

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Caracterización Inmunoquímica de la Proteína Inmunogénica 5G8 de
Giardia lamblia y Evaluación de su Posible Papel Protector en un
Modelo Gerbil



Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta:

María Alejandra Valdez López

Hermosillo, Sonora

Octubre de 2015

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



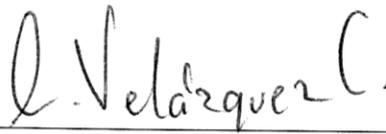
"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



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

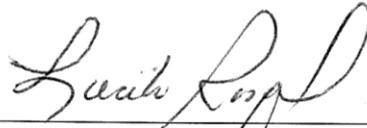
FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de **María Alejandra Valdez López**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.



Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras

Director Académico

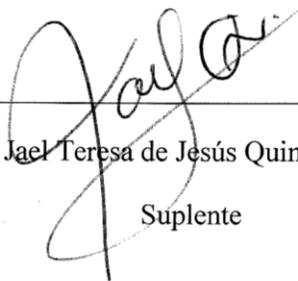


M.C. María Lucila Rascón Durán

Secretario

Dr. Humberto Francisco Astiazarán García

Vocal



Dra. Jael Teresa de Jesús Quintero Vargas

Suplente

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Biología Celular, del Departamento de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad de Sonora, bajo la dirección del Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras; con el financiamiento de CONACyT (proyecto CB-2010-01/155224).

DEDICATORIAS

Primeramente a Dios por estar siempre a mi lado en todos los momentos más difíciles de la vida y darme la fortaleza para continuar día a día para seguir mis sueños siendo mi guía y luz en el camino, brindándome su mano para levantarme en cada caída y lo más importante, el mantener a la toda la gente que amo unida y muy cerca de mí.

A mis padres, que sin ustedes NADA de esto hubiera sido posible, por su infinito amor, comprensión e inmenso apoyo en cada meta que me propongo, por toda su preocupación y una disculpa por tantas ausencias en momentos familiares, que yo sé que ustedes comprenden que el trabajo de laboratorio es de mucha dedicación, responsabilidad y disciplina, pues gracias a ustedes poseo en mí dichos valores tan importantes, y quiero que sepan que son mi más grande motivación para seguir adelante y luchar por mis sueños para ser alguien de quien se sientan orgullosos, los amo con toda mi alma y corazón, créanme que estas palabras se quedan cortas a comparación de todo lo que ustedes significan para mí, y estoy inmensamente agradecida con Dios por haberme dado la oportunidad de tener a estos maravillosos padres, que Dios me los bendiga siempre, les dé salud y sigamos siendo tan unidos como toda la vida, muchas gracias Lourdes e Ignacio.

A mi hermano Carlos y cuñada Roxana, por estar siempre a mi lado en los momentos más difíciles, por ser un apoyo en las enfermedades, tristezas y ser mi compañía en esta ciudad, pues vivir sola y lejos de la familia no es fácil, pero con su cariño y comprensión, todo fue mucho mejor; muchas gracias a los dos.

Alejandra Valdez

AGRADECIMIENTOS

A mi muy querido Dr. Carlos Arturo Velázquez por ser más que un director y maestro, un gran amigo, le agradezco tanto el haberme dado la oportunidad de formar parte de su extraordinario equipo de trabajo, usted siempre tan dispuesto a apoyar a los alumnos con sus inquietudes científicas y verlos crecer académicamente. También, le agradezco de corazón el haber confiado y creído en mí para lograr esta meta, por todas sus enseñanzas, su paciencia, dedicación, tiempo y preocupación. Además, puedo decirle que usted es una de las personas más brillantes que he tenido la dicha de conocer en mi vida y siempre estaré agradecida con Dios por ello. También recordaré con mucho cariño todos los momentos agradables, de numerosas ocurrencias y por supuesto, su motivadora frase: “todo es perfectible”. Que Dios lo bendiga siempre a usted y toda su familia, ¡lo quiero mucho!

A mi querida M.C. Lucila Rascón, no sé cómo expresarle lo agradecida que estoy con usted por todas sus atenciones y el gran apoyo que ha sido para nosotros, siempre está presente para brindar su ayuda con cariño y se ha convertido en mucho más que en una maestra para todos. Siempre con mucho ánimo y una gran sonrisa me enseñó la importancia del respeto y la toma de decisiones, y quiero que sepa que sin usted, el laboratorio jamás sería el mismo, pues mantiene el orden y las cosas funcionando perfectamente, ¿Qué sería de nosotros sin usted? La quiero mucho maestra, gracias por ser tan maravilloso ser humano, Dios la bendiga.

A mi queridísima Dra. Jael Quintero, que a lo largo de estos años que tuve la fortuna de trabajar con usted, nos hemos convertido en grandes amigas. Siempre fue un gran apoyo en cada uno de mis objetivos a cumplir, también recuerdo que fue la primera persona con la que trabajé en el laboratorio, mi primera jefa, gracias por todo su tiempo, dedicación para ayudarme a crecer y su amistad llena de buenos momentos, siempre la recordaré con mucho cariño, que Dios la llene de muchos éxitos como lo merece.

Al Dr. Humberto Astiazarán por ser parte importante de mi comité de tesis y un excelente maestro, también a su equipo de colaboradores del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), especialmente al Laboratorio de Patología Experimental del Departamento de Nutrición por todo el apoyo brindado para llevar a cabo este trabajo.

Al Dr. Ramón Enrique Robles, un agradecimiento muy especial a usted por ser un gran maestro y amigo que estimo demasiado, gracias a usted, como una vez le dije en clase; aprendí el verdadero valor de la bioquímica y logró que en mí se desarrollara una gran fascinación por ella, siempre le estaré muy agradecida por todas sus enseñanzas.

A la M.C. Martha Judith Valdez y su equipo de trabajo por sus atenciones y el apoyo brindado amablemente siempre para el uso de cada uno de los instrumentos e importantes equipos de laboratorio.

A la Universidad de Sonora, a la División de Ciencias Químico Biológicas y de la Salud, al Departamento de Ciencias Químico Biológicas y al Posgrado en Ciencias de la Salud por brindarme el apoyo para realizar mi trabajo de investigación y por los años de educación que me otorgaron.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado en el financiamiento del proyecto y otorgarme una beca para realizar mis estudios.

Al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA), en particular al M.C. Rafael Canett por todo su apoyo en el Bioterio.

A los miembros del laboratorio de cáncer en medicina: Anita, Alejandra, Priscila, Lulú, Jael, etc., por sus atenciones y amabilidad.

A la Q.B. Denia, por el excelente trabajo que desempeña a diario, su gran disponibilidad, apoyo y esa personalidad tan agradable que la caracteriza.

A mis amados amigos del laboratorio: Lulú, Gloria, Brenda, Ana (watiny), Elia, Erika, Thania, Lucía, Jael, Paola, Dorita, Raúl, Víctor, Ramses, Efraín, Samuel, Francisco, David, Karmelita, Mariana, Alex, Isaac, Mario, Sergio, Wences y muchos más, quiero que sepan que cuando llegué a esta ciudad no me imaginé conocer a tan maravillosas personas (aunque algunos no me dejen comer sal jaja), cada uno de ustedes tiene un lugar muy especial en mi corazón y por ustedes el trabajo de laboratorio ha sido una de las mejores experiencias que he vivido, Dios los bendiga a todos y les deseo muchísimo éxito a donde quiera que vayan.

A mis inseparables amigas de Caborca, Kristian y Bliz, que aunque pasen los años nuestra amistad sigue creciendo.

Y a TODA mi familia, le agradezco a Dios por ponerlos en mi camino y por estar a mi lado en cada uno de los momentos de mi vida brindándome todo su amor y apoyo, ¡los amo familia, GRACIAS!

Alejandra Valdez

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
OBJETIVOS	xiii
RESUMEN	xiv
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	4
<i>Giardia lamblia</i>	4
Giardiasis	6
Epidemiología	6
Antígenos de <i>G. lamblia</i>	7
Mecanismos Efectores de la Respuesta Inmune	8
Inmunidad Innata	9
Inmunidad Adquirida	11
Antecedentes del Laboratorio de Inmunología y Biología Celular	11
Generación de Anticuerpos Monoclonales	12
Proteínas Inmunogénicas de <i>G. lamblia</i>	13
MATERIALES Y MÉTODOS	16
Modelo Experimental	16
Cultivo axénico de <i>G. lamblia</i>	16
Obtención del Extracto Proteico	17

Aislamiento de la Proteína Inmunogénica 5G8 de <i>G. lamblia</i>	17
Acoplamiento del Anticuerpo Monoclonal 5G8.B5	18
Infección de <i>Meriones unguiculatus</i> con Trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	
Cepa 5G8 (+)	18
Evaluación de la Capacidad Immunoprotectora del AcMo 5G8.B5	19
Ensayo de Immunoprotección con AcMo 5G8 (<i>Inmunización Pasiva</i>)	19
Separación y Reconocimiento de la Banda Proteica por la Técnica Western Blotting	20
Identificación de Péptidos a Partir del Análisis por Espectrometría de Masas	
ESI-MS/MS	21
Análisis Bioinformático de las Secuencias Identificadas por Espectrometría	
de Masas ESI-MS/MS	21
Evaluación de la Expresión Superficial de la Proteína 5G8 en Trofozoítos de	
<i>G. lamblia</i> por Citometría de Flujo	22
Análisis Estadístico	22
Predicción de Epítopes de Células B y T	24
RESULTADOS	26
Aislamiento de la Proteína Inmunogénica 5G8 de <i>G. lamblia</i>	26
Análisis por Espectrometría de Masas ESI-MS/MS de la Proteína	
Inmunogénica 5G8 de <i>G. lamblia</i>	30
Análisis Bioinformático de la Proteína 5G8 de <i>G. lamblia</i>	30
Evaluación del Papel Protector del AcMo 5G8.B5 en un Modelo de Infección	
Gerbil (<i>Meriones unguiculatus</i>) utilizando trofozoítos de <i>G. lamblia</i> cepa 5G8 (+)	37

Potenciales Epítopes Reconocidos por Linfocitos B y T vía Simulación	
Computacional (<i>In silico</i>)	40
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	53
ANEXOS	64

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Valor de significancia de las comparaciones por parejas de los grupos de experimentación.	39
II.	Predicción de epítopes de células B de la proteína 5G8, por análisis a través de la base de datos IEDB (Immune Epitope Database).	41
III.	Predicción de epítopes de la proteína 5G8, afines a las moléculas del MHC clase II de ratón (haplotipo I-Ak) generados por la base de datos SYFPEITHI.	43

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Ciclo de vida de <i>G. lamblia</i> .	5
2. Reconocimiento de la proteína 5G8 en la superficie de trofozoíto de <i>G. lamblia</i>	23
3. Inmunorreconocimiento de la proteína 5G8 en fracciones cromatográficas.	27
4. Perfil electroforético (SDS-PAGE) de la proteína 5G8 aislada de <i>G. lamblia</i> .	28
5. Inmunorreconocimiento de la proteína 5G8 (banda de ~ 71 kDa) en la mezcla de fracciones positivas (MFP).	29
6. Péptidos identificados a partir de la banda proteica de ~ 71 kDa por espectrometría de masas ESI-MS/MS.	31
7. Perfil electroforético (SDS-PAGE) de la proteína 5G8 aislada de <i>G. lamblia</i> , bajo condiciones reductoras y desnaturalizantes.	33
8. Péptidos identificados a partir de la banda proteica de ~ 71 kDa por espectrometría de masas ESI-MS/MS y su relación a nivel génico.	34
9. Estructura primaria y características de la proteína 5G8.	36
10. Evaluación del papel protector del AcMo 5G8.B5 en un modelo de infección intestinal con <i>G. lamblia</i> .	38
11. Ubicación de los epítopes para células B en la secuencia de aminoácidos de la proteína 5G8.	42
12. Ubicación del epítope de mayor puntaje de afinidad para células T en la secuencia de aminoácidos de la proteína 5G8.	44
13. Ubicación de los epítopes de células B y T en la secuencia de aminoácidos de la proteína 5G8.	44

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar inmunoquímicamente la proteína 5G8 de *G. lamblia* y evaluar su posible efecto inmunoprotector en un modelo gerbil.

Objetivos Específicos

- Caracterizar bioquímicamente la proteína 5G8 de *G. lamblia* por espectrometría de masas.
- Analizar a la proteína 5G8 mediante herramientas bioinformáticas para alineamientos de secuencias, localización en el genoma de *G. lamblia*, transcripción y traducción de secuencias nucleotídicas, estimación de masa molecular de proteínas, modelado de la estructura primaria y predicción de epítopes para linfocitos B y T.
- Evaluar el papel protector de la proteína 5G8 en la colonización y duración de la infección intestinal por *G. lamblia* un modelo gerbil.

RESUMEN

La giardiasis es una de las enfermedades gastrointestinales más frecuentes alrededor del mundo. El agente causal es *G. lamblia*, un parásito que infecta y coloniza el duodeno de los seres humanos, otros mamíferos y algunos ovíparos. México, es un país endémico con prevalencias que varían desde el 5 al 60 % y según el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, en el primer semestre del 2012, Sonora se ubicó en el quinto lugar con 654 casos.

En la actualidad, el tratamiento farmacológico contra la giardiasis tiene algunas limitantes importantes, como ejemplo de ellas son la generación de cepas resistentes y efectos secundarios en el organismo. No se cuenta con una vacuna contra *G. lamblia* en humanos, esto es en gran medida por los limitados conocimientos que se tienen de la respuesta inmune durante la enfermedad. Se han identificado y descrito algunos antígenos inmunogénicos del parásito, sin embargo, muy pocas de estas moléculas han sido estudiadas para conocer su papel protector. El presente trabajo está enfocado en la identificación y caracterización inmunoquímica de la proteína inmunogénica 5G8 de *G. lamblia*, a través de la técnica analítica de espectrometría de masas y el posterior análisis por herramientas bioinformáticas, así como también, la evaluación de su efecto inmunoprotector en un modelo gerbil y la predicción de los potenciales epítopes de activación de linfocitos B y T.

Con el propósito de aislar la proteína 5G8 a partir de un lisado de trofozoítos de *G. lamblia*, se realizó una cromatografía de afinidad. La proteína 5G8 aislada (~ 71 kDa) fue analizada mediante espectrometría de masas. Se identificaron dos proteínas con masas moleculares relativas de ~ 28 kDa y ~ 38 kDa pertenecientes a la familia de Proteínas Variables de Superficie (VSPs), ambas proteínas al ser analizadas por medio de herramientas bioinformáticas para alineamientos de secuencias, se logró comparar e identificar las zonas de homología con otras proteínas, indicando una posible relación de tipo funcional o evolutiva entre ellas. Así mismo, se localizaron ambas proteínas en el genoma de *G. lamblia*, siendo encontradas de forma adyacente compartiendo un sitio en

común. Posteriormente, se generó un constructo de ambas secuencias, el cual fue traducido en un solo producto proteico de una cadena polipeptídica compuesta de 607 aminoácidos y una masa molecular de ~ 61 kDa. Adicionalmente, la proteína 5G8 fue sometida y analizada en condiciones desnaturalizantes y reductoras por medio de un corrimiento electroforético, dando como resultado la presencia de una sola banda en el gel de poliacrilamida, sugiriendo fuertemente que es constituida de una sola cadena polipeptídica.

Por último, se evaluó el papel inmunoprotector del anticuerpo monoclonal (AcMo) 5G8.B5 (anti-5G8) específico para esta proteína, mediante ensayos de infección en un modelo gerbil. La administración del AcMo 5G8.B5 a gerbos infectados, mostró una disminución estadísticamente significativa de la carga parasitaria ($p < 0.05$) con respecto a los grupos de animales control (Grupo uno, tratados con solución reguladora de fosfatos salinos (PBS): $7.21 \times 10^6 \pm 6.11 \times 10^6$ células/mL; Grupo dos, tratados con el AcMo control de isotipo (aBDC.2): $5.99 \times 10^6 \pm 6.80 \times 10^6$ células/mL; Grupo tres, tratados con el AcMo 5G8.B5: $0.84 \times 10^6 \pm 0.20 \times 10^6$ células/mL). Adicionalmente, se realizó la predicción de un epítipo potencial de reconocimiento tanto para la respuesta humoral como la celular, el cual consistió en el traslape de 11 residuos de aminoácidos entre el epítipo No. 5 de células B y el epítipo No. 1 de células T, a partir de un análisis vía simulación computacional (*In silico*) de la proteína 5G8.

