

**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**Identificación de antígenos inmunodominantes de  
*Giardia lamblia* reconocidos por anticuerpos séricos  
de ratones C3H/HeJ con giardiasis**

Por:

**Noé Ontiveros Apodaca**

Tesis aprobada por la  
**Coordinación de nutrición**


Como requisito parcial para obtener el grado de  
**Maestría en Ciencias**

Hermosillo, Sonora.

Abril de 2005

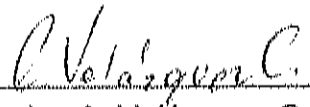
## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Noé Ontiveros Apodaca, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



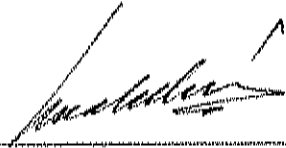
---

Dr. Humberto F. Astiazarán García  
Director de Tesis



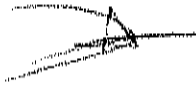
---

Dr. Carlos A. Velázquez Contreras  
Asesor



---

Dra. Ana María Calderón de la Barca  
Asesora



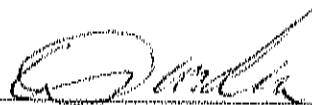
---

Dr. Jesús Hernández López  
Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD)

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar créditos al CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director de tesis.



---

Dr. Alfonso Gardea Béjar

Director General

Este trabajo fue realizado con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONOCYT), Proyecto I39133-N

## AGRADECIMIENTOS

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD)** por darme la oportunidad de desarrollar el presente trabajo en sus instalaciones.

Al **Laboratorio de Inmunohematología Diagnóstica de la Universidad de Sonora** por prestarme sus instalaciones para el desarrollo de algunas técnicas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico.

Al **Dr. Humberto Astiazarán y Dr. Carlos Velázquez** por darme la oportunidad de colaborar en el presente trabajo, por la confianza otorgada y los conocimientos compartidos.

A la **Dra. Ana María Calderón de la Barca** por apoyarme en todo momento durante mi estancia en **CIAD** y facilitar reactivos y equipo durante el desarrollo del presente trabajo.

Al **Dr. Jesús Hernández** por su gran disposición en la revisión de éste trabajo.

A la **M.C. Guillermina García Sánchez y M.C. Karina D. García Orozco** por el apoyo brindado para el desarrollo de técnicas de doble dimensión.

A mis compañeros de laboratorio **René (Graco), Adriana, Mary, Xaviera, Mario, Chayito, Emmanuel, Lili, Ale y Lucila** por apoyarme cuando los requerí.

A mis hermanas **Lupita y Hedith** y mi hermano **Adolfito**, por el apoyo y cariño brindado todos estos años y a mis sobrinas **Valeria, Rosalva, Chamelita y Noeli** que me llenan de alegría.

A mi papá **Adolfo Ontiveros** porque me demuestra su cariño y aprecio cada vez que estoy con él.

A mis amigos **Eduardo (Carnal)** y su esposa **Sonia** por estar dispuestos a ayudarme en todo momento. Mil gracias por su amistad.

## DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a tres personas: mi hijo **Noé Ontiveros Rascón** y mi mamá **Rosa Amelia Apodaca** porque son parte fundamental en mi vida, y a **Victoria** por compartir conmigo los momentos alegres y difíciles durante este tiempo.

## CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	X
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	XI
ANTECEDENTES GENERALES.....	XIII
REFERENCIAS.....	XVIII

**Capítulo 1: Identificación mediante electroforesis SDS-PAGE e inmunodetección de antígenos inmunodominantes de *Giardia lamblia* reconocidos por anticuerpos séricos (IgG) de ratones C3H/HeJ con giardiasis.**

INTRODUCCIÓN.....	2
OBJETIVOS .....	3
General.....	3
Específicos.....	3
MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
Cultivo de <i>G. lamblia</i> .....	4
Animales de experimentación.....	4
Infección y colección de muestras de suero de ratones infectados.....	4
Obtención de proteína soluble de <i>G. lamblia</i> .....	5
Determinación de la concentración de proteína soluble .....	6
Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA).....	6
Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	7
Electrotransferencia .....	7

Inmunodetección.....	8
Análisis de espectrometría de masas.....	8
RESULTADOS.....	9
La infección con <i>G. lamblia</i> en ratones induce una respuesta inmune humoral sistémica.....	9
La respuesta inmune sistémica (IgG) de ratones infectados reconoce antígenos de <i>G. lamblia</i> con diferentes masas moleculares.....	9
Se identificaron diferentes proteínas de <i>G. lamblia</i> por espectrometría de masas.....	14
DISCUSIÓN.....	18
CONCLUSIONES.....	21
REFERENCIAS.....	22
ANEXOS.....	24
Determinación de proteína método de Bradford.....	24
Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA).....	25
Electrotransferencia e inmunodetección.....	26
Procesamiento de muestras para espectrometría de masas.....	27

**Capítulo 2: Inmunodetección de antígenos de *Giardia lamblia* separados mediante electroforesis de doble dimensión (Punto isoelectrico SDS-PAGE) y generación de anticuerpos monoclonales específicos contra antígenos de *G. lamblia*.**

INTRODUCCIÓN.....	31
OBJETIVOS .....	32
General.....	32
Específicos.....	32



MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
Electroforesis de punto isoeléctrico.....	33
Tinción de geles de punto isoeléctrico.....	33
Electroforesis en doble dimensión.....	34
Tinción de geles de doble dimensión.....	35
Electrotransferencia de proteínas separadas en doble dimensión.....	35
Inmunización de ratones para obtener células de bazo.....	36
Generación de anticuerpos monoclonales.....	36
Selección de hibridomas positivos a antígenos de <i>G. lamblia</i> .....	37
RESULTADOS.....	39
Separación de antígenos de <i>G. lamblia</i> por electroforesis de doble dimensión y su reconocimiento por anticuerpos séricos (IgG) de ratones infectados.....	39
Los anticuerpos monoclonales generados reconocen antígenos de superficie de <i>G. lamblia</i> .....	39
DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIONES.....	44
REFERENCIAS.....	45

## LISTA DE TABLAS

### CAPÍTULO 1

Tabla	Página
1. Proteínas identificadas en el análisis de espectrometría de masas.....	14

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Figura	Página
1. Detección de anticuerpos séricos IgG anti- <i>G. lamblia</i> por ELISA durante una primoinfección.....	10
2. Detección de anticuerpos séricos IgG anti- <i>G. lamblia</i> por ELISA durante una reinfección.....	11
3. Reconocimiento antigénico de la IgG sérica anti- <i>G. lamblia</i> durante una primoinfección.....	12
4. Reconocimiento antigénico de la IgG sérica anti- <i>G. lamblia</i> durante una reinfección .....	13

### CAPÍTULO 2

Figura	Página
1. Separación de proteínas solubles de <i>G. lamblia</i> en doble dimensión tinción con nitrato de plata.....	40
2. Reactividad de los anticuerpos B5 y 4B11 por inmunofluorescencia indirecta.....	41

## INTRODUCCIÓN GENERAL

La alta incidencia de parasitosis intestinales en países emergentes es un problema de salud pública que está relacionado con problemas nutricionales (García-Aranda, 1995; Devera y col., 1998). La parasitosis ocasionada por *G. lamblia* (giardiasis) es de las más comunes y afecta principalmente a la población infantil de dichos países (Gardner-Hill, 2001). Este parásito ocasiona malabsorción de nutrientes pudiendo afectar el desarrollo corporal y el estado nutricional del hospedero (Bai, 1998).

La giardiasis puede ser eliminada de forma natural o con tratamiento médico, pero las reinfecciones suelen ser comunes en aquellas poblaciones donde las prácticas de higiene no son adecuadas y no se cuenta con un sistema apropiado de suministro de agua y de drenaje. Aunado a esto, se han detectado cepas de *G. lamblia* resistentes al tratamiento (Wright y col., 2003). Considerando estos casos, el desarrollo de herramientas profilácticas es una alternativa que puede contribuir a controlar y erradicar la infección, y de esta manera mejorar el estado nutricional de las poblaciones donde la giardiasis es endémica.

El conocimiento sobre los mecanismos de patogénesis y de respuesta inmune hacia *G. lamblia* así como la identificación de los antígenos es limitado, lo que dificulta el desarrollo de una alternativa profiláctica apropiada. Existen estudios sobre la función de los linfocitos T y linfocitos B para controlar la infección (Stager y Muller, 1997; Singer y Nash, 2000) y se ha demostrado la producción de anticuerpos anti-*Giardia* de diferentes isotipos (Gottstein y col. 1990). Hasta el momento, se considera que las células B al igual que las células T son requeridas para controlar la infección.

En los últimos años se logró secuenciar el genoma de *Giardia* ([www.mbl.edu/Giardia](http://www.mbl.edu/Giardia)). La información generada en este proyecto facilita la

identificación y caracterización de las proteínas del parásito. En este sentido, Palm y col. (2003) identificaron 16 proteínas inmunoreactivas reconocidas por anticuerpos séricos de pacientes con giardiasis de una zona no endémica y posteriormente logran la caracterización de una de ellas (Weiland y col. 2003). Estos resultados pueden ser de particular relevancia para el desarrollo de vacunas recombinantes y pruebas diagnósticas de la giardiasis.

En el presente trabajo, se identificaron mediante electroforesis SDS-PAGE, electrotransferencia e inmunodetección los antígenos inmunodominantes de *G. lamblia* reconocidos por el sistema inmune humoral (IgG) de ratones C3H/HeJ con giardiasis. Así mismo, se establecieron las condiciones para separar por punto isoeléctrico y posterior electroforesis SDS-PAGE las proteínas de *G. lamblia* y adicionalmente, se generaron hibridomas específicos contra antígenos del parásito, los cuales serán relevantes para la caracterización inmunológica de estos. Los antígenos seleccionados fueron analizados por espectrometría de masas para obtener su estructura primaria.

## ANTECEDENTES GENERALES

### Giardiasis y Nutrición

*Giardia lamblia* es el parásito protozoario que ocasiona la giardiasis humana. La infección se desarrolla principalmente en el intestino delgado y puede ocasionar malabsorción de nutrientes. Durante su ciclo de vida el parásito cursa por dos estadios: quiste y trofozoito. El primero es la etapa infectiva y el segundo la patógena.

La giardiasis puede ser asintomática o sintomática. En el segundo de los casos, las manifestaciones clínicas inician dentro de la primera a tercera semana posterior a la ingestión de quistes y se caracteriza por diarrea, malestar general, debilidad, flatulencia, dolor abdominal, esteatorrea, pérdida de peso y anorexia (Adam, 1991; Gardner, 2001). En general, los dos tipos de infección pueden presentar efectos adversos sobre el estado nutricional del hospedero (Astiazarán y col., 2000).

Las implicaciones nutricionales de la infección han sido ampliamente estudiadas tanto en humanos como en modelos animales. Se ha demostrado que los niveles de hemoglobina, vitaminas A y B12 (Solomons, 1982; Sackey y col., 2003; Barreras y Ontiveros, 2002), así como parámetros antropométricos son afectados en los organismos parasitados (Sackey y col., 2003). La infección en el humano es más prevalente en los niños por lo que los efectos nutricionales se ven reflejados principalmente en este grupo poblacional.

Al parecer, el uso de antiparasitarios es una buena medida para eliminar la giardiasis. Sin embargo, se han detectado cepas de *G. lamblia* resistentes al tratamiento médico (Wright y col., 2003) y considerando que tanto el humano como los animales domésticos son reservorios de *G. lamblia* y transmisores de la infección, es posible que las reinfecciones se presenten a mediano o largo

plazo (Sackey y col., 2003), sobre todo en los sectores poblacionales donde no se cuenta con un sistema apropiado de suministro de agua y de drenaje (Olson y col., 2000). Tomando en cuenta estos casos, el desarrollo de nuevas alternativas para controlar la infección es un factor que contribuiría a mejorar el estado nutricional de las poblaciones donde la giardiasis es endémica.

### Giardiasis y Respuesta Inmune

Los mecanismos de inmunidad en el tracto gastrointestinal pueden ser específicos y no específicos. *G. lamblia* evade mecanismos no específicos (Eckmann, 2000; Kasper y Buzoni-Gatei, 2001), incluso, se cree que algunos de éstos pueden favorecer la colonización del parásito (Lamm, 1997; Faubert, 2000). Al parecer, la eliminación de la infección está mediada por mecanismos de defensa específicos que involucran la producción de anticuerpos y la inmunidad celular (Lamm, 1997).

Se ha observado que las personas con hipogamaglobulinemia están predispuestas a adquirir la giardiasis (Adam, 1991; Faubert, 1996) y la infección crónica sintomática en estas personas es más común que en aquellas con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Heyworth, 1992). Estas observaciones y los estudios realizados en modelos animales (Stager y Muller, 1997; Heyworth 1986) ponen de manifiesto la potencial importancia de los anticuerpos para controlar la infección.

Diferentes isotipos de inmunoglobulinas específicas a *G. lamblia* se han encontrado en el suero de personas con giardiasis (Birkhead, 1989; Sullivan, 1991; Pérez, 1994). Considerando que el parásito coloniza la mucosa intestinal son los anticuerpos del isotipo IgA los principales encargados de eliminar la infección (Langford y col., 2002). Sin embargo, debido a que en estudios *in vitro* se ha demostrado que los isotipos IgG e IgM presentan actividad citotóxica

contra el parásito, no se descarta la posibilidad de que estas inmunoglobulinas pudieran contribuir a controlar la infección a través de mecanismos aún no bien comprendidos (Smith, 1985; Heyworth, 1986; Nash, 1986; Faubert, 1996; Spiekermann y col., 2002).

La importancia de las células T para controlar la giardiasis también se ha evaluado empleando diferentes modelos de ratones: aquellos que carecen de linfocitos T (Roberts-Thomson, 1978; Adam, 1991, Singer y Nash, 2000), de linfocitos TCD4+ (Heyworth, 1987; Heyworth, 1989) y deficientes de linfocitos T y B (Byrd, 1994). Estos estudios demuestran que la inmunidad mediada por células es relevante en la eliminación del parásito. En conjunto, la respuesta de anticuerpos y la inmunidad mediada por células T actúan de manera sinérgica para eliminar la infección (Zhou y col., 2003).

El conocimiento sobre la respuesta inmune a la giardiasis proviene de 4 fuentes diferentes: estudios *in vitro* con trofozoitos de *G. lamblia* y células inmunes, ratones infectados con *G. muris*, ratones y jerbos infectados con *G. lamblia* y humanos infectados naturalmente o voluntarios (Faubert, 1996).

El modelo del ratón es el más apropiado para estudiar los mecanismos de respuesta inmune en la giardiasis (Byrd, 1994) ya que los ratones pueden infectarse con sus parásitos naturales y existe una gran variedad de reactivos y protocolos para evaluar la respuesta inmune en este roedor, además, se dispone de cepas de ratones inmunológicamente bien definidas.

#### Identificación de Antígenos de *Giardia lamblia*

Se han identificado diferentes antígenos de *G. lamblia* inmunoreconocidos por el suero de animales y humanos infectados (Arguello y Ortega-Pierres, 1997; Olmos y col., 2003; Hernández y col., 2003) así como también de animales inmunizados (Guimaraes y col., 2002; Chaudhuri y col.,

1997). Las investigaciones difieren en el tipo de cepa utilizada, tipo de anticuerpo y en el modelo experimental. Estas observaciones, dificultan la comparación de resultados entre diferentes laboratorios.

En el modelo murino, la proteína variante de superficie H7 característica de la cepa de *G. lamblia* GS/M-83-H7 ha sido bien caracterizada (Bienz y col., 2001). Este antígeno tiene una masa molecular relativa de 72 kDa y es reconocido por el sistema inmune del ratón cuando es expresado en un bioportador entérico para vacunas recombinantes (Stager y col., 1997). Hasta el momento, no existen reportes donde se haya evaluado el papel protector de este antígeno.

La inmunodetección de proteínas separadas por electroforesis de doble dimensión y el posterior análisis por espectrometría de masas, es una buena estrategia para estudiar las propiedades de algunas de ellas (Patterson y Aebersold, 2003). Palm y col. (2003), fueron los primeros en utilizar esta metodología para identificar antígenos de *G. lamblia*. En este estudio se reportaron 16 proteínas reconocidas por el suero de pacientes con giardiasis. Dichas proteínas, tuvieron pesos moleculares de 20 a 68 kDa y la más inmunoreconocida en una dimensión fue  $\alpha$ -1-Giardina. Posteriormente, con el uso de un anticuerpo monoclonal que reconoce esta proteína, Weiland y col. (2003) caracterizaron este antígeno. La información generada de esta manera es de particular interés para el desarrollo de posibles vacunas recombinantes (Sette y Fikes, 2003).

### Desarrollo de Vacunas

Hasta el momento, no existe una vacuna contra la giardiasis en el humano. Diversas estrategias han sido evaluadas en modelos animales con el propósito de generar inmunidad contra *G. lamblia*. La infección sistémica con



trofozoitos y la inmunización con extractos proteicos, son alternativas que han sido evaluadas obteniendo resultados positivos en algunos casos (Jenkis, 2001; Stein, 2003; Olson y col., 2000). Sin embargo, estas opciones no han sido del todo aceptadas y no se consideran para inducir inmunidad contra la giardiasis humana.

Una nueva estrategia para generar inmunidad contra la giardiasis es el desarrollo de vacunas recombinantes. De esta manera, se ha demostrado la producción de anticuerpos específicos contra el parásito (Stager y col., 1997) y se ha logrado disminuir la excreción de quistes en ratones inmunizados con proteínas recombinantes de la pared quística (Larocque y col., 2003).

Hasta el momento, la capacidad de las vacunas recombinantes para generar inmunidad contra *G. lamblia* no se ha demostrado, por lo que la identificación y caracterización de los antígenos que son reconocidos por el sistema inmune del hospedero, así como entender mejor los mecanismos de patogénesis y de respuesta inmune hacia estos antígenos, son prioritarios para el desarrollo de vacunas efectivas.

## REFERENCIAS

- Adam R.D. 1991. The biology of *Giardia spp.* Microbiol Rev. 55(4):706-32.
- Arguello M., Ortega-Pierres M.G. 1997. *Giardia duodenalis*: analysis of humoral immune response in experimentally infected gerbils (*Meriones unguiculatus*). Arch of Med Res. 28(2):1-8.
- Astiazarán-García H., Espinoza-Castellano M., Castanon G., Chávez-Murguía B., Martines-Palomo A. 2002. *Giardia lamblia*: effect of infection with symptomatic and asymptomatic isolates on the growth of gerbils (*Meriones unguiculatus*). Exp Parasitol. 95(2): 128-135.
- Bai J. C. 1998. Malabsortion syndrome. Digestion. 59: 530-546.
- Barreras M. E., Ontiveros A. N. 2002. Efecto de la giardiasis aguda sobre el metabolismo del retinol en jerbos (*Meriones unguiculatus*) con desnutrición proteica y de vitamina A. Tesis. Depto. de Cs. Q.B. Universidad de Sonora.
- Bienz M.P., Wittwer P., Zimmerman M., Muller N. 2001. Molecular characterisation of a predominant antigenic region of *Giardia duodenalis* varian surface protein H7. Int J Parasitol. 31 827-832.
- Birkhead G., Janoff E.N., Vogt R.L., Smith P.D. 1989. Elevated levels of immunoglobulin A to *Giardia lamblia* during a waterborne outbreak of gastroenteritis. J Clin Microbiol. 27(8):1707-10.
- Byrd L.G., Conrad J.T., Nash T.E. 1994. *Giardia lamblia* infections in adult mice. Infect Immun. 62(8):3583-5.
- Chaudhuri D.D., Sarkar S., Muñoz M.L., Das P. 1997. Biochemical and immunological characterization of soluble antigens of *Giardia lamblia*. Parasitol Res. 83:604-610.

- Devera R., Niebla-Punos G., Nastasi-Vatanese A. J., Velásquez-Álvarez V. J., González-Meneses R. 1998. Giardiasis en escolares de ciudad Bolívar. *Rev Biomed.* 9:145-150.
- Eckman L., Laurent F., Langford T D., Hetsko L. M., Smith R. J., Kagnoff F. M., Gillin D.F. 2000. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. 2000. *The J Immunol.* 164: 1478-1487.
- Faubert G. 2000. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev.* 13(1):35-54.
- Faubert G. 1996. The immune response to *Giardia*. *Parasitology Today.* 12(2): 140-45.
- García-Aranda J.A. 1995. Importancia clínica de la giardiasis. *Bol. Med. Hosp. Infant. De Mex.* 52(10).
- Gardner T.B., Hill D.R. 2001. Treatment of giardiasis. *Clin Microbiol Rev.*
- Gottstein B., Harriman G.R., Conrad J.T., Nash T.E. 1990. Antigenic variation in *Giardia lamblia*: Cellular and humoral immune response in a mouse model. *Parasite Immunology* 12 : 659-673.
- Guimaraes S., Sogayar LT., Franco M. 2002. Analysis of proteins from membrane and soluble fractions of *Giardia duodenalis* trophozoites of two brazilian axenic strains. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 44(5): 239-244.
- Hernández J.F., Duque S., Arévalo A., Guerrero R., Nicholls R.S. 2003. Identificación de antígenos de aislamientos colombianos de *Giardia duodenalis* reconocidos por IgG total y subclases. *Biomédica.* 23:263-273.
- Heyworth M.F., Carlson Jr., Ermak T.H. 1987. Clearance of *Giardia muris* infection requires helper/inducer T lymphocytes. *J Exp Med.* 165(6):1743-8
- Heyworth M.F. 1986. Antibody response to *Giardia muris* trophozoites in mouse intestine. *Infect. Immunon.* 52(2):568-71.

- Heyworth M.F. 1989. Intestinal IgA responses to *Giardia muris* in mice depleted of helper T lymphocytes and in immunocompetent mice. *J Parasitol.* 75(2):246-51.
- Heyworth M.F. 1992. Immunology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *J Infec Dis.* 166:465-72.
- Jenkins C.M.. 2001. Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 101 : 291-310.
- Kasper H.L., Buzoni-Gatei Dominique. 2001. Ups and downs of mucosal cellular immunity against protozoan parasites. *Infec immun.* 69 (1) : 1-8.
- Lamm E.M. 1997. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 311-340.
- Langford T.D., Housley P.M., Boes M., Chen J., Kagnoff F.M., Gillin D.F., Eckmann L. 2002 Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia spp.* *Infect immune.* 70(1): 11-18.
- Larocque R., Nakagaki K., Lee P., Abdul-Wahid A., Faubert G.M. 2003. Oral immunization of BALB/c mice with *Giardia duodenalis* recombinant cyst wall protein inhibits shedding of cysts. *Infect. Immun.* 71(10): 5662-9.
- Nash T.E., Aggarwal A. 1986. Cytotoxicity of monoclonal antibodies to a subset of *Giardia* isolates. *J Immunol.* 136(7):2628-32.
- Olmos R.N., Duque S., López M.C., Arévalo A., Guerrero R., Velandia P.M., Nicholls R.S. 2003. Identificación de antígenos de quistes y trofozoitos de aislamientos colombianos de *Giardia duodenalis* reconocidos por IgA. *Biomédica.* 23: 309-17.
- Olson M.E., Ceri H., Morck D.W. 2000. *Giardia* vaccination. *Parasitology today.*
- Palm J.E., Weiland E.L., Griffiths J.W., Jungstrom L.I., Svard G.S. 2003. Identification of immunoreactive proteins during acute human giardiasis. *J Infec Dis.* 187:1849-59.
- Patterson D.S., Aebersold H.R. 2003. Proteomics: the first decade and beyond. *Nature Genetics supplement.* 33: 311-322.

- Pérez Olive., Lastre M., Bandera F., Diaz M., Domenech I., Fagundo R., Torres D., Finlay C., Campa C., Sierra G. 1994. Evaluation of the immune response in symptomatic and asymptomatic human giardiasis. *Arch of Med Res.* 25 (2): 171-177.
- Roberts-Thomson I.C., Mitchell G.F. 1978. Giardiasis in mice. prolonged infections in certain mouse strains and hypothyroid (nude) mice. *Gastroenterology.* 75(1):42-6.
- Sackey M.E., Welgel M.M., Armijos X.R. 2003. Predictors and nutritional consequences of intestinal parasitic infections in rural Ecuadorian children. *J of Trop Ped.* 49: 17-23.
- Sette A., Fikes J. 2003. Epitope-based vaccines : an update on epitope identification, vaccine design and delivery. *Current Opinion in immunology.* 15 : 461-470.
- Singer S.M., Nash T.E. 2000. T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect immune* 68:170-5.
- Smith P.D. Pathophysiology and immunology of giardiasis. 1985. *Ann. Rev. Med.* 36: 295-307.
- Solomons N.W. 1982. Giardiasis: nutritional implications. *Rev. Infect. Dis.* 4(4): 859-69.
- Spiekermann M.G., Finn W.P., Ward E.S., Dumont J., Dickinson L.B., Blunberg S.R., Lencer I.W. 2002. Receptor-mediated immunoglobulin G transport across mucosal barriers in adult life: functional expression of FcRn in the mammalian lung. *J. Exp. Med.* 196(3): 303-310.
- Stager S., Gottstein B., Muller N. 1997. Systemic and local antibody response in mice induced by a recombinant peptide fragment from *Giardia lamblia* variant surface protein (VSP) H7 produced by a *Salmonella typhimurium* vaccine strain. *Int J Parasitol.* 27(8): 965-971.
- Stager S., Muller N. 1997. *Giardia lamblia* infections in B-cell-deficient transgenic mice. *Infect Immun.* 65(9):3944-6.

- Stein J.E., Radecki S.V., Lappin M.R. 2003. Efficacy of giardia vaccination in the treatment of giardiasis in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 222(11): 1548-51.
- Sullivan P.B., Neale G., Cevallos A.M., Farthing M.J. 1991. Evaluation of specific serum anti-*Giardia* IgM antibody response in diagnosis of giardiasis in children. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 85:748-49.
- Weiland E.L., Palm J.E., Griffiths J.W., McCaffery J.M., Svard G.S. 2003. Characterisation of alpha-1 giardin: an immunodominant *Giardia lamblia* anxin with glycosaminoglycan-binding activity. *Int J Parasitol.* 1-11.
- Wright J.M., Dunn L.A., Upcroft P., Upcroft J.A. 2003. Efficacy of anti giardial drugs. *Expert Opin Drug Saf.* 2 (6): 529-541.
- Zhou P., Li Erqiu., Zhu Nannan., Robertson J., Nash T.E., Singer M.S. 2003. Role of interleukin-6 in the control of acute and chronic *Giardia lamblia* infections mice. *Infec and immune.* 71(3): 1566-1568.

## Capítulo 1

**Identificación mediante electroforesis SDS-PAGE e inmunodetección de antígenos inmunodominantes de *Giardia lamblia* reconocidos por anticuerpos séricos (IgG) de ratones C3H/HeJ con giardiasis.**

## INTRODUCCIÓN

No obstante que la giardiasis es una de las parasitosis más comunes a nivel mundial (Gardner-Hill, 2001) el conocimiento sobre los mecanismos de patogénesis y de respuesta inmune hacia *G. lamblia* así como la identificación de los antígenos del parásito es limitado.

En jerbos infectados con trofozoítos de *G. lamblia* se detectan diferentes proteínas antigénicas que pueden ser relevantes en el desarrollo de alternativas profilácticas y diagnósticas de la infección (Arguello y Ortega, 1997). Sin embargo, la caracterización de la respuesta inmune hacia estos antígenos en el modelo del jervo es difícil ya que las herramientas biológicas disponibles para evaluar la respuesta inmune en este roedor son escasas.

Chaudhuri y col. (1997), inmunizaron conejos con trofozoítos de *G. lamblia* para detectar las fracciones proteicas del parásito más inmunoreactivas. En este estudio, se sugiere la fracción de mayor masa molecular (250-150 kDa) para generar herramientas diagnósticas y profilácticas de la giardiasis, pero se debe considerar que la respuesta inmune inducida mediante un proceso de inmunización no es comparable a la generada durante la infección.

Utilizar un modelo murino para identificar y evaluar la respuesta inmune hacia los antígenos de *G. lamblia* confiere considerables ventajas, como son: controlar las condiciones de infección (primoinfección o reinfección) y se facilita evaluar la respuesta inmune a diferentes niveles (sistémico, secretor, celular y mecanismos de inmunidad innata). De esta manera, se obtiene información que puede ser relevante para el desarrollo de una alternativa profiláctica apropiada.

En el presente capítulo, se evaluó por ELISA la respuesta inmune sistémica (IgG) de ratones C3H/HeJ infectados con *G. lamblia* y se identificaron por electrotransferencia e inmunodetección los antígenos inmunodominantes del parásito. Adicionalmente, las bandas antigénicas seleccionadas fueron analizadas por espectrometría de masas.



## OBJETIVOS

### General

Identificar mediante electroforesis SDS-PAGE e inmunodetección las proteínas capaces de estimular una respuesta inmune humoral sistémica de anticuerpos IgG en ratones C3H/HeJ infectados con *G. lamblia*.

### Específicos

- Establecer las condiciones experimentales para evaluar la respuesta inmune humoral sistémica de anticuerpos IgG en ratones C3H/HeJ con giardiasis.
- Evaluar por ELISA la presencia de anticuerpos específicos anti-*G. lamblia* en muestras de suero obtenidas de ratones infectados.
- Establecer el patrón de reconocimiento antigénico mediante electrotransferencia e inmunodetección.
- Seleccionar las proteínas inmunodominantes capaces de estimular la respuesta de anticuerpos IgG.
- Identificar por espectrometría de masas las proteínas inmunoreconocidas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivo de *G. lamblia*

Los trofozoítos de *G. lamblia* clona GS/M-83-H7 obtenidos de American Type Culture Collection (ATCC) fueron cultivados en condiciones semianaerobias a 37 °C en medio TYI-S-33 complementado al 10% con suero de ternera neonato (In vitro, S.A. México, D.F.) y antibiótico Ceftriaxona al 0.2% (Rocephin I.M. Roche 500 mg).

### Animales de Experimentación

Para el modelo experimental murino, fueron utilizados 7 ratones machos de la cepa singénica C3H/HeJ de 8 a 12 semanas de edad (The Jackson Lab Maine, EUA). Los animales fueron mantenidos en el bioterio del Departamento de Investigación de Posgrado en Alimentación (DIPA) de la Universidad de Sonora, con un ciclo de 12 horas luz y 12 horas de obscuridad a una temperatura de 25 °C. La selección de esta cepa de ratón se basó en estudios previos donde se reporta que son susceptibles a la infección intestinal por *G. lamblia* (Byrd, 1994).

### Infección y Colección de Suero de Ratones Infectados

La infección de ratones se llevó a cabo mediante la inoculación intragástrica de  $5 \times 10^6$  trofozoítos de *G. lamblia* suspendidos en 200  $\mu$ L de solución reguladora de fosfatos (PBS) a 4 °C, se utilizó una jeringa para insulina con una aguja para alimentación forzada. Las muestras de sangre fueron

colectadas previo a la infección y posterior a esta (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 semanas) y se obtuvieron mediante el corte de un fragmento pequeño de la cola de los ratones. Considerando que el parásito es capaz de reinfectar un organismo y con el propósito de identificar aquellos antígenos de *G. lamblia* que fueran inmunodominantes, se realizó una segunda infección a los ratones al día 45 post-infección y se hizo un muestreo de manera similar (1, 2, 3, 4, 5, 6 semanas). Las muestras de sangre se centrifugaron a 1500 x g por 10 min a 4°C para obtener el suero el cual se almacenó a -30 °C hasta su uso.

#### Obtención de Proteína Soluble de *G. lamblia*

Para la obtención de proteínas solubles se partió de un cultivo confluyente de trofozoitos de *G. lamblia* (aproximadamente  $100 \times 10^6$  trofozoitos). Los tubos de vidrio conteniendo el cultivo de *G. lamblia* se expusieron al hielo para despegar los parásitos de las paredes y posteriormente se centrifugaron a 800 x g por 10 min a 4 °C. Los parásitos fueron lavados 4 veces de manera similar con PBS (GIBCO) a 4 °C pH 7.2. Después del último lavado la pastilla de trofozoitos se resuspendió en 1 mL de PBS y se sometió a 4 ciclos de congelación en nitrógeno líquido – descongelación a temperatura ambiente. La lisis celular fue verificada por observación al microscopio óptico adaptado para contraste de fases (Olympus BX-40, Tokio, Japón). Posteriormente, al lisado celular se le agregaron 5 µL de una mezcla de inhibidores de proteasas (SIGMA., St. Luis Mo.) por mL y se sonicó 2 veces (Brandson sonifier 250, Shelton, Ct. USA) durante 2 min a 30 ciclos. Finalmente, el sonicado se centrifugó a 14,000 x g por 15 min a 4 °C. El sobrenadante conteniendo el antígeno soluble de *G. lamblia* se almacenó a -20 °C hasta su uso.

### Determinación de la Concentración de Proteína Soluble

El extracto soluble de *G. lamblia* se analizó para determinar la concentración de proteína total por el método de Bradford (1976). La concentración de proteína se estimó a partir de curvas de calibración utilizando albúmina sérica bovina como estándar (SIGMA A-9647 St. Louis MO. USA). Una vez obtenida la curva, se preparó la muestra antigénica a analizar en una dilución 1:20 con solución salina fisiológica (**Anexo 1**) para después hacerla reaccionar con reactivo de Bradford (BIO-RAD). Después de 5 min de iniciada la reacción se procedió a leer la densidad óptica de esta solución a 595 nm en un espectrofotómetro (Termo Espectronic Genesis 8).

### Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (ELISA)

El extracto soluble de *G. lamblia* se adsorbió a pozos de una placa de micro titulación (2.5 µg de antígeno / pozo) utilizando un volumen de 50 µl de solución reguladora de carbonatos Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> - NaHCO<sub>3</sub> (0.015 M - 0.034 M) pH 9.6 y se dejó incubar con esta solución toda la noche a 4 °C. Los lavados se realizaron con 200 µL de PBS pH 7.2 (4 X 5 min). Posteriormente, los sitios libres de antígeno en los pozos fueron bloqueados incubando con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS pH 7.2 (50 µL/pozo). Una vez bloqueados, se realizaron lavados con PBS pH 7.2. Posteriormente, se colocaron 50 µL de una dilución 1:10 de los sueros a estudiar y se dejó incubar por 2 h a temperatura ambiente. Posterior a los lavados de la placa se adicionaron 50 µL/pozo de una solución de anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (HRP) en dilución 1:1000 y se incubó por 1 h a temperatura ambiente. Se utilizó una mezcla de ABTS-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.003%) para revelar la reacción antígeno-anticuerpo. Las lecturas de absorbancia se hicieron a 415 nm en un lector de microplacas (Benchmark Bio-Rad, Hercules, CA. USA) a los 15 min de

iniciada la reacción. Como control negativo de la reacción se utilizaron sueros de ratones no expuestos a *G. lamblia* (**Anexo 2**).

### Electroforesis en Geles de Poliacrilamida

La separación electroforética de las proteínas solubles de *G. lamblia* se realizó en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes y reductoras SDS 2% -  $\beta$ -mercaptoetanol 1% (Current Protocols in Protein Science, 1998) y se cargaron 50  $\mu$ g de proteína por carril. Para el desarrollo de la técnica se utilizó una cámara miniprotean III (BIO-RAD, Hercules, CA. USA) y una fuente de poder EC-500. La electroforesis se desarrolló a 80 Volts constantes y se utilizó una solución reguladora Tris-Glicina-SDS (25 mM - 192 mM - 0.1%). Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250 (BIO-RAD, Hercules, CA. USA).

### Electrotransferencia

Se corrieron 500  $\mu$ g del antígeno soluble de *G. lamblia* en geles preparativos SDS-PAGE al 12%. Para determinar el peso molecular aproximado de las proteínas que fueran inmunodetectadas se cargaron en el gel 7  $\mu$ L de marcadores de peso molecular preteñidos (BIO-RAD). La proteína en los geles fue electrotransferida a membrana de nitrocelulosa de 0.45  $\mu$ m (BIO-RAD, Hercules, CA. USA) utilizando un sistema de electrotransferencia semi-seco modelo IMM-1-A (The W.E.P. Company Inc., Seattle, Washington, USA). La solución de transferencia consistió de Tris-Glicina-Metanol-SDS (48 mM - 39 mM - 20% - 0.13 mM) con pH 8.3 y se aplicó una corriente constante de 120 miliamperes por 25 min. Para bloquear los sitios libres de antígeno la membrana electrotransferida se incubó por 1 h a temperatura ambiente en una solución de

PBS - BSA 1% - leche descremada en polvo (Svelty, Nestle, México) 1% y posteriormente se enjuagó con PBS pH 7.2. Finalmente, la membrana fue cortada en tiras de 0.3 cm de ancho para ser almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso (**anexo 3**).

### Inmunodetección

Para detectar las bandas proteicas inmunoreactivas se realizaron ensayos de inmunodetección con los sueros de los ratones infectados de distintas semanas posteriores a la infección (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6) y reinfección (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6). Se utilizaron sueros de ratones no expuestos a *G. lamblia* como controles negativos para descartar reacciones antígeno-anticuerpo no específicas. Las membranas electrotransferidas cortadas y bloqueadas, se hicieron reaccionar por 2 h con el suero de los ratones diluido 1:25 en solución de bloqueo (descrita en la electrotransferencia) y se lavaron con 200 mL de PBS 1X pH 7.2 (4 x 5 min). Posteriormente, se colocó el segundo anticuerpo conjugado a peroxidasa en dilución 1:5000 en solución de bloqueo y se incubó 1 h a temperatura ambiente para posteriormente lavar con PBS 1X (**Anexo 3**). Finalmente, el complejo antígeno-anticuerpo formado se identificó mediante la utilización de quimioluminiscencia (PIERCE SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate ).

### Análisis de Espectrometría de Masas

El análisis de espectrometría de masas de los antígenos seleccionados de *G. lamblia*, se realizó en el Laboratorio de Espectrometría de Masas del Departamento de Bioquímica y Biofísica Molecular de la Universidad de Arizona. El tratamiento de las muestras previo al análisis consistió de reducción, alquilación y digestión de las proteínas en el gel con tripsina (**Anexo 4**).

## RESULTADOS

### La Infección con *G. lamblia* en Ratones Induce una Respuesta Inmune Humoral Sistémica

Las muestras de suero de los diferentes ratones infectados con *G. lamblia* evaluadas por ELISA, mostraron la presencia de anticuerpos de la clase IgG contra antígenos del parásito. Los títulos de anticuerpos fueron significativamente altos ( $P < 0.001$ ) a partir de la segunda semana posterior a la infección comparados con las muestras control (Figura 1). Durante la reinfección se observaron títulos significativos ( $P < 0.001$ ) con respecto a los sueros control desde la primera semana posterior al inóculo (Figura 2).

### La Respuesta Inmune Sistémica (IgG) de Ratones Infectados Reconoce Antígenos de *G. lamblia* con Diferentes Masas Moleculares

Para los ensayos de inmunodetección se juntaron los sueros colectados antes y después de la infección. En total se obtuvieron 13 muestras de suero de los ratones: 7 de la primoinfección y 6 de la reinfección. En estos ensayos se reconocieron 6 bandas antigénicas con masas moleculares relativas (MMR) de 48, 55, 63, 71, 131 y 159 kDa. Las bandas detectadas por los sueros de la primoinfección tuvieron MMR de 159, 131, 71 y 63 kDa. No se observó reconocimiento por los sueros previo a la infección (Figura 3). En la reinfección, se reconocieron antígenos de *G. lamblia* con MMR de 71, 63, 55 y 48 kDa. La banda de 55 kDa fue reconocida a partir de la tercera semana (Figura 4).

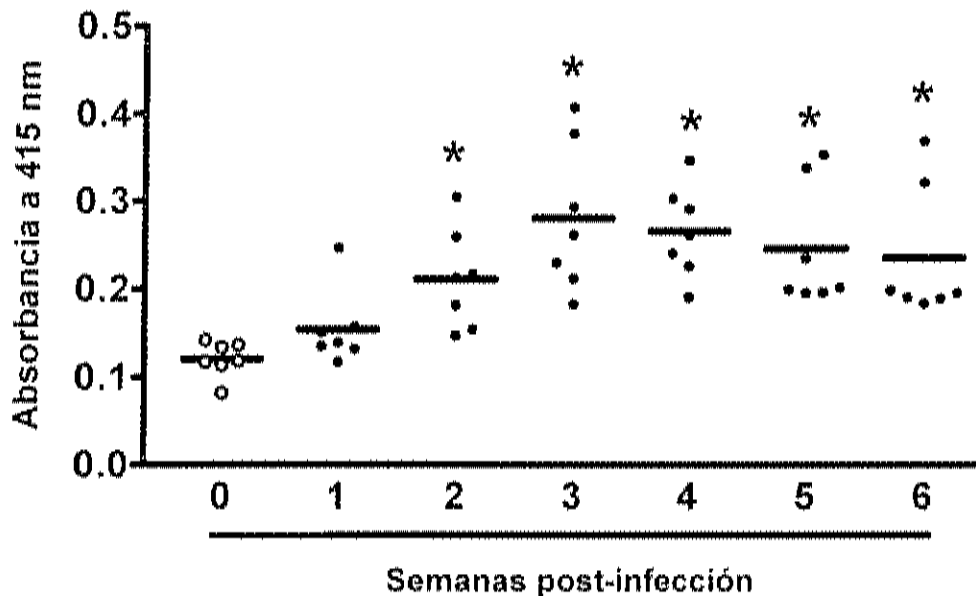


Figura 1. Detección de anticuerpos séricos IgG anti-*G. lamblia* por ELISA durante una primoinfección. Un grupo de ratones (n=7) fueron inoculados con  $5 \times 10^6$  trofozoitos de *G. lamblia*. Las muestras de suero fueron obtenidas a diferentes tiempos post-infección (0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 semanas). Cada símbolo representa un ratón individual. Las líneas horizontales representan la media aritmética de los datos obtenidos a diferentes tiempos post-infección. El asterisco indica diferencia significativa ( $P < 0.001$  por prueba de T pareada) entre los ratones pre-infectados (semana 0) y los post-infectados.



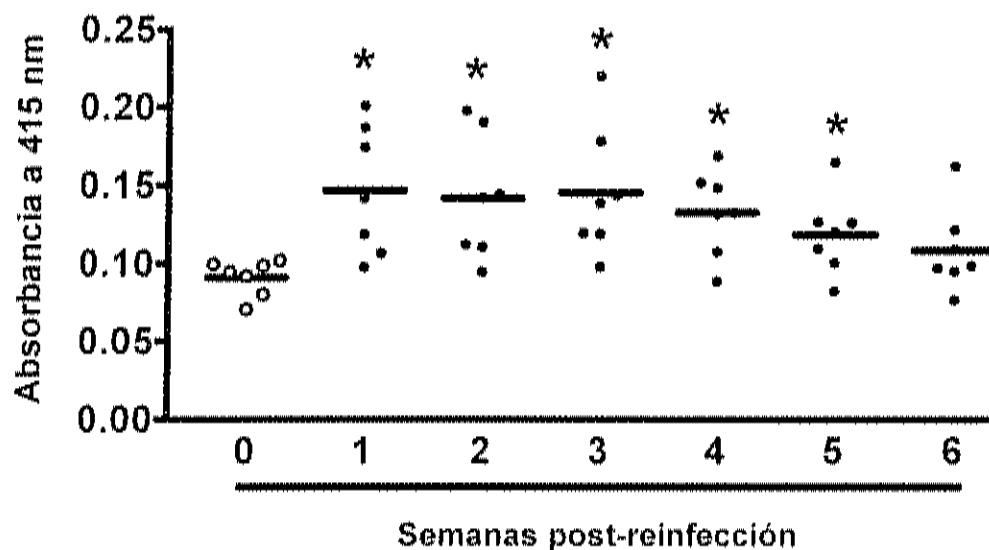
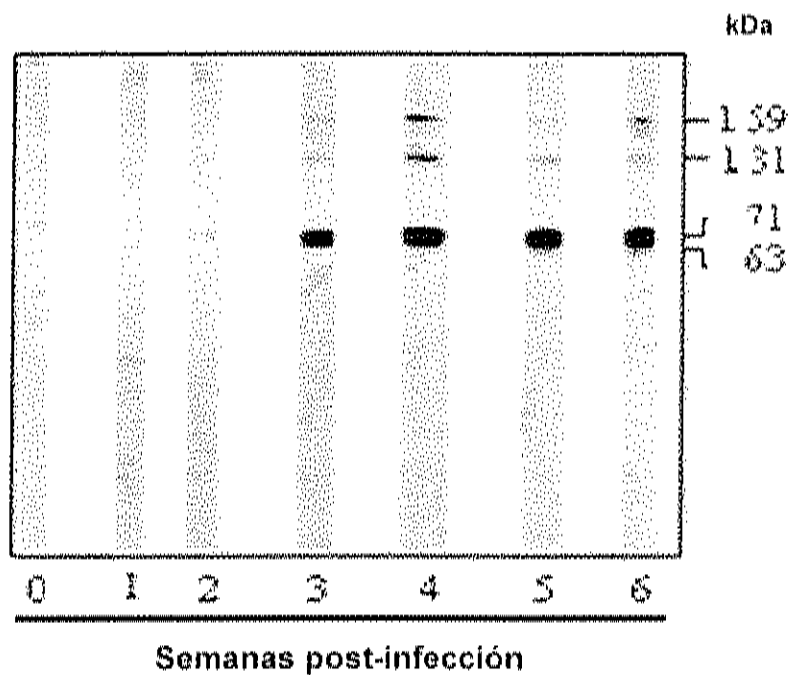
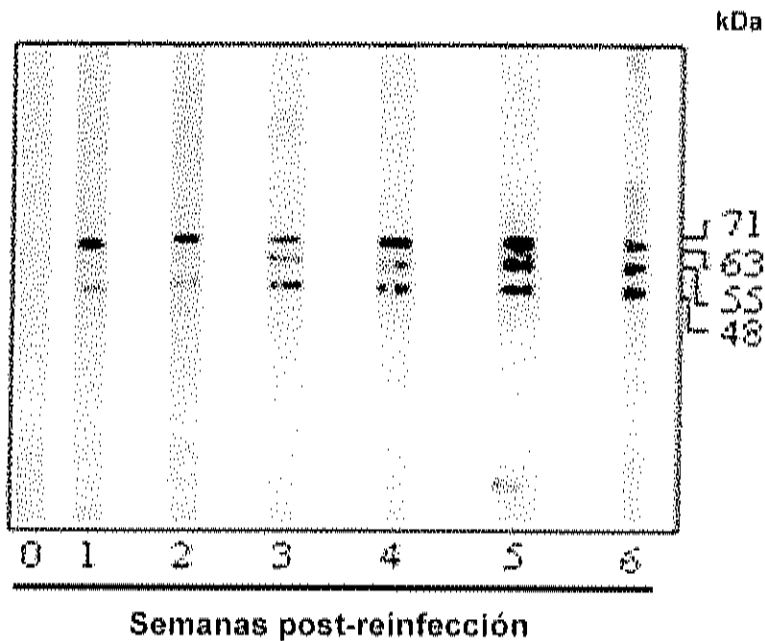


Figura 2. Detección de anticuerpos séricos IgG anti-*G. lamblia* por ELISA durante una reinfección. Un grupo de ratones (n=7) fueron re infectados con  $5 \times 10^6$  trofozoitos de *G. lamblia* al día 45 post-infección. Las muestras de suero fueron obtenidas a diferentes tiempos post-reinfección (1, 2, 3, 4, 5 y 6 semanas). Cada símbolo representa un ratón individual. Las líneas horizontales representan la media aritmética de los datos obtenidos a diferentes tiempos post-reinfección. El asterisco indica diferencia significativa ( $P < 0.001$  por prueba de T pareada) entre los ratones pre-infectados (semana 0) y los post-infectados.



**Figura 3. Reconocimiento antigénico de la IgG sérica anti-*G. lamblia* durante una primoinfección.** Se mezclaron volúmenes iguales de sueros obtenidos a un mismo tiempo post-infección de un total de siete ratones. El ensayo se realizó con las mezclas de sueros obtenidos a diferentes tiempos post-infección (0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 semanas) el cual fue diluido 1:25 en PBS-BSA1%-Leche descremada 1%.



**Figura 4. Reconocimiento antigénico de la IgG sérica anti-*G. lamblia* durante una reinfección.** Se mezclaron volúmenes iguales de sueros obtenidos a un mismo tiempo post-reinfección de un total de siete ratones. El ensayo se realizó con las mezclas de sueros obtenidos a diferentes tiempos post-reinfección (0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 semanas) el cual fue diluido 1:25 en PBS-BSA1%-Leche descremada 1%.

Se Identificaron Diferentes Proteínas de *G. lamblia* por  
Espectrometría de Masas

Para identificar las proteínas presentes en las bandas inmunoreconocidas se realizaron análisis de espectrometría de masas. Las proteínas analizadas fueron las bandas con MMR de 48, 55, 63 y 71 kDa. En la tabla 1 se muestran las proteínas de *G. lamblia* identificadas en cada una de las bandas antigénicas. En resumen, se identificaron 33 proteínas diferentes entre las que se encuentran: proteínas del citoesqueleto, de superficie y del metabolismo del parásito.

**Tabla 1. Proteínas identificadas en el análisis de espectrometría de masas.**

Banda analizada (kDa)	Proteínas identificadas	PM reportado (kDa)
71	- Proteína de choque térmico 90	43.4
	- Proteína de choque térmico 83	36.9
	- Proteína tipo anquirina	87.6
	- Ornitina carbamoil transferasa	36.4
	- Aldehído alcohol deshidrogenasa	97.1
	- Proteína vesicular de fusión SEC18	90.6
	- $\alpha$ -1-tubulina	50.5
	- Proteína variante de superficie S2	62.6
	- Adaptador proteico de cadena pesada subunidad $\beta$	122.8
	- Piruvato deshidrogenasa	131.8
	- Secuencia N-etilamida-sensitiva proteína	89.6

	de fusión	
	- Glucógeno sintasa	85.0
63	- Proteína tipo dinamina	79.4
	- Transcetolasa 1	77.5
	- Acetil-CoA sintetasa	78.0
	- Proteína de choque térmico 70 B2	71.6
	- Vacuolar-ATPasa subunidad-A catalítica	71.5
	- Piruvato quinasa	70.7
	- Proteína MGC53202	71.5
	- Glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa	83.0
	- Proteína de choque térmico 83	36.8
	- Respuesta a estrés oxidativo 1	46.9
	- Proteína UM04848.1	79
	- Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	73.8
	- Adaptador proteico de cadena pesada subunidad $\beta$	122.8
	- Proteína sensitiva homóloga de transformación	65.3
	- GLP_703_16957_14660	87.5
	- Proteína 21.1	136.5
55	- Proteína de choque térmico 70 B2	71.6
	- Proteína tipo dinamina	79.4
	- Acetil-CoA sintasa	78.0
	- Proteína MGC53202	71.5
	- Proteína sensitiva homóloga de transformación	65.3
	- Piruvato quinasa	70.7
	- Vacuolar-ATPasa subunidad-A catalítica	71.5
	- Respuesta a estrés oxidativo 1	46.9

-	Proteína de choque térmico 83	36.8
-	COG0364: glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa	83.0
-	Adaptador proteico de cadena pesada subunidad $\beta$	122.8
-	78 kDa regulador de glucosa precursor proteico	74.3
-	Proteína tipo anquirina	87.6
-	Quinesina	115.7
-	Proteína 21.1	154.8

---

48	-	Proteína de choque térmico 70 B2	71.6
	-	78 KDa regulador de glucosa precursor proteico	74.3
	-	Transcetolasa 1	77.5
	-	Proteína sensitiva homóloga de transformación	65.3
	-	Proteína tipo dinamina	79.5
	-	Proteína MGC53202	71.5
	-	Arginina deaminasa	64.1
	-	Acetyl-CoA sintasa	78.1
	-	Piruvato quinasa	70.7
	-	$\alpha$ -1-tubulina	50.5
	-	Fosfomanomutasa-2	73.9
	-	$\beta$ -7 tubulina	50
	-	$\beta$ -tubulina	24.6
	-	Proteína de choque térmico 83	36.9
	-	Adaptador proteico de cadena pesada subunidad $\beta$	122.8

- Secuencia ornitina carbamoil transferasa	36.4
- OSJNBbOO65L13.12	84.4
- Proteína variante de superficie VSP136b	72.5
- Factor de elongación 2	99.6
- Piruvato deshidrogenasa	31.8
- Aldehído-alcohol deshidrogenasa	97.1
- Proteína de la familia de las transducinas	47.9
AWD-40	

---

## DISCUSION

La información generada en el presente trabajo, representa uno de los primeros esfuerzos para identificar los antígenos inmunodominantes de *G. lamblia* y caracterizar la respuesta inmune hacia estos antígenos en el modelo murino. Las muestras de suero de los animales infectados permitieron reconocer e identificar mediante electrotransferencia, inmunodetección y análisis de espectrometría de masas proteínas antigénicas de *G. lamblia*.

Aunque *G. lamblia* es un parásito no invasivo, induce una respuesta inmune sistémica pero se desconoce el papel que esta respuesta desempeña en el control de la infección. En estudios *in vitro*, se ha demostrado que los fagocitos y proteínas del complemento son más eficientes para eliminar al parásito en presencia de anticuerpos anti-*G. lamblia* de los isotipos IgG e IgM. Sin embargo, la utilidad *in vivo* de estos anticuerpos es cuestionable debido a que el parásito coloniza el epitelio intestinal. Por otro lado, se cree que la respuesta sistémica es relevante para la localización de la infección. En este trabajo, nos enfocamos en la identificación de los antígenos de *G. lamblia* que inducen la respuesta sistémica (IgG) en el modelo del ratón, con las expectativas de en futuros estudios lograr su caracterización y evaluar su papel en la respuesta inmune hacia *G. lamblia*.

La respuesta sistémica de los ratones infectados con *G. lamblia* fue medida por ELISA. Los títulos mas altos de anticuerpos coinciden con el tiempo en que la infección empieza a ser eliminada (Figuroa y Granados, 2003). Este comportamiento es similar a lo reportado por Gottstein y col. (1990) en un modelo de infección de ratones CR:NIH:S de 3 días de nacidos, aunque debe considerarse que el hospedero es inmunológicamente inmaduro al momento de la infección. En el modelo del jerbo, los títulos de anticuerpos séricos incrementan aún después de que no son detectados quistes en las heces de los



animales (Arguello y Ortega-Pierres, 1997) y se ha demostrado resistencia a la reinfección en este modelo. (Aggarwal y Nash, 1987).

En el presente trabajo, también fue evaluada por ELISA la respuesta sistémica (IgG) durante la reinfección. En estas condiciones no se evaluó el curso de la infección y aunque los títulos de anticuerpos estuvieron por arriba del punto de corte a partir de la primera semana, no fue posible relacionar esta respuesta con el desarrollo de la reinfección. Hasta el momento, la importancia de los anticuerpos séricos del isotipo IgG para controlar la giardiasis es incierta.

Las muestras de suero de los ratones infectados en el presente estudio reconocieron diferentes antígenos del parásito. Bandas antigénicas con MMR similares han sido reportadas como antígenos de *G. lamblia* reconocidos por anticuerpos séricos de humanos con giardiasis (Hernández y col., 2003, Heyworth, 1992, Kum, 1991, Faubert, 2000) y de jerbos infectados con trofozoítos de *G. lamblia* (Arguello y Ortega-Pierres, 1997).

En el presente estudio, la primer banda reconocida durante la primoinfección presentó una MMR de 71 kDa y posteriormente fueron reconocidas 3 bandas adicionales con MMR de 63, 131 y 159 kDa. La principal diferencia fue la intensidad del reconocimiento, las bandas con MMR de 71 y 63 kDa fueron las más inmunoreactivas, a diferencia de lo reportado en jerbos infectados con cepas diferentes de *G. lamblia* (Arguello y Ortega-Pierres, 1997).

Considerando que *G. lamblia* puede reinfectar un organismo, se realizó una segunda infección a los ratones. De esta manera, se lograron identificar dos bandas nuevas inmunoreactivas con MMR de 48 y 55 kDa y a diferencia de la primoinfección no fueron detectadas las bandas con MMR de 131 y 159 kDa. No obstante, al igual que en la primoinfección las bandas con MMR de 71 y 63 kDa fueron inténsamente reconocidas. Los cambios en el reconocimiento durante la primoinfección y la reinfección pueden estar asociados a la variación antigénica de *G. lamblia* (Stager y Muller, 1997, Nash, 1997, Nash, 2001).

Las bandas antigénicas detectadas con los sueros de ratones reinfectados fueron analizadas por espectrometría de masas. El análisis reveló

33 proteínas diferentes de *G. lamblia*, tres de las cuales ya han sido reportadas (ornitina carbamoil transferasa, arginina deaminasa y  $\beta$ -tubulina) por Palm y col. (2003) como antígenos del parásito reconocidos por anticuerpos séricos de pacientes con giardiasis.

También se ha evaluado la respuesta inmune secretora (IgA) hacia antígenos de *G. lamblia* en el modelo del ratón (Beltrán, 2004). Los resultados no difieren del todo en cuanto al reconocimiento antigénico de los dos tipos de respuesta; las bandas con MMR de 63, 71 y 159 kDa son reconocidas en común y también se detectan bandas con MMR de 131, 58, 48, 106 y 86 kDa que no son reconocidas por una u otra respuesta. No obstante, las condiciones de electroforesis para lograr detectar los antígenos reconocidos por los anticuerpos IgA difieren de lo reportado en este trabajo para anticuerpos séricos IgG.

Las diferencias en el reconocimiento entre las respuestas de anticuerpos sistémica (IgG) y secretora (IgA) pueden deberse a algunos factores del parásito y el hospedero, entre los que están: la naturaleza y capacidad inmunogénica de los antígenos de *G. lamblia* para inducir una respuesta inmune, la disponibilidad del antígeno para inducir una respuesta sistémica y local, la acción de las células presentadoras de antígeno que puede afectar el acceso del antígeno al sistema inmune sistémico y las diferencias entre el sistema inmune de mucosas y periférico.

Considerando estos últimos resultados, nos podemos plantear las siguientes preguntas: ¿Cuáles son los antígenos específicos que reconocen los anticuerpos IgG e IgA en esas bandas antigénicas? Y ¿cuáles son las características propias de estos antígenos? Sin duda, la inmunodetección de estas moléculas separadas por electroforesis en dos dimensiones y el posterior análisis de espectrometría de masas contribuirá en gran medida para responder a estas interrogantes, así como para identificar los antígenos específicos reconocidos por los anticuerpos séricos del isotipo IgG.

## CONCLUSIONES

La infección de ratones C3H/HeJ con trofozoitos de *G. lamblia* de la cepa GS/M-83-H7 indujo una respuesta inmune sistémica de anticuerpos (IgG) la cual pudo ser detectada por ELISA. Los títulos de anticuerpos contra antígenos del parásito fueron significativos a partir de la segunda semana posterior a la primera infección y a partir de la primera semana durante la segunda infección. Considerando la reactividad y frecuencia de la inmunodetección los resultados indican que los antígenos inmunodominantes de *G. lamblia* en este modelo de giardiasis son los que presentaron MMR de 48, 55, 131, 159, 63 y 71 kDa; principalmente deben considerarse los de MMR de 71 y 63 kDa que fueron detectados tanto en la primoinfección como en la reinfección. Adicionalmente, el análisis de espectrometría de masas de las bandas antigénicas con MMR de 48, 55, 63 y 71 kDa reveló 33 proteínas diferentes de *G. lamblia*, entre las que se encuentran: proteínas del citoesqueleto, de superficie y del metabolismo del parásito.

## REFERENCIAS

- Aggarwal A, Nash T.E. 1987. Comparison of two antigenically distinct *Giardia lamblia* isolates in gerbils. *Am J Trop Med Hyg.* 36 (2): 325-332.
- Arguello M, Ortega-Pierres M.G. 1997. *Giardia duodenalis*: analysis of humoral immune response in experimentally infected gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Archives of Medical Research.* 28(2):1-8.
- Astiazarán-García H, Espinoza-Castellano M, Castañón G., Chávez-Murguía B., Martines-Palomo A. 2002. *Giardia lamblia*: effect of infection with symptomatic and asymptomatic isolates on the growth of gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Exp. Parasitol.* 95(2): 128-135.
- Barreras M.E, Ontiveros A.N. 2002. Efecto de la giardiasis aguda sobre el metabolismo del retinol en jerbos (*Meriones unguiculatus*) con desnutrición proteica y de vitamina A. Tesis. Depto. de Cs. Q.B. Universidad de Sonora.
- Belosevic M, Faubert G.M., MacLean J.D., Law C., Croll N.A. 1983. *Giardia lamblia* infections in Mongolian gerbils: an animal model. *J. Infect Dis.* 145(2).
- Beltrán Cota M.I. 2004. Identificación y caracterización inmunológica de antígenos de *Giardia lamblia* en la respuesta inmune secretora (IgA) en ratones C3H/HeJ. Tesis de maestría en proceso. CIAD. Depto. de Nutrición.
- Byrd L.G., Conrad J.T., Nash T.E. 1994. *Giardia lamblia* infections in adult mice. *Infect Immun.* 62(8):3583-5.
- Faubert G. 2000. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev.* 13(1):35-54.
- Figueroa Ojeda D.C., Granados López A.J. 2003. Evaluación de la respuesta inmune humoral sistémica durante la evaluación intestinal con *Giardia lamblia* en un modelo murino. Tesis. Depto. de Cs. Q.B. Universidad de Sonora.

- Gardner T.B., Hill D.R., 2001. Treatment of giardiasis. Clin Microbiol Rev.
- Gottstein B., Harriman G.R., Conrad J.T., Nash T.E. 1990. Antigenic variation in *Giardia lamblia*: Cellular and humoral immune response in a mouse model. Parasite Immunology 12 : 659-673.
- Hernández J.F., Duque S., Arévalo A., Guerrero R., Nicholls R.S. 2003. Identificación de antígenos de aislamientos colombianos de *Giardia duodenalis* reconocidos por IgG total y subclases. Biomedica. 23:263-273.
- Heyworth M.F. 1992. Immunology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. J Infect Dis. 166:465-72.
- Kum K., Khanna R., Vinayak V.K. 1991. Characterization of surface associated antigens of axenic *Giardia lamblia* trophozoites and their recognition by human sera. Indian J Med Res. 93 : 40-6.
- Nash T.E. 1997. Antigenic variation in *Giardia lamblia* and the host's immune response. Trans. R. Soc. Lond. 352 : 1369-1375.
- Nash T.E., Luján H.T., Mowatt M.R., Conrad J.T. 2001. Variant-specific surface protein switching in *Giardia lamblia*. Infect and Immun. 69(3): 1922-1923.
- Olmos R.N., Duque S., López M.C., Arévalo A., Guerrero R., Velandia P.M., Nicholls R.S. 2003. Identificación de antígenos de quistes y trofozoitos de aislamientos colombianos de *Giardia duodenalis* reconocidos por IgA. Biomedica. 23: 309-17.
- Palm J.E., Weiland E.L., Griffiths J.W., Jungstrom L.I., Svard G.S. 2003. Identification of immunoreactive proteins during acute human giardiasis. J Infect Dis. 187:1849-59.
- Solomons N.W. 1982. Giardiasis: nutritional implications. Rev. Infect. Dis. 4(4): 859-69.
- Stager S., Muller N. 1997. *Giardia lamblia* infections in B-cell-deficient transgenic mice. Infect and Immun. 65(9): 3944-3946.

## ANEXO 1

### Determinación de Proteína Método de Bradford

1.- Preparar diluciones seriadas a partir de un estándar de albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración de 1mg/mL en solución salina fisiológica (SSF). Obtener las siguientes concentraciones: 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312 mg/mL y realizar una dilución adicional para obtener una concentración de 0.4 mg/mL.

2.- A 800  $\mu$ l de reactivo Bradford en dilución 1:5 (Bradford-SSF) agregar 40  $\mu$ l de solución de BSA de cada una de las diluciones (por duplicado) y dejar incubar de 5 a 10 min. para posteriormente leer la densidad óptica (D.O) de las soluciones en espectrofotómetro (Termo Espectronic, Genesis 8,) a 595 nm.

3.- Graficar la curva estándar de BSA y obtener la ecuación de la misma, así como su coeficiente de correlación para confirmar la confiabilidad de los datos.

4.- Realizar una dilución del extracto antigénico soluble de *G. lamblia* 1:10 en SSF en un volumen final de 100  $\mu$ L.

5.- Tomar 40  $\mu$ L de dilución antigénica y agregarla a 800  $\mu$ l de solución de Bradford en dilución 1:5 y leer la D.O. en espectrofotómetro a 595 nm, después de 5 a 10 minutos de incubación.

6.- Obtener la concentración de proteínas totales del extracto antigénico con la ecuación obtenida en el paso 3.

## ANEXO 2

### Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (ELISA)

- 1.- Agregar a cada pozo de una placa de microtitulación de 96 pozos 2.5  $\mu$ L de extracto antigénico contenidos en 50  $\mu$ L de solución de carbonatos  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  -  $\text{NaHCO}_3$  (0.015 M - 0.034 M) pH 9.6 y dejar incubar toda la noche a 4°C.
- 2.- Realizar 4 lavados de los pozos con 200  $\mu$ L de PBS 1X  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  -  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - NaCl (1.377 mM - 8.45 mM - 1.454 M) pH 7.2.
- 3.- Bloquear los sitios libres de antígeno con 50  $\mu$ L de solución bloqueadora (BSA 1% - PBS 1X, pH 7.2) y dejar incubar 1 hora en agitación constante a 60 rpm (rotor marca LAB-LINE, MAXI Rotator) a temperatura ambiente.
- 4.- Agregar el primer anticuerpo (suero de ratones infectados) en dilución 1:10 en solución bloqueadora y dejar incubar por 1 hora a temperatura ambiente, en agitación constante (60 rpm).
- 5.- Lavar los pozos nuevamente con PBS 1X pH 7.2. Se recomienda eliminar las burbujas que puedan formarse y no dejar secar la placa durante en ningún momento de experimento.
- 6.- Agregar 50  $\mu$ L de solución de segundo anticuerpo (Goat anti-mouse IgG, preoxidase conjugated SIGMA, A-0168 ) en cada uno de los pozos, en dilución 1:1000 en solución de bloqueo e incubar por 1 hora a temperatura ambiente y agitación constante (60 rpm).
- 7.- Lavar los pozos como en el paso 2.
- 8.- Adicionar a los pozos 50  $\mu$ L de solución reveladora, ABTS (ácido 2,2'-azino-6,3 dietil benzitiazolin sulfónico) -  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0.03%. La solución de ABTS se obtiene de la siguiente manera: disolver 250 mgr de ABTS en 250 mL de solución reguladora de citratos ácido cítrico -  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0.067 M - 0.09 M). Primeramente llevar el volumen a 200 mL y ajustar el pH a 4.2 con NaOH 1 M y después aforar a 250 mL.

9.- Leer la D.O en espectrofotómetro (Fisher Biorad Microplate reader, BENCHMARK), a 415 nm despues de 15 min.

### ANEXO 3

#### Electrotransferencia e Inmunodetección

1.- Colocar el gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulosa y dos pads (BIO-RAD) en solución de transferencia 1X Tris - Glicina - Metanol - SDS (48 mM - 39 mM - 20% - 0.13 mM) pH 8.3 por 5 a 15 minutos.

2.- Acomodar de la siguiente manera: pad, membrana de nitrocelulosa, gel de poliacrilamida, y pad, eliminando en cada paso las burbujas que pudieron haberse formado por el buffer pasando un tubo limpio sobre cada capa.

3.- Electrotransferir en un sistema semiseco (Semi-Dry Blotting System, modelo IMM-1-A) por 25 min a 120 mili Amperes constantes.

4.- Bloquear la membrana de nitrocelulosa electrotransferida con 15 mL de PBS 1X - BSA 1% - Leche descremada Svelty 1%, a 100 rpm por 1 hora.

5.- Enjuagar la membrana con PBS 1X  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  -  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - NaCl (1.377 mM - 8.45 mM - 1.454 M) pH 7.2 para quitar el exceso de solución bloqueadora y cortar en tiras de 0.3 cm.

6.- Almacenar las tiras de nitrocelulosa a -25 °C hasta su uso posterior.

7.- Teñir el gel electrotransferido con azul de Coomassie para confirmar la tranferencia adecuada del antígeno.

8.- A las tiras a probar agregar el primer anticuerpo (suero de ratón infectado y/o suero de ratón preinfectado) en dilución 1:25 (400  $\mu\text{L}$ ) con solución PBS 1X - BSA1% - Leche descremada Svelty 1% (utilizar tubos para vacutainer).

9.- Dejar incubar por 2 h en agitación constante a 100 rpm.



10.- Transferir las tiras a un vaso de precipitado y realizar 5 lavados a las tiras con PBS1X pH 7.2 por 5 minutos cada uno a 100 rpm.

11.- Transferir las tiras a tubos vacutainer limpios y agregar el segundo anticuerpo (Goat anti-mouse anti IgG peroxidase conjugated, SIGMA, A-0168) en dilución 1:5000 con PBS 1X – BSA 1% - Leche descremada Svelty 1% y mantener en agitación constante a 100 rpm por una hora.

12.- Enjuagar las tiras de nitrocelulosa como en el paso 10.

13.- Colocar las tiras en papel transparente después de quitar el exceso de agua (NO DEJAR SECAR), y agregar aproximadamente 200  $\mu$ L de solución reveladora (1 parte de luminol con 1 parte de peróxido, SuperSignal, West Pico, Chemiluminescent Substrate, PIERCE) a cada una de las tiras y dejar incubar por 5 min.

14.- Exponer las tiras por 30 seg, 2 min ó 5 min a una película de radiografía.

15.- Exponer la película 30 seg en solución reveladora.

16.- Enjuagar en agua por 5 a 10 seg.

17.- Mantener la película en solución fijadora por 30 seg.

18.- Quitar el exceso de solución enjuagando la película con agua.

19.- Dejar secar.

## ANEXO 4

### Procesamiento de Muestras Para Espectrometría de Masas

1.- Las bandas de interés fueron extraídas de geles de poliacrilamida al 10% y cortadas en trozos pequeños para ser transferidas de manera individual a tubos eppendorf con 200  $\mu$ L de agua milli-Q.

2.- Se retiró el exceso de agua y se lavó brevemente en vortex con  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM.

3.- Se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo 50% /  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM 50%. Se agitó en vortex y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Este paso se repitió hasta que las piezas del gel estuvieron claras.

4.- Se retiró el exceso de líquido y se lavó por 5 min en vortex con la solución anterior. Posteriormente se lavó en vortex por 5 min con acetonitrilo para deshidratar las piezas del gel. Se retiró el exceso y se dejó secar al aire.

5.- Se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de una solución de DTT 10 mM en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mM. Se agitó en vortex brevemente y se dejó reducir por 45 a 60 min a  $65^\circ\text{C}$ .

6.- La solución se dejó enfriar a temperatura ambiente y se retiró la solución de DTT. Se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de una solución de iodoacetamida 55 mM en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mM. Se agitó en vortex brevemente y se incubó por 45 min en la oscuridad y a temperatura ambiente.

7.- Se retiró el exceso de iodoacetamida y las piezas del gel fueron lavadas con 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mM por 5 min en vortex. Posteriormente se lavó con una solución de acetonitrilo 50% /  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM 50% por 5 min en vortex. Se retiró el exceso de solución y se deshidrató con acetonitrilo como se describió en el paso 4.

8.- Se agregó la solución de tripsina- $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM lo suficiente para cubrir las piezas del gel, usualmente 20  $\mu\text{L}$  y se dejaron rehidratar a  $4^\circ\text{C}$  por 30 min.

9.- Cuando fue necesario se agregó más  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM hasta cubrir las piezas del gel y se dejó en digestión toda la noche a  $37^\circ\text{C}$ .

10.- Se centrifugó brevemente y el sobrenadante fue transferido a un tubo eppendorf de 0.65 mL.

11.- Las piezas del gel fueron lavadas en vortex por 20 min con 30  $\mu\text{L}$  de una solución de acetonitrilo 50% / ácido fórmico 2% para después centrifugar y recuperar el sobrenadante que se agregó al recuperado en el paso anterior.

12.- El procedimiento anterior se repitió hasta completar un volumen de aproximadamente 60 $\mu\text{L}$ . La muestra se almacenó a  $-30^\circ\text{C}$  hasta el posterior análisis.

13.- Los extractos digeridos fueron agitados en vortex y el volumen se redujo a 5 – 10  $\mu$ L en Speed Vac.

14.- Se centrifugó a 15,000 x g por 10 min y el sobrenadante se transfirió a un eppendorf de 0.65 mL para ser cargado en el espectrómetro de masas.

## Capítulo 2

**Inmunodetección de antígenos de *Giardia lamblia* separados mediante electroforesis de doble dimensión (Punto isoelectrico SDS-PAGE) y generación de anticuerpos monoclonales específicos contra antígenos de *G. lamblia*.**

## INTRODUCCIÓN

La giardiasis es una de las parasitosis más comunes a nivel mundial y la estrategia principal para controlarla es el tratamiento médico. Sin embargo, las reinfecciones suelen ser comunes y se ha demostrado que existen cepas de *G. lamblia* resistentes a los diferentes fármacos utilizados para eliminar la infección (Jiménez-Cardoso y col., 2004; Wright y col., 2003). Considerando estos casos, el desarrollo de una herramienta profiláctica es una buena alternativa para evitar la parasitosis en las poblaciones donde la giardiasis es endémica.

La identificación y caracterización de los antígenos específicos de *G. lamblia* que son reconocidos por el sistema inmune del hospedero son factores clave para el desarrollo de vacunas recombinantes (Sette y Fikes, 2003). De esta manera, se generan anticuerpos contra el parásito y se logra disminuir la excreción de quistes (Stager y col., 1997; Larocque y col., 2003). No obstante, son escasos los estudios publicados acerca de la identificación de los antígenos específicos del parásito que median la respuesta inmune (Palm y col., 2003).

Con el propósito de ampliar el conocimiento acerca de los antígenos y la biología de *G. lamblia* se han generado diversos anticuerpos monoclonales (Campbell y Faubert, 1994; Nash y col. 2001). Sin embargo, estas herramientas biológicas no son suficientes para evaluar la complejidad antigénica del parásito y es necesario un mayor número de ellas para evaluar la antigenicidad (Nash, 1997) y lograr la caracterización inmunológica de los antígenos de *G. lamblia*.

En el presente capítulo, se describen las condiciones para separar el antígeno soluble de *G. lamblia* en electroforesis de dos dimensiones, así como para electrotransferir dichos antígenos a membrana de nitrocelulosa. Sin embargo, no se logró inmunodetectar los antígenos del parásito empleando suero de ratones C3H/HeJ infectados con *G. lamblia*. Por otro lado, se generaron anticuerpos monoclonales contra antígenos del parásito, los cuales fueron evaluados por inmunofluorescencia indirecta.

## OBJETIVOS

### General

Identificar mediante electroforesis de doble dimensión (Punto isoelectrico-SDS-PAGE), inmunodetección y análisis de espectrometría de masas los antígenos específicos de *G. lamblia* reconocidos por anticuerpos séricos (IgG) de ratones C3H/HeJ con giardiasis.

### Específicos

- Establecer las condiciones para separar las proteínas solubles de *G. lamblia* mediante electroforesis de doble dimensión.
- Detectar las proteínas reconocidas por anticuerpos séricos de ratones C3H/HeJ mediante electrotransferencia e inmunodetección.
- Identificar las proteínas reconocidas por el suero de los ratones infectados mediante análisis de espectrometría de masas.
- Generar anticuerpos monoclonales contra antígenos de *G. lamblia*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Electroforesis de Punto Isoeléctrico

Las proteínas solubles de *G. lamblia* fueron separadas por punto isoelectrico en geles de poliacrilamida con gradiente de pH de 3.5-9.5 (Amersham Pharmacia Biotech AB, Ampholine™ PAGplate). La proteína soluble (250 µg / 30 µL) obtenida como se describió en el capítulo 1 con ligeras modificaciones (el último lavado se realizó con agua grado HPLC y los parásitos fueron resuspendidos también con agua grado HPLC) se agregó en tiras de aplicación de muestra (22-24 por gel) previamente colocadas hacia el cátodo sobre el gel de punto isoelectrico. A lo largo de los extremos del gel se colocaron tiras de celulosa humedecidas con solución reguladora ánodo (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1M) y cátodo (NaOH 1M). Las muestras fueron recorridas a 1000 Volts constantes, 50 mAmp máx., 30 Wats máx. por 1 h. Transcurrido este tiempo, se retiraron las piezas de aplicación de muestra y se corrió la electroforesis a 1300 Volts constantes, 50 mAmp máx., 30 Wats máx. por 1.5 h. Se utilizó una cámara de electroforesis horizontal (BIOPHORESIS™ BIO-RAD) y una fuente de poder BIO-RAD Power-Pac 3000. Durante el ensayo se mantuvo una temperatura de 5 °C para lo que se utilizó un baño de recirculación de agua (VWR Scientific™ Model 1150A). Posterior a la electroforesis el gel fue cortado de acuerdo al tamaño de las tiras de aplicación de muestra y se almacenó a -70 °C.

### Tinción de Geles de Punto Isoeléctrico

Para observar la separación de las proteínas se tiñeron dos tiras del gel de punto isoelectrico. El gel primeramente fue fijado con una solución de ácido sulfosalicílico 3.45% - ácido tricloroacético 11.5% - metanol 30% y se incubó por

30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las tiras del gel de punto isoelectrico se lavaron 3 veces por 5 min con solución desteñidora (CH<sub>3</sub>COOH 18%- Etanol 25%) y se tiñó por una hora (Azul de Coomassie R-250 0.2% - CH<sub>3</sub>COOH 8% - Etanol 25%). Por último, se dejó desteñir toda la noche en solución desteñidora.

### Electroforesis en Doble Dimensión

Para la separación del antígeno soluble de *G. lamblia* en dos dimensiones, se corrieron primero geles de punto isoelectrico como se describió anteriormente. Las tiras de punto isoelectrico se unieron a un gel SDS-PAGE al 12.5 % de 1.5 mm y no se utilizó gel de inicio. Para unir el gel de punto isoelectrico con el de acrilamida se utilizó agarosa al 0.5 % con trazas de azul de bromofenol. Previo a unir la tira de punto isoelectrico con el gel de acrilamida, esta fue incubada por 15 min en 5 mL de una solución de SDS 2%, Tris-HCl 8.8 (50 mM), urea 6 M, Glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol 0.002%, DTT 50 mg; posteriormente, se incubó de nuevo por 15 min en un volumen similar de solución que contenía iodoacetamida 125 mg en lugar de DTT (el DTT y iodoacetamida se agregaron a la solución previo a su uso). La técnica se desarrolló en una cámara de electroforesis vertical para geles medianos (BRL, USA) y se utilizó una fuente de poder BIO-RAD Power-Pac 3000. La electroforesis se corrió a 150 Volts y 25 mAmp constantes por 7 h. La solución de corrida consistió de tris-glicina-SDS (25 mM - 192 mM - 0.1%) y los geles fueron teñidos con nitrato de plata.



### Tinción de Geles de Doble Dimensión

Para visualizar las proteínas separadas en doble dimensión se tiñeron los geles con nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ). Posterior a la electroforesis, los geles SDS-PAGE al 12.5 % fueron lavados por 10 min en agitación constante con agua desionizada. Posteriormente, las proteínas fueron fijadas al gel incubando una hora a temperatura ambiente en una solución de etanol-ácido acético (30%-10%). Transcurrido este tiempo, se dejó reducir una hora a temperatura ambiente con una solución de etanol-acetato de sodio-glutaraldehído-tiosulfato de sodio (30 % - 0.5 M – 0.05 M – 0.2 %). Posteriormente, el gel se lavó 3 X 5 min con agua desionizada. Una vez realizados los lavados el gel se incubó por 20 min a temperatura ambiente y protegido de la luz con solución de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$  0.1% - formaldehído 0.02%) para después revelar la reacción con una solución de carbonato de sodio – formaldehído (2.5% - 0.01%). Cuando la reacción fue clara, se detuvo con una solución de EDTA 0.05 M para finalmente transferir el gel a una solución de etanol al 40%.

### Electrotransferencia de Proteínas Separadas en Doble Dimensión

Para detectar los antígenos específicos reconocidos por los anticuerpos séricos (IgG) de los ratones infectados con *G. lamblia*, el antígeno soluble fue separado por electroforesis en dos dimensiones y las proteínas fueron electrotransferidas a membrana de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  (BIO-RAD, Hercules, CA. USA). Para el desarrollo de la técnica se utilizó un sistema de electrotransferencia semiseco (Trans-Blot<sup>®</sup> SD, BIO-RAD Hercules, CA. USA) y la solución de transferencia consistió de tris-glicina-metanol-SDS (48 mM – 39 mM – 20% - 0.13 mM) a pH 8.3. Las condiciones óptimas de transferencia fueron 1 h a 20 volts constantes y 300 mAmp. Una vez transferidas las proteínas, los sitios libres de antígeno en la membrana se bloquearon incubando

por 1 h a temperatura ambiente en una solución de PBS-BSA 1%-leche descremada en polvo (Svelty, Nestle. México) al 1%. Finalmente, la membrana se enjuagó con PBS pH 7.2 y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### Inmunización de Ratones para Obtener Células de Bazo

Con el propósito de generar el mayor número de clones posibles específicas para los antígenos inmunoreconocidos en una dimensión (capítulo 1), las bandas antigénicas con MMR de 47, 55, 63 y 71 kDa fueron extraídas de geles SDS-PAGE al 10% para inmunizar ratones de la cepa C3H/HeJ. Las bandas extraídas del gel fueron lavadas 3 veces con 5 mL de PBS estéril pH 7.2. Posteriormente, las piezas del gel fueron maceradas exhaustivamente en 500  $\mu\text{L}$  de PBS estéril pH 7.2 y se completó a 1 mL con adyuvante completo de Freund (GIBCO). Esta última suspensión fue agitada en vortex por 1 h para después inmunizar ratones de forma intraperitoneal con 400  $\mu\text{L}$  de la suspensión. Posteriormente, se realizaron inmunizaciones cada 10 días por un periodo de 60 días siguiendo el mismo proceso pero con adyuvante incompleto de Freund. Finalmente, 48 h antes de sacrificar a los ratones estos fueron inmunizados con antígeno soluble completo sin adyuvante.

### Generación de Anticuerpos Monoclonales

Para obtener las células de bazo uno de los ratones inmunizados fue sacrificado por dislocación cervical. El bazo fue removido de manera aséptica y macerado para después filtrarse a través de una superficie fina de tela. Posteriormente, el filtrado se centrifugó por 5 min a 2000 rpm y se retiró el sobrenadante. El precipitado conteniendo las células se resuspendió en 5 mL de solución ACK Lysing para eliminar glóbulos rojos. La suspensión celular se

centrifugó como anteriormente y las células fueron resuspendidas en 5 mL de medio DMEM para ser contadas en cámara de Neubauer. Posteriormente, las células de mieloma AG82YK fueron agregadas a la suspensión de células de bazo en relación 1:2 con respecto a las de bazo. En seguida, se realizaron 3 lavados de la suspensión celular con 5 mL de medio DMEM. Posteriormente, el tubo conteniendo las células se colocó en un baño de agua a 37 °C y gota a gota se agregó 1 mL de polietilenglicol (1500 al 50%) en 1 min. Después de agregado el polietilenglicol, el tubo se agitó suavemente por 1 min y se agregaron 2 mL de medio DMEM en 2 min. Finalmente, se agregaron 7 mL de medio DMEM gota a gota en un lapso de 3 min para completar un volumen de 10 mL. El tubo fue centrifugado a 1500 rpm por 5 min y se retiró el medio. Posteriormente, las células se resuspendieron suavemente en 10 mL de medio D10F. Después, utilizando medio D10F la suspensión celular se llevó a un volumen suficiente para preparar 13 placas de 96 pozos con 100 µL de la suspensión celular. En promedio se colocaron 50 mil células por pozo. Transcurridas 12 h se agregó medio HAT2X/D10F/300ng de ciclosporina A, 100 µL por pozo. Las placas fueron monitoreadas diariamente para observar crecimiento celular y el tamizaje fue realizado cuando se observó crecimiento celular en los pozos.

#### Selección de Hibridomas Positivos a Antígenos de *G. lamblia*

La selección de los hibridomas se realizó por ensayos de inmunofluorescencia indirecta. Los trofozoítos de *G. lamblia* fueron colocados en microplacas de titulación con fondo cónico y fueron lavados utilizando una pipeta multicanal con 200 µL de una solución de PBS-BSA-NaN<sub>3</sub> (1X-1%-0.02%) posterior al lavado los trofozoítos fueron centrifugados a 1500 rpm por 5 min a 4°C. Enseguida, los trofozoítos fueron resuspendidos en medio de cultivo el cual fue recuperado de los pozos donde se encontraban los hibridomas y se incubó 1 h a 4°C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 1500 rpm por 5 min a 4°C y se

lavó 3 veces con la solución de PBS-BSA- $\text{NaN}_3$ . Posteriormente, los trofozoitos fueron resuspendidos en 100  $\mu\text{L}$  de solución de PBS-BSA- $\text{NaN}_3$  y se agregaron 2  $\mu\text{L}$  de un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado a fluoresceína y se incubó por 1 h a 4  $^{\circ}\text{C}$  protegido de la luz. Posteriormente, los trofozoitos fueron lavados 2 veces con solución de PBS-BSA- $\text{NaN}_3$  y resuspendidos en 50  $\mu\text{L}$  de la misma solución. Finalmente, la suspensión de trofozoitos se colocó entre portaobjeto y cubreobjeto para ser observada al microscopio de fluorescencia.

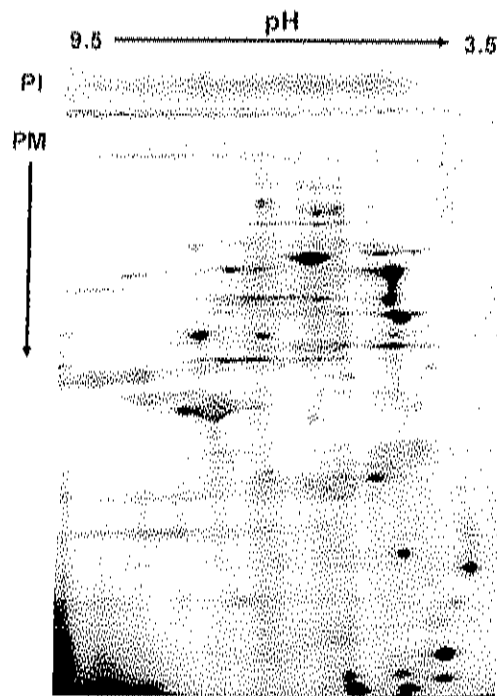
## RESULTADOS

### Separación de Antígenos de *Giardia lamblia* por Electroforesis de Doble Dimensión y su Reconocimiento por Anticuerpos Séricos (IgG) de Ratones Infectados

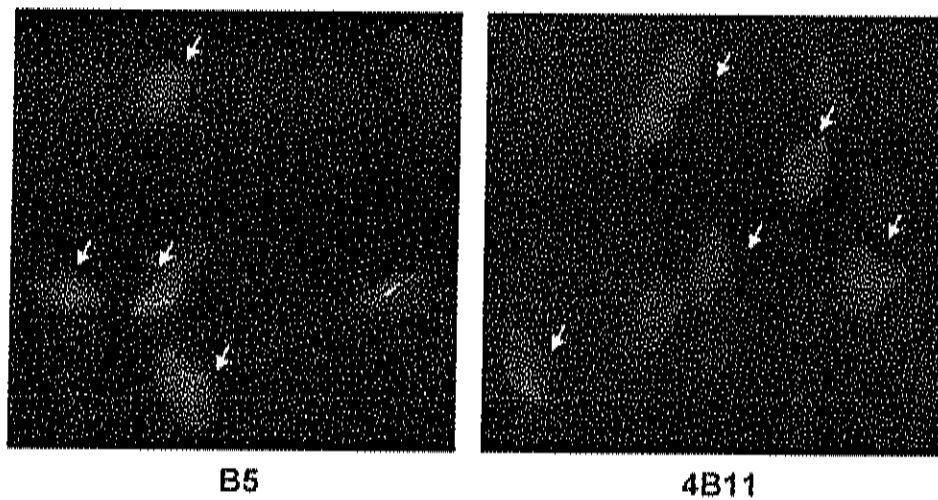
Como se demostró en el capítulo 1, se identificaron varias proteínas de *G. lamblia* en las bandas antigénicas reconocidas por anticuerpos séricos (IgG) de ratones infectados. Para identificar los antígenos específicos en esas bandas se realizó electroforesis en dos dimensiones. La separación del antígeno soluble de *G. lamblia* en doble dimensión pudo ser visualizada solo con tinción de nitrato de plata (Figura 1) y las condiciones óptimas de electrotransferencia de estas proteínas fueron establecidas. Sin embargo, en este estudio bajo las condiciones de inmunodetección establecidas en el capítulo 1, no fue posible detectar los antígenos específicos del parásito reconocidos por anticuerpos séricos del isotipo IgG.

### Los Anticuerpos Monoclonales Generados Reconocen Antígenos de Superficie de *Giardia lamblia*

Para generar los anticuerpos específicos contra los antígenos inmunodominantes de *G. lamblia* se inmunizaron ratones con las bandas detectadas durante el curso la reinfección (capítulo 1). De los hibridomas que fueron probados para ser inmunoreactivos contra antígenos del parásito, 2 fueron positivos por inmunofluorescencia indirecta (B5 y 4B11); pero no lo fueron por electrotransferencia e inmunodetección (Figura 2).



**Figura 1. Separación de proteínas solubles de *Giardia lamblia* en doble dimensión (tinción con nitrato de plata).** Para realizar la electroforesis de punto isoeléctrico se cargaron 250  $\mu\text{g}$ /30  $\mu\text{L}$  de proteína soluble de *G. lamblia*. La electroforesis se desarrolló a 1000 Volts constantes, 50 mAmp máx, 30 Wats máx por una hora y posteriormente a 1300 Volts constantes 50 mAmp máx, 30 Wats máx. La separación de proteínas en doble dimensión se realizó en geles SDS-PAGE al 12.5%. La electroforesis se desarrolló a 150 Volts, 50 mAmp constantes por 7 h. PI=Gel de punto isoeléctrico, PM=Peso molecular.



**Figura 2. Reactividad de los anticuerpos B5 y 4B11 por inmunofluorescencia indirecta.** Los trofozoítos de *G. lamblia* fueron lavados con una solución de PBS-BSA1%-NaN<sub>3</sub> 0.02% y fueron resuspendidos en medio de cultivo recuperado de los pozos donde se encontraban los hibridomas (200 µL). El segundo anticuerpo (anti-IgG de ratón conjugado a fluoresceína) se agregó en dilución 1:100 (100 µL). Las flechas señalan los trofozoítos que presentaron fluorescencia.

## DISCUSION

En el presente capítulo se consideró separar las proteínas solubles de *G. lamblia* mediante electroforesis de dos dimensiones con la finalidad de inmunodetectar aquellos antígenos que son reconocidos por los anticuerpos séricos de ratones infectados. La separación de las proteínas por punto isoeléctrico fue suficiente para observar puntos bien definidos una vez realizada la doble dimensión. En trabajos similares (Palm y col., 2003), se ha utilizado un gradiente de pH de 5 a 8 y se observa una buena separación de las proteínas de *G. lamblia* en doble dimensión. En el estudio antes citado, fue posible identificar los antígenos del parásito que son reconocidos por anticuerpos séricos de humanos con giardiasis.

En el presente trabajo, no se encontraron las condiciones óptimas para detectar los antígenos específicos que son reconocidos por los anticuerpos séricos de ratones infectados con *G. lamblia*. Para establecer las condiciones apropiadas es necesario realizar más ensayos de inmunodetección, pero debe considerarse que la cantidad de suero inmune con la que se cuenta es escasa.

La generación de anticuerpos monoclonales contra antígenos de *G. lamblia* ha sido un factor importante para caracterizar antígenos del parásito y para entender mejor la variabilidad antigénica. Estas herramientas biológicas también han sido útiles para agrupar las distintas cepas de *G. lamblia*. En el presente trabajo se identificaron dos clonas que generan anticuerpos contra antígenos del parásito.

La evaluación de estas clonas se hizo por electrotransferencia e inmunodetección y no se observó reactividad de los anticuerpos por este método considerando las condiciones establecidas en el capítulo 1 a excepción del primer anticuerpo donde se utilizó medio de cultivo de los hibridomas. Previamente, con esta misma metodología no fue posible detectar el antígeno H7 (característico de la cepa de *G. lamblia* que se utilizó en este estudio) pero el



anticuerpo monoclonal G10/4 específico para dicho antígeno si presentó reactividad por inmunofluorescencia indirecta. Considerando este caso, se optó por evaluar los hibridomas generados por la técnica antes mencionada y se observó reactividad para dos de ellos. Estas herramientas generadas pueden ser utilizadas para obtener los antígenos específicos que reconocen y contribuir al conocimiento sobre la complejidad antigénica del parásito.

## CONCLUSIONES

Se establecieron las condiciones para separar el antígeno soluble de *G. lamblia* mediante electroforesis de doble dimensión así como para transferir estas proteínas a membrana de nitrocelulosa. Sin embargo, no se logró detectar los antígenos específicos reconocidos por anticuerpos séricos (IgG) de ratones C3H/HeJ infectados con *G. lamblia*. Por otro lado, se generaron anticuerpos monoclonales contra antígenos de superficie de *G. lamblia*, los cuales serán de utilidad para realizar la purificación y caracterización bioquímica de tales antígenos.

## REFERENCIAS

- Bienz M.P., Wittwer P., Zimmerman M., Muller N. 2001. Molecular characterisation of a predominant antigenic region of *Giardia duodenalis* variant surface protein H7. *Int. J Parasitol.* 31 827-832.
- Campbell J.D., Faubert G.M. 1994. Recognition of *Giardia lamblia* cyst-specific antigens by monoclonal antibodies. *Parasite Immunol.* 16(4):211-9.
- García-Aranda J.A. 1995. Importancia clínica de la giardiasis. *Bol. Med. Hosp. Infant. De Mex.* 52(10).
- Jiménez-Cardoso E., Flores-Luna A., Pérez-Urizar J. 2004. *In vitro* activity of two phenil-carbamate derivatives, singly and in combination with albendazole against albendazole-resistant *Giardia intestinalis*. *Acta Trop.* 92(3):237-44.
- Larocque R., Nakagaki K., Lee P., Abdul-Wahid A., Faubert G.M. 2003. Oral immunization of BALB/c mice with *Giardia duodenalis* recombinant cyst wall protein inhibits shedding of cysts. *Infect Immun.* 71(10): 5662-9.
- Nash T.E. 1997. Antigenic variation in *Giardia lamblia* and the host's immune response. *Phil. Trans. R. Soc. Land.* 352:1369-1375.
- Nash T.E., Luján H.T., Mowatt M.R., Conrad J.T. 2001. Variant-specific surface protein switching in *Giardia lamblia*. *Infection and Immunity.* 1922-1923.
- Palm J.E., Weiland E.L., Griffiths J.W., Jungstrom L.I., Svard G.S. 2003. Identification of immunoreactive proteins during acute human giardiasis. *J Infec Dis.* 187:1849-59.
- Sette A., Fikes J. 2003. Epitope-based vaccines : an update on epitope identification, vaccine design and delivery. *Current Opinion in immunology.* 15 : 461-470.
- Stager S., Gottstein B., Muller N. 1997. Systemic and local antibody response in mice induced by a recombinant peptide fragment from *Giardia lamblia* variant surface protein (VSP) H7 produced by a *Salmonella typhimurium* vaccine strain. *International Journal for Parasitology.* 27(8): 965-971.

- Weiland E.L., Palm J.E., Griffiths J.W., McCaffery J.M., Svard G.S. 2003. Characterisation of alpha-1 giardin; an immunodominant *Giardia lamblia* annexin with glycosaminoglycan-binding activity. *Int J Parasitol.* 1-11.
- Wright J.M., Dunn L.A., Upcroft P., Upcroft J.A. 2003. Efficacy of anti-giardial drugs. *Expert Opin Drug Saf.* 2 (6): 529-541.

- Weiland E.L., Palm J.E., Griffiths J.W., McCaffery J.M., Svard G.S. 2003. Characterisation of alpha-1 giardin: an immunodominant *Giardia lamblia* anxin with glycosaminoglycan-binding activity. *Int J Parasitol.* 1-11.
- Wright J.M., Dunn L.A., Upcroft P., Upcroft J.A. 2003. Efficacy of anti-giardial drugs. *Expert Opin Drug Saf.* 2 (6): 529-541.