

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales

- I Z T A C A L A -



**“ CARACTERIZACION DE ANTIGENOS RELEVANTES
DEL PROTOZOARIO PARASITO *Giardia lamblia* ”**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

BIOLOGO

PRESENTA

JOSE ANTONIO RAMIREZ BARGENAS

México, D. F.

1986



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.

ESTA TESIS ESTA DEDICADA:

A MI MADRE: CON TODO MI AMOR

A LA MEMORIA DE MI PADRE CON EL RESPETO Y EL AMOR QUE ME
MERECE

A MIS HERMANOS: HECTOR, Ma. DEL CARMEN, LUIS, MARIO, ARMANDO Y
MARIBEL. CON AMOR Y DESEANDO QUE LOGREN SIEMPRE
SUS MAS QUERIDAS METAS.

GRACIAS:

A la Dra Guadalupe Ortega por la paciencia y la confianza mostradas durante mi aprendizaje.

A el Consejo de Nacional Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haber aportado el donativo y la beca durante la realización de este trabajo.

A mis amigos Héctor, Bety, José Luis, Lilia, Bulmaro, Ramón, David, Enrique, Amaya, Tere R., Tere O., Manuel Alejandra, Araceli, Jaime, Rogelio, Margarita, quienes vivirán entre mis mas bellos recuerdos.

A mis nuevos amigos por su tolerancia y hacer gratos los momentos de mi vida.

CONTENIDO

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	i
RESUMEN.....	ii
ABREVIATURAS.....	iu
INTRODUCCION.....	1
Manifestaciones Clínicas de la Enfermedad.....	3
Diagnóstico.....	4
Respuesta Inmune en Giardiasis.....	6
Perspectivas del Uso de Anticuerpos Monoclonales.....	9
OBJETIVOS.....	15
METODOLOGIA.....	16
Animales.....	16
Cultivo del Parásito <u>G. lamblia</u>	16
Protocolo de Inmunización de Animales.....	17
Preparación de Antígenos Solubles.....	17
Marcaje de Superficie de Trofozoítos de <u>G. lamblia</u> con ¹²⁵ I.....	18
Análisis Electroforético de Antígenos Solubles.....	19
Cultivo de Células de Mieloma.....	20
Obtención de Células Alimentadoras.....	20
Obtención de Híbridomas Mediante Fusión Celular.....	21
Selección, Clonación y Expansión de Híbridos.....	22
Purificación de Anticuerpos a Partir de Líquido Ascítico.....	24
Ensayo de ELISA.....	25
Determinación de la Reactividad de los Anticuerpos Monoclonales por Inmunofluorescencia Indirecta.....	26
Inmunoelctrotransferencia.....	27
Inmunoprecipitación de Antígenos de <u>G. lamblia</u> Marcados con ¹²⁵ I.....	28
RESULTADOS.....	31
Cultivo de Trofozoítos.....	31
Obtención de Antígeno Soluble.....	31

Marcaje de Superficie de Trofozoítos de <u>G. lamblia</u>	31
Análisis Electroforético de Antígenos Solubles de <u>G. lamblia</u> ..	32
Inmunización de Animales.....	33
Crecimiento de células de mieloma.....	34
Obtención de Anticuerpos Monoclonales.....	34
Caracterización de Anticuerpos monoclonales.....	35
Purificación de Anticuerpos a Partir de Líquido Ascítico.....	36
Inmunolectrotransferencia.....	36
Inmunoprecipitación de Antígenos Marcados de <u>G. lamblia</u>	47
DISCUSION	49
CONCLUSIONES.....	57
BIBLIOGRAFIA.....	58
ANEXO 1. REACTIVOS Y EQUIPO.....	68
ANEXO 2. PREPARACION DE MEDIOS Y SOLUCIONES.....	71

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

TABLA 1. LINEAS CELULARES DE MIELOMA USADAS EN FUSIONES CON CELULAS LINFOIDES.....	13
TABLA 2. AISLAMIENTO DE LA LINEA DE MIELOMA MAT-SENSIBLE X63.Ag8.653.....	14
TABLA 3. OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA <u>Giardia lamblia</u>	42
TABLA 4. CLONACION DE HIBRIDOS PRODUCTORES DE ANTICUERPOS ANTI- <u>G. lamblia</u>	43
TABLA 5. CARACTERISTICAS DE CLONAS PRODUCTORAS DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA <u>G. lamblia</u>	44
TABLA 6. PURIFICACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES A PARTIR DE LIQUIDO ASCITICO.....	45
FIGURA 1. Diagrama del dispositivo usado en transferencia electroforética de proteínas.....	30
FIGURA 2. Análisis electroforético de antígeno de <u>G. lamblia</u> obtenido por solubilización con triton x100.....	39
FIGURA 3. Electroforesis de los diferentes extractos antigénicos solubles de <u>G. lamblia</u>	40
FIGURA 4. Análisis electroforético de los componentes protéicos de <u>G. lamblia</u> susceptibles al marcaje con ¹²⁵ I.....	41
FIGURA 5. Patrones de inmunofluorescencia obtenidos en trofozoítos de <u>G. lamblia</u> incubados con diferentes anticuerpos monoclonales.....	46
FIGURA 6. Reactividad de sueros inmunes sobre proteínas de <u>G. lamblia</u> en papel de nitrocelulosa.....	47
FIGURA 7. Inmunoprecipitación de antígenos de <u>G. lamblia</u> marcados con ¹²⁵ I empleando suero inmune de conejo.....	48

RESUMEN.

La giardiasis es una parasitosis intestinal causada en humanos por Giardia lamblia un protozoo del orden Diplomonadida. La distribución de esta enfermedad es cosmopolita y dentro de los síntomas más severos de esta se encuentran la diarrea y la mala absorción intestinal.

Recientemente se ha enfatizado en la importancia de llevar a cabo estudios acerca de la biología de este parásito, de los mecanismos responsables de la patogenia de la enfermedad así como de la respuesta inmune que se desarrolla durante la infección. En este contexto, la caracterización de antígenos de G. lamblia y el estudio de su papel en la relación huésped--parásito resulta muy relevante.

En este trabajo se establecieron cultivos axénicos de G. lamblia de la cepa Portland-1, lo cual permitió contar con el material necesario para llevar a cabo la caracterización de antígenos de este parásito.

El análisis electroforético de los extractos de trofozoítos obtenidos por solubilización con diferentes detergentes, mostró una gran complejidad antigénica. Sin embargo el uso de técnicas de marcaje radiactivo de superficie empleando ^{125}I , mostró que el número de componentes susceptibles de ser marcados es muy reducido. Asimismo, se obtuvieron anticuerpos monoclonales en contra de antígenos de superficie de G. lamblia. La reactividad de estos anticuerpos monoclonales en ensayos de inmuofluorescencia empleando trofozoítos de G. lamblia sugiere que existe heterogeneidad antigénica en la superficie de estos.

Por otro lado, algunos de los componentes del parásito obtenidos por solubilización con detergentes, así como por marcaje radiactivo, fueron reconocidos por sueros provenientes de animales experimentales (conejo y ratón) inmunizados con trofozoítos de G. lamblia. Los resultados presentados en este trabajo proveen información relevante que permitira llevar a cabo estudios posteriores en cuanto a la participación de antígenos del parásito en la relación con su huésped.

ABREVIATURAS.

- AFS..... amortiguador fosfato salino.
 ASB..... albúmina sérica bovina.
 CINVESTAV-IPN. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del
 Instituto Politécnico Nacional.
 DMSO..... dimetilsulfoxido.
 DOC..... deoxicolato de sodio
 EGPA-DSS..... electroforesis en gel de poliacrilamida en
 presencia de duodecil sulfato de sodio.
 ELISA..... siglas en inglés del ensayo inmunoabsorbente con
 el uso de enzimas.
 FMS..... fluoruro de fenil metil sulfónilo.
 FITC..... siglas en inglés del isotiocianato de fluoresceína
 HAT..... medio constituido por hipoxantina, aminopterina y
 timidina.
 HGFRT..... enzima hipoxantin guanin fosforribosil transferasa
 IgA..... inmunoglobulina del tipo A.
 IgG..... inmunoglobulina del tipo G.
 MDCK..... (siglas en inglés de la línea celular Madin Derby
 Canine Kidney cells
 PM..... marcadores de peso molecular.
 N-EM..... N-etilmaleimida.
 PEG..... polietilenglicol.
 P-1..... cepa Portland-1 de Giardia lamblia
 RPMI-1640..... medio para el mantenimiento en cultivo de células
 de mieloma e hibridomas.
 SSSA..... solución saturada de sulfato de amonio.
 T..... tween 20.
 TA..... temperatura ambiente.

INTRODUCCION

A partir de los descubrimientos de Van Leewenhoek en relación a los organismos microscópicos que vivían en las gotas de agua, se han ampliado los estudios referentes a las formas y el comportamiento de los protozoarios.

Los protozoarios son organismos unicelulares, que llevan a cabo funciones biológicas y fisiológicas que en los organismos superiores dependen de muchas células especializadas. A pesar de su supuesta simplicidad los protozoarios han podido invadir gran diversidad de habitats. Estos organismos contribuyen en las cadenas tróficas de las comunidades donde habitan, ya que existen formas fotosintéticas las cuales nutren al medio de compuestos orgánicos. Otros absorben alimento a través del cuerpo contribuyendo con esto a la reducción de restos de plantas y animales. Asimismo, existen algunos que se nutren de productores microscópicos o descomponedores, actuando como consumidores primarios, evitando así el aumento de estas poblaciones; algunos más se alimentan de consumidores primarios o se sitúan en un nivel más alto de la cadena trófica (1).

La mayor parte de los protozoarios son de vida libre, pero algunos de ellos son parásitos y se han adaptado a vivir dentro de sus huéspedes. Los protozoarios parásitos pueden ser tanto intracelulares como extracelulares y pueden parasitar desde una célula hasta órganos enteros y desde un insecto hasta organismos más complejos.

Giardia lamblia (Kofoid y Christiansen, 1915), es un protozoo del orden Diplomonadida (2), el cual parasita al hombre y algunos otros animales causando en ellos la enfermedad

denominada giardiasis. G. lamblia, se ha identificado en todos los climas y el mecanismo de transmisión de este organismo se considera variable dependiendo, fundamentalmente, de los hábitos de higiene de las comunidades. El mecanismo más frecuente de infección se realiza por la ingestión de agua y alimentos contaminados con quistes de este parásito. Se ha sugerido también la transmisión por contacto de persona a persona en individuos homosexuales (3,4) y por observaciones de giardiasis en guarderías (5).

El ciclo de vida de este parásito es relativamente sencillo y presenta dos estadios, el de quiste y el de trofozoíto. Este se inicia con la forma infectante de quiste, el cual después de ser ingerido por el huésped, llega al tracto digestivo y se establece en el lumen intestinal, donde se divide por mitosis para dar lugar a dos formas trofozoíticas. Posteriormente los trofozoítos recién formados se dividen mediante un complicado proceso de fisión binaria longitudinal. La multiplicación de los trofozoítos se ve influenciada por el pH intestinal, siendo más rápida cuando existe un medio alcalino, sobre todo cuando hay aclorhidría y una alimentación rica en carbohidratos (6). La localización de trofozoítos en el intestino delgado se observa en los segmentos correspondientes al duodeno y yeyuno principalmente. El ciclo finaliza con el enquistamiento de los trofozoítos y su expulsión en las heces al medio ambiente (7,8,9).

La giardiasis actualmente representa un problema de salud pública por el hecho de que G. lamblia es uno de los parásitos intestinales encontrados con más frecuencia en enfermedades diarreicas (10), así como por su amplia distribución

y su fácil propagación (11).

La incidencia de esta parasitosis intestinal se ha reportado que es del 2 al 25% de la población mundial (12). En Latinoamérica las frecuencias son cercanas al 23.1% (13) en escolares de zonas rurales. Para la República Mexicana se observan frecuencias del orden del 19% y en estudios llevados a cabo en Ciudad Nezahualcoyotl, la frecuencia encontrada fue del 21% (14).

MANIFESTACIONES CLINICAS DE LA ENFERMEDAD.

Los pacientes con giardiasis pueden experimentar síntomas severos incluyendo: diarrea, dolor abdominal, distensión abdominal, anorexia, náusea y pérdida de peso (15,16). La población infantil padece con mayor frecuencia que los adultos de enteritis aguda o crónica con síntomas digestivos variables. Estos padecimientos tienen efectos muy marcados en el desarrollo del niño. Otros de los efectos que produce la enfermedad es el síndrome de mala absorción intestinal que resulta de los daños estructurales y funcionales producidos por el parásito a nivel de intestino delgado. Estudios realizados por Anand y colaboradores (17), en donde se llevó a cabo la infección de ratones con quistes de G. lamblia obtenidos de un paciente, demuestran que existe una disminución en la tasa de transporte de nutrientes además de un decremento en los niveles enzimáticos en el epitelio intestinal. Debido a estos efectos se sugiere que existe un desarreglo en la membrana de las células epiteliales. Esto resulta en una disminución del número de sitios de transporte específicos involucrados en la translocación de varios nutrientes dentro de la célula epitelial, así como en las enzimas presentes en el epitelio intestinal.

En otros estudios llevados a cabo en ratones de la cepa CF/1 infectados con quistes de G. muris (18), en los cuales se siguió el curso de la infección, se encontró que los efectos histopatológicos más severos, localizados en las áreas del yeyuno en la última etapa de la infección, están asociados con el pico máximo de detección de trofozoítos en el intestino. Asimismo, se observó que la disminución de daños histopatológicos, tanto en grupos de ratones infectados con dosis altas de quistes como en aquellos infectados con dosis bajas fue similar. Aun cuando el mecanismo exacto por el cual se presenta la histopatología intestinal se desconoce, se sugiere que posiblemente las alteraciones observadas se deban tal vez a una toxina del parásito o bien a la respuesta del mismo huésped para contrarrestar la infección (5). Este último punto podría quedar descartado por los resultados obtenidos en los experimentos de Anand y col. en 1985 (19). Estos autores incuban cortes del intestino delgado de ratones con trofozoítos de G. lamblia y observan un daño directo sobre las células epiteliales del intestino concluyendo que este efecto no está mediado por factores como la proliferación bacteriana, desconjugación biliar y reacciones inmunológicas. En humanos ha sido posible demostrar el daño estructural del intestino mediante microscopía electrónica (20).

DIAGNOSTICO.

Los métodos usados para el diagnóstico de la giardiasis se basan principalmente en los ensayos coproparasitológicos y biopsias duodenales. Sin embargo, estos no presentan un grado de confiabilidad aceptable y se practican cuando se presenta una sintomatología franca. Por otro lado en el caso de las biopsias intestinales, estas pueden causar traumatismos importantes en los

pacientes. Asimismo, se debe tomar en cuenta que existen individuos asintomáticos, los cuales excretan pocos o ningún quiste, dando lugar a que el análisis coproparásitoscópico sea menos certero (5,15,21).

Recientemente se han desarrollado otros ensayos inmunológicos que se han aplicado en el diagnóstico de la giardiasis, entre estos se incluyen: inmunofluorescencia, radioinmunoensayo y ELISA (del inglés Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (22,8,23). Sin embargo aún no han podido ser perfectamente evaluadas.

Por todo lo anterior se puede decir que no se cuenta con un método de diagnóstico eficiente y confiable que permita evidenciar la existencia de giardiasis ya sea en pacientes o en individuos asintomáticos.

Respecto al tratamiento de la giardiasis, el uso de algunos compuestos químicos a principios de siglo han sido probados para la resolución de la enfermedad. Entre estos están tetracloruro de carbono, mercurio y bismuto. El primer compuesto efectivo contra la giardiasis fue la mecaprína y no fue sino hasta principios de los 60s cuando este compuesto dejó de utilizarse por la aparición de los derivados del imidazol. El primero de ellos y el más usado es el metronidazol. Otro fármaco usado ampliamente es la quinacrína. Sin embargo, el tratamiento con estas drogas también requiere que exista una sintomatología clara. Además su uso en grandes dosis puede traer como consecuencia efectos colaterales para quienes lo usan (24).

RESPUESTA INMUNE EN GIARDIASIS.

La infección del hombre con G. lamblia y de ratones con G. muris, es con frecuencia autolimitante (25,26). Sin embargo, en algunos individuos y en ratones inmunologicamente competentes se establece una fase crónica debido tal vez a deficiencias en los mecanismos inmunes que se activan en el intestino.

A pesar de su alta prevalencia, poco se conoce acerca de la patología de la enfermedad, de la interacción huésped-parásito y de los mecanismos de defensa involucrados en la resistencia a la infección y a subsecuentes infecciones. Observaciones epidemiológicas, clínicas y experimentales llevadas a cabo tanto en humanos como en ratones infectados, indican la existencia de una respuesta inmune del huésped en contra de Giardia sp. Dichas observaciones se refieren al hecho de que en individuos expuestos repetidamente al parásito, hay resistencia a la infección y los síntomas que presentan son menos severos que en aquellos individuos que adquieren por vez primera la infección con este organismo (5). Estas observaciones sugieren que el primer contacto del huésped con este parásito, puede conferir resistencia a la reinfección y proponen la participación de la respuesta inmune en el control de la enfermedad. Por otro lado el hecho de que individuos inmunodeficientes sean más susceptibles a la infección por este organismo proporciona evidencias sobre la importancia de la respuesta inmune-humoral en la giardiasis (27).

En ratones neonatos que se infectan experimentalmente con quistes de G. muris, se ha encontrado que desarrollan protección limitada contra la infección. Esta es pasivamente transferida por la ingestión de leche de madres inmunes y su

efecto protector esta mediado por anticuerpos del tipo IgA e IgG específicos contra G. muris, los cuales se encuentran en la leche. Sin embargo, el efecto protector de estos anticuerpos, además de ser limitado actúa solo en una fase temprana del proceso infeccioso (28).

Varios estudios realizados por Smith et al en los 80s (12,29,30), sugieren que en el hombre se desarrolla una respuesta inmune en contra de G. lamblia. En uno de estos estudios se detectaron anticuerpos circulantes del tipo IgG en un 80% de individuos con giardiasis. Dichos anticuerpos parecen estar dirigidos contra los antígenos de superficie del trofozoíto. Sin embargo, el título de anticuerpos detectados en pacientes con infecciones recurrentes es muy variable, por lo que se sugiere no jueguen un papel importante en protección.

En otro de los estudios realizados por el mismo investigador en el año de 1982, sugiere la participación de respuestas de tipo celular en humanos. En estos se ha demostrado que macrófagos obtenidos de personas normales son capaces de causar daño a trofozoítos de G. lamblia en ensayos in vitro. Este fenómeno ocurre espontáneamente y parece no involucrar linfocitos sensibilizados. Otro mecanismo que se ha propuesto y que participa en la protección contra la infección por Giardia, es la citotoxicidad dependiente de anticuerpos en la cual los granulocitos pueden presentar citotoxicidad para G. lamblia en presencia de anticuerpos dirigidos contra este parásito (31). En estos estudios se propone que la citotoxicidad espontánea mediada por células, en este caso monocitos macrófagos, puede ser el primer nivel de defensa para la eliminación del parásito. Cuando los trofozoítos vencen esta respuesta y se induce la producción

de anticuerpos anti-G. lamblia, la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos se pone en juego como un segundo nivel de defensa del huésped contra G. lamblia. Esta posibilidad es congruente con el hecho de que tanto células monocíticas como granulocitos son más numerosas en la mucosa intestinal de algunos individuos con giardiasis (19). Asimismo, se ha reportado que en el lumen intestinal de ratones infectados con G. muris, se encuentran células linfoides unidas a los trofozoítos, sugiriendo que esas pueden tener un papel efector en contra del parásito (32). Sin embargo, un mejor entendimiento de la relación huésped-parásito en esta infección implicaría la caracterización y purificación de antígenos biológicamente relevantes de Giardia.

Gracias a la facilidad de poder mantener en cultivos axénicos a los trofozoítos de G. lamblia y así poder trabajar con el parásito libre de contaminantes (33-37), se han realizado estudios acerca de varios aspectos del metabolismo de este protozoario (38-40). Esto también ha hecho posible llevar a cabo otros a fin de caracterizar antígenos de Giardia.

En un estudio realizado por Smith y colaboradores (41), se caracterizaron tanto las proteínas como el perfil antigénico de una cepa de G. lamblia (WB). Por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida, se encontró que los trofozoítos contenían 26 bandas proteicas con pesos moleculares entre 12 y 140 Kilodaltones. Por inmunoelectroforesis cruzada bidimensional, se observó que dicha cepa contenía 37 antígenos anódicos y uno neutral. Al comparar el patrón antigénico con cepas de diferentes localizaciones geográficas por inmunoelectroforesis cruzada, se encontraron varias diferencias. Con estos hallazgos los autores sugieren que dichas diferencias pueden contribuir a la

variación en la respuesta del huésped.

En otros estudios realizados por Nash y colaboradores (42), se identificaron antígenos excretados o secretados por G. lamblia. En estos mediante el uso del marcaje de la superficie con ^{125}I , se mostro que la naturaleza de estos antígenos es similar a los que se encuentran en la membrana del trofozoíto. Por otra parte, Einfeld y Stibbs en 1984, encuentran que una banda de 82,000 daltones observada en su patrón de antígenos de superficie marcada con el mismo isótopo, es precipitable usando sueros monoespecíficos (43).

Estudios como estos, pueden conducir a un mejor entendimiento de la biología del parásito así como la naturaleza de las respuestas inmunológicas del huésped.

PERSPECTIVAS DEL USO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Köhler y Milstein en 1975 (44), obtuvieron células híbridas que producían anticuerpos específicos. Esto lo lograron a partir de fusiones de células de mieloma y células linfoides productoras de anticuerpos. Estos estudios constituyeron el inicio de la tecnología de hibridomas para la producción de anticuerpos monoclonales. Estos últimos son producidos por células híbridas que poseen características de las células parentales. Por un lado, presentan un crecimiento indefinido; característica dada por la célula de mieloma y por otro producen anticuerpos monoespecíficos lo cual esta determinado por la célula linfoide.

La monoclonalidad de los anticuerpos se basa en el hecho de que cada célula B produce un solo tipo de anticuerpo,

capaz de reconocer uno solo o pocos determinantes antigénicos. De esta manera se logra una especificidad en cuanto al reconocimiento de antígenos, lo cual presenta algunas ventajas en relación al uso de sueros policlonales obtenidos de animales inmunizados.

Otro aspecto importante en la producción de anticuerpos monoclonales es la selección de una línea celular de mieloma adecuada. Dicha línea debe cumplir de inicio con la característica de ser no secretora de ningún tipo de cadena de inmunoglobulina. La tabla 1 muestra las diferentes líneas de mieloma y su producción de moléculas. Una de las líneas más usadas en la fusión con células linfoides productoras de anticuerpo es la X63-Ag8.653; el proceso para su aislamiento se muestra en la tabla 2 (45).

La selección de los híbridos después de la fusión, se hace usando el medio de HAT (medio para cultivo de células que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina), debido a que las células de mieloma han pasado por un proceso de selección primero para que usen una vía de "salvamento" en la síntesis de ácidos nucleicos mediante la adición de HAT al medio. Las células que poseen la enzima hipoxantin-guanin-fosforibosil transferasa (HGFRT) usarán la hipoxantina para convertirla a guanósil fosfato, como una vía alterna. De esta manera, una célula deficiente en la HGFRT morirá en un medio con HAT. Por último, las células HGFRT⁺ se seleccionan usando la 8-azaguanina, un análogo de guanina y que es incorporado por la HGFRT.

Así, empleando el mismo sistema de selección con HAT, cuando se usan células de mieloma HGFRT estas morirán al no

presentar la enzima que les permita incorporar la hipoxantina del medio. Los linfocitos, por su parte, morirán al no estar en un medio adecuado para su propagación. Por lo tanto, los híbridos reciben por parte de los linfocitos además de la característica de producir anticuerpos, los mecanismos para la producción de la enzima necesaria para su crecimiento (46).

A través de los años se han empleado diversos fusógenos en la hibridaciones realizadas por varios investigadores (47). Actualmente se emplea el polietilenglicol (PEG), con el cual se han logrado mayores rendimientos en cuanto a la producción de híbridos (48,49).

La utilidad de los anticuerpos monoclonales se ha reflejado en el campo de la parasitología, particularmente en la identificación de antígenos relevantes de parásitos tales como son Trichinella, Toxoplasma y Plasmodium (50,51,52).

El empleo de anticuerpos monoclonales en la caracterización y purificación de antígenos relevantes de G. lamblia constituiría una herramienta muy valiosa. Esto es, los antígenos así purificados podrían ser evaluados en el papel que juegan en la relación huésped-parásito. Lo cual traería como consecuencia, un mejor entendimiento de esta parasitosis. Otro aspecto que es importante determinar es el papel que juegan los antígenos de G. lamblia en mecanismos de protección, en la adherencia a células blanco y en la patogenicidad del parásito.

Por otro lado, el contar con antígenos purificados y caracterizados permitirá evaluar su uso en el desarrollo de métodos de inmunodiagnóstico para giardiasis. De esta manera

podría ser posible determinar con mayor confianza la presencia o ausencia de este protozooario en las enfermedades intestinales producidas por parásitos.

En el aspecto de profilaxis para contrarrestar la enfermedad causada por G. lamblia, los antígenos purificados y caracterizados podrían ser usados en ensayos de protección y con esto ver la posibilidad de evitar la infección producida por este parásito.

TABLA 1. LINEAS CELULARES DE MIELOMA USADAS EN FUSIONES CON CELULAS LINFOIDES (46).

MIELOMA	CLASE Ig	FUENTE
RATON		
X63-Ag8	Y1,k	MOFC-21 (mieloma)
NS1-Ag4/1	k, intracelular	X63
MPC11-45.6TG1.7	Y2b, k	BALB/c
X63-Ag8.653	ninguna	X63-Ag8
SP2/0-Ag14	ninguna	(X63-Ag8xBALB/c) (hibridoma)
FD	ninguna	Clona de SP2/0-Ag14
S194/5XX0.BU.1	ninguna	BALB/c
RAT		
210.RCY3.Ag1.2.3	--,k	rata Lou

TABLA 2. AISLAMIENTO DE LA LINEA DE MIELOMA HAT-SENSITIVA X63-Ag8.653 (46).

MIELOMA	CADENAS	MARCADOR	CARACTERISTICAS
MOFC-21	γ1, k	----	<u>In vivo</u> mieloma
P3	γ1, k	----	<u>In vitro</u> mieloma
P3X63-Ag8	γ1, k	HGFRT	<u>In vitro</u> línea seleccionada por resistencia a 8-azaguanina.
P3X63-Ag8.6	--, k	HGFRT	teñido con FITC* anti γ1. Las variantes negativas teñidas por Fluorescencia. 85% de clonas k ⁺ .
P3X63-Ag8.65	--, k	HGFRT	Ag8.65 se reclonó 2% de células fueron k ⁺ .
P3X63-Ag8.653	--, --	HGFRT	estable no productor, HAT-sensitivo.

* Isotiocianato de fluoresceína.

OBJETIVOS.

A fin de contribuir al entendimiento de la giardiasis se plantearon los siguientes objetivos.

1. Caracterizar el perfil protéico de los trofozoítos de G. lamblia cepa Portland-1
2. Obtener anticuerpos monoclonales en contra de antígenos de trofozoítos de G. lamblia cepa P-1.
3. Determinar la reactividad de los anticuerpos monoclonales.

METODOLOGIA.

ANIMALES.

Ratones de la cepa BALB/c de 4-6 semanas de edad y conejos Nueva Zelanda de 2 meses de edad fueron obtenidos del Bioterio del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN). Estos animales se emplearon en diversos ensayos experimentales. Los ratones fueron mantenidos en cajas de plástico con aserrín esterilizado en autoclave a 120°C por 20 minutos y se les administró alimento comercial para ratones, esterilizado por calor seco a 150°C por 20 minutos. El agua que se les dio fue acidificada (pH 2.5) y suplementada con vitaminas. Los conejos por su parte se mantuvieron en jaulas fabricadas en el CINVESTAV-IPN. El alimento administrado fue esterilizado igual que el alimento para ratones y el agua preparada con las mismas características mencionadas anteriormente.

CULTIVO DEL PARASITO G. lamblia.

Trofozoítos de G. lamblia de la cepa Portland-1 (P-1), donada por el Dr. Weinbach del National Institute of Health se crecieron axenicamente en medio TYI-S-33 (36). Las botellas de cultivo conteniendo los trofozoítos se incubaron a 37°C (ver anexo 1). Los trofozoítos crecidos bajo estas condiciones fueron cosechados cuando alcanzaron la fase logarítmica de crecimiento. La cosecha se realizó por enfriamiento de las botellas en un baño de hielo-agua por un periodo de 30 min. Las botellas se invirtieron y los trofozoítos ya despegados de las paredes se colectaron en tubos Falcon de 50 ml y se lavaron con una solución de amortiguador fosfato salino (AFS) pH 7.2. El paquete celular fue empleado para diversos fines como la inmunización de

animales, obtención de antígeno soluble y el marcaje de los componentes de superficie.

PROTOCOLO DE INMUNIZACION DE ANIMALES.

Tanto para la obtención de híbridomas como para la obtención de suero inmune, se usaron ratones de la cepa BALB/c a los cuales se les inyectó intraperitonealmente con trofozoítos a intervalos de una semana. La primera inoculación se llevó a cabo en adyuvante completo de Freund's empleándolo en una relación 1:1 (v/v) con AFS. Las dos siguientes en adyuvante incompleto. En el caso de los ratones que fueron empleados para la obtención de híbridomas, la última inoculación se llevó a cabo con trofozoítos resuspendidos en AFS y por vía intravenosa. Para ratones de los cuales se obtuvo suero inmune, la inoculación final se realizó en adyuvante incompleto. La inmunización de conejos se realizó de igual manera que para ratones.

PREPARACION DE ANTIGENOS SOLUBLES.

Las botellas conteniendo los trofozoítos en fase logarítmica de crecimiento, fueron colocadas en un baño de hielo-agua durante 30 min con la finalidad de despegar las células adheridas a las paredes de las botellas. Después de invertir varias veces las botellas el contenido se vació en tubos Falcon de 50 ml y se centrifugaron durante 10 min a 2,000 rpm a 4°C en una centrifuga con sistema de refrigeración acoplado (anexo 1). Los trofozoítos se lavaron tres veces mediante centrifugaciones con AFS pH 7.2. En la centrifugación final el paquete celular se resuspendió en 1 ml de una solución de tris-base 10 mM pH 8.13 conteniendo 25 mM de N-etil-maleimida (N-EM) y 1 mM de fluoruro de fenil-metil sulfonilo (FFMS) como inhibidores de proteasas. Después de tres sonicaciones a 12,000 micrones de 15

segundos con 30 segundos de descanso cada una en un aparato de ultrasonido, se adicionó, según el caso; triton X100 al 0.5%, DOC al 2% para solubilizar la muestra y la mezcla se sonico tres veces más en las condiciones anteriormente mencionadas. Asimismo, se obtuvieron extractos en ausencia de detergente siguiendo el mismo protocolo. El extracto sonicado se centrifugó por 30 min a 12,000 rpm y el sobrenadante se guardó hasta usarse en análisis de electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de duodecil sulfato de sodio (EGPA-DSS) y en ensayos de ELISA.

125

MARCAJE DE SUPERFICIE DE TROFOZOITOS DE G. lamblia CON I.

Los trofozoitos crecidos axénicamente se lavaron de acuerdo al protocolo mencionado anteriormente. el paquete celular obtenido se resuspendió en un volumen de 250 ul de AFS y los trofozoitos se contaron en un hemocitómetro. El marcaje de los componentes de superficie se realizó por el método de lactoperoxidasa (53), de acuerdo al siguiente protocolo: en un tubo de ensayo de 13 x 100 previamente tratado durante 24 horas con mezcla crónica, se adicionaron 0.5 mCi. de $^{125}\text{I-Na}$ (anexo 1). Con el fin de neutralizar el medio de marcaje se adicionó 1 volumen igual de AFS 2X conteniendo HCl 0.1 N. Después de esto, se adicionaron secuencialmente; 1 ul de AFS-KI 0.027 M, 100 ul de lactoperoxidasa (1mg/ml), la suspensión de trofozoitos y AFS hasta completar un volumen de 1 ml. A la mezcla se agregaron 25 ul de H_2O_2 al 0.3% por dos veces agitando durante 2.5 min después de cada adición. Esto con la finalidad de catalizar la reacción de la lactoperoxidasa. El contenido del tubo se colocó en un tubo Falcon de 15 ml y se centrifugó a 2,000 rpm durante 10 min. Para eliminar el ^{125}I libre se lavó 3 veces en una solución de AFS-KI 0.001 M mediante centrifugaciones. Posteriormente el paquete se resuspendió en 1 ml de la solución

con inhibidores de proteasas y se obtuvo el antígeno soluble por sonicación (ver sección de obtención de antígeno soluble). El tubo conteniendo el antígeno marcado se guardó a -20°C en viales de plomo hasta usarse en ensayos de EGPA-DSS, inmunoelectrotransferencia e inmunoprecipitación.

ANÁLISIS ELECTROFORETICO DE ANTIGENOS SOLUBLES.

Con el fin de caracterizar el perfil protéico de los trofozoítos de G. lamblia, los antígenos solubles (tanto el marcado como el no marcado) se procesaron para llevar a cabo electroforesis en geles de poliacrilamida de acuerdo al método de Laemli (54), en la cual se emplearon geles al 10% y primeramente la muestra se hirvió por 3 minutos con el objeto de evitar que con la adición de 2-mercaptoetanol (agente reductor) se activaran los inhibidores de proteasas y se observara degradación en las proteínas dentro del gel. Posteriormente se adicionó 2-mercaptoetanol de tal manera que quedara a una concentración final del 2% y la muestra se hirvió durante 2 min más. Las muestras se colocaron en el gel y se efectuó la electroforesis a 50 voltios durante 14-16 horas. Con la finalidad de determinar el número de componentes en la separación electroforética, se procedió a teñir los geles con el colorante para proteínas azul de Coomassie (AC). Para ello, el gel se sumergió en una solución de AC al 0.1% por una hora después de lo cual, se cambió a la solución de alto metanol (ver anexo 2) hasta que se hicieron evidentes las bandas. Por último, el alto metanol se cambió por bajo metanol hasta lograr un fondo claro en el gel. En relación al análisis de los antígenos marcados, estos fueron sometidos a electroforesis empleando un número de cuentas adecuado ($50,100$ o 200×10^3). Una vez terminado el corrimiento, el gel fue tratado para la detección de bandas por AC. Con el fin de efectuar el

análisis de las muestras, los geles fueron sometidos al siguiente tratamiento: al finalizar la tinción como se mencionó anteriormente, la solución de bajo metanol se cambió por agua bidestilada manteniendo al gel en agitación constante durante 1 hora. Posteriormente el gel se pasó a una solución de salicilato de sodio 1 M (anexo 2) durante 1/2 hora, después de lo cual se transfirió a una solución de glicerol-agua 1% y de ahí se pasó a un secador de geles (anexo 1) por un lapso de aproximadamente 1 h. La radioactividad de los componentes se detectó por exposición del gel a una placa de rayos X. Después de un tiempo adecuado de exposición, la placa se reveló de acuerdo a las indicaciones de los proveedores (anexo 1).

La determinación de el peso molecular de los componentes se determinó mediante el ajuste a una curva estándar, hecha con marcadores de peso molecular (MW) como se indica en el catálogo del proveedor (55).

CULTIVO DE CELULAS DE MIELOMA.

Las células de mieloma de la línea X63-Ag8.653 aislada por Kearney (56), fueron crecidas en medio RPMI-1640 completo (anexo 2) esterilizado por filtración. Las células se alimentaron con medio fresco cada vez que fue necesario (aproximadamente cada 4 días). Para llevar a cabo la fusión, las células se cosecharon en fase logarítmica de crecimiento y se obtuvieron números del orden de $1-2 \times 10^7$ células.

OBTENCION DE CELULAS ALIMENTADORAS.

Con el fin de crear un medio apropiado para el crecimiento de los híbridos resultantes de la fusión, se obtuvieron células de exudado peritoneal de ratones. Un día

antes de la fusión celular, 2 ratones de la cepa BALB/c fueron sacrificados por anestesia total en una cámara con éter y en condiciones de asepsia se descubrió la región peritoneal mediante un corte longitudinal de la piel. Cada ratón se inoculó intraperitonealmente 5 ml de medio RPMI-1640-incompleto, se masajearon aproximadamente durante 30 segundos después de los cuales, se extrajo el líquido acumulado con jeringas estériles y se colocó en tubos Falcon de 50 ml. Las células así obtenidas se lavaron en RPMI-incompleto a 1,000 rpm durante 10 min. El paquete celular en resuspendió en medio HAT (ver anexo 2) y 50 ul de esta suspensión se agregó a cada pozo de la placa de microtitulación. Las células obtenidas de cada dos ratones fueron suficientes para preparar 3 placas de microtitulación.

OBTENCION DE HIBRIDOMAS MEDIANTE FUSION CELULAR.

Para la obtención de híbridos productores de anticuerpos monoclonales, se inmunizaron ratones de acuerdo al protocolo descrito en la sección correspondiente. Cuatro días después de la última inmunización se llevó a cabo la fusión celular. Los ratones fueron sacrificados en una cámara de éter y los bazo de estos se extrajeron en condiciones de esterilidad. Posteriormente se preparó la suspensión celular disgregando el órgano con pinzas de punta roma en medio RPMI-incompleto. Las células se lavaron por centrifugaciones a 1,000 rpm durante 10 min. Con la finalidad de eliminar las células rojas (eritrocitos) la suspensión de células de bazo se trató con una solución de cloruro de amonio (ver anexo 2) y se dejó 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó medio incompleto y las células se lavaron por centrifugación para eliminar el cloruro de amonio. Después del lavado las células se resuspendieron en 10 ml de medio RPMI incompleto y se determinó su número y viabilidad

empleando hemocitómetro y la tinción con azul tripano (ver anexo 2) respectivamente. Por otro lado, las células de mieloma a la densidad requerida se cosecharon en un tubo falcon de 50 ml y se lavaron de la misma manera que las células linfoideas, para después resuspenderlas en 1 o mas ml de medio RPMI-incompleto y determinar el número de ellas.

La fusión celular se realizó de acuerdo a lo descrito por Fazekas y Scheidegger (57). En esta, tanto las células de bazo como las células de mieloma lavadas y contadas se colocaron en un tubo Falcon de 50 ml. Ambas poblaciones celulares se mezclaron en una proporción de 1:1 y se centrifugaron. Después de remover todo el líquido, se adicionó gota a gota al paquete celular, 1 ml de la solución fusionante de PEG, agitando constantemente durante 1 y 1/2 min. Posteriormente, el PEG se diluyó agregando 1,3 y 16 ml de medio RPMI-incompleto agitando en un periodo de 30 seg para cada volumen añadido. La suspensión celular se dejó reposar 5 min y después se centrifugó 10 min a 1,000 rpm. El paquete celular se resuspendió en 15 ml de medio de HAT y se alicuoteó en volúmenes de 50 ul por cada pozo de la placa de microtitulación. Los pozos fueron alimentados a los días 5 y 8 después de la fusión con medio de HAT y al día 12 con medio HT el cual, después de 2 cambios se sustituyó por medio RPMI-completo. Las cajas conteniendo las células se mantuvieron a 37° en una atmósfera de 5.2% de CO₂ en una incubadora con temperatura y humedad regulada.

SELECCION, CLONACION Y EXPANSION DE HIBRIDOS.

Después de la fusión celular, se colectó el sobrenadante de los pozos que presentaron crecimiento celular y este se reemplazó por medio nuevo. Con las muestras colectadas

se llevó a cabo el ensayo de ELISA para determinar la presencia de anticuerpos.

Los híbridos cuyos sobrenadantes resultaron positivos se eligieron para ser clonados. En algunos casos la clonación de híbridos se llevó a cabo directamente en la placa de 96 pozos y en otros antes de clonarlas se transfirieron a las placas de 24 pozos. En ambos casos se determinó la producción de anticuerpos antes de llevar a cabo la clonación. Esta última se realizó por dilución limitante (58). Para ello, se contó el total de células de los pozos seleccionados y se tomó el número necesario para que en cada pozo de una placa de microtitulación se colocara 1/2 célula. Las células así clonadas se alimentaron después de una semana con medio RPMI-1640 y una vez que crecieron a confluencia se determinó la producción de anticuerpo y se expandieron, tanto in vitro por cultivo de tejidos como in vivo por la inoculación de células en ratones.

Es importante que una vez que se pruebe la producción de anticuerpos en las células híbridas, estas sean congeladas para su conservación. El no hacerlo acarrearía problemas como son la pérdida de producción de anticuerpos debido a la recombinación genética (59). Asimismo se evitaría la proliferación de híbridos no productores. La misma razón existe para la congelación de las clonas obtenidas de los parentales y que producen anticuerpos específicos contra Giardia lamblia. Para esto se llevó a cabo el siguiente protocolo: cuando las células alcanzaron un crecimiento adecuado fueron despegadas por pipeteo suave sobre las paredes de los recipientes de cultivo y la suspensión fue centrifugada a 1,000 rpm durante 10 minutos. El paquete celular se resuspendió en 1 ml de medio RPMI-completo y se adicionó 0.1 ml de dimetil

sulfóxido (DMSO). La mezcla se paso a un vial para criocultivo de células (siempre manteniendolo en hielo) y se guardó a -70°C por 24 h, posteriormente se transfirió a nitrógeno líquido.

Las clonas productoras de anticuerpo específico contra G. lamblia seleccionadas por ELISA fueron expandidas in vitro en cajas de pétri. Una vez que se comprobó que seguían produciendo anticuerpos se expandieron in vivo mediante la inoculación de estas en ratones BALB/c, los cuales fueron inyectados días antes con 0.5 ml de pristina. Cada ratón fue inoculado con 1×10^6 células híbridas resuspendidas en RPMI-incompleto. El crecimiento de las células híbridas en los ratones da lugar a la formación de tumores de tipo ascítico. Una vez que se desarrollan estos, el líquido producido que contiene los anticuerpos fue colectado por punción de la cavidad peritoneal con una aguja estéril. La colecta de líquido de cada ratón se realizó varias veces de manera que se obtuvo la mayor cantidad posible de este.

PURIFICACION DE ANTICUERPOS A PARTIR DE LIQUIDO ASCITICO.

El líquido obtenido de los ratones inoculados con las clonas productoras de anticuerpos fue procesado para la obtención de inmunoglobulinas mediante la precipitación de estas con una solución saturada de sulfato de amonio (SSSA) (60). Para ello se utilizó el siguiente protocolo: 1 volumen de líquido ascítico se mezcló con 2 volúmenes de AFS en hielo, a esta mezcla se agregaron volúmenes de SSSA (anexo 2) gota a gota y en agitación constante. Después de una hora en frío, se colectó el precipitado por centrifugación a 12,000 rpm por 15 min el sobrenadante se descartó y la pastilla se disolvió en 3 volúmenes de AFS. Posteriormente se agregaron 3 volúmenes de SSSA en las condiciones antes mencionadas y se siguió el mismo proceso (3X en

total). la pastilla final se resuspendió en un volumen de 0.5 a 1 ml de AFS y se dializó extensivamente contra AFS. El contenido del tubo de diálisis se colectó en viales y se guardó a -20°C . La determinación de proteína se hizo por el método de Lowry (61).

ENSAYO DE ELISA.

La determinación de la producción de anticuerpos en las células híbridas después de una fusión celular requiere de técnicas muy sensibles pues el título de anticuerpos en pozos de placas de microtitulación suele ser bajo. La técnica de ELISA es un método que permite detectar nanogramos de anticuerpo en una solución (62), de ahí que esta haya sido elegida para la búsqueda de híbridos productores de anticuerpos. El protocolo seguido para el desarrollo de este ensayo fue el siguiente: en placas de microtitulación para ELISA (anexo 1), se colocaron 200 μl por pozo de antígenos solubles del parásito G. lamblia (ver sección de preparación de antígenos solubles) a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en amortiguador de carbonatos pH 9.6 (anexo 2). Los pozos después de incubarse por 4 h a temperatura ambiente (TA) fueron bloqueados con AFS conteniendo 0.5% de albúmina sérica bovina y 0.5% de tween 20 (AFS/ASB/T) durante 30 min a TA. Enseguida se efectuaron 3 lavados de 3 minutos cada uno con AFS/T y se agregó a cada pozo de 50-100 μl de sobrenadantes de cultivo, obtenidos de los híbridos que crecieron. Como controles positivos se emplearon suero inmune anti-G. lamblia y el suero obtenido de los ratones usados en la fusión celular ambos a una dilución de 1:100. Como control negativo se usó suero de ratones normales diluido 1:250. Las diluciones de ambos controles se hicieron en AFS/ASB/T. Las placas se incubaron a 37°C durante 1 h. Después de lavar como se menciona anteriormente se adicionaron 100 μl de un segundo anticuerpo dirigido contra

inmunoglobulinas de ratón diluido 1:3000 en AFS/ASB/T y las placas se mantuvieron a TA por 3 horas más y posteriormente se lavaron como antes. Después de esto se agregaron 200 ul de la solución de sustrato de orto-Fenilendiamina. En ocasiones la reacción se paró colocando en cada pozo 50 ul de una solución de H₂SO₄ 2.5 N.

2 4

La lectura de los pozos fue cualitativa, pues el interés real era conocer cuales de las células producía suficiente cantidad de anticuerpos anti-G. lamblia y esto fue detectado por simple observación.

DETERMINACION DE LA REACTIVIDAD DE ANTICUERPOS MONOCLONALES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

Con el fin de conocer la reactividad de los anticuerpos monoclonales sobre los trofozoítos vivos de G. lamblia se realizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta (63).

Las cajas de cultivo conteniendo trofozoítos crecidos axenicamente se pusieron por 30 min en un baño de hielo-agua y se invirtieron varias veces. Luego de asegurarse que los trofozoítos se han despegado de las paredes de la caja, se efectuaron 3 lavados en AFS como para la extracción de antígeno. Después de contar las células se colocaron 8,000 trofozoítos suspendidos en 100 ul de AFS en tubos eppendorf cuyo número dependió de las muestras a probar. A cada tubo se agregó 100 ul de sobrenadante de cultivo y se incubaron a 4°C durante 1 h. Como controles positivos se usaron sueros inmunes como se señala en la parte de ELISA y como control negativo medio RPMI-completo. Las diluciones de los controles se hicieron en AFS. Después de un lavado por centrifugación a 2,000 rpm con AFS se adicionó el

conjugado FITC-cabra anti-inmunoglobulina de ratón diluido 1:100 en AFS/ASB 0.1% y se incubaron a 4°C por 20 minutos. Posteriormente se lavaron con AFS/ASB 0.1% como antes y se hicieron las preparaciones sobre portaobjetos sellando el cubreobjetos con barniz transparente. Las preparaciones se observaron en un microscopio de fluorescencia.

Cuando se usaron en este ensayo anticuerpos precipitados con Sulfato de Amonio, las diluciones a las cuales se utilizaron fueron 1:100.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

Con la finalidad de caracterizar aquellos antígenos que son reconocidos por los anticuerpos monoclonales, los antígenos solubles de Giardia se separaron por electroforesis como se menciona anteriormente. Las proteínas separadas en el gel fueron transferidas a papel de nitrocelulosa de acuerdo al método de Towbin (64). Después de la corrida el gel se equilibró en el amortiguador de transferencia (ver anexo 2) durante 1 hora con un cambio a la media hora. Posteriormente en el mismo baño se colocaron, el papel de nitrocelulosa frente al gel y 2 hojas de papel filtro una a cada lado, así como fibra scotch. Con esto se formó un "sandwich" (ver figura 1) y se procedió a llevar a cabo la transferencia. Esta última se realizó por 4 horas a 75 voltios empleando una fuente de poder de alto amperaje (ver anexo 1). Cuidando que el papel de nitrocelulosa quedara orientado hacia el polo positivo la transferencia se realizó a 4°C. Una vez terminada la transferencia se cortó una tira del papel de nitrocelulosa y se tiñó con tinta india (anexo 1) con el fin de asegurarse que las proteínas se transfirieron correctamente. El proceso de tinción fue este: La tira de nitrocelulosa se lavó 2

veces en AFS/T 0.3% por 10 min cada vez. Posteriormente se le adicionó tinta india diluida 1:1,000 en la solución de lavado y se mantuvo siempre en agitación constante durante 1 h. Por último para quitar el exceso de tinta, la tira fue colocada en agua bidestilada hasta que quedó lo más clara posible.

El resto del papel de nitrocelulosa transferido se sumergió toda la noche a TA en una solución conteniendo 3% de ASB y 0.2% de gelatina en AFS (AFS/ASB/GEL). Esto con el fin de bloquear los sitios del papel donde no se transfirió ninguna banda de proteína del gel. Una vez bloqueado el papel se cortó en tiras de 5 mm y posteriormente las tiras se incubaron con el sobrenadante de los híbridos que contenían anticuerpos monoclonales, así como con sueros inmunes de ratón y de conejo anti-G. lamblia. El sobrenadante se utilizó tal cual, mientras que de los sueros se hizo una dilución 1:100 y esta última se realizó en la solución bloqueadora cada tira de papel se incubó con 1 ml. Enseguida que las tiras se incubaron 2 h a TA con los anticuerpos, fueron lavadas 3 veces en una solución de AFS/T 0.05% de 10 min c/u y en agitación constante. Después del último lavado, el papel se incubó 2 h a TA con una dilución 1:2,000 de un conjugado de cabra anti-Ig de ratón o de conejo (según el caso) acoplado con la enzima peroxidasa. Finalmente enseguida de que las tiras se lavaron 3 veces por 10 min c/u se adicionó la solución de sustrato 4-cloro-i-naftol (ver anexo 2). La reacción de los anticuerpos se detectó por la aparición de bandas en el papel de nitrocelulosa después de añadir el sustrato.

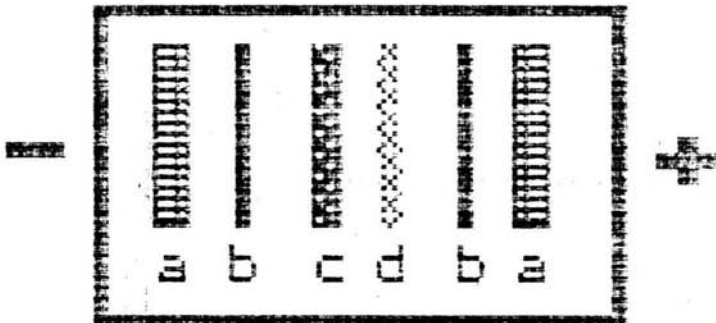
125

INMUNOPRECIPITACION DE ANTIGENO DE G. lamblia MARCADO CON 1.

Los trofozoítos de G. lamblia fueron marcados con 125I por el método de lactoperoxidasa (53), y a partir de ellos se

obtuvo antígeno soluble. Dicho antígeno fue usado en el ensayo de inmunoprecipitación utilizando sueros inmunes, tanto de conejo como de ratón. En este mismo ensayo al igual que estos sueros se usaron los anticuerpos producidos por las clonas seleccionadas con anterioridad. El protocolo para la inmunoprecipitación indirecta de componentes marcados es el reportado por Midgley y Hepburn (65) y se llevó a cabo de la siguiente manera: en primer lugar se colocaron 200×10^3 cpm por cada tubo de 12 X 100 (anexo 1) usado para cada suero problema. Después de colocar las diluciones del suero o los sueros se incubaron toda la noche a 4°C . Enseguida a cada tubo se agregaron 50 μl de un antisuero anti-ratón o anti-conejo (según el caso) y se incubaron por 4 h más a 4°C . En cada tubo se usó suero normal a una dilución de 1:100 como acarreador de complejos inmunes. Finalmente el precipitado resultante se lavó dos veces a 3,500 rpm y la pastilla final se analizó por EGPA-DSS. Los componentes inmunoprecipitados por los sueros se detectaron por la autorradiografía del gel (como se menciona en la parte de marcaje de superficie) (las soluciones para las diluciones de cada uno de los reactantes se mencionan en el anexo 2).

FIGURA 1. DIAGRAMA DEL DISPOSITIVO USADO EN LA TRANSFERENCIA ELECTROFORETICA DE PROTEINAS.



- a) FIBRA SCOTCH
- b) PAPEL WHATMAN No. 3
- c) GEL DE POLIACRILAMIDA
- d) PAPEL DE NITROCELULOSA

RESULTADOS.

CULTIVO DE TROFOZOITOS.

Los trofozoítos de G. lamblia, fueron crecidos axenicamente en medio TYI-S-33. Una vez que llegaron a la fase logarítmica de crecimiento, se cosecharon y lavaron en AFS. La viabilidad de los parásitos se determinó por el método de exclusión con azul tripano. Cuando se contaron las células se observó cerca del 95% de viabilidad en el contenido de una botella de cultivo. El rendimiento por recipiente fue de aproximadamente 50 millones de células.

OBTENCION DE ANTIGENO SOLUBLE.

Para la obtención de antígeno soluble de G. lamblia, los trofozoítos se cosecharon en fase logarítmica de crecimiento y se lavaron en AFS. Posteriormente se resuspendieron en una solución de tris-base con inhibidores de proteasas y se sonicaron ya sea en presencia y ausencia de detergentes. La concentración proteica a partir de 50×10^6 células fue de aproximadamente 3-4 mg/ml para el antígeno preparado con triton x100 al 0.5%, 2.5-3 mg/ml para el extracto preparado con deoxicolato de sodio al 2% y 1.9 aproximadamente para el extracto preparado sin usar detergentes.

125

MARCAJE DE SUPERFICIE DE TROFOZOITOS DE G. lamblia CON 125 I.

Las células de G. lamblia fueron sometidas a marcaje con 125 I (ver parte de metodología). Al término de la extracción de antígeno marcado, se tomó una alícuota de 5 μ l y se midió la incorporación radiactiva en un contador de emisiones gamma. Generalmente se obtuvieron de 200 a 300×10^3 cpm en el volumen de muestra analizado. Los antígenos marcados fueron analizados

por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de duodecil sulfato de sodio (EGPA-DSS).

ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE ANTIGENOS SOLUBLES DE G. lamblia.

Con el fin de conocer la complejidad proteica de los trofozoítos de G. lamblia, así como el perfil de los antígenos de superficie marcados con 125I, los extractos sonicados fueron procesados por electroforesis en geles de poliacrilamida (EGPA-DSS). El perfil electroforético de los antígenos solubles del parásito mostró una gran complejidad de bandas (fig. 2). La tinción del gel con azul de Coomassie reveló la presencia de 48 bandas en un rango de pesos moleculares comprendidos entre 16 y 147 K. Fue notorio que entre algunas bandas existen diferencias en cuanto a la intensidad de tinción esto puede indicar que no todas las bandas se encuentran en la misma cantidad como constituyente del trofozoíto.

En la figura 3 se muestra el análisis electroforético de los diferentes extractos sonicados de trofozoítos de G. lamblia. El extracto obtenido con triton muestra 2 diferencias claras en comparación con los extractos obtenidos ya sea con deoxicolato de sodio y el obtenido sin usar detergente. La primera es la presencia una banda cercana a los 56 K y la segunda son tres bandas muy juntas que migran aproximadamente entre 69 y 75 K (ambas diferencias señaladas con flechas). Cabe mencionar que no se encontraron diferencias marcadas en y entre los perfiles proteicos cuando se uso 2-mercaptoetanol como agente reductor. Los patrones electroforéticos de los diferentes extractos fueron reproducibles cuando se ensayaron con las condiciones mencionadas en la parte de material y métodos.

Con la finalidad de identificar los componentes de superficie de trofozoítos de G. lamblia que fueron accesibles al marcaje con ^{125}I , el extracto celular obtenido se sometió a un análisis electroforético. La figura 4 muestra los resultados de la autorradiografía de los diferentes extractos. El número de cuentas utilizadas por carril para este análisis fueron 200×10^4 . El patrón del extracto obtenido con triton X100 se caracterizó por presentar aproximadamente 10 bandas identificables con pesos moleculares de 16 a 131 K. Este patrón fue reproducible y un aspecto importante fue la detección de una banda mayoritaria de aproximadamente 80 K. A diferencia del patrón de bandas obtenido con el extracto antigénico solubilizado con triton, los mostrados en los extractos con deoxicolato de sodio se caracterizaron por presentar un menor número de bandas de alto peso molecular principalmente. En estos extractos la banda mayoritaria analizada en condiciones no reductoras tiene un peso molecular aproximado de 114 K. En todos los casos en que se comparó el perfil electroforético de cada uno de los extractos en presencia y en ausencia de 2-mercaptoetanol la migración y cantidad de bandas fue diferente. Respecto a esto se observó que en presencia del agente reductor el número de bandas era menor en ausencia de este. Por otro lado la banda mayoritaria de los diferentes extractos en los análisis en condiciones reductoras tuvo una migración diferente lo que sugiere que el agente reductor afecta de alguna manera las características de migración de los componentes de los diferentes extractos de G. lamblia.

INMUNIZACION DE ANIMALES.

Con la finalidad de preparar los anticuerpos monoclonales, se procedió inicialmente a la inmunización de ratones con trofozoítos de G. lamblia durante 4 semanas y se

obtuvo, tanto suero inmune como células linfoides que posteriormente fueron usadas en la fusión celular para la obtención de hibridomas. Los sueros obtenidos fueron analizados en cuanto a la presencia de anticuerpos anti-G. lamblia empleando la técnica de ELISA (ver sección de metodología). Los ensayos fueron realizados empleando diferentes diluciones de suero inmune (1:50-1:500). De acuerdo a la intensidad de la reacción obtenida en el ensayo de ELISA se determinó usar la dilución de 1:100 como estándar para el control de suero inmune en ensayos subsiguientes. La titulación de los sueros inmunes de ratón en la técnica de ELISA demostró que con este protocolo de inmunización se obtuvo un buen título producción de anticuerpos en los animales empleados.

CRECIMIENTO DE LAS CELULAS DE MIELOMA.

Las células empleadas en la obtención de anticuerpos monoclonales fueron de la línea X63-Ag8.653, las cuales se crecieron a confluencia en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino. Estas fueron cosechadas en fase logarítmica de crecimiento. El rendimiento por botella de cultivo fue de aproximadamente de 3×10^6 células. La viabilidad de estas determinada por el método de exclusión con azul tripano fue aproximadamente de 85%.

OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.

La fusión celular para la obtención de anticuerpos monoclonales se llevó a cabo utilizando 10 células linfoides y un número igual de células de mieloma. El número total de pozos con crecimiento de híbridos obtenidos fue de 61. Los resultados de esta fusión se resumen en la tabla 3, en donde se muestra que la eficiencia de fusión fue del 21.5%, y el 28 % de híbridos

mostró reacción positiva en el análisis por la técnica de ELISA. De estos se seleccionaron aquellos híbridos que presentaron mayor reactividad en los ensayos de ELISA, así como por los patrones obtenidos en ensayos de inmunofluorescencia indirecta.

CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.

El número de híbridos que resultaron positivos por ELISA fue de 17 y de estos se seleccionaron 10, los cuales fueron clonados. Los resultados de la clonación se encuentran resumidos en la tabla 4, en donde se muestra que la eficiencia de clonación así como la positividad en ensayos de ELISA para cada híbrido es variable. De las células clonadas se seleccionaron cuatro y los resultados de su caracterización se resumen en la tabla 5. En esta se señala que los anticuerpos monoclonales fueron de los isotipos IgG1 (2D7D10), IgG2a (3F4C5) e IgG2b (1F10D8 y 3F11G3). Las clonas además de ser positivas por la técnica de ELISA, presentaron reactividad cuando se realizó con ellos el ensayo de inmunofluorescencia. En este último se usaron trofozoítos vivos, los cuales se procesaron como se menciona en la parte de metodología. La reactividad de los anticuerpos monoclonales se localizó en la superficie del trofozoíto, así se observa que la clona 1F10D8 tiñe principalmente la porción donde se encuentra el disco adherente del trofozoíto. La clona 2D7D10 reconoce una línea ventral a lo largo del trofozoíto. Dicha línea termina cerca del cuerpo mediano, el cual también es reconocido (figura 5b). La tinción obtenida con la clona 3F4C5, se observa en lo que podría ser el cuerpo mediano (fig. 5c). La fluorescencia que se obtuvo con la clona 3F11G3 se localiza en toda la superficie del trofozoíto en forma de parches (fig. 5d). Por último en la figura 5e se muestra el patrón de fluorescencia de los trofozoítos cuando se uso suero inmune. En este el

reconocimiento se localiza en todo el organismo.

PURIFICACION DE ANTICUERPOS A PARTIR DE LIQUIDO ASCITICO.

Las clonas seleccionadas despues de cultivarse in vitro en cajas de cultivo fueron probadas en el ensayo de ELISA para asegurarse que aun mantenían su producción de inmunoglobulinas y postteriormente se expandieron in vivo mediante la inoculación de ratones de la cepa BALB/c con 10^6 células por ratón. Los resultados de obtención de anticuerpo monoclonal a partir de líquido ascítico se reportan en la tabla 6. En esta tabla se muestra que la cantidad de proteína varía en un rango de 1 a 2.8 mg de proteína por ml de ascítis.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

Con la finalidad de conocer que componentes proteicos eran reconocidos por los anticuerpos monoclonales se llevó a cabo la transferencia de proteínas de G. lamblia a papel de nitrocelulosa. El papel con las proteínas transferidas se puso a reaccionar con los diferentes anticuerpos y sueros disponibles para esta técnica.

La figura 6a muestra el patrón de proteínas transferidas al papel de nitrocelulasa, el cual fue teñido con tinta india. Los componentes detectados fueron practicamente similares en cuanto a numero y PM a los obtenidos en el análisis electroforético. Las figuras 6a y 6b muestran la reacción del papel de nitrocelulosa con los sueros de ratón y de conejo respectivamente.

Con el suero de ratón se observó la tinción de varias bandas comprendidas en un rango de 22 y 128 K. Principalmente

existieron 9 zonas de reconocimiento muy marcado con los siguientes pesos moleculares 31-34, 38-44, 47, 68, 82 y 115-123 K y otras zonas con menor grado de tinción. En contraste con el suero inmune de conejo se logró un mayor número de bandas proteicas teñidas por encima de 40 K. No sucedió así con bandas de peso molecular más bajo de este las cuales no se tñieron claramente.

Cuando se hicieron reaccionar los anticuerpos monoclonales con el papel de nitrocelulosa, las tiras revelaron la presencia de varias bandas muy tenues. Esta serie de bandas se encontraban entre 20 y 140 K. Sin embargo, el control de medio presentó reacción con algunas de las bandas, por lo que este reconocimiento pudo haber sido en cierto modo inespecífico.

INMUNOPRECIPITACION DE ANTIGENOS MARCADOS DE G. lamblia.

El antígeno de G. lamblia marcado con ^{125}I fue usado en ensayos de inmunoprecipitación siguiendo el protocolo mencionado en la parte de metodología.

La fig. 7 muestra la inmunoprecipitación de los diferentes extractos de antígeno marcado usando suero de conejo anti-G. lamblia. El patrón electroforético de los antígenos extraídos con triton x100, se caracterizó por presentar dos bandas de gran intensidad. Una cercana a los 113 K y otra de aproximadamente de 80 K. Con respecto al reconocimiento de el suero inmune en el extracto solubilizado con deoxicolato se logró obtener una banda muy tenue que migra aproximadamente a 105 K. Asimismo los resultados obtenidos cuando se precipitó el antígeno en ausencia de solubilizadores fueron muy similares a los precipitados en el extracto obtenido con DOC.

En este ensayo los resultados de precipitación obtenidos usando anticuerpos monoclonales no fueron lo suficientemente claros, por lo cual no fue posible analizarlos adecuadamente.

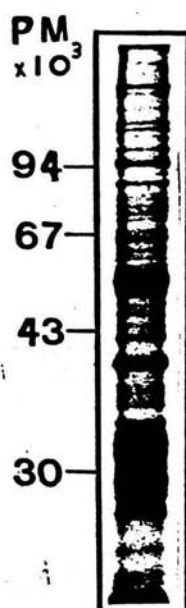


FIGURA 2. Análisis electroforético del extracto de trofozoítos de G. lamblia obtenido por sonicación y solubilización con triton X100. La tinción de las fracciones obtenidas se llevó a cabo con azul de Coomassie.

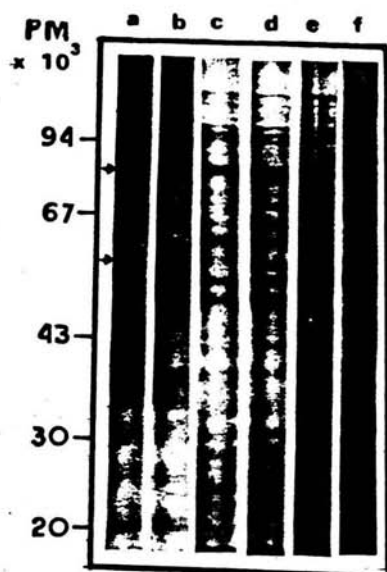


FIGURA 3. Análisis electroforético de los diferentes extractos solubles de trofozoítos de *G. lamblia* extraídos en diferentes condiciones. a) extracto obtenido con triton X100 0.5% c) antígeno solubilizado con deoxicolato de sodio al 2% e) antígeno obtenido en ausencia de detergentes; en condiciones reductoras, b) igual a a); d) igual a c) y f) igual a e) pero sin agentes reductores.

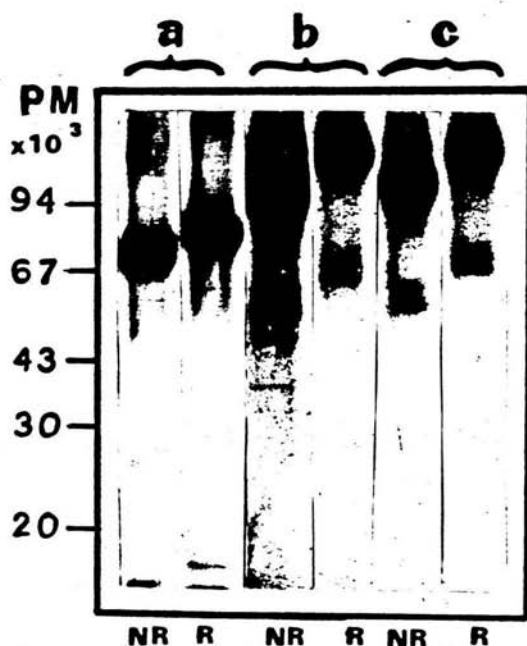


FIGURA 4. Autorradiografía del análisis electroforético de los componentes proteicos de G. lamblia susceptibles al marcaje con ^{125}I . Usando como agentes solubilizantes: a) triton X100 0.05%; b) deoxicolato de sodio 2% y c) en ausencia de detergentes. R significa en condiciones reductoras y NR en condiciones no reductoras. La radiactividad usada por carril fue de 200,00 cpm.

TABLA 3. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA Giardia lamblia.

INMUNIZACIÓN	% DE HÍBRIDOS	% DE HÍBRIDOS POSITIVOS POR ELISA
Ratones BALB/c inmunizados 4 veces con 500,000 trofozoítos de <u>G. lamblia</u> a intervalos de 1 semana	21.5	28.0

Obtención de anticuerpos monoclonales contra G. lamblia. Células de bazo de ratón obtenidas después de inmunizar a los animales con trofozoítos de G. lamblia fueron fusionadas con células de mieloma X63.Ag8.653. La producción de anticuerpos monoclonales fue determinada por el ensayo de ELISA.

El porcentaje de híbridos se obtuvo dividiendo el número de pozos con crecimiento celular (62) entre el número total de pozos con que se inició el experimento (288) X 100.

El porcentaje de híbridos positivos por ELISA se obtuvo por la división de pozos con crecimiento celular y que mostraron mayor reactividad en el ensayo de ELISA (18) entre el total de pozos utilizados (62) X 100.

TABLA 4. CLONACION DE HIBRIDOS PRODUCTORES DE ANTICUERPOS ANTI-B. lamblia.

HIBRIDO	% CLONAS	% POSITIVAS POR ELISA
1C9	6.5	0.0
1F9	2.0	1.0
1F10	6.5	6.5
1G10	16.6	10.4
2A4	6.5	2.0
2C6	2.0	2.0
2D7	2.0	2.0
2G3	25.0	0.0
3F4	6.5	6.5
3F11	16.6	10.4

La clonación de híbridos productores de anticuerpos monoclonales se llevó a cabo por dilución limitante. El porcentaje de clonas de los mismos, se calculó; dividiendo el número total de clonas obtenidas entre el total de pozos usados X 100. La positividad de estas clonas se determinó dividiendo el número de clonas positivas entre el total de clonas obtenidas X 100.

TABLA 5. CARACTERISTICAS DE CLONAS PRODUCTORAS DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA G. lamblia.

CLONA	ISOTIPO DE Ig	ELISA	FLUORESCENCIA
1F1008	IgG2b	2+	+
2D7D10	IgG1	+	+
3F4C5	IgG2a	+	+
3F1163	IgG2b	2+	+

Los sobrenadantes de las clonas seleccionadas fueron analizados en cuanto a su isotipo por ensayos de ELISA empleando anticuerpos monoespecíficos en contra de las diferentes inmunoglobulinas de ratón. Los valores reportados para el ensayo de ELISA fueron determinados por cruces (+) de acuerdo a la intensidad de la reacción obtenida en este ensayo. La reactividad de los anticuerpos monoclonales en ensayos de inmunofluorescencia indirecta se reportaron con cruces cuando resultaron positivos.

TABLA 6. PURIFICACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES A PARTIR DE LIQUIDO ASCITICO.

CLONA	VOLUMEN TOTAL DE LIQUIDO ASCITICO	CONCENTRACION DE PROTEINA POR ml DE ASCITIS
1F1008	3 ml	1.026 mg
2D7D10	9 ml	2.814 mg
3F405	9 ml	2.074 mg
3F1163	6 ml	2.544 mg

Células de las cuatro clonas seleccionadas fueron inoculadas en ratones BALB/c. El líquido ascítico obtenido de estos se precipitó usando sulfato de amonio.

La concentración de proteína por mililitro se obtuvo realizando la división de la cantidad total de proteína al final de la precipitación entre el total de mililitros de ascitis precipitados.

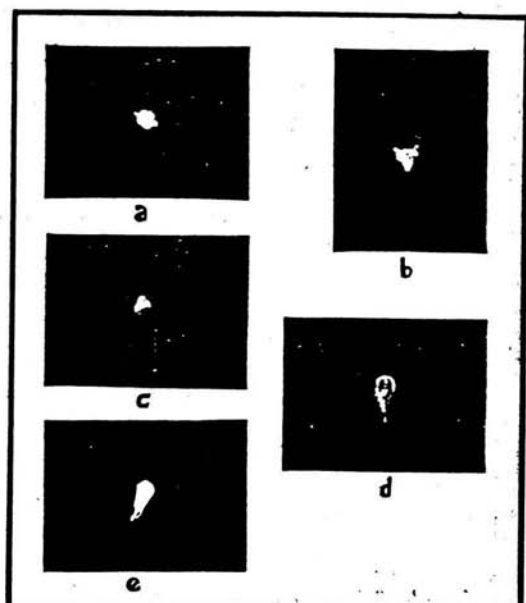


FIGURA 5. Patrones de reactividad obtenidos en ensayos de inmunofluorescencia indirecta con trofozoítos vivos de *G. lamblia* incubados con diferentes anticuerpos monoclonales a) 1F1008; b) 2D7D10; c) 3F4C5; d) 3F1163 y e) suero inmune de ratón. Las muestras fueron observadas en un microscopio de fluorescencia. X400.

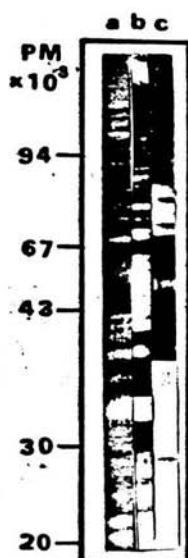


FIGURA 6. Reactividad de sueros inmunes anti-*G. lamblia* por la técnica de inmunolectrotransferencia. a) papel de nitrocelulosa teñido con tinta india después de la transferencia electroforética de proteínas; b) suero inmune de ratón dilución 1:100; c) suero inmune de conejo dilución 1:250.

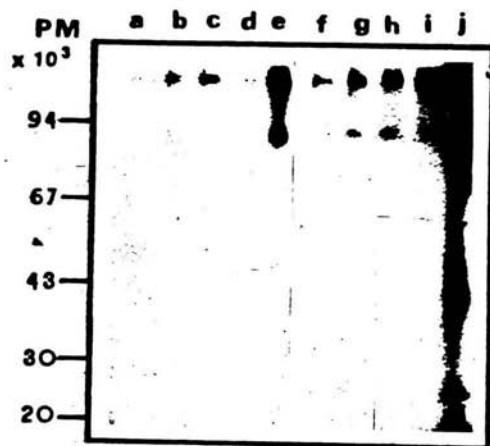


FIGURA 7. Autorradiografía de la inmunoprecipitación de antígenos de G. lamblia marcados con ^{125}I , usando suero inmune de conejo. El análisis de precipitados se realizó por EGPA-DSS. a-e) componentes solubilizados con DOC 2% y precipitados con a) suero normal de conejo; b-d) suero inmune de conejo 2,4 y 6 ul respectivamente; e) extracto reducido. Los siguientes paneles (f-j) son los patrones obtenidos con el antígeno solubilizado con tritón X100 y los cuales fueron precipitados con f) suero de conejo; g-i) 2,4 y 6 ul de suero inmune de conejo; j) extracto en condiciones reductoras.

DISCUSION.

Desde los inicios de este siglo se ha intentado mantener trofozoítos de G. lamblia en cultivo in vitro (6). Este organismo se logró cultivar en forma monoxénica por primera vez en 1960. Estos cultivos se establecieron a partir de aislados obtenidos del hombre (66). Posteriormente se han logrado desarrollar cultivos axénicos (33-37), los cuales han servido para llevar a cabo estudios acerca de este parásito, el cual se puede obtener libre de contaminantes. En el presente trabajo se llevó a cabo el mantenimiento de trofozoítos de G. lamblia de la cepa Portland-1 usando el medio de cultivo TY1-S-33 inicialmente descrito por Diamond (67) y modificado por Keister (37). Los cultivos de G. lamblia constituyeron un material idóneo para llevar a cabo la caracterización de antígenos de este parásito.

El aislamiento y la caracterización de antígenos relevantes de organismos parásitos ha sido de gran importancia en el campo de la parasitología clínica. El contar con antígenos puros de estos organismos ha permitido llevar a cabo estudios acerca de la biología de los parásitos, así como el papel que juegan estos componentes en la relación huésped-parásito.

Con la finalidad de caracterizar antígenicamente los componentes proteicos de G. lamblia se siguieron tres estrategias. Por un lado se procedió a la obtención de extractos solubles del parásito empleando para ello detergentes como agentes solubilizantes. Otra forma de abordar este estudio fue mediante el empleo de técnicas de radionaraje de superficie con ¹²⁵I y finalmente se prepararon anticuerpos monoclonales en contra de antígenos del parásito.

El uso de detergentes en la obtención de antígenos solubles ha sido bien documentado (68,69). La utilidad que tienen estos compuestos es disolver los complejos lipoprotéicos principalmente, logrando con esto solubilizar componentes de las membranas de organismos que pueden ser caracterizados por análisis electroforéticos. La solubilización de estos puede variar dependiendo del detergente que se emplee. En el presente trabajo al utilizar dos agentes solubilizantes en la extracción de antígenos de G. lamblia, se observaron diferencias en cuanto a la cantidad de proteína total obtenida. En el caso de triton X100 se obtuvieron 3-4 mg de proteína por ml, mientras que cuando se uso DCC el rendimiento fue menor, aproximadamente 2.5-3 mg de proteína por ml. Estos resultados se obtuvieron en varios experimentos, en los cuales se utilizó el mismo número de células solubilizadas con los detergentes mencionados.

El análisis electroforético entre extractos antigénicos demostró que la solubilización de proteínas de G. lamblia se efectúa de manera similar en relación al número de ellas, pero existen diferencias en cuanto a la intensidad de tinción con el colorante azul de Coomassie. Así, cuando se empleó triton X100 se observaron 3 bandas que migran entre 69 y 75 K y otra alrededor de 56 K, las cuales parecen estar en mayor proporción en estos extractos que en los solubilizados con DCC. Estos resultados sugieren que los detergentes empleados parecen actuar de manera diferente en solubilizar componentes de G. lamblia.

En general el patrón de bandas observado con los dos detergentes usados se caracterizó por presentar similar número de bandas (48 en total). Los pesos moleculares entre los que quedaron comprendidos estos componentes fue de 16 a 147 K. En un

estudio llevado a cabo por Smith y col. (30), se caracterizaron las proteínas de Giardia de diferentes localizaciones geográficas. En los análisis electroforéticos realizados por estos autores se usaron extractos de trofozoítos de la cepa P-1 obtenidos por ciclos de congelación-descongelación, encontrándose 26 componentes entre 12 y 140 K. En otros estudios realizados por Moore y col. (70), se analizaron por EGPA-DSS extractos sonicados de trofozoítos de G. lamblia de la misma cepa y el número de proteínas observadas en este análisis fue de 20. Las diferencias entre los resultados presentados en este estudio y los obtenidos por estos autores pueden deberse a la manera de obtener los extractos de trofozoítos. El mayor número de bandas obtenidos en este trabajo sugiere que la utilización del método de sonicación conjuntamente con un detergente (en este caso triton X100) favorece la solubilización de antígenos, lo cual da lugar a una mejor resolución de estos componentes cuando son analizados por EGPA-DSS.

Por otro lado la extrema sensibilidad de los métodos de radiomarcaje es generalmente esencial en la detección de pequeñas cantidades de antígenos presentes en complejos biológicos. En este aspecto el método de lactoperoxidasa usando ^{125}I es uno de los métodos más comunes para el marcaje de proteínas de superficie. Con el fin de caracterizar antígenos presentes en la superficie de los trofozoítos de G. lamblia se llevó a cabo la radiiodación de estos componentes. El caracterizar estos antígenos resulta de gran importancia, debido a que son estos los que primeramente se exponen al sistema inmune del huésped. En este sentido es posible que G. lamblia contenga en la superficie componentes que le permiten reconocer y adherirse a las células del epitelio intestinal.

Al ser analizados por EGPA-DSS, se observó que solo un número reducido de componentes de G. lamblia fue susceptible al marcaje con ^{125}I en comparación con los extractos totales. La diferencia del uso de detergentes en la extracción de antígeno soluble marcado para su análisis en EGPA-DSS fue notable al observar la autorradiografía de estos componentes. De esta manera, se demostró que tanto las bandas de alto peso molecular como las de bajo peso molecular mostraron mayor resolución cuando se usó para su extracción triton X100 comparadas con aquellas extraídas con DCC o sin usar detergentes. Asimismo se presentaron patrones diferentes en cuanto a la migración de los diferentes extractos. La variación más notable fue observada en el componente mayormente marcado ya que se encontró en un peso molecular más alto en el extracto solubilizado con DCC. De igual manera los extractos analizados en condiciones no reductoras fueron diferentes a los efectuados en condiciones reductoras. Esto sugiere que el 2-mercaptoetanol al romper los enlaces disulfuro altera la estructura espacial de las proteínas de G. lamblia y por lo tanto su comportamiento electroforético es diferente.

Al comparar los resultados de este análisis electroforético de los componentes radiomarcados de G. lamblia con los obtenidos por otros autores se observaron algunas diferencias. En estudios reportados por Nash y col. (42), empleando marcaje con ^{125}I de trofozoítos de la cepa P-1 de G. lamblia, se encontró en el análisis electroforético la presencia de un material polidisperso de alto peso molecular, el cual no fue detectado en este estudio de antígenos. La ausencia de este material se podría deber a la manera de extracción de antígenos de trofozoítos, ya que estos autores utilizan ciclos de

congelación-descongelación. Por otro lado Einfeld y Stibbs (44), reportan la presencia de 8 componentes en un análisis electroforético de extractos marcados de trofozoítos de la misma cepa fragmentados por sonicación y solubilización con triton X100. Entre ellos uno mayoritario de 80 K aproximadamente. Estos resultados son similares a los obtenidos en el análisis electroforético de antígenos realizado en este trabajo, ya que al igual que estos autores se observó un componente mayoritario de aproximadamente 80 K de peso molecular, así como una serie de bandas de pesos moleculares similares a las observadas en su estudio. Estas similitudes podrían deberse a que las condiciones para la obtención de antígenos fue semejante al usar sonicación para la fragmentación de células y triton X100 para la solubilización de antígenos.

Los descubrimientos de Köhler y Milstein acerca de la obtención de híbridos que sintetizan anticuerpos homogéneos y específicos (45), ha constituido una de las más valiosas herramientas usadas en Biología y Medicina. Mediante el uso de estos anticuerpos monoclonales se han logrado aislar y caracterizar antígenos relevantes de organismos parásitos importantes en Salud Pública. Estos antígenos purificados pueden ser ampliamente usados en pruebas de diagnóstico y de protección contra las enfermedades ocasionadas por parásitos (71).

Mediante la fusión celular entre células de mieloma y células linfoides provenientes de ratones inmunizados con G. lamblia, en este estudio se obtuvieron varias clonas, de las cuales se aislaron 4 de ellas que producían anticuerpos de la clase IgG contra G. lamblia. Cuando se caracterizaron estos anticuerpos monoclonales se encontró que reaccionaban con antígenos solubles y de superficie empleando las técnicas de

ELISA e inmunofluorescencia indirecta respectivamente. El hecho de que estas clonas produjeran anticuerpos de la clase IgG reviste cierta importancia, ya que en pacientes que presentan la enfermedad en un estado crónico este tipo de inmunoglobulina se encuentra con mas frecuencia, así como en concentraciones elevadas (30). De esta manera el empleo de anticuerpos monoclonales permitirá aislar los componentes reconocidos por estos y estudiar su papel en la infección.

Con la finalidad de conocer la localización de antígenos de los trofozoítos de G. lamblia que eran reconocidos por los anticuerpos monoclonales producidos en este trabajo se llevó a cabo la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Los resultados de este ensayo demostraron que existe un reconocimiento de componentes de superficie en trofozoítos vivos de G. lamblia. La reactividad con algunos anticuerpos monoclonales se observó en estructuras localizadas en la parte ventral del trofozoíto. La importancia de estas observaciones reside en el hecho de que esta porción de Giardia es la que tiene una relación más íntima con las células del epitelio intestinal. Asimismo los diferentes patrones obtenidos sugieren que la superficie de trofozoítos presenta heterogeneidad antigénica. Así que 2 anticuerpos monoclonales reconocen el cuerpo medio pero uno además tiene una estructura diferente al otro. Una más de las clonas reconoce el disco adherente el cual, ha sido involucrado en la adhesión a células del epitelio intestinal (15). Por último una clona reconoce lo que podría ser el reborde lateral del trofozoíto así como los flagelos y cuerpo mediano del mismo. En este contexto la purificación de antígenos de superficie reconocidos por los anticuerpos monoclonales permitirá llevar a cabo estudios sobre el papel de estos antígenos en la adhesión

de trofozoítos a células blanco. En este aspecto en el laboratorio de la Dra. Ortega se ha logrado aislar mediante el uso de cromatografía de afinidad usando un anticuerpo monoclonal de la misma línea que 1F10D8 (1F10C10), un componente de aproximadamente 67 K el cual se ha usado en ensayos de adhesión de trofozoítos de G. lamblia a células MDCK. Los resultados de estos estudios sugieren que este antígeno inhibe permanentemente la adhesión de trofozoítos a células MDCK.

Por otro lado era de interés caracterizar las proteínas del parásito reconocidos por los anticuerpos monoclonales. Para tal efecto se llevó a cabo el ensayo de inmunoelectrotransferencia indirecta usando primeramente sueros inmunes de ratón y de conejo. Los resultados de estos mostraron que un gran número de componentes son reconocidos por los sueros usados. Esto sugiere que las proteínas parecen no perder sus propiedades inmunogénicas después del tratamiento electroforético. La reactividad de los anticuerpos monoclonales se intentó observar empleando el mismo procedimiento, sin embargo, los resultados obtenidos no fueron concluyentes. La poca claridad en la tinción de bandas en el papel de nitrocelulosa observada con anticuerpos monoclonales podría deberse al uso de agentes desnaturizantes como el DSS, lo cual podría cambiaría conformación nativa de los componentes de G. lamblia. De esta manera no habría un reconocimiento de estos por los anticuerpos monoclonales, ya que en el proceso de inmunización se emplearon trofozoítos completos. La ausencia de reactividad de los anticuerpos monoclonales con proteínas transferidas a filtros de nitrocelulosa ha sido reportada por otros autores (59). En el caso de los anticuerpos policlonales la desnaturización de algunos componentes parece no interferir con su reactividad. Esto

puede ser debido a sus características de policlonalidad. Asimismo se ha reportado (60) que estos son capaces de reconocer proteínas aun en estado desnaturalizante.

Otro de los ensayos realizados en este trabajo para analizar la reactividad de anticuerpos tanto monoclonales como policlonales fue la técnica de co-precipitación de antígenos de G. lamblia marcados con ^{125}I . Cuando se emplearon sueros de conejo inmunizado con trofozoítos de G. lamblia, los resultados mostraron básicamente la precipitación de dos componentes de alto peso molecular en los diferentes extractos utilizados, demostrando la inmunogenicidad de los componentes. De igual manera el mismo ensayo se llevó a cabo con los anticuerpos monoclonales obtenidos en este estudio. Sin embargo, dado que el fondo encontrado en los controles fue muy alto por lo que resultó difícil el tener datos concluyentes al respecto.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo, es importante enfatizar que el contar con cultivos axénicos de trofozoítos de G. lamblia permitió llevar a cabo una caracterización de componentes de este parásito. Los datos resultantes en este trabajo, siguiendo las diferentes estrategias planteadas, proveen información relevante para llevar a cabo estudios posteriores en cuanto al aislamiento y purificación de antígenos de G. lamblia. Una vez obtenidos estos, pueden ser empleados para estudiar su papel en la relación huésped-parásito. Asimismo estas investigaciones ofrecen perspectivas para el uso de antígenos aislados en pruebas de inmunodiagnóstico y en ensayos de protección empleando en este último caso modelos experimentales para giardiasis.

CONCLUSIONES.

1. Se logró el crecimiento de trofozoítos de G. lamblia mediante cultivos axénicos usando el medio TYI-S-33 suplementado con 10% de suero de ternera y bilis bovino como un constituyente importante.
2. El análisis electroforético de extractos solubles de G. lamblia mostró un total de 48 proteínas con pesos moleculares entre 16 y 147 K.
3. Los antígenos de superficie de G. lamblia accesibles al marcaje con ¹²⁵I son pocos y su movilidad en EGPA-DSS fue diferente dependiendo de las condiciones usadas para su extracción.
4. Se obtuvieron anticuerpos monoclonales específicos contra antígenos solubles de G. lamblia.
5. Los ensayos de inmunofluorescencia indirecta usando cuatro anticuerpos monoclonales demostraron que estos están dirigidos contra la superficie de trofozoítos viables.

BIBLIOGRAFIA.

1. Meglitsch, P.A.,(1978). Zoología de Invertebrados. Ed. Blume. Madrid, España. pp. 19-85.
2. Levine, N.D., Corliss, J.D., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., G.F., Loeblich, III, A.R., Lox, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprage, V., Vavra, J. & Wallace, F.G..(1980). A newly classification of the protozoa. Journal of the Protozoology. 27(1): 37-58.
3. Meyers, J.D., Kuharic, H.A., & Holmes, K.K..(1977). Giardia lamblia infection in homosexual men. British Journal of Venereal Diseases. 53: 54-55.
4. Kean, B.H., William, D.C., & Luminais, S.K..(1979). Epidemic amoebiasis and giardiasis in a biased population. British Journal of Venereal Diseases. 56: 375-378.
5. Stevens, D.P.. (1982). Giardiasis: Immunity, Immunopathology and Immunodiagnosis. In: Immunology of Parasitic Infections. edited by Cohen, Sidney & Warren K.S.. Blackwell Scientific Publications. pp. 192-203.
6. Meyer, E.A. & Radulescu, S.. (1979). Giardia and Giardiasis. In: Advances in Parasitology. Edited by Lumsden, W.H.R., Muller, R. & Backer, J.R.. Academic Press. U.S.A. vol. 17: 1-47.
7. Mahanoud, A. & Warren, K.S.. (1975). Algorithms in the diagnosis and management of exotic diseases.II. Giardiasis.

Journal Infectious Diseases. 131(5): 621-624.

8. Ackers, J.P.. (1980). Giardiasis: basic parasitology. Transactions of the Royal Society of the Tropical Medicine and Hygiene. 74(4): 427-428.
9. Roberts-Thomson, I.C.. (1984). Giardiasis. In: Tropical and Geographical Medicine. Edited by Warren, K.S. & Mahamoud, A. Mc. Graw-Hill Book Company. pp. 319-325.
10. Knight, R.. (1980). Epidemiology and transmission of giardiasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 74(4): 433-436.
11. Gutierrez, B..(1979). Conceptos actuales sobre la etiología de la diarrea infecciosa (Gastroenteritis). Gaceta de Medicina Clínica. 2: 5-6.
12. Smith, P.D., Elson, Ch.D., Keister, D.B. & Nash, T.E..(1982). Human host response to Giardia lamblia. I. Spontaneous killing by mononuclear leukocytes in vitro. Journal Immunology. 128: 1372-1376.
13. Figueroa, L., Navarrete, N., Franjola, R. & Puga, S..(1981). A copro-parasitological survey among school children from the city of Concepcion Chile. Children Parasitology. 36(3/4): 66-67.
14. Tay, J., Salazar-Scettino, P.M., de Haro, I. y Ruiz-Hernández A.L..(1978). Frecuencia de las parasitosis intestinales en México. Salud Pública de México. Epoca V. Vol. XX No. 3:

297-327.

15. Kulda, J. & Nohynkova, E.. (1978). Flagellates of the human intestine and intestines of the other species. In: Parasitic protozoa. Edited by Kreier, J.P..Academic Press. USA. vol. II 69-104.
16. Wright, S. G.. (1980). Giardiasis and malabsorption. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 74(4): 436-437.
17. Anand, B.S., Mahamoud, A., Ganguly, N.K., Rehani, N.M., Dilawari, I.B. & Mahajal, R.C..(1982). Transport studies and enzyme assays in mice infected with human Giardia lamblia. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 76(5): 616-619.
18. Olveda, R.K., Andrews Jr., J.S. & Hewelitt, E.L..(1982). Murine giardiasis: Localization of trophozoites and small bowell histopathology during the course of infection. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 31(1): 60-66.
19. Anand, B.S., Chaudhary, A., Yadev, R.S. & Baveja, U.K..(1985) Experimental examination of the damaging effects of Giardia lamblia on intestinal mucosal scrapings of mice. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 79:613-617.
20. Tandon, B.N., Puri, B.K., Gandhi, P.C. & Tewari, S.G..(1974). Mucosal surface injury of jejunal mucosa in patients with

- Giardia infection: an electron microscopic study. Indian Journal of Medical Research. 62: 1838-1842.
21. Rosenthal, M.D.P. & Liebman, M.D.W..(1980). Comparative study of stool examinations, duodenal aspiration, and pediatric entero-test for giardiasis in children. Journal Pediatrics. 96(2): 278-279.
 22. Visvesvara, G.S., Smith, P.D., Healy, G.R. & Brown, W.R.. (1980). An immunofluorescence test to detect serum antibody Giardia lamblia. Annals Internal Medicine. 93: 802-805.
 23. Ungar, B.L.P. Yolken, R.H., Nash, T.E. & Quinn, T.C.. (1984). Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of Giardia lamblia infecal specimens. Journal Infectious Diseases. 149(1): 90-97
 24. Mendelson, R. M.. (1980). The treatment of giardiasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 74(4): 438-439.
 25. Rendtorff, R.C.. (1975). The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. Giardia lamblia cysts given in capsules. American Journal of Hygiene. 59: 209-220.
 26. Roberts-Thomson, I.C., Stevens, D.P., Mahamoud, A.A.F. & Warren, K.S..(1976). Giardiasis in the mouse: An animal model Gastroenterology. 7: 57-61.
 27. Ament, M.E., Ochs, O.D. & Davis, S.D.. (1973). Structure and

function of the gastrointestinal tract in primary immunodeficiency syndromes: a study of 39 patients. *Medicine* 52: 227-248.

28. Andrews Jr., J.S. & Hewelitt, E.L. (1981). Protection against infection with Giardia muris by milk containing antibody to Giardia. *Journal Infectious Diseases*. 143(2): 242-246.
29. Smith, P.D., Guillin, F.D., Spira, W.M. & Nash, T.E. (1982). Chronic giardiasis: studies on drug sensitivity, toxin and host immune response. *Gastroenterology*. 80: 797-803.
30. Smith, P.D., Guillin, F.D., Brown, W.R. & Nash, T.E. (1981). IgG antibody to Giardia lamblia detected by enzyme-linked immunosorbent assay. *Gastroenterology*. 80: 1476-1480.
31. Smith, P.D., Elson, C.H. & Keister, D.B. (1983). Human host response to Giardia lamblia. II. Antibody dependent killing in vitro. *Cellular Immunology*. 82: 308-315
32. Owen, R.L., Allen, C.L. & Stevens, D.P. (1981). Phagocytosis of Giardia muris by macrophages in Peyer's Patch epithelium in mice. *Infection and Immunity*. 33(2): 591-601.
33. Visvesvara, G.S. (1980). Axenic growth of Giardia lamblia in Diamond's TPS-medium. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 74(2):
34. Meyer, E.A. (1976). Giardia lamblia: Isolation and axenic cultivation. *Experimental Parasitology*. 39: 101-105.

35. Farthings, M.J.G., Varon, S.R. & Keusch, G.T.. (1983). Mammalian bile promotes growth of Giardia lamblia in axenic culture. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 77(4): 467-569.
36. Kazprzak, W. & Majewska, A.C..(1983). Isolation and axenic growth of fresh Giardia intestinalis strains in TPS-medium. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 77(2): 223-224.
37. Keister, D.B..(1983). Axenic culture of Giardia lamblia in TYI-S-33 medium supplemented with bile. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 77(4): 487-488.
38. Lindmark, D.G..(1980). Energy metabolism of the anaerobic protozoon Giardia lamblia. Molecular and Biochemical Parasitology. 1: 1-12.
39. Jarroll, E.L., Muller, P.J., Meyer, E.A. & Morse, S.A.. (1981). Lipid and carbohydrate metabolism of Giardia lamblia. Molecular and Biochemical Parasitology. 2: 187-196.
40. Weinbach, E.C., Clagget, E.C., Keister, B.D. & Diamond, L.S.. (1980). Respiratory metabolism of Giardia lamblia. Journal of Parasitology. 66(2): 347-350.
41. Smith, P.D., Guillin, F.D., Kaushal, N.A. & Nash, T.E..(1982) Antigenic analysis of Giardia lamblia from Afghanistan, Puerto Rico, Ecuador and Oregon. Infection and Immunity. 36(2): 714-719.

42. Nash, T.E., Guillin, F.D. & Smith, P.D.. (1983). Excretory-secretory products of Giardia lamblia. Journal Immunology. 131(4): 2004-2010.
43. Einfeld, D.A. & Stibbs, H.H.. (1984). Identification and characterization of a major surface antigen of Giardia lamblia. Infection and Immunity. 40(2): 377-383.
44. Köhler, G. & Milstein, C..(1975). Continuous cultures of fused cells secreted antibody of predefined specificity. Nature. 256: 495-497.
45. Kearny, J.F..(1974). Hybridomas and monoclonal antibodies. In: Fundamental Immunology. Edited by William. E.P.. Raven Press. New York. pp. 751-756.
46. Littlefield, J.W..(1964). Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. Science. 145:709-710.
47. Irvin, A.D.. (1976). Techniques and applications of cell fusion and hibridisation. An introduction. Veterinary Records 98: 351-356.
48. Pontecorvo, G..(1975). Production of mammalian somatic cell hybrids by means of poliethilene glycol traetment. Somatic Cell Genetics. 1(4): 397-400.
49. Davison, R.L. & Gerald, P.S..(1977). Induction of mammalian somatic cell hibridisation by poliethilene glycol: In: Methods in Cell Biology. XV: 325-337.

50. Ortega-Pierres, G., Chayen, A., Clark, N.W.T. & Parkhouse, R. M.E..(1984). The occurrence of antibodies to hidden and exposed determinants of surface antigens of Trichinella spiralis. Parasitology. 88: 359-369.
51. Yoshida, N., Nusenzweig, R.S., Potcnjak, P., Nussenzweig, U. & Aikawa, M..(1980). Hybridoma produces protective antibodies against sporozoite stage of malaria parasite. Science. 207: 71-73.
52. Epstein, N., Miller, L.H., Kaushal, D.C., Udeinya, I.J., Rener, J., Howard, R.J., Asofsky, R., Aikawa, M. & Hess, R.. (1981). Monoclonal antibodies against specific surface determinant on malarial (Plasmodium knowlesi) merozoites block erythrocyte invasion. Journal of Immunology. 127(1): 212-217.
53. Marchalonis, J.J..(1969). An enzymic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins. Biochemical Journal. 113: 299-305.
54. Laemli, U.K..(1970). Cleavage of structural proteins during the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-685.
55. ELECTROPHORESIS CALIBRATION KITS. PHARMACIA BIOTECHNOLOGY PRODUCTS. CATALOG.
56. Kearney, J.F., Radbruch, A., Liesegang, B. & Rajewski K.. (1979). A new Mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell line. The Journal of Immunology. 123(4): 1548-1550.

57. Fazekas de St. Groth & Scheidegger, D..(1980). Production of monoclonal antibodies strategy and tactics. *Immunological Methods*. 35: 1-21.
58. Crawford, D.H., Barlow, M.J., Harrison, J.I., Winger, L. & Huehns, E.R..(1983). Production of human monoclonal antibody to rhesus D antigen. *Lancet*. i:386-388.
59. Goding, J.W..(1983). *Monoclonal antibodies: Principles and practice*. Academic Press. U.S.A.. p. 37.
60. Garvey, J.S., Cremer, N.E. & Sussdorf, D.H..(1977). *Methods in immunology*. 3a. ed.. W.A. Benjamin, Inc.. U.S.A.: p.p. 218-220
61. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J.. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.
62. Voller, A., Bidwell, D. E. & Bartlett, A..(1979). The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Dynatech Laboratories, Inc.* p.p. 25-41.
63. Johnson, G.D. & Araujo, G.M..(1981). A simple method of reducing the fading of immunofluorescence during microscopy *Journal of Immunological methods*. 43: 349-350.
64. Towbin, H., Staemlin, T. & Gordon, J..(1979). Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets procedure and some applications. *Proceedings of National Academy Science*. 76(9): 4350-4354.

65. Midgley Jr., A.R. & Hepburn, M.R..(1980). Use of the double antibody method to separate antibody bound from free ligand in radioimmunoassay. *Methods in Enzymology*. 70: 266-274.
66. Karapetyan, A.E..(1962). In vitro cultivation of Giardia duodenalis. *Journal of Parasitology*. 48: 337-340.
67. Diamond, L.S., Harlow, D.R. & Cunnuck, C.C..(1978). A new medium for the axenic cultivation of Entamoeba histolytica and other Entamoeba. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 72: 431-432.
68. Helenius, A. & Simons, K..(1975). Solubilization of membranes by detergents. *Biochemical and Biophysical Acta*. 415: 29-79.
69. Helenius, A., McCaslin, D.R., Fries, E. & Tanford, C..(1979). Properties of detergents. *Methods in Enzymology*. LV1:734-749.
70. Moore, G.W., Sogandares-Bernal, F. & Dennis, M.V.. (1982). Characterization of G. lamblia trophozoite antigens using polyacrylamide gel electrophoresis, high performance liquid chromatography, and enzyme labeled immunosorbent assay. *Veterinary Parasitology*. 10:229-237.
71. Cohen, S.. (1984). Monoclonal antibodies in parasitic infectious diseases. *British Medical Bulletin*. 40(31): 291-296.

ANEXO 1. REACTIVOS Y EQUIPO.

REACTIVOS.

BAKER.

ácido acético, ácido cítrico, bicarbonato de sodio, carbonato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, dextrosa, glicerol, fosfato de potasio dibásico, fosfato de potasio monobásico, fosfato de sodio, metanol, sulfato de amonio.

BBL.

Extracto de levadura, tripticasa.

BIO-LABS.

suero de ternera.

BIO-RAD.

acrilamida, bis-acrilamida, duodecil sulfato de sodio, TEMED.

CAPPEL.

conjugados:

conjugado-suero de cabra anti-Ig de ratón-proxidasa, suero de cabra anti-IgG1 de ratón, suero de cabra anti-IgG2a de ratón, suero de cabra anti-IgG2b de ratón, suero de cabra anti-IgG3 de ratón, suero de cabra anti-IgM de ratón.

SIGMA.

ácido L-ascórbico, albúmina sérica bovina, bilis bovina, citrato férrico de amonio, 4-cloro-1-naftol, gelatina, glicina, lactoperoxidasa, O-fenilendiamina, persulfato de amonio, pironina Y, tris-base, tween 20, aminopterina, timidina, hipoxantina

fungizona.

MATERIAL Y EQUIPO.

PREPARACION DE ANTIGENOS SOLUBLES.

centrífuga refrigerada BECKMAN TJ-6, sonicador MSE, hemocitómetro AMERICAN OPTICAL, centrífuga EPPENDORF mod. 5414, tubos FALCON de 50 ml, tubos EPPENDORF de 1.5 ml.

MARCAJE DE SUPERFICIE.

tubos PYREX de 12 x 100, centrífuga refrigerada TJ-6, centrífuga clínica IEC, contador de emisiones gamma PACKARD BELL, sonicador MSE, centrífuga EPPENDORF mod. 5414, tubos de poliestireno cristal 12 x 100.

ANALISIS ELECTROFORETICO.

fuelle de poder ISCO mod. N-493, cámara de electroforésis BRL V-161, agitador giratorio NEW BRUNSWICK, platina metálica para barra magnética CORNING, tubos EPPENDORF 1.5 ml.

OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.

tubos FALCON de 50 y 15 ml, centrífuga clínica IEC, campana de flujo laminar VECCO, incubadora con CO₂, humedad y temperatura regulada FORMA SCIENTIFIC, placas de microtitulación COSTAR, pipetas serológicas de 1,5 y 10 ml, botellas para cultivo de células COSTAR, propipeta PIPET AID, microscopio ZEISS, viales para criocultivo NUNC, micropipetas GILSON, congelador de -70°C. REVCO, contenedor de nitrógeno líquido.

ENSAYO DE ELISA.

micropipetas GILSON, placas de microELISA DYNATECH, estufa con

temperatura regulada PRECISION, refrigerador AMERICAN.

INMUNOFLUORESCENCIA

tubos de 1.5 ml EPPENDORF, centrífuga BECKMAN TJ-6, micropipeta GILSON, microscópio óptico OLYMPUS, microscópio de fluorescencia ZEISS, portaobjetos, cubreobjetos de 18 x 18, banniz transparente

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

cámara de electroforesis BRL, fuente de poder ISCO, micropipeta GILSON, tubos eppendorf, platina con temperatura CORNING, agitador lateral BELCO GLASS, cámara de transferencia BIO-RAD, fuente de poder BIO-RAD mod. 2.5/250, tubos de 16 x 150 con tapón de rosca PYREX,

CO-PRECIPITACION.

tubos de poliestireno cristal 12 X 100, contador gamma PACKARD BELL, centrífuga EPPENDORF mod. 5414, cámara de electroforesis BRL, fuente de poder ISCO, micropipeta GILSON.

ANEXO 2: PREPARACION DE MEDIOS Y SOLUCIONES.

CULTIVO AXENICO DE TROFOZOITOS.

Preparación del medio TYI-S-33 modificado por Keister (1964).

bilis bovina	0.05	g
extracto de levadura.....	1.0	g
tripticasa.....	2.0	g
dextrosa.....	1.0	g
cloruro de sodio.....	0.2	g
L-cisteína.....	0.2	g
ácido L-ascórbico.....	0.01	g
citrato férrico de amonio.....	0.023	g
fosfato de potasio dibásico....	0.06	g
fosfato de potasio monobásico..	0.01	g

Se llevó a 80 ml. de agua, se ajustó el pH. entre 6.8-6.9 y se filtró a través de una de una membrana millipore de 0.22µm. Al final se reconstituyó con lo siguiente:

sueros de ternera.....	10	ml
penicilina.....	25,000	U/l
Estreptomicina.....	0.025	g

INMUNIZACION DE ANIMALES.

amortiguador fosfato salino (AFS) pH 7.2.

cloruro de sodio.....	8.0	g
cloruro de potasio.....	0.2	g
fosfato de sodio dibásico.....	2.89	g (dodecahidratado)
fosfato de potasio.....	0.2	g

añorar a 1000 ml de agua bidestilada después de ajustar el pH.

Para preparar la solución con ACF o AIF, se mezcló el

antígeno disuelto en AFS con un volumen igual de adyuvante y se emulsionó vigorosamente.

OBTENCIÓN DE ANTIGENOS SOLUBLES.

tris 10 mM pH 8.13 conteniendo inhibidores de proteasas.

Los inhibidores se prepararon por separado en soluciones concentradas como sigue:

N-EM.....	100	mM	en agua
FFMS.....	200	mM	en isopropanol.
		125	

MARCAJE DE SUPERFICIE DE TROFOZOITOS CON I.

AFS 2X + 0.1 N de HCl (AFS concentrado 2 veces + 3 ul de HCl).

AFS-KI 0.027 M (AFS + cristales de KI hasta 0.027 M).

AFS-KI 0.001 M (AFS + cristales de KI hasta 0.001 M).

lactoperoxidasa 1 mg/ml (disuelta en AFS).

peróxido de hidrógeno 0.03% (disuelto en AFS)

ELECTROFORESIS DE ANTIGENOS SOLUBLES.

GEL ESPACIADOR (30 ml).

acrilamida 30%.....	10	ml
bisacrilamida 2%.....	4	ml
tris-base 1 M pH 8.8.....	11.25	ml
DSS 20%.....	0.15	ml
agua.....	4.4	ml
TEMED.....	0.013	ml
persulfato de amonio 10%.....	0.09	ml

GEL CONCENTRADOR (10 ml).

acrilamida 30%.....	1.7	ml
bisacrilamida 2%.....	0.7	ml
tris-base 1 M pH 6.8.....	1.25	ml

DSS 20%.....	0.05	ml
agua.....	6.8	ml
TEMED.....	0.01	ml
persulfato de amonio 10%.....	0.05	ml

SOLUCION DE CORRIDA.

tris-base.....	3.02	g
glicina.....	14.41	g
agua.....	800	ml
ajustar pH.....	8.3	
DSS 20%.....	5	ml
aforar a.....	1000	ml

SOLUCION PARA DISOLVER LA MUESTRA (2X).

tris-base.....	1.512	g
glicerol.....	25	ml
DSS.....	2.0	g
pironina Y.....	0.004	g
ajustar pH.....	6.8	
agua cuanto baste para.....	100	ml

SOLUCION DE AZUL DE COOMASSIE

metanol.....	50%
ácido acético.....	10%
AC.....	0.1%

SOLUCION DE ALTO METANOL.

metanol.....	45.4%
ácido acético.....	7.5%

SOLUCION DE BAJO METANOL.

metanol.....	10%
ácido acético.....	5%

Solución de salicilato de sodio pH 6.

ácido salicílico.....	1	M
hidróxido de sodio.....	1	M

Se disolvieron juntos en agua. No se aforó hasta ajustar el pH a 6.0.

CULTIVO DE CELULAS DE MIELOMA.

Preparación del medio RPMI-1640 incompleto.

El contenido de un sobre de medio RPMI-1640 se disolvió siguiendo las instrucciones del proveedor. Se ajustó el pH a 7.2 y se aforó a 1000 ml de agua. Finalmente se filtró a través de una membrana millipore de 0.22um.

Para la preparación del medio completo se adicionaron a cada 100 ml de medio incompleto los siguientes componentes:

suero fetal de bovino.....	10	ml
L-glutamina.....	2	mM
penicilina.....	10,000	U/I
estreptomicina.....	1	mg
fungizona.....	1	ug

OBTENCION DE HIBRIDOMAS MEDIANTE FUSION CELULAR.

Preparación de medio de HAT.

Cada 100 ml. de medio RPMI-1640 completo contenía:

hipoxantina.....	10^{-5}	M
------------------	-----------	---

aminopterina.....	10^{-7}	M
timidina.....	10^{-5}	M
glicina.....	10^{-3}	M

El medio de HT se preparó de igual manera que el HAT solo sin aminopterina.

Preparación de la solución de cloruro de amonio.

cloruro de amonio.....	0.16	M
tris-base.....	0.17	M

Se mezclaron 9 partes de cloruro de amonio con 1 parte de tris-base. Se ajustó el pH a 7.2.

Preparación de PEG usado para la fusión:

polietilenglicol.....	2.0	g
medio RPMI-incompleto.....	2	ml

Se autoclavó a 120°C por 15 min y posteriormente se adicionaron 0.2 ml de DMSO.

PURIFICACION DE ANTICUERPOS A PARTIR DE LIQUIDO ASCITICO.

solución sobresaturada de sulfato de amonio pH 7.2.

sulfato de amonio.....	110.0	g
agua.....	100	ml

Con la finalidad de disolver el sulfato de amonio se se calentó a 70°C . Después de lo cual la solución se dejó reposar. Al momento de uso, la solución saturada se agitó dejándola reposar por unos minutos. El sobrenadante se separó y fue empleado en la precipitación.

ENSAYO DE ELISA.

Preparación de la solución de bloqueo.

AFS/ASB/T..... AFS pH 7.2 conteniendo 0.5% de albúmina sérica de bovino y 0.5% de tween 20.

Preparación de la solución de lavados.

AFS/T..... AFS pH 7.2 conteniendo 0.5% de tween 20.

Preparación de la solución de acoplamiento de antígeno a las placas. Amortiguador de carbonatos pH 9.6.

carbonato de sodio.....	1.95	g
bicarbonato de sodio.....	2.98	g
afonar con agua.....	1000	ml

Solución de sustrato de O-fenilendianina.

ácido cítrico.....	0.1	M
fosfato de sodio dibásico.....	0.1	M

Estas soluciones se prepararon por separado y posteriormente se mezclaron 24.3 partes de ácido cítrico con 25.7 partes de fosfato. Finalmente se checó el pH 5.0 y se diluyó 1:2 con agua bidestilada.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

Preparación del amortiguador de transferencia (BX).

tris-base.....	48.44	g
glicina.....	230.72	g
agua.....	2,000	ml

solucion 1X		
amortiguador 8X.....	500	ml
metanol.....	800	ml
agua.....	2,700	ml

Preparación de sustrato.

solución concentrada para revelar las tiras de nitrocelulosa previamente incubadas con anticuerpos.

6X (4-cloro-1-naftol)..... 0.003 g / ml en metanol

solucion 1X		
AFS.....	30	ml
solución 6X.....	6	ml
peróxido de hidrógeno.....	0.012	ml

CO-PRECIPITACION DE ANTIGENOS MARCADOS DE G. lamblia.

Solución para disolver el antígeno marcado.

cloruro de sodio.....	14	mM
amortiguador de fosfatos pH 7.0	10	mM
rojo de fenol.....	10	mg/L
gelatina.....	0.1%	
azida de sodio.....	25	mM

Solución para disolver el suero problema.

Se preparó igual que la solución anterior pero adicionando:

suero normal.....	1:100	dilución final
EDTA.....	50	mM

Solución conteniendo el 2o. anticuerpo (solución para lavar los complejos finales).

Se prepara como la primera solución en ausencia de gelatina y rojo de fenol. Pero conteniendo:

azul de bromofenol..... 15 mg/L