En conclusión, nuestros datos sugieren que la proteína 5G8 es una VSP (~ 71 kDa) codificada por un solo gen. Esta proteína puede inducir una respuesta inmune protectora en el modelo gerbil de infección por *G. lamblia*, así como también, el presentar en su secuencia un epítipo potencial de reconocimiento que desencadena una respuesta inmune de tipo humoral y celular, el cual podría considerarse como blanco de futuros estudios.

El presente trabajo, contribuirá en el conocimiento de los posibles mecanismos de protección del organismo, así como en el desarrollo de bases experimentales para la futura caracterización de proteínas con capacidad inmunoprotectora, siendo de gran utilidad en un futuro para el diseño de una vacuna contra este parásito.

INTRODUCCIÓN

G. lamblia, reconocido como el protozoo patógeno intestinal responsable de la giardiasis, una patología que se presenta con manifestaciones clínicas que varían desde la infección asintomática a la enfermedad aguda o crónica asociada con diarrea y mala absorción de nutrientes, afectando principalmente a niños y sujetos inmunocomprometidos. La infección por *G. lamblia* es una de las enfermedades parasitarias más comunes en todo el mundo, principalmente en países en vías de desarrollo (Lujan, 2006, WHO, 1996, SINAVE, 2015). Esta parasitosis posee mayor incidencia en lugares donde el saneamiento es deficiente. Las áreas específicas de alto riesgo reconocido para los viajeros se encuentran en la Unión Soviética, el sudeste y el sur de Asia, África tropical, México y el oeste de América del Sur (Wolfe, 1992). Por lo tanto, es importante implementar nuevas medidas de prevención e higiene para evitar el aumento desmedido de estas cifras.

Este parásito habita en las primeras porciones del intestino delgado, donde el pH es ligeramente alcalino, el cual aumenta en gran medida la capacidad de las sales biliares y los ácidos grasos para inducir la diferenciación de los trofozoítos de *G. lamblia* en quistes resistentes al agua (Gillin y col., 1988; Eckmann y col., 2000). Su ciclo de vida se caracteriza por la existencia de dos formas morfológicamente distintas: trofozoíto y quiste. El trofozoíto mide 12-15 μm de longitud por 5-9 μm de ancho (Ankarklev y col., 2010), posee una superficie dorsal convexa y una superficie plana en la que se encuentra el disco ventral que le facilita la adhesión a la mucosa del intestino delgado. Cuenta con 2 núcleos y 4 pares de flagelos. El quiste es relativamente resistente, lo que permite la supervivencia prolongada en una variedad de condiciones ambientales (Adam, 2001; Keserue y col., 2011) es de forma ovalada, mide aproximadamente 8-14 μm de largo y 7-10 μm de ancho, su superficie es lisa y su pared es doble y altamente resistente. La parte exterior de la pared del quiste está cubierta por una red de filamentos de 7 a 20 nm (Erlandsen y col., 1989; Erlandsen y col., 1990; Johnston y col., 2003; Keserue y col., 2011). Cuatro importantes proteínas se han identificado en la pared exterior del quiste de

masas moleculares alrededor de los 29, 75, 88 y 102 kDa (Erlandsen y col., 1990). El componente de azúcar de la porción externa es predominantemente galactosamina en forma de N-acetilgalactosamina (GalNAc) (Jarroll y col., 1989; Karr y col., 2004). Afirmaciones anteriores de que la pared del quiste está compuesta de quitina (N-acetilglucosamina) han sido refutadas (Adam, 1991).

El quiste constituye la forma infectante de este protozoo, acceden a los hospederos susceptibles al ser ingeridos con el agua de consumo, los alimentos o directamente de persona a persona por contaminación a través de heces fecales. Una vez ingeridos los quistes, el proceso de desenquistamiento se inicia en las primeras porciones del intestino delgado, como resultado aparecen dos nuevos trofozoítos, los cuales son la forma vegetativa que viven y se replican por fisión binaria longitudinal en la mucosa del intestino delgado. En humanos, los efectos clínicos de una infección por *G.lambli*a van desde un portador en estado asintomático hasta un síndrome severo de malabsorción. Los factores que posiblemente contribuyen a la variación en las manifestaciones clínicas pueden ser: La virulencia de la cepa, el número de quistes ingeridos, la edad del hospedero y el estado del sistema inmune en el momento de la infección (Faubert, 2000).

Después de la exposición al fluido biliar, los cambios bruscos de pH entre el estómago y el duodeno y posiblemente, la acción de enzimas digestivas, algunos de los trofozoítos forman quistes en el yeyuno y pasan hacia las heces, lo que permite la terminación del ciclo de transmisión mediante la infección de un nuevo hospedero (Adam, 2001). Existen muchas razones que justifican el desarrollo de una vacuna contra *Giardia*, las tres posiblemente más importantes son las siguientes: Primera, *Giardia* ha sido reconocida como un patógeno oportunista reemergente, que afecta a los grupos de alto riesgo como niños pequeños, ancianos y aquellas personas inmunocomprometidas. Segunda, la giardiasis es una infección debilitante que afecta a miles de personas anualmente, especialmente en países en desarrollo. Tercera, *Giardia* tiene un potencial zoonótico y su principal vía de transmisión es a causa del agua no tratada, la cual se usa

para beber, lavar alimentos y para la higiene personal, especialmente en países en desarrollo donde el acceso al agua pura no está garantizado (Lee y col., 2011).

Actualmente el tratamiento para la giardiasis es utilizando medicamentos cuyos principios activos no son altamente eficaces, como ejemplo encontramos a metronidazol que puede presentar un gran número de efectos secundarios tales como cefalea, náuseas, vértigo, entre otros (Gardner, 2001). También se han registrado cepas de *Giardia* resistentes a dichos medicamentos. Además, es frecuente la re-infección luego del tratamiento debido a que estos individuos no generan mecanismos de defensas eficaces para eliminar el parásito (Lujan, 2006).

Entre los tratamientos para dicha protozoosis se utilizan ampliamente tres antiparasitarios: El metronidazol, tinidazol y la furazolidona (Vázquez y col., 2009). Con base en lo anterior, surge la necesidad de conocer qué tipo de moléculas están presentes en el parásito y cuáles participan en la respuesta inmune de tipo humoral y celular en el hospedero. Lo cual permitirá generar el conocimiento para el desarrollo de una vacuna que elimine por completo la infección de manera segura y no agresiva para el organismo.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Giardia lamblia

G. lamblia es un protozoo eucariote unicelular y flagelado, que comúnmente ocasiona enfermedades de tipo diarreicas en todo el mundo. Se caracteriza por que sus miembros son diplozoicos flagelados que poseen orgánulos pares, entre ellos dos núcleos similares (Samuelson, 2002).

Este parásito coloniza el intestino delgado superior y se adhieren a la superficie del epitelio intestinal mediante un organelo característico llamado disco ventral o de adhesión (Lujan, 2006).

El ciclo de vida de *G. lamblia* alterna entre dos formas morfológicas, el quiste y el trofozoíto (Wolfe, 1992) (Figura 1). El trofozoíto es la forma vegetativa y mide aproximadamente 12-15 μm de longitud por 5-9 μm de ancho (Ankarklev y col., 2010), tiene forma de pera y posee un disco de succión cóncava ventral formado por microtúbulos. El quiste, es la forma infecciosa y mide aproximadamente de 8-14 μm de largo y 7-10 μm de ancho (Johnston y col., 2003; Ali y col., 2003; Keserue y col., 2011) se caracterizan por poseer una rígida pared glicoproteica externa que les permiten sobrevivir inclusive frente a la acción de los desinfectantes más comunes. Otro de los mecanismos de adaptación de este parásito es la variación de los antígenos de superficie que le permite a los trofozoítos evadir la respuesta inmune del hospedero y generar infecciones tanto agudas como crónicas o recurrentes en individuos infectados (Lujan, 2006).

CICLO DE VIDA

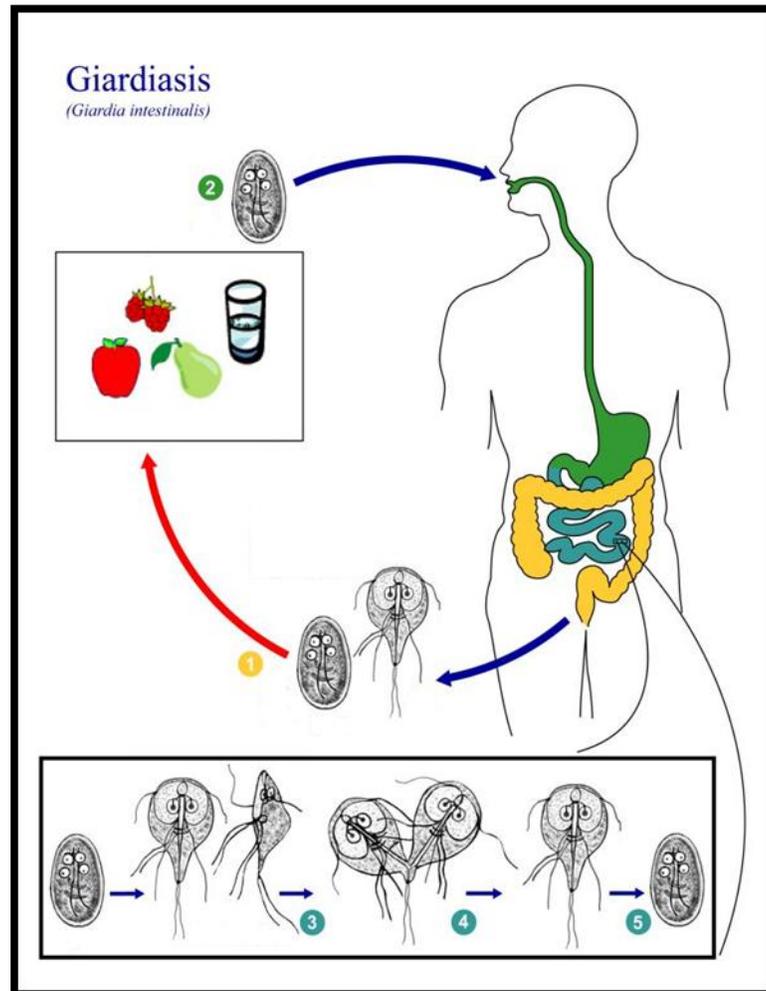


Figura 1. Ciclo de vida de *G. lamblia*. 1.-Expulsión de quistes y trofozoítos a través de las heces, 2.- Ingestión de los quistes de *G. lamblia*, 3.- Desenquistamiento y liberación de los trofozoítos, 3.- Reproducción por fisión binaria longitudinal del trofozoíto, 4.- Colonización del intestino delgado, 5.- Enquistamiento de trofozoítos que serán liberados nuevamente, iniciando el ciclo (Center for Disease Control and Prevention, 2013).

Giardiasis

G. lamblia, es el agente responsable de la giardiasis, una patología que se presenta con manifestaciones clínicas que varían desde la infección asintomática a la enfermedad aguda o crónica asociada con diarrea y mala absorción de nutrientes (Lujan, 2006). Esta infección, ocurre por la ingestión de la forma quística del parásito a través de agua, alimentos contaminados o por contacto directo fecal-oral entre personas (Franco y col., 2001; Marshall y col., 1997). Tan sólo de 10-25 quistes son suficientes para ocasionar la infección por *G. lamblia* (Vesey y col., 1999). Una vez que el parásito llega al estómago, se inicia el proceso de desenquistamiento mediante el estímulo inducido por el pH, ácido y concluye principalmente en la parte alta del intestino delgado (Wolfe, 1992).

Epidemiología

México se reporta como una zona endémica de giardiasis, Según el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) en el primer semestre del 2012, Sonora se ubicó en el quinto lugar con 654 casos, afectando principalmente a niños de entre 1 y 9 años de edad (SINAVE, 2012).

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, podrían interrumpir el ciclo de transmisión de esta parasitosis (Tesis de Maestría; Rascón, 2008). Otra fuente importante de infección por este parásito, son los alimentos contaminados.

Los recursos están disponibles para educar a los consumidores sobre el manejo adecuado, almacenamiento y cocción de los alimentos. El diagnóstico y tratamiento de una enfermedad transmitida por alimentos, se basa en el historial y el examen físico del afectado. Los síntomas comunes de enfermedades transmitidas por alimentos incluyen vómitos, diarrea (con o sin sangre), fiebre, dolores abdominales, cefalea, deshidratación,

mialgias y artralgias. Sin embargo, estos resultados no deben retrasar el tratamiento empírico si se sospecha de una enfermedad transmitida por los alimentos, el tratamiento empírico debe centrarse en el manejo de los síntomas como la rehidratación si el paciente está clínicamente deshidratado. Las enfermedades transmitidas por alimentos deben ser reportados a las agencias locales y estatales de salud (Switaj y col., 2015)

Antígenos de *G. lamblia*

La caracterización molecular de los antígenos de *G. lamblia*, es importante para comprender los mecanismos de patogenicidad del parásito y los mecanismos de defensa del hospedero. Dentro de los antígenos más estudiados se encuentra una familia de proteínas características de *G. lamblia*, conocidas como giardinas, estas se definen como una familia de proteínas estructurales (~ 30 kDa) que se encuentra en forma de pequeñas hebras adjuntas a los microtúbulos en el disco del citoesqueleto de los trofozoítos del parásito, más de una giardina se encuentra presente en los bordes del disco y fueron nombradas como α 1- giardina, α 2- giardina y γ -giardina. El interés en las proteínas giardinas como antígeno principal en la respuesta inmune hacia *Giardia*, se basa en el hecho de ser únicas de este parásito, sin embargo, no se han reportado estudios del papel de estas proteínas en la inmunidad en la giardiasis (Faubert, 2000). Las α -giardinas forman una amplia clase de proteínas codificadas por 21 genes diferentes (denominados α -1 a α -19). Estos 21 genes en la cepa WB, se encontraron conservados en la cepa GS. (Steuart y col., 2008; Feliziani y col., 2011).

Para sobrevivir dentro del hospedador y evadir la respuesta inmune, este parásito manifiesta lo que se conoce como variación antigénica. Los trofozoítos expresan una determinada proteína de superficie que forma una verdadera interfaz entre el parásito y el medio, la cual pertenece a una familia de proteínas denominadas proteínas variables de superficie (*Variant-Specific Surface Protein*, VSPs) (Gillin y col. 1990; Mowatt y col., 1991). 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 (Faubert, 2000; Biez y col.,

2001). Es probable que la variación antigénica participe en la determinación del espectro clínico de la giardiasis y la capacidad de los trofozoítos para reinfectar al hospedero, el cual debe ser capaz de prevenir la infección mediante el desarrollo de respuestas inmunes específicas de forma simultánea a todas las moléculas variables de superficie. Por lo que una desregulación de la variación antigénica podría ser útil en la generación de vacunas eficaces (Svård y col., 1998; Rivero y col., 2010).

Las VSPs son escasamente glicosiladas (Papanastasiou y col., 1997a) ricas en cisteína, con pesos moleculares documentados de 22,3 kDa a más de 200 kDa. El contenido de cisteína es generalmente cerca del 11 al 12 % comúnmente encontrado en los motivos CXXC (Nash, 2002). En las VSPs, la secuencia del N-terminal es variable, pero los 27 aminoácidos del C-terminal (que consiste en una cola hidrofóbica) incluyendo la región que atraviesa la membrana citoplasmática son altamente conservados (Mowatt y col., 1991), finalizados por una cadena invariable de cinco aminoácidos hidrofílicos CRGKA.

Son varios los antígenos de *G. lamblia* en los que se ha demostrado su inmunorreactividad, dando como resultado la producción de anticuerpos anti-*Giardia* de los isotipos IgA, IgM e IgG en las secreciones mucosas y suero. Dicha producción de anticuerpos específicos está relacionado con el aclaramiento de este parásito (Faubert, 2000; Nash y col., 1987; Heyworth, 1989; Daniels y col., 1994; Snider y col., 1986).

Mecanismos Efectores de la Respuesta Inmune

Usualmente la giardiasis es una infección autolimitada en donde alrededor del 85 % de los casos, desaparece en 2 a 4 semanas, lo cual indica que existen mecanismos de defensa efectivos en el hospedero contra este parásito (Eckmann y col., 2000; Ankarklev y col., 2010). Varias citocinas poseen funciones sobrepuestas en la regulación de la respuesta inmune innata y adaptativa. Las citocinas IL-6 e IL-17 desempeñan un papel importante durante la infección (Lopez-Romero y col., 2015).

