mexicanos. 2013. Población General.

Singer Steven M. & Nash Theodore E. 1999. T-cell-Dependent control of Acute *Giardia lamblia* infections in Mice. National Institutes of Health. 68.1: 170-171.

Soliman, M., Taghi-Kilani, R., Abou-Shady, A., El-Mageid, S., Handousa, A., Hegazi, M. & Belosevic, M. 1988. Comparison of serum antibody responses to *Giardia lablia* of symptomatic and asymptomatic patients. Am J Trop Med Hyg., 58, 232-239.

Soltys B., Falah M. y Gupta R. 1996. Identification of endoplasmic reticulum in the primitive eukaryote *Giardia lamblia* using cryoelectron microscopy and antibody to BiP. Journal of Cell Science 109: 1909-1917.

Sotelo, C. N., 1998. Giardiasis en niños. Aspectos Clínicos y Terapéuticos. *Biología Medica del Hospital Infantil Mexicano*. 55: 47-53.

Sprong H., Caccio S. y van der Giessen J. 2009. Identification of Zoonotic Genotypes of *Giardia duodenalis*. PLOS Neglected Tropical Diseases 3(12): 558.

Syed, A. A. y Hill, D. R., 2003. *Giardia intestinalis*. Current Opinion in infectious Diseases. 16: 453-460.

Thompson R. y Monis P. 2011. Taxonomy of *Giardia* Species. 3-15 p. En: Luján Hugo D. y Svärd Staffan. *Giardia* A Model Organism. Springer-Verlag/Wien. New York, EEUU.

Varela Munita, M. F. 2011. TGF- β 1 previene el estrés de retículo endoplásmico y la muerte celular inducida por Isquemia/Reperfusión simulada en fibroblastos cardiacos de rata. Tesis de Licenciatura. Universidad de Chile. Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica. Santiago, Chile.

Velazquez, C., Beltran, M., Ontiveros, N., Rascon, L., Figueroa, D. C., Granados, A. J., Hernandez-Martinez, J., Hernandez, J. y Astiazaran- Garcia, H., 2005. *Giardia lamblia* infection induces different secretory and systemic antibody responses in mice. Parasite immunology. 27: 351-356.

Weiland, M., Palm, J., Griffiths, W., McCaffery, J., & Svärd, S. 2003. Characterization of alpha-1 giardin: an immunodominant *Giardia lamblia* annexin with glycosaminoglycan-binding activity. Int J parasitol. 33, 1341-1351.

Wolfe M. 1992. Giardiasis. Clinical Microbiology Reviews 5: 93-100.

ANEXO 1
Cultivo de *G. lamblia*

Materiales

- Incubadora a 37°C.
- Tubos de ensayo 13 x 100 con tapón de rosca estériles.
- Pipetas serológicas estériles de 10, 5 y 1 mL.
- Pipetor (Drummond Broomal, Scientific CO).
- Mechero.
- Sistema de filtración (Steril aseptic system, millipore, 01730 Bradford MA).
- Membrana de filtración (0.45 µm).
- Campana de flujo laminar (Purifier class II biosafety cabinet, Delta series, LABCONCO).

Reactivos

Medio de Cultivo TYI-S-33 (Para 1 L)

Tripticasa.....	20 g
(BBL Triticase petone pacnreatic digest of casein) BD 211921	445 g.
Extracto de Levadura	10 g
(Bacto Yeast Extract Technical) BD 288620	500 g. LOT. 0055682
Dextrosa.....	10 g
(D – (+) – Dextrose) Sigma D9434	500 g. Batch #108K0014
NaCl.....	2 g
Sigma 5-5886	
L–Cisteína.....	2 g
(L-Cysteine hydrochloride monohydrate from non-animal Sorce)	Sigma C6852-1006
Fosfato de Sodio dibásico.....	1 g
Sigma S0876-1KG	
Fosfato de Sodio monobásico.....	0.6 g
Sigma S0751-500 g.	
Bilis.....	0.6 g
(Bile from bovine and ovine) Sigma B8381-1006	
Ácido ascórbico.....	0.1 g
(L-Ascorbic Acid) P.M.= 176 Sigma A5960-25G	065K0181

Citrato férrico amoniacal.....0.023 g

Una vez disueltos los componentes en polvo, se ajusta el pH a 6.9 con NaOH. Adicionar el antibiótico ceftriaxona (100 µg/mL). Suplementar al 10% con suero de ternera recién nacida (GIBCO Invitrogen 16-010) y se afora a 1000 mL con agua ultrapura. Finalmente, esterilizar por filtración con una membrana de 0.45 µm.

Procedimiento

1. Adicionar aproximadamente 7.5 mL de medio TYI-S-33 suplementado al 10% con NBCS en un tubo de ensayo 13 x 100 estéril.
 2. Adicionar 0.5 mL de cultivo de *G. lamblia* en confluencia ($\approx 1 \times 10^6$ trofozoítos/mL).
- El pase se realiza en condiciones estériles (campana de flujo laminar Bioseguridad II).

ANEXO 2

Cultivo del hibridoma 5G8.B5

Material

- Incubadora a 37°C.
- Cajas de cultivo estériles.
- Pipetas serológicas estériles de 10, 5 y 1 mL.
- Pipetor (Drummond Broomal, Scientific CO).
- Sistema de filtración (Steril aseptic system, millipore, Bradford MA 01730).
- Membranas para filtración (0.45 μ m).
- Campana de flujo laminar (Purifier class II biosafety cabinet, Delta series, LABCONCO).

Reactivos

D-MEM (GIBCO CAS. 12100-061)

L-arginina-HCl (SIGMA A-5131)

L-asparagina anhidro (SIGMA A-4159)

NaHCO₃ (SIGMA S-5761)

Piruvato de sodio (Biowhittaker Walkersville, CAS 13-115E)

L-glutamina (Biowhittaker Walkersville, CAS 17-605E)

HEPES (SIGMA H-3784)

Penicilina/estreptomicina (SIGMA P-4333).

2-mercaptoetanol (Merck. 4213005)

Equipo

- ✓ Báscula digital
- ✓ Sistema de filtración (sterile aseptic system, Millipore corporation).
- ✓ Bomba de vacío.
- ✓ Pipetas serológicas.
- ✓ Micropipetas.
- ✓ Puntas para micropipetas.

Procedimiento

1.- Pesar los reactivos indicados y verterlos en un vaso de precipitado que contenga agua ultrapura, agitar un poco asegurando que quede bien disuelto.

Para preparar 1 litro de DMEM:

DMEM.....	13.37 g
L-arginina HCl.....	0.116 g
L-asparagina anhidra.....	0.036 g
NaHCO ₃	2.0 g
(a) Piruvato de sodio.....	10.0 mL
(b) L-glutamina.....	7.5 mL
(c) Penicilina/estreptomicina (1000x).....	1.0 mL

2.- Los reactivos líquidos (a, b y c) y el polvo DMEM se deben de añadir dentro de la campana, utilizando pipetas estériles para evitar contaminación.

3.- Una vez añadidos todos los reactivos; el medio se debe esterilizar por medio de filtración empleando un filtro Millipore de 0.45 µm.

4.- Ya filtrado el medio, pasarlo a un frasco de vidrio estéril y etiquetarlo con nombre de quién lo preparó y la fecha.

5.- Colocar pruebas de esterilidad para asegurar que el medio de cultivo no esté contaminado.

6.- Almacenar el medio de cultivo bajo refrigeración a 4°C hasta su uso.

NOTA: Para preparar el medio D5F o D10F, se debe suplementar el medio DMEM al 5 ó 10%, según su aplicación, con suero fetal bovino, previamente inactivado con calor.

Las líneas celulares e hibridomas se mantienen en cajas de cultivo de 25 cm², bajo condiciones de 5% de CO₂. Cada tres días realizar un subcultivo a una concentración de 10,000 células/mL.

ANEXO 3

Aislamiento y Purificación de Anticuerpos Monoclonales

Materiales

- Incubadora a 37°C.
- Cajas de cultivo estériles.
- Pipetas serológicas estériles de 10, 5 y 1 mL.
- Pipetor (Drummond Broomal, Scientific CO).
- Sistema de filtración (Steril aseptic system, millipore, Bradford MA 01730).
- Filtros de poro 0.45 μm .
- Sefarosa (Proteína A 4B, P-9424).
- Campana de flujo laminar (Purifier class II biosafety cabinet, Delta series, LABCONCO).

Método

1. Cultivar los hibridomas (40F ó 5G8.B5) en condiciones normales, 37°C en atmósfera de 5% de CO₂.
2. Recolectar 3 litros del sobrenadante, almacenarlo en congelación hasta su uso.
3. Limpiar con HCl 1 mM una columna Bio-Rad y las mangueras, empacar en la columna la matriz de sefarosa la cual tiene proteína A.
4. Pasar los 3 litros de sobrenadante por la columna y una vez unidos los anticuerpos a la proteína A, eluir con 1.5 mL de glicina 0.1 M (pH 2.5) y recolectar en distintas fracciones en tubos de vidrio de 13 X 100 con 300 μL de trizma 1M (pH8).
5. Determinar la cantidad de proteína presente en las fracciones de interés, utilizando un espectrofotómetro de UV a 280nm, en una cubeta de cuarzo. Almacenar las fracciones con mayor concentración de proteína a -80°C, hasta su uso.
6. Realizar el pase del sobrenadante tres veces.
7. Mezclar, concentrar y dializar las fracciones seleccionadas. Realizar una SDS-PAGE para observar la pureza de la purificación.

ANEXO 4

Ensayo de Inmunoadsorción

Soluciones:

PBS 1X, pH 7.2 frío.

TYI-S-33 10% NBCS

AcMo 5G8.B5 a 25 µg/mL

Anticuerpo control de isotipo 40F a 25 µg/mL

Materiales

Placas de fondo plano de seis pozos Corning.

Incubadora de CO₂.

Refrigerador o cuarto frío a 4°C.

Método

1. Cubrir una placa de 6 pozos con la solución de AcMo 5G8.B5 y otra del anticuerpo control de isotipo 40F (25 µg/mL).
2. Incubar 1 h a 37°C.
3. Retirar el exceso de solución de anticuerpo y bloquear la placa con PBS-BSA 1% por 1 h a 37°C.
4. Lavar 5 veces con PBS 1X, pH 7.2 frío.
5. Agregar 2 X 10⁶ trofozoítos de *G. lamblia*, previamente incubados a 4°C.
6. Lavar 5 veces con PBS 1X, pH 7.2 frío.
7. Adicionar 2 mL de TYI-S-33 al 10% NBCS, e incubar por 10 min a 4°C.
8. Cosechar las células adheridas y evaluar su expresión por citometría de flujo.

ANEXO 5

Inducción de giardiasis

Reactivos

1. Solución reguladora de fosfatos (PBS) 10 X, pH 7.2

NaH₂PO₄.....1.9 g

Na₂HPO₄.... 12 g

NaCl..... 85 g

Disolver en 800 mL de agua desionizada, ajusta pH a 7.2 con un Potenciómetro (HANNA Instruments. pH 211). y aforar a 1000 mL con agua desionizada. Para preparar PBS 1X, diluir 1:10 con agua desionizada.

Durante su uso en el proceso de infección mantener el PBS a 4°C

Método

1. Someter a los ratones a infectar a 6 o 9 horas de ayuno, con el fin de favorecer la infección.
2. Mantener el cultivo de trofozoítos de *G. lamblia* por 20 minutos en agua-hielo para liberar los trofozoítos adheridos a la pared del tubo.
3. Lavar los trofozoítos 3 veces en solución PBS 1X, pH 7.2, usando centrífuga (Thermo IEC Marathon 3000R, Fisher Scientific) a 1800rpm por 5 min. a 4°C.
4. Para su cuantificación en el hemacitómetro (cámara Neubauer) se toma una alícuota de estos trofozoítos y se hace una dilución 1:20 con PBS 1X y una posterior dilución 1:2 con azul de triptano.
5. Después del último lavado resuspender la pastilla de trofozoítos en PBS 1X y ajustar a 5X10⁶ trofozoítos en 200 µL de PBS 1X.
6. Con ayuda de una jeringa para alimentación forzada, se inoculan por vía oral 200 µL de la suspensión de trofozoítos a temperatura ambiente.

Nota: Mantener trofozoítos de *G. lamblia* a 4°C durante toda su manipulación y antes de inocular.

ANEXO 6

Obtención de antígeno soluble de *G. lamblia*

Reactivos

1. Solución reguladora de fosfatos 1 X, pH 7.2 (Ver apéndice 2)
2. Inhibidores de proteasas (4-(2-aminoetil)bencenfulfonilfluoruro (AEBSF), bestanina, pepstatina, A,E-64, leupeptina y 1,10-fenantiolina., SIGMA.)

Método

1. Colocar cultivo de *G. lamblia* a confluencia (13 tubos 13 x 100), en un baño de agua-hielo por 15 minutos, lo cual permite que los trofozoítos adheridos al vidrio se despeguen.
2. Juntar los cultivos en tubos falcon de 50 mL.
3. Lavar por 3 ocasiones los tubos de cultivo con 1 mL de PBS y juntar con los cultivos en los tubos falcon.
4. Centrifugar (Centrífuga (Maraton 3000r, Fisher Scientific) a 1800 rpm por 10 minutos y descartar el sobrenadante y juntar las células en un solo tubo falcon.
5. Lavar los trofozoítos por 2 ocasiones con 10 mL de PBS 1X y resuspender los trofozoítos en 1 mL de PBS 1X y colocarlos en microtubos de 1.5 mL y adicionar 5 µL de cocktail de proteasas
6. Lisar las células sometiendo el microtubo a congelación (congelador -80°C. Thermo Fisher Scientific modelo 703) hasta que la suspensión esté completamente congelada (aproximadamente 45 minutos).
7. Retirar del congelador y dejar descongelar a temperatura ambiente (aproximadamente 15 minutos).
8. Repetir el paso 6 y 7 por 3 ocasiones y posterior a esto sonicar 30 ciclos por 2 minutos. Repetir el procedimiento 3 veces.
9. Centrifugar (microcentrífuga. Labnet Spectrafuge 7M) a 14,000 xg por 15 minutos a 4 °C y colectar el sobrenadante (extracto antigénico).
10. Cuantificar contenido de proteínas totales por medio del método Bradford y guardar el extracto proteico en congelación a -30 o C, hasta su uso.

ANEXO 7

Determinación de proteína por el micrométodo de Bradford

Reactivos

Reactivo de Bradford (Sigma, B-6916)

Material

- Microtubos cónicos (eppendorf) de 1.5 mL.
- Micropuntas (1 y 100 μ L).
- Micropipetas (100-1000 y de 10-100 μ L).
- Placas de 96 pozos (fondo plano).
- Lector de microplacas con filtro de 570 nm (Multiskan EX, Thermolabsystem).

Procedimiento

1. Preparar diluciones seriadas a partir de un estándar de albúmina (BSA, Biorad, Quick Start Bradford Protein Assay Kit 1 #500-0201) a una concentración de 1.4 mg/mL en PBS. Obtener las siguientes concentraciones; 0.088, 0.177, 0.355 y 0.710 mg/mL.
2. Adicionar 5 μ L de la solución de BSA, de la muestra problema y del control negativo de PBS en los pozos de la placa por triplicado.
3. Adicionar por pozo 250 μ L del reactivo de Bradford, incubar por 15 min a TA y medir la densidad óptica en un lector de microplacas a 570 nm.
4. Graficar la curva estándar de BSA y obtener la ecuación, así como su coeficiente de correlación para confirmar la confiabilidad de los datos.
5. Obtener la concentración de proteína de la muestra problema.

ANEXO 8

Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE)

Reactivos

1. Acrilamida/ Bisacrilamida 30%/8%

Acrilamida..... 30g

N, N'-metinel-bisacrilamida...0.8g

Mezclar en un volumen de 100 mL de agua desionizada. Filtrar la solución con un filtro de 0.45 µm. Almacenar en frasco color ámbar a 4°C.

Nota: La acrilamida monomérica es neurotóxica por lo cual se debe usar mascarilla y guantes durante su preparación.

2. Trizma base/SDS, pH 6.8 4X (Trizma- base 0.5 M conteniendo SDS l 0.4%)

Trizma base..... 6.05 g

Agua deionizada..... 40 mL

Ajustar el pH a 6.8 con HCl 1 N y aforar a 100 mL. Filtrar con filtro 0.45 µm y adicionar 0.4 g de SDS. Almacenar a 4 °C.

3. Trizma-base, pH 8.8 4X (Trizma-base 1.5 M, conteniendo 0.4% SDS)

Trizma base..... 91 g

Agua deionizada..... 300 mL

Ajustar el pH a 8.8 con HCl 1N y aforar a 500 mL con agua ultrapura y pasar esta solución por un filtro de 0.45 µm y adicionar 2 g de SDS. Almacenar a 4 °C

4. Persulfato de amonio (PSA) al 10%

(NH₄)₂SO₈..... 10 µg

Agua ultrapura..... 100 µL

5. TEMED (N, N, N', N'- Tetrametilendiamina)

6. Gel separador (2 minigeles de 6 X 8 cm y separador de 0.75 mm)

Acrilamida/Bisacrilamida 30 %/8 %.....6 mL

Buffer Tris 4X con SDS pH 8.8..... 3.75 mL
Agua des-ionizada.....5.25 mL
Persulfato de amonio (PSA).....0.08 mL
TEMED..... 0.018 mL

7. Gel concentrador (2 minigeles de 6 X 8 cm y separador de 0.75 mm) Acrilamida/Bisacrilamida 30 %/0.8 %..... 0.65 mL

Buffer Tris-SDS pH 6.8.....1.25 mL
Agua ultrapura..... 3.05 mL
Persulfato de amonio.....0.07 mL
TEMED.....0.01 mL

8. Buffer de corrida 1X, pH 8.3

Glicina.....72 g
Trizma base..... 15.1 g
SDS..... 5 g

Disolver en agua ultrapura y aforar a 1 litro

Para obtener la solución de trabajo 1X, diluir 1:5 la solución stock con agua deionizada y ajustar el pH a 8.3. Almacenar en refrigeración.

9. Solución reguladora de muestra (Buffer muestra) 2X.

En un pequeño volumen de agua deionizada disolver a 0.38 g de trizma-base. Ajustar e pH a 6.8 y añadir los siguientes reactivos en campana ventilada.

SDS..... 1 g
Glicerol..... 5 mL
2-mercaptoetanol..... 2.5 mL
Azul de bromofenol.....0.5 mg

Aforar a 25 mL con agua deionizada y almacenar a -20 °C.

Método

1. Ensamblar los vidrios en el equipo para geles de 0.75 mm; asegurandose que no haya fuga de líquido, colocando un poco de alcohol etílico al 70 %. Descartar el alcohol y secar el remanente.

2. Adicionar el gel de separación al 12 % de 0.75 mm de grosor. Mezclar muy bien y colocar el gel en los vidrios y adicionar unas gotitas de alcohol etílico al 70 % con una pipeta Pasteur, evitando la formación de burbujas.
3. Dejar polimerizar por aproximadamente una hora a temperatura ambiente.
3. Adicionar el gel concentrador al, con pozos de 5 mm de ancho aproximadamente y poner el peine que formará los pozos inmediatamente después de colocar la solución del gel separador entre los vidrios para electroforesis. Dejar polimerizar por una hora a temperatura ambiente.
4. Realizar una dilución del extracto antigénico soluble de *G. lamblia* 1:5 con solución de buffer muestra 6X en un microtubo. Mezclar muy bien la solución de antígeno en el vórtex.
5. Tomar 8 μ L de Marcador Peso Molecular (MPM)
6. Cargar la muestra antigénica y MPM en los pozos respectivos y correr a 100 Voltios constantes por aproximadamente una hora y media, evitando liberar el frente del gel.

ANEXO 9

Electrotransferencia e Inmunodetección (Western-Blotting)

Método

1. Colocar el gel de poliacrilamida realizado durante la electroforesis, membrana de nitrocelulosa y dos pads (BIO- RAD) en solución de transferencia 1X, pH 8.3 por 5 a 15 minutos.
2. Acomodar de la siguiente manera: pad, membrana de nitrocelulosa, gel de poliacrilamida, y pad, eliminando en cada paso las burbujas que pudieron haberse formado por el buffer pasando un tubo limpio sobre la capa.
3. Electrotransferir en un sistema semiseco (Semi-Dry Blotting System, modelo IMM-1-A, no. de serie 11798) por 20 minutos a 120 mili amperes constantes.
4. Almacenar la membrana de nitrocelulosa a -25° C hasta su uso posterior.
5. Teñir el gel electrotransferido con azul de Coomassie para confirmar la adecuada transferencia del antígeno.

Inmunodetección

1. Bloquear las membranas de nitrocelulosa electrotransferidas con Ag de *Giardia*, con leche descremada 5 %- PBS 1X- BSA 1 % por 1 hora.
2. Enjuagar membranas con PBS 1X para quitar el exceso de solución bloqueadora.
3. Eliminar el exceso de PBS 1X y agregar el primer anticuerpo (suero de ratones infectados). Dejar incubar por 1 hora en agitación constante.
4. Enjuagar las tiras suavemente y realizar 5 lavados con PBS 1X, pH 7.2, por 5 minutos.
5. Agregar el segundo anticuerpo (cabra anti-ratón anti IgG peroxidasa conjugada) en dilución 1:7500 con PBS 1X-BSA 0.01 % e incubar durante una hora en agitación constante. Posteriormente enjuagar las tiras suavemente y realizar 5 lavados con PBS 1X, pH 7.2, por 5 minutos.
6. Realizar 5 lavados con PBS 1X, pH 7.2 de 5 minutos. Después de quitar el exceso de agua (NO DEJAR SECAR), y agregar aproximadamente la solución reveladora: una parte de

luminol con una parte de peróxido de hidrógeno (Super Signal, best Pico, Chemiluminescent Substrate, prod no. 34080, Lot No. EB60813, Pierce) a cada una de las tiras y dejar incubar por 10 minutos aproximadamente.

7. Exponer las tiras por 30 segundos a una película y revelar por medio de un proceso de revelado manual: El proceso de exposición y revelado se realiza en un cuarto oscuro: • Exponer la película 10 segundos en solución reveladora. • Enjuagar en agua por 5 a 10 segundos. • Mantener la película en solución fijadora por 10 segundos. • Quitar el exceso de solución enjuagando la película con agua varias veces. • Dejar secar.