



UNIVERSIDAD MOTOLINIA A. C.
ESCUELA DE QUIMICA
CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U. N. A. M.

AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LOS ANTIGENOS DE Giardia lamblia
(CEPA PORTLAND) POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNA Y SU
REACCION CRUZADA CON OTRAS CEPAS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A
MARIA DOLORES GENOVEVA
RAMIREZ HERNANDEZ

TESIS CON
FALLA LE CR.GEN

DIRECTOR DE TESIS Q. F. B. JOSE ALEJANDRO ADRIAN MENESES CASTARON



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CAPITULO I	
INTRODUCCION	1
CAPITULO II	
INFORMACION GENERAL SOBRE EL TEMA	2
CAPITULO III	
PARTE EXPERIMENTAL	4
3.1. Diseño del experimento	4
3.1.1. Diagrama	6
3.2. Material biológico	7
3.2.1. <u>Giardia lamblia</u> cepa Portland, cepas de pacientes adultos sintomáticos y sueros de niños asintomáticos.	7
3.2.2. Conejos machos Nueva Zelanda	7
3.3. Material de laboratorio	7
3.4. Reactivos	8
3.5. Cultivo axénico de <u>Giardia lamblia</u>	9
3.5.1. Siembra	9
3.5.2. Cosecha	10
3.5.3. Cálculo del número de trofozoitos	10
3.6. Fraccionamiento proteico en la columna de ULTROGEL ACA-34	10
3.6.1. Preparación de la columna	10
3.6.2. Obtención de las fracciones	11
3.7. Inmunización de los animales	11
3.7.1. Sacrificio de los animales	11
3.8. Obtención de las inmunoglobulinas de la clase G, contra las fracciones proteicas.	11

3.9. Electroforesis en gel de poliacrilamida	12
3.9.1. Tinción y revelado	12
3.10. Transferencia a papel de nitrocelulosa a partir del gel de poliacrilamida	13
3.11. Hemaglutinación indirecta	13
3.12. Resultados	15
CAPITULO IV	
DISCUSION	23
CAPITULO V	
RESUMEN	24
BIBLIOGRAFIA	28
APENDICE	33
8.1. Material y reactivos	33
8.1.1. Material	33
8.1.2. Reactivos	33
8.2. Cultivo axénico de <u>Giardia lamblia</u>	33
8.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida	34
8.3.1. Preparación de las placas	34
8.3.2. Solución de Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	34
8.3.3. Solución de Tris-HCl pH 6.8	34
8.3.4. Solución de Lauril-sulfato	35
8.3.5. Solución reguladora para la muestra	35
8.4. Transferencia a papel de nitrocelulosa a partir del gel de poliacrilamida	36
8.4.1. Solución de transferencia	36
8.4.2. Solución de bloqueo	36

8.4.3. Solución reguladora de fosfatos	36
8.4.4. Solución de Tween-gelatina	36
8.4.5. Solución de lavado	36
8.4.6. Revelado del papel de nitrocelulosa	36
8.5. Hemaglutinación indirecta	36
8.5.1. Solución de Alsevers	36
8.5.2. Suspensión de glóbulos rojos de carnero	37
8.5.3. Preparación del antígeno	37
8.5.4. Solución amortiguadora de fosfatos	37
8.5.5. Solución de ácido tánico	37
8.5.6. Suero normal de conejo	37
8.5.7. Adsorción de los glóbulos rojos de carnero	37

INTRODUCCION

La diferente patogenicidad de Giardia lamblia se pone de manifiesto cuando este protozooario se encuentra en pacientes con la patología descrita para Giardiasis como son: diarrea crónica (19), alteraciones en las disacaridasas (32), aplanamiento de las criptas en las vellosidades de la mucosa intestinal (25), trayendo como consecuencia una mala absorción intestinal repercutiendo en forma importante, si se trata de niños en crecimiento y desarrollo (39).

Sin embargo, también se le encuentra en sujetos asintomáticos evocando así una importante relación huésped-parásito. Si suponemos que el parásito es el responsable de la sintomatología descrita, tendríamos que demostrar diferencias entre las cepas de Giardia lamblia, tratando de determinar si existe diferente comportamiento del protozooario frente al huésped. De ahí el interés en estudiar los antígenos de Giardia lamblia tratando de determinar si existen diferencias entre los antígenos de las distintas cepas atribuyéndole a ello los diferentes niveles de patogenicidad.

El objetivo de este trabajo fue aislar los antígenos de membrana y somáticos de Giardia lamblia, cepa Portland y determinar la reacción cruzada entre los antígenos aislados y los sueros de 40 niños asintomáticos infectados probablemente con diferentes cepas de Giardia lamblia, infiriendo semejanzas antigénicas entre la cepa hospedera y la cepa Portland.

INFORMACION GENERAL SOBRE EL TEMA

Lambl, en 1859 describe la morfología de Giardia lamblia, como un protozoo que posee núcleos adyacentes y prolongaciones que salen del citoplasma conocidas como flagelos (11). Sin embargo, la morfología de este protozoo ha sido descrita ampliamente al microscopio de luz y al microscopio electrónico (4,25). Se sabe, que posee un disco ventral el cual sirve para fijarse a la mucosa intestinal. (11).

El ciclo vital del protozoo presenta dos fases: la de trofozoito y la de quiste. (11).

De estas, la segunda es la fase infectante, a la que también se le atribuye la patología desarrollada. Esta patología puede ser explicada por las siguientes tres teorías (21):

- 1.- Teoría mecánica.- Explica la falta de absorción intestinal, causada por la adhesión a la mucosa intestinal, por una gran cantidad de trofozoitos.
- 2.- Teoría del daño a la mucosa.- Determinada por una imagen que deja en espejo su disco suctor, causando una irritación superficial en la mucosa.
- 3.- Teoría de la relación huésped-parásito.- El huésped parece influir en forma importante, en la patogenicidad de este protozoo, debido a factores modificantes como: estado nutricional, nivel socio-económico, enfermedades asociadas, etc.

La transmisión de este protozoo es en general a través de

agua contaminada (3,15,34) o también se refiere a guarderías sin el manejo adecuado de las heces fecales (20).

Para el diagnóstico de Giardiasis se han utilizado diferentes técnicas como son: concentración, flotación, sedimentación, búsqueda de anticuerpos, etc (11).

Sin embargo hasta la fecha no ha sido posible esclarecer si la patología desarrollada por el protozoario es " per se ", o bien si se trata de una relación huésped-parásito.

Quienes involucran directamente al parásito, han tratado de aislar diferentes cepas (2,5,9,24,28,33) con el objeto de demostrar, entre otras cosas, proteínas asociadas con estructuras particulares como microtúbulos que justifiquen (17), si son sustancias de excreción o secreción (27), las que determinan los diferentes grados de patogenicidad para este protozoario.

PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Diseño del experimento

Aislamiento y purificación de los antígenos de Giardia lamblia (cepa Portland) por cromatografía en columna y su reacción cruzada con otras cepas.

A partir de un cultivo axénico de Giardia lamblia homogeneizar mecánicamente el Potter Evelyn, adicionar HCl 0.1 N y dejar durante 24 horas a 4°C. Posteriormente por centrifugación obtener un sedimento y un sobrenadante; pasar ambas partes a través de una columna de ULTROGEL ACA-34. Las fracciones proteicas obtenidas se utilizan para inmunizar a conejos machos Nueva Zelanda por vía intradérmica con el adyuvante completo de Freund. Después de un período de dos meses y medio, sacrificar los animales y por punción cardíaca obtener 50 ml de sangre. Con el suero obtenido hacer una purificación parcial de inmunoglobulinas de la clase G por precipitación con sulfato de amonio sobresaturado, con pH neutro; una vez obtenidas dializar toda la noche contra una solución de boratos salinos.

Con las proteínas obtenidas, hacer contraelectroforesis (9), utilizándolas como antígeno y las inmunoglobulinas aisladas del suero de los conejos como anticuerpos.

La hemaglutinación indirecta es otra técnica utilizada

para probar que las fracciones aisladas forman anticuerpos en los animales utilizados, observando la existencia de reacción cruzada entre las fracciones y otras cepas de Giardia lamblia aisladas de pacientes sintomáticos adultos, lo mismo que con 40 sueros de niños asintomáticos.

3.2. Material biológico.

3.2.1. Giardia lamblia cepa Portland, cepas de pacientes adultos sintomáticos y sueros de niños asintomáticos.

Se cultivo axénicamente (23), la cepa Portland donada generosamente por el Dr. Antonio Ramírez del Hospital Infantil de México " Federico Gómez", Las cepas aisladas de pacientes adultos obtenidas de heces y concentradas por el método de Faust (11), de la clínica # 75 del IMSS, y 40 sueros de niños asintomáticos de Kinder "Tacubaya" localizado en la misma colonia del D.F.

3.2.2. Conejos machos Nueva Zelanda.

Se utilizaron 20 conejos machos, de 36 días y un peso promedio de 1 350 kg. Adquiridos de la granja experimental de la Universidad Nacional Autónoma de México.

3.3. Material de laboratorio.

Autoclave Presto

Bomba peristáltica LKB 4912

Botellas de vidrio CORNING

Cámara para electroforesis HELENA LABORATORIES

Cámara para electroforesis vertical LKB

Cámara para inmunotransferencia LKB

Centrífuga SORVALL RT-6 000 DUPONT

Colector de fracciones LKB

Columna cromatográfica LKB 2137-026
Espectrofotómetro COLEMAN
Fuente de poder LKB
Homogeneizador KINET
Incubadora 37°C MEDILAB
Jeringa de vidrio 50 ml MAPAD
Microscopio de luz invertida ZEISS
Microscopio de luz ZEISS
Pipeta Pasteur
Pipeta Thoma
Potenciómetro CORNING Mod. 5
Termocirculador LKB

3.4. Reactivos

Acido cítrico
Acido clorhídrico
Acido tánico
Adyuvante completo de Freund
Azul de bromofenol
Azul de Coomasie
Azul Dextran D-5751 Sigma Chemical
Citrato de sodio
Cloruro de potasio
Cloruro de sodio
Fosfato dibásico de potasio
Fosfato monobásico de sodio
Gelatina

Glucosa

N"N' bis-acrilamida

Hidróxido de sodio

Lauril-sulfato

Mercapto-etanol

Persulfato de amonio

Poliacrilamida

Sulfato de amonio

Temed (N,N,N',N' tetrametilenamina)

Tinta china negra PELIKAN

Tris-base

Tris-HCl

Tween 20

3.5. Cultivo axénico de Giardia lamblia

Esta técnica se describe en el apéndice 8.1

3.5.1. Siembra

Colocar en las cajas, 45 ml de medio de cultivo TYI-S-33 suplementado con bilis de buey y después de pasar la prueba de esterilidad, incubar con una suspensión de trofozoitos 1×10^6 , incubarlas durante tres días a 37°C obteniéndose un crecimiento exponencial aproximado de 50×10^6 trofozoitos. Verificar al microscópio, con un aumento de 10x para ver la confluencia, viabilidad y morfología.

3.5.2. Cosecha

Enfriar las cajas en baño de hielo por 30 minutos como mínimo para despegar los trofozoitos de las cajas. Centrifugar la cosecha a 550 xG durante 10 minutos a 4°C, decantar el sobrenadante y agregar aproximadamente 1.0 ml de solución salina. Resuspender varias veces con una pipeta Pasteur llevar al volúmen inicial de 1.0 ml. Repetir esta manipulación tres veces.

3.5.3. Cálculo del número de trofozoitos

Utilizar una pipeta Thoma y la cámara de Neubauer, efectuar los cálculos según la siguiente fórmula:

$$A = \frac{a \times b \times c}{d}$$

A = número total de trofozoitos

a = factor de dilución (10)

b = factor que transforma la superficie de los milímetros cuadrados a volumen en milímetros cúbicos.

d = superficie contada.

3.6. Fraccionamiento proteico en la columna de ULTROGEL ACA-34.

3.6.1. Preparación de la columna

Lavar el ULTROGEL ACA-34 tres veces con agua destilada y desgasificar al vacío por tres horas se-

guidas. Montar una columna de vidrio de 37 cm de largo y 2.6 cm de ancho. Determinar el volumen vacío con azul dextran.

3.6.2. Obtención de las fracciones.

Homogeneizar aproximadamente 10^8 trofozoitos de Giardia lamblia en Potter Evelyn y adicionar un volumen igual de HCl 0.1 N. Centrifugar a 550 xG durante 5 minutos obtener un precipitado y sobrenadante. Colocar ambas partes en la parte superior de la columna; efectuar la elución con solución reguladora de fosfatos pH 7.1. Colocar las fracciones en 100 tubos con un volumen final de 1.5 ml cada tubo.

3.7. Inmunización de los animales

Sangrar previamente los animales por punción cardíaca para investigar, la presencia de anticuerpos contra Giardia lamblia mediante contrainmunolectroforesis (9). Posteriormente inocular intradérmicamente con 0.5 ml de fracciones proteicas obtenidas, mezcladas con el adyuvante completo de Freund, cada ocho días por espacio de dos meses.

3.7.1. Sacrificio de los animales.

Después de la última inmunización, dejar descansar los conejos por cuatro semanas, posteriormente extraer por punción cardíaca 50 ml de sangre.

3.8. Obtención de las inmunoglobulinas de la clase G, contra las fracciones proteicas.

Preparar una solución de sulfato de amonio sobresaturada, pH neutro, agregarla gota a gota y en constante agitación al suero hasta completar un volumen igual a este. En el fondo del vaso observar un precipitado blanco, que es guardado en refrigeración toda la noche. Al siguiente día centrifugar a 550 xG durante 30 minutos a 40°C y desecar el sobrenadante. Repetir este procedimiento hasta que el sobrenadante sea claro. Dializar las inmunoglobulinas de la case G, toda la noche contra un volumen 50 veces mayor a la muestra, con solución de boratos salinos.

3.9. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Los reactivos utilizados se citan en el apéndice 8.2. En los geles completamente polimerizados colocar las fracciones proteicas con una concentración de 1 mg/ml en los diferentes carriles. Incluir un patrón de peso conocido como albúmina sérica bovina 1 mg/ml. Sumergir las placas en la cámara superior que contiene la solución reguladora -- (ver apéndice 8.2.5.), se tapa la cámara y ajustar el voltaje a 120 voltios y 25 miliamperes. El corrimiento de las muestras se efectúa por espacio de 8 horas.

3.9.1. Tinción y revelado

Una vez transcurrido el tiempo de corrimiento, -- preparar un recipiente conteniendo una solución azul de Coomasie al 0.125%, depositar los geles por 25 minutos para después ser colocados en otro

recipiente conteniendo solución desteñidora de ácido acético y metano en proporción 2:1 y guardar toda la noche.

3.10 Transferencia a papel de nitrocelulosa a partir del gel de poliacrilamida.

Colocar los geles en solución de transferencia (apéndice 8.3.1) para quitar el exceso de solución amortiguadora de fosfatos y revelar con tinta china con relación de un microlitro de tinta china por 1 ml de solución de fosfatos salinos.

3.11 Hemaglutinación indirecta

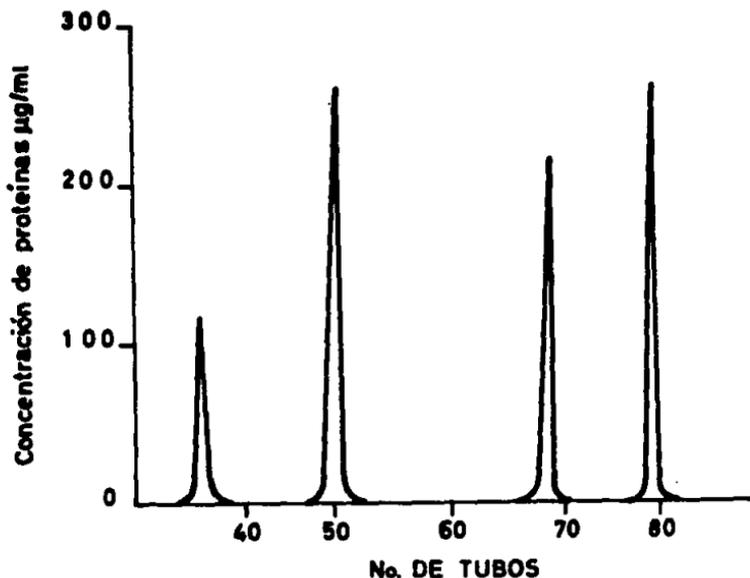
Preparar una suspensión de glóbulos rojos de carnero al 2% con solución amortiguadora de fosfato salino con pH 7.2, tomar 3 ml de la suspensión y mezclar con 3 ml de ácido tánico (dilución 1:2 000), incubar durante 10 minutos a 37°C, después centrifugar a 550 xG durante 5 minutos, desechar el sobrenadante. Lavar el paquete de glóbulos rojos con solución amortiguadora de fosfatos salinos (ver apéndice 8.3.3) para quitar el excedente de ácido tánico. El control negativo contiene 5 ml de la solución amortiguadora de fosfatos salinos pH 6.4 y 1 ml de glóbulos rojos de carnero tratados con ácido tánico. El control positivo contiene 4ml de la solución amortiguadora de fosfatos salinos pH 6.4, 1 ml de glóbulos rojos de carnero tratados con ácido tánico y 1 ml de la solución de antígeno.

Dejar reposar ambos tubos 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugar a 550 xG, posteriormente agregar 2 ml de suero normal de conejo con una dilución de 1:100 y centrifugar en las mismas condiciones. Preparar placas de limbro con 0.1 ml de suero haciendo diluciones logarítmicas, y añadir 20 lamdas de glóbulos rojos de carnero recubiertos con el antígeno correspondiente.

3.12. Resultados

Los resultados obtenidos en el presente trabajo se muestran por medio de gráficas y tablas, para mayor claridad.

Grafica 1. Representa la separación cromatográfica del precipitado a través de una columna de ULTROGEL ACA-34 distinguiéndose 4 fracciones con una concentración de 100 a 276 microgamos/ml.



Gráfica 2. Se observa la separación cromatográfica del sobrenadante; obteniéndose cuatro fracciones proteicas con concentraciones entre 900 y 2 000 microgramos/ml.

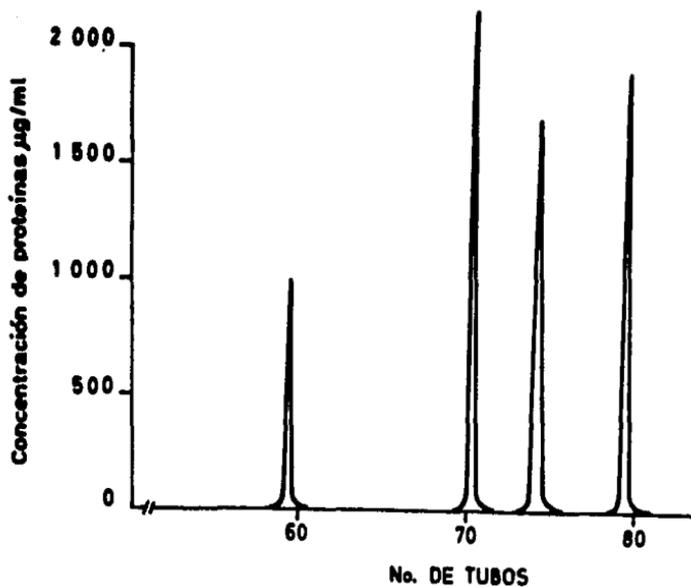
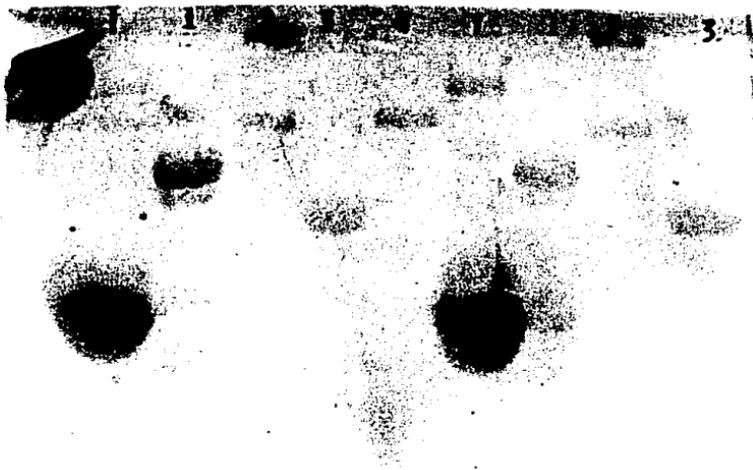


Figura 1. La electroforesis en gel de poliacrilamida se llevó a cabo solamente con los antígenos de membrana, por lo que se deduce presentaron mayor antigenicidad.



T = Testigo (albúmina)

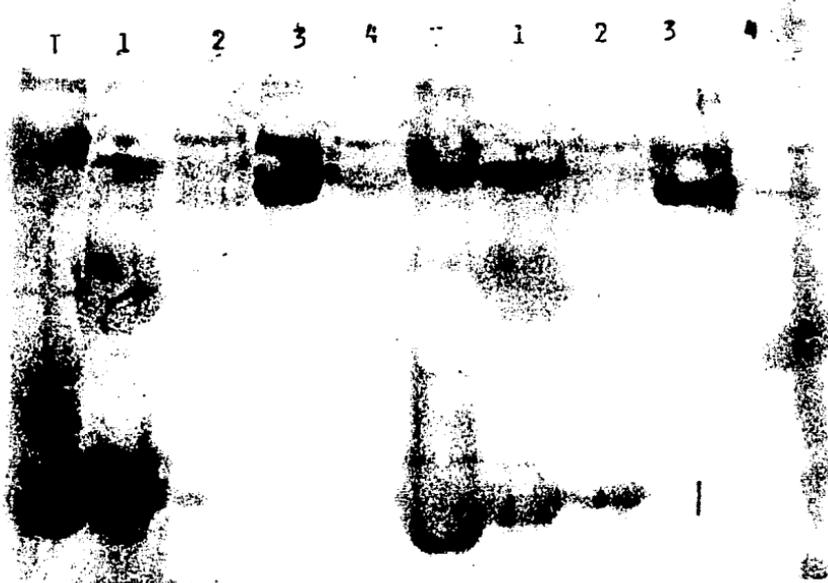
1 = Antígeno MEM- 35

2 = Antígeno MEM - 48

3 = Antígeno MEM - 70

4 = Antígeno MEM - 82

Figura 2. Muestra la transferencia a papel de nitrocelulosa. Se observa que estas fracciones proteicas son de mayor complejidad, comparadas con el revelado del gel de poliacrilamida.



T = Testigo (albúmina)

1 = Antígeno MEM - 35

2 = Antígeno MEM - 48

3 = Antígeno MEM - 70

4 = Antígeno MEM - 82

La inmunización de los animales y la purificación de las inmunoglobulinas de la clase G, fueron utilizadas con el propósito de determinar el nivel de inmunogenicidad de cada fracción proteica cuantificando el título de anticuerpos por la técnica de hemaglutinación indirecta. La tabla 1 muestra los resultados obtenidos, en donde la media geométrica muestra que los antígenos de membrana (MEM), fueron más inmunogénicos comparativamente con los antígenos del sobrenadante (SN), a excepción, del antígeno 86 que dió resultados de anticuerpos más altos que las fracciones proteicas de la membrana.

TABLA I

* TITULO DE ANTICUERPOS CONTRA LAS FRACCIONES DE ANTIGENO AISLADOS DE MEMBRANA Y SOBRENADANTE DE Giardia lamblia.

	Antígenos	Título de anticuerpos
SOBRENADANTE	35	1:192 \pm 8
	50	1:133 \pm 10
	69	1:240 \pm 12
	80	1:144 \pm 7
MEMBRANA	Ag de membrana	
	58	1:42 \pm 16
	73	1:85 \pm 21
	76	1:25 \pm 14
	86	1:432 \pm 7
COMPLETO	Ag completo	1:1532 \pm 890

* MEDIA GEOMETRICA

Los resultados sobre la reacción cruzada entre los antígenos del sobrenadante y precipitado con los sueros de los niños - parasitados por Giardia lamblia se presentan en la tabla II. Se observa que los títulos de anticuerpos, fueron muy diferentes cuando se utilizó el antígeno completo en comparación cuando se encuentra fraccionado. De los 40 niños solo 19 presentaron títulos de anticuerpos 1:128 con las fracciones del sobrenadante 86. Por otro lado las fracciones de membrana -- 35 mostró en forma semejante que por lo menos 50% de los sueros de estos niños presentan títulos de anticuerpos 1:64. -- Haciendo la comparación cuando se utiliza la cepa completa - solo 2 presentaron títulos de anticuerpos 1:64 y 3 en 1:128, como se indica en la tabla II. Las demás fracciones, MEM-48 y SN-58 su mayor frecuencia se encontró en títulos 1:32.

TABLA II

FRECUENCIA DEL TITULO DE ANTICUERPOS DEL SUERO DE 40 NIÑOS CONTRA ANTIGENO COMPLETO Y FRACCIONES PROTEICAS DE MEMBRANA Y SOBRENADANTE AISLADOS DE Giardia lamblia

	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
<u>Antígeno completo</u>	6	5	12	5	4	2	3	2	0	0	1
<u>MEM-35</u>	1	0	1	2	6	22	4	2	0	2	0
<u>MEM-48</u>	2	1	1	7	18	8	2	1	0	0	0
<u>MEM-70</u>	1	4	4	10	8	8	1	2	1	1	0
<u>MEM-82</u>	5	8	7	5	7	7	1	0	0	0	0
<u>SN-58</u>	4	2	4	10	13	7	0	0	0	0	0
<u>SN-73</u>	6	3	12	4	7	8	0	0	0	0	0
<u>SN-76</u>	4	6	9	7	2	5	5	2	0	0	0
<u>SN-80</u>	0	0	0	0	0	9	19	8	2	1	1

DISCUSION

En la actualidad el estudio de los antígenos de Giardia lamblia tiene interés por varias razones.

Una de ellas es por que estos podrían contener glicoproteínas, con un azúcar receptor de las células intestinales indicándonos la explicación a los mecanismos de adherencias, para que se fije el disco ventral de Giardia lamblia en las células de la mucosa intestinal. Y otra, porque sus diferentes epítopes - podrían explicarnos el distinto nivel de virulencia entre cepa y cepa (26, 27).

Existen diferentes criterios a este respecto, mientras que a algunos autores suponen que los antígenos de membrana contienen la especificidad de la cepa (10), otros, suponen diferencias más importantes que incluyen a estos y además a los antígenos somáticos, basándose en la diversificación del contenido de DNA en diferentes cepas de Giardia lamblia (1, 26, 27).

La participación de la inmunidad celular y humoral ha sido - plenamente demostrada; la primera, donde los linfocitos T de - pacientes con Giardiasis crónica juegan un papel importante. - Dentro de estos eventos se ha demostrado que los macrófagos que fagocitan a Giardia lamblia, así como los monocitos indican que ellos podrían participar en los mecanismos de defensa (31).

RESUMEN

A partir de un cultivo axénico de Giardia lamblia cepa Portland, se obtiene mediante centrifugación diferencial, antígenos somáticos y de membrana. Ambas son fraccionadas por columna de - - ULTROGEL ACA-34, obteniéndose cuatro picos de elución en cada uno. Estos son cuantificados, observándose diferencias importantes en cuanto a su concentración proteica.

Con las fracciones obtenidas, en cada pico de elución, se inmuniza a conejos machos raza Nueva Zelanda por vía intradérmica - con adyuvante completo de Freund. A partir del suero de los animales se obtiene la fracción gamma globulínica por precipitación con sulfato de amonio sobresaturado.

Con las fracciones de membrana, se lleva a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida, con el fin de conocer la composición de dicha fracción. También se hace inmunotransferencia, a partir del gel de poliacrilamida, para observar las bandas proteicas no reveladas en el gel de poliacrilamida.

Se probó la reacción cruzada de las fracciones proteicas del sobrenadante y del precipitado, obtenidas de 40 sueros de niños - con Giardiasis asintomática, mediante hemaglutinación indirecta observándose que los antígenos de membrana fueron más inmunogénicos comparados con los antígenos del sobrenadante y probablemente estos antígenos sean compartidos con la cepa Portland y la cepa hospedera.

Con relación a la inmunidad humoral se ha demostrado, que en personas con hipoglobulinemia, la prevalencia de Giardia lamblia es mucho más alta (31).

A nivel experimental la participación de las inmunoglobulinas y su capacidad protectora ha sido estudiada por Snider (35), donde en animales tratados con anti-IgM la virulencia de Giardia lamblia, se hizo más importante.

De ahí el interés de aislar antígenos con el objeto de investigar su papel en la respuesta inmune celular y humoral.

En el presente trabajo se pudo separar por lo menos 8 antígenos diferentes; los primeros cuatro corresponden a los antígenos de membrana y los cuatro restantes a los antígenos somáticos.

Los contenidos en las fracciones aisladas dió la impresión, de acuerdo al título de anticuerpos, que podrían ser utilizados para determinar la presencia de éstos mediante la técnica de hemaglutinación indirecta en el suero de los niños con Giardiasis asintomática.

De acuerdo a la tabla II, se puede concluir que la Giardia lamblia que había parasitado a estos niños contenía antígenos parecidos a los de la cepa Portland.

Sin embargo, la intensidad de los títulos de anticuerpos señalan la presencia de los antígenos de MEM-35 y SN-80 en forma más importante, puesto que los títulos fueron 1:64 y 1:128.

Nuestro propósito es continuar estudiando la composición de los antígenos así como sus epítopes de sus glicoproteínas.

CONCLUSIONES

- 1.- En el presente trabajo fueron obtenidas fracciones proteícas por columna de ULTROGEL ACA-34 en donde se aislaron -- ocho fracciones; cuatro correspondientes al sobrenadante y cuatro al precipitado.
- 2.- Las fracciones inoculadas a conejos raza Nueva Zelanda probaron ser antigénicas tal como lo demuestra el hecho de haber detectado anticuerpos correspondientes.
- 3.- Las inmunoglobulinas aisladas corresponden a la clase G.
- 4.- Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida se demostró la presencia de varias proteínas contenidas en cada fracción aislada.
- 5.- Al realizar una reacción cruzada por hemaglutinación indirecta, se observó que las fracciones de membrana presentan títulos más altos, a excepción de las fracciones del sobrenadante, con el suero de los niños parasitados por Giardia lamblia.
- 6.- Con los resultados obtenidos se puede concluir que las fracciones que tienen distinto poder antigénico se encuentran en la fracción MEM-35 y SN-80 al haberse encontrado variación en sus títulos de anticuerpos con respecto a las demás fracciones aisladas.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aggarwall, A. y Nash, T.E.: Comparison of two antigenically distinct Giardia lamblia isolates in gerbils. An.J.Trop.Med. Hyg. 36(2); 235-242. 1987.
- 2.- Andrews, J.J., Elhen, J.S. y Stevens, D.P.: Purification of Giardia muris trophozoites by using nylon fiber columns. Am.J.Trop.Med.Hyg. 29(1); 12-15. 1980.
- 3.- Barbour, A.G., Craig, R. N.: An outbreak of Giardiasis in a group campers. A.J.Trop.Med.Hyg. 25(3):384-389; 1976.
- 4.- Beraguist, N.R.: Membrane dynamics of Entamoeba histolytica and Giardia lamblia studied with reflection contrast microscopy and the carbon immunoassay. Arch. Invest. Med. 13(3) 384-402: 1982.
- 5.- Bertham, M.A. Meyer, S.A.: A comparison of isozymes of five axenic giardia lamblia. J.Parasitology. 69(5); 793-796; 1983.
- 6.- Beth, P.U. y Nash, T.E.: Cross-reactivity among different Gliardia lamblia isolates using Immunofluorescent antibody and ELISA. A.J.Trop.Med.Hyg; 37(2); 283-295:1988.
- 7.- Brandboard, L.L., Barancik, M.: Histological demonstration of mucosal, invasion by Giardia lamblia, in man A.J.Trop.Med. Hyg 52(2);143-150, 1967.
- 8.- Burn, T.W.: Three pathogens important in primary care. Pasasitic Bowel Disease. 71(5); 173-179:1982.
- 9.- Craft, C.J., Nelson, J.D.: Diagnosis of Giardiasis by counter immunoelectrophoresis of feces. J.Infec.Disease; 145(4): 499-504:1982.

- 10.- Einfield, D.A. y Stibbs, H.H.: Identification and characterization of a major surface antigen of Giardia lamblia, Infection and Immunology. 6 (6); 377-382. 1984.
- 11.- Faust, Carroll: Parasitología Clínica. Salvat. Edición 1986.
- 12.- Gillin, F.D. y Diamond, L.S.: Clonal growth of Giardia lamblia trophozoites in a semisolid agarosa medium. J. Parasitology. 66 (2); 350-352: 1980.
- 13.- Gorts, B. y Hemelof, W. Rutine culture of Giardia lamblia trophozoites from human duodenal aspirates. Lancet 137.1984.
- 14.- Grenn, L.E., Miles, M.: Immunodiagnostic detection of Giardia antigen in feces by rapid visual enzyme-linked immunoassay. Lancet. 19 (2572); 691-693: 1985.
- 15.- Greensmith, C.T. y Fast, M.: Giardiasis associated with the use of water slide. Pediatrics Inf. Dis. 7 (2); 91-94; 1988.
- 16.- Hill, D.R. Guerrat, R.T.: Giardia lamblia infection of suckling mice. J. Infectious Diseases. 147 (2); 217-221. 1983.
- 17.- Holberton, D.V. y Ward, A.P.: Isolation of the cytoskeleton from Giardia. Tubulin and low-molecular-weight protein associated with microtubule structures. J. Cell Sci. 47 (1); 139-166. 1981.
- 18.- Jokipii, L. y Jokipii, A.M.: Short communications. Annals. Trop. Med. and Parasitology. 74 (1); 93-95: 1980.
- 19.- Kamath, K.R. y Murugasu, R.: A comparative study of four methods for detection Giardia lamblia in children with diarrheal disease and malabsorption. Gastroenterology. 66 (1); 16-21: 1974.
- 20.- Keytoye, M.D., Krijden, S. y Warren, M.: Person to person

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- transmission of Giardia lamblia a day care nurseries. J. Parasitology. 119 (1); 241-248: 1978.
- 21.- Marvin, E.A., Hans, D.O. y Starkey, D: Structure and function of the gastrointestinal tract in primary immunodeficiency syndromes a study of 39 patients. Medicine. 39 (1); 191-195: 1973.
- 22.- Masamichi, A. y Kaplan, B.: Effector mechanism of host resistance in murine Giardiasis specific IgG and IaG cell mediated toxicity. J.Immunology. 134 (3); 245-251: 1985.
- 23.- Meyer, E.A.: Culture of Giardia lamblia. Lancet 32 (2954); 527: 1984.
- 24.- Meyer, E.A.: Giardia lamblia. Isolation an axenic cultivation experimental. Parasitology. 197 (1); 101-105: 1985.
- 25.- Moreki, R. y Parker, J.G.: Ultrastructural studies of the human Giardia lamblia and sujacent jejunal mucosa in a sujet with steatorrhea. Gastroenterology. 52 (2-1); 151-164:1967.
- 26.- Nash, T.E. Gillin, D: Excretory - secretory products of giardia lamblia. J. Immunolog. 131 (4); 2004-2010: 1983.
- 27.- Nash, T.E. y Keister, D.F.: Diferences in excretory-secretory products and surfase antigen among 19 isolates of Giardia. J.Infectious diseases. 52 (6): 1166-1169: 1985.
- 28.- Ridley, M.J. y Ridley, D.S.: Serum antiboides and jejunal histology in Giardiasis associated with malabsortion. J. Clinical Pathology. 28 (1); 30-34: 1976. .
- 29.- Riggs, L.L., Dupuis, W. y Saph, G.: Detection of Giardia lamblia by immunofluorescence. Applied and enviromental microbiology. 45 (2); 788-802: 1983.

- 30.- Roberts-Thomson, I.C. Stevens, D.P. y Mahmoud, A.: Giardiasis in the mouse: An animal model. Gastroenterology. 71 (1); 57-67: 1976.
- 31.- Shigehoko, U., Jephcott, A. y Begg, N.T.: Outbreak of Giardiasis associated with mains water in the united Kingdom. Lancet. 8 (3048); 730-732: 1986.
- 32.- Smith, P.D.: Pathophysiology and Immunity of Giardiasis. Ann. Rev. Med. 36 (1); 285-307: 1985.
- 33.- Snider, D.P., Jullus, G. y Brian, J.U.: Chronic Giardia muris infection in Anti-IgM treated mice. Ann of Immunology. 137 (4); 4153-4162: 1982.
- 34.- Sotto, A., Cabrera, S. y Barballa, E.: Blood groups in recurrent Giardiasis. Lancet. Dec; 1321-1333: 1983.
- 35.- Spauling, J.J., Pacha, E.E. y Clark, G.W.: Quantitation of Giardia cysts by membrane filtration. J. Clin. Microbiology. 18 (3); 713-715: 1983.
- 36.- Ungar, B.L., Valken, R.H. y Nash, T.E.: Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of Giardia lamblia in fecal specimens. J. Infectious Disease. 149 (1); 90-97: 1984.
- 37.- Vázquez, A.M., García, C. y Armas, A.: Cuantificación de linfocitos T en niños con Giardiasis. Rev. Cubana Pediatría. 59 (1); 7-10: 1987.
- 38.- Vázquez, T.O., Velasco, C.O.: Giardiasis. Infectología. 7 (4); 179-199. 1987.
- 39.- Vega, F.L.: Absorción intestinal en niños con Giardiasis. Bol. Md. Hosp. Inf. de Mex. 40 (11); 598-603: 1983.
- 40.- Vianyak, V.K., Chadna, R.: Detection of Giardia lamblia antigen in the feces by counterimmunoelectrophoresis. Pediatric Inf.

Disease. 4 (4); 383-386: 1985.

- 41.- Visvesvara, G.S.: Anoxic grown of Giardia lamblia in Diamond's
TPS-1 medium. Trans. of the Royal of Trop. Med. Hyg. 74 (2);
213-215. 1980.
- 42.- Wittner, M., Maayan, W. y Tanowitz, H.B.: Diagnosis of
Giardiasis by two methods. Arch. Pathol. Lab. Med. 107 (1);
524-257. 1983.
- 43.- Wolfson, J.S., Hopkins, C.C. y Weber. I.F.: An association
between cryptosporidium and Giardia stool. The New England
J. of Medicine. 22 (788); 435: 1984.

APENDICE

8.1 Material y Reactivos.

8.1.1 Material:

Agitador magnético.
 Balanza analítica BOSCH P-115.
 Matraces aforados.
 Matraces erlenmeyer.
 Pipetas serológicas.
 Termómetro hasta 110°C
 Tubos de ensaye.
 Tubos de rosca.

8.1.2 Reactivos:

Acido ascórbico (J.T.Baker).
 Bilis de buey (Bioxon).
 Biosate (BBL)
 Cloruro de sodio (J.T.Baker).
 Citrato de fierro (J.T.Baker).
 Dextrosa (J.T.Baker).
 Fosfato de potasio dibásico (J.T.Baker).
 Fosfato de potasio monobásico (J.T.Baker).

8.2 Cultivo axénico de Giardia lamblia.

Medio de cultivo TY1-S_33 suplementado con bilis de buey, con-
 tituido por: 15 gr de Biosate, 5 gr de Dextrosa, 1 gr de clo-
 ruro de sodio, 500 mg de fosfato de potasio monobásico, 300 mg
 de fosfato de potasio dibásico, 1 gr de L-cisteína-HCl, 100 gr
 de ácido ascórbico, 10 mg/10 ml de bilis de buey, 11.5 mg de

citrato férrico de amonio y c.b.p. 500 ml de agua desionizada.

PROCEDIMIENTO

Disolver los reactivos en el orden presentado con aproximadamente 300 ml de agua desionizada, ajustar el pH a 7.0-7.2 con NaOH 0.1 N, agregar 11.5 mg de cítrato férrico de amonio y llevar a un volumen final de 500 ml. clarificar el medio mediante la filtración a través de papel Whatman # 1, esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Añadir, en condiciones estériles 25 ml de bilis bovina (previamente inactivada a 56°C durante 30 minutos), depositar en botellas de vidrio o plástico estériles con tapón de rosca. Hacer ésto en condiciones estériles con ayuda del flujo laminar Veco, dejar la botella con el medio en la estufa a 37°C por 24 horas como prueba de esterilidad.

8.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida.

8.3.1 Preparación de las placas.

Preparar el gel de poliacrilamida con una mezcla de acrilamida 30 gr y N'N'bis-acrilamida 0.8 gr en 10 ml de agua desionizada, filtrar por papel Whatman # 1 y guardar en un frasco color ambar.

8.3.2 Solución de Tris-HCl 1.5 M pH 8.8

Disolver 18.5 gr de Tris-base en 50 ml de agua desionizada, ajustar el pH con NaOH 1N y aforar con agua desionizada.

8.3.3 Solución de Tris-HCl pH 6.8

Disolver 7.88 gr de Tris-HCl en 50 ml de agua desionizada, ajustar el pH con HCl 1N y aforar a 100 ml con agua desionizada.

8.3.4 Solución de Lauril-sulfato al 10%

Pesar 10 gr de lauril-sulfato y disolver en 100 ml de agua desionizada.

8.3.5 Solución reguladora para la muestra.

De una solución de Tris-HCl 1.5 M tomar 25 ml, y agregar 2 gr de Lauril-sulfato, 10 ml de glicerol, 5 ml de mercapto-etanol, 1 ml de azul de bromofenol al 0.1%, y aferrar a 100 ml de agua desionizada.

PROCEDIMIENTO.

Preparar los geles o diferentes concentraciones, uno que sirve como espaciador con concentración del 5%, y otro como gel separador con concentración del 10%.

Composición del gel espaciador: 5 ml de la mezcla de acrilamida y bis-acrilamida, 7.5 ml de Tris-HCl con pH 6.8, 0.03 ml de solución de lauril-sulfato, 0.15 ml de TEMED (N,N,N'N' tetrametilamida), 0.01 ml de persulfato de amonio al 10% y 17.1 ml de agua desionizada.

Composición del gel separador: 20.0 ml de la mezcla de acrilamida y bisacrilamida, 15 ml de Tris-HCl con pH 8.8., 1.2 ml de solución de lauril-sulfato, 0.02 ml de TEMED, y 0.1 ml de persulfato de amonio.

Montar las placas de vidrio sobre las bases de acrílico y sujetar con los tornillos laterales (equipo completo de LKB), llenar las placas con la solución evitando hacer burbujas hasta aproximadamente 8 cm de altura, sellar con agua destilada.

Dejar a temperatura ambiente por espacio de 60 minutos, posteriormente guardar a 4°C toda la noche.

8.4 Transferencia a papel de nitrocelulosa a partir del gel de poli-acrilamida.

8.4.1 Solución de transferencia

Pesar 9.075 gr de Tris-base, 43.2 gr de glicina, 600 ml de metanol y 2400 ml de agua destilada.

8.4.2 Solución de bloqueo

Pesar 8 gr de cloruro de sodio, 2.081 gr de etilendiamino tetracetato, 2.5 gr de gelatina y disolver en 800 ml de agua destilada.

8.4.3 Solución reguladora de fosfatos

Pesar 8 gr de cloruro de sodio, 0.2 gr de fosfato monobásico de potasio, 2.9 gr de fosfato dibásico de potasio, 1.6 gr de fosfato de sodio monobásico, 0.2 gr de cloruro de potasio, 0.5 ml de Tween 20, disolver todo en 1000 ml de agua destilada.

8.4.4 Solución de Tween-gelatina

Pesar 1 gr de gelatina y disolver en 200 ml de solución reguladora de fosfatos conteniendo Tween 20.

8.4.5 Solución de lavado

A 100 ml de la solución de fosfatos agregar 0.1 ml de Tween 20.

8.4.6 Revelado del papel de nitrocelulosa.

Agregar 1 microlitro de tinta china negra Pelikan por cada ml de la solución amortiguadora.

8.5 Hemaglutinación indirecta.

8.5.1 Solución de Alsevers

Pesar 2.05 gr de glucosa, 0.2 gr de citrato de sodio.

Disolver todo en 100 ml de agua destilada y esterilizar a 121°C durante 10 minutos.

8.5.2 Suspensión de glóbulos rojos de carnero.

Almacenar aproximadamente 50 ml de sangre de carnero en 100 ml de solución de Alsevers, y dejarlos madurar por 15 días a 4°C.

8.5.3 Preparación del antígeno.

Los antígenos usados son las fracciones proteicas obtenidas de la columna, las cuales se dializan contra cloruro de sodio toda la noche.

8.5.4 Solución amortiguadora de fosfatos.

Preparar una solución de fosfato de potasio monobásico 0.15 M y una solución de fosfato dibásico de sodio 0.15 M. De la primera solución tomar 24 ml y de la segunda 76 ml, agregar al final un volumen igual de solución salina.

8.5.5 Solución de ácido tánico

Tomar 1 ml de ácido tánico aforar a 100 ml con agua destilada de la cual se hace una dilución 1:2, con solución salina.

8.5.6 Suero normal de conejo.

Por punción cardíaca obtener 50 ml de sangre, e inactivar el suero a 56°C durante 30 minutos.

8.5.7 Absorción de los glóbulos rojos de carnero.

Con el suero normal de conejo absorber un volumen igual de glóbulos rojos de carnero, incubar en baño maría a 37°C por una hora, y dejar en reposo toda la noche,

y finalmente centrifugar, obteniéndose de esta forma el suero absorbido.