La respuesta inmunológica humoral es un mecanismo especializado para la eliminación de microorganismos extracelulares y moléculas antigénicas. *G. lamblia*, al colonizar el duodeno, se producen inmunoglobulinas del tipo IgA. Sin embargo, aun tratándose de un parásito no invasivo, este es capaz de inducir una respuesta sistémica mediante la producción de anticuerpos tipo IgG e IgM generados por linfocitos B, los cuales se ha evidenciado que en conjunto con las células T CD4 + y la liberación de citocinas incluyendo IL-6, TNF- α , IFN- γ e IL-4, son fundamentales para el proceso de aclaramiento de la giardiasis en el hospedador (Singer y col., 2000; Kamda y col., 2012; Jimenez y col., 2014).

Se sugiere que las células T CD4 + desempeñan un doble papel durante la respuesta inmune anti-*Giardia*. En primer lugar, activan y estimulan la diferenciación de células B para generar anticuerpos específicos de *Giardia*. En segundo lugar, las células T CD4+ actúan a través de un mecanismo independiente de células B que probablemente es mediado por células Th17 (Lopez-Romero y col., 2015).

Inmunidad Innata

En la primera línea de defensa contra la colonización por patógenos, intervienen los mecanismos de la inmunidad innata, algunos de estos mecanismos incluyen al moco, el peristaltismo, factores citotóxicos, óxido nítrico (NO), microbiota, mastocitos y células dendríticas (DC). Asimismo, las citocinas son consideradas como un tipo de enlace entre la respuesta inmune innata y adaptativa. La IL-6, derivada de las DC, es una citocina importante en la defensa contra la giardiasis que modula la maduración y conmutación de las células B para producir IgA, también media la diferenciación de las células T (Lopez-Romero y col., 2015).

Algunos estudios, muestran que la producción de NO puede contribuir en la defensa del hospedero en contra de *G. lamblia*. Varios donantes de NO, mas no sus componentes base, inhiben el crecimiento del parásito sin afectar la viabilidad, lo que sugiere que el NO actúa como citostático más que como un citotóxico para *G. lamblia* (Eckmann y col., 2000). Adicionalmente, estudios *in vitro* han demostrado que la

infección por *G. lamblia* de células epiteliales de intestino humano, inhibe la producción de NO. Esto ocurre debido a la presencia limitada del sustrato fundamental arginina (aminoácido esencial para la producción de NO), generando como consecuencia, un descenso en la producción de NO. Por lo tanto, el equilibrio entre el consumo de arginina por giardia y la producción de NO epitelial, podría contribuir a la variabilidad en la duración y gravedad de las infecciones por este parásito (Pavanelli y col., 2010).

Durante la infección, los trofozoítos de *G. lamblia* residen en el lumen intestinal y se adhieren al epitelio, pudiendo provocar una leve o nula inflamación en el tejido lo cual indica que los mecanismos de defensa del hospedero actúan localmente (Eckmann, 2003; Lopez-Romero y col., 2015). Los macrófagos han sido identificados como una de las células efectoras en giardiasis humana y animal. Owen y col. en 1981, demostraron que los macrófagos de la mucosa son capaces de ingerir trofozoítos *in vivo*. Esto fue confirmado por Hill & Pohl en 1990, quienes mostraron que trofozoítos de *G. lamblia* fueron ingeridos por macrófagos de placas de Peyer, mejorando la actividad del estallido oxidativo de los macrófagos de la mucosa. También se han reportado varios estudios *in vitro* en los que macrófagos tienen la capacidad de ingerir trofozoítos de *Giardia* y posteriormente eliminarlos mediante mecanismos oxidativos (Smith, 1985; Solaymani-Mohammadi y col., 2010). Adicionalmente, se observó que los macrófagos tratados con interferon-gamma recombinante (IFN- γ) y lipopolisacárido bacteriano (LPS) ingirieron un número significativamente mayor de trofozoítos en crecimiento *in vitro* que los macrófagos no tratados (Belosevic y col. 1992).

Otro mecanismo de defensa ante este parásito consiste en el efecto protector de los anticuerpos anti-*Giardia*, presentes en la leche materna por adquisición a través de la infección con *G. lamblia*. Una diferencia significativa se observa entre los niños nacidos de madres con y sin presencia de anticuerpos respecto a la edad en que fue adquirida la primera infección por el parásito. Los niños nacidos de madres no inmunes están en mayor riesgo de contraer giardiasis y desarrollar síntomas graves en comparación con los hijos de madres inmunes (Tellez y col., 2003).

Inmunidad Adquirida

Si los mecanismos de inmunidad innata no pueden eliminar al patógeno, éste continúa desarrollándose, expresando y liberando antígenos, lo que desencadena la respuesta inmune adaptativa. 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.

El control de la giardiasis por el hospedero, requiere de la respuesta inmune humoral asociada a mucosas y de la respuesta celular, así como también de una respuesta equilibrada de las células T CD4 + antígeno-específicas y de una liberación de citocinas incluyendo IL-4, IL-6, TNF- α e IFN- γ . Adicionalmente, requiere de la producción de anticuerpos IgA o IgG específicos contra los antígenos del parásito (Roxstrom-Lindquist y col., 2006). Se ha demostrado la presencia de anticuerpos IgG e IgM específicos a *G. lamblia* en suero de personas infectadas (Wolfe, 1992; Soliman y col. 1998). Por lo que en aquellos pacientes con hipogammaglobulinemia, cuando los niveles de IgG e IgA se encuentran reducidos, las infecciones se presentan de forma crónica (Soliman y col., 1998; Palm y col., 2003).

Otro efecto letal en los trofozoítos de *G. lamblia*, es dependiente de la vía clásica del complemento en el suero de humano, sin embargo, para conservar dicha capacidad letal, el suero debe contar con un sistema de complemento intacto, decir, sin deficiencias en los componentes que lo integran. Los sueros humanos conteniendo anticuerpos anti-*G. duodenalis*, eliminan a más del 98 % de los parásitos *in vitro* (Hill y col., 1984). Por lo que dichos sueros con anticuerpos de la clase IgM y complemento provocan la lisis de los trofozoítos y por lo tanto, su eliminación (Deguchi y col., 1987).

Antecedentes del Laboratorio de Inmunología y Biología Celular

Una de las líneas de nuestro grupo de trabajo, se ha enfocado en el estudio de la respuesta inmune anti-*G. lamblia*, utilizando un modelo murino (C3H/HeJ) y gerbil

(*Meriones unguiculatus*). Se ha estudiado la identificación y caracterización bioquímica e inmunológica de antígenos inmunodominantes que inducen una respuesta humoral y celular. En el caso de la respuesta inmune humoral, esta se dirigió a un número limitado de proteínas (8 bandas proteicas, de masa molecular relativa: 48, 55, 63, 71, 86, 106, 131 y 149 kDa), dentro de las cuales, cabe destacar las proteínas de ~ 70 kDa y 86 kDa que fueron reconocidas tanto por la respuesta humoral secretora (IgA) como la sistémica (IgG) (Velázquez y col., 2005). En cuanto a la respuesta inmune celular, se identificaron proteínas con masa molecular relativa de 40-64, 65-77 y 90-110 kDa (Astiazarán y col., 2009). Es de resaltar, que tanto la respuesta inmune celular como la humoral fueron activadas por una proteína de ~ 70 kDa (la cual se denominó 5G8).

Estudios de citometría de flujo mostraron que ~ 5 % de la población de trofozoítos expresa la proteína 5G8 en la superficie, mientras que la mayoría de la población de trofozoítos (> 90 %) expresa la proteína en el interior de la célula.

Adicionalmente, se evaluó *in vitro* la capacidad aglutinante del AcMo específico para la proteína 5G8 en trofozoítos de *G. lamblia* (Quintero y col., 2013). Los datos obtenidos sugirieron a la proteína 5G8 como candidato de estudio, la cual podrá contribuir a un mejor entendimiento de la relación *G. lamblia*-hospedero.

Generación de Anticuerpos Monoclonales

Los hibridomas de células B son una herramienta poderosa para la caracterización bioquímica e inmunológica de antígenos, ya que son células inmortales productoras de AcMos que se generan a partir de la fusión de esplenocitos provenientes de ratones (infectados o inmunizados) con células de mieloma, obteniendo finalmente una célula híbrida productora de AcMos. Otra gran utilidad de los AcMos es la distinción de subconjuntos de células B y células T. Este conocimiento es beneficioso no sólo para la investigación básica, sino también en medicina para la identificación de los diferentes tipos de leucemias y linfomas, lo que permite a los médicos adaptar el tratamiento adecuado (Pandey, 2010).

En cuanto al tratamiento de enfermedades autoinmunes, existen estudios donde la administración parenteral del anticuerpo-CD3 induce un efecto inmunomodulador en modelos animales de autoinmunidad (Chatenoud y col. 2007). Así como en seres humanos con diabetes autoinmune (Herold y col., 2002; Keymeulen y col., 2005). Adicionalmente, el AcMo anti-CD3 murino (OKT3) está aprobado como terapia en el rechazo agudo de trasplantes, aunque los efectos secundarios pueden llegar a ser severos (Friend y col., 1999). Nuevos hallazgos han demostrado que la administración por vía oral del AcMo anti-CD3, es seguro y biológicamente activo en los seres humanos, presentando una nueva alternativa para el tratamiento de enfermedades autoinmunes (Ilan y col., 2010).

Previamente en nuestro grupo de investigación, se generaron hibridomas de células B específicos para proteínas de *G. lamblia*, a partir de ratones infectados (C3H/HeJ) con la cepa GS/M-83-H7, que produjeron AcMos, los cuales son específicos hacia una proteína inmunogénica de *G. lamblia* (Astiazarán y col., 2009).

Por otra parte, los estudios realizados utilizando AcMos conjugados con compuestos fluorescentes, ofrecen la capacidad de detectar más rápidamente la presencia de organismos infecciosos en muestras problema. Dicha detección de moléculas de superficie celular marcadas por anticuerpos monoclonales o policlonales conjugados con un fluorocromo, es probablemente la aplicación más utilizada de la citometría de flujo (Dick, 1985; Holmes y col., 2001). La detección de quistes de *G. lamblia* en las heces humanas a través de la técnica con el AcMo fluorescente, puede llegar a ser una herramienta útil. Sin embargo, es importante la comparación de múltiples métodos para el diagnóstico de éste y otros parásitos, con el objetivo de desarrollar un protocolo de laboratorio basado en dicha comparación (Zell y col., 1990; Manser y col., 2013).

Proteínas Inmunogénicas de *G. lamblia*

La identificación de antígenos de *G. duodenalis* que juegan un papel en la inmunidad adquirida ha sido de gran dificultad por varias razones: 1. Usualmente los trofozoítos no

invaden los tejidos (si hay una estimulación del sistema inmunitario, esta permanece localizada), 2. Se ha reportado la existencia de variación antigénica en la membrana superficial de los trofozoítos, 3. Los investigadores han utilizado diferentes cepas de *Giardia*, así como también distintos reactivos de anticuerpos, 4. Por todo lo anterior, es difícil comparar los resultados obtenidos entre los diferentes laboratorios de investigación (Faubert, 2000). Algunos autores han identificado proteínas inmunogénicas de *G. lamblia*, las cuales son reconocidas durante la respuesta inmune sistémica y humoral en humanos y ratones infectados con trofozoítos de *G. lamblia*. (Palm y col., 2003; Gottstein y col. 1990; Nash, 1990).

Con base en lo anterior, la identificación de proteínas inmunogénicas de *G. lamblia* que induzcan una respuesta inmunológica humoral, así como una respuesta inmune celular, ha sido uno de los objetivos primordiales de investigación, pues dichos conocimientos son la clave para el desarrollo de vacunas (Quintero y col., 2013). Se ha descrito que en el modelo murino adulto (C3H/HeJ), durante la giardiasis, se muestran elevaciones en los niveles de anticuerpos intestinales (IgA) y séricos (IgG) específicos para proteínas de *G. lamblia* en la infección primaria y secundaria, en donde fueron observadas diferencias en la respuesta de ambos tipos de anticuerpos, lo cual podría deberse a una gran variedad de factores tanto del hospedero como del parásito, tales como la naturaleza y capacidad inmunogénica de los antígenos a inducir una respuesta inmune y la variación antigénica, etc. Sin embargo, la carga parasitaria de los ratones infectados decrece considerablemente, lo cual indica que la respuesta de anticuerpos juega un papel importante para el aclaramiento de la infección por *G. lamblia* (Velázquez y col., 2005).

La caracterización de los antígenos de *Giardia* es importante para comprender los mecanismos de patogenicidad del parásito y defensa del hospedero. En este contexto, varios investigadores se han dado a la tarea de identificar antígenos capaces de inducir respuestas inmunes específicas contra el parásito. Los más ampliamente caracterizados son las proteínas VSPs, las cuales pueden verse afectadas en su expresión por la respuesta inmune adaptativa y otros factores (Ankarklev y col., 2010). Se ha reportado

también la identificación de antígenos no variables. (Einfeld y Stibbs 1984; Moss y col., 1990; Farthing, 1992; Palm y col., 2003). Otras proteínas inmunogénicas como las de choque térmico (HSP, Heat Shock Protein), las cuales se liberan en respuesta a estrés por cambios bruscos de temperatura y pH como ocurre en estomago e intestino delgado. Dentro de esta clasificación de proteínas se encuentra el grupo de las HSP70, es una familia compleja y conservada de proteínas constitutivas y reguladas, funcionalmente distintas del grupo HSP60 (Reiner y col., 1992).

La familia HSP70 incluye proteínas constitutivamente sintetizadas y de estrés regulado con diversas localizaciones celulares (Schlesinger, 1990). Estas HSP generalmente funcionan como chaperonas moleculares, uniendo a proteínas recién sintetizadas o dañadas en su forma desplegada y permitiendo su importación en compartimentos celulares membranosos como las mitocondrias, cloroplastos, retículo endoplasmático, y lisosomas (Reiner y col., 1992).

Algunas de las proteínas descritas se encuentran relacionadas en diversos procesos dentro de la biología de *Giardia*, como lo son las α -1 giardinas, 7 giardinas, β -giardina, α y β -tubulina, localizándose en el citoesqueleto y flagelos (Adam, 2001; Abdul-Wahid y Faubert, 2004; Tellez y col., 2003).

El estudio y caracterización de las proteínas inmunogénicas de *G. lamblia*, representan una herramienta muy importante para el conocimiento de los mecanismos implicados tanto en la patogenicidad del parásito como en la respuesta del hospedero, por lo que el presente trabajo está enfocado específicamente en la caracterización de una proteína altamente inmunogénica de ~ 71 kDa denominada 5G8, así como también, en la evaluación de su capacidad inmunoprotectora a través de un modelo *in vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo Experimental

Se utilizaron gerbos (*Meriones unguiculatus*) de 8 a 14 semanas de edad, estos fueron adquiridos a través del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV). Los animales fueron mantenidos en el Bioterio del Departamento de Investigaciones de Posgrado en Alimentación de la Universidad de Sonora (DIPA), con fotoperíodos de 12 horas a 25 °C, acceso a agua y alimentación *ad libitum*, con una dieta comercial para roedores (2018S de Teklad global diets 18 % protein Rodent diet sterilizable). Todos los procedimientos se llevaron a cabo bajo los términos y condiciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, concerniente al sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres.

La selección de esta especie se basó en estudios previos que reportan una mayor susceptibilidad a la infección intestinal por *G. lamblia* en este modelo (Belosevic y col., 1983).

Cultivo Axénico de *G. lamblia*

Se utilizaron cultivos axénicos de trofozoítos de la cepa de *G. lamblia* clona GS/M-83-H7, obtenidos de American Type Culture Collection (ATCC), los cuales fueron cultivados en medio TYI-S-33, suplementado con 10 % de suero de ternera recién nacida (MICROLAB, LOT. M-8397) y 100 µg/mL de ceftriaxona (AMSA, Laboratorios, solución inyectable, 1G/1M/3.5mL) e incubados a 37 °C (L-C Incubator, Barnstead, Lab-Line) en condiciones microaerofílicas. Adicionalmente, bajo las mismas condiciones, se utilizó la cepa enriquecida por la técnica de inmunoadsorción (Anexo 10) a partir de la clona GS/M-83-H7, denominada 5G8 (+).

Obtención del Extracto Proteico

El extracto proteico soluble de *G. lamblia*, se obtuvo a partir de cultivos confluentes y axénicos cultivados e incubados a 37 °C (L-C Incubator, Barnstead, Lab-Line) los cuales fueron desprendidos de un frasco de 500 mL, en agua-hielo por 20 minutos. Después, los trofozoítos fueron lavados por 2 ocasiones con solución reguladora de fosfatos salinos (PBS), pH 7.2, bajo las condiciones de 800 g, 4 °C, por 5 minutos. Una vez contenidos los trofozoítos en una pastilla, se resuspendieron en 700 µL de PBS y se agregaron 5 µL de una solución de inhibidores de proteasas [4-(2-aminoetil) fluoruro benceno sulfonilo (AEBSF)] 23 mM, pepstatina A 0.3 mM, E-64 0.3 mM, bestatina 2 mM, y EDTA sódico 100 mM (Sigma, St. Louis, MO, USA), después fueron sometidos a 3 ciclos de congelación y descongelación en un congelador (Thermo Fisher Scientific) a -80 °C y temperatura ambiente respetivamente. Acto seguido, la muestra se sonicó (Brandon Sonifier 250, Shelton, CT, USA) por 3 ciclos de 20 segundos, a una amplitud de 10 % manteniendo el recipiente con el lisado de trofozoítos frío durante el sonicado, pues la muestra tiende a calentarse en el proceso. Finalmente el detrito fue removido por centrifugación bajo las condiciones de 10 000 g, a 4 °C por 20 minutos. El sobrenadante conteniendo la muestra proteica solubilizada, se cuantificó por el método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y se almacenó a -80 °C hasta su uso. (Gottstein y col., 1990).

Aislamiento de la Proteína Inmunogénica 5G8 de *G. lamblia*

El aislamiento de la proteína 5G8 fue llevado a cabo por medio de una columna cromatográfica de afinidad, en la cual se acopló el AcMo 5G8.B5 a esferas de sefarosa 4B (Sigma, Cyanogen Bromide Activated Sepharose 4B) y partiendo de un lisado de aproximadamente 670 millones de trofozoítos de *G. lamblia*, 5G8 (+), del cual se obtuvieron 16 mg absolutos de proteína, dicho lisado se pasó 3 veces a través de la columna cromatográfica (12 gotas por minuto, 4 °C), después fueron recolectadas las fracciones eluidas por cambios de pH, utilizando 416 µL de glicina 0.1 M (pH 2.5) y en tubos Eppendorf conteniendo 83.4 µL de Trizma 1 M (pH 8.0) lo cual generó un total de

10 fracciones que fueron evaluadas por dot blotting (utilizando el AcMo 5G8.B5) con la finalidad de conocer aquellas que contenían la proteína 5G8 (Tesis de licenciatura, Cisneros-Romero, Glaus-Garzón, 2008).

Acoplamiento del Anticuerpo Monoclonal 5G8.B5

Para lograr el acoplamiento eficiente del AcMo 5G8.B5 a las esferas de sefarosa, primeramente, se hidrataron con HCl 1 mM por 15 minutos a temperatura ambiente. Después, dichas esferas fueron lavadas con aproximadamente un litro de HCl 1 mM y con solución reguladora de acoplamiento. Al terminar los lavados, las esferas fueron transferidas a una solución que contiene al AcMo 5G8.B5 y se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente, con movimiento constante para permitir la unión covalente del anticuerpo a las esferas de sefarosa. A continuación, se recuperaron las esferas en un embudo de vidrio sinterizado y el líquido eluido fue analizado en un espectrofotómetro (o cuantificado por técnica de Bradford) a una DO_{280nm} con la finalidad de conocer el rendimiento del acoplamiento del anticuerpo. Enseguida, se transfirieron las esferas a otro tubo cónico que contenía glicina 0.2 M, pH 8.0, esto para bloquear cualquier sitio no reactivo en la sefarosa. Se mantuvo en incubación por dos horas a temperatura ambiente en movimiento constante. Por último, las esferas fueron lavadas con solución reguladora de acoplamiento y de $CH_3COONa-NaCl$ (pH 4.2) de manera alternada y con PBS 0.02 % de azida de sodio. (Tesis de licenciatura, Cisneros-Romero, Glaus-Garzón, 2008).

Infección de *Meriones unguiculatus* con Trofozoítos de *G. lamblia* Cepa 5G8 (+)

Para evaluar el establecimiento de la giardiasis en el modelo de infección elegido, se formaron dos grupos de tres gerbiles cada uno. Al grupo 1, considerado grupo control negativo, se le proporcionaron 200 μ L de PBS, pH 7.2, y al grupo 2 se le administraron 5×10^6 de trofozoítos de *G. lamblia*, 5G8 (+) resuspendidos en 200 μ L de PBS estéril a un pH 7.2. Después de 7 días, los gerbiles fueron sacrificados y se diseccionaron 10 cm

de la parte alta de intestino (duodeno), a este fragmento del intestino se le realizó un corte longitudinal y se efectuó un ligero lavado con medio de cultivo para *G. lamblia*, después se recolectó e incubó en tubos de vidrio de 2 mL en agitación constante por una hora a 4 °C. Posteriormente, el tejido fue retirado y el medio fue centrifugado a las condiciones de 800 g a 4 °C, por 5 minutos. Finalmente, se realizó el conteo celular de los trofozoítos presentes en el precipitado por microscopía óptica utilizando una cámara de Neubauer.

Evaluación de la Capacidad Inmunoprotectora del AcMo 5G8.B5

Para analizar la respuesta protectora generada de forma indirecta por la proteína inmunogénica 5G8 de *G. lamblia*, mediante la evaluación de la capacidad protectora del AcMo 5G8.B5 por inmunización pasiva, se formaron 3 grupos compuestos de 4 gerbiles cada uno, los cuales primeramente, fueron inoculados con una cantidad de 1×10^6 de trofozoítos de *G. lamblia*, en un tiempo determinado, para posteriormente recibir un tratamiento específico.

Ensayo de Inmunoprotección con AcMo 5G8 (Inmunización Pasiva)

Al grupo 1 se le administraron 200 µL de PBS. Al grupo 2 se le suministraron 100 µg del AcMo irrelevante aBDC.2, utilizado como control de isotipo (Kanagawa y col., 2002) resuspendidos en 200 µL de PBS, ambos grupos considerados como controles negativos. Por último, al grupo 3 se le administraron 100 µg de AcMo 5G8.B5 resuspendidos en 200 µL de PBS. Dos horas después, se inocularon los tres grupos con 1×10^6 trofozoítos de *G. lamblia* 5G8 (+), resuspendidos en 200 µL de PBS estéril a un pH 7.2. Posteriormente, a los días 1, 3 y 5 se reforzó cada tratamiento y en la misma cantidad tanto de PBS (grupo 1) como de AcMos (grupos 2 y 3) suministrada inicialmente. A los 7 días después, los gerbiles fueron sacrificados y se evaluó la carga parasitaria de la parte alta del intestino delgado (duodeno) diseccionando 10 cm de este, realizando cortes longitudinales, posteriormente, se adicionó 1 mL de medio de cultivo TYI-S-33 frío para lavar suavemente los cortes de intestino, después, se incubó por 1

hora a 4 °C en agitación, llevando lo anterior a un volumen final de 2 mL de medio de cultivo en un tubo de vidrio con tapa de rosca. Por último, el contenido de los frascos se centrifugó a 800 g, 4 °C por 7 minutos, se descartó el sobrenadante y se contaron los trofozoítos encontrados en el precipitado utilizando cámara de Neubauer.

Separación y Reconocimiento de la Banda Proteica por la Técnica Western Blotting

Antes de procesar y analizar una muestra por espectrometría de masas, es indispensable conocer con exactitud en cuál banda (en un gel SDS-PAGE) se encuentra la proteína a ser secuenciada. Para esto, se llevó a cabo la técnica de western blotting.

Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE a 12 % y transferidas a una membrana de nitrocelulosa en un sistema semi-seco de electrotransferencia a corriente constante (Modelo No. Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell, No. de serie 221BR 51543, 50W, 25 VDC). Enseguida, dichas proteínas transferidas fueron teñidas con rojo de Ponceau por 10 minutos con el propósito de observar el patrón de bandas, indicando una transferencia eficiente. Después de desteñir la membrana con agua al flujo directo, esta fue bloqueada con una solución de PBS al 5 % de leche en polvo Svelty libre de grasas, por una hora. Posteriormente, se realizaron lavados con PBS hasta quitar completamente los residuos de la solución de bloqueo, después la membrana de nitrocelulosa fue incubada con el AcMo 5G8.B5 por una hora a temperatura ambiente y en movimiento constante. A continuación, se realizaron 5 lavados de 5 minutos con PBS. Al terminar, la membrana fue incubada con anticuerpo anti- IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano (diluido 1:7500 con PBS-0.1 % ABS) (ABS, albúmina bovina sérica) (Sigma, St. Louis MO, USA), por una hora a temperatura ambiente en movimiento constante. Después se lavó nuevamente la membrana con PBS (5 lavados de 5 minutos) y se le agregó una mezcla 1:1 de luminol y peróxido de hidrógeno (Super Signal, West Pico Signal Chemiluminescent, Thermo scientific 34080) por 10 minutos a temperatura ambiente y se procedió a revelar la reacción antígeno-anticuerpo por quimioluminiscencia, utilizando soluciones reveladoras y fijadoras.

Identificación de Péptidos a Partir del Análisis por Espectrometría de Masas ESI-MS/MS

Espectrometría de masas (EM) es una técnica analítica que provee información cualitativa (estructura, secuencia de aminoácidos) y cuantitativa (masa molecular o concentración) acerca de una muestra. El análisis de EM se llevó a cabo utilizando un sistema de HPLC Microbore (Surveyor, Thermo, San Jose, CA), y un ESI-MS/MS (Electrospray tandem mass spectrometer) LCQ Deca (Finnigan, San Jose, CA). Las muestras fueron introducidas a la columna analítica utilizando un inyector automático Surveyor (Topógrafo, Thermo, San Jose, CA), el eluyente de la columna de HPLC fue directamente sometido a la fuente de ionización de electrospray de un espectrómetro de masas Thermo LCQ Deca con trampa de iones.

Los datos de MS/MS fueron analizados utilizando el sistema computarizado SEQUEST (Bioworks 3.1, Thermo) (Tesis de Doctorado; Quintero, 2013).

Análisis Bioinformático de las Secuencias Identificadas por Espectrometría de Masas ESI-MS/MS

Para llevar a cabo el análisis bioinformático de los resultados generados por espectrometría de masas, se utilizaron algunas bases de datos y algoritmos en los que se realizaron comparaciones tanto de las secuencias individuales (~ 28 y 38 kDa) como del constructo denominado 5G8.

Algunos ejemplos de los procesos realizados fueron los siguientes: Alineamientos de secuencias, BLASTn (secuencia de nucleótidos), BLASTp (secuencia de aminoácidos), localización dentro del genoma de *G. lamblia*, transcripción y traducción de secuencias nucleotídicas, estimación de masa molecular de proteínas, modelado de la estructura primaria, ubicación de motivos y dominios, predicción de epítopes para linfocitos B y T, etc.

1. <http://giardiadb.org/giardiadb/>
2. <http://www.uniprot.org/>
3. <http://www.expasy.org/>
4. <http://wlab.ethz.ch/protter/start/>
5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
6. <http://tools.immuneepitope.org/bcell/>
7. <http://www.iedb.org/>
8. www.syfpeithi.de

Evaluación de la Expresión Superficial de la Proteína 5G8 en Trofozoítos de *G. lamblia* por Citometría de Flujo

Para analizar el patrón de expresión de la proteína 5G8 superficialmente, se utilizaron cultivos confluentes de *G. lamblia*, los cuales se desprendieron utilizando agua-hielo por 10 minutos, después se realizó el conteo de los trofozoítos ajustando a una cantidad de 5×10^5 células por pozo en una placa de fondo cónico. Posteriormente, se llevaron a cabo 2 lavados con PBS a centrifugaciones de 800 g, 4 °C por 5 minutos. Después, se incubaron los trofozoítos con el AcMo 5G8.B5 (1 µg/mL) por 1 hora a 4 °C. Al terminar la incubación, se realizaron 2 lavados con PBS (800 g, 4 °C por 5 minutos) y se incubaron con el anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a isocianato de fluoresceína (FITC) diluido 1:200 con 0.05 % de NaN₃-D5F por 1 hora a 4 °C, en total oscuridad. Finalmente, las células fueron lavadas 2 veces con PBS y resuspendidas en 200 µL de D5F al 0.05 % de NaN₃. Posteriormente se fijaron con 200 µL de paraformaldehído al 2 % filtrado. El análisis fue realizado por citómetro de flujo (Canto II FACS, Becton Dickinson, CA, USA) (Figura 2).

Análisis Estadístico

El análisis de los datos resultantes por conteo de la carga parasitaria en cada grupo de gerbiles (Grupo 1: PBS, Grupo 2: AcMo C.I. aBDC.2 y Grupo 3: AcMo 5G8.B5) se llevó a cabo, según la naturaleza de los datos, por medio de la prueba no paramétrica

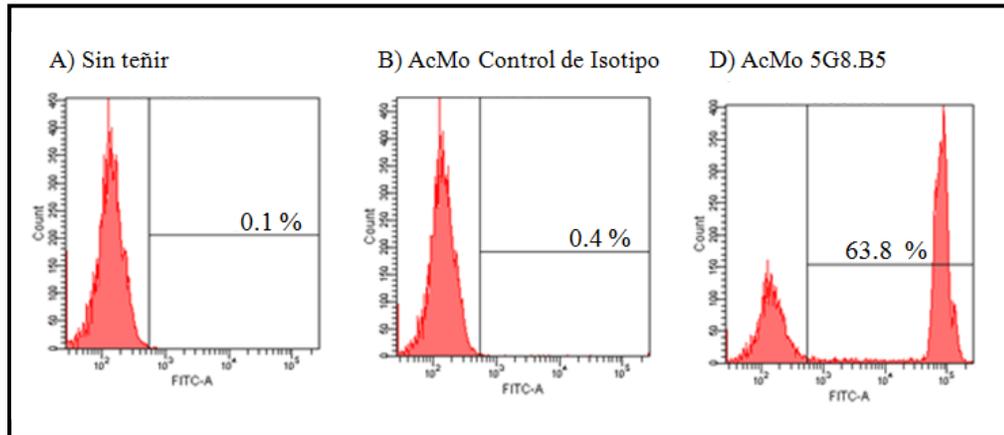


Figura 2.- Reconocimiento de la proteína 5G8 en la superficie de trofozoíto de *G. lamblia*. Análisis de citometría de flujo utilizando trofozoítos de la cepa 5G8 (+). A) Fluorescencia basal de la población de interés. B) Control de isotipo aBDC.2 (IgG2b). C) Reconocimiento por el AcMo 5G8.B5 (IgG2b).

Kruskal-Wallis, la cual consiste en un diseño donde se encuentra una variable independiente o antecedente, de tipo cualitativo nominal con más de 2 modalidades; dichas modalidades definen la existencia de los grupos de valores que, por ser parte de varios conjuntos distintos de individuos, se denominan grupos independientes. Por otra parte, se encuentra una variable dependiente o consecuente, de tipo cuantitativo continuo con distribución no semejante a la de la curva normal o de tipo cuantitativo discreto (Valenzuela, 2006).

El análisis fue realizado por el programa estadístico IBM[®] SPSS[®] Statistics Version 21.

Predicción de Epítopes de Células B y T

Con el fin de obtener una predicción de los posibles epítopes de células B, se basó principalmente en las propiedades de los aminoácidos que los conforman. Por lo tanto, la secuencia de la proteína 5G8 de *G. lamblia* fue analizada con base en el algoritmo “Bepipred” para epítopes lineales, el cual combina los métodos descritos por 3 autores: Markov, basado en la predicción de la localización de los residuos del epítope según el ambiente en el que se encuentren y dependiendo de sus residuos vecinos (Larsen y col., 2006); Levitt, basado en la predicción de la estructura secundaria de la región que conforma el epítope, dependiendo de la naturaleza de sus residuos (Levitt, 1978); Parker, en este método se construyó la escala hidrofílica basada en los tiempos de retención del péptido durante la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en una columna de fase inversa (Parker y col., 1986). Dicho algoritmo fue empleado utilizando la base de datos “Immune Epitope Database” (IEDB) (<http://tools.immuneepitope.org/bcell/>), donde se obtuvo el promedio de los puntajes de cada aminoácido en conjunto correspondientes a los epítopes con una longitud mayor a 5 residuos, los cuales pueden ser reconocidos por la región variable de la molécula de anticuerpo (McLennan y col. 2012) tomando posteriormente los epítopes de mayor puntaje con respecto al valor del umbral (valor de 1).

Para analizar los posibles epítopes de células T, se realizó una predicción sometiendo la secuencia de la proteína 5G8 a la base de datos SYFPEITHI (www.syfpeithi.de). La predicción se basa en las características químicas de las cadenas residuales de los aminoácidos que constituyen los epítopes generados y el algoritmo califica los aminoácidos que tienen mayor afinidad al surco de unión a péptidos del MHC clase II (haplotipo I-A^k). Los ligandos predichos para el haplotipo I-A^k por SYFPEITHI, tienen una longitud de 15 aminoácidos, donde los 3 aminoácidos amino-terminal y 3 aminoácidos carboxilo-terminal, representan los residuos que flanquean el surco y los nueve aminoácidos centrales representan el nonúmero de unión al surco del MHC clase II.

RESULTADOS

Aislamiento de la Proteína Inmunogénica 5G8 de *G. lamblia*

Con la finalidad de aislar la proteína inmunogénica 5G8 a partir de un lisado de trofozoítos de *G. lamblia*, se realizó una cromatografía de afinidad utilizando el anticuerpo monoclonal 5G8.B5. De las fracciones recolectadas por cromatografía de afinidad, se identificaron aquellas que contenían la proteína 5G8 mediante ensayos de dot-blotting. El proceso de aislamiento de la proteína 5G8, fue realizado mediante la recolección de fracciones cromatográficas en tres ocasiones consecutivas [recolección 1 (R1), recolección 2 (R2) y recolección 3 (R3)].

En la primera recolección (R1), la proteína 5G8 fue identificada en las fracciones 2, 3 y 4 (F2, F3 y F4). De igual manera se encontraron positivas las fracciones F3, F4 y F5 de la segunda recolección (R2) y finalmente, en la F3 y F4 de la tercera recolección (R3) (Figura 3A). Se utilizó el AcMo aBDC.2 (IgG2b) como un control de isotipo, el cual al ser incubado con las fracciones obtenidas, no mostró un reconocimiento hacia la proteína 5G8 contenida en éstas. (Figura 3B).

Las fracciones que resultaron positivas para la proteína 5G8 fueron agrupadas en una sola, para su subsecuente análisis por SDS-PAGE y western blotting con la finalidad de comprobar la pureza y el aislamiento específico de la proteína de interés en la muestra obtenida. Únicamente una banda proteica de ~ 71 kDa fue identificada en el gel de poliacrilamida (Figura 4) y reconocida por el AcMo 5G8.B5 (Figura 5, A2). Esta banda proteica fue extraída del gel y procesada para su posterior análisis por espectrometría de masas.

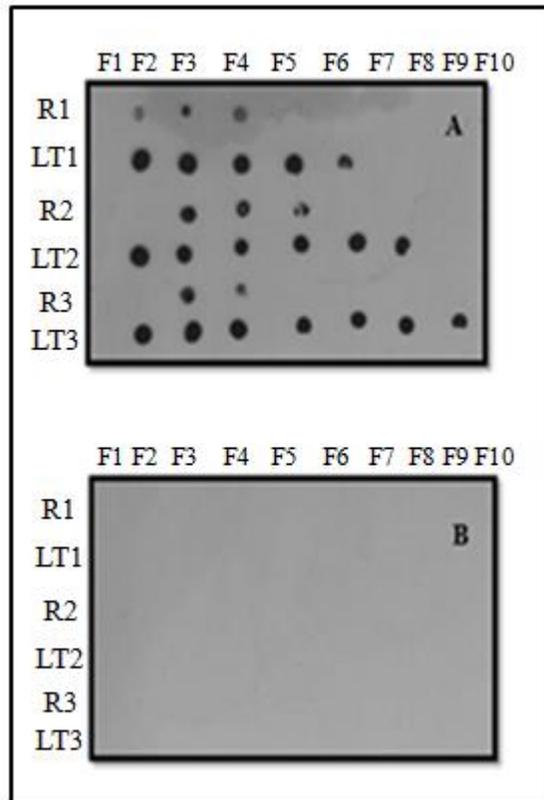


Figura 3. Inmunorreconocimiento de la proteína 5G8 en fracciones cromatográficas. **Panel A**, fracciones reconocidas por el AcMo 5G8.B5 (IgG2b, 1 μ g/mL). **Panel B**, control negativo, fracciones incubadas con el AcMo control de isotipo aBDC.2 (IgG2b, 1 μ g/mL). F: Fracciones eluídas (1 μ L de muestra por cada punto); R: Recolección del lisado de trofozoítos; LT: Lisado de trofozoítos, como control de cada fracción eluída (2 μ g por punto).

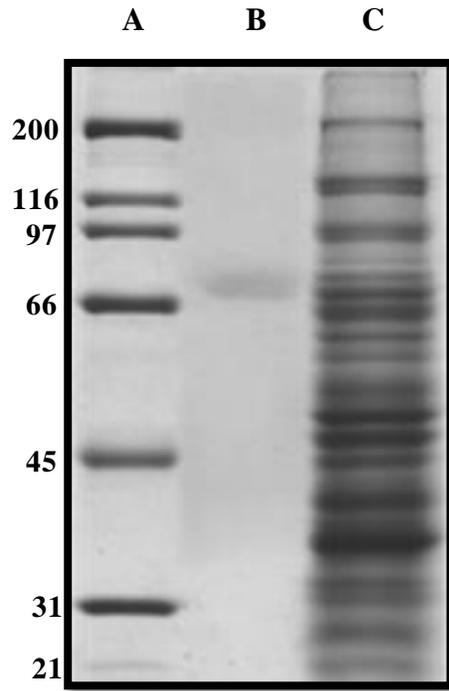


Figura 4. Perfil Electroforético (SDS-PAGE) de la proteína 5G8 de *G. lamblia*. El carril A corresponde al marcador de peso molecular, el carril B a la proteína 5G8 aislada y en el carril C el lisado de trofozoítos de *G. lamblia* 5G8 (+).

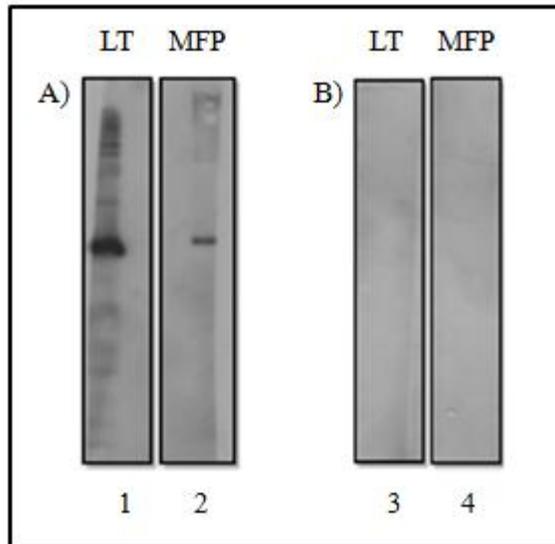


Figura 5. Inmunorreconocimiento de la proteína 5G8 (banda de ~ 71 kDa) en la mezcla de fracciones positivas (MFP). **A1.** Reconocimiento por el AcMo 5G8.B5 en el lisado de trofozoítos de *G. lamblia*. **A2.** Reconocimiento de banda única por el AcMo 5G8.B5 (IgG2b, 1 µg/mL) en la mezcla de fracciones positivas. **B-3** y **B-4.** Controles negativos, lisado de trofozoítos y mezcla de fracciones positivas incubadas con el AcMo control de isotipo aBDC.2 (IgG2b, 1 µg/mL) respectivamente. LT: Lisado de trofozoítos; MFP: Mezcla de fracciones positivas.

Análisis por Espectrometría de Masas ESI-MS/MS de la Proteína Inmunogénica 5G8 de *G. lamblia*

Con el fin de identificar la proteína inmunogénica 5G8 de *G. lamblia*, se utilizó espectrometría de masas. La banda proteica de ~ 71 kDa aislada, fue procesada a través de alquilación, reducción y digestión enzimática (tripsina). Después de separar los péptidos por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), estos fueron inyectados en un espectrómetro de masas ESI-MS/MS para ser analizados.

A partir del análisis de esta banda proteica de ~ 71 kDa se identificaron péptidos provenientes de dos proteínas de masas moleculares diferentes (~ 28 y ~ 38 kDa) (Figura 6). Las cuales al ser comparadas con secuencias reportadas en la base de datos de *G. lamblia* (*GiardiaDB*), arrojaron los siguientes resultados.

En la proteína de masa molecular de ~ 28 kDa, se identificaron un total de 11 péptidos provenientes de una proteína de *G. lamblia*, perteneciente a la familia denominada Proteínas Variables de Superficie, VSP (gi|559179812) con un 76 % de cobertura. En la segunda proteína identificada, con una masa molecular de ~ 38 kDa, fueron identificados un total de 12 péptidos, provenientes de otra proteína de *G. lamblia*, también perteneciente a la familia de VSP (gi|559177553) mostrando un 46 % de cobertura.

Análisis Bioinformático de la Proteína 5G8 de *G. lamblia*

El análisis de la banda proteica de ~ 71 kDa por medio de espectrometría de masas ESI-MS/MS, generó como resultado la identificación de péptidos provenientes de dos proteínas de masas moleculares diferentes (~ 28 y ~ 38 kDa). Lo que ha llevado a formular algunas hipótesis al respecto, la primera consiste en lo siguiente, si se realiza la sumatoria de ambas masas moleculares; se asemeja a un valor alrededor de los 70 kDa, lo cual coincide con la masa molecular descrita de la proteína de interés. Con base a lo anterior, es posible especular la existencia de 2 cadenas polipeptídicas conformando a la

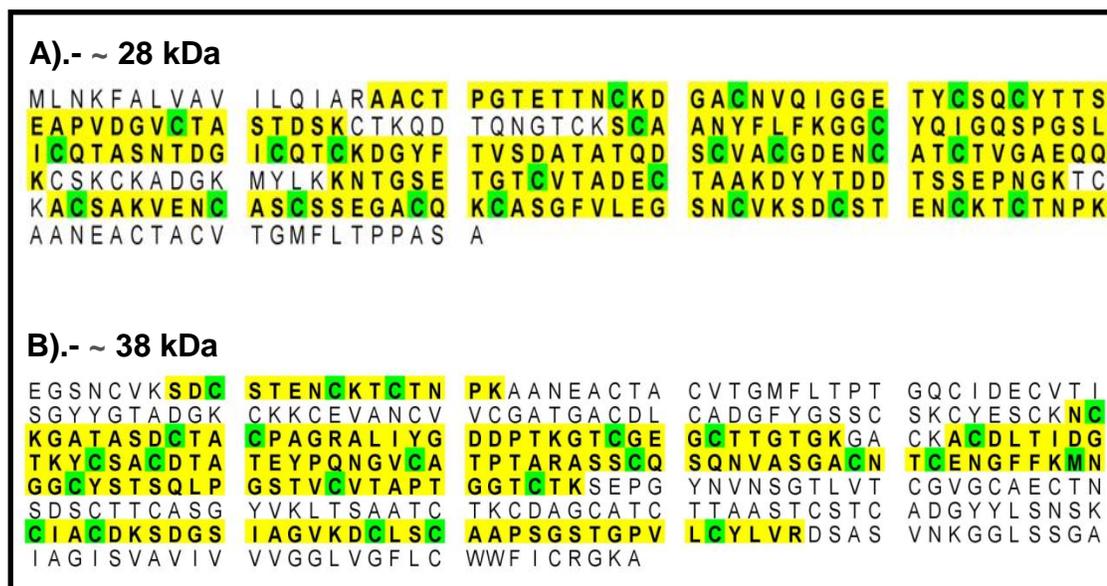


Figura 6. Péptidos identificados a partir de la banda proteica de ~ 71 kDa por Espectrometría de Masas ESI-MS/MS. **A):** Proteína Variable de Superficie (*Giardia intestinalis*), gi|559179812 (100 %) masa molecular ~ 28 kDa, 11 péptidos exclusivos (segmentos amarillos), 206/271 aminoácidos (76 % de cobertura). **B):** Proteína Variable de Superficie (*Giardia intestinalis*), gi|559177553 (100 %) masa molecular ~ 38 kDa, 12 péptidos exclusivos (segmentos amarillos), 175/379 aminoácidos (46 % de cobertura).

proteína 5G8. Para comprobar o descartar dicha hipótesis, se llevaron a cabo una serie de experimentos que consistieron en someter a la proteína 5G8 aislada, bajo condiciones reductoras y desnaturalizantes con el propósito de favorecer la disociación de estas subunidades potenciales y analizarlas mediante electroforesis (SDS-PAGE). El resultado de este experimento fue la presencia de una sola banda en el gel de poliacrilamida, con masa molecular alrededor de los 71 kDa, descartando la hipótesis que la proteína 5G8 está constituida por dos subunidades (Figura 7).

Previamente se mencionó que las secuencias polipeptídicas de ~ 28 y ~ 38 kDa, son consideradas productos de dos genes independientes. Sin embargo, al analizar ambas secuencias de aminoácidos, se observa que el segmento carboxilo terminal de la secuencia perteneciente a la de ~ 28 kDa, coincide con el segmento amino terminal de la secuencia de ~ 38 kDa. Con base en lo anterior, se ha planteado una segunda hipótesis que establece que la proteína 5G8 es el producto de la expresión de un único gen (Figura 8).

Con el propósito de comprobar la hipótesis anterior, se realizó un análisis bioinformático empleando las secuencias de nucleótidos reportadas para las cadenas polipeptídicas de ~ 28 y ~ 38 kDa. A partir de una comparación de secuencias nucleotídicas por medio de BLASTn (<http://giardiadb.org/giardiadb/showApplication.do>) se identificó una región de homología entre ambas, coincidiendo con lo observado en su contraparte aminoacídica. Por otro lado, para ubicar en el genoma de *Giardia* las secuencias de nucleótidos correspondientes a las cadenas de ~ 28 y ~ 38 kDa, empleando la herramienta BLASTn, se encontró una región que cubre en su totalidad la secuencia reportada para la proteína de ~ 28 kDa con un 100 % de identidad y una región adyacente que cubre la secuencia reportada para la proteína de ~ 38 kDa con un 96 % de identidad, además, un sitio intermedio en común de 132 nucleótidos (Anexo 12.2).

Posteriormente, se identificaron los marcos de lectura abiertos en la secuencia continua localizada en el genoma. Por lo que siguiendo con este análisis, se encontraron

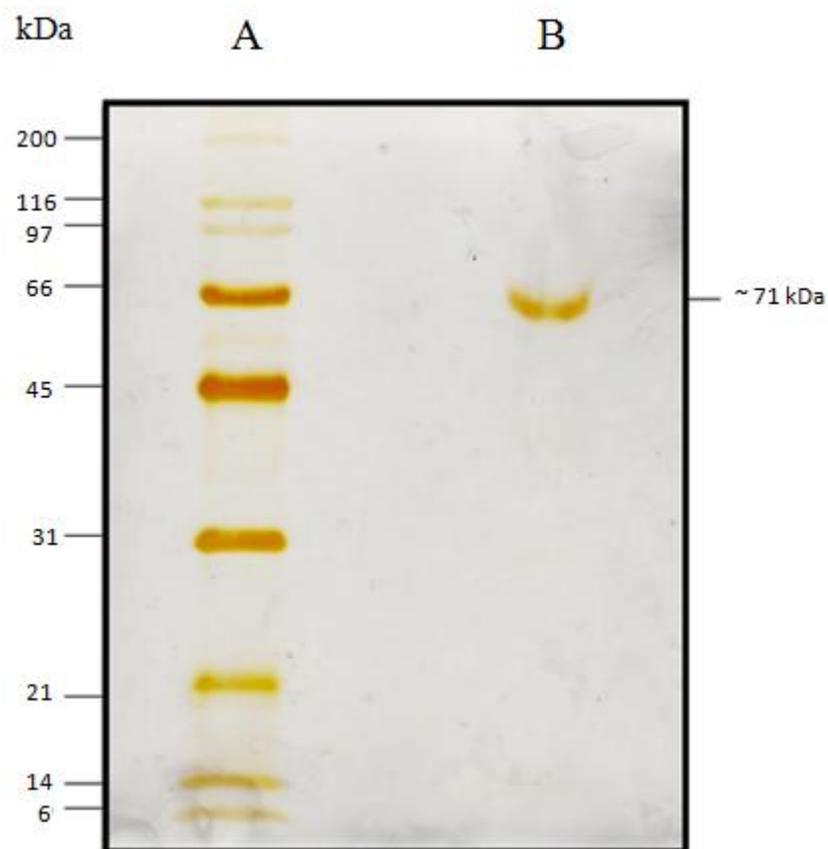


Figura 7. Perfil Electroforético (SDS-PAGE) de la proteína 5G8 aislada de *G. lamblia*, bajo condiciones reductoras y desnaturizantes. El carril A corresponde al marcador de peso molecular, el carril B a la proteína 5G8 aislada, sometida a condiciones reductoras y desnaturizantes (~ 2 μ g), teñido por el método de plata.

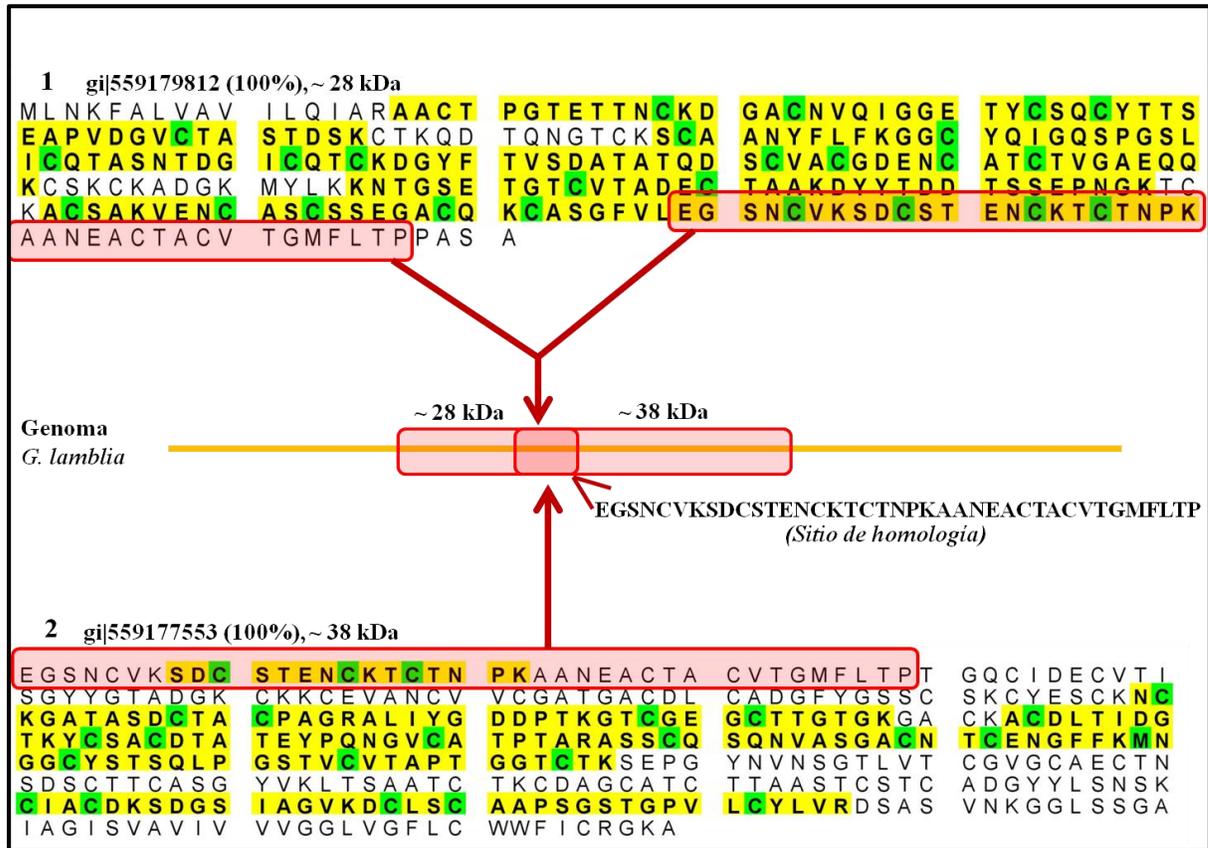


Figura 8. Péptidos identificados a partir de la banda proteica de ~ 71 kDa por Espectrometría de Masas ESI-MS/MS y su relación a nivel génico. **1):** Proteína Variable de Superficie (*Giardia intestinalis*), masa molecular ~ 28 kDa, segmento final de la secuencia (señalado con rojo) que coincide con la sección inicial de la segunda proteína (sitio de homología). **2):** Proteína Variable de Superficie (*Giardia intestinalis*), masa molecular ~ 38 kDa, segmento inicial de la secuencia (señalado con rojo). Se considera que en conjunto forman una sola proteína a nivel génico.

ciertas mutaciones, tanto como deleciones y sustituciones, que al ser corregidas de manera puntual en el segmento de nucleótidos, se obtuvo un marco de lectura completo que genera un producto proteico compuesto de 607 aminoácidos y una masa molecular de ~ 61 kDa. Adicionalmente, al analizar esta secuencia completa de aminoácidos, se encuentran todos los péptidos que fueron identificados por espectrometría de masas con un 60.2 % de cobertura.

Estos resultados sugieren fuertemente que la proteína 5G8 está constituida de una sola cadena polipeptídica, y además, forma parte de la familia de VSPs. Las VSPs son una familia de proteínas que cubren la superficie completa del parásito (Nash, 2002) y se caracterizan por la presencia de numerosos motivos CXXC (donde X representa cualquier aminoácido) (Adam y col., 1988), finalizados por una cadena invariable de aminoácidos hidrofílicos CRGKA, uno o dos motivos GGCY, una conservada cola de aminoácidos hidrofóbicos (Nash, 2002) y un motivo “Zn finger” ó CXXCXXXCXXC los cuales están estrechamente relacionados. La proteína 5G8 posee todas características descritas anteriormente para las VSP (Figura 9).

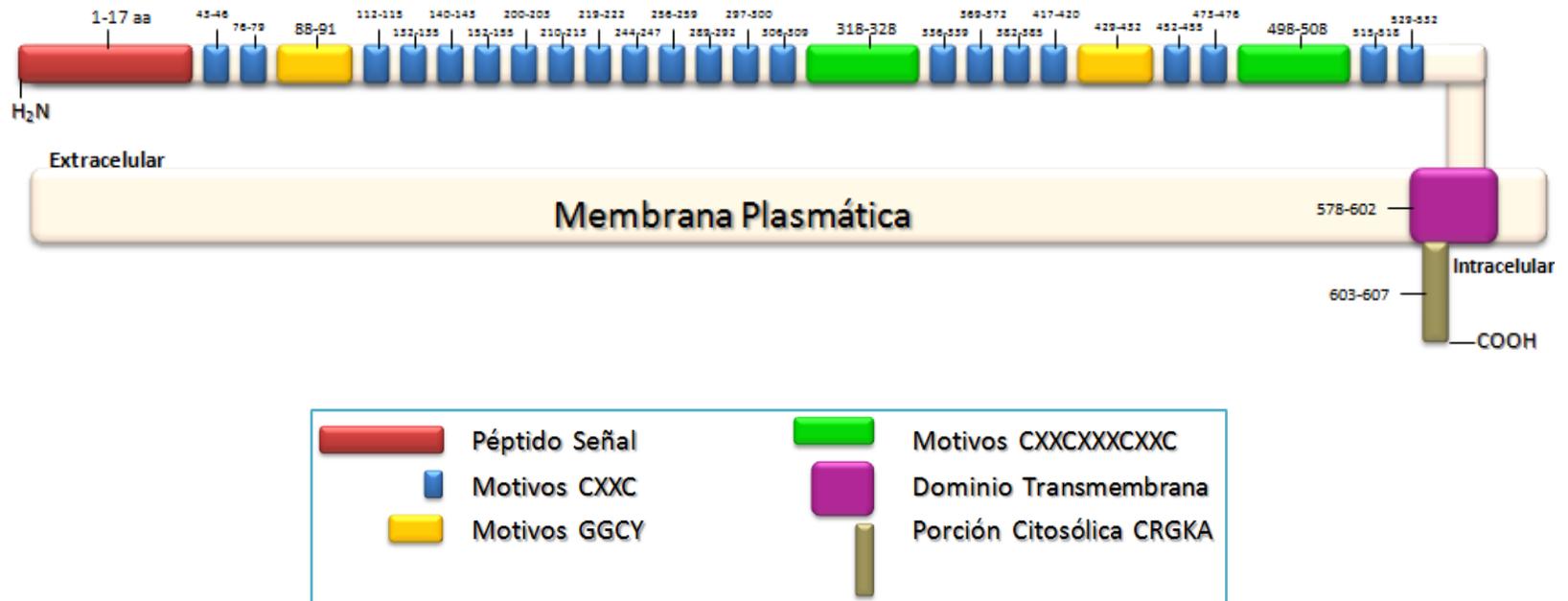


Figura 9. Estructura primaria y características de la proteína 5G8. Cadena polipeptídica (607 aminoácidos), péptido señal (color rojo), motivos CXXC (color azul), motivo CXXCXXXCXXC (color verde), motivos GGCY (color amarillo), porción citosólica CRGKA (color café), dominio transmembrana (color morado).

Evaluación del Papel Protector del AcMo 5G8.B5 en un Modelo de Infección Gerbil (*Meriones unguiculatus*) Utilizando Trofozoítos de *G. lamblia* Cepa 5G8 (+)

Con el objetivo de evaluar la actividad protectora del AcMo 5G8.B5, se realizó un ensayo *in vivo* de protección utilizando trofozoítos de *G. lamblia* 5G8 (+) y gerbiles (*Meriones unguiculatus*) como modelo de infección intestinal. Se utilizaron tres grupos de gerbiles (n= 5/grupo) por cada repetición del experimento, el cual se realizó por triplicado, teniendo un total de 15 gerbiles por grupo.

Los 3 grupos fueron infectados con 1×10^6 trofozoítos, dos horas posteriores a la infección, se proporcionaron diferentes tratamientos: al Grupo 1 se le administró solución reguladora de fosfatos salinos (PBS). Al Grupo 2, se le suministró AcMo control de isotipo aBDC.2 y finalmente el Grupo 3 fue tratado con el AcMo 5G8.B5, ambos anticuerpos fueron utilizados a una concentración de $100 \mu\text{g}/200 \mu\text{L}$ de PBS. Los tratamientos fueron suministrados a diferentes tiempos (24, 72 y 120 h). Finalmente, el día 7 después de la infección, se llevó a cabo la recuperación de trofozoítos a partir de la extracción del duodeno de los gerbiles infectados, la cual resultó de la siguiente manera (Figura 10): Grupo uno: $7.21 \times 10^6 \pm 6.11 \times 10^6$ células /mL, Grupo dos: $5.99 \times 10^6 \pm 6.80 \times 10^6$ células /mL, Grupo tres: $0.84 \times 10^6 \pm 0.20 \times 10^6$ células /mL. Por lo tanto, el grupo que recibió tratamiento con el AcMo 5G8.B5, mostró una disminución estadísticamente significativa de la carga parasitaria con una $p < 0.05$ en comparación con los grupos control, mientras que los datos al comparar al grupo 1 (PBS) con respecto al grupo 2 (AcMo C.I. aBDC.2), se obtiene una $p > 0.05$, indicando que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos control (Tabla I). (Datos obtenidos por medio de la prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis).

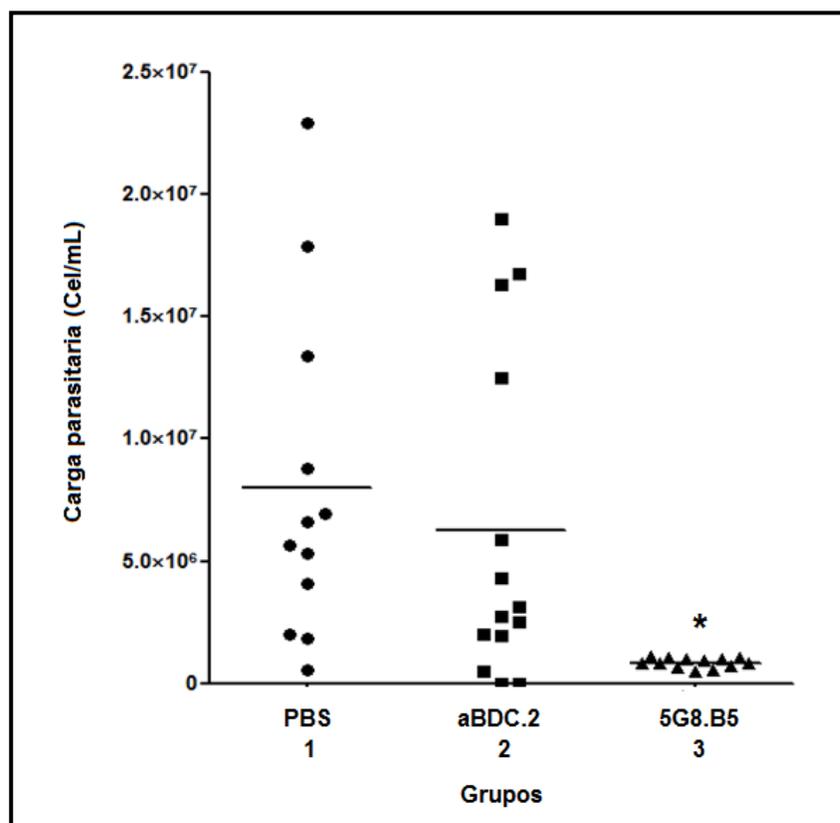


Figura 10. Evaluación del papel protector del AcMo 5G8.B5 en un modelo de infección intestinal con *G. lamblia*. El AcMo 5G8.B5 disminuyó la carga parasitaria en gerbiles (*Meriones unguiculatus*) infectados con *G. lamblia* 5G8 (+). La administración intragástrica del AcMo 5G8.B5 (100 µg) (n= 13), PBS (200 µL) (n= 14) y el AcMo control de isotipo aBDC.2 (100 µg) (n= 14), fue realizada a diferentes tiempos (24, 72 y 120 h) a gerbiles infectados con 1×10^6 de trofozoítos de *G. lamblia*. El día 7 de infección, se realizó la recuperación y conteo de dichos trofozoítos. *El asterisco indica la diferencia significativa entre el grupo tratado con el AcMo 5G8.B5 con respecto a los grupos control.

Tabla I. Valor de significancia de las comparaciones por parejas de los grupos de experimentación.

Grupos comparados	Valor de significancia (α)
3-2	0.006
3-1	0.000
2-1	0.118

**Nivel de significancia .05 (IBM® SPSS® Statistics Version 21).*

Potenciales Epítopes Reconocidos por Linfocitos B y T vía Simulación Computacional (*In silico*)

A partir de la secuencia de la proteína 5G8 de *G. lamblia*, la base de datos IEDB identificó una serie de epítopes lineales para células B, los cuales se definen como un fragmento consecutivo de la secuencia de una proteína (Zhang y col., 2012). Dicho análisis mostró una predicción de un total de 31 epítopes dentro de la característica de localización de los residuos por “BepiPred” (Larsen y col., 2006). Posteriormente, fueron elegidos aquellos epítopes con mayor puntaje, tomando los primeros 5 (Tabla II). Adicionalmente, estos fueron ubicados en la secuencia de aminoácidos de la proteína 5G8 con el propósito de señalar la posición exacta de cada uno de los epítopes resultados de la predicción (Figura 11).

Para la predicción de los epítopes de células T, el algoritmo utilizado de la base de datos SYFPEITHI identificó los epítopes con mayor afinidad química al sitio de unión (surco) del MCH clase II. Dicho análisis, mostró como resultado la predicción de 10 epítopes de la proteína 5G8 con mayor afinidad al haplotipo I-A^k, siendo los nueve aminoácidos centrales los que representan el motivo de unión a las moléculas del MHC clase II (tabla III). Adicionalmente, el epítope de mayor puntaje de afinidad predicho por la base de datos, fue señalado dentro de la secuencia de aminoácidos de la proteína 5G8, conociendo su ubicación exacta en el polipéptido (Figura 12).

Por último, al analizar los epítopes predichos tanto para células B como células T, se observó que el epítope No. 5 de células B (color morado), coincide con el epítope No.1 predicho para linfocitos de células T (color verde) en 11 residuos de aminoácidos (Figura 13). Lo cual indica que la proteína 5G8 posee un epítope potencial que es reconocido tanto por células B como por células T.

Tabla II. Predicción de epítopes de células B de la proteína 5G8, por análisis a través de la base de datos IEDB (Immune Epitope Database).

No.	Posición	Secuencia de epítipo	Puntaje
1	549	A A P S G S T G	1.24
2	346	I Y G D D P T K G T C G E G C T T G T G K G A C	1.21
3	166	N T G S E T G T C V T A D E C T A A K D Y Y T D D T S S E P N G K T C K	1.17
4	442	V C V T A P T G G T C T K S E P G Y N V N	1.17
5	47	Y T T S E A P V D G V C T A S T D S K C T K Q D T Q N G T C K	1.01

MLNKFALVAVILQIARAAC TPGTETTNC KDGACNVQIGGETYCSQCYTTSEA
 PVDGVCTASTDSKCTKQDTQNGTCKSCAANYFLFKGGCYQIGQSPGSLICQT
 ASNTDGIQCTCKDGYFTVSDATATQDSCVACGDENCATCTVGAEQQKCSKCK
 ADGKMYLKKNTGSETGTCVTADECTAAKDYYTDDTSSEPNGKTCKACSAKVE
 NCASCSSEGACQKCASGFVLEGSNCVKSDCSTENCKTCTNPKAANEACTACV
 TGMFLTPTGQCIDECVTISGYYG TADGKCKKCEVANC VVCGATGACDLCADG
 FYGSSCSKCYESCKNCKGATASDCTACPAGRAI IYGDDPTKGTCEGEGCTTGT
 GKGACHACDLTIDGTKYCSACDTATEYFPQNGVCATPTARASSCQSQNVASGA
 CNTCENGFFKMNGGCYSTSQLPGSTVCVTAPTGGTCTKSEPGYNVNSGTLVT
 CGVGCAECTNSDSCTTCASGYVKL TSAATCTKCDAGCATCTTAASTCSTCAD
 GYYLSNSKCIACDKSDGS IAGVKDCLSCAAPSGSTGFPVLCYLVRDSASVNKG
 GLSSGAIAGISVAVIVVVGGLVGF LCWWFICRGKA

Figura 11. Ubicación de los epítopes para células B en la secuencia de aminoácidos de la proteína 5G8. Epítoto No.1 (color amarillo) Posición en el residuo 549, longitud 8 aa; Epítoto No. 2 (color azul) Posición en el residuo 346, longitud 24 aa; Epítoto No. 3 (color rojo) Posición en el residuo 166, longitud 36 aa; Epítoto No.4 (color verde) Posición en el residuo 442, longitud 21 aa; Epítoto No.5 (color morado) Posición en el residuo 47, longitud 31 aa.

Tabla III. Predicción de epítopes de la proteína 5G8, afines a las moléculas del MHC clase II de ratón (haplotipo I-A^k) generados por la base de datos SYFPEITHI.

No.	Posición	Secuencia de epítope															Puntaje
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	
1	67	T	K	Q	D	T	Q	N	G	T	C	K	S	C	A	A	26
2	95	Q	S	P	G	S	L	I	C	Q	T	A	S	N	T	D	22
3	186	Y	Y	T	D	D	T	S	S	E	P	N	G	K	T	C	20
4	114	T	C	K	D	G	Y	F	T	V	S	D	A	T	A	T	18
5	121	T	V	S	D	A	T	A	T	Q	D	S	C	V	A	C	18

```

MLNKFALVAVILQIARAAC TPGTETTNCCKDGACNVQIGGETYCSQCYTTSEA
PVDGVCTASTDSKCTKQDTQNGTCKSCAANYFLFKGGCYQIGQSPGSLICQT
ASNTDGIQCTCKDGYFTVSDATATQDSCVACGDENCATCTVGAEQQKCSKCK
ADGKMYLKKNTGSETGTCVTADECTAAKLYYTD DTSSEPNGKTCKACSAKVE
NCASCSSEGACQKCA SGFVLEGSNCVKSDCSTENCKTCTNPKAANEACTACV
TGMFLTPTGQC IDECVTISGYYGTADGKCKKCEVANCVVCGATGACDLCADG
FYGSSCSKCYESCKNCKGATASDCTACPAGRALIYGDDPTKGTCEGEGCTTGT
GKGACKACDLTIDGTKYCSACDTATEY P QNGVCATPTARASSCQSQNVASGA
CNTCENGF FKMNGGCYSTSQLPGSTVCVTAPTGGTCTKSEPGYNVNSGTLVT
CGVGCAECTNSDSCTTCASGYVKLTSAATCTKCDAGCATCTTAASTCSTCAD
GYYLSNSKCIACDKSDGS IAGVKDCLSCAAPSGSTGPVLCYLVRDSASVNKG
GLSSGAIAGISVAVIVVVGGLVGF LCWWFICRGKA

```

Figura 12. Ubicación de los epítopes de mayor puntaje de afinidad para células T en la secuencia de aminoácidos de la proteína 5G8. Epítoto No.1 (color verde) Posición en el residuo 67; Epítoto No. 2 (color café) Posición en el residuo 95; Epítoto No.3 (color azul) Posición en el residuo 186; Epítoto No.4 (color amarillo) Posición en el residuo 114.

```

MLNKFALVAVILQIARAAC TPGTETTNCCKDGACNVQIGGETYCSQCYTTSEA
PVDGVCTASTDSKCTKQDTQNGTCKSCAANYFLFKGGCYQIGQSPGSLICQT
ASNTDGIQCTCKDGYFTVSDATATQDSCVACGDENCATCTVGAEQQKCSKCK
ADGKMYLKKNTGSETGTCVTADECTAAKDY YTD DTSSEPNGKTCKACSAKVE
NCASCSSEGACQKCA SGFVLEGSNCVKSDCSTENCKTCTNPKAANEACTACV
TGMFLTPTGQC IDECVTISGYYGTADGKCKKCEVANCVVCGATGACDLCADG
FYGSSCSKCYESCKNCKGATASDCTACPAGRALIYGDDPTKGTCEGEGCTTGT
GKGACKACDLTIDGTKYCSACDTATEY P QNGVCATPTARASSCQSQNVASGA
CNTCENGF FKMNGGCYSTSQLPGSTVCVTAPTGGTCTKSEPGYNVNSGTLVT
CGVGCAECTNSDSCTTCASGYVKLTSAATCTKCDAGCATCTTAASTCSTCAD
GYYLSNSKCIACDKSDGS IAGVKDCLSCAAPSGSTGPVLCYLVRDSASVNKG
GLSSGAIAGISVAVIVVVGGLVGF LCWWFICRGKA

```

Figura 13. Ubicación de los epítopes de células B y T en la secuencia de aminoácidos de la proteína 5G8. Traslapo de 11 residuos de aa entre epítoto No. 5 para linfocitos de células B (color morado) posición 47, longitud de 31 aa, y el epítoto No. 1 para linfocitos de células T (color verde) posición 67, longitud de 15 aa.

DISCUSIÓN

Con la finalidad de caracterizar a la proteína inmunogénica 5G8 de *G. lamblia*, el presente estudio describe el análisis y la identificación de su estructura primaria, así como su potencial papel en la inducción de una respuesta inmune protectora en contra de la infección por *G. lamblia*.

Previamente, nuestro laboratorio describió a esta proteína con una masa molecular relativa de ~ 71 kDa, la cual es reconocida tanto por la respuesta secretora (IgA en heces) como sistémica (IgG en suero) de ratones infectados por *G. lamblia* (Velázquez y col., 2005). En los primeros estudios, la identidad de la proteína inmunogénica 5G8 era enfocada hacia una integrante específica de la familia de proteínas de choque térmico (HSP) con una masa molecular de ~ 71 kDa, la cual recibe el nombre de Proteína de Unión a Inmunoglobulinas (BiP), ésta actúa como una molécula chaperona que asiste en la traslocación de polipéptidos nacientes a través de la membrana del retículo endoplásmico, así como su subsecuente plegamiento y oligomerización (Ebert, 2000, Dierks y col.,1993). Sin embargo, resultados recientes obtenidos por espectrometría de masas ESI-MS/MS, dentro de nuestro grupo de investigación, sugieren fuertemente que la proteína 5G8 pertenece a la familia de VSP. Con el propósito de obtener mayor información acerca de la identificación de ésta proteína, se realizó un análisis bioinformático de alineamiento de secuencias, BLAST, en el que se compara una secuencia problema contra una gran cantidad de secuencias reportadas en una base de datos, con el fin de encontrar genes homólogos y conocer su función (Altschul y col., 1990). Encontramos la existencia de otras proteínas con un alto porcentaje de homología con respecto al constructo de ~ 71 kDa de la proteína 5G8 (dicho constructo fue diseñado uniendo las secuencias de nucleótidos pertenecientes a las proteínas de ~ 28 kDa y ~ 38 kDa) entre las que resultaron: Major surface labeled trophozoite antigen 417 (51 %), Major surface labeled trophozoite antigen 11 (45 %) y Variant specific surface protein VSP4A1 (30 %). Estas forman parte de la familia de VSP y pudieran estar evolutivamente conservadas. Algunas de sus características

principales señalan que son proteínas ricas en cisteína, con un rango de masas moleculares entre 20 – 200 kDa, poseen una secuencia variable perteneciente al N-terminal y aproximadamente 27 aminoácidos del C-terminal (que consiste en una cola hidrofóbica) incluyendo la región que atraviesa la membrana citoplasmática, altamente conservados (Mowatt y col., 1991; Ankarklev y col. 2010), finalizados por una cadena invariable de aminoácidos hidrofílicos, CRGKA. Los mecanismos de variación antigénica en *Giardia* son controlados por ARN de interferencia (RNAi) y la interrupción de esta vía genera trofozoítos que expresan simultáneamente numerosas VSP. Por otra parte, jerbos sometidos a una infección primaria con *Giardia*, las cuales expresaban gran cantidad de VSP; fueron protegidos de infecciones posteriores (Rivero y col., 2010), lo que sugiere que la variación antigénica es esencial para la evasión del sistema inmune; esta información podría ser útil para el desarrollo de estrategias en la elaboración de una vacuna (Lujan y col., 2011; Lopez-Romero y col., 2015).

Considerando los resultados obtenidos, es posible evidenciar que la proteína 5G8 pertenece a la familia de VSPs, ya que posee en su estructura primaria algunos de los dominios y motivos más importantes que son distintivos de esta clase de proteínas, lo que nos permite confirmar la naturaleza de la proteína de interés (Figura 9).

La membrana celular del trofozoíto de *G. lamblia*, está cubierta con una sola clase de VSP específica que en un momento dado, es reemplazada por otra VSP cada 6 a 13 generaciones en el cultivo celular (Nash, 1997; Li y col., 2013), posiblemente como mecanismo de evasión contra la respuesta inmune del hospedero. Experimentalmente, sólo 6 VSP han sido localizadas en la membrana celular hasta el momento (VSPA6, TSA417, VSPH7, VSPA6- S1 (G3M), VSP1267 y VSP9B10A) (Adam y col. 1988, Gillin y col., 1990; Lujan y col., 1995; Nash y col., 1990; Yang y col., 1995; Nash y col., 2001; Li y col., 2013). En recientes estudios, se realizaron análisis experimentales para verificar qué estructuras de las VSP son necesarias para ser localizadas en la superficie de la membrana celular. Los datos llevaron a las siguientes conclusiones: (i) la secuencia del carboxilo terminal, CRGKA, no es esencial para la localización de las VSP en la membrana celular, (ii) un “motivo 1” de 45 residuos que consisten en dos

CXXCs separados por 12-15 residuos de aminoácidos situados cerca de carboxilo terminal y un “motivo 2” hidrofóbico de 38 residuos en el carboxilo terminal, son ambos suficientes y esenciales para la localización de la proteína en la membrana celular. (iii) una secuencia N- terminal del lado contrario del “motivo 1”, no es requerida como blanco de localización en la membrana celular. (Li y col., 2013). Lo cual permite indagar más sobre la importancia que representan las características estructurales de esta familia de proteínas (VSPs) para su expresión en la superficie de la membrana celular.

Para continuar con el análisis bioinformático, se utilizó el constructo génico de ~ 71 kDa de la proteína 5G8, anteriormente mencionado, en el cual fue identificada una delección de la base nitrogenada Guanina en la zona homóloga, específicamente en el nucleótido número 801 (c.801delG) de la secuencia correspondiente a la proteína de ~ 28 kDa, esta delección provoca un marco de lectura abierto que codifica únicamente para esta proteína y al mismo tiempo, una secuencia de aminoácidos (PASA) que termina con la homología, seguido de un codón de stop que trunca a la proteína. Por el contrario, la inserción de esta base nitrogenada Guanina, a través de correcciones puntuales, el marco de lectura codifica un producto proteico de 607 aminoácidos y de una masa molecular de ~ 61 kDa y que adicionalmente, conserva los péptidos identificados por el análisis de espectrometría de masas. Estos datos en conjunto con las evidencias experimentales discutidas anteriormente, sugieren la existencia de un gen que codifica para una sola proteína, es decir, la proteína 5G8 proviene de la expresión de un solo gen.

Otro de los experimentos enfocados en la caracterización de la proteína 5G8, fue la evaluación de la capacidad protectora del AcMo 5G8.B5 que va dirigido específicamente a esta proteína, a través de la administración de dicho anticuerpo observando su efecto en la disminución de la carga parasitaria en animales de experimentación infectados. Es muy probable que el AcMo 5G8.B5 haya favorecido la aglutinación de trofozoítos de *G. lamblia* 5G8 (+) en los animales infectados (Quintero y col., 2013), y de ese modo, asociado con la acción mecánica del peristaltismo del intestino, evitara que el parásito colonice el intestino delgado, contribuyendo a la disminución en la carga parasitaria. Por lo que el AcMo 5G8.B5 específico para la

proteína 5G8 de *G. lamblia*, mostró una capacidad protectora en la infección en el modelo gerbil (Tesis de Licenciatura, Samaniego, 2014).

Es posible observar una disminución en la carga parasitaria dentro del grupo tratado con el AcMo control de isotipo aBDC.2 en comparación con el grupo tratado con PBS, sin embargo, dichos datos muestran una $p > 0.05$, indicando que no hay una diferencia estadísticamente significativa en dicha disminución de la carga parasitaria entre estos grupos, y aunque el AcMo control de isotipo aBDC.2 no reconoce ni se une a la superficie del trofozoíto, es probable que posea una acción indirecta, promoviendo condiciones desfavorables para la colonización del parásito. Sin embargo, al comparar estos controles con el grupo de animales tratados con el AcMo 5G8.B5, la disminución de la carga parasitaria en este último fue muy evidente y estadísticamente significativa. Por lo que es importante realizar futuros estudios para la optimización del procedimiento y sobre todo, elucidar el mecanismo de acción que posee el AcMo 5G8.B5.

Para contribuir al estudio, adicionalmente se realizó un análisis preliminar de la expresión de la proteína 5G8 en la superficie de los trofozoítos de *G. lamblia* que fueron recuperados de los gerbiles infectados y que recibieron los distintos tratamientos en ciertos periodos establecidos. Después de 7 días de haber sido infectados, se observó que el 38.8 % de la población de trofozoítos recuperados del grupo uno (tratados con PBS) expresaban la proteína, el 60.8 % en el grupo dos (tratados con AcMo control de isotipo) y el 30.2 % en el grupo tres (tratados con el AcMo 5G8.B5). La población de trofozoítos recuperados de cada grupo, expresó superficialmente la proteína 5G8, a pesar de las condiciones adversas del organismo tales como las variaciones de pH, la respuesta inmune innata, la inmunidad humoral y celular o también la microbiota, etc., en el cual colonizaron por un periodo de 7 días, mostrando así, el mantenimiento de la expresión superficial de la proteína. Por lo tanto, es de suma importancia conocer ciertos aspectos sobre el patrón de expresión de la proteína de estudio, ya que *G. lamblia* experimenta variación antigénica, proceso que consiste en la variación de las proteínas de superficie que recubren por completo la superficie celular de los trofozoítos (Nash, 2002; Ankarklev y col., 2010). Por lo que al conocer los factores externos y de inducción de

estrés celular que pudieran regular la expresión superficial de la proteína 5G8, debido a los antecedentes con los que se cuentan de su posible naturaleza, nos brindará un mayor conocimiento contribuyendo en la caracterización de la proteína 5G8 de *G. lamblia*.

También, es posible observar una disminución de la población que expresa la proteína 5G8 entre los grupos de gerbiles tratados con el AcMo 5G8.B5 comparado con el control de isotipo aBDC.2, esto pudiera deberse a que el AcMo 5G8.B5 suministrado en un principio, reconoció el epítipo de la proteína 5G8 en la superficie de los trofozoítos y el cual, muy probablemente, favoreció la aglutinación que en conjunto con otras condiciones provocaron la disminución de la carga parasitaria, por lo que al realizar la tinción para citometría de flujo de los trofozoítos recuperados utilizando el AcMo 5G8.B5, se analizó un menor porcentaje de la población que expresaba la proteína 5G8 en el grupo tratado con el AcMo 5G8.B5 en comparación con los controles (los cuales no reconocen el epítipo de la proteína 5G8). Por lo tanto, estudios posteriores pueden llegar a elucidar el mecanismo de acción y de unión específica del AcMo 5G8.B5 con respecto a la proteína 5G8 en la superficie de los trofozoítos en un modelo *in vivo*.

Por otra parte, en otros estudios de inmunización pasiva en un modelo de giardiasis, la actividad del suero de ratones inmunizados y el AcMo anti-*Giardia muris*, el cual va dirigido a una glicoproteína de la superficie del parásito (Butscher y col., 1988); fue evaluada *in vitro* e *in vivo*, en donde se observó la inmovilización de los trofozoítos *in vitro* y fue también citotóxico para ellos en presencia del complemento exógeno. Además, se observó que tanto el suero obtenido a partir de la infección de ratones, así como el AcMo anti-*G. muris* administrados directamente en el duodeno de ratones, redujeron significativamente el número de trofozoítos durante la fase aguda de la infección. Estos resultados sugieren un papel de participación parásito-anticuerpo en la eliminación de los trofozoítos de *G. muris* del intestino delgado. Por lo que es de particular interés, el hallazgo de la actividad antimicrobiana de los anticuerpos séricos y la interacción parásito-AcMo, en el duodeno (Belosevic y col., 1994).

Para lograr la eliminación de *G. lamblia* en el hospedero, la activación tanto de la respuesta inmune humoral como la respuesta celular, se ha reportado como esencial. Pocos estudios se han enfocado en la investigación de los antígenos de este parásito que estimulan efectivamente una respuesta inmune en el organismo. Por lo que es importante incrementar el conocimiento acerca de las proteínas que induzcan una respuesta inmune humoral y celular de carácter protector (Lopez-Romero, 2015). La predicción de epítopes de células B y T *In silico*, es una herramienta de gran importancia para la identificación de aquellos epítopes que desencadenan una mayor respuesta humoral y celular. Los epítopes antigénicos son regiones de la superficie de la proteína que son preferencialmente reconocidos por anticuerpos generados por células B (Getzoff y col., 1988). La predicción de estos epítopes se basa en las propiedades de sus aminoácidos tales como la hidrofiliidad (Parker y col., 1986; Hopp y col., 1981), accesibilidad al solvente (Emini y col., 1985), estructura secundaria (Pellequer y col., 1993; Levitt, 1978), flexibilidad (Karplus y col., 1985), localización de los residuos (Larsen y col., 2006) y antigenicidad (Kolaskar y col., 1990).

Usualmente los epítopes antigénicos de células B, se clasifican como continuos o discontinuos. Un epítope continuo (también llamado lineal) es un fragmento consecutivo de la secuencia de una proteína, mientras que el epítope discontinuo se compone de varios fragmentos dispersos a lo largo de la secuencia de una proteína, pero aún así forma una interface de unión al antígeno en 3D. Actualmente, la mayoría de los métodos disponibles de predicción de epítopes, se enfocan principalmente en epítopes continuos debido a la simplicidad y la conveniencia de los métodos de investigación disponibles (Zhang y col., 2012).

Los modelos computacionales complementan útilmente el área experimental a través del eficiente descubrimiento de péptidos capaces de unirse al MHC y epítopes de células T. Dichos modelos han sido aplicados exitosamente en la predicción de epítopes de células T en enfermedades infecciosas, cáncer, autoinmunidad y alergias (Bing y col., 2009).

Los péptidos extracelulares presentados en las moléculas del MCH II, permiten al sistema inmune detectar la presencia de microorganismos ajenos a este compartimiento. Sólo una pequeña fracción de los posibles péptidos que son generados a partir de proteínas de organismos patógenos, puede desencadenar una respuesta inmune. Las moléculas del MHC de clase II, presentan péptidos derivados de proteínas tomadas del ambiente extracelular, los cuales estimulan la inmunidad humoral y celular en contra de microorganismos patógenos, a través de la participación de linfocitos T CD 4⁺. Para que un péptido pueda estimular una respuesta de linfocitos T cooperadores, debe unirse al MHC clase II en los organelos endocíticos (Castellino y col., 1997; Nielsen y col., 2010).

En este trabajo, fueron reveladas las regiones más probables en la proteína 5G8 que pudieran ser responsables de la activación de la respuesta inmune. Adicionalmente, en el análisis se observó la coincidencia de 11 residuos de aminoácidos en el epítipo No. 5 para células B con respecto al epítipo de mayor puntaje predicho para linfocitos de células T, indicando que la proteína 5G8 posee un epítipo potencial de reconocimiento que desencadena una respuesta inmune de tipo humoral y celular, el cual podría considerarse como blanco de estudio para posteriores análisis e investigaciones concernientes a la generación de una posible vacuna efectiva contra el parásito.

En resumen, este trabajo describe la identificación y caracterización bioquímica e inmunológica de la proteína inmunogénica 5G8 del parásito *G. lamblia*. En el cual se evaluó su capacidad protectora de forma indirecta, utilizando el AcMo específico generado para esta proteína. Dicha herramienta permite indagar en el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados durante un proceso infeccioso, permitiendo un mejor entendimiento de la interacción hospedero-parásito. Así mismo, la identificación de la naturaleza a la que pertenece esta proteína, el conocimiento de sus características específicas y la revelación de sus potenciales epítopos de reconocimiento, pueden contribuir sentando las bases moleculares que permitan el futuro desarrollo racional de una posible inmunoterapia y medidas profilácticas contra *G. lamblia*.

CONCLUSIONES

- Se aisló la proteína 5G8 y se cuenta con la identificación de su secuencia de aminoácidos.
- La proteína 5G8, está compuesta de una sola cadena polipeptídica.
- La proteína 5G8 pertenece a la familia de VSPs.
- La proteína 5G8 puede inducir una respuesta inmune protectora en un modelo experimental de giardiasis.
- Se identificaron epítopes potenciales de reconocimiento tanto para células B como para células T.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdul-Wahid, A., Faubert, G. M. 2004. Similarity in cyst wall protein (CWP) trafficking between encysting *Giardia duodenalis* trophozoites and CWP-expressing human embryonic kidney-293 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 324:1069-1080.
- Abián J. 2008. Introducción a la Espectrometría de Masas para la caracterización de péptidos y proteínas en Proteómica. *Proteómica.* 2
- Adam, R. D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev* 14(3): 447-475.
- Adam, R. D. 1991. The biology of *Giardia* spp. *Microbiol Rev.* 55, 706-732.
- Adam R. D., Aggarwal A., Lal A., de la Cruz V., McCutchan T., Nash T. 1988. Antigenic variation of a cysteine-rich protein in *Giardia lamblia*. *J Exp Med.* 167:109 –118.
- Ali S. A., Hill D. R. 2003. *Giardia intestinalis*. *Curr Opin Infect Dis.* 16:453-460.
- Altschul S., Gish W., Miller W., Myers E., Lipman D. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215:403-410.
- Ankarklev J., Jerlström-Hultqvist J., Ringqvist E., Troell K., Svärd S. 2010. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nature Rev Microbiol.* doi:10.1038/nrmicro2317.
- Astiazaran G., H., Quintero, J., Vega, R., Briceno, P., Oviedo, C., Rascón, L., Garibay E., A., Castillo F. J., Robles R., Hernandez, J., Velázquez, C. 2009. Identification of T-cell stimulating antigens from *Giardia lamblia* by using *Giardia*-specific T-cell hybridomas. *Parasite Immunol.* 31, 1329.
- Belosevic M., Faubert G. M., MacLean J. D., Law C., Croll N. A. 1983. *Giardia lamblia* Infections in Mongolian Gerbils: An Animal Model. *J Infect Dis.* 147 (2):222-226.
- Belosevic M., Daniels C. 1992. Phagocytosis of *Giardia lamblia* trophozoites by cytokine-activated macrophages. *Clin exp Immunol.* 87, 304-309.
- Belosevic M., Faubert G. M., Dharampaul S. 1994. Antimicrobial action of antibodies against *Giardia muris* trophozoites. *Clin Exp Immunol* 1994; 95:485-489.

- Biez, M., Siles-Lucas, M., Witter, P., Müller, N. 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.
- Bing W., Kun Y., Genyan L., Fangyi X., Feng Z., Yun C. 2009. Computational prediction and identification of Epstein-barr virus latent membrane protein 2A antigen-specific CD8+ T-cell epitopes. *Cell Mol Immunol.* 6(2):97-103.
- Butscher W. G., Faubert G. M. 1988. The therapeutic action of monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Giardia muris*. *Immunol.* 64:175-80.
- Byrd, L. G., Conrad, J. T., Nash, T. E. 1994. *Giardia lamblia* infections in adult mice. *Infect Immun.* 62, 3583-3585.
- Castellino F., Zhong G., Germain R. 1997. Antigen presentation by MHC class II molecules: invariant chain function, protein trafficking, and the molecular basis of diverse determinant capture. *Hum Immunol.* 54:159–69.
- Chatenoud L., Bluestone J. 2007. CD3-specific antibodies: a portal to the treatment of autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 7:622–32. [PubMed: 17641665].
- Cisneros-Romero, N., Glaus-Garzón, J. 2010. Purificación y caracterización parcial de la proteína 5G8 de *Giardia lamblia* GS/M-83-H7. Tesis de licenciatura. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias Químico-Biológicas. Hermosillo, Sonora, México.
- Daniels C. W. and Belosevic M. 1994. Serum antibody responses by male and female C57Bl/6 mice infected with *Giardia muris*. *Clin Exp Immunol.* 97: 424–429.
- Deguchi, M., F. D. Gillin, and I. Gigli. 1987. Mechanism of killing of *Giardia lamblia* trophozoites by complement. *J. Clin. Investig.* 79:1296–1302.
- Dick, H.M. 1985. Monoclonal antibodies in clinical medicine. *Br Med J*; 291, 762-4.
- Dierks, T., Klappa, P., Wiech, H., Zimmermann, R. 1993. The role of molecular chaperones in protein transport in to the endoplasmic reticulum. *Phil Trans R Soc Lond B.* 339: 335-341.
- Ebert, E.C. 2000. *Giardia* induces proliferation and interferon gamma production by intestinal lymphocytes. *Gut.* 44 342-346.

- Eckmann, L., Laurent, F., Langford, T.D., Hetsko, M.L., Smith, J.R., Kagnoff, M.F., Gillin, F.D. 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.
- Eckmann, L. 2003. Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite Immunol.* 25(5): 259-270.
- Einfeld, D. A., Stibbs, H. H. 1984. Identification and characterization of a major surface antigen of *Giardia lamblia*. *Infect Immun.* 46(2): 377-383.
- Emini E. A., Hughes J. V., Perlow D. S., Boger J. 1985. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *Journal of virology* 55: 836–839.
- Erlandsen, S. L., W. J. Bemrick, and J. Pawley. 1989. High-resolution electron microscopic evidence for the filamentous structure of the cyst wall in *Giardia muris* and *Giardia duodenalis*. *J. Parasitol.* 75:787–797.
- Erlandsen, S. L., W. J. Bemrick, D. E. Schupp, J. M. Shields, E. L. Jarroll, J. F. Sauch, and J. B. Pawley. 1990. High-resolution immunogold localization of *Giardia* cyst wall antigens using field emission SEM with secondary and backscatter electron imaging. *J. Histochem. Cytochem.* 38:625–632.
- Farthing, M. J. 1992. *Giardia* comes of age: Progress in epidemiology, immunology and chemotherapy. *J Antimicrob Chemother.* 30(5): 563-566.
- Faubert, G. 2000. Immune Response to *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol.* 13(1): 35-54.
- Feliziani C., Merino M., Rivero M., Hellman U., Pistoiresi-Palencia M., Rópolo A. 2011. Immunodominant proteins a-1 giardin and b-giardin are expressed in both assemblages A and B of *Giardia lamblia*. *BMC Microbiol.* doi:10.1186/1471-2180-11-233.
- Franco, R. M. B., Rocha, T. R., Neto, C. 2001. Ocurrance of *Cryptosporidium* oocyst and *Giardia* cyst in raw water from atibada river campinas brazil. *Inst Med Trop.* 43:107-109.

- Friend P., Hale G., Chatenoud L., Rebello P., Bradley J., Thiru S., y col. 1999. Phase I study of an engineered aglycosylated humanized CD3 antibody in renal transplant rejection. *Transplantation*. 68:1632–7. [PubMed: 10609938].
- Gardner T., Hill D. 2001. Treatment of Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* P. 114–128.
- Getzoff E. D., Tainer J. A., Lerner R. A., Geysen H. M. 1988. The chemistry and mechanism of antibody binding to protein antigens. *Advances in immunology* 43: 1–98.
- Gillin F. D., Hagblom P., Harwood J., Aley S., Reiner D., McCaffery M., So M., Guiney D. 1990. Isolation and expression of the gene for a major surface protein of *Giardia lamblia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87: 4463–4467.
- Gillin F. D., Reiner D. S., Boucher S. E. 1988. Small-Intestinal Factors Promote Encystation of *Giardia lamblia* In Vitro. *Infect. Immun.* P. 705-707.
- Gillin, F. D., Reiner D. S., Wang C. S. 1983. Human milk kills parasitic intestinal protozoa. *Science* 221:1290–1292.
- Gottstein, B., Deplazes, P., Tanner, I. 1993. In vitro synthesized immunoglobulin-a from NU/+ and reconstituted Nu/Nu mice against a dominant surface-antigen of *Giardia lamblia*. *Parasitol Res.*79:644-648.
- Gottstein B., Harriman G. R., Conrad J. T., Nash T. E. 1990. Antigenic variation in *Giardia lamblia*: cellular and humoral immune response in a mouse model. *Parasite Immunol.* 12:659–673.
- Herold K., Hagopian W., Auger J., Poumian-Ruiz E., Taylor L., Donaldson D., y col. 2002. Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 346:1692–8.
- Heyworth M. F. 1989. Intestinal IgA responses to *Giardia muris* in mice depleted of helper T lymphocytes and in immunocompetent mice. *J Parasitol.* 75: 246–251.
- Hill D. R., Burge J. J., Pearson R. D. 1984. Susceptibility of *Giardia lamblia* trophozoites to the lethal effect of human serum. *J. Immunol.* 132:2046–2052.
- Hill D., Pohl R. 1990. Ingestion of *Giardia lamblia* trophozoites by murine Peyer's patch macrophages. *Infect Immun.* 58:3202-7.

- Holmes K., Lantz L., Russ W. 2001. Conjugation of fluorochromes to monoclonal antibodies. *Curr Protoc Cytom.* Chapter 4: Unit 4.2.
- Hopp T. P., Woods K. R. 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78: 3824–3828.
- Hugo, D. L. 2006. *Giardia* y giardiasis. *Medicina (Buenos Aires)*; 66: 70-74.
- Ilan Y., Zigmond E., Lalazar G., y col. 2010. Oral administration of OKT3 monoclonal antibody to human subjects induces a dose-dependent immunologic effect in T cells and dendritic cells. *J Clin Immunol.* pp. 167–177.
- Janeway C. A., Jr., Travers P and Walport M. In *Janeway's Immunobiology*, New York: Garland Science; 2008: 1-887.
- Jarroll, E. L., P. Manning, D. G. Lindmark, J. R. Coggins, and S. L. Erlandsen. 1989. *Giardia* cyst wall-specific carbohydrate: evidence for the presence of galactosamine. *Mol. Biochem. Parasitol.* 32:121–131.
- Jimenez J., Fontaine J., Creusy C. 2014. Antibody and cytokine responses to *Giardia* excretory/secretory proteins in *Giardia intestinalis*-infected BALB/c mice. *Parasitol Res.* 113: 2709-2718.
- Johnston, S. P., Ballard M. M., Beach M. J., Causer L., Wilkins P. P. 2003. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 41:623–626.
- Kamda J. D., Nash T. E., Singer S. M. 2012. *Giardia duodenalis*: dendritic cell defects in IL-6 deficient mice contribute to susceptibility to intestinal infection. *Exp Parasitol.* 130: 288-291.
- Kanagawa O., Militech A., Vaupel B. 2002. Regulation of diabetes development by regulatory t cells in pancreatic islet antigen-specific TCR transgenic nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 168:6159-6164.
- Karplus P. A., Schulz G. E. 1985. Prediction of chain flexibility in proteins – a tool for the selection of peptide antigens. *Naturwissenschaften* 72: 212–213.

- Karr C., Jarroll E. 2004. Cyst wall synthase: N-acetylgalactosaminyltransferase activity is induced to form the novel N-acetylgalactosamine polysaccharide in the *Giardia* cