

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

**Caracterización Bioquímica parcial de Antígenos
Inmunodominantes de *Giardia lamblia* Capaces de Inducir
una Respuesta Inmune Humoral en un Modelo Murino**

TRABAJO DE TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Presenta:

Q.B. Ma. Lucila Rascón Durán

Hermosillo, Sonora

Marzo de 2008

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



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



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

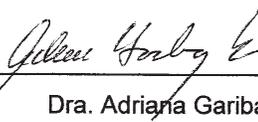
FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis de María Lucila Rascón Durán, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.

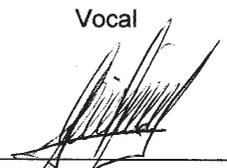


Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras
Director de Tesis

Dr. Humberto Francisco Astiazarán García
Secretario



Dra. Adriana Garibay Escobar
Vocal



Dr. Eduardo Ruiz Bustos
Suplente

El presente trabajo se realizó en los laboratorios del Programa de Posgrado en Ciencias de la Salud, de la Universidad de Sonora bajo la dirección del Dr. Carlos Arturo Velásquez Contreras con apoyo económico del proyecto CONACYT P46645.

El presente trabajo se realizó en los laboratorios del Programa de Posgrado en Ciencias de la Salud de la Universidad de Sonora bajo la dirección del Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras con apoyo económico parcial del Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica CONACYT-Gobierno del Estado de Sonora, clave SON-204-C01-008.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por tan maravillosas bendiciones: La vida, mi familia y mis amigos.

A la Universidad de Sonora por ser un espacio de fortalecimiento académico y personal; A las autoridades que en diferentes espacios y momentos me han brindado oportunidades de superación, en especial a la Dra. Carmen Candia por el apoyo que ha mostrado para mi mejoramiento académico.

A mis padres por darme la vida, por su invaluable amor, y su ejemplo de tenacidad. A mis hermanos, sobrinos y a mi segunda mamá Doña Elsy por la unión que en todo momento hemos tenido.

A mis dos AMORES: Humberto e Itzel Reneé, por tantos momentos de alegría. Porque siempre hay palabras de aliento y esperanza en los momentos difíciles. LOS AMO.

Al Dr. Carlos Velázquez, al Dr. Humberto Astiazarán, a la Dra. Adriana Garibay y al Dr. Eduardo Ruíz, porque en todo momento compartieron su experiencia académica y siempre tuvieron algún consejo para mejorar el contenido de este trabajo. Por su enseñanza de constancia, la virtud de la tolerancia y la importancia de la perseverancia en lo perfectible. Pero sobre todo gracias por su amistad.

A mis compañeros y amigos del Departamento de Ciencias Químico-Biológicas por todos los momentos que hemos compartido: Leonardo, Monserrat, Rogelio, Moisés, Ramón, Judith, Rosy, Ana Gloria, Margarita, Loren, Olivia, Rosy Lerma, Edilia, Martha, Lucía, Griselda, Mary Arce, Lupita Cárnez, Tere, Blanquita, Claudia, Maestro Cázares, Maestro Alcántar,

Maestro Córdova, Maestra Virginia, Maestra Sandra porque en los momentos buenos, difíciles y más difíciles están allí. Gracias por todo.

Al personal del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA), por las facilidades brindadas en sus instalaciones. En particular al M. en C. Rafael Canett por su apoyo en el Bioterio, a la Dra. Marina Ezquerro y al Dr. José Luis por su asesoría en el manejo de la electroforesis en doble dimensión.

A mis hijitos y maestros: Jael, Anita, Paola, Claudia, Carolina, Estela, Dalia, Margarita, Pedro, Martín, Rafa, Carlos, Marcos, porque sin su apoyo este trabajo no habría concluido hoy. Porque con su juventud y alegría me dan fortaleza para seguir adelante.

A la QFB. Diana Mendoza y Q.B Bertha Pacheco por su apoyo en el mantenimiento de los cultivos de *Giardia*. Al Q.B. René Valenzuela por su asesoría en el manejo de métodos inmunoquímicos.

A mis amigos de siempre: Claudia y Javier por su ejemplo de ser cada día mejor y por todos los bellos momentos compartidos.

A mis compañeros de generación: Lucía, Armida, Edgar, Micaela, Martha, María del Socorro, Eleazar, Betty, Tannia, Bethuel, Ernesto, Alejandro, Adelina, Martín, Mónica, Francisco, por todas las experiencias que compartimos.

Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber

Albert Einstein

**Con profundo amor dedico este trabajo a
HUMBERTO y a mi hija ITZEL RENEÉ
porque son la razón de mi existir.**

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
OBJETIVOS	xiii
RESUMEN	xiv
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	4
Giardiasis: Aspectos Clínicos	4
Epidemiología	5
Antígenos de <i>G. lamblia</i>	7
Mecanismos Efectores de la Respuesta Inmune	10
Mecanismos Naturales de Defensa	10
Inmunidad Adquirida	12
Modelos Experimentales para el Estudio de la Inmunología de la Giardiasis	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
Modelo Experimental	15
Cultivo de <i>G. lamblia</i>	15
Preparación del Extracto Antigénico	15
Cuantificación de Proteínas Solubles	16
Inducción de la Giardiasis en el Modelo Murino	16
Evaluación de la Respuesta Inmune Humoral	16
Evaluación de la Respuesta Inmune Humoral Sistémica	17
Análisis Estadístico	17
Identificación de Proteínas Inmunogénicas	17
Secuenciación de los Antígenos Inmunodominantes de <i>G. lamblia</i> Mediante Espectrometría de Masas	18
Inmunofluorescencia de Antígenos de Superficie de <i>G. lamblia</i>	18

RESULTADOS	20
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	49
BIBLIOGRAFÍA	50
ANEXOS	61

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Estimación del contenido de proteínas en extractos obtenidos mediante lisis de trofozoítos de <i>G. lamblia</i> GS-M-83-H7.	21
II. Manchas proteicas de <i>G. lamblia</i> separadas por 2-DE.	24
III. Proteínas de <i>G. lamblia</i> identificadas en bandas inmunogénicas mediante espectrometría de masas.	28
IV. Probables proteínas capaces de inducir una respuesta de IgG Sistémica identificadas por Western-blotting en 2D y espectrometría de masas.	33
V. Proteínas identificadas por espectrometría de masas en muestras control separadas por 2-DE.	34

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Patrón electroforético en 2-DE de Proteínas solubles de trofozoítos de <i>G. lamblia</i> clona GS-M-83-H7.	22
2. Perfil electroforético en 2-DE del extracto antigénico de <i>G. lamblia</i> en rango de punto isoelectrónico de 5 a 8.	23
3. Título de anticuerpos IgG séricos en ratones C3H/HeJ con giardiasis.	26
4. Proteínas reconocidas por IgG sérica en ratones infectados con trofozoítos de <i>G. lamblia</i> mediante Western-blotting en 2D.	29
5. Perfil electroforético del extracto proteico de <i>G. lamblia</i> mediante 2-DE en gradiente de pH 5 a 8.	31
6. Anticuerpos IgG en ratones con giardiasis reconocen antígenos de superficie de la clona GS-M-83-H7 durante la primo y la re-infección.	36
7. Perfil de inmunorreconocimiento de antígenos de <i>G. lamblia</i> que inducen respuesta de IgG a nivel sistémico.	37
8. La composición química de la solución de rehidratación usada en 2-DE afecta el inmunorreconocimiento de IgA fecal.	39
9. Los agentes desnaturizantes y reductores presentes en la solución de equilibrio usada en 2-DE afectan el inmunorreconocimiento de IgA.	41
10. Condiciones experimentales óptimas en el ensayo de manchas para el inmunorreconocimiento de IgA fecal.	42
11. Western-blot en 2D de proteínas de <i>G. lamblia</i> e IgA fecal.	43

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar parcialmente antígenos de *Giardia lamblia* clona GS-M-86-H7 capaces de inducir una respuesta inmune humoral sistémica y mucosal en ratones C3H/HeJ.

Objetivos Específicos

1. Generar el perfil electroforético del extracto proteico de *G. lamblia* clona GS-M-83-H7 mediante electroforesis en doble dimensión (2-DE).
2. Evaluar la respuesta de IgG sérica anti-*G. lamblia* durante una primo y re-infección en ratones C3H/HeJ.
3. Caracterizar parcialmente proteínas de *G. lamblia* clona GS-M-86-H7 con capacidad de estimular la producción de anticuerpos séricos de isotipo IgG e IgA fecal.

RESUMEN

El estudio de la respuesta inmune involucrada en la giardiasis, se ha abordado a través de la identificación y caracterización molecular de los antígenos de *Giardia lamblia* y en el estudio de los mecanismos de defensa contra el parásito. Sin embargo, solo relativamente pocas proteínas inmunogénicas se han caracterizado a nivel molecular. Estudios en humanos y en modelos murinos sugieren la participación importante de linfocitos T, linfocitos B (Eckmann, 2003; Langford y cols., 2002; Rosales-Borjas y cols., 1998; Singer y col., 2000; Stäger y col., 1996) y ciertas citocinas (Biez, y cols., 2003; Venkatesan y cols., 1996; Zhou y cols., 2003; Zhou y cols. 2007) en el aclaramiento de la infección. Recientemente en nuestro laboratorio se identificaron una serie de bandas proteicas mediante SDS-PAGE, con capacidad de inducir una respuesta de anticuerpos IgA e IgG específicos hacia *G. lamblia* en ratones C3H/HeJ. En base a estos resultados y con el objetivo de profundizar más en el conocimiento de las proteínas inmunogénicas del parásito, se utilizó electroforesis en doble dimensión (2-DE) y análisis por espectrometría de masas. Los resultados de este estudio mostraron un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) de IgG sérica en la segunda semana post-infección, con reconocimiento dirigido hacia proteínas con masas moleculares entre 63 y 71 kDa y puntos isoeléctricos entre 5.3 a 5.8. En el análisis por espectrometría de masas se identificaron tres proteínas variables de superficie (VSP-H7, VSP-H7-1 y VSP-INR) y una β -giardina. Adicionalmente se identificó la presencia de proteínas citoplasmáticas como la proteína 21.1, proteínas de choque térmico, proteína de unión a cadenas pesadas de inmunoglobulinas (BiP), enzimas como la fosfatidil inositol cinasa y enolasa en el área de inmunorreactividad. La generación de anticuerpos monoclonales (IgG2b) a partir de células de bazo de ratones infectados por vía per-oral con *G. lamblia*, permitió la identificación de proteínas inmunodominantes en la

banda de 71 kDa. La presencia de agentes desnaturalizantes y reductores usados en la electroforesis en doble dimensión afectó el inmunorreconocimiento de IgA fecal. Los resultados de nuestro estudio sugieren que parte de la respuesta inmune humoral en ratones infectados con *G. lamblia* está dirigida contra epitopes conformacionales de proteínas localizadas en la superficie del parásito y proteínas citosólicas.

INTRODUCCIÓN

Giardia lamblia es el principal protozooario causante de enfermedades diarreicas en una gran variedad de hospederos, incluyendo al humano (Adam, 2001; Byrd y cols., 1994; Larocque y cols., 2003; Ljungstöm y cols., 1985). Afecta principalmente a la población infantil de países en vías de desarrollo (Torres y cols., 2001). Sin embargo, en países industrializados, la giardiasis es considerada una infección re-emergente (Ortega y Adam, 1997; Pollock y cols., 2005). En México, su prevalencia oscila entre el 20 al 60% (Moya-Camarena y cols., 2002; Sotelo, 1998). Sonora se encuentra entre los 5 estados de mayor prevalencia de giardiasis (S.S.A. 2003 y 2006).

Los esfuerzos gubernamentales realizados para el control de la giardiasis, posiblemente se ven obstaculizados debido a las limitaciones que existen en el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares de la interacción huésped-patógeno, por lo que a pesar de la existencia de fármacos eficientes contra *Giardia* y a las campañas de salud para el control de la giardiasis, esta sigue siendo un problema de alta prevalencia (S.S.A. 2006). En este sentido, diversos grupos de investigadores están enfocados en el estudio de la biología (Gillin y Reindner, 1996), bioquímica y genética del parásito (Elmendorf y cols., 2003; Nash, 1992, 1995, 1997, 2002; Nash y cols., 1985, 2001), epidemiología, formas de transmisión (Franco y cols. 2001) e inmunología de la giardiasis (Eckmann, 2003; Faubert, 2000; Li y cols., 2004 Rosales-Borjas y cols., 1998; Roxström-Lindquist y cols., 2005; Singer y Nash, 2000; Velázquez y cols., 2005; Zhou y cols. 2003; 2007).

La respuesta inmune involucrada en la giardiasis, se ha abordado a través de la identificación y caracterización molecular de los antígenos de *Giardia* así como del estudio de los mecanismos de defensa humoral y celular del hospedero contra el parásito. Entre los antígenos mayormente estudiados se encuentran el grupo de las giardinas (30-50 kDa), un grupo de

tubulinas (12 a 145 kDa), una proteína de choque térmico de 57 kDa y una familia de proteínas denominadas proteínas variables de superficie (VSPs), con masa molecular relativa de 30 a 200 kDa. La VSP mejor caracterizada a nivel bioquímico e inmunológico es la VSP-H7 (Adam, 2001; Aggarwal y Nash, 1988; Biez y cols., 2001; Faubert, 2000; Nash y cols., 2001; Tellez y cols., 2005). La gran limitante que actualmente se tiene, es que la mayoría de los estudios hasta ahora publicados se limitan a la detección de proteínas inmunorreactivas de *G. lamblia* mediante su análisis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), motivo por el cual se hacen necesarias nuevas investigaciones que permitan identificar y caracterizar de manera más precisa el amplio repertorio de antígenos en este parásito y su papel durante el establecimiento de la respuesta inmune hacia éste parásito.

Estudios en humanos y en modelos murinos sugieren que el aclaramiento de la infección se debe a mecanismos de inmunidad natural (Eckmann y cols., 2000; Li y cols., 2006; Roxström-Lindquist y cols., 2005) y mecanismos específicos adquiridos tanto de linfocitos T como linfocitos B. *G. lamblia* induce la producción de anticuerpos específicos de las clases IgA (como uno de los principales mecanismos de defensa del hospedero, dado el sitio anatómico de la infección), IgG e IgM cuyos títulos correlacionan con el aclaramiento de la infección (Adam, 2001; Byrd y cols., 1994; Hassan y cols., 2002; Langford y cols., 2002; Rosales-Borjas y cols., 1998; Scott y cols., 2004; Stänger y Müller, 1997; Tellez y cols., 2005). Controversialmente, Singer y Nash (2000) reportan que los anticuerpos tienen una función de limitada y que es dependiente de linfocitos T.

Recientemente en nuestro laboratorio se identificó una serie de bandas proteicas mediante SDS-PAGE, con capacidad de inducir una respuesta de anticuerpos específicos contra *G. lamblia* de las clases IgA e IgG en ratones C3H/HeJ durante infección primaria y secundaria. Aún y cuando los datos muestran diferencias en el reconocimiento antigénico entre la respuesta secretora y sistémica, es importante resaltar la consistente

inmunorreactividad de la banda de 86 kDa (reconocida exclusivamente por anticuerpos intestinales de la clase IgA a lo largo de 6 semanas de infección). Así mismo, las bandas de 63 y 71 kDa las cuales fueron reconocidas tanto por anticuerpos séricos de la clase IgG como por anticuerpos intestinales de la clase IgA (Velázquez y cols., 2005). En base a estos resultados, el objetivo del presente trabajo es conocer qué proteínas contenidas en las bandas inmunorreactivas son capaces de inducir esta respuesta humoral. Los resultados del presente trabajo sientan las bases para la realización de ensayos de protección y en un futuro abordar estrategias para el desarrollo de una vacuna contra esta infección.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Giardiasis: Aspectos Clínicos

Giardia lamblia es el protozoo flagelado que más comúnmente ocasiona infecciones intestinales en el humano y en otras especies de mamíferos alrededor del mundo (Adam, 2001; Farthing, 2003; Faubert, 2000).

La infección por *Giardia* (giardiasis), ocurre por la ingestión de la forma quística del parásito a través de agua, alimentos contaminados, por contacto directo fecal-oral entre personas o a través de fomites contaminados (Franco y cols., 2001; Marshall y cols., 1997). Una vez que el parásito llega al estómago se inicia el proceso de desenquistación mediante el estímulo inducido por el pH ácido y concluye principalmente en la parte alta del intestino delgado. En este proceso interviene la actividad de enzimas pancreáticas como la tripsina, una vez que emerge la forma de trofozoíto, éste es capaz de colonizar el intestino y de esta manera establece el proceso infeccioso.

Las manifestaciones clínicas de la giardiasis son muy variadas e inespecíficas, como son: dolor abdominal, náusea, vómito, en algunos casos se puede presentar diarrea severa, estados de desnutrición y pérdida de peso. Sin embargo, un alto porcentaje de personas cursan con giardiasis asintomática (Adam, 2001; Syed y Hill, 2003). Los síntomas típicamente ocurren entre los días 6-15 después de la infección. En más del 85% de los pacientes que cursan con giardiasis, la infección es un proceso autolimitado, indicando que el hospedero cuenta con mecanismos de defensa efectivos contra este parásito. Sin embargo, se presentan algunos casos de giardiasis crónica aún en individuos inmunocompetentes (Eckmann; 2003).

Se ha postulado que entre los factores que posiblemente contribuyen a la variabilidad en los síntomas, se incluyen la carga parasitaria ingerida, la virulencia de la cepa de *Giardia*, la edad del hospedero así como el estado de inmunocompetencia del hospedero al momento de la infección (Faubert, 2000). Sin embargo, algunos de éstos factores aún se encuentran en debate.

Algunos autores reportan cambios ultraestructurales y funcionales muy sutiles en el epitelio intestinal, como ligero acortamiento de las microvellosidades (Astiazarán y cols., 2000; Farthing, 2003; Farthing y cols., 1986; Jimenez y cols., 2004; Scout y cols., 2000) e infiltración linfocitaria (Buret, 2005). Adicionalmente, se reporta un efecto deletéreo en la actividad de enzimas digestivas, lo cual posiblemente contribuya a procesos de malabsorción de nutrimentos (Moya y cols., 2002; Singer y Nash 2000). En contraparte, Procop en 2001 reportó la formación de nichos de colonización duodenal sin evidencia de alteración histológica.

Recientemente, se ha demostrado un efecto citopático en los productos de excreción y secreción del parásito tales como lectinas (Sousa y cols., 2001; Weiland y cols. 2003) y proteínas (Jiménez, J. C. y cols., 2000).

Epidemiología

La giardiasis es la infección gastrointestinal por protozoarios de mayor importancia epidemiológica a nivel mundial, y está emergiendo como una de las principales causas de diarrea no viral en niños que asisten a centros de desarrollo infantil (Pollock y cols. 2005).

La Organización Mundial de la salud (OMS) estima que existen alrededor de 250 millones de personas infectadas con este parásito en el mundo (WHO, 1996). En países desarrollados, aún y cuando la giardiasis

ocurre menos frecuentemente, su prevalencia parece estar incrementándose y se considera la principal causa de brotes de enfermedad diarreica asociada a la ingesta de agua potable (Furness y cols., 2000). Lo mismo parece estar sucediendo en países como Brasil y Cuba (Franco y cols. 2001; Gómez y cols., 1999).

En México la Dirección de epidemiología de la Secretaría de Salud, en 2003 ubicó a Sonora como el estado de mayor prevalencia de Giardiasis y en el 2005 en el quinto lugar (S.S.A., 2003, 2006). Así mismo, diferentes estudios realizados en Sonora reportan prevalencias variables pero altas de giardiasis en niños (Valencia y cols., 1981; Sotelo, 1998).

Los factores de riesgo para adquirir la infección no están bien definidos, pero se asocia más frecuentemente a la ingesta de agua no filtrada, algunas prácticas sexuales (oral-anal), la presencia de ciertos trastornos inmunitarios como hipogammaglobulinemia, entre otros (Farthing, 2003; Faubert, 2000). Los lactantes parecen estar más protegidos debido posiblemente a la transferencia de anticuerpos de isotipo IgA anti- *Giardia* de la madre al lactante (Tellez y cols., 2005).

El empleo simultáneo de diversas medidas para la prevención y control de la infección como sistemas de educación sanitaria para promover la higiene personal, control sanitario de animales reservorios de *Giardia*, así como sistemas de distribución de agua potable y uso de sistemas adecuados de depósito de excretas (sistema de drenaje o letrinas), podrían interrumpir el ciclo de transmisión de esta parasitosis. Por otro lado, el desarrollo de nuevas medidas profilácticas, requiere un mayor conocimiento de los factores de virulencia del parásito así como de los mecanismos de defensa del hospedero que puedan contribuir a la erradicación de la giardiasis.

Antígenos de *G. lamblia*

La caracterización de los antígenos de *G. lamblia* es importante para comprender los mecanismos de patogenicidad del parásito y los mecanismos de defensa del hospedero. En este sentido diversos investigadores se han dado a la tarea de identificar antígenos capaces de inducir respuestas inmunes humorales y/o celulares específicas contra el parásito.

Los resultados encontrados en la literatura son divergentes entre un investigador y otro, posiblemente debido a las diferentes estrategias metodológicas empleadas. Por ejemplo, la separación por electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) ha mostrado que existe un gran número de proteínas con inmunoreactividad positiva frente a sueros provenientes tanto de humanos infectados como de modelos animales de experimentación (Palm y cols., 2003). Sin embargo, otros investigadores han realizado un fraccionamiento de las proteínas de extractos antigénicos mediante cromatografía (Chaudhuri y cols., 1997) quienes detectan inmunoreactividad solo en las fracciones de alta masa molecular.

Aunque son muchos los antígenos que han demostrado su inmunoreactividad hacia anticuerpos de las clases IgM, IgG e IgA, solo pocos de ellos se han caracterizado a nivel molecular. Dentro de los antígenos que más se han estudiado se encuentra una familia de proteínas estructurales específicas y características de *G. lamblia*, conocidas como giardinas con masas moleculares que oscilan entre 29-38 kDa, las cuales se asocian a los microtúbulos del disco ventral, al axostilo y membrana plasmática de los trofozoítos (Peattie y cols., 1989). Actualmente, se reconocen alrededor de 24 giardinas pertenecientes a cuatro grupos: α , β , γ y δ -giardinas (Faubert, 2000; Giardia DB, 2007).

La familia de tubulinas forman parte del citoesqueleto del cuerpo del trofozoíto y de los flagelos, actualmente son clasificadas en 5 grupos: α , β , γ , δ y ϵ con masas moleculares de alrededor de 12 a 140 kDa. Sin embargo, se desconoce su función en los mecanismos inmunológicos de la giardiasis.

Dentro del grupo de lectinas asociadas a *Giardia*, se ha identificado a taglina como un antígeno de superficie con masa molecular de alrededor de 30 kDa, esta lectina tiene especificidad por manosa 6-fosfato y posiblemente participe en el acortamiento en las microvellosidades que se observan en la giardiasis (Farthing y cols., 1986).

Nash y colaboradores fueron los primeros en reportar el fenómeno de variación antigénica en *G. lamblia* mediante la identificación de una familia muy amplia de proteínas ricas en cisteína con masas moleculares de 50 a 200 kDa llamadas Proteínas Variables de Superficie (Variant-Specific Surface Protein cotidianamente denominadas VSPs). *Giardia* contiene en su genoma un repertorio de entre 150-200 genes que codifican alrededor de 250 VSPs (Adam, 2001; Giardia-DB, 2007). Aún y cuando las VSPs son heterogéneas en cuanto a su tamaño molecular, secuencia de aminoácidos y que son antigénicamente diferentes entre si, comparten algunas características. Su contenido de residuos de cisteína es alto (aproximadamente 12%), son ricas en treonina (aproximadamente 11%), contienen múltiples copias del tetrapéptido CXXC, poseen un dominio transmembranal altamente conservado de alrededor de 38 aminoácidos el cual termina con una secuencia C-terminal hidrofílica invariable compuesta por cinco aminoácidos (CRGKA) localizados hacia el citosol. La secuencia invariable GGCY prioritariamente se encuentra localizada hacia el C-terminal, pero en algunas ocasiones también se encuentra presente hacia la porción N-terminal (Nash, 2002). La región N-terminal es altamente variable y es la responsable de las características antigénicas particulares de cada una de las proteínas que conforman esta familia (Aggawal y Nash, 1987;

1988). Aunque su función biológica no es clara, posiblemente participen en la sobrevivencia del parásito en el lumen intestinal del hospedero (Müller y Stänger, 1999; Nash, 1997). Sin embargo, se requieren más estudios que permitan esclarecer el papel de estos antígenos en los mecanismos de defensa del hospedero.

Las VSPs cubren la superficie de los trofozoítos y cambian espontáneamente cada 6 a 12 generaciones aproximadamente, cambio que también se ha observado durante el proceso enquistación y exquistación. La clasificación de las VSPs se hace en base a su inmunorreactividad con anticuerpos monoclonales. En este sentido, se identificó un antígeno de 170 kDa inicialmente llamado CRP170 y, posteriormente como VSPA6 mediante el anticuerpo monoclonal (MAb 6E7). En estudios *in vitro*, estos anticuerpos resultaron citotóxicos exclusivamente para trofozoítos de la clona WB que expresaban la VSPA6. Otros antígenos identificados en la cepa WB de *G. lamblia* son la VSP1269 (68 kDa) y la VSP1267 (64 kDa) (Nash, 1992, 1995; Nash y cols., 2001; Adam, 2001; Faubert, 2000).

En la cepa GS-M-83-H7 de *G. lamblia*, la VSP mejor caracterizada a nivel molecular es la VSP-H7. Esta es una proteína de superficie de 56 kDa, la cual corre en la banda de 72 kDa mediante su separación por SDS-PAGE (Biez y col., 2001; Faubert, 2000). Estudios bioquímicos y de biología molecular indican que básicamente contiene dos sitios antigénicos: un sitio en la región N-terminal de 314 aminoácidos, la cual ha mostrado baja respuesta de anticuerpos predominantemente durante la fase temprana de la infección, y una segunda región hacia el extremo C-terminal de 171 aminoácidos la cual muestra gran capacidad de inducir la producción de anticuerpos, preferentemente durante la fase tardía o incluso después de que la infección resuelve (Müller y cols., 1996; Stäger y Müller, 1997). Esta proteína se ha identificado mediante su inmunorreactividad con el anticuerpo G10/4, los cuales muestran efecto citotóxico *in vitro* (Müller y Stänger, 1999).

La variación antigénica es un fenómeno muy importante para entender los mecanismos de respuesta inmune hacia el parásito. Esta variación antigénica puede afectarse en función al grado de compromiso del sistema inmune del hospedero. Este evento fue demostrado por Gottstein y Nash, en 1991 quienes observaron variación antigénica en la superficie de trofozoítos al inducir la infección en ratones inmunocompetentes, evento que no se presentó al infectar ratones atímicos y ratones con inmunodeficiencia combinada severa.

Mecanismos Efectores de la Respuesta Inmune

Usualmente la giardiasis es una infección autolimitada. En alrededor del 85% de los casos la infección aclara en 2 a 4 semanas, lo cual indica que existen mecanismos de defensa efectivos en el hospedero contra este parásito (Eckmann y cols., 2000). La mucosa gástrica constituye una barrera mecánica de defensa previniendo el acceso directo del parásito a las células epiteliales. El óxido nítrico (NO) sintetizado por células epiteliales del intestino delgado es considerado como un importante mecanismo de defensa por su actividad antimicrobiana para una gran variedad de bacterias y parásitos patógenos entre otras de sus funciones biológicas (Eckmann y cols., 2000; Kasper y Buzoni-Gatel, 2001; Roxström-Lindquist y cols, 2005).

Mecanismos Naturales de Defensa

La giardiasis es una infección caracterizada típicamente por su casi nula capacidad de producir inflamación gástrica y su nula capacidad invasiva, lo cual indica que los mecanismos de defensa del hospedero actúan localmente. La constante y rápida renovación de las células intestinales, así como de la capa mucosa que protege a las células epiteliales, la actividad enzimática y la microflora normal, constituyen una

barrera para el libre acceso de muchos parásitos gastrointestinales, incluyendo a *Giardia lamblia* (Eckmann, 2002).

En modelos murinos de giardiasis y en estudios con líneas celulares *in vitro*, se ha observado que la microflora normal del intestino delgado, la cual consiste predominantemente de bacterias de la cavidad oral como *Streptococcus sp.*, *Haemophilus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Actinomyces sp.* y *Peptostreptococci sp.* determinan la susceptibilidad o resistencia a la infección (Roxström-Lindquist y cols., 2005).

Las células epiteliales intestinales producen y secretan algunas sustancias como defensinas, lactoferrina, especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico (NO) con actividad citotóxica e inmunomoduladora en infecciones gastrointestinales (Cunliffe y Mahida, 2004; Li y col., 2006).

En un estudio *in vitro*, se observó que el NO es capaz de inhibir el crecimiento, enquistación y exquistación de *G. lamblia* (Eckmann y cols., 2000). En este mismo estudio, se observó que trofozoítos viables de *G. lamblia* son capaces de inhibir la producción de NO por células Caco-2 sin necesidad de contacto íntimo entre el parásito y la célula epitelial, lo cual sugiere que *Giardia* produce y secreta uno o varios factores capaces de inhibir la producción de NO mediante el consumo de arginina. Por un lado, *Giardia* intercambia ornitina por arginina extracelular como una fuente de energía importante para su metabolismo (Adam, 2001); por otro lado, la NO sintetasa requiere arginina como sustrato para formar NO (Mathews y cols., 2002), lo que sugiere que posiblemente este parásito podría inhibir la producción de NO a través de dos vías separadas pero mutuamente reforzadoras: consumo de arginina y liberación de su competidor ornitina, el cual inhibe la captura de arginina por las células epiteliales y por lo tanto, inhibe la síntesis de NO. Sin embargo, estos eventos requieren ser más estudiados.

Estudios recientes han demostrado la participación de ciertas citocinas para el control de la giardiasis en modelos experimentales con ratones genéticamente deficientes de IL-6, observando que esta citocina es importante para el control de la infección en su fase temprana, mas no en la fase tardía. Esta citocina participa en varios procesos inmunológicos como respuestas inflamatorias, diferenciación de linfocitos B, está involucrada de manera importante en la expansión clonal de linfocitos B productores de IgA y en la maduración de células plasmáticas secretoras de IgA (Biez y cols., 2003; Zhou y cols., 2003).

La participación diferencial de subpoblaciones de linfocitos T cooperadores (Th) en diferentes modelos experimentales, sugiere que la producción de diferentes subtipos de inmunoglobulinas está relacionada con otras citocinas como IL4 la cual regula la producción de IgG₁ (perfil de respuesta Th₂), mientras que la producción de IgG_{2a} en cepas de ratones relativamente resistentes es regulada por interferón gamma (IFN- γ) con perfil de respuesta Th₁ (Singer y Nash, 2000; Venkatesan y cols., 1996).

Recientemente se ha demostrado la participación del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) en los procesos de protección contra *G. lamblia*. Ratones tratados con anticuerpos neutralizantes anti-TNF α y ratones genéticamente deficientes de TNF α presentan dificultad para aclarar la infección con *G. lamblia*, lo que supone la existencia de otro mecanismo alterno a los previamente descritos (IgA, mastocitos, IL-4, IL-6) que es regulado por TNF α y que requiere ser demostrado (Zhou y cols., 2007).

Inmunidad Adquirida

Debido a que *G. lamblia* es un parásito no invasivo, el proceso infeccioso se limita al lumen intestinal, el principal mecanismo de defensa inmune está mediado por tejido linfoide asociado a mucosas a través de la

producción de IgA secretora. Sin embargo, en diferentes estudios *in vivo* e *in vitro*, se ha observado que los anticuerpos de la clase IgM e IgG pudieran contribuir en los mecanismos de defensa contra este parásito (Nash, 1997; Faubert, 2000).

En estudios realizados en ratones y en humanos se ha observado un aumento en el título de IgA, IgG e IgM los cuales correlacionan con el aclaramiento de la infección (Gottstein y cols., 1990). Por otro lado, se ha reportado que en pacientes con hipogammaglobulinemia se dificulta la eliminación de *Giardia*. Esta observación ha sido apoyada en estudios en animales transgénicos carentes de linfocitos B, Linfocitos T o ambos (ratones con Inmunodeficiencia Severa Combinada; SCID) a diferencia de ratones inmunocompetentes, quienes de manera natural resuelven la infección en aproximadamente 21 días post-infección (Stäger y Müller, 1997).

La inmunidad mediada por anticuerpos actúa en concierto con la inmunidad celular para el control de la giardiasis, la cual también se ha evaluado en diferentes modelos experimentales, utilizando ratones deficientes de linfocitos T o bien deficientes de subpoblaciones de linfocitos T. Los resultados indican que la inmunidad celular es importante para la eliminación del parásito (Scot y cols., 2004; Singer y Nash, 2000). Sin embargo, actualmente se desconocen los mecanismos de este tipo de respuestas.

Modelos Experimentales para el Estudio de la Inmunología de la Giardiasis

El estudio de los mecanismos de defensa contra patógenos requiere del uso de sistemas experimentales, ya que difícilmente se pueden evaluar todos los aspectos mecanísticos en pacientes infectados. Los modelos experimentales *in vivo* o *in vitro* pueden ayudar a reproducir el proceso

infeccioso en humanos. Sin embargo, se debe tener cuidado en seleccionar el que mejor pueda reproducir el proceso infeccioso en estudio. En el caso de la giardiasis, existen algunas cepas de *Giardia lamblia* que pueden reproducir el proceso infeccioso exitosamente en modelos animales (Byrd y col., 1994). En nuestro laboratorio se evaluó la capacidad infectiva de la cepa WB-C6 y GS/M-83-H7 tanto en jerbo (*Meriones unguiculatus*) como en ratones C3H/HeJ (datos no reportados), encontrando que la cepa WB solo es capaz de infectar al jerbo, para quienes no se cuenta con la herramienta de reactivos biológicos que permitan evaluar la respuesta inmune. Sin embargo, y en concordancia con la información que existe en la literatura, la cepa GS/M-H7 es capaz de inducir giardiasis en el modelo murino C3H/HeJ, del que se tiene amplio conocimiento de su sistema inmune y se cuenta con una amplia gama de reactivos biológicos que permiten estudiar la respuesta inmune hacia *G. lamblia*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo Experimental

Se utilizaron ratones machos adultos de la cepa singénica C3H/HeJ (The Jackson Lab Maine, U.S.A) quienes se mantuvieron en el bioterio del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentación (DIPA) de la Universidad de Sonora, bajo ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, temperatura controlada, acceso a agua y alimentación *ad libitum*.

Cultivo de *G. lamblia*

Los trofozoítos de *G. lamblia* clona GS/M-83-H7, se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC). Los trofozoítos se cultivaron en medio TYI-S-33 suplementado con suero fetal bovino, bajo condiciones de microanaerofilia a 37°C.

Preparación del Extracto Antigénico

El extracto antigénico de *Giardia lamblia* se obtuvo a partir de cultivos confluentes y axénicos en base al procedimiento descrito por Beltrán (2004) con las siguientes modificaciones: se realizaron 2 lavados con solución reguladora de fosfatos (PBS) pH 7.2 de Gibco, y dos lavados con 5 mL de agua grado HPLC, se centrifugó a 800 xg por 10 min a 4°C. Los trofozoítos contenidos en la pastilla, se resuspendieron en agua grado HPLC y se procedió a la lisis mediante congelación en nitrógeno líquido y descongelación a temperatura ambiente por tres ocasiones. Se adicionaron 5 µL de una solución de inhibidores de proteasas (Sigma, P9599) seguido de

2 ciclos de sonicación a 30 ciclos por segundo, por 2 minutos (Brandon sonifier 250, Shelton, Ct, USA). El homogenado se sometió a centrifugación a 14,000 xg por 15 min. El sobrenadante conteniendo la mezcla proteica solubilizada se guardó a -20°C hasta su posterior uso (Anexo1).

Cuantificación de Proteínas Solubles

Se realizó por medio del micrométodo espectrofotométrico de Bradford en placas de 96 pozos (Sigma, St Luis MO; U.S.A.), utilizando una curva estándar con albúmina sérica bovina (Sigma A-9647).

Inducción de la Giardiasis en el Modelo Murino

A un grupo de 9 ratones se les administró por vía peroral, 5×10^6 trofozoítos de *G. lamblia* suspendidos en 200 μ L de PBS estéril y pH 7.2 (primoinfección), a la semana 8 post-infección se repitió el procedimiento para inducir la re-infección.

Evaluación de la Respuesta Inmune Humoral

Previo a la inducción de la giardiasis, se recolectó una muestra de sangre de la vena de la cola de cada uno de los ratones (controles negativos), este procedimiento se repitió semanalmente por espacio de 8 semanas en la primoinfección y por 6 semanas en el proceso de re-infección.

Evaluación de la Respuesta Inmune Humoral Sistémica

La respuesta humoral sistémica se evaluó a través del título de anticuerpos de la clase IgG específicos para proteínas de *G. lamblia* en suero mediante la técnica estándar de ELISA indirecta. Como anticuerpo secundario se utilizó IgG de cabra anti-ratón conjugado a peroxidasa de rábano (Sigma, A0168). Como sistema de revelado de la reacción antígeno-anticuerpo se utilizó una solución de ABT-S en solución reguladora de citratos con H₂O₂. El título de anticuerpos se midió semanalmente tanto en la primoinfección como en la re-infección.

Análisis Estadístico

Para comparar el promedio de los títulos de anticuerpos IgG obtenidos en los sueros de los ratones infectados con *Giardia lamblia* durante infección experimental se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) con comparaciones múltiple por medio de la prueba de Duncan con valor de significancia de $p < 0.05$.

Identificación de Proteínas Inmunogénicas

Las proteínas solubles presentes en el extracto de *G. lamblia* fueron separadas mediante electroforesis en doble dimensión (2-DE) de acuerdo al protocolo establecido en el anexo 2. Las proteínas contenidas en 150 µg del extracto antigénico se separaron en primera dimensión por punto isoeléctrico en geles de poliacrilamida con gradiente de pH de 3-10 (Bio-Rad, cat. No. 163-2004) y 5-8 (Bio-Rad, cat. No. 163-2000), equipo Protean IEF cell (Bio-Rad, Hercules, CA. U.S.A). La segunda dimensión se realizó mediante SDS-PAGE al 12% en cámara miniprotean III (Bio-Rad, Hercules, CA. U.S.A.) a 100 voltios constantes por 30 minutos y posteriormente a 200 voltios constantes hasta concluir la electroforesis. Las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa en un sistema semiseco

(Trans-Blot SD, Bio-Rad, Hercules, U.S.A.). Las proteínas inmunorreactivas se identificaron mediante su reacción con anticuerpos presentes en muestras de suero de ratones infectados en dilución 1:20 en PBS-BSA 1%-leche descremada 1% (svelty^{MR}) por una hora. Como anticuerpo secundario se utilizó IgG de cabra anti-ratón conjugada a peroxidasa de rábano en dilución 1:5000 en PBS-BSA 1%, incubando a temperatura ambiente por una hora. La inmunorreactividad fue revelada por quimioluminiscencia (PIERCE SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate), de acuerdo al protocolo del anexo 3.

Secuenciación de los Antígenos Inmunodominantes de *G. lamblia*

Una vez identificadas las proteínas inmunorreactivas se procedió a su localización en otro gel de 2-DE corrido bajo las mismas condiciones experimentales y teñido con AgNO₃. Las muestras a analizar se cortaron con ayuda de una navaja de un filo y se destiñeron con KMnO₄. Posteriormente se realizó una digestión en gel con tripsina (Anexo 4). Los péptidos resultantes de la digestión con tripsina se almacenaron en congelación a -30°C, hasta realizar su análisis por espectrometría de masas (Tandem MS/MS). Para identificar la o las proteínas contenidas en cada mancha proteica inmunorreactiva, los resultados que se obtuvieron en el análisis de espectrometría de masas se contrastaron con la información contenida en la base de datos del genoma de *G. lamblia* (www.giardiadb.org) y con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>).

Inmunofluorescencia de Antígenos de Superficie de *G. lamblia*

A partir de un cultivo axénico y en confluencia de trofozoítos de *G. lamblia* clona GS-M-83-H7, y previamente lavados con solución reguladora de fosfatos salino pH 7.2 y albúmina sérica bovina al 1% (PBS-BSA 1%), se colocaron 5x10⁶ trofozoítos por pozo en microplacas de 96 pozos con fondo

en U. Se centrifugó a 800 xg, 10 minutos a 4°C y se retiró el exceso de solución reguladora. Las células se hicieron reaccionar con una mezcla de sueros correspondientes a la semana 4 post-infección y de la semana 4 posterior a la re-infección ambos en dilución 1:25 en PBS-BSA 1%. Se incubó por espacio de 1 hora a 4°C, posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS-BSA 1%, mediante centrifugación a 800xg, 4°C por 5 minutos. Para evidenciar la reacción antígeno-anticuerpo se utilizaron anticuerpos IgG de cabra anti-ratón conjugados a ficoeritrina (BioSciencie, USA), en dilución 1:200, se incubó por 1 hora a 4°C y protegidos de la luz, después de este tiempo se retiró el exceso de anticuerpo secundario (no unido), mediante 3 lavados con PBS-BSA 1%. Los trofozoítos fueron resuspendidos en 100 µL de PBS-BSA1% y fijados con 100 µL paraformaldehído al 2%. La inmunofluorescencia se observó por microscopía (Olympus BX-50; U.S.A). Ver Anexo 5.

RESULTADOS

Concentración de Proteínas en el Extracto Antigénico

A partir de diferentes extractos proteicos obtenidos mediante la lisis por congelación en nitrógeno líquido y descongelación a temperatura ambiente de trofozoítos de *G. lamblia* GS-M-83-H7 se estimó la concentración de proteínas en microgramos por cada 1×10^6 trofozoítos sometidos a lisis. La cuantificación de proteínas se estimó mediante el micrométodo de Bradford. Se obtuvo un valor promedio y desviación estándar (DE) de 46.2 ± 4.9 μg de proteína por cada 1×10^6 trofozoítos de *G. lamblia* sometidos a lisis (Tabla I).

Patrón electroforético en 2-DE de Proteínas solubles de Trofozoítos de *G. lamblia*

La generación de un patrón electroforético reproducible en doble dimensión de proteínas de *G. lamblia* se logró mediante la aplicación de 150 μg de proteína soluble mediante rehidratación pasiva. Como se muestra en la figura 1, la mayoría de las proteínas se localizaron en el rango de punto isoeléctrico de 5 a 8, motivo por el cual se seleccionó este rango de pH para favorecer la separación de las proteínas del extracto de *G. lamblia* en los ensayos de doble dimensión (Figura 2) y proceder a los ensayos de Western-blotting. La mayoría de las proteínas contenidas en el extracto antigénico que se pudieron separar en 2-DE correspondieron a proteínas de masa molecular relativa entre 20 a 100 kDa (Tabla II). Se observó un área muy densa de proteínas con masas moleculares inferiores a 50 kDa, en donde posiblemente se encuentra la familia de giardinas y tubulinas ampliamente estudiadas por otros autores (Peattie y cols., 1989; Nohýuková y cols., 2000).

Tabla I. Estimación del contenido de proteínas en extractos obtenidos mediante lisis de trofozoítos por congelación-descongelación.

Trofozoítos (1X10 ⁶)	Proteína (mg)	mg de proteína/1x10 ⁶ trofozoítos
118	5.8	50.5
134	5.2	38.5
167	7.5	45.1
125	6.3	50.4
89	4.1	46.5
Media ± DE: 46.2 ± 4.9		

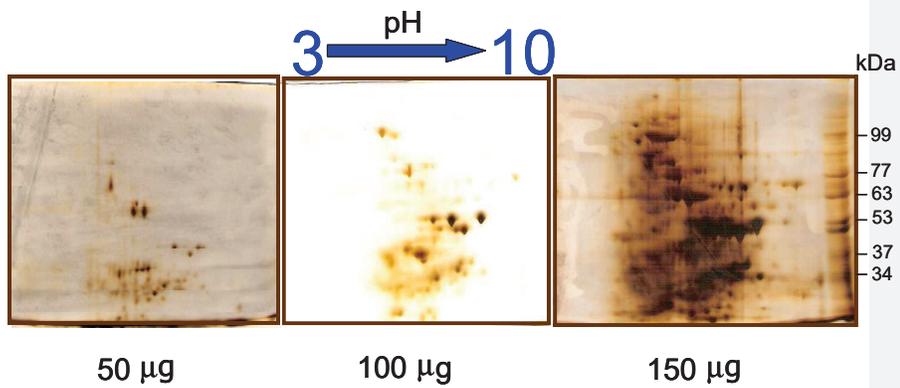


Figura 1. Perfil electroforético en 2-DE de Proteínas solubles de trofozoítos de *G. lamblia* clona GS-M-83-H7. Geles de IEF con rango lineal de pH de 3 a 10 fueron rehidratados pasivamente con 50, 100 y 150 µg de proteína respectivamente.

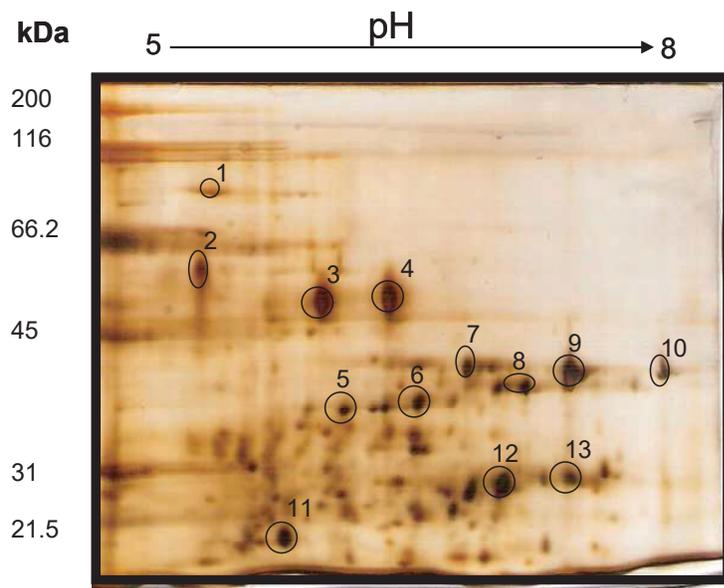


Figura 2. Perfil electroforético en 2-DE del extracto antigénico de *G. lamblia* en rango de punto isoeléctrico de 5 a 8. Mediante rehidratación pasiva, se cargaron 170 µg de proteína contenida en el extracto proteico.

Tabla II. Manchas proteicas de *G. lamblia* separadas por 2-DE

mancha	Punto isoelectrico	Masa molecular (kDa)
1	5.5	80
2	5.4	55
3	6	47
4	6.3	48
5	6.3	38
6	6.6	39
7	6.8	41
8	7.1	40
9	7.3	41
19	7.8	41
11	5.9	18
12	7	25
13	7.3	26

Estimación del punto isoelectrico (pI) y masa molecular relativa de las manchas proteicas separadas en 2-DE en gradiente continuo de pH 5-8 y SDS-PAGE 12% en la segunda dimensión. El número con que se indica cada mancha corresponde al mismo que se presenta en la figura 2.

***G. lamblia* GS-M-83-H7 Induce una Respuesta Inmune Humoral Sistémica Mediada por Anticuerpos de Isotipo IgG en Ratones C3H/HeJ**

Con el objetivo de evaluar la producción de anticuerpos IgG se realizó un ensayo de ELISA indirecto en muestras de sueros de un grupo de ratones infectados por vía per-oral con 5×10^6 trofozoítos de *G. lamblia*. El título de anticuerpos se monitoreó semanalmente por espacio de 8 semanas durante la primo infección y por 6 semanas posteriores a re-infección. El título de anticuerpos séricos de la clase IgG mostró un incremento sostenido y estadísticamente significativo a partir de la segunda semana después de la administración de los trofozoítos ($p < 0.05$) y hasta el final de la primoinfección. En la semana 1 posterior a re-infección, la producción de IgG mostró un incremento de alrededor del 57% respecto a la octava semana de la primoinfección (D.O. a 415 nm promedio de 0.373 a la semana 8 post-infección y 0.586 en la semana 1 posterior a la re-infección). El título de anticuerpos IgG séricos se mantuvo elevado hasta la semana 6 de re-infección (D.O. promedio de 0.787) (Figura 3). Los resultados obtenidos fueron consistentes con los previamente reportados por nuestro grupo de trabajo (Velázquez y cols., 2005).

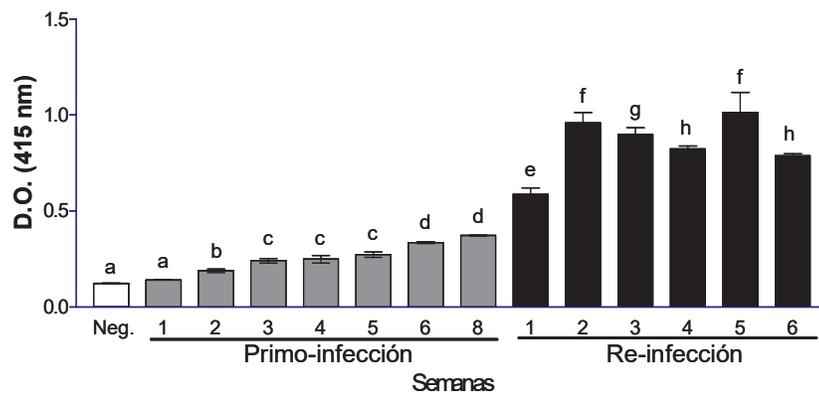


Figura 3. Título de anticuerpos IgG séricos en ratones C3H/HeJ con giardiasis. Un grupo de ratones (n=9) fueron infectados por vía per-oral con 5×10^6 trofozoítos de *Giardia lamblia* GS-M-83-H7. Para la determinación de anticuerpos IgG, muestras de sueros previo a la infección (control negativo) indicada con la barra color blanco y muestras de suero obtenidas semanalmente por espacio de 8 semanas (primo-infección, indicadas con las barras color gris) y 6 semanas (re-infección, indicadas con las barras en negro) fueron evaluadas mediante ELISA indirecto. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa a $p < 0.05$ mediante ANOVA con prueba de Duncan.

Identificación de Proteínas Inmunorreactivas de *G. lamblia* Reconocidas por Anticuerpos IgG Séricos de Ratones Infectados

En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio, mediante electrotransferencia e inmunodetección a partir de electroforesis en una dimensión (Western-blotting 1-DE), se detectó fuerte inmunoreactividad para IgG sérica en las bandas proteicas con masa molecular relativa de 159, 131, 71 y 63 kD (Velázquez y cols. 2005). En el análisis por espectrometría de masas de estas cuatro bandas, mayoritariamente se encontraron proteínas citosólicas, muchas de ellas involucradas en el metabolismo energético como la ornitina carbamoiltransferasa, alcohol deshidrogenasa, piruvato flavodoxin oxidoreductasa las cuales se localizaron en la banda proteica de 71 kDa. En el mismo sentido, en la banda de 63 kDa se encontró a la carbamato cinasa, fosfoenol piruvato carboxicinas, transcetolasa, glucosa-6-P-1-deshidrogenasa entre otras proteínas citosólicas. Adicionalmente en ambas bandas se identificaron proteínas inducidas por estrés como la HSP-90 y la HSP-70. En la tabla III se indican las proteínas identificadas en las bandas de 71 y 63 kDa mediante el análisis por espectrometría de masas. Se hace énfasis en estas dos bandas porque las proteínas inmunorreactivas encontradas en el presente trabajo se encontraron en este rango de masa molecular relativa.

Con el objetivo de identificar que proteínas contenidas en dichas bandas son las responsables de inducir la respuesta de IgG sistémica específica contra *G. lamblia*, se seleccionó el grupo de sueros de la cuarta semana post-infección y se probaron mediante Western-blotting con proteínas de *G. lamblia* GS-M-83-H7 separadas por 2-DE. Se identificaron 8 manchas inmunorreactivas, cuatro de ellas con masas moleculares relativas de 71 kDa y cuatro con masa molecular relativa de 63 kDa. En ambos casos, el punto isoeléctrico estimado fue de 5.3, 5.4, 5.5 y 5.6 (Fig. 4).

Tabla III. Proteínas de *Giardia lamblia* identificadas en bandas inmunogénicas mediante espectrometría de masas.

Banda	Proteína	Masa molecular (Da)	ORF*
71 kDa	Ornitina carbamoil transferasa	36437	10311
	HSP 90-alfa	36990	13864
	HSP 90-alfa	43438	98054
	α -tubulina	50552	103676
	Proteína de membrana rica en cisteína grupo 2	62608	15475
	Proteína hipotética	71861	16577
	Proteína hipotética	82403	17412
	Glicogeno sintetasa, putativa	85062	104031
	Proteína 21.1	87609	27925
	NSF	89604	114776
	NSF	90660	112681
	Alcohol dehidrogenasa	97134	93358
	Beta adaptina	122832	21423
	Piruvato-flavodoxin oxidoreductasa	131803	17063
	Proteína hipotética	213746	9183
63 kDa	HSP 90-alfa	36990	13864
	Proteína hipotética	44192	16700
	Cinasa, STE STE20	46981	10609
	Proteína hipotética	62564	5883
	Fosfoproteína 1 inducida por estrés	65361	27310
	Piruvato cinasa	70738	3206
	Cinasa, NEK	71522	113553
	ATP sintetasa vacuolar subunidad catalítica A	71537	7532
	HSP70 citosólica	71633	88765
	Fosfoenolpiruvato carboxykinasa	73845	10623
	Transcetolasa	77564	9704
	Acetyl-CoA sintetasa	78101	13608
	Treonyl-tRNA sintetasa	79032	13998
	Dynamina	79513	14373
	Glucosa-6-fosfato 1-dehidrogenasa	83076	8682
Proteína vacuolar sorting 35	87504	23833	
Proteína 21.1	102710	14859	
β -adaptina	122832	21423	
Cinasa, NEK	136560	16272	

* ORF: del inglés Open Reading Frame (Marco de lectura abierta)

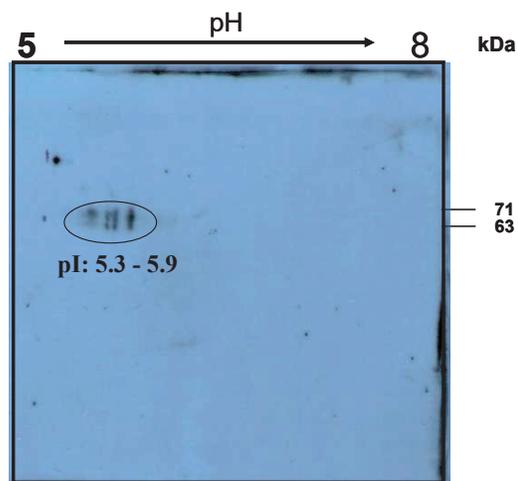


Figura 4. Proteínas inmunorreactivas para IgG sérica en ratones infectados con trofozoítos de *G. lamblia* mediante Western-blotting en 2D. Proteínas de *G. lamblia* fueron separadas por 2-DE y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Para su inmunodetección se utilizó un grupo de sueros de la cuarta semana posteriores a la re-infección en dilución 1:20 y anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugada a HRP en dilución 1:5000. Las manchas proteicas inmunorreactivas indicadas en la figura presentan pI de 5.3 a 5.9 y masas moleculares relativas de 63 y 71 kDa.

Análisis por Espectrometría de Masas de Proteínas de *G. lamblia* capaces de Inducir una Respuesta Sistémica de Anticuerpos IgG en el Modelo Murino

Para identificar que proteínas reconocidas por los anticuerpos de isotipo IgG específicos contra *G. lamblia*, se obtuvieron los péptidos de un total de 5 manchas proteicas identificadas en la zona de inmunorreactividad positiva para IgG. Adicionalmente, se obtuvieron dos muestras indicadas con los números 6 y 7 como controles internos positivos de una zona alejada al área de inmunorreactividad y adecuadamente separadas. Como control negativo se analizó la muestra 8 localizada en un área donde la tinción con nitrato de plata no reveló presencia de proteína (figura 5). Los péptidos se obtuvieron por digestión con tripsina y fueron analizados mediante espectrometría de masas (Tandem MS/MS), los resultados se contrastaron con la base de datos del genoma de *G. lamblia* (www.giardadb.org) y con la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>).

En el área de inmunorreactividad se identificaron 3 proteínas variables de superficie: la VSP-H7; locus número ([|gi|159143|gb|AAA18202.1|](http://www.giardadb.org)) con masa molecular de 56871 Da y pl. 5.6, la VSP-H7-1 ([|gi|6573212|gb|AAF17594.1|AF202776-1|](http://www.giardadb.org)) con masa molecular de 57023 Da y pl. 5.9 y la VSP con INR ([|gi|157436253|gb|EDO80509.1|](http://www.giardadb.org)) con masa molecular de 73891 Da y pl 5.3. Experimentalmente y en base a su corrimiento en 2-DE bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras, se estimó una masa molecular (www.giardadb.org) de 71 kDa y pl entre 5.3 y 5.8 para estas proteínas, lo cual concuerda con los valores reportados en la literatura para la VSP-H7 específica de la clona GS-H7 (Lujan y cols., 1995; Müller y cols., 1996). Estas proteínas se identificaron en la mancha proteica indicada con el número 5 de la figura 5. Otras de las proteínas membranales identificadas fueron: proteína de unión a cadenas pesadas de inmunoglobulinas (BIP del inglés; Binding Immunoglobulin Protein) y una

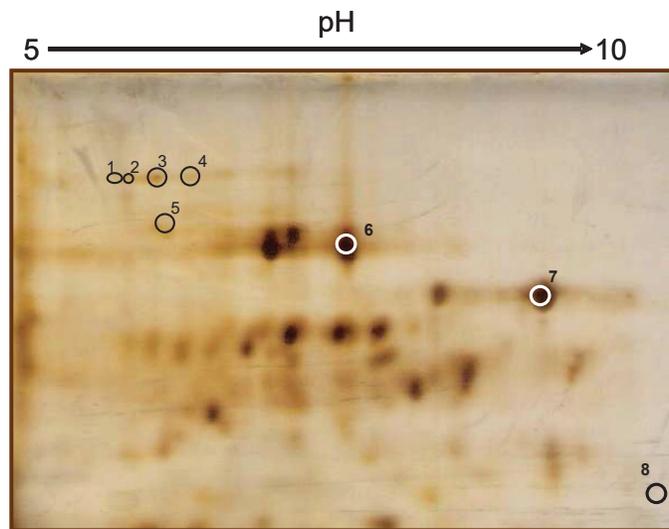


Figura 5. Perfil electroforético del extracto proteico *G. lamblia* mediante 2-DE en gradiente lineal de pH de 5-8. Geles para isoelectroenfoque de 7 cm (IPG) fueron cargados con 150 μ g de proteínas de *G. lamblia* mediante rehidratación pasiva. Las manchas proteicas fueron visualizadas mediante la tinción con plata. Las proteínas contenidas en las muestras indicadas con los números 1 al 8 fueron desteñidas con KMnO_4 y digeridas con tripsina para su análisis por espectrometría de masas.

proteína coiled coil. Mediante el análisis por espectrometría de masas de las proteínas contenidas en las manchas inmunorreactivas también se identificaron algunas proteínas citosólicas como la proteína 21.1, factor 1A de iniciación de translocación en eucariotes y algunas enzimas como la fosfatidil inositol cinasa, enolasa y aminoacil histidil dipeptidasa.

En la tabla IV se presenta un resumen de las posibles proteínas inmunorreactivas, mediante su análisis por 2-DE y espectrometría de masas. Por otro lado, en la tabla V se presentan los resultados obtenidos en el análisis proteómico de las manchas elegidas como controles internos. La mancha número 6 reveló la presencia de 6 isoformas de glutamato deshidrogenasa con masas moleculares que oscilan entre 16 y 50 kDa, y pI de 7.9 a 9.3, mientras que en la muestra número 7 se demostró la presencia de α , β , γ y δ giardinas, $\alpha 2$ y β tubulinas, 2 isoformas de carbamato cinasas una con masa molecular de 34221 Da y pI 7.9 y otra con masa molecular de 33879 Da y pI de 7.9. Estas enzimas fueron avaladas por 12 y 2 secuencias de aminoácidos respectivamente, así mismo se identificó la presencia de ornitina carbamoiltransferasa (OCT) y enolasa. Las proteínas localizadas en las manchas 6 y 7 no mostraron inmunoreactividad en los ensayos de Western-blotting en doble dimensión.

Tabla IV. Probables Proteínas capaces de inducir una respuesta de IgG sistémica identificadas por Western-blotting en 2D y espectrometría de masas.

Mancha	Proteína	masa molecular (Da)	pI	No. Identificación
1	Proteína hipotética	9664	9.7	gij 71075728 ref XP_770387.1
	Factor 1 A de iniciación de translocación en Eucariotes	18155	5.4	gij 157436484 gb EDO80699.1
	Aminoacil-histidil dipeptidasa	55103	6.5	gij 157433256 gb EDO77502.1
	Proteína hipotética	61924	6.5	gij 157438141 gb EDO82349.1
	Proteína hipotética	121399	5.3	gij 157435894 gb EDO80113.1
	Fosfatil inositol cinasa	293346	6.5	gij 24181422 gb AAM33436.1
	Proteína hipotética	179370	6.5	gij 157434596 gb EDO78825.1
	Proteína hipotética	267836	5.3	gij 157438122 gb EDO82330.1
2	Cadena pesada de dineína	623006	5.7	gij 157432784 gb EDO77039.1
	BiP	72675	5.1	gij 468016 gb AAA19123.1
	Proteína hipotética	83192	6.1	gij 157437190 gb EDO81401.1
	roteína coiled coil	47842	6	gij 157435939 gb EDO80157.1
	NEK Cinasa	160607	5.9	gij 157436618 gb EDO80832.1
3	Cadena pesada de dineína	302117	5.8	gij 157434527 gb EDO78757.1
	Proteína hipotética	55992	6.8	gij 157432813 gb EDO77067.1
	Proteína hipotética	105376	5.6	gij 157432533 gb EDO76795.1
	Proteína 21.1	82347	5.5	gij 157434007 gb EDO78242.1
4	Cinasa, NEK	160607	5.9	gij 157436618 gb EDO80832.1
	triptofano peryódico	130624	6	gij 157435380 gb EDO79602.1
5	Proteína hipotética	62009	4.9	gij 157434247 gb EDO78480.1
	Proteína hipotética	24321	4.7	gij 157438233 gb EDO82441.1
	Proteína hipotética	121399	5.3	gij 157435894 gb EDO80113.1
	Spindle pole proteína	112852	6.6	gij 157434840 gb EDO79067.1
	Proteína hipotética	425815	6.4	gij 157438338 gb EDO82546.1
5	Enolasa	48220	5.7	gij 157437452 gb EDO81662.1
	VSP- H7	56871	5.6	gij 159143 gb AAA18202.1
	VSP- H7-1	57023	5.9	gij 6573212 gb AAF17594.1
	β- giardina	30877	5.4	gij 2144818 pir SJGQBG
	Proteína 21.1	66236	6.8	gij 157437041 gb EDO81253.1
	Proteína hipotética	40411	6.3	gij 157433358 gb EDO77602.1
	VSPcon INR	73891	5.3	gij 157436293 gb EDO80509.1

Con formato: Centrado

Tabla con formato

Con formato: Centrado

Con formato: Centrado

Tabla V. Proteínas identificadas por espectrometría de masas en muestras control separadas por 2-DE.

Mancha	Proteína probable	Masa molecular (Da)	pI	Numero identificación
6	glutamato dehidrogenasa	14194	9.3	gi 156720237 dbj BAF76769.1
	NADP-Glutamato deshidrogenasa	49766	7.9	gi 118548 sp P28724
	proteína hipotética	40411	6.3	gi 157433358 gb EDO77602.1
	glutamato dehidrogenasa	21425	9	gi 58036451 dbj BAD88545.1
	NADP-Glutamato deshidrogenasa	40545	8.6	gi 30038139 gb AAP12655.1
	NADP-Glutamato deshidrogenasa	15965	9	gi 115607113 gb ABJ16403.1
	Enolasa	48220	5.7	gi 157437452 gb EDO81662.1
	NADP-Glutamato deshidrogenasa	33879	7.9	gi 30038155 gb AAP12663.1
	Proteína hipotética	40636	8.8	gi 30172736 sp O97438
	Glutamato dehidrogenasa	34221	7.9	gi 10567614 gb AAG18504.1
	NADP-Glutamato deshidrogenasa	61193	5.8	gi 56407641 gb AAV88045.1
	NADP-Glutamato deshidrogenasa	39982	9.3	gi 157435028 gb EDO79253.1
	Enolasa	90434	4.7	gi 157438411 gb EDO82619.1
	Carbamato cinasa	153925	7.2	gi 157438402 gb EDO82610.1
kinecina	115701	6.2	gi 157438402 gb EDO82610.1	
7	Carbamato cinasa	34221	7.9	gi 30172736 sp O97438
	Cadena ligera de Dineína	10448	7.5	gi 157434524 gb EDO78754.1
	gamma giardina	35632	7	gi 585197 sp P38413
	Carbamato cinasa	33879	7.9	gi 157436342 gb EDO80558.1
	UPL-1	34283	6.9	gi 25140627 gb AAN73281.1
	Ornitina carbamoiltransferasa	36437	7	gi 157438097 gb EDO82305.1
	alfa-1 giardina	33890	6.7	gi 121184 sp P17063
	factor alfa-1 de elongación	43951	7.8	gi 585082 sp Q08046
	Proteína 2 similar a GARP	39982	9.3	gi 56407641 gb AAV88045.1
	Piruvato fosfato dicinasa	97645	6.7	gi 1213492 gb AAC47168.1
	Piruvato fosfato dicinasa	97645	6.7	gi 1213492 gb AAC47168.1
proteína hipotética	97645	6.7	gi 1213492 gb AAC47168.1	

Anticuerpos IgG Séricos Reconocen Antígenos de Superficie de

G. lamblia

Para determinar si los anticuerpos séricos son capaces de reconocer antígenos de superficie del parásito, se realizó una inmunotinción indirecta de trofozoítos de *G. lamblia* GS-M-83-H7 con suero de ratones infectados. Estos ensayos mostraron la presencia de moléculas de superficie distribuidas tanto en la membrana como en los flagelos del parásito que fueron reconocidas por anticuerpos IgG séricos tanto en la primoinfección como en la re-infección (Figura 6).

Como estrategia adicional a la caracterización de proteínas antigénicas de *Giardia*, se produjeron anticuerpos monoclonales mediante la fusión de esplenocitos extraídos de ratones después de la semana 6 de re-infección con trofozoítos GS-M-83-H7 por vía intragástrica y células de mieloma (P3 X 63.Ag8). Para la selección de los hibridomas de células B específicos contra *G. lamblia* se realizó un tamizaje mediante el ensayo de manchas (dott-blotting), e inmunofluorescencia indirecta. Se obtuvieron 9 hibridomas de células B (1B10, 2C9, 3C3, 3C5, 3C10, 3D10, 4C7, 5F4 y 5G8) y 6 subclonas (2C9.D11, 3C10.E5, 3C10.E6, 3C10.F8, 5G8.B5 y 5G8.D7) con especificidad hacia proteínas de *G. lamblia* clona GS-M-83-H7.

Los anticuerpos producidos por la mayoría de los hibridomas fueron de isotipo IgG2b, excepto el hibridoma 1B10 el cual produjo anticuerpos de isotipo IgG2a. Al comparar el perfil de reconocimiento de los anticuerpos presentes en el suero de los ratones utilizados en nuestro estudio y los anticuerpos monoclonales 1B10, 3C10.E5 y 5G8.B5 mediante Western-blotting con proteínas separadas por SDS-PAGE 12% y transferidas a membranas de nitrocelulosa, se observó que la banda proteica de 71 kDa fue reconocida por los anticuerpos monoclonales y por IgG sérica de los ratones durante la primoinfección y re-infección (Figura 7). Estos resultados

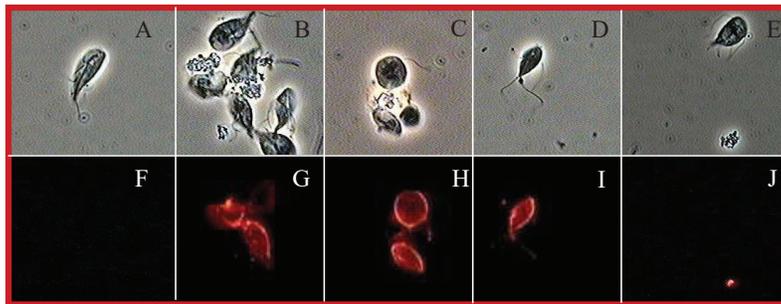


Figura 6. Anticuerpos IgG de ratones con giardiasis reconocen antígenos de superficie de la clona GS-M-83-H7 durante la primo y la reinfección. Los paneles A, B, C, D y E muestra la microscopía en contraste de fases del ensayo de inmunofluorescencia que se presenta en los paneles F al J. El panel F corresponde a un control negativo con una mezcla de sueros previo a la infección, G muestra la inmunorreactividad en la semana 4 post-infección, H corresponde a la semana 4 de re-infección, I presenta la inmunorreactividad con anticuerpos monoclonales 3C10.E5 y J corresponde a un control de medio (D5F). La reacción antígeno-anticuerpo se evidenció mediante el uso de anticuerpos anti-IgG conjugados a ficoeritrina en dilución 1:100 en PBS-BSA 1% y su observación en microscopía de fluorescencia con filtro de emisión de 578 nm, con aumento de 40X.

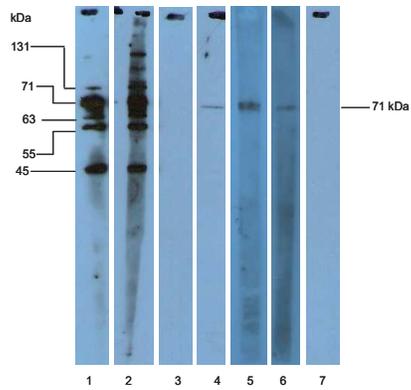


Figura 7. Perfil de inmunorreconocimiento de antígenos de *G. lamblia* que inducen respuesta de IgG a nivel sistémico. Análisis de Western-blotting en 1D que muestra el inmunorreconocimiento de IgG de un grupo de sueros durante la primoinfección (1), re-infección (2), control de sueros de pre-infección (3) y de los anticuerpos monoclonales 1B10 (4), 3C10.E5 (5), 5G8.B5 (6), en el panel 7 se presenta el control el anticuerpo irrelevante 40F.

junto con los resultados de inmunofluorescencia y los obtenidos en los análisis de espectrometría de masas a partir de electroforesis en doble dimensión (2-DE) nos permiten sugerir que alguna de las VSP's identificadas (VSP-H7, VSP-H7-1 y VSP con INR) pudieran ser blanco de la respuesta inmune a nivel sistémico en el modelo experimental utilizado en nuestro estudio.

Respuesta Inmune Humoral Mediada por IgA secretora

Con el objetivo de encontrar condiciones experimentales adecuadas para evaluar la respuesta de IgA fecal en ratones infectados con *G. lamblia* a través de western-blotting en segunda dimensión, se evaluó el efecto de los reactivos utilizados en 2-DE en el inmunorreconocimiento de IgA fecal. Nuestro laboratorio cuenta con el antecedente de que el detergente SDS y el agente reductor β -mercaptoetanol a concentraciones estándar utilizadas en SDS-PAGE afectan el inmunorreconocimiento de IgA fecal con antígenos solubles de *G. lamblia* (Velázquez y cols., 2005).

Para el procedimiento de 2-DE la muestra proteica a analizar debe solubilizarse en solución de rehidratación la cual, bajo condiciones estándar contiene urea 8M, DTT 50 mM y el detergente CHAPS al 2%. Una vez que las proteínas son separadas en primera dimensión en base a su punto isoeléctrico (pI) y previo a la segunda dimensión, las tiras de isoelectroenfoque (IPG) deben equilibrarse, en una solución (equilibrio I) que contiene urea 6M, SDS 2% y DTT 2%, posteriormente debe equilibrarse en una solución que contiene el agente alquilante iodoacetamida al 2.5%, detergente SDS 2% y urea 6M (solución de equilibrio II).

Mediante ensayos de manchas y de acuerdo a lo especificado en la figura 8, se evaluó el efecto de diferentes combinaciones en la concentración de Urea, CHAPS y DTT de la solución de rehidratación sobre el reconocimiento de proteínas de *Giardia lamblia* por parte de IgA fecal de

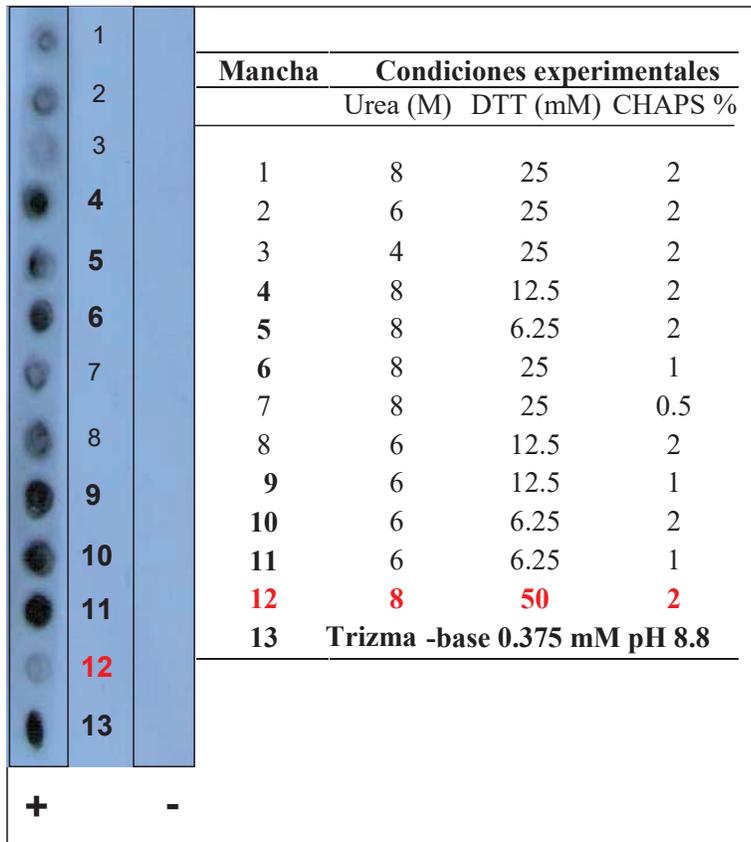
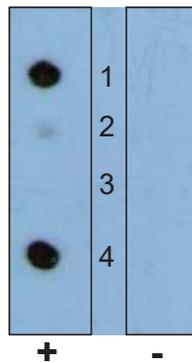


Figura 8. La composición química de la solución de rehidratación usada en 2-DE afecta el inmunorreconocimiento de IgA fecal. Para el ensayo de manchas se adsorbió 1 µg de proteína soluble de *G. lamblia* GS-M-83-H7 en membrana de nitrocelulosa disuelto en soluciones de rehidratación con la composición química indicada en la tabla anexa. La tira indicada con + se hizo reaccionar con un grupo de sueros de la semana 4 de primoinfección y el control negativo (-) se hizo reaccionar con un grupo de sueron de pre-infección. Muestras de heces se diluyeron 1:10 en PBS pH 7.2, BSA 1% y leche descremada al 5%. El anticuerpo secundario (anti-IgA conjugado a peroxidasa de rábano) se utilizó en dilución 1:5000. El tiempo de exposición de la película fotográfica fue de 20 minutos.

ratones infectados. Se observó que las condiciones estándar en la solución de rehidratación afectaron la inmunorreactividad entre proteínas de *G. lamblia* GS-M-83-H7 y anticuerpos IgA en heces (mancha número 12). Las condiciones utilizadas en las manchas indicadas con los números 4, 5, 6, 9, 10 y 11 de la figura 8, aparentemente fueron adecuadas para dicha inmunorreactividad, lo cual sugiere que el DTT fue el principal componente de la solución de rehidratación que afectó dicha inmunorreactividad. Se sugiere que concentraciones de 12.5 mM de DTT pueden ser utilizadas para la identificación de proteínas inmunorreactivas para IgA fecal.

Adicionalmente se evaluó el efecto de la solución de equilibrio I. De acuerdo a los resultados del ensayo de manchas que se presenta en la figura 9, donde fue evidente el efecto deletéreo que presenta la composición química de dicha solución (urea 6M, tris-HCl, 0.375 mM con pH 8.8, glicerol 20%, SDS 2% y DTT 2%) en el reconocimiento de IgA fecal. Considerando que las proteínas no necesariamente deben ser alquiladas para su adecuada separación en 2-DE se decidió utilizar y modificar únicamente la solución de equilibrio I en su contenido de SDS y DTT como principales agentes desnaturizantes y reductores. Mediante ensayos de manchas se encontró que concentraciones mayores a 1% de SDS y 1% de DTT afectan la inmunorreactividad con IgA fecal, esta reactividad se restableció al utilizar 0.2% de SDS y 0.2% de DTT (Figura 10). Sin embargo, al utilizar las condiciones de la solución de rehidratación (urea 8M, CHAPS 2%, DTT 12.5%) y solución de equilibrio I (urea 6M, SDS 0.2% y DTT 0.2%) que en el ensayo de manchas resultaron adecuadas para el inmunorreconocimiento de IgA y aplicarlo al proceso de 2-DE no fue posible identificar la presencia de proteínas inmunorreactivas (Figura 11). Por lo cual, se recomienda nuevos estudios que permitan utilizar 2-DE como estrategia metodológica para evaluar de la respuesta inmune de IgA secretora.



Figra 9. Los agentes desnaturalizantes y reductores presentes en la solución de equilibrio usada en 2-DE afectan el inmunorreconocimiento de IgA. Para el ensayo de manchas el extracto proteico de *G. lamblia* GS-M-83-H7 se diluyó 1:2 en: solución reguladora trizma-HCl 0.375M, pH 8.8 **(1)**, solución de equilibrio I preparado en el laboratorio de acuerdo a las condiciones estándar del manual Bio-Rad para 2-DE (urea 6M, Tris-HCl 0.375M, pH 8.8, SDS 2%, glicerol 20%, DTT 2% (peso/volumen) **(2)**, Solución de equilibrio I comercial (Bio-Rad, cat. 163-2099) **(3)** y en solución reguladora de fosfatos salino (PBS), pH 7.2 **(4)**. En cada uno de los puntos se adsorbió 1 µg de proteína en membrana de nitrocelulosa y se hicieron reaccionar con muestras de heces en dilución 1:10 de la cuarta semana de primoinfección (+) y con muestras de heces de pre-infección como control negativo (-). El anticuerpo secundario (anti-IgA conjugada a peroxidasa de rábano) en dilución 1:5000. Tiempo de exposición de la película fotográfica de 20 minutos.

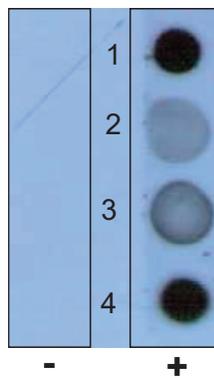


Figura 10. Condiciones experimentales óptimas en el ensayo de manchas para el inmunorreconocimiento de IgA fecal. Se adsorbió 1 μg de proteína soluble en membranas de nitrocelulosa se acuerdo a las siguientes condiciones experimentales: **1** (solución de rehidratación conteniendo urea 8M, CHAPS 2%, DTT 12.5 mM), **2** (solución de equilibrio I conteniendo urea 6M, SDS 2%, DTT2%), **3** (solución de equilibrio I conteniendo urea 6M, SDS 1%, DTT 1%) y **4** (solución de equilibrio I conteniendo urea 6M, SDS 0.2%, DTT 0.2%). Para el ensayo se utilizó un grupo de sueros de la semana 4 de primoinfección (+) y como control negativo (-) se utilizó un grupo de sueros de pre-infección en dilución 1:10 y el anticuerpo secundario (anti-IgA-peroxidasa de rábano) en dilución 1:5000. Tiempo de exposición de la película fotográfica de 20 minutos.

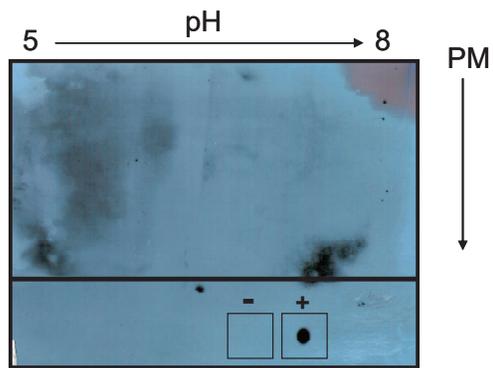


Figura 11. Western-blotting en 2-D de proteínas de *G. lamblia* e IgA fecal. Tiras de isoelectroenfoque fueron rehidratadas con 400 μ g de extracto proteico de GS-M-H7 en solución de rehidratación modificado (DTT 12.5 mM) y solución de equilibrio I con DTT 0.1% y SDS 0.2%. Para la inmunodetección se utilizó un grupo de muestras de heces en dilución 1:10 en PBS-BSA1%-leche 5%, anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra IgA anti-ratón) en dilución 1:10,000 en PBS-BSA 1%, leche svelty 1%. Revelado por quimioluminiscencia. El tiempo de exposición de la película fotográfica fue de 20 minutos.

DISCUSIÓN

Con el objetivo de identificar proteínas de *G. lamblia* GS-M-83-H7 capaces de inducir una respuesta inmune humoral, en el presente trabajo se utilizaron análisis de ELISA indirecto, dott-blotting, Western-blotting (de proteínas separadas en 2-DE) y espectrometría de masas como las principales herramientas metodológicas. En concordancia con los resultados reportados por otros autores (Palm y cols., 2003; Stäger y Müller, 1997; Venkatesan y cols., 1996) y los reportados por nuestro grupo de trabajo (Velázquez y cols., 2005), se observó que aún y cuando *G. lamblia* es un parásito que reside únicamente en el lumen intestinal, el parásito es capaz de despertar una respuesta de anticuerpos a nivel sistémico, medido esto mediante el título de anticuerpos IgG séricos los cuales podrían participar en el proceso de aclaramiento de la infección. En un estudio realizado en nuestro laboratorio se observó una relación inversa en el título de IgG y el número de trofozoítos en duodeno en diferentes tiempos del proceso infeccioso (datos no reportados). El o los mecanismos involucrados en estos procesos aún se desconocen.

Las proteínas inmunorreconocidas por un grupo de sueros de la cuarta semana de re-infección mediante Western-blotting en doble dimensión, correspondieron a proteínas con masas moleculares relativas de 63 y 71 kDa y pI entre 5.2 a 5.8. En un estudio previo en nuestro laboratorio, mediante western-blotting con proteínas separadas por SDS-PAGE 12 % ya se había observado inmunorreactividad en las bandas proteicas con estas masas moleculares. Otros autores han observado que productos excretorios-secretorios (E/S) del parásito también son capaces de inducir respuestas de inmunidad sistémica y mucosal (Jiménez y cols., 2004; Jiménez y cols.,

2007), donde proteínas con masas moleculares de 15 a 72 kDa fueron reconocidas por IgG sérica de ratones inmunizados oralmente con antígenos E/S de *Giardia*, mientras que las bandas de masa molecular de 50, 58 y 63 kDa fueron reconocidas por anticuerpos IgA.

En nuestro estudio, en el área de inmunoreactividad se identificaron 3 proteínas variables de superficie: la VSP-H7, VSP-H7-1 y VSP-con INR. Experimentalmente y en base a su corrimiento en 2-DE bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras, se estimó una masa molecular de 71 kDa y pI entre 5.3 y 5.9 para estas proteínas. En la literatura se reporta que la VSP-H7 tiene una masa molecular de 56 kDa pero en base a su corrimiento en SDS-PAGE se localiza en la banda de 72 kDa (Biez y cols., 2001; Lujan y cols., 1995; Müller y cols., 1996). Esta proteína variable de superficie es característica de la clona GS-M-83-H7. Adicionalmente se identificaron las giardinas α , β , γ y δ , $\alpha 2$ y β tubulinas.

El análisis de espectrometría de masas también identificó una serie de proteínas involucradas en el metabolismo del parásito como la proteína de unión a cadenas pesadas de inmunoglobulinas (BiP) por sus siglas en inglés (Immunoglobulin-binding-protein), esta proteína también se le denomina GPR78, es una proteína de choque térmico con masa molecular relativa de 70 kDa localizada en el retículo endoplásmico y participa en translocación de proteínas de secreción (Alder y cols., 2005). Otra proteína identificada fue la chaperonina GroEL de 60 kDa, también involucrada en el plegamiento de proteínas en algunas bacterias. En la mayoría de los eucariontes esta proteína se encuentra localizada en mitocondrias y facilita el plegamiento de proteínas después de su transporte a través de la membrana mitocondrial. Posiblemente en *Giardia*, su localización sea en hidrogenosomas de manera similar que en *Tricomonas* (Roger y cols., 1998). Estas proteínas también se identificaron en estudios previos en nuestro laboratorio mediante el análisis en SDS-PAGE en una dimensión (Ontiveros, 2005).

El análisis de espectrometría de masas reveló la presencia de 6 isoformas de glutamato deshidrogenasa con masas moleculares que oscilan entre 16 y 50 kDa, y pI de 7.9 a 9.3 y 2 isoformas de carbamato cinasas (una con masa molecular de 34221 Da y pI 7.9 y otra con masa molecular de 33879 Da y pI de 7.9). Otras dos enzimas identificadas fueron la ornitina carbamoiltransferasa (OCT) y la enolasa las cuales están involucradas en el metabolismo energético del parásito. En nuestro estudio, estas últimas dos proteínas no mostraron inmunorreactividad a diferencia de los resultados presentados por Téllez y cols. (2005), quienes proponen la participación de estas proteínas en la respuesta inmune mediada por IgA en leche y saliva de mujeres nicaragüenses. Posiblemente estas enzimas, bajo ciertos estímulos celulares, sean secretadas por *Giardia* durante su interacción con células intestinales de humano y de esta manera puedan estimular una respuesta inmune tanto a nivel mucosal como sistémico. Sin embargo, se requieren más evidencias científicas que esclarezcan la importancia de este evento durante la infección.

Mediante inmunofluorescencia se demostró la presencia de moléculas de superficie distribuidas en todo el cuerpo del parásito como blancos moleculares de la respuesta inmune humoral mediada por anticuerpos IgG séricos. No se descarta la posibilidad de que moléculas intracelulares pudieran inducir estos tipos de repuestas en el hoperdo, posiblemente mediante su secreción hacia el lumen intestinal como parte del mismo ciclo de vida del parásito o tras su liberación mediante procesos de lisis del mismo, o bien, que estas proteínas pudieran estar actuando como moléculas adyuvantes de la respuesta inmune humoral. El efecto adyuvante de moléculas citosólicas de *Giardia* fue reportado por Dunn y cols. en 2001, quienes observaron que la co-administración oral de antígenos y fracciones citosólicas de *Giardia* indujo a un aumento en la producción de anticuerpos IgG séricos, IgA sérica y secretora en comparación con la toxina de cólera (CT), considerada actualmente como uno de los adyuvantes de elección. La posibilidad de que proteínas citosólicas pudieran ser el blanco de la

respuesta inmune durante la giardiasis o que pudieran estar actuando como adyuvantes de la misma infección requiere mas estudios.

A pesar de que *G. lamblia* es un parásito no invasivo que estrictamente reside en el lumen intestinal del hospedero, en nuestro estudio se observó que antígenos de superficie del parásito son capaces de estimular respuestas de inmunidad sistémica mediada por IgG tanto en la primo como en la re-infección. Otros investigadores han reportado que la VSP-H7 es casi exclusivamente la única proteína responsable de la respuesta inmune humoral (Gottstein y cols. 1993; Nash y col., 1992). Esta VSP, fue una de las proteínas identificadas como inmunodominantes mediante el análisis por espectrometría de masas. Sin embargo, otras proteínas incluyendo las involucradas en el metabolismo de *Giardia*, pudieran ser importantes en los mecanismos sistémicos de defensa del huésped y requieren ser estudiados. La actividad citotóxica de los anticuerpos de isotipo IgG se ha demostrado en estudios *in vitro* (Jiménez, y cols. 2004) y su participación *in vivo*, en los mecanismos de defensa del huésped se asocia al hecho de que el mayor título de estos anticuerpos coincide con el momento en el cual el proceso infeccioso cesa (Eckmann, 2003), adicionalmente se ha observado que animales deficientes de linfocitos B son incapaces de eliminar al parásito y en ellos la giardiasis se hace crónica (Stäger y Müller, 1997), por lo que estamos interesados en evaluar posteriormente la participación de este tipo de anticuerpos en el lumen intestinal de ratones con giardiasis, así como su papel protector contra esta infección y evaluar posibles mecanismos de transcitosis de moléculas involucradas en la activación de la respuesta inmune sistémica de la giardiasis. Estudios *in vitro* sobre el transporte bidireccional de IgG a través de monocapas celulares sugieren que el receptor Fc de Inmunoglobulinas (FCRn) puede establecer y mantener un balance en la distribución de IgG a través de la barrera epitelial con importantes implicaciones en los mecanismos de inmunidad mucosal y de defensa del

huésped contra parásitos no invasivos (Claypool y cols., 2004; Dickinson y cols., 1999).

Con la ayuda de los hibridomas de células B generados en nuestro laboratorio estamos interesados en la caracterización bioquímica e inmunológica de antígenos reconocidos por los anticuerpos producidos por dichos hibridomas. Por otro lado, es importante encontrar las condiciones experimentales óptimas de 2-DE que nos permitan de manera más fina la identificación y caracterización de antígenos inductores de la respuesta de IgA mucosal.

El uso de la electroforesis en doble dimensión en combinación con los análisis por espectrometría de masas y la información que ofrecen las bases de datos del genoma de *Giardia lamblia* y de otros organismos constituyen una herramienta muy importante en el estudio de proteínas. En el presente trabajo estas metodologías y la generación de anticuerpos monoclonales, nos permitieron avazar en el conocimiento de proteínas de *Giardia lamblia* clona GS-M-83-H7 capaces de inducir una respuesta inmune humoral sistémica mediado por IgG.

CONCLUSIONES

- Se establecieron las condiciones óptimas de electroforesis en 2-DE para el análisis de proteínas contenidas en el extracto antigénico de *G. lamblia*
- Se identificaron tres VSPs como posibles blancos moleculares de la respuesta inmune humoral de IgG: VSP-H7, VSP-H7-1 y VSP con INR.
- La infección con *G. lamblia* clona GS-M-83-H7 en ratones C3H/HeJ, induce una respuesta inmune humoral mediada por IgG contra antígenos de superficie y contra proteínas citosólicas del parásito.
- Mediante el ensayo de manchas fue posible encontrar condiciones experimentales óptimas para el inmunorreconocimiento de IgA fecal. Sin embargo estas condiciones no permitieron identificar proteínas responsables de la respuesta inmune humoral mediada por IgA secretora mediante Western-blotting en 2-DE.
- Los resultados de nuestro estudio sugieren que parte de la respuesta inmune humoral en ratones infectados está dirigida contra epitopes conformacionales de antígenos de *G.lamblia*.

BIBLIOGRAFÍA

Adam, R.D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. Clin. Microbiol. Rev. 14(3): 447-475.

Aggawal, A., Nash, T.E. 1987. Comparison of two antigenically distinct *Giardia lamblia* isolates in Gerbils. Am. J. Trop. Med. Hyg. 36(2): 325-332

Aggawal, A., Nash, T.E. 1988. Antigenic Variation of *Giardia lamblia* in Vivo. Infect. Immun. 56(6): 1420-1423.

Alder, N.N., Y.S. Jeffrey; L. Brodsky; L.M. Hendershot; A.E. Johnson, 2005. The molecular mechanisms underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum. J. Cell Biol. 168(3): 389-399.

Astiazarán, G.H., C.M. Espinoza; G. Castañón, M.B. Chávez; P.A. Martínez, 2000. *Giardia lamblia*: Effect of Infection with Symptomatic and Asymptomatic Isolates on the Growth of Gerbils (*Meriones unguiculatus*). Exp. Parasitol. 95: 128-135.

Beltrán, C.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 Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

Biez, M., M. Dai; M. Welle; B. Gottstein; N. Müller. 2003. Interlekin-6-Deficient Mice are Highly Susceptible to *Giardia lamblia* Infection but Exhibit Normal Intestinal Immunoglobulin A Responses against the Parasite. Infect. Immun. 71(3): 1569-1573.

Biez, M., P. Wittwer; V. Zimmermann; N. Müller. 2001. Molecular characterization of a predominant antigenic region of *Giardia lamblia* variant surface protein H7. Int. J. of Parasitol. 31: 827-832.

Biez, M., M. Siles-Lucas, P. Witter; N. Müller. 2001. *vsp* Gene Expression by *Giardia lamblia* clone (GS/M-83-H7 during Antigenic Variation In Vivo and In Vitro. Infect. Immun. 69(9): 5278-5285.

Buret, A.G. 2005. Immunopathology of giardiasis: the role of lymphocytes in intestinal epithelial injury and malfunction. Mem Inst Oswaldo Rio de Janeiro, Vol 100(suppl. I): 185-190.

Byrd, L.G., J.T. Conrad; T.E. Nash. 1994. *Giardia lamblia* Infection in Adult Mice. Infect. Immun. 62(8): 3583-3585.

Chaudhuri, P.P., D. Das S. Sarkar, L.M. Muñoz, P. Das. 1997. Biochemical and Immunological Characterization of Soluble antigens of *Giardia lamblia*. Parasitol. Res. 83: 604-610.

Claypool, S.M., B.L. Dickinson; J. S. Wagner; F. E. Johansen; N.Venu; J.A. Borawski; W.I. Lencer; R.S. Blumberg. 2004. Bidirectional Transepithelial IgG Transport by a Strongly Polarized Basolateral Membrane Fc-Receptor. Mol. Biol. Cell. 15: 1746-1759.

Cunliffe, R., Mahida, Y.R. 2004. Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract. J. L. Biol. 75:49-58.

Davids, B. J., J.E. D. Palm, M.P. Housley, J.R. Smith, Y.S. Andersen, M.G. Martin, B.A. Hendrickson, F.E. Johansen, S.G. Svärd, F. D. Gillin and L. Eckmann. 2006. Polymeric Immunoglobulin Receptor in Intestinal

Immune Defense against the Lumen-Dwelling Protozoan Parasite *Giardia*. J. Immunol. 177:6281-6290.

Dickinson, B. L., K. Badizadegan; Z. Wu; J.C. Ahouse; X. Zhu; N. E. Simister; R. S. Blumberg; W. I. Lencer. 1999. Bidirectional FcRn-dependent IgG transport in a polarized human intestinal epithelial cell line. J. Clin. Inv. 104(7): 903-911.

Dunn, L. A., J. A. Upcroft; E. V. Fowler; B. S. Matthews; P. Upcroft. 2001. Orally Administrated *Giardia duodenalis* Extracts Enhance an Antigen-Specific Antibody Response. Infect. Immun. 69(10): 6503-6510.

Eckmann, L. 2002. Small bowel Infections. Curr. Opin. Gastroenterol. 18: 197-202.

Eckmann, L. 2003. Mucosal Defences against *Giardia*. Parasite Immunol. 25(5): 259-270.

Eckmann, L., F. Laurent; T. D. Langford; M. L. Hetsko; J. R. Smith; M. F. Kagnoff; F. D. Gillin. 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*. J. Immunol. 164: 1478-1487.

Elmendorf, H. G., S. C. Dawson; J. M. McCaffery. 2003. The Cytoskeleton of *Giardia lamblia*. Int. J. Parasitol. 33: 3-28.

Farthing, M. J. 2003. Immune Response-Mediated Pathology in Human Intestinal Parasitic Infection. Parasite Immunol. 25(5): 247-257.

Farthing, M. J., M. E. Pereira; G. T. Keusch. 1986. Description and Characterization of a Surface Lectin from *Giardia lamblia*. *Infect. Immun.* 51(2): 661-667.

Faubert, G. 2000. Immune Response to *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13(1): 35-54.

Franco, R. M. B., T. R. Rocha; C. Neto. 2001. Occurrence of *Cryptosporidium* oocyst and *Giardia* Cyst in Raw Water from Atibada River Campinas Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.* 43: 107-109.

Furness, B. W., Beach, M. J., Roberts, J. M. 2000. Giardiasis surveillance- United States, 1992-1997. *MMWR- CDC Surveill Summ.* 49 (7): 1-13.

Gillin, F. D. and Reidner D. S. 1996. Cell Biology of the Primitive Eukariote *Giardia lamblia*. *Ann. Rev. Microbiol.* 50: 679-705.

Gotstein, B., G.R. Arriman; J.T. Conrad; T.E. Nash, 1990. Antigenic variation in *Giardia lamblia*: Cellular and humoral immune response in a murine model. *Parasite immunol.* 12:659-673

Gómez, M., J.L. Orihuela; M. E. Orihuela. 1999. Parasitismo intestinal en círculos infantiles. *Rev. Cubana Med. Gen. Integr.* 15: 266-269.

Hassan. S. M. T., M. Maachee; O. M. Córdova; R. Díaz; M. Matrinez; A Osuna. 2002. Human Secretory Immune Response to Fatty Acid-Binding Protein Fraction From *Giardia lamblia*. *Infect. Immun.* 70(4): 2226-2229.

Jiménez, J. C., G. Uzcanga; A. Zambrano; M. C. Di Prisco; N. R. Lynch. 2000. Identification and Partial Characterization of Excretory/Secretory Products with Proteolytic Activity in *Giardia intestinalis*. *J. Parasitol.* 86(4): 859-862.

Jiménez, J. C., J. Fontaine ; J. M. Grzych ; E. Dei-Cas ; M. Capron. 2004. Systemic and Mucosal Responses to Oral Administration of Excretory and Secretory Antigens from *Giardia intestinalis*. Clin. Diag. Lab. Immunol. 11(1): 152-160.

Jiménez, J. C., W. Morelle ; J. C. Michalsky ; M. C. Dei-Cas. 2007. Excreted/secreted glycoproteins of *G. intestinalis* play an essential role in the antibody response. Parasitol. Res. 100: 715-720.

Kasper, L. H., D. Buzoni-Gatel. 2001. Ups and Downs of Mucosal Cellular Immunity Against Protozoan Parasites. Infect. Immun. 69(1): 1-8.

Langford. T. D., M. P. Housley, M. Boes, J. Chen, M. F. Kagnoff, F.D. Gillin and L. Eckmann. 2002. Central Importance of Immunoglobulin A in Host Defense against *Giardia* sp. Infect. Immun. 70(1): 11-18.

Larocque, R., K. Nakagaki, P. Lee, A. Abdul-Wahid, and G. M. Faubert. 2003. Oral Immunization of BALB/c Mice with *Giardia duodenalis* Recombinant Cyst Wall Protein Inhibits Shedding of Cysts. Infect. Immun. 71(10): 5662-5669.

Li, E., P. Zhou; Z. Petrin; S. M. Singer. 2004. Mast Cell-Dependent Control of *Giardia lamblia* Infections in Mice. Infect. Immun. 72(11): 6642-6649.

Li, E; P. Zhou; S. M. Singer, 2006. Neuronal Nitric Oxide Synthase Is Necessary for Elimination of *Giardia lamblia* Infections in Mice. J. Immunol. 176: 516-521.

Ljungström, I., J. Holmgren; A. M. Svennerholm; A. Ferrante. 1985. Changes in Intestinal Fluid and Mucosal Immune Responses to Cholerae

Toxin in *Giardia muris* Infection and Binding of Cholera Toxin to *Giardia muris* Trophozoites. Infect. Immun. 50(1): 243-249.

Luján, H. D., M. R. Mowatt; Y. Lu; A. Lees; M. R. Chance; T. Nash. 1995. Purification of a Variant-specific Surface Protein of *Giardia lamblia* and Characterization of its Metal-binding Properties. J. Biol. Chem. 270(23): 13807-13811.

Marshall M. M., D Naumovitz; Y. R. Ortega; C. R. Sterling. 1997. Waterborne protozoan pathogens. Clin. Microbiol. Rev. 10: 67-85.

Mathews, Ch. K., K. E. van Holde, K. G. Ahern. 2002. Bioquímica. Capítulo 21. Metabolismo de los compuestos nitrogenados: aminoácidos, porfirinas y neurotransmisores. 838-841.

Moya-Camarena, S. Y., N. Sotelo; M. E. Valencia. 2002. Effects of asymptomatic *Giardia intestinalis* infection on carbohydrate absorption in well-nourished Mexican Children. Am. J. Trop. Med. Hyg. 66: 255-259.

Müller, N., S. Stäger; B. Gottstein. 1996. Serological Analysis of Antigenic Heterogeneity of *Giardia lamblia* Variant Surface Proteins. Infect. Immun. 64(4): 1385-1390.

Müller N., S. Stänger. 1999. Periodic appearance of a predominant variant antigen type during a chronic *Giardia lamblia* infection in a mouse model. Int. J. Parasitol. 29: 1917-1923.

Nash, T. E. 1992. Surface antigen variability and variation in *Giardia lamblia*. Parasitol. Today. 8: 229-234.

Nash, T. E. 1995. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. In Molecular Approach to parasitology. J. C. Boothroyd, R. Komuniecki. Willey-Liss, Inc. U.S.A.

Nash, T. E. 1997. Antigenic variation in *Giardia lamblia* and the host's immune response. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 352: 1369-1375.

Nash, T. E. 2002. Surface antigenic variation in *Giardia lamblia*. Mol. Microbiol. 45(3): 585-590.

Nash, T. E., Keister, D. B. 1985. Differences in Excretory-Secretory Products and Surface Antigens Among 19 Isolates of *Giardia*. J. Infect. Dis. 12(6): 1166-1170.

Nash, T. E., M. R. Mowatt. 1992. Characterization of a *Giardia lamblia* variant-specific surface protein (Vsp) gene from isolate GS/M and estimation of the Vsp gene repertoire size. Mol. Biochem. Parasitol. 51: 219-227.

Nash, T. E., H.T. Luján; M. R. Mowatt; J.T. Conrad. 2001. Variant-Specific Surface Protein Switching in *Giardia lamblia*. Infect. Immun. 69(3): 1922-1923.

Nohýunková, E., Drábel, P., Reisching, J., Kulda, J. 2000. Localization of gamma-tubulin in interphase and mitotic cells of a unicellular eukaryote, *Giardia intestinalis*. Eur. J. Cell. Biol. 79: 438-445.

Ontiveros, A. N. 2005. Identificación de antígenos inmunodominantes de *Giardia lamblia* reconocidos por anticuerpos séricos de ratones C3H/HeJ con giardiasis. Tesis de maestría en ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

Ortega, Y. R., R. D. Adam. 1997. *Giardia*: Overview and Update. Clin. Infect. Dis. 25: 545-550.

Palm, D. J. E; M. Weiland; J. Griffiths; I. Ljungström; S. Svärd. 2003. Identification of Immunoreactive Proteins During Acute Human Giardiasis. J. Infect. Dis. 187: 1849-1859.

Peattie, D. A., R.A. Alonso; A. Hein; P. Caulfield. 1989. Ultrastructural Localization of Gardins to the Edges of Disk Microribbons of *Giardia lamblia* and the Nucleotide and Deduced Protein Sequence of Alpha Gardin. J. Cell Biol. 109: 2323-2335.

Pollock, K. G., H. V. Smith, D. Young; C. N. Ramsay; W. J. Reilly. 2005. *Giardia* Surveillance in Scotland, 1988-2003. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 24: 571-573.

Procop, G. W. 2001. Gastrointestinal Infections. Infect. Dis. Clin. North Am. 15: 1073-1108.

Roger, A. J., S. G. Svärd, J. Tovar; C. G. Clark; M. W. Smit. 1998. A mitochondrial-like chaperonin 60 gene in *Giardia lamblia*: Evidence that mitochondrial-like diplomonads once harbored an endosymbiont related to the progenitor of mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 229-234.

Rosales-Borjas, D. M., J. D. Rivadeneyra; A. D. Leyva; S. V. Zambrano; C. Mascaró; A. Osuna; L. O. Ortiz. 1998. Secretory Immune Response to Membrane Antigens during *G. lamblia* Infection in Humans. Infect. Immun. 66(2): 756-759.

Roxström-Lindquist, K., D. J. E. Palm; D. Reiner; E. Ringqvist; S. G. Svärd. 2005. *Giardia* Immunity - and update. Trends Parasitol. 21(1):1-6

Scott, K. G. E., R. Logan; G. M. Klamer; D. A. Teoh; A. G. Buret. 2000. Jejunal Brush Border Microvillous Alterations in *Giardia muris*-Infected Mice: Role of T lymphocytes and Interleukin 6. *Infect. Immun.* 68(6): 3412-3418.

Scott, K.G.E., L.C.H. Yu; A. G. Buret. 2004. Role of CD8⁺ and CD4⁺ T Lymphocytes in Jejunal Mucosal Injury during Murine Giardiasis. *Infect. Immun.* 72(6): 3536-3542.

Secretaría de Salud. 2003. Sistema Único para la Vigilancia Epidemiológica. Dirección General de Epidemiología.

Secretaría de Salud. 2006. Sistema Único para la Vigilancia Epidemiológica. Dirección General de Epidemiología.

Shant J., S, Bhattacharyya; S. Ghosh; N.K. Ganguly; S. Majumdar. 2002. A potentially important excretory-secretory product of *Giardia lamblia*. *Exp. Parasitol.* L (102):178-186

Singer, S.M., T.E. Nash. 2000. T-Cell Dependent Control of Acute *Giardia lamblia* Infection in Mice. *Infect. Immun.* 68(1): 170-175.

Sotelo. C.N. 1998. Giardiasis en niños. Aspectos Clínicos y Terapéuticos. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México.* 55(1): 47-53.

Sousa, M.C., C.A. Gonçalves; V.A. Bairos; J. P. Da-Silva. 2001. Adherence of *Gardia lamblia* Trofozoites to Int-407 Human Intestinal Cells. *Clin. Diag. Lab. Immunology.* 8(2): 258-265.

Stänger, S., B. Gottstein; N. Müller. 1997. Systemic and Local Antibody Response in Mice Induced by a Recombinant Peptide Fragment form *Giardia*

lamblia Variant Surface Protein (VSP) H7 Produced by *Salmonella typhimurium* vaccine strain. Int. J. Parasitol. 27(8):965-971.

Stäger, S., Müller, N. 1997. *Giardia lamblia* infection in B-Cell-Deficient Transgenic Mice. Infect. Immun. 65(9): 3944-3946.

Syed, A. A., D.R. Hill. 2003. *Giardia intestinalis*. Curr. Opin. Infect. Dis. 16: 453-460.

Tellez, A., D. Palm; M. Werland; J. Aleman; J. W. Krusnell; E. Linder; S. Svärd. 2005. Secretory antibodies Against *G. intestinalis* in Lactating Nicaraguan Women. Parasite Immunol. 27(5): 163-169.

Torres, M.E., M.C. Pérez, F. Schelotto, G. Varela, V. Parodi, F. Allende, E. Falconi, L. Dell'Acqua, P. Gaione, M.V. Méndez, A.M. Ferrari, A. Montano, E. Zanetta, A.M. Acuña, H. Chiparelli and E. Ingold. 2001. Ethiology of Children's Diarrhea in Montevideo, Uruguay: Associated Pathogens and Unusual Isolates. J. Clin. Microbiol. 39(6): 2134-2139.

Valencia, M. E., R.P. Jardines, I., Higuera, J.T. Lozano, P.G. Wong, E.D. Noriega. 1981. Estudio Nutricional de los Centros Urbanos Marginados de Sonora (Reporte Técnico). Instituto de Investigaciones y Estudios Superiores del Noroeste, A.C. Hermosillo, Sonora, México.

Velázquez, C., M. Beltrán; N. Ontiveros; L. Rascón; D. C. Figueroa; A.J. Granados; J. Hernández-Martínez; J. Hernández; H. Astiazarán-García. 2005. *Giardia lamblia* infection induces different secretory and systemic antibody responses in mice. Parasite Immunol. 27(9): 351-356.

Venkatesan, P., R. G. Finch; D. Wakelin. 1996. Comparison of Antibody and Cytokine Responses to Primary *Giardia muris* Infection in H-2 congenic Strains of Mice. *Infect. Immun.* 64(11): 4525-4533.

Weiland, M., D. E. L. Palm; W. J. Griffiths; J. M. McCaffery; S. G. Svärd. 2003. Characterization of alpha 1-giardin: an Immunodominant *Giardia lamblia* annexin with Glycosaminoglycan-binding activity. *Int. J. Parasitol.* 33(12): 1341-1351.

WHO. 1996. The World Health Report. Geneva: World Health Organization.

Zhou, P., E. Li; N. Zhu; J. Robertson; T. E. Nash; S. M. Singer. 2003. Role of Interleukin-6 in the Control of Acute and Chronic *Giardia lamblia* Infections in Mice. *Infect. Immun.* 71(3): 1566-1568.

Zhou, P., E. Li; T. Shea-Donohue; J. Robertson; S.M. Singer. 2007. Tumor necrosis factor α contributes to protection against *Giardia lamblia* infection in mice. *Parasite Immunol.* 29(7): 367-374.

ANEXO 1

Obtención del Extracto Antigénico de *G. lamblia*

Reactivos

Solución reguladora de fosfatos-salina (PBS) pH 7.2

Inhibidores de proteasas (Sigma, No. Cat. P2714)

Nitrógeno líquido

Procedimiento

1. Colocar 6 tubos (18x150) de cultivo de *G. lamblia* a confluencia, en un baño de agua-hielo por 15 minutos, lo cual permitirá que los trofozoítos adheridos al vidrio se despeguen.
2. Juntar los cultivos en 2 tubos falcon de 50 mL estériles.
3. Lavar por 3 ocasiones los tubos de cultivo con 1 mL de PBS y juntar con los cultivos en los tubos falcon.
4. Centrifugar a 800 xg por 10 minutos.
5. Descartar el sobrenadante y juntar las células en un solo tubo falcon.
6. Lavar los trofozoítos por 2 ocasiones con 10 mL de PBS.
7. Lavar una vez con agua grado HPLC.
8. Resuspender los trofozoítos en 600 μ L de agua grado HPLC y colocarlos en un tubo ependorff de 1.5 mL.

9. Lisar las células sumergiendo el tubo en nitrógeno líquido hasta que la suspensión esté completamente congelada (aproximadamente 5 minutos).
10. Retirar del nitrógeno líquido y dejar descongelar a temperatura ambiente (aproximadamente 15 minutos).
11. Repetir el paso 9 y 10 por 3 ocasiones. Se puede monitorear la lisis por microscopía..
12. Adicionar 5 μ L de cocktail de proteasas.
13. Sonicar 20 ciclos por 2 minutos. Repetir el procedimiento 2 veces.
14. Centrifugar a 14,000 xg por 15 minutos a 4°C.
15. Colectar el sobrenadante (extracto antigénico).
16. Cuantificar contenido de proteínas totales por medio del micrométodo Bradford (Sigma B6916).
17. Guardar el extracto proteico en congelación a -30°C, hasta su uso.

ANEXO 2

Electroforesis en Doble Dimensión (2-DE)

Preparación de la muestra

Si el extracto antigénico se obtiene en solución reguladora de fosfatos pH 7.2 (PBS) Lavar el extracto antigénico con 1 volumen igual de solución de trizma-base 10 mM, sacarosa 250 mM mediante centrifugación a 1000 xg en centricones con punto de corte 10 kDa, hasta obtener el volumen inicial, repetir este paso 2 veces más. En el último lavado centrifugar hasta que el volumen se reduzca alrededor de la mitad del volumen original (con el objetivo de concentrar las proteínas). Determinar la concentración de proteínas mediante el micrométodo de Bradford.

Rehidratación

Rehidratar pasivamente tiras de IEF de 7 cm de longitud con un volumen total de 125 μ L de solución conteniendo 150 μ g de proteína por 12 horas de acuerdo a los siguientes pasos:

1. Depositar 125 μ L de solución conteniendo la mezcla proteica a analizar en las 3/5 partes centrales de un carril de la charola de rehidratación. Es **importante** no permitir la formación de burbujas, las cuales podrían interferir en la distribución de la muestra en el gel.

2. Retirar la capa protectora de una tira de IEF y colocarla con la cara que contiene el gel hacia abajo, esto es, haciendo contacto con la muestra a analizar.
3. Dejar reposar por espacio de 1 hora a 25°C.
4. Cubrir con 1 mL de aceite mineral y cubrir la charola con la tapa protectora.
5. Permitir la rehidratación pasiva del gel por 12 horas a 25°C.

Primera dimensión (punto isoeléctrico)

1. Colocar una pieza de papel filtro en cada uno de los extremos del canal de la charola de IEF.
2. Adicionar 8 μ L de agua nanopura en cada una de las piezas de papel filtro. Si es necesario, reajuste la posición de estos en la charola.
3. Retirar la tira de IEF de la charola de rehidratación.
4. Eliminar el exceso de aceite colocando la tira de IEF en posición vertical sobre un papel filtro por 7-8 segundos.
5. Eliminar residuos no absorbidos colocando la tira de IEF entre dos papeles filtro previamente humedecidos con agua nanopura.
6. Transferir la tira de IEF al canal correspondiente en la charola de IEF manteniendo la cara conteniendo el gel hacia abajo y con el extremo marcado como "+" hacia el extremo marcado con el mismo signo en la charola de IEF. Repetir esto para todas las tiras. Las cuales se deberán distribuir desde los extremos hacia el centro de la charola en las posiciones 1, 12, 2, 11, 3, 10, etc.
7. Cubrir con 1 mL de aceite mineral.
8. Cubrir con la tapa protectora colocando la parte indicada con el signo "+" de la tapa hacia el lado marcado con el mismo signo en la charola de IEF.
9. Colocar la charola en el equipo de IEF.
10. Programar el equipo de IEF con los siguientes parámetros:
Paso 1: 100 voltios, 30 minutos, rampa lineal.

Paso 2: 250 voltios, 30 minutos, rampa linear.

Paso 2: 4000 voltios, 2 horas, rampa linear.

Paso 3: 4000 voltios, 10,000 voltios-hora, rampa rápida.

11. Una vez que se haya completado la corrida electroforética, remover las tiras de IEF.
12. Retirar el exceso de aceite, colocando la tira verticalmente sobre un papel filtro por 5 segundos.
13. Guardar a -30°C en tubo falcon de 15 mL nuevo o perfectamente limpio con la cara que contiene el gel hacia arriba.

Equilibrio

1. Si las tiras de IEF están en congelación, permitir que adquieran la temperatura ambiente. La tira se tornará clara.
2. Colocar la tira en un tubo falcon con capacidad de 15 mL.
3. Adicionar 2.5 mL de solución de equilibrio I.
4. mantener 10 minutos en el agitador horizontal a velocidad baja.
5. Descarte la solución de equilibrio I.
6. Adicione 2.5 mL de solución de equilibrio II y agite por 10 minutos en agitador horizontal a velocidad baja.
7. Durante esta incubación, calentar la agarosa en el horno de microondas hasta que esta se licue. CUIDADO de no calentar demasiado, ya que la agarosa contiene SDS por lo que el sobrecalentamiento generaría espuma y podría derramarse. Este paso es opcional, en su caso se puede utilizar solución reguladora trizma-glicina pH 6.8 con 2% de SDS (solución utilizada para formar el gel concentrador en SDS-PAGE pero fortificado con SDS al 2%).
8. Descarte la solución de equilibrio II.
9. Enjuague la tira de IEF, en una probeta de 10 mL conteniendo solución de corrida Tris-glicina-SDS. Utilice una pipeta pasteur para remover cualquier burbuja en la superficie del buffer.

10. Elimine el exceso de líquido contenido en la tira de IEF, colocándola en posición vertical sobre papel Whatman.

Segunda dimensión (SDS-PAGE 12%)

1. Colocar la tira de IEF en la parte superior de un gel preformado de SDS-PAGE al 12%, la base de plástico que soporta al gel en la tira de IEF deberá quedar en contacto con el vidrio posterior y el gel dirigido hacia el frente.
2. Utilizando una pipeta pasteur, sellar la tira de IEF con solución reguladora trizma-glicina pH 6.8 o con agarosa 1% como se indica en el paso 7 del apartado de equilibrio.
3. Permitir que el gel solidifique perfectamente (aproximadamente 20 minutos en el caso de solución reguladora Trizma-glicina y aproximadamente 5 minutos en el caso de utilizar agarosa).
4. Montar los vidrios en la cámara de electroforesis y llenar los reservorios con solución de corrida trizma-glicina-SDS 1X, pH 8.3.
5. Iniciar la corrida de segunda dimensión a 100 V constantes por 20 minutos aproximadamente (1/3 de la longitud total del gel), subir el voltaje a 200 V constantes hasta que el frente llegue al margen inferior del gel (aproximadamente 45 minutos).
6. Apagar la fuente de poder.
7. Desconectar la cámara, desmontar los geles y proceder a tinción o a electrotransferencia según sea el caso.

ANEXO 3

Inmunodetección de IgG

Reactivos

Solución de bloqueo. (PBS pH 7.2, leche descremada svelty^{MR} 10%)

PBS 1X pH 7.220 mL

Leche2 gr

Mezclar en vortex. Usar esta solución recién preparada.

PBS-BSA 1%

PBS 1X pH 7.2 10 mL

BSA 0.1 gr

Reactivos para el Sistema de revelado

Solución luminol-H₂O₂

Mezclar un volumen de luminol con un volumen igual de H₂O₂. Para el caso de una membrana de 2DE se requiere un volumen final de 2.5 mL,

para una membrana control de 1D se requieren 200 μ L de dicha mezcla, para un control de dot-blott se requieren 50 μ L.

Solución reveladora fuji

Para preparar 400 mL.

1. A 100 mL de agua agregar 99.8 mL de solución A, mezclar bien.
2. 10.5 mL de solución B, mezclar.
3. Adicionar 10.5 mL de solución C mientras agita.
4. Llevar a un volumen final de 400 mL con agua destilada y mezclar perfectamente (172.2 mL de agua).
5. Guardar en frasco color ambar a temperatura ambiente.

Solución fijadora

Para preparar 400 mL.

1. A 100 mL de agua, agregar 100 mL de solución A y mezclar completamente.
2. Adicionar 15.8 mL de solución B y mezclar bien.
3. Aforar a 400 mL con agua destilada (184.2 mL de agua) y mezclar bien.
4. Guardar en frasco color ambar a temperatura ambiente.

NOTA: Descartar la solución reveladora si esta presenta un color café muy oscuro. Y la solución fijadora se deberá descartar si presenta una coloración evidentemente amarillenta o café.

Reacción antígeno –anticuerpo

1. Bloquear la membrana electrotransferida con solución de bloqueo por una hora, en agitación a 60 rpm.

2. Enjuagar la membrana con 50 ml de PBS 1X pH 7.2.
3. Incubar con un pool de sueros de ratones infectados con *G. lamblia*, diluido 1:25 en solución de PBS-BSA 1% por dos horas en agitación a 60rpm.
4. Lavar por 5 veces con solución de PBS pH 7.2 por 5 minutos, en agitación a 60 rpm cada lavado.
5. Incubar 1 hora con el anticuerpo secundario (anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa) diluido 1:5000 en PBS-BSA1% bajo las mismas condiciones de agitación.
6. Lavar con PBS pH 7.2, 5 veces por 5 minutos cada lavado.
7. Revelar por quimioluminiscencia, de la siguiente manera:

Procedimiento de revelado

1. Eliminar la solución de lavado de las membranas para inmunodetección, colocando estas en forma vertical sobre un papel filtro.
2. Colocar las membranas a revelar sobre plástico adherente y sobre una superficie plana.
3. Adicionar la mezcla de luminol- peróxido de hidrógeno (proporción 1:1), en cantidad suficiente para que cubra la membrana.
4. Dejar reaccionar por 5 minutos.
5. Eliminar el exceso de luminol-peróxido de hidrógeno, colocando la membrana verticalmente sobre un papel filtro.
6. Colocar las membranas sobre otro trozo de plástico adherente y cubrir las membranas con el mismo plástico. Dentro del cassette de revelado. Los siguientes pasos requieren oscuridad.
7. Cortar un trozo de film de acuerdo al tamaño de la membrana a revelar.
8. Colocar el film sobre la membrana.
9. Cerrar el cassette.
10. Dejar reaccionar por 15 minutos.

11. Sacar el film del cassette.
12. sumergir el film en solución reveladora por 10 segundos, escurrir el exceso de solución.
13. Sumergir en agua destilada por 10 segundos, escurrir el exceso de agua.
14. Sumergir en solución fijadora por 10 segundos, escurrir el exceso de solución.
15. Sumergir en agua destilada por 10 segundos y escurrir el exceso de agua.
16. Observar resultados.

ANEXO 4

Digestión con Tripsina de Proteínas en Gel

Soluciones (Deberán prepararse el día de su uso)

NH_4HCO_3 100 mM

NH_4HCO_3 50 mM en Acetonitrilo (ACN) 50%

ACN 50%/ ácido fórmico 2%

DTT 10 mM en NH_4HCO_3 50 mM

Iodoacetamida 55 mM en NH_4HCO_3 50 mM

Tripsina 12.5 ng/ μL en NH_4HCO_3 50 mM.

NOTA IMPORTANTE. Para la preparación de muestras a analizar para espectrometría de masas en muy IMPORTANTE evitar la contaminación con queratinas por lo cual se requiere tener especial cuidado de utilizar guantes, gorro, lentes de protección para laboratorio y cubre bocas y bata durante todo el procesamiento de las muestras desde la obtención del extracto proteico hasta la realización de la digestión proteica.

1. Cortar las manchas proteicas del gel de poliacrilamida previamente teñidas con azul de Coomassie. Triturarla lo más finamente posible mediante el uso de una navaja. Mantener las piezas de gel en suficiente agua ultrapura (grado miliQ)
2. Transferir los trozos de gel a un tubo eppendorf de 1.5 mL y remover el exceso de agua.

3. Lavar con 100 μL de NH_4HCO_3 50 mM, para asegurar que las piezas estén a un pH correcto.
4. Desteñir los geles de la siguiente manera:
 - 4a. Adicionar 200 μL de acetonitrilo 50%/ NH_4HCO_3 50 mM al 50%, vortex e incubar por 10 minutos. Remover el líquido. Las piezas de gel deberán estar claras, si no es así, repetir el paso hasta que sea necesario.
 - 4b. Remover el exceso de líquido, lavar 5 min con 200 μL de acetonitrilo 50%/ NH_4HCO_3 50 mM al 50%, luego 5 minutos con acetonitrilo 100% para deshidratar las piezas de gel. Vortex durante las incubaciones, retire el acetonitrilo en una campana o en speedvac sin calor. Las piezas de gel podrían tornarse blancas y quebradizas.

Reducción y alquilación

1. Para reducir las proteínas, cubrir las piezas de gel con 50 μL de DTT 10 mM en NH_4HCO_3 100 mM, mezclar con vortex e incubar a 56 °C por 45-60 min.
2. Enfriar a temperatura ambiente, remover el DTT y adicionar 50 μL de iodoacetamida 55 mM en NH_4HCO_3 100 mM. Mezclar con vortex e incubar 45 min a temperatura ambiente en oscuridad.
3. Descartar la iodoacetamida.
4. Lavar las piezas con 100 μL de NH_4HCO_3 por 5 minutos mezclando en vortex, luego 2 veces con ACN 50%/ NH_4HCO_3 50 mM por 5 minutos, mezclando en vortex. Deshidratar con 100 μL de ACN.
5. Remover el ACN remanente, y dejar evaporar en el medio ambiente o bajo campana de extracción. Nuevamente las piezas de gel se pueden tornar de color blanco y quebradizas.

Digestión con Tripsina

1. Adicionar 20 μL de solución de tripsina en NH_4HCO_3 50 mM, e incubar 30 min a 4°C .
2. Incubar toda la noche a 37°C .

Extracción de péptidos

1. Transferir el sobrenadante de la solución de digestión a tubos eppendorf de 1.5 mL.
2. Adicionar 30 μL de ACN 50%/ ácido fórmico 2%, incubar 20 minutos, mezclando en vortex. sonicar 5 minutos en baño de agua, sin calor. Remover el sobrenadante y juntar con el digerido anterior. Repetir este paso para completar aproximadamente 100 μL de solución digerida.
3. Reducir el volumen hasta 5-10 μL en speedvac. No permitir que se seque.
4. Centrifugar a 10000 xg por 10 minutos para remover cualquier micropartícula, transferir el sobrenadante a tubos eppendorf de 0.65 mL.
5. Guardar a -30°C , hasta su análisis por espectrometría de masas.

ANEXO 5

Inmunofluorescencia de trofozoítos teñidos con anti-IgG marcada con ficoeritrina

Reactivos

PBS pH 7.2-BSA1%

BSA 1 gr

PBS pH 7.2 (Gibco) cbp 100 mL

Disolver en vortex y mantener en refrigeración 4°C. La solución se deberá preparar el mismo día de su uso.

Azul de tripano en solución 4% (Sigma, T8154).

Goat anti-IgG Mouse-Ficoeritrina (BioSciencie) 1:200 em PBS, pH 7.2-BSA 1%

Paraformaldehído 2%

Procedimiento

1. Colocar un tubo de 13x100 conteniendo el cultivo de *Giardia* en agua-hielo por 15 minutos con el objetivo de despegar los trofozoítos de las paredes del tubo.
2. Centrifugar a 800xg por 10 minutos a 4°C.
3. Retirar el sobrenadante.

4. Lavar los trofozoítos 3 veces con 5 mL de solución de PBS-BSA 1%, mediante centrifugación a 800xg por 5 minutos a 4°C.
5. Descartar el sobrenadante del último lavado y resuspender los trofozoítos en 500 µL de PBS-BSA 1%.
6. Hacer una dilución de una alícuota de las células con azul de tripano (ej. 1:50).
7. Contar el número de células en hemacitómetro.
8. Ajustar el número a 5×10^5 trofozoítos por pozo en microplacas de 96 pozos con fondo en U.
9. Centrifugar a 800 xg, 5 minutos, 4°C y retirar el exceso de solución reguladora.
10. Resuspender las células con 100 µL de los sueros a probar en dilución 1:10 en PBS-BSA 1%. En el caso de los anticuerpos control utilizar 100 µL de sobrenadante de los cultivos del hibridoma 3C10.E5 y como control de medio utilizar 100 µL de medio D5F.
11. Incubar por 1 hora a 4°C (en refrigerador).
12. Lavar por 3 veces, con 200 µL de PBS-BSA 1% y centrifugación a 800xg, 5 minutos, 4°C.
13. Descartar el sobrenadante y resuspender las células con 100 µL de anti-IgG-ficoeritrina en dilución 1:200.
14. Incubar por 1 hora a 4°C y protegido de la luz (cubrir la microplaca con papel aluminio).
15. Lavar 3 veces como en el paso 12.
16. Resuspender las células con 50 µL de PBS-BSA 1% y fijar con 50 µL de paraformaldehído al 2%.
17. Observar al microscopio, primero con el filtro de emisión a 578 nm (luz roja) para localizar la fluorescencia de los trofozoítos, fotodocumentar y posteriormente observar en contraste de fases y fotodocumentar.

