



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**OBTENCIÓN DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL
PARA EL INMUNOMARCAJE DE
*Giardia intestinalis***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

KARINA NOLASCO RÍOS



**DIRECTOR DE TESIS:
M. EN C. AÁRON RODRÍGUEZ CABALLERO**

2016

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.



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.

Hoja de datos del Jurado

1. Datos del Alumno

Karina Nolasco Ríos
Universidad Nacional
Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología 307327099

2. Datos del Sinodal 1 (Tutor)

M. en C.
Aarón Rodríguez Caballero

3. Datos del Sinodal 2

M. en C.
Perla María del Carmen
Acevedo Ramírez

4. Datos del Sinodal 3

M. en C.
Yolanda Medina Flores

5. Datos del Sinodal 4

M. en C.
Isabel Cristina
Cañeda Guzmán

6. Datos del Sinodal 5

M. en C.
Jovanny Fernando Yonatan
Olvera Bautista

7. Datos del trabajo escrito

Obtención de un anticuerpo monoclonal para el inmunomarcaje de trofozoítos de *Giardia intestinalis*. 57 pp. 2016

Agradecimientos a:

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias, por darme el privilegio de realizar mis estudios dentro de sus aulas.

Al Laboratorio de Parasitología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría por abrirme las puertas para la realización de este trabajo.

A la Dra. Martha Ponce Macotela por dejarme hacer esta tesis en su laboratorio, ser un modelo en mi formación personal y haber confiado en Aarón como asesor.

A Gustavo Peralta Abarca por la ayuda en el cultivo a Charly por el apoyo con el material, a Silvia Salazar Caballero por su disposición de ayudarme, por su paciencia en mis dudas y por enseñarme cosas nuevas y Yadira por el apoyo emocional.

A mi asesor M. en C. Aarón Rodríguez Caballero que siempre estuvo al pendiente de mí en el laboratorio, me apoyo, resolvió mis dudas; por la paciencia y atenta revisión de este trabajo, ya que sin su apoyo no hubiese sido posible llevarlo a cabo.

A mí jurado Perla María del Carmen Acevedo Ramírez, Yolanda Medina Flores, Isabel Cristina Cañeda Guzmán y Jovanny Fernando Yonatan Olvera Bautista por el tiempo que dedicaron en la revisión y de mi trabajo.

A los amigos que estuvieron paso a paso en mi camino y que nunca dejaron que caminara sola.

Gracias por todo.

Dedicado a:

A mi padre que es mi ejemplo a seguir, que me enseñó a seguir siempre adelante la persona que dará su apoyo incondicional, esta es una forma de demostrar que valió la pena su esfuerzo por mantener mi carrera.

A mi hermana Janette porque estuvo siempre a mi lado, cuidándome en esos momentos difíciles y que sin su fortaleza tal vez yo nunca llegaría a este punto.

A mi abuelito Juan† porque hasta su último día confió en que terminaría

A doña Irma por ser como una madre para mí y por tanto cariño.

A todas aquellas personas que no dejaron de confiar en mí.

Gracias por confiar.

Contenido

1. Resumen	5
2. Introducción	6
2.1. Características generales de <i>Giardia duodenalis</i>	6
2.3 Morfología.....	7
2.4. Ciclo de vida	9
2.5. Mecanismos de transmisión.....	10
2.6. Patogenicidad y mecanismos parasitarios	11
2.7. Taxonomía.....	12
2.8. Especies	13
2.9. Ensamblés.....	14
2.10. Inmunología	15
2.11. Distribución geográfica y epidemiología	17
2.12. Diagnósis y tratamiento	19
2.12. Anticuerpos monoclonales	21
3. Planteamiento del problema.....	24
4. Hipótesis	24
5. Objetivo General	24
6. Objetivos Particulares	24
7. Métodos	25
7.1. Material biológico.....	25
7.2. Cultivos.....	26
7.3. Ensayos in vivo	26
7.4. Obtención del Anticuerpo Monoclonal.....	26
8. Resultados	29
8.1 Cuantificación de trofozoítos.....	29
8.2. Monitoreo de la respuesta inmune de los ratones.....	29

8.3. Titulación de la respuesta inmune de los ratones	29
8.4. Fusión.....	30
8.5. Ensayo por inmunoabsorción ligada a enzima (ELISA).....	31
8.6. Producción de ascitis	31
8.7. Clonación por dilución limitante.....	32
8.8. Cuantificación de anticuerpos	33
8.9. Preparación de muestras fijas de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i>	33
8.10. Inmunfluorescencia del anticuerpo monoclonal.....	34
9. Discusión	39
10. Conclusión	44
11. Bibliografía	45
12. Anexo.....	53

Contenido de cuadros:

Cuadro 1. Características morfológicas de las diferentes especies de *Giardia*.....13

Cuadro 2. Especies propuestas para cada ensamble de *Giardia duodenalis*.....15

Cuadro 3. Casos reportados de Giardiosis en varios países en el mundo.....19

Cuadro 4. Casos reportados de Giardiosis en varios países en México.....19

Cuadro 5. Tipos de antiparasitarios utilizados en *Giardia duodenalis*.....21

Cuadro 6. Determinación de reactividad del AcMo 1A10 D4 E3 en diferentes muestras.....38

Contenido de figuras:

Figura 1. Trofozoíto de *Giardia duodenalis*.....7

Figura 2. Estadios de *Giardia duodenalis*.....9

Figura 3. Esquema del ciclo de vida de *Giardia duodenalis*.....10

Figura 4. Imagen de la estructura general de los anticuerpos.....22

Figura 5. Monitoreo de respuesta inmune del ratón.....29

Figura 6. Titulación de la respuesta inmune del ratón.....30

Figura 7. Hibrídomas en una placa de 96 pozos.....30

Figura 8. Placa con reacción de ELISA.....31

Figura 9. Fluorescencia de hibrídomas en placa.....31

Figura 10. Inyección intraperitoneal del hibrídoma para producción de ascitis.....32

Figura 11. Imagen de un pozo de microplaca en clonación.....33

Contenido de láminas:

Lámina 1. Inmunomarcaje de trofozoítos de <i>Giardia duodenalis</i>	34
Lámina 2. Acercamiento de los trofozoítos marcados con el anticuerpo monoclonal.....	35
Lámina 3. Inmunomarcaje de trofozoítos de <i>T. vaginalis</i>	36
Lámina 4. Inmunomarcaje de quistes de <i>Giardia duodenalis</i>	37
Lámina 5. Inmunomarcaje de ooquistes de <i>Crisptosporidium</i>	38

Abreviaturas

AcMo: anticuerpo monoclonal

DMEM: Dulbelcco's Modified Eagle Medium

DMSO: dimetil-sulfoxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligada a enzimas

Fab: fracción de reconocimiento antigénico

Fc: la fracción cristalizable

FIT: inmunoflorecencia de isotiocionato de fluoresceína

FITC: isotiocionato de fluoresceína

HAT: hipoxantina, aminopterina y timidina

IgA: inmunoglobulina A

IgG: imonuglobulina G

IgM: inmunoglobulina M

PBS: Buffer fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

SFB: suero fetal bovino

1. Resumen

La Giardiosis juega un papel importante de salud pública en los países en vías de desarrollo (Furtado *et al.*, 2012; Yaoyu y Xiao, 2011). Afecta principalmente la edad pediátrica, causa vómito, dolor epigástrico, náuseas, diarrea y mala absorción de nutrientes (Espelage *et al.*, 2010) provoca pérdida del desarrollo cognitivo y físico (Minetti *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2013; Busatti *et al.*, 2013).

Se utilizaron trofozoítos de la cepa INP220806-HGINV, ésta se mantuvo y se expandió para la inmunización de cinco ratones BALB/c hembras, con la finalidad de utilizar las células del bazo del ratón para la producción de hibridomas. Se utilizó la prueba de ELISA para medir la respuesta inmune y seleccionar los hibridomas productores de anticuerpo. Por clonación limitante se obtuvo la clona 1A10 D4 E3.

Al anticuerpo monoclonal (1A10 D4 E3) se le acoplo el isotiocianato de fluoresceína, para poder utilizarlo como inmunomarcaje de trofozoítos de *Giardia duodenalis* de la cepa INP220806-HGINV, como una técnica alternativa de detección de este parásito, sin embargo dicha clona tiene reacción cruzada con *Trichomona vaginalis*.

Palabras clave: *Giardia duodenalis*, anticuerpo monoclonal, inmunomarcaje, *Trichomona vaginalis*

Abstract

Giardiasis is an important role of public health in developing countries (Furtado *et al.*, 2012; Yaoyu and Xiao, 2011). Mainly affects the pediatric age, causing vomiting, epigastric pain, nausea, diarrhea and malabsorption of nutrients causing loss of cognitive and physical development (Minetti *et al.*, 2015; Espelage *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2013; Busatti *et al.*, 2013)

We used trophozoites the INP220806-HGINV strain, this was maintained and expanded for immunization of five mice BALB / c mice, with the goal of using the mouse spleen cells for hybridoma production. ELISA was used to measure the immune response and select antibody producing hybridomas. By the limiting cloning, it was obtained the clone 1A10 D4 E3

The monoclonal antibody (1A10 D4 E3) was coupled fluorescein isothiocyanate, to use it as immunostaining by Giardia trophozoites of INP220806-HGINV strain, for an alternative technique of detection this parasite, nevertheless this cloned has cross reaction with *Trichomonas vaginalis*

Key words: *Giardia duodenalis*, monoclonal antibody, immunostainig, *Trichomona vaginalis*

2. Introducción

La Giardiosis juega un papel importante de salud pública en los países en vías de desarrollo (Furtado *et al.*, 2012; Yaoyu y Xiao, 2011). Afecta principalmente la edad pediátrica, causando vómito, dolor epigástrico, náuseas, diarrea y mala absorción de nutrientes (Espelage *et al.*, 2010) provocando pérdida del desarrollo cognitivo y físico (Minetti *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2013; Busatti *et al.*, 2013).

La infección se transmite por la vía oral-fecal. Inicia cuando el hospedero ingiere quistes que se pueden encontrar en agua contaminada o en comida (Adam, 2001; Abossie y Seid, 2014). Asociada con malas condiciones sanitarias (en países en vías de desarrollo), la infección también se puede dar por viajes internacionales e inmigración para países desarrollados (Espelage *et al.*, 2010). Casi 2 millones de personas se infectan con este parásito en todo el mundo, se reportan 500, 000 casos nuevos al año (Hoque *et al.*, 2002).

Hay diferentes técnicas para detección de parásitos, las más comunes en cualquier lugar del mundo son las coproparasitoscópicas por las que se pueden obtener y/o detectar la presencia del parásito (Rajurkar *et al.*, 2012). En caso de no detectar al organismo mediante los métodos anteriores, existen diversas técnicas empleando anticuerpos, las cuales son ideales para aquellos laboratorios donde no se tiene personal especializado en ensayos inmunoenzimáticos como ELISA, ésta es una de las pruebas más específicas para detección de este parásito (Chakarova, 2010).

Es indispensable encontrar alternativas eficientes para poder hacer un diagnóstico rápido de ésta enfermedad sin la necesidad de personal especializado en dichas pruebas de diagnóstico, para un diagnóstico anticipado y un tratamiento eficaz.

2.1. Características Generales de la Giardiosis

El agente etológico de la Giardiosis es *Giardia duodenalis* (Espelage *et al.*, 2010) también conocido como *Giardia lamblia* y *Giardia intestinalis* (Monis *et al.*, 2010; Yaoyu y Xiao, 2011) este parásito es binucleado y flagelado, se encuentra en anfibios, aves y mamíferos (Yaoyu y Xiao, 2011). Carece de retículo endoplásmico, aparato de Golgi, glicosomas, mitocondrias o

peroxisomas (Plutzer *et al.*, 2010; Xin *et al.*, 2005). Presenta hidrogenosomas y mitosomas, como vestigios mitocondriales para la producción de hidrogeno (Cavalier-Smith, 2003)

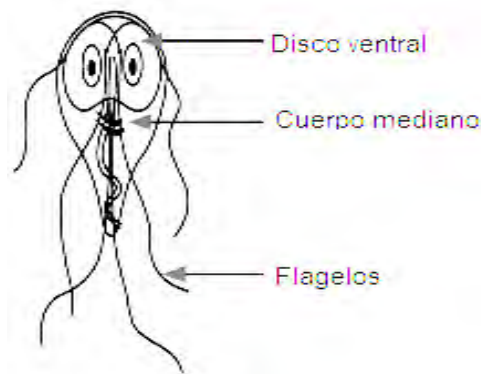


Figura 1. Trofozoito de *Giardia duodenalis* (Thompson y Monis, 2004).

2.2. Morfología

Trofozoíto

El trofozoíto mide aproximadamente de 12 a 15 μm de largo, con forma de pera (Adam, 2001) de 7 a 9 μm de ancho y 1 o 2 μm de espesor, de simetría bilateral, la parte anterior es más ancha que la posterior y redondeada, mientras que la parte posterior es delgada y termina en punta (Thompson, 2004; Adam, 2001).

Las partes que conforman al trofozoíto son: cuatro pares de flagelos (anterior, posterior, caudal y ventral), cuerpo medio y disco suctor o adhesivo en la parte ventral. Tiene dos núcleos (Gadelha *et al.*, 2015; Adam, 2001).

Flagelos: los cuatro pares de flagelos son simétricos, con un origen en ocho cuerpos parabasales, se localizan a los lados de la línea media, cerca de los núcleos (Gadelha *et al.*, 2015)

Cuerpo medio: es una estructura plasmática, formada por microtúbulos, a éstos se les ha asociado a funciones como división celular, construcción del disco suctor en células hijas y soporte de la región terminal donde no hay disco suctor y reserva de lipoproteínas (Thompson, 2004; Adam, 2001).

El disco suctor o adhesivo se localiza en la parte anterior, mide de 8 a 10 μm . La capacidad de adherencia del parásito a la mucosa de intestino es dada por mecanismos de hidroadhesión, ya que la membrana del disco contiene lectinas que se utilizan para la adhesión (Gadelha *et al.*, 2015; Adam 2001).

Núcleos: cuenta con dos núcleos de forma ovoide, con endosoma diferenciado, la membrana nuclear es delgada (Thompson, 2004; Adam, 2001). Ambos tienen la misma cantidad de DNA y son activos transcripcionalmente (Xin *et al.*, 2005).

Los trofozoítos en la superficie tienen un tipo de proteínas que pertenecen a la familia llamada Proteínas Variables de Superficie (VSP). Estas proteínas crean una interfaz entre el hospedero y/o medio y el parásito (Lujan, 2006).

En mamíferos el trofozoíto de *Giardia sp.* se encuentra en la parte superior del intestino delgado (Fiorillo *et al.*, 2014). Se han demostrado rasgos estructurales nucleares y funciones de éstos concluyendo que los nucléolos pueden estar presentes en *Giardia*. Estos nucléolos tienen algunas características distintivas: estas estructuras parecen ser estables a lo largo de la progresión del ciclo celular puesto que éstos se observaron en trofozoítos y quistes, sin embargo, la cinética detallada de su montaje necesita más investigación utilizando cultivos de *Giardia duodenalis* en crecimiento y en enquistamiento. Este problema se está estudiando actualmente (Jiménez *et al.*, 2008).

Quiste

Es la forma de resistencia al ambiente (Adam, 2001) ya que la pared glicoproteica externa protege al parásito de las condiciones adversas del ambiente por ejemplo de los desinfectantes (Lujan, 2006). Tiene un diámetro de 8 a 12 μm ; contiene cuatro núcleos; la pared tiene de 0.3 a 0.5 μm de grueso y dos membranas, es incoloro, carecen de mitocondrias, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y lisosomas (Thompson, 2004; Adam, 2001).

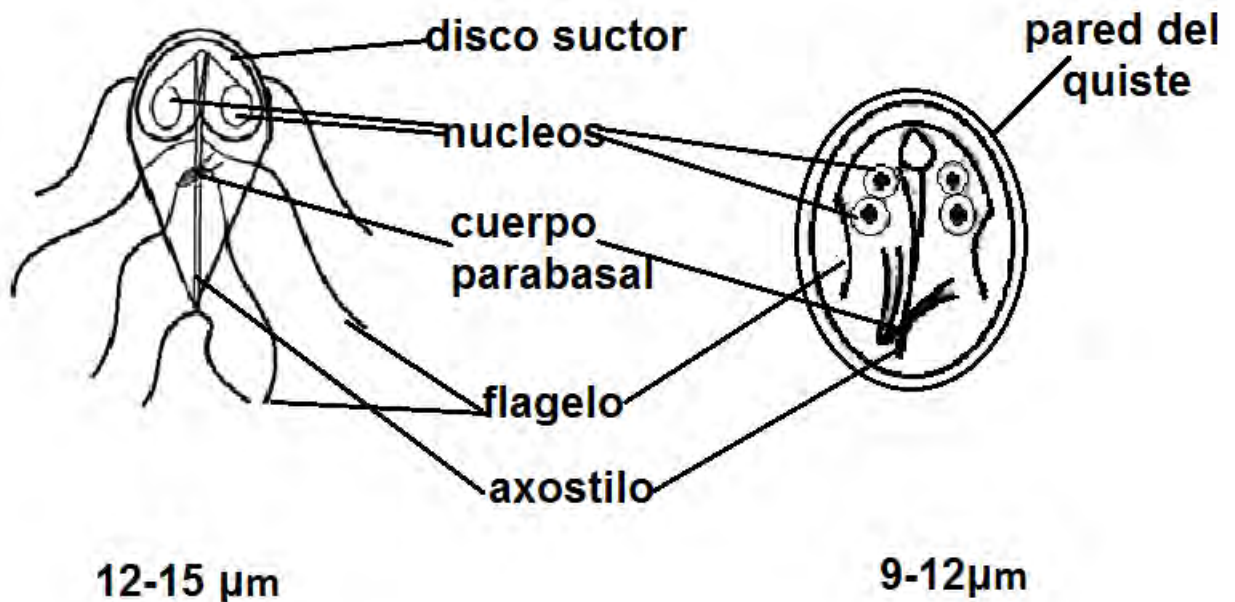


Figura 2. estadios de *Giardia duodenalis*. A) trofozoíto y B) quiste (tomado de https://o.quizlet.com/CWkd7STS-2Gqsm4IWeS3Wg_m.png)

2.3. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *G. duodenalis* es directo, ya que no tiene hospederos intermedios para completar su ciclo (Faubert, 2000). *G. duodenalis* tienen dos estadios en su ciclo de vida, el trofozoíto y el quiste (Adam, 200).

La infección inicia por la ingesta de quistes de *G. duodenalis*, éstos se desinquistan con el pH ácido del estómago, así liberan los trofozoítos en el intestino delgado (Lujan, 2006).

Los trofozoítos colonizan en el yuyeno, y dependiendo del estado inmunológico del huésped pueden encontrarse también en el duodeno (Indira y Herrera, 2005) y al encontrar un ambiente pobre en colesterol, induce la formación de quistes que son excretados con las heces (Lujan, 2006).

La humedad y la temperatura ambientales son factores muy importantes en el desarrollo del ciclo, al ser un parásito no específico, puede tener hospederos como mamíferos incluyendo al ser humano, entre otros animales domésticos (Lujan, 2006), además de algunos anfibios y aves (Yaoyu y Xiao, 2011).

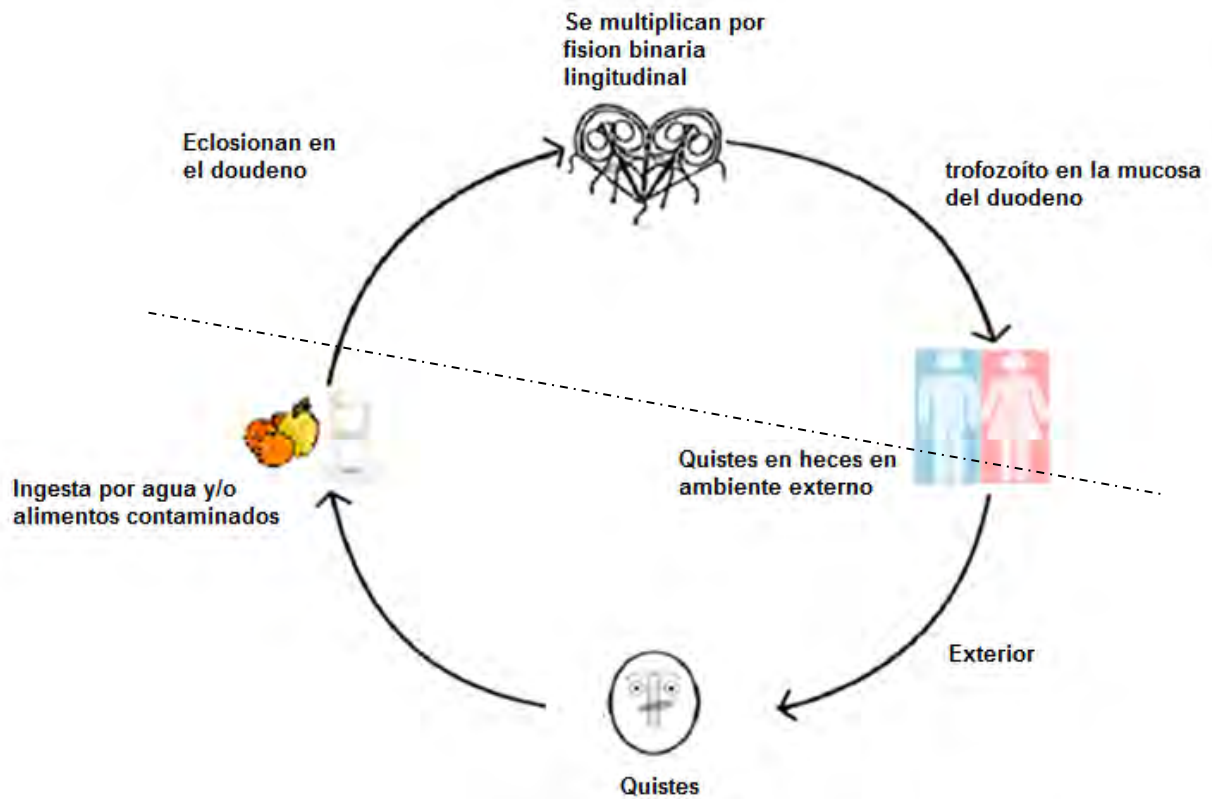


Figura 3. Esquema del ciclo de vida de *G. duodenalis*.

2.4. Mecanismos de transmisión

La infección de esta parasitosis inicia ingiriendo agua o comida contaminada con quistes de *G. duodenalis*. Se trasmite por la vía oral-fecal (Abossie y Seid, 2014).

Se asocia con malas condiciones sanitarias, principalmente en países en vías de desarrollo, también por viajes internacionales e inmigración para países desarrollados (Espelage *et al.*, 2010).

El mecanismo de transmisión puede ser de dos tipos: de humano a humano (antropomórfica) (Koehler *et al.*, 14); por ejemplo: una persona con quistes, al ir al baño y al no lavarse las manos enseguida prepara algo para comer a otras personas, éstas pueden infectarse. O de humano a animal (zoonótica) (Koehler *et al.*, 2014), es decir, cuando una persona igualmente va al baño y no se lava las manos, después juega con éstos (perro o gato) estos lamen sus manos y pueden infectarse.

2.5. Patogenicidad y mecanismos parasitarios

La Giardiosis puede tener diferentes manifestaciones clínicas, esto dependerá del tipo de interacción que se pueda establecer entre hospedero-parásito al ser infectado el ser humano (Almonili *et al.*, 2009).

Puede haber un portador asintomático o bien presentar una diarrea de larga duración con malabsorción (Espelage *et al.*, 2010). Los síntomas más comunes son: vómito, dolor epigástrico, náuseas y diarrea (Stadelman *et al.*, 2013), hasta llegar a una malabsorción de nutrientes en una infección crónica. En algunas ocasiones daña la mucosa intestinal, ocasionando una pérdida de proteínas más severamente en huéspedes inmunodeprimidos (Furtado *et al.*, 2014). Además puede causar complicaciones post infección, por la presencia del parásito, aun cuando éste ya se ha eliminado (Halliez y Buret, 2013).

Esta zoonosis también puede causar perturbaciones en el desarrollo físico y cognitivo en niños (Busatti *et al.*, 2013)

El trofozoíto por medio del disco en la parte ventral se adhiere a la parte superior del intestino. (Furtado *et al.*, 2014), a partir del cual se inicia un daño mecánico (Ponce *et al.*, 2008) con interacciones con lectinas y anexinas (Martínez *et al.*, 2014) produciendo daño epitelial por diferentes mecanismos bioquímicos (Ponce *et al.*, 2008).

La interacción de *G. duodenalis* con los enterocitos y células caliciformes induce a una reducción de α -actina, además de una reorganización de la F-actina y α -actina (Buret *et al.*, 2002), que debilita la barrera epitelial creando huecos en ésta. Se altera el equilibrio iónico celular, además genera lesiones en el borde de las microvellosidades y el epitelio (Martínez *et al.*, 2014), hay una malabsorción de Na^+ y D-glucosa (Troeger *et al.*, 2007). Se presenta diarrea (Martínez *et al.*, 2014), aumentando la permeabilidad intestinal por modificaciones en el epitelio. Así este parásito puede manipular el entorno para su supervivencia.

G. duodenalis puede competir con el hospedero por arginina para reducir la producción de óxido nítrico en las células epiteliales al estar en contacto con las VSP, cambiando la expresión de genes para las proteínas de superficie del trofozoíto y evita una respuesta inmune contra el parásito utilizando las interacciones proteína-proteína (Lujan *et al.*, 1995). Además de la reducción de hierro y/o zinc compite por los micronutrientes del huésped (Ponce *et al.*, 2008).

Las secreciones de proteasas protegen a los trofozoítos degradando la IgA secretada (Ponce *et al.*, 2008) para contrarrestar la respuesta inmune específica para *Giardia*. Estas mismas

secreciones de proteínas pueden actuar como caspasas y promueven la apoptosis de los enterocitos (Martínez *et al.*, 2014).

2.6. Taxonomía

Giardia duodenalis es una especie que taxonómicamente se conoce en la literatura médica y parasitológica por los sinónimos de *Giardia lamblia* y *Giardia intestinalis*, ya que estos nombres se usan de forma indistinta para distintas cepas de esta especie; pero el nombre adecuado y con el que manejará esta tesis es el de *Giardia duodenalis* (Filice, 1952). Aunque el otro es un sinónimo de acuerdo con las reglas de nomenclatura zoológica este es el único nombre adecuado para este parásito (Monis *et al.*, 2010).

Históricamente *G. duodenalis* fue observada por primera vez por Leeuwenhoek en 1681 en sus propias heces (DuPont, 2013). Sin embargo, la primera descripción detallada de este parásito la realizó Lambl en 1859, quien lo nombró *Cercomonas intestinalis* (Cox, 2002; Faubert, 2000).

Después Grassi en 1879, encontró otro género de *Giardia* en roedores, estos organismos tenían forma oval con 4 flagelos y con estructuras parecidas a núcleos. A estos los denominó *Dimorphus muris*. (Adam, 2001). Ya en 1881 cambió el nombre a *Megastoma entericum* (Vázquez y Campos, 2009).

Kuntler en 1883 describió éste organismo en renacuajos al que denomina *Giardia*, y fue la primera vez que se utilizó (Adam, 2001). Después Blanchar en 1888 sugiere el nombre de *Lamblia intestinalis*. En 1902 Stiles cambió el nombre a *Giardia duodenalis* (Adam, 2001; Thompson *et al.*, 2004). Por lo tanto se conserva este nombre y los sinónimos son *Giardia lamblia* y *Giardia intestinalis*, que se utilizan por la costumbre.

De acuerdo a la clasificación de Ruggiero *et al.*, 2015, *Giardia duodenalis* por poseer núcleo se encuentra dentro del Súper-reino Eukaryota. Por ser un parásito con apariencia asimétrica y con ranura de alimentación se encuentra dentro del súpergrupo de los Excavata. En el Phylum Metamonada por la presencia de flagelos en grupos de cuatro, asociados con el núcleo y pertenece al Sub-phylum Trichoza por no tener mitocondria, hidrogenosomas y peroxisomas (Cavalier-Smith, 2003a).

Súper-reino: Eukaryota (Chatton, 1925)

Reino: Protozoa (Goldfuss, 1818)

Sub-reino: Eozoa (Cavalier-Smith, 1997)

Infra-reino: Excavata (Cavalier-Smith 2002 -- Simpson 2003)

Phyllum: Metamonada (Grassé, 1952 -- Cavalier-Smith 1987)

Sub-phyllum: Trichoza Cavalier-Smith 1997

Clase: Eopharyngea Cavalier-Smith, 1993

Orden: Diplomonadida Wenyon 1926, emend. Brugerolle *et al.*, 1975

Familia: Giardiidae Kulda y Nohy'nkova' 1978

Género: *Giardia* Roger, *et al.*, 1998; Morrison *et al.*, 2001;
Tachezy-Horner y Embley, 2001)

Especie: *Giardia duodenalis* (Stiles, 1902)

2.7. Especies

Existen 7 especies de *Giardia*: *G. agilis* (Kunstler 1882), *G. ardae* (Noller 1920), *G. duodenalis*, *G. muris* (Grassi 1879; Benson 1908), *G. psittaci* (Erlandsen and Bemrick, 1987), *G. microti* (Benson 1908) y *G. varani* (Lavier 1923); ésto está relacionado con el tipo de hospedero al que parasitan.

En la tabla 1 se muestran algunas características de cada especie (Ryan y Cacciò, 2013; Yaoyu y Xiao, 2011).

Cuadro 1. Características morfológicas de las diferentes especies de *Giardia*.

Especies	Características morfológicas	Tamaño largo/ ancho μm	Hospederos	Referencia
<i>G. agilis</i> (Kunstler 1882)	Cuerpo medio en forma lagrimea	20-30/4-5	Anfibios	(Thompson, 2004; Adam, 2001)
<i>G. muris</i> (Grassi 1879; Benson 1908)	Cuerpo medio redondo	9-12/5-7	Aves Roedores	(Thompson, 2004; Adam, 2001)
<i>G. duodenalis</i> (Stiles 1902)	Cuerpo medio en forma de clava	12-15/6-8	Mamíferos	(Thompson, 2004; Adam, 2001)
<i>G. ardae</i> (Noller 1920)	Cuerpo medio pleomórfico que carece de flagelo caudal y con muesca en disco ventral	Aprox. 10/ Aprox. 6.5	Garzas	(Thompson, 2004; Adam, 2001)
<i>G. psittaci</i> (Erlandsen and Bemrick, 1987)	Cuerpo medio en forma de clava, sin flanco ventrolateral	Aprox. 14/ Aprox. 6	Loros y papagayos (Psitácidos)	(Thompson, 2004; Yaoyu y Xiao, 2011)
<i>G. microti</i> (Benson 1908)	Cuerpo medio en forma de clava, quistes con dos trofozoítos con discos ventrales maduros		Topos y roedores	(Yaoyu y Xiao, 2011; Adam, 2001)
<i>G. varani</i> (Lavier 1923)	Carece de cuerpos medios	-----	Varano (<i>Varanus salvator</i>)	(Ryan y Cacciò, 2013; Yaoyu y Xiao, 2011)

2.8. Ensamblajes

Giardia tiene una gran variedad de hospederos, esto ha causado diferencias moleculares en algunas cepas, algunos autores sugieren que *G. duodenalis* se encuentra en un proceso de especiación (Ryan y Cacciò, 2013).

Los ensamblajes A y B corresponden a los humanos y otros primates principalmente (Patti *et al.*, 2014; Martínez *et al.*, 2014; Plutzer *et al.*, 2010). C y D mayormente se encuentran en perros. El ensamblaje E se encuentra comúnmente en animales de ganadería. En felinos se encuentra el ensamblaje F. El G en ratas (Manuscript, 2012; Plutzer *et al.*, 2010). Por último el H se encuentra en mamíferos marinos principalmente (Ryan y Cacciò, 2013; Yaoyu y Xiao, 2011). En el cuadro 2 se muestran las especies propuestas en conjunto con sus hospederos.

Cuadro 2. Especies propuestas para cada ensamble de *Giardia duodenalis*.

Ensamble	Especies propuestas	Hospederos	Referencia
A	<i>G. duodenalis</i> (Stiles 1902)	Humanos y otros primates, rumiantes, cerdos, caballos, caninos, gatos, hurones, roedores, marsupiales y otros mamíferos	(Plutzer <i>et al.</i> , 2010; David <i>et al.</i> , 2014)
B	<i>G. duodenalis</i> (Stiles 1902)	Humanos y otros primates, ganado, perros, caballos, conejos, castores, ratas	(Plutzer <i>et al.</i> , 2010; David <i>et al.</i> , 2014)
C y D	<i>G. canis</i> (Hegner 1922)	Caninos	(Plutzer <i>et al.</i> , 2010) (Martínez <i>et al.</i> , 2014)
E	<i>G. bovis</i> (Fanthan 1921)	Rumiantes domésticos y cerdos	(Manuscript 2012; Plutzer <i>et al.</i> , 2010)
F	<i>G. cati</i> (Deschiens 1925)	Gatos	(Manuscript, 2012)
G	<i>G. simodi</i>	Topos y ratones	(Manuscript, 2012; Plutzer <i>et al.</i> , 2010)
H	-----	Mamíferos marinos y gaviotas	(Ryan y Cacciò, 2013; Yaoyu y Xiao, 2011)

2.9. Inmunología

Giardia coloniza primordialmente el duodeno y el yeyuno, ambos de los cuales son ambientes hostiles que limitan la supervivencia de los microbios debido a sus altas concentraciones de enzimas digestivas y bilis. El moco que es secretado por las células caliciformes intestinales protege a las células epiteliales de las enzimas digestivas e impide el acceso de patógenos al epitelio, incluyendo *Giardia*. Los péptidos antimicrobianos (AMP) son péptidos pequeños (<40 aminoácidos). Se producen por una variedad de células huésped, incluyendo células de Paneth epiteliales (López *et al.*, 2015).

Las células epiteliales intestinales pueden sintetizar óxido nítrico (NO), que tienen actividades citotóxicas e inmunomoduladoras. El NO se produce enzimáticamente a partir de L-arginina por la acción de la NO sintasa (NOS). Se ha demostrado que el NO inhibe el proceso de exquistación y también induce un efecto citostático sobre los trofozoítos de *G. duodenalis*. Los genotipos B y E

de trofozoítos son más susceptibles a NO que el genotipo A, lo que sugiere que el NO actúa de manera genotipo-dependiente (López *et al.*, 2015).

Pero *Giardia* puede inhibir la producción de NO tomando el consumo de arginina como fuente de energía; produciendo ornitina, lo que puede inhibir la captación de arginina por el epitelio intestinal, la falta de arginina induce a apoptosis en líneas celulares humanas.

Los macrófagos derivados de los órganos linfoides (Alparó, 2005) y de la leche pueden engullir trofozoítos de *Giardia* tanto *in vitro* como durante la infección. Los neutrófilos pueden participar como efectores durante la Giardiosis. La incubación de neutrófilos polimorfonucleares humanos (PMN) con trofozoítos de *Giardia* y suero hiperinmune desencadena una respuesta oxidativa en PMN. Se ha demostrado que la IL-5 desempeña un papel central en el desarrollo de eosinófilos, activación y supervivencia. Los mastocitos son reconocidos actualmente como células efectoras de la respuesta inmune contra varios parásitos.

Los mastocitos también pueden contribuir a la supervivencia de las células B, la activación y la diferenciación en células plasmáticas, impulsando el desarrollo de respuestas inmunes humorales orientadas IgA.

Las células dendríticas (DC) actúan en la eliminación de *Giardia*, este es un activador de las DC. Las giardias lisadas y proteínas de secreción- excreción pueden activar la maduración de las DC causando un aumento de la expresión de citosinas pro inflamatorias, tales como IL-6, TNF- α , IL-12, y moléculas de superficie, como CD80, CD86, moléculas de MHC II. En consecuencia, la presencia de *Giardia* puede activar la maduración y migración de DC al sitio de la infección (López *et al.*, 2015).

Las células de los micropliegues (M), encargadas de llevar el material extraño del lumen intestinal a los tejidos linfoides por transporte transepitelial. Las células M y DC pueden estar implicados en el transporte de antígenos de *Giardia*-específicos a los órganos inmunes locales y sistémicas. Las células M podrían permitir el movimiento de los antígenos específicos para *Giardia* en las placas de Peyer, las DC inducen la baja regulación de uniones estrechas de modo que puedan migrar a otros sitios e inducir mecanismos inmunes adaptativos.

La citosina más elevada durante la Giardiosis es IL-6, ésta induce las respuestas celulares innatas y también diferenciación de células B. IL-6 y IL-17 participan en el desarrollo de las células T CD4 + Th17, que median primeros mecanismos inmunes adaptativos. Los linfocitos Th17 juegan un

papel importante en la eliminación de *Giardia*. Otra citosina que es liberada durante la infección es TNF α .

La primera respuesta inmune es local, da una solución espontánea, pero no es completamente exitosa. Al iniciar una detección de antígeno de *G. duodenalis*, se incrementan los linfocitos y se activan las células T (CD4) (Alparó, 2005), después se promueve la formación de anticuerpos y por último una respuesta inflamatoria celular (Indira y Herrera, 2005; Dreesen *et al.*, 2014). Las células T CD4 + son importantes mediadoras de la eliminación *Giardia*, las células T CD8 + desempeñan el papel de la inmunopatología de la enfermedad (López *et al.*, 2015).

Giardia requiere respuestas inmunes humorales y celulares de la mucosa, tales como la respuesta equilibrada de las células T CD4 + específicas, la liberación de citocinas, incluyendo IL-6, TNF α , IFN γ y IL-4, y la producción de anticuerpos IgA o IgG específicos contra antígenos del parásito (Abdel *et al.* 2013). Los anticuerpos, en particular del isotipo IgA, contribuyen al mantenimiento de la inmunidad protectora contra la Giardiasis, se pueden detectar en la saliva humana y la leche materna (López *et al.*, 2015).

La respuesta inmune celular aún no se determina por completo para ésta enfermedad (Furtado *et al.*, 2012). Pero las células CD4 tienen memoria específica para este parásito, que producen interleucinas para generar una respuesta humoral, después se formarán anticuerpos contra el antígeno producido por el parásito, donde se podrá controlar y posiblemente eliminar la infección (Indira y Herrera, 2005).

2.10. Distribución geográfica y epidemiología

Giardia duodenalis es un parásito cosmopolita (Reyes *et al.*, 2014) causando enfermedades intestinales en humanos y otros animales. Casi 2 millones de personas se infectan con este parásito en todo el mundo. Se reportan 500, 000 casos nuevos al año (Hoque *et al.*, 2002).

El reporte de prevalencia de esta parasitosis depende de factores como área geográfica, grupo de estudio, sensibilidad a los métodos de diagnóstico, accesibilidad a cuidados médicos (Escobedo *et al.*, 2014); además de las características socioeconómicas, como condiciones de pobreza y la deficiencia de infraestructura (Sánchez *et al.*, 2000). En el cuadro 3 se muestran algunos casos reportados en el mundo sobre esta parasitosis. La Organización Mundial de la salud (OMS) indican que unas 3,500 millones de personas están infectadas por parásitos intestinales, presentando una mortalidad de aproximadamente el 10 % de las diarreas (Espinoza *et al.*, 2015).

Afecta a niños principalmente y adultos. Los signos y síntomas son: vómito, dolor epigástrico, náuseas, diarrea y mala absorción de nutrientes; provoca pérdida del desarrollo cognitivo y físico (Minetti *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2013; Busatti *et al.*, 2013). Los síntomas clínicos dependen de la cantidad de parásitos y el grado de infección (Espinoza *et al.*, 2015).

En México, esta parasitosis intestinal es una de las principales causas de morbilidad, (Sánchez *et al.*, 2000). La frecuencia de la parasitosis en toda la República Mexicana es muy variable, con cifras que fluctúan del 2% al 39% (Vázquez y Campos, 2009). Se demostró una prevalencia de 44.6% de casos de enfermedades diarreicas son causados por *Giardia duodenalis* en un estudio realizado en 2015 (Espinoza *et al.*, 2015), algo que afecta la salud pública, principalmente en niños.

Actualmente esta parasitosis se considera como una infección re-emergente debido al aumento de su frecuencia y por la transmisión zoonótica y antropomórfica (Indira y Herrera, 2005).

Cuadro 3. Prevalencia de Giardiosis en el mundo.

País/ localidad	# de muestras	Edad	# de casos +	Referencia
Etiopía	400	5-15	11.7	Abossie y Seid, 2014
Rwanda	119	Prescolares	20	Niyizurugero <i>et al.</i> , 2013
España	211	1-16	34	Goñi <i>et al.</i> , 2010
Venezuela	191	Niños y adolescentes	82.120	Espinoza <i>et al.</i> , 2015
Bolivia	305	Niños y adolescentes	81.9	Espinoza <i>et al.</i> , 2015

Cuadro 4. Casos reportados de Giardiosis en México.

País-localidad	# de muestras	Edad	# de casos +	Referencia
Ciudad de México (Xochimilco)	986	0-5	8.7	Cifuentes <i>et al.</i> , 2004
Ciudad de México	200	0-1	50	Sánchez <i>et al.</i> , 2006
Ciudad de México	81	19 aprox.	44.6	Espinoza <i>et al.</i> , 2015
Ciudad de México	3643	1-59	53.3	Cedillo <i>et al.</i> , 2009

2.11. Diagnósis y tratamiento

Hay diferentes técnicas para detección de parásitos, las más comunes en cualquier lugar del mundo son las coproparásitoscópicas que son por las que se pueden obtener y/ o detectar la presencia del parásito. Otro tipo de técnicas utilizadas son fluido duodenal, biopsia, frotis yuyenal y prueba String, que es la obtención de moco con la cápsula de gelatina (Rajurkar *et al.*, 2012).

Las técnicas microscópicas más especializadas no se utilizan cotidianamente ya que se necesita personal especializado para el manejo de estos instrumentos, pero se puede utilizar la microscopia electrónica y confocal, entre otras (Rajurkar *et al.*, 2012), éstas se utilizan para morfología y diagnóstico.

Las pruebas moleculares más utilizadas son: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis, para un análisis más detallado de los datos obtenidos (Goering, 2000). inmunofluorescencia directa, ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) y prueba inmunocromatografica (Rajurkar *et al.*, 2012) sirven para la identificación de especies o ensamblajes de *G. duodenalis*. Otra técnica comúnmente utilizada para el mantenimiento y expansión de parásito es el cultivo in vitro (Rajurkar *et al.*, 2012).

Para identificar trofozoítos y quistes de *G. duodenalis* en México se utiliza: las muestras coproparásitoscópicas en fresco o directo, de concentración FAUST y Formol Tritón Eter (FTE) (Gutiérrez *et al.*, 2012). Para una mejor observación del quiste, además de las técnicas de tinción más comunes como: hierro-hematoxilina, tinción tricromica y giemsa. (Rajurkar *et al.*, 2012).

En caso de no detectar la presencia de *G. duodenalis* mediante el examen anterior, pero aun existe la sospecha de que el agente causal de la sintomatología de un individuo se puede recurrir a técnicas inmunológicas, mediante el uso de anticuerpos o inmunoensayos como ELISA, ésta es una de las pruebas más específicas para detección de este parasito (Chakarova, 2010).

Para el tratamiento de ésta parasitosis se utilizan medicamentos de amplio espectro, tales como: metronidazol, tinidazol, albendazol, mebendazol y nitazoxanida. En México se recurre frecuentemente al uso de fármacos de la familia 5-nitroimidazoles. En el cuadro 5 se muestran los tipos de antiparasitarios que se pueden utilizar en México; todos con tratamiento de 3 a 7 días, excepto tinidazol que solo se maneja monodosis (Gutiérrez *et al.*, 2012).

Cuadro 5. Tipos de antiparasitarios utilizados en *Giardia duodenalis*

Familia del fármaco	Variantes	Modo de acción	Referencia
Bencimidazoles	Albendazol y Mebendazol	Inhibición de la polimerización del citoesqueleto e interferencia con la captación de glucosa.	(Reyes <i>et al.</i> , 2014)
5-nitroimidazoles	Metronidazol, Secnidazol, Tinidazol y Ornidazol	Dimerización del DNA, causando daño en el mismo.	(Reyes <i>et al.</i> , 2014)
Furazolidona	Furoxona	Inhibe la enzima mono- amino-oxidasa	(Reyes <i>et al.</i> , 2014) (Ansell <i>et al.</i> , 2015)
5-Nitrotiazol	Nitazoxanida	Reducción y oxidación de DNA	(Ansell <i>et al.</i> , 2015)
Quinacrina	Atabrine y Mepacrine	Interfiere en la duplicación del DNA	(Ansell <i>et al.</i> , 2015)
Paromomicina	Hematina	Inhibe síntesis de proteínas	(Vicens y Westh, 2001; Ansell <i>et al.</i> , 2015)

2.12. Anticuerpos monoclonales (AcMo)

Una herramienta específica para el diagnóstico y tratamiento de la Giardiosis son los anticuerpos monoclonales o inmunoglobulinas que forman parte del sistema inmune humoral. Los anticuerpos son glucoproteínas específicas que se producen en las células B. Los anticuerpos monoclonales son capaces de unirse con alta especificidad y afinidad a una molécula, en este caso el antígeno (Machado *et al.*, 2006).

Los anticuerpos monoclonales (AcMo) se empezaron a producir en 1975 por Georges Köhler y Cesar Milstein, consistía en la obtención de una línea celular que pudiera secretar un isótopo determinado de inmunoglobulina contra un antígeno específico (Machado *et al.*, 2006).

Los principales isotipos de inmunoglobulinas humanas tienen características estructurales únicas que les permiten realizar funciones específicas inmunes (Irani *et al.*, 2015).

Los primeros anticuerpos quiméricos humanos se crearon a partir de 1985 en ratones y en 1986 se incorporó la técnica de humanización de anticuerpos (Machado *et al.*, 2006).

La respuesta inmunológica específica se desarrolla cuando un organismo ha sido expuesto a uno o varios antígenos, origina una respuesta policlonal y produce anticuerpos contra un rango amplio

de estructuras presente en los antígenos. Al contrario de éste, la respuesta monoclonal se da por la selección de una sola clona de células que produce un anticuerpo para un antígeno específico (Machado *et al.*, 2006).

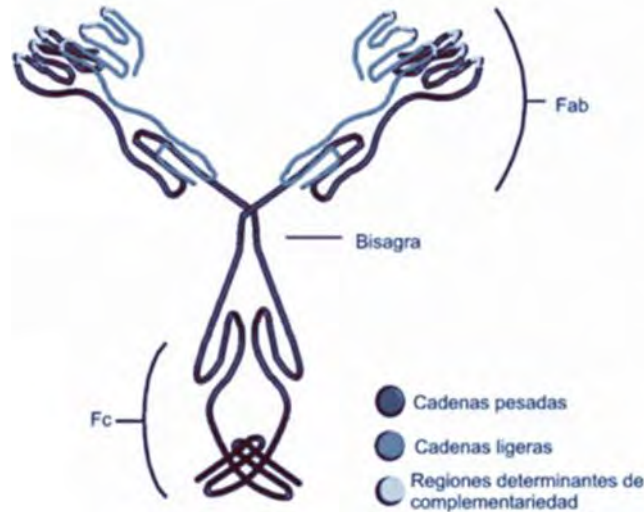


Figura 4. Imagen de la estructura general de los anticuerpos, donde se muestra la fracción de reconocimiento antigénico (Fab) y la fracción cristalizante (Fc). (Tomado de Machado *et al.*, 2006.)

Los anticuerpos se dividen en una fracción el reconocimiento antigénico (Fab) y una fracción cristalizante (Fc) que interactúa con una variedad de moléculas accesorias para mediar funciones efectoras como la citotoxicidad celular (Irani *et al.* ,2015).

Con respecto a la relación hospedero- agente infeccioso, los anticuerpos monoclonales son una herramienta para completar estudios funcionales y de diagnóstico, para encontrar blancos terapéuticos y vacunas, entre otras cosas (Machado *et al.* ,2006).

Algunas aplicaciones de los anticuerpos monoclonales son: detectar y cuantificar niveles de expresión de genes; determinar la localización de la expresión de genes a diferentes niveles desde celular hasta tejidos; identificación de interacciones moleculares como la inmuno precipitación, identificación de marcadores fenotípicos únicos de un tipo celular; inmuno diagnóstico de enfermedades infecciosas y sistémicas; diagnóstico y tratamiento de tumores específicos; análisis funcionales de moléculas de la superficie celular o de proteínas (Machado *et al.* ,2006).

Los anticuerpos monoclonales también pueden ser utilizados para profundizar en otro tipo de estudios como en la interacción hospedero-parasito, inmunomarcaje, entre otros.

El inmunomarcaje es una técnica para marcar proteínas específicas de una célula, por medio de la utilización de anticuerpos. En este trabajo se enfocara el inmunomarcaje entre receptores de membrana que participan entre la interacción parásito- hospedero.

En México se han hecho algunos trabajos con anticuerpos monoclonales, principalmente en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) con la producción de estos para investigación principalmente y en el Instituto Nacional de Pediatría.

El trabajo de González-Rete es el primer trabajo en México hasta el momento en el que se utiliza la producción de anticuerpos monoclonales (AcMo) contra quistes de ensamble E de *Giardia*.

3. Planteamiento del problema

La Giardiosis es un problema de salud de la población a nivel mundial, en México el 44.6% de casos de enfermedades diarreicas son causados por *Giardia duodenalis* (Espinoza *et al.*, 2015), por lo que es un problema de salud pública, más frecuente en niños de entre 0 a 12 años de edad.

En la actualidad se han descubiertos aislados que al parecer son invasivos como es el caso de la cepa *Giardia intestinalis* INP220806-HGINV, por este motivo es importante generar herramientas para el estudio de la interacción hospedero– parásito para poder obtener un diagnóstico más rápido y eficaz para dar tratamientos específicos a los pacientes con Giardiosis en una etapa temprana de la enfermedad.

4. Hipótesis

La obtención de un anticuerpo monoclonal contra *Giardia duodenalis* (Cepa INP220806-HGINV), servirá como una herramienta en el inmunomarcaje de trofozoítos de *Giardia* para complementar los estudios de histológicos así como en el diagnóstico de esta parasitosis.

5. Objetivo General:

- Obtener un anticuerpo monoclonal para la inmunodetección de trofozoítos de *Giardia duodenalis* utilizando la cepa INP220806-HGINV.

6. Objetivos Particulares:

- Inmunizar ratones con trofozoítos de *Giardia duodenalis* (*Giardia intestinalis* INP220806-HGINV) para la producción de anticuerpos.
- Obtener un anticuerpo para trofozoítos de *Giardia duodenalis* (*Giardia intestinalis* cepa INP220806-HGINV)
- Titular el anticuerpo monoclonal contra el antígeno de *Giardia duodenalis* para conocer su inmunogenicidad
- Acoplar a FITC (isotiocinato de fluoresceína) al anticuerpo monoclonal para dar fluorescencia al anticuerpo
- Realizar el inmunomarcaje de trofozoítos de *Giardia duodenalis* con el anticuerpo para probar su especificidad.

7. Métodos

7.1. Material biológico

- Se utilizaron trofozoítos de *Giardia doudehalis* (*Giardia intestinalis* INP220806-HGINV), cepa donada por el Laboratorio de Parasitología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría.
- Trofozoítos de *Trichomonas vaginalis* donados por el Laboratorio de Parasitología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría.
- Ooquistes de *Cryptosporidium sp.* y quistes *Giardia doudehalis*. Ambos fueron obtenidos de un paciente del Instituto Nacional de Pediatría. Se aislaron de muestras frescas de heces y no se cultivaron.
- Células de mieloma X63Ag8.653 donada por el laboratorio de anticuerpos monoclonales del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE).
- Cinco ratones hembras de la cepa BAL/c de cuatro semanas de destete donados por el Bioterio del Instituto Nacional de Pediatría.
- Conejo hembra de aproximadamente 1 mes de nacido donado por el Bioterio del Instituto Nacional de Pediatría.

7.2. Cultivos

- Para el cultivo de trofozoítos de *Giardia doudehalis* de la cepa INP220806-HGINV se utilizó el medio TY1-S-33 en tubos de 8 ml, a 37°C. se hicieron cambios de medio cada tercer día. Siguiendo el método descrito por Guillard, 1973 se tomaron los tubos con aislados en fase log.

Para la obtención de los trofozoítos de *Giardia doudehalis* se centrifugaron a 2500 rpm y se hicieron tres lavados con PBS el botón obtenido. Las observaciones y cuantificación de trofozoítos se realizaron con la cámara de Neubauer y un microscopio Óptico Olympus Bx4. La concentración del cultivo se detrmino con la siguiente fórmula:

Núm. de trofozoítos totales / Núm. de cuadrantes x Factor de dilución (100) x 10000.

Los trofozoítos contados se sometieron a tres ciclos de congelación-descongelación con nitrógeno y temperatura ambiente para romper las células, después se centrifugaron a 2500 rpm y el sobrenadante se utilizó como la proteína soluble extraída de los trofozoítos, esto se utilizó como antígeno. A lo obtenido se le agregaron inhibidores de proteínas. Ésto se cuantificó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

- Para el cultivo de trofozoítos de *Trichomonas vaginalis* se utilizó medio TYS (ver anexo) en tubos de 8 ml, a 37°C. Haciendo cambios de medio cada tercer día. Se tomaron los tubos con aislados en fase log. Se obtuvieron y cuantificaron con el método Guillard, (1973).
- Las células de mieloma X63Ag8.653 antes de cultivarse se descongelaron en agua tibia. Éstas se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 min, el sobrenadante se decantó. Al botón se le añadió medio DMEM con suero fetal bovino al 10%. El cultivo de células X63Ag8.653 se realizó en medio DMEM con suero fetal bovino al 10% y se hicieron tres cambios medio cada tercer día y se mantuvieron a 37°C.

7.3. Ensayos in vivo

- A las cinco hembras BALB/c se extrajeron 200 µl de sangre obtenida de la cola. La sangre se centrifugó a 3500 rpm por 5 min y el suero se almacenó a -4°C.
- Se inmunizaron cinco ratones BALB/c con 10,000 trofozoítos de *Giardia doudehalis* de la cepa INP220806-HGINV.
- Quince días después de la primera inoculación se volvió a tomar una muestra de sangre de la cola y se le hizo el mismo procedimiento mencionado. Se inoculó nuevamente, se repitió 3 veces más.
- Con todas las muestras de sangre se hizo una titulación de cada ratón, el más alto tuvo la mejor respuesta inmune.

7.4. Obtención del Anticuerpo Monoclonal

- Después de las inoculaciones de *G. doudehalis* a los cinco ratones, con los sueros obtenidos se hizo una titulación. Se eligió a curva más alta para sacrificar al ratón correspondiente por dislocación cervical, este ratón se esterilizó en alcohol, se limpió la parte del peritoneo y se extrajo el bazo, este se colocó en una caja de Petri con organza y DMEM sin suero fetal bovino, después se maceró con el embolo de una jeringa. Lo obtenido se colocó en un tubo de 50 ml, se centrifugó a 1200 rpm por 5 min y se decantó el sobrenadante.
- Las células X63Ag8.653 se despegaron de la caja de cultivo y se centrifugaron, el sobrenadante se decantó y se juntaron con las células del bazo en un solo tubo de 50 ml se lavaron nuevamente con DMEM sin SFB y se adicionó: 0.5 ml de Polietilenglicol durante 1 min, 5 ml de DMEM sin SFB durante 3 min y 15 ml de DMEM sin SFB durante 1 min. El tubo se centrifugó y el sobrenadante se decantó. El botón se resuspendió con DMEM y

HAT con SFB al 10% y se colocaron 200µl por pozo de una placa de cultivo de 96 pozos. Se utilizaron 5 placas.

- Después de 15 días se realizó el cambio a DMEM con HT y SFB al 10%, se escogieron los pozos con un mejor crecimiento. Con la finalidad de seleccionar los hidridomas productores de anticuerpos se les hace un ELISA (ver anexo) con antígenos de *G. duodenalis*, la placa se leyó a 490 nm.
- Los pozos que salieron por arriba del valor de corte en la prueba de ELISA se utilizaron para inocular a un ratón para hacer ascitis y se dejó dos semanas hasta que al ratón se le note el abdomen abultado, después se sacrificó por dislocación cervical.
- El líquido ascítico obtenido se colocó en una placa de cultivo y se volvió a hacer una prueba de ELISA para la elección de células.
- Los pozos más altos de la prueba de ELISA se seleccionaron para la clonación por dilución limitante para obtención de anticuerpos monoclonales. Cada uno se probó con una ELISA.
- Los anticuerpos obtenidos se purificaron utilizando el kit Montage Spin Columns with PROSEP-G media. Después esto purifico el anticuerpo con kit Montage antibody kit and spin columns with PROSEP-A Media usando la ley Beer-Lambert.
- Para el acoplamiento de FITC a IgG se realizó de acuerdo a la metodología que describió Gutiérrez., *et al.*, (2007); los anticuerpos se dializaron toda la noche, 1mg del anticuerpo, con solución de carbonatos y se hicieron dos cambios de la solución. Se preparó una concentración de 1mg / mL de FITC en DMSO y se tomaron 50 µL para mezclarlo con el anticuerpo y se dejó en oscuridad durante toda la noche a temperatura ambiente y en movimiento. Para quitar el FITC que no se conjugó se volvió a dializar con solución de carbonatos durante toda la noche y se dieron tres cambios o más de PBS. Se hicieron alícuotas y se guardó en congelación y cubierto de la luz.
- Para el inmunomarcaje se tomaron 10 µL de trofozoitos de *Giardia duodenalis* y *Trichomonas vaginalis* y se colocaron en un portaobjetos y se dejó secar. Después se le añadió una gota de metanol sobre los trofozoítos y se dejó secar. Se hizo un pozo de plastilina y se colocó sobre la periferia de la muestra fija de trofozoítos. Dentro del pozo se le añadió 500 µL de la siguiente dilución: 10 µL de anticuerpo acoplado a FITC y 990 µL de PBS. Se dejó en oscuridad por 30 min y se lavó la muestra con PBS. Se observó en un Microscopio Confocal Olympus 1x81.
- Para comparar la especificidad del anticuerpo monoclonal se hizo un anticuerpo policlonal, inoculando a un conejo, con aproximadamente 10, 000 trofozoítos, y 15 días se volvió inocular, esto se repitió por tres ocasiones más. Antes de cada inoculación se tomó una

muestra de sangre para monitorear su respuesta inmune. Para probar su inmunogenicidad se le realizó una ELISA (este fue un trabajo previo del laboratorio).

8. Resultados

8.1. Cuantificación de trofozoítos

Se cuantificaron 34,6000,000 en un tubo de 8 ml.

Esta cuenta se hizo por triplicado.

8.2. Monitoreo de respuesta inmune de los ratones

En la **Figura 5** se muestra la respuesta inmune de los ratones en diferentes tiempos. El ratón 3 mostró una mayor producción de anticuerpos con respecto a los demás ratones.

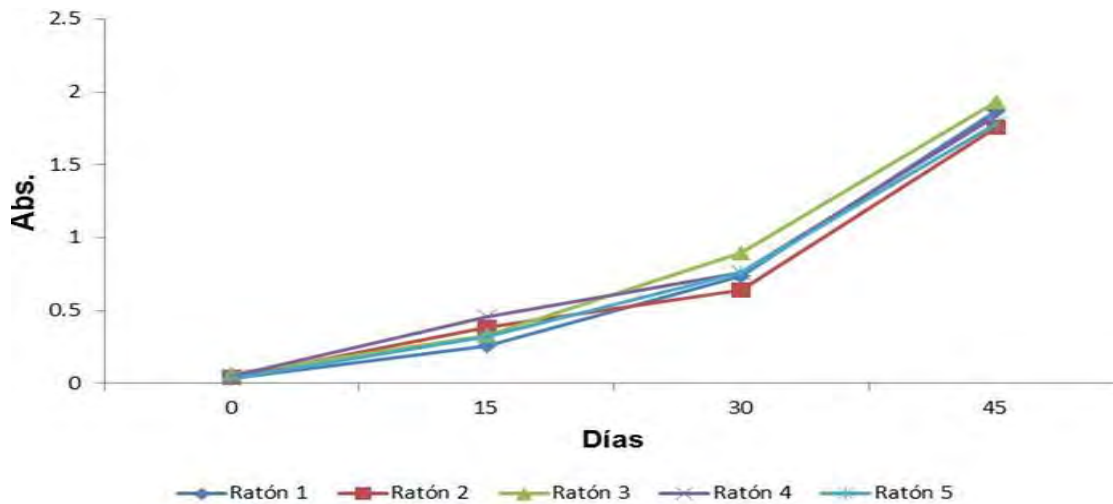


Figura 5. Absorbancia de sueros positivos de ratones inmunizados con trofozoítos de *G. duodenalis*.

8.3. Titulación de la respuesta inmune de los ratones

La titulación del suero a los 45 días, nos muestra cual ratón tiene una mayor producción de anticuerpos. Como se puede observar en la **Figura 6** casi todos los ratones tienen absorbancias muy parecidas, estadísticamente no sabemos si esta diferencia fue significativa con respecto a los otros ratones.

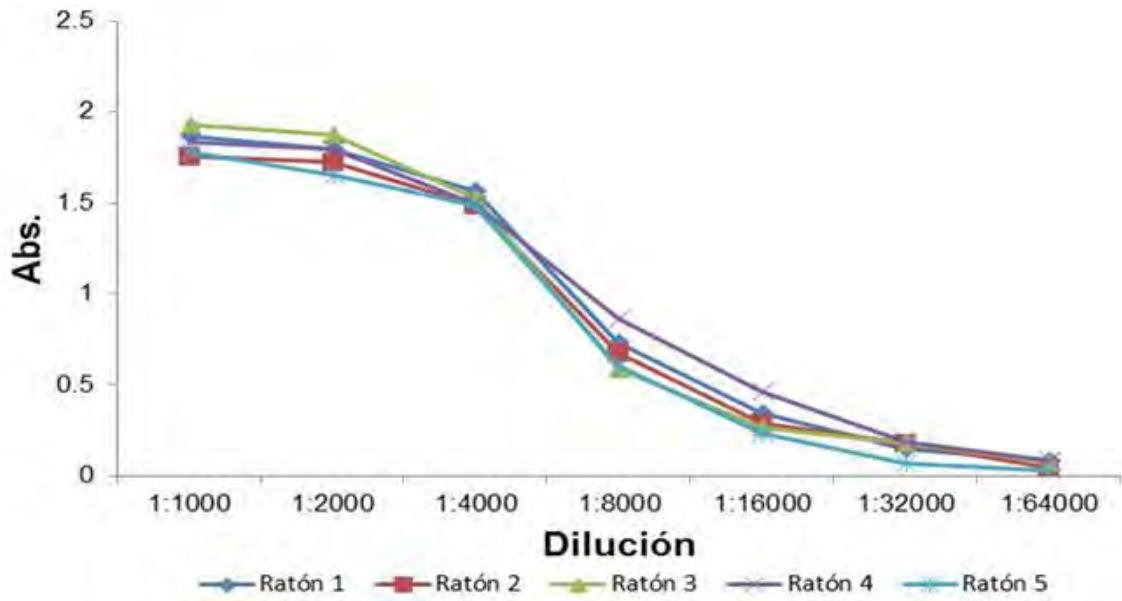


Figura 6. Titulación del suero de los cinco ratones a los 45 días de inoculación con XXXX.

8.4. Fusión

Las células del bazo y las células de mieloma, se fusionaron con poli etilenglicol y DMEM sin SFB, obteniendo híbridomas que se mantienen en DMEM con 10% de SFB y en una incubadora a 37°C.

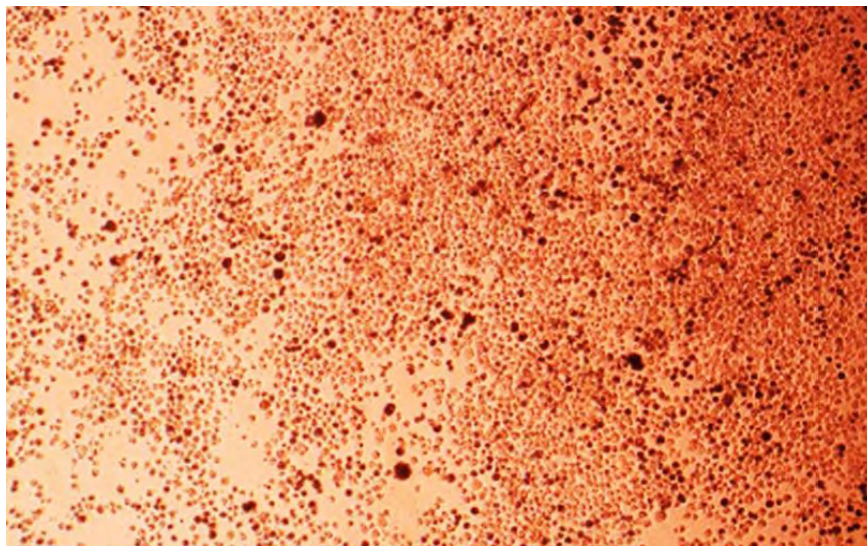


Figura 7. Híbridomas en una placa de 96 pozos.

8.5. Ensayo por inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA)

Se probaron todos los pozos que contenían hibridomas con la técnica de ELISA, todos los pozos que dieron por encima del valor de corte se clonaron por dilución limitante. De estos pozos clonados se volvieron a probar con la técnica de ELISA, para posteriormente inocularlos en ratones y generar ascitis.



Figura 8. Reacción de ELISA positiva.

Al leer la microplaca de ELISA de 96 pozos con hibridomas se obtuvo lo siguiente:

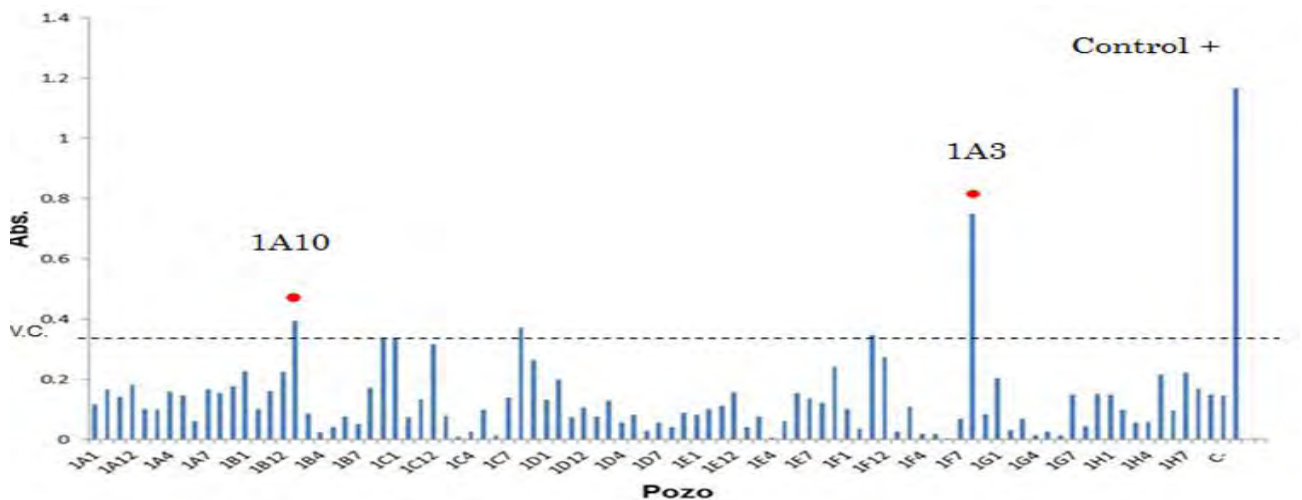


Figura 9. Absorbancia de los sobrenadantes de hibridomas, se tomaron dos pozos por arriba del valor de corte (V.C.) (se representa con línea punteada) indicados con un punto rojo (1A10 y 1A3).

Del cual se obtuvo la clona: **1A10 D4E3** al cual se utilizó como anticuerpo monoclonal y con el que se realizaron las siguientes pruebas de sensibilidad.

8.6. Producción de ascitis

De las placas de cultivo de la clonación se obtuvieron absorbancias altas, los pozos fueron 1A3 y 1A10. Ambos pozos se inocularon a un ratón respectivamente por vía intraperitoneal.

Con el fin limpiar las células y obtener una mayor cantidad de éstas.

Después de 2 semanas se obtuvo ascitis del pozo 1 A10. La ascitis se colocó en una caja de cultivo de 50 ml y días después se criopreservaron esos híbridomas.

El pozo 1 A3 no produjo ascitis.



Figura 10. Inyección intraperitoneal del híbridomas para producción de ascitis.

8.7. Clonación celular por dilución limitante

Antes de clonar por dilución limitante en toda la microplaca de 96 pozos se inició haciendo una dilución doble seriada solo en una fila de la placa, des ésta manera se obtendrían pozos altos y de esos se haría otra dilución igual. Por último se realizó la clonación como se explica en la metodología



Figura 11. Pozo de microplaca en clonación

8.8. Cuantificación de anticuerpo

El anticuerpo purificado se cuantificó de acuerdo con la siguiente fórmula de ley Beer-Lambert y se obtuvo:

0.0252 mg/mL

Convirtiendo en microgramos se obtuvo

250 µg/mL

8.9. Inmunofluorescencia del anticuerpo monoclonal

El anticuerpo monoclonal obtenido de *Giardia duodenalis* fue comparado con un anticuerpo policlonal obtenido previamente en este laboratorio.

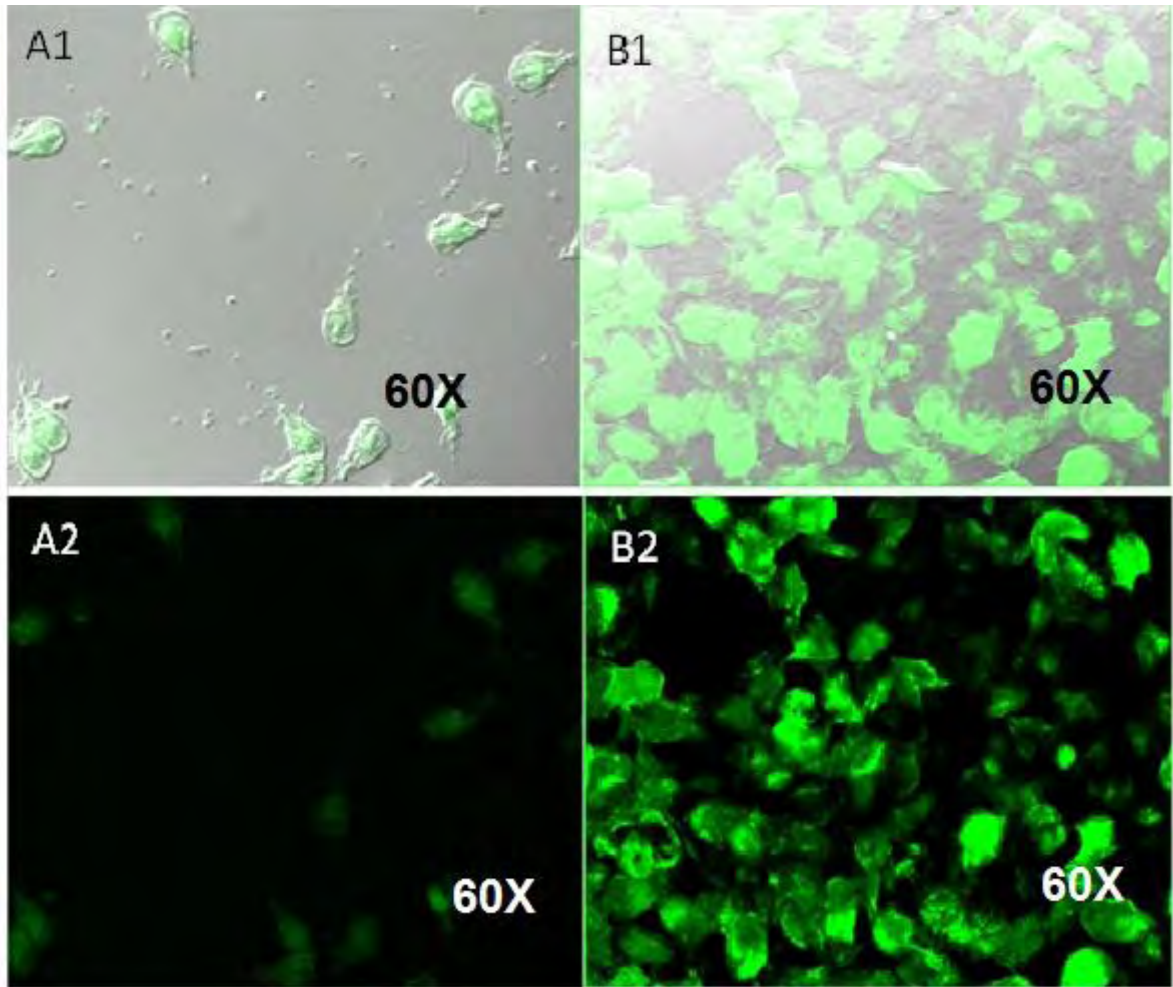


Lámina 1. Inmunomarcaje de trofozoítos de *Giardia duodenalis*. A) Con el anticuerpo monoclonal marcado con FITC. B) Con los anticuerpos policlonales marcados con FITC. 1) Microscopía de Nomarski y 2) Solo la marca del anticuerpo.

En la lámina 1 se observó que el anticuerpo monoclonal solo fluoresció dentro del trofozoíto de *Giardia duodenalis*, mientras que el anticuerpo policlonal lo hace en todo el trofozoíto del parásito. Esto demostró que el monoclonal es más específico que el policlonal.

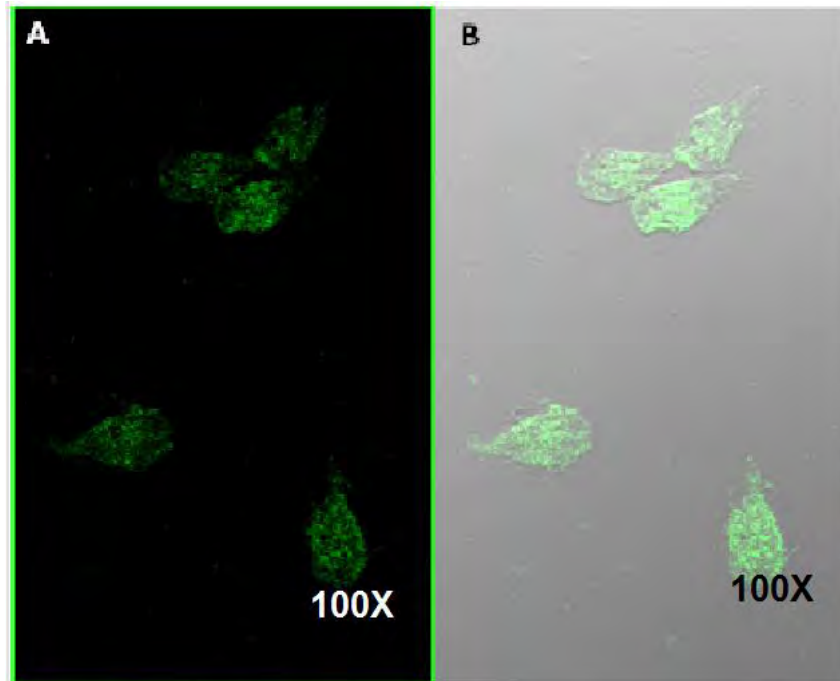


Lámina 2. Acercamiento de los trofozoitos marcados con el anticuerpo monoclonal, A) solo el anticuerpo y B) microscopia de Nomarski.

En la **Lámina 2** se muestra un acercamiento de trofozoítos de *Giardia duodenalis*, aquí se puede observar como la superficie del parásito no es iluminada, sino la parte de adentro, es decir el citoplasma. Podemos decir que la proteína que está detectando el anticuerpo está distribuida dentro del trofozoíto. Se puede apreciar que los núcleos ni los flagelos están iluminados.

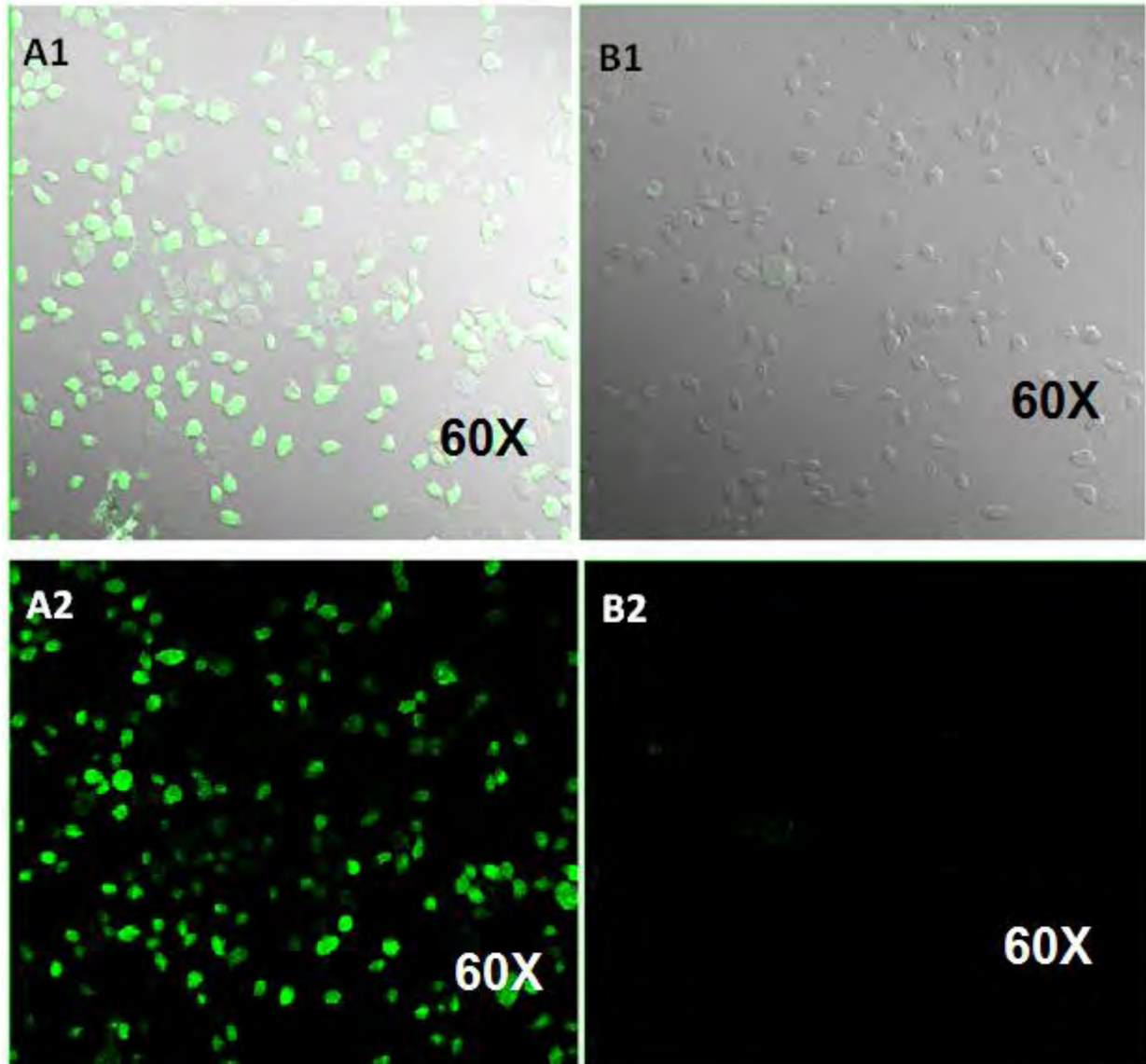


Lámina 3. Inmunomarcaje de trofozoítos de *T. vaginalis*. A) Con los anticuerpos policlonales marcados con FITC. B) Con el anticuerpo monoclonal marcado con FITC. 1) Microscopia de Nomarski y 2) Solo la marca de los anticuerpos.

El esquema anterior nos muestra que el anticuerpo policlonal al igual que en *G. duodenalis* tiñe todo el trofozoíto de *T. vaginalis*, mientras que el anticuerpo monoclonal solo pinta algunas células, esto tal vez se debe a la fase en la que se encuentren las mismas, expresándose una proteína específica o igual a las que se encuentran en *G. duodenalis*.

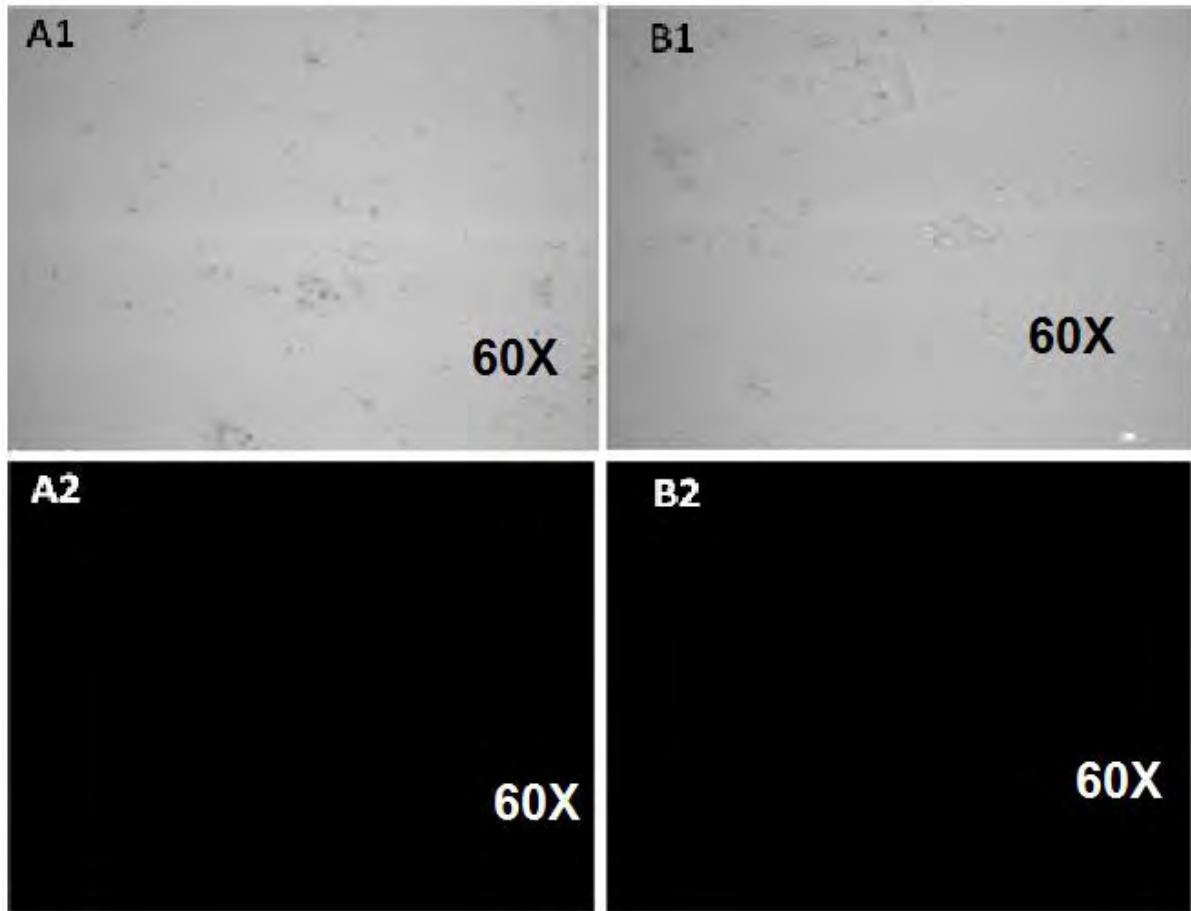
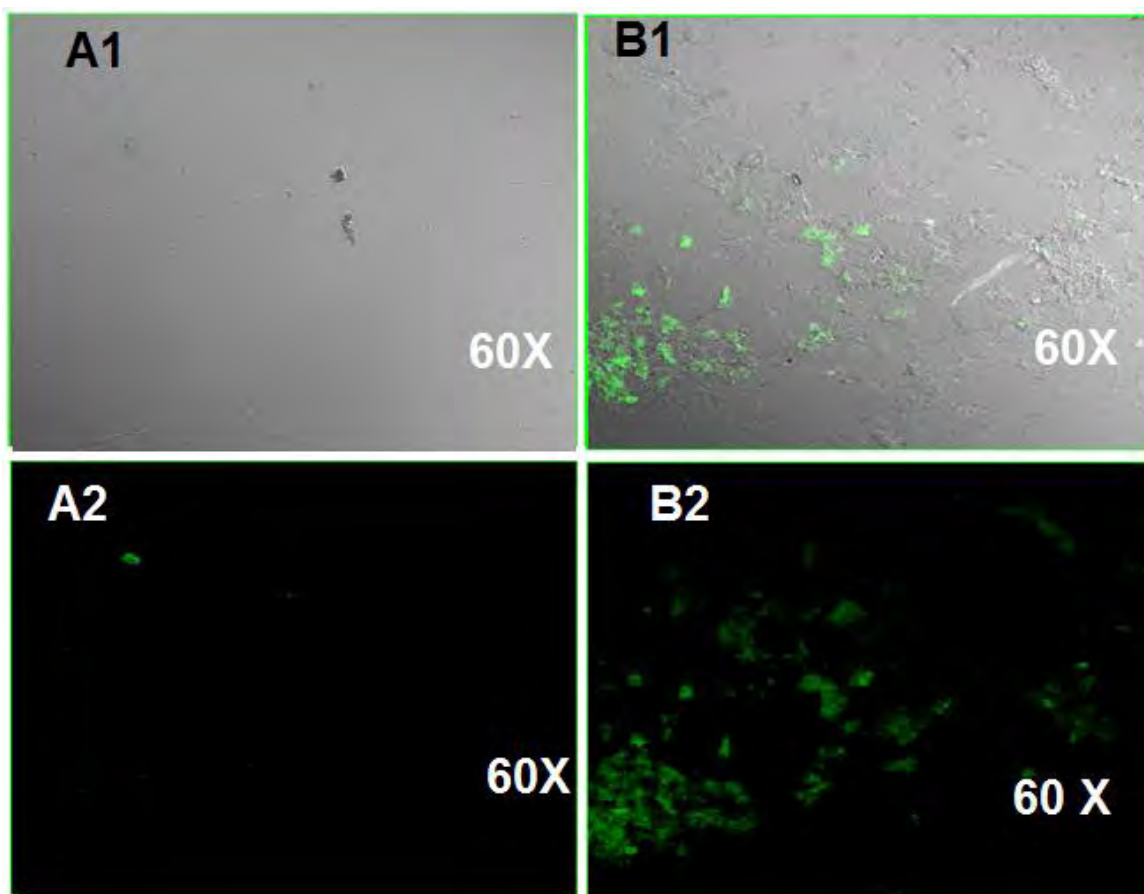


Lámina 4. Inmunomarcaje de quistes de *Giardia duodenalis*. A) Con el anticuerpo monoclonal marcados con FIT. B) Con los anticuerpos policlonales marcado con FIT. 1) Microscopia de Nomarski y 2) Solo la marca de los anticuerpos.

En la lámina 4 se muestra que el anticuerpo tanto policlonal como monoclonal no son sensibles a epítopes de quistes de *Giardia duodenalis*, por esto ambos anticuerpos no fluorescen, ya que es un estadio diferente del trofozoíto seguramente las proteínas que se encuentran en dicho estadio no están presentes en la forma quiste.



Lamina 5. Inmunomarcaje de ooquistes de *Cryptosporidium* sp. A) Con el anticuerpo monoclonal marcados con FIT. B) Con los anticuerpos policlonales marcado con FIT. 1) Microscopia de Nomarski y 2) Solo la marca de los anticuerpos.

Como se muestra en la imagen anterior en el policlonal fluorescen todos los restos de material celular, en cambio en el AcMo fluoresce un punto donde no hay ooquiste, posiblemente es el remanente del FIT, por un mal enjuague del portaobjetos.

Cuadro 6. Determinación de reactividad del AcMo 1A10 D4 E3 en diferentes muestras

Parasito	Reactividad	Observaciones
Trofozoito de <i>G. duodenalis</i>	Positivo	Fluoresce el citoplasma, los núcleos no están iluminados, ni tampoco los flagelos
Quiste de <i>G. duodenalis</i>	Negativo	No se observa fluorescencia
Trofozoito de <i>T. vaginalis</i>	Positivo	Solo algunas células fluorescen
Ooquistes de <i>Criptosporidium</i>	Negativo	No se observa fluorescencia

9. Discusión

Para la evaluación del anticuerpo monoclonal obtenido para este trabajo (1A10 D4 E3) se probó con trofozoítos de *Giardia duodenalis* de la cepa *Giardia intestinalis* INP220806-HGINV, con quistes de *Giardia duodenalis*, trofozoítos de *Trichomonas vaginalis* y con ooquistes de *Cryptosporidium sp.*

En la **figura 5** se observó que el ratón 3 tuvo una respuesta inmune más elevada al parásito, comparado con los demás ratones, ya que la gráfica muestra la línea más elevada que las otras. Esto se corroboró en la **figura 6**, donde se muestra la titulación de todas las inoculaciones en cada uno de los ratones; el ratón 3 había tenido una mejor respuesta al parásito y una alta producción de anticuerpos para este tipo de infección, seguido del ratón 4. Por esto se utilizó el ratón 3, y en caso de que no pudiera salir el anticuerpo se utilizaría el ratón 4.

Los resultados de la inmunización son importantes porque no se utilizó ningún tipo de adyuvante, por lo tanto los antígenos que están reconociendo son altamente inmunógenos, ya que a la segunda inmunización tenemos una respuesta positiva y sigue aumentando con el número de inmunizaciones. En comparación con el trabajo de Saura (2012), donde se utilizó el adyuvante emulsionado (Sigma Adjuvant System, Sigma Aldrich) al igual que en el trabajo de Hernández, (2008) que también utilizaron adyuvante (Adyuvante completo de Freud) para la obtención de una respuesta inmune alta.

Se obtuvo la clona 1A10 D4 E3, el cual se utilizó como anticuerpo monoclonal positivo. Comparando estos resultados con los descritos en el trabajo de González (2012), se obtuvo un AcMo que detecta algunas proteínas de trofozoítos de *Giardia duodenalis* en fase de enquistamiento de ensamble E, a diferencia del obtenido en este trabajo, que detecta trofozoítos que no están en fase de enquistamiento y que la cepa utilizada en este proyecto se encuentra entre los ensambles A y B.

En el trabajo de Jiménez, *et al.*, (2014) ellos realizan la producción de anticuerpos monoclonales para detectar el tipo de respuesta Th1 o Th2 además de la expresión de ciertas citosinas, al infectar ratones BALB/c con quistes de *G. duodenalis*, mostrando que los anticuerpos no solo sirven para pruebas de diagnóstico sino para inmunología y biología molecular.

En la **lámina 1** se muestra el anticuerpo monoclonal acoplado a trofozoítos de *G. duodenalis*, el campo A1 muestra el anticuerpo monoclonal marcado con FIT con microscopia de Nomarski, en el campo A2 se muestra la marca del anticuerpo en el trofozoíto; mientras que en campo B1 se

muestra el anticuerpo policlonal con microscopia de Nomarski y en la B2 la parte fluorescente del trofozoíto.

En esta lámina se pudo observar que, en comparación con el anticuerpo policlonal solo se acopla a la parte del citoplasma del parásito. Podemos decir que el anticuerpo si se puede usar para la detección de *G. duodenalis*.

Una de las expectativas para este trabajo podría ser la elaboración de un Western blot. En el trabajo de Quintero *et al.* (2013), además de la obtención del anticuerpo monoclonal contra antígeno de *G. duodenalis* se realizó un Western blot, para medir el tamaño de las proteínas detectadas por el AcMo

Como se observa en la **lámina 2**, mostró una mejor resolución de la imagen, la parte del citoplasma del trofozoíto es la que florece. En el campo B se puede apreciar como la circunferencia de trofozoíto no fluoresce por el anticuerpo, rectificando que el AcMo obtenido solo detecta proteínas citoplasmáticas de *Giardia duodenalis*.

En el campo A se puede observar que no se florece completamente la parte interna del trofozoíto, sino que son una serie de puntos específicos, principalmente en el área central de dicho parásito, sin contar los núcleos, ya que estos tienen proteínas diferentes a las de citoplasma. Sobre los flagelos, estos tampoco fluorescen, eso quiere decir que el epítotope que reconoce este anticuerpo no se desarrolla en *ésta* parte superficial del cuerpo de trofozoíto.

En un principio solo se quería saber la especificidad del anticuerpo ante *G. duodenalis*, pero se pensó que una comparación con otro parásito nos daría una mejor idea de que tan específico es, así que se decidió acoplarlo a un parásito cercanamente relacionado porque posiblemente el anticuerpo monoclonal podría detectar un grupo taxonómico. Así que se comparó con *Trichomonas*, otra especie de metamonadidos de importancia médica para el ser humano.

Para saber si el anticuerpo monoclonal además del grupo taxonómico detectaba alguna otra proteína de un grupo distinto, por ejemplo, de parásitos intestinales se pensó utilizar un parásito que no tenga parentesco taxonómico como *Cryptosporidium*. Este se utilizó porque se obtuvo de paciente pediátrico de Instituto Nacional de Pediatría

Al comparar con *Trichomonas vaginalis* (**lámina 3**) hay varias células iluminadas, tanto con el anticuerpo monoclonal (Campo B) como con el policlonal (campo A), esto nos dice que cierto grupo de proteínas que se encuentran en el citosol, componen a ambos parásitos (*G. duodenalis* y

T. vaginalis) demostrando que son taxonómicamente cercanos (Cavalier-Smith, 2003; Ruggiero, et al. ,2015).

Refiriéndonos a *T. vaginalis*, tienen un ciclo donde solo se encuentra como trofozoíto, y considerando esto se observó que solo las células que se piensa que estaban en la última etapa del ciclo celular fluoresce, es decir, que los componentes del parásito cambian dependiendo de la etapa del ciclo. O posiblemente al escoger un tubo de parásitos que estaban en estrés por falta de nutrientes en el medio, ciertas proteínas se expresan en condiciones de estrés o cuando hay un exceso en nutrientes, por esto creemos que solo algunas fluoresce. También es necesario conocer más a fondo el ciclo de vida de *T. vaginalis* para poder saber porque solo las células más grandes y circulares son las únicas que se iluminan con el anticuerpo monoclonal.

En comparación con el anticuerpo obtenido en el proyecto de Hernández (2008) se inmunizo a los ratones hembras con trofozoítos de *T. vaginalis* para la obtención de un anticuerpo monoclonal susceptible a antígeno del parásito antes mencionado.

En la **lámina 4** se hace una prueba con la fase resistente de *Giardia duodenalis* para saber si el anticuerpo se podría utilizar para diagnóstico de ambas fases de este parásito. Se observó que tanto el anticuerpo monoclonal como el policlonal no detecta ningún epítipo, porque no fluoresce ningún tipo de anticuerpo. Esto nos indica que en la fase de quiste la proteína que detecta el anticuerpo no está presente en el quiste o posiblemente no se encuentra en la pared del quiste este tipo de proteína a la que se une el anticuerpo, y al ser tan gruesa no permite hacer el reconocimiento interno.

Esto demostró que los componentes de ambas fases de *Giardia* son muy distintos, y que al hacer las inoculaciones a los ratones con trofozoítos solo se desarrollaron anticuerpos contra esta fase, tal vez si se hubieran utilizado quistes no se reconocerían los trofozoítos al acoplarlos. Quizá si se rompe el quiste podría fluorecer el anticuerpo ya que la proteína que detecta el AcMo se encuentra en el citoplasma del parásito

Por tanto el anticuerpo no se puede usar como prueba diagnóstica en quistes obtenidos en materia fecal.

Para saber si el anticuerpo monoclonal además del grupo taxonómico detectaba alguna otra proteína de un grupo distinto, por ejemplo, de parásitos intestinales se pensó utilizar un parásito que no tenga parentesco taxonómico como *Cryptosporidium* sp. éste se utilizó porque se obtuvo de paciente pediátrico de Instituto Nacional de Pediatría.

En la **lámina 5** no se registró fluorescencia, esto indica que el AcMo podría ser exclusivo del grupo taxonómico de metamonadidos, lo que podría ayudar para distinguir a otros parásitos que formen parte de este grupo. Se deberán hacer más pruebas con otros parásitos taxonómicamente cercanos por ejemplo diplomonadidos y parabasalidos.

La obtención del anticuerpo se pensó solo utilizarlo para el diagnóstico (inmunomarcaje) de Giardiosis, sin la necesidad de personal especializado en pruebas de detección y diagnóstico; pero como se mostró en la **lámina 3** también se podría utilizar para detectar Trichomoniasis. Sería bueno probar el anticuerpo con las otras especies de para saber si se puede generalizar.

El anticuerpo también podría usarse en otro tipo de pruebas como histoquímicas, por ejemplo, en un corte de intestino, para marcarnos la presencia de residuos de *Giardia doudevalis*, si es que no se encuentra este, o si solo se tiene la presente la fase de resistencia.

Sería conveniente saber a qué proteínas se está uniendo el anticuerpo específicamente, hacer pruebas como un Western blot y otras pruebas de biología molecular serían ideales para la caracterización del anticuerpo monoclonal.

Por último, el contenido del trabajo se manejó con *Giardia doudevalis* (Filice, 1952), y aunque el otro es un sinónimo (*Giardia intestinalis*) de acuerdo con las reglas de nomenclatura zoológica este es el único nombre válido para este parásito (Monis, *et al.*, 2010). La relevancia de esto radica en homogenizar el lenguaje científico y evitar confusiones.

Con el desarrollo de los ensambles, por ejemplo, se podría reconocer que existen especies crípticas que son potencialmente autógenas del humano, entonces sería pertinente esclarecer solo una especie de *Giardia* que infecta al humano.

De esta forma la giardiosis se puede definir como una enfermedad con agente etiológico del género *Giardia* como ocurre en otras parasitosis ocasionadas por protozoos, por ejemplo leishmaniosis y malaria.

10. Conclusión

- Se obtuvo la clona **1A10, 1D4, 1E3** que se tomó como anticuerpo monoclonal contra *G. duodenalis*.
- El AcMo no es específico para la cepa INP220806-HGINV de *Giardia duodenalis*, ya que en algunas células de *Trichomona vaginalis* se observaron marcas del anticuerpo.
- El anticuerpo se puede utilizar para inmunomarcaje de *G. duodenalis* en estudios inmunohistoquímicos.

11. Bibliografía

- Abdel, E. H., Belal, U. S., Abdellatif, M. Z. M., Naoi, K., y Norose, K. (2013). Breast-feeding protects infantile diarrhea caused by intestinal protozoan infections. *Korean Journal of Parasitology*, 51(5), 519–524. doi:10.3347/kjp.2013.51.5.519
- Abossie, A. y Seid, M. (2014). Assessment of the prevalence of intestinal parasitosis and associated risk factors among primary school children in Chenchu town, Southern Ethiopia. *BMC Public Health*, 14(1), 166. doi:10.1186/1471-2458-14-166
- Adam, R. D. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 447–469. doi:10.1128/CMR.14.3.447
- Almonili, A., Martin, D., Montonte, A., Fonte L. (2009). Giardiasis extraintestinal entre realidades y mitos. *Rev Haban cienc med La Habana Vol. VII N°2*.
- Alparo I. (2005). Giardiasis y desnutrición. *Rev Soc Bol Ped* 2005; 44 (3): 166 – 73.
- Ansell, B. R. E., McConville, M. J., Ma'ayeh, S. Y., Dagley, M. J., Gasser, R. B., Svård, S. G., y Jex, A. R. (2015). Drug resistance in *Giardia duodenalis*. *Biotechnology Advances*, 33(6), 888–901. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.04.009
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Buret, A. G., Mitchell, K., Muench, D. G., y Scott, K. G. E. (2002). *Giardia lamblia* disrupts tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor. *Parasitology*, 125(Pt 1), 11–19. doi:10.1017/S0031182002001853
- Busatti, H. G. N. O., Alves, R. J., Santana, K. G., Gil, F. F., Cury, M. C., Vannier, M. a., y Gomes, M. a. (2013). Effects of metronidazole analogues on *Giardia lamblia*: Experimental infection and cell organization. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75(2), 160–164. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.001
- Cavalier-Smith, T. (1987). The origin of eukaryotic and archaebacterial cells. *Ann N Y Acad Sci* 503, 17–54.
- Cavalier-Smith, T. (1993). Kingdom Protozoa and its 18 phyla. *Microbiol Rev* 57, 953–994.
- Cavalier-Smith, T. (1997). Amoeboflagellates and mitochondrial cristae in eukaryotic evolution: megasystematics of the new protozoan subkingdoms Eozoa and Neozoa. *Arch Protistenkd*

147,237–258.

- Cavalier-Smith, T. (2002). The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 297–354.
- Cavalier-Smith, T. (2003). Protist phylogeny and the high-level classification of Protozoa. *European Journal of Protistology*, 39(4), 338–348. doi:10.1078/0932-4739-00002
- Cavalier-Smith, T. (2003a) The excavate protozoan phyla Metamonada Grasse emend. (Anaeromonadea, Parabasalia, Carpediemonas, Eopharyngia) and Loukozoa emend. (Jakobea, Malawimonas): their evolutionary affinities and new higher taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2003), 53, 1741–1758 DOI 10.1099/ijs.0.02548-0
- Chakarova B. (2010). Comparative evaluation of the diagnostic methods for detection of *Giardia intestinalis* in humans fecal samples. *Tjs* 8 (s2):174-179.
- Chatton, E. (1925). *Pansporella perplexa* réflexions sur la biologie et la phylogenese des Protozoaires. *Ann Sci Nat Biol Anim Zool* (10e sér) 8, 6–84 (in French).
- Chen T.; Chen S.; Wu, H; Lee T; Lu Y ;Wu L; Ni Y.; Sun Ch.; Yu W.(2013). Persistent gut barrier damage and commensal bacterial influx following eradication of *Giardia* infection in mice. *Gut Pathogens*, 5(1), 26. doi:10.1186/1757-4749-5-26
- Cedillo R ;Leal A, Yépez L , Gómez A , Ortega G , Tapia R y Muñoz O (2009). Seroepidemiology of Giardiasis in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 80(1), 2009, pp. 6–10.
- Cifuentes E., Suárez L., Espinosa M., Juárez L, y Martínez A. (2004). Risk of *Giardia intestinalis* infection in children from an artificially recharged groundwater area in Mexico City. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(1), 65–70. doi:10.1097/00001648-200611001-01045
- Cox, F. E. G. (2002). History of Human Parasitology. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(4), 595–612. doi:10.1128/CMR.15.4.595
- David, E. B., Patti, M., Coradi, S. T., Oliveira, T. C. G., Ribolla, P. E. M., y Guimaraes, S. (2014). Molecular typing of *Giardia duodenalis* isolates from nonhuman primates housed in a Brazilian zoo. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 56(1), 49–54. doi:10.1590/S0036-46652014000100007
- Dreesen, L., Bosscher, K. De, Grit, G., Staels, B., Lubberts, E., y Bauge, E. (2014). *Giardia muris*

Infection in Mice Is Associated with a Protective Interleukin 17A Response and Induction of Peroxisome, 82(8), 3333–3340. doi:10.1128/IAI.01536-14

DuPont, H. L. (2013). *Giardia*: Both a harmless commensal and a devastating pathogen. *Journal of Clinical Investigation*, 123(6), 2352–2354. doi:10.1172/JCI69932

Espelage, W., an der Heiden, M., Stark, K., y Alpers, K. (2010). Characteristics and risk factors for symptomatic *Giardia lamblia* infections in Germany. *BMC Public Health*, 10, 41. doi:10.1186/1471-2458-10-41.

Espinoza-Muñoz, D. Y;Gómez-Gómez, N. E. (2014).Prevalence of gastrointestinal parasite in the indigenous community of Seminke of Wiwa shelter, in Sierra Nevada de Santa Marta.iMedPub Journal. Vol. 11 No. 2:6 doi: 10.3823/1248.

Faubert, G. (2000). Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(1), 35–54. doi:10.1128/CMR.13.1.35-54.2000

Fiorillo, A., di Marino, D., Bertuccini, L., Via, A., Pozio, E., Camerini, S., ... Lalle, M. (2014).. *PloS One*, 9(3), e92902. doi:10.1371/journal.pone.0092902

Furtado, A. K., Cabral, V. L. R., Santos, T. N., Mansour, E., Nagasako, C. K., Lorena, S. L., y Pereira-Filho, R. A. (2012). *Giardia* infection: Protein-losing enteropathy in an adult with immunodeficiency. *World Journal of Gastroenterology*, 18(19), 2430–2433. doi:10.3748/wjg.v18.i19.2430

Gadelha, A. P. R., Benchimol, M., y de Souza, W. (2015). Helium ion microscopy and ultra-high-resolution scanning electron microscopy analysis of membrane-extracted cells reveals novel characteristics of the cytoskeleton of *Giardia intestinalis*. *Journal of Structural Biology*, 190(3), 271–278. doi:10.1016/j.jsb.2015.04.017

Guillard, R. R. L. (1973). Division rates. En:Handbook of Phycological Methods. Stein, J.R. (ed.). Cambridge University Press, Cambridge, 289-312 pp

Goering, R. V.(2000)Molecular Strain Typing for the Clinical Laboratory: Current Application and Future Direction. *Clinical Microbiology Newsletter* Vol. 22, No. 22 November 15, 2000.

Goñi, P., Aldana, D. E., Clavel, A., Seral, C., Remacha, M. A., y Castillo, F. J. (2010). Prevalencia de *Giardia duodenalis* genotipo B en humanos en Zaragoza, España. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clinica*, 28(10), 710–712. doi:10.1016/j.eimc.2010.04.010

Gonzalez, B. (2012). Obtencion de anticuerpos monoclonales contra antígenos de quistes de

Giardia intestinalis del ensamble E. Tesis de licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.

Grasse P. (1952). Classe des zooflagelles: Zooflagellata ou Zoomastigina (Euflagellata Claus 1887). Generalités. In *Traite de Zoologie*, vol. 1, fasc. 1, pp. 574–578. Edited by P.-P. Grasse. Paris:Masson (in French).

Gutiérrez, C. E. J., Samón, C. T., Miranda, A. A., Fernández, D. G., Higginson, C. D., Sierra G. G., Schade. R. (2007). Obtención de un conjugado anti IgG de ratón - FITC mediante la tecnología IgY para uso como anticuerpo secundario en la detección de antígenos de superficie celular. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 38(1), 85-89.

Gutiérrez, A; Martínez A; Gonzalez E; Sifuentes C; Acosta M; Martínez E J y Vázquez R (2012). Prevención, diagnóstico y tratamiento farmacológico de la Giardiasis en niños y adolescentes de 1 a 18 años en el primer y segundo nivel de atención. Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud. México. Secretaría de salud. Pp 45.

Halliez, M. C. M., y Buret, A. G. (2013). Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World Journal of Gastroenterology*, 19(47), 8974–8985.
doi:10.3748/wjg.v19.i47.8974

Hernandez, H M. (2008). Evaluación de la inmunogenicidad y la capacidad protectora de la proteínasa de 62 kDa de *Trichomonas vaginalis* en la Trichomonosis experimental en ratones. Tesis de Doctorado en Ciencias de la salud. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” de la Habana. 90 pp.

Hoque, M. E., Lay-yeec, R., y Hope, T. (2002.). Original Report Risk of Giardiasis in Aucklanders : a case-control study. *International Journal of Infectious Diseases*, 6(3), 191-197.
doi:10.1016/S1201-9712(02)90110-4

Indira, D., y Herrera, A. (2005). Giardiasis y desnutrición, 44(3), 166–173.

Irani, V., Guy, A. J., Andrew, D., Beeson, J. G., Ramsland, P. a., y Richards, J. S. (2015). Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases. *Molecular Immunology*.
doi:10.1016/j.molimm.2015.03.255

Jimenez L F; Zavala, G.; Chavez, B.; Ramos M P.;López G;Chavez B, Segura, M.L.; Montañez C; B. Hell A.; Arguello R; Ortega G. (2008). Identification of nucleoli in the early branching protist *Giardia duodenalis*. *International Journal for Parasitology*, 38(11), 1297–1304.

doi:10.1016/j.ijpara.2008.04.012

- Jimenez, C; Fontaine, J; Creusy, C; Fleurisse, L; Grzych, J M; Capron, M; Dei-Cas, E. (2014). Antibody and cytokine response to giardia excretory-secretory proteins in *Giardia intestinalis* infected BALB-C mice. *Parasitol Res* 113:2709-2718, DOI 10.1007/s00436-014-3927-4.
- Koehler, A. V., Jex, A. R., Haydon, S. R., Stevens, M. a., y Gasser, R. B. (2014). *Giardia*/Giardiasis - A perspective on diagnostic and analytical tools. *Biotechnology Advances*, 32(2), 280–289. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.10.009
- Lindarte, G. T., Tamayo, M. Z., Isaza, M. R., y Osorio, L. R. (2011). Investigación científica sobre genotipificación y distribución de *Giardia intestinalis* en humanos y caninos de América. *Salud Uninorte*, 27(1), 49–62.
- López, G; Quintero, J; Astiazarán H.; Velazquez C. (2015.) Host defences against *Giardia lamblia*. *Parasite Immunology*, 2015, 37, 394–406.
- Lujan, H. D. (2006). *Giardia* y Giardiasis. *Medicina*, 66(1), 70–74.
- Lujan, H. D., Mowatt, M. R., Wu, J. J., Lu, Y., Lees, A., Chance, M. R., y Nash, T. E. (1995). Purification of a variant-specific surface protein of *Giardia lamblia* and characterization of its metal-binding properties. *Journal of Biological Chemistry*. doi:10.1074/jbc.270.23.13807
- Machado N; Tellez G; Castaño J (2006). Monoclonal antibodies: physical development and therapeutic perspectives. *Asociación Colombiana de Infectología*. *Infectio* 2006; 10(3): 186-197.
- Manuscript, A. (2012). NIH Public Access. *Changes*, 29(6), 997–1003. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted
- Martínez, M. N., González, A., Reynoso, R., Montijo, E., y Ponce M. (2014). Intraepithelial *Giardia Intestinalis*. *Medicine*, 93(29), e277. doi:10.1097/MD.0000000000000277
- Minetti, C., Lamden, K., Durband, C., Cheesbrough, J., Platt, K., Charlett, A., O'Brien, S. J., Fox, A., y Wastling, J. M. (2015). Case-control study of risk factors for sporadic Giardiasis and parasite assemblages in North West England. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(10), 3133-3140. doi:10.1128/JCM.00715-15
- Monis, T; Caccio Simine M y Thompson Andrew R.C (2010). Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends in Parasitology* Vol.25 No.2: 93-100. doi:10.1016/j.pt.2008.11.006

- Morrison, H. G., Roger, A. J., Nystul, T. G., Gillin, F. D. y Sogin, M. L. (2001). *Giardia lamblia* expresses a proteobacterial-like DnaK homolog. *Mol Biol Evol* 18, 530–541.
- Niyizurugero, E., Ndayanze, J. B., y Bernard, K. (2013). Prevalence of intestinal parasitic infections and associated risk factors among Kigali Institute of Education students in Kigali, Rwanda. *Tropical Biomedicine*, 30(4), 718–726.
- Plutzer, J., Ongerth, J., y Karanis, P. (2010). *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213(5), 321–333. doi:10.1016/j.ijheh.2010.06.005
- Ponce, M., González, A., Reynoso, R., y Martínez, M. N. (2008). Goblet cells: Are they an unspecific barrier against *Giardia intestinalis* or a gate? *Parasitology Research*, 102(3), 509–513. doi:10.1007/s00436-007-0790-6
- Quintero J; Figueroa D.C; Barcelo R; Breci L., Astiazaran H; Rascon, L; Robles R, Garibay A; Velazquez E; Leon G; Hernandez, J.M; Velazquez C.(2013) Identification of an immunogenic protein of *Giardia lamblia* using monoclonal antibodies generated from infected mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 108(5): 616-622
- Rajurkar, M. N., Lall, N., Basak, S., y Mallick, S. K. (2012). A simple method for demonstrating the *Giardia lamblia* trophozoite. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 6(9), 1492–1494. doi:10.7860/JCDR/2012/4358.2541
- Reyes, H; de la Mora; Castillo, A;Yepez L.; Hernandez G.; Figueroa, R.; Lopez, G.; (2014). Giardial Triosephosphate Isomerase as Possible Target of the Cytotoxic Effect of Omeprazole in *Giardia lamblia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(12), 7072–7082. doi:10.1128/AAC.02900-14
- Ryan, U., y Cacciò, S. M. (2013). Zoonotic potential of *Giardia*. *International Journal for Parasitology*, 43(12-13), 943–956. doi:10.1016/j.ijpara.2013.06.001
- Roger, A. J., Svard, S. G., Tovar, J., Graham Clark, C., Smith, M. W., Gillin, F. D. y Sogin, M. L. (1998). A mitochondrial-like chaperonin 60 gene in *Giardia lamblia*: evidence that diplomonads once harbored an endosymbiont related to the progenitor of mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 229–234.
- Ruggiero, M. A., Gordon, D. P., Orrell, T. M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R. C., Cavalier-Smith, T., Guiry, M. D., Kirk, P. M. I. (2015). A Higher Level Classification of All Living Organisms. *PLoS ONE* 10(6): e0130114. doi: 10.1371/journal.pone.0130114

- Sánchez J.; Tay J., Aguilar, A., Ruiz D., Malagón, F., Rodríguez, J. A.; Ordoñez J; Calderón, L. (2006). Cryptosporidiosis and other intestinal protozoan infections in children less than one year of age in Mexico City. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(6), 1095–1098.
- Sánchez, J.; Tay, J., Guerrero, R; L., Romero; R.; Ruíz, D.; y Rivas, C. (2000). Frecuencia de parasitosis intestinales en asentamientos humanos irregulares. *Rev Fac Med UNAM Vol.43 No.3*
- Stadelmann, B., Hanevik, K., Andersson, M. K., Bruslerud, O., y Svärd, S. G. (2013). The role of arginine and arginine-metabolizing enzymes during *Giardia* - host cell interactions in vitro. *BMC Microbiology*, 13(1), 256. doi:10.1186/1471-2180-13-256
- Saura, A. (2012). “Nuevos metodos para el diagnóstico microbiológico de la amibiasis y de otros parásitos intestinalis”. Tesis de doctorado en Ciencias de la salud. Laboratorio de bioquímica y biología molecular. Facultad de Medicina. Universidad Catolica de Cordoba.
- Tachezy, J., Sanchez, L. B. y Müller, M. (2001). Mitochondrial type iron-sulfur cluster assembly in the amitochondriate eukaryotes *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*, as indicated by the phylogeny of IscS. *Mol Biol Evol* 18, 1919–1928.
- Thompson, R. C. A. (2004). The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and Giardiasis. *Veterinary Parasitology*, 126 (1-2 SPEC.ISS.), 15–35. doi:10.1016/j.vetpar.2004.09.008
- Troeger, H., Epple, H. J., Schneider, T., Wahnschaffe, U., Ullrich, R., Burchard, G. D., ... Schulzke, J. D. (2007). Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut*, 56(3), 328–335. doi:10.1136/gut.2006.100198
- Vázquez, Oscar y Campos Teresita (2009) Giardiasis. La parasitosis más frecuente a nivel mundial. *Revista del centro de Investigación. Universidad La Salle Vol. V núm. 31. pp 75-90.*
- Vicens, Q., y Westhof, E. (2001). Crystal Structure of Paromomycin Docked into the Eubacterial Ribosomal Decoding A Site. *Structure*, 9(8), 647-658. doi:10.1016/S0969-2126(01)00629-3
- Xin, D. D., Wen, J. F., He, D., y Lu, S. Q. (2005). Identification of a *Giardia krr1* homolog gene and the secondarily anucleolate condition of *Giardia lamblia*. *Molecular Biology and Evolution*, 22(3), 391–394. doi:10.1093/molbev/msi052
- Yaoyu, F., y Xiao, L. (2011). Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and

12. Anexo

Preparación de medio TY1-S-33 (para 1L)

- 10g Glucosa
- 2g NaCL
- .600g Fosfato de potasio dibasico
- 1g Fosfato de potasio monobásico
- 1g L- cisteína
- .200g Ac. ascórbico
- .030g Citrato férrico de amonio
- 1.0g Bilis

- 10g Extracto de levadura
- 20g Tripticasa

Ajustando el pH a 7 y adicionando antibióticos (ampicilina y estreptomina). Se prefiltra con una membrana de 0.22µm después se filtra con una membrana de 0.22 µm dentro de una campana de flujo laminar.

Preparación de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

Para un 1L se le adiciono:

- 3.7 g bicarbonato de sodio
- 2g HEPES
- 0.1 g glucosa
- 0.2 g L- glutamina

Se ajustó el pH a 6.8 y adicionando antibióticos (penicilina, anfotericina B, vancomicina). Se filtra con una membrana de 0.22 µm de poro, dentro de una campana de flujo laminar.

Descomplementación de SFB (Suero Fetal Bovino)

Poner el frasco de suero fetal bovino en la incubadora a 56° durante 30 min. Después se deja enfriar a temperatura ambiente y se deja en oscuridad.

Preparación de medio TYS (para 1L)

- 2 g de tripticasa de peptona
- 1 g de extracto de levadura
- 0.5 g de maltosa
- g de clorhidrato de L-cisteína
- 0.02 g de ácido L-ascórbico
- 0.08 g de K₂HPO₄
- 0.08 g KH₂PO₄

Ajustando el pH a 7 y adicionando antibióticos

Preparación de PBS (Buffer fosfato salino)

Para un litro

Para 1L	1X	10X
NaCL	8 g	80 g
KCL	0.201g	2.01g
KH₂PO₄	0.190g	1.9 g
NA₂HPO₄	0.610g	6.1g

Se lleva a 800 mL se disuelven los compuestos y se afora a 1 L.

Preparación de solución de Albúmina

Se agregan 2 mg en 1 mL de PBS utilizando las siguientes diluciones de proteína

Tubo	proteína 2 mg/mL	PBS μL	concentración μg/mL
1	5	995	10
2	10	990	20
3	15	985	30
4	20	980	40
5	25	975	50
6	30	970	60
7	35	965	70
8	40	960	80
9	45	955	90
10	50	950	100

Método de Bradford para cuantificación en microplaca

Solución de albúmina a una concentración de 2mg/mL

Se hacen diluciones seriadas de 10 a 100 μg/mL en PBS al 1%. En una placa de 96 pozos se colocan 40 μL de cada dilución a partir de las posiciones A2 y B2 hasta A11 y B11. En los pozos A1 y B1 solo colocó H₂O, y en A12 y B12 solo PBS, éstos se tomaron como blanco.

Después se preparó una solución 1:5 de Bradford y PBS y se colocaron 160 μL en todos los pozos. En cualquier otra línea se pusieron 40 μL de las muestras problema y 160 μL de la solución

de Bradford para poder hacer una curva patrón. Se hizo lectura en un espectrofotómetro de placa a una longitud de onda de 595 nm utilizando A12 y B12 como blancos.

Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

La microplaca para ELISA de 96 pozos se sensibilizó, a cada pozo se le agregaron 100 μ L con una solución de 1 μ g/mL de antígeno disuelto en la solución de carbonatos. Se dejó toda la noche con ésta solución a 4°C. Al siguiente día, la placa se lavó tres veces con solución de lavado (PBS-tween 20 al 0.05%). Para bloquear la microplaca de ELISA se adicionaron a cada pozo 200 μ L de una solución de gelatina al 1% que se disolvió en la solución de lavado. Se dejó 30 min a 37°C.

Después se desechó la solución de gelatina y se lavó nuevamente la microplaca. Se repitió tres veces. Se colocaron 100 μ L del sobrenadante de los hibridomas, por duplicado, y se dejó toda la noche a 4°C. En la mañana siguiente se hicieron 3 lavados. Se le agregaron 100 μ L de anti-IgG-HRP de ratón, en una disolución 1:1000. Se dejó por 2 horas a 37°C y posteriormente se lavó tres veces. Se colocaron 100 μ L de la solución de cromógeno, se dejó en reposo por 15 min y se dejó la microplaca a temperatura ambiente en la oscuridad. Se adicionaron 100 μ g solución de paro y se leyó la placa a 490 nm.

Clonación celular por dilución limitante

Se colocaron 100 μ l de DMEM con SFB al 10% en la fila A de una placa de cultivo de 96 pozos. Se tomaron 100 μ l de un pozo con hibridomas que dieron positivos al antígeno y se colocaron en el pozo A1. Se hicieron diluciones doble seriadas en toda la fila A, tomando 100 μ l en cada dilución. Se dejará reposar durante 10 min la placa esperando a que se asienten las células de hibridomas. Se observó cada pozo de la fila A con un microscopio óptico y se escogió el pozo con aproximadamente 40 a 50 células. El pozo seleccionado se diluyó en 18 ml de DMEM con SFB al 10% y se colocaron 200 μ l de ésta dilución en cada pozo faltante de la placa

Solución de carbonatos para el acoplamiento con FITC

Para preparar 200 mL se pesa:

- 0.636 g de carbonato de sodio
- 1.172 g de bicarbonato de sodio

Disolver en 180 mL y ajustar el pH a 9.6, después aforar a 200 mL y mantener a 4°C.

PBS tween al 0,05%

Para 1L	1X	10X
NaCL	8 g	80 g
KCL	0.201g	2.01g
KH₂PO₄	0.190g	1.9 g
NA₂HPO₄	0.610g	6.1g

Se lleva a 800 mL y se le adiciona 500 µL de tween 20. Por último se afora a 1L.

Preparación de Gelatina

Para 25 mL

Pesar 250 g de Gelatina y adicionar 20 mL en PBS tween al 0.05%, para poder disolver el compuesto se pone a baño maría y cuando este disuelta la gelatina aforar a 25 mL.

Dilución de anti-igG

Para 10 mL

Se disuelven 10 µL de anti-IgG en 9.99 mL de PBS tween al 0.05%

Solución de cromógeno

Para 10 mL

Pesar 4 mg de orto-fenilendiamina (OPD) y disolver en:

- 5 mL de ácido cítrico al 0.1 M
- 5 mL de citrato de sodio al 0.1 M
- 4 µL de agua oxigenada al 30%

Solución de paro

Disolver 55.17 mL de H₂SO₄ a 2 N en 800 mL de agua destilada. Se afora a 1 L.

Solución de diálisis de anticuerpo

Soluciones para 1L

- 17g Na₂CO₃
- 28g NaHCO₃

Diluir en 800 mL de PBS y lleva el pH a 9.5 y aforar a 1 L.

Soluciones para purificación de anticuerpos

Buffer A

- 112.6g glicina
- 175.3g NaCl
- 1.0g azida de sodio

Diluir en 800 mL de agua destilada y ajustar el pH a 9 y al final aforar a 1L.

Buffer B

- 23.44g ac. Cítrico
- 1.0g azida de sodio

Diluir en 800 mL de agua destilada y ajustar el pH a 2.5 y al final aforar a 1L.

Buffer C

- 103.72g tris base
- 22.72g hidroclicoridrico
- 1.0g azida de sodio

Diluir en 800 mL de agua destilada y ajustar el pH a 9 y al final aforar a 1L.

leyBeer-lambert:

$A = \epsilon CL$

Donde:

ϵ : coeficiente de absorptividad

C: concentración de la sustancia

AL: distancia que recorre la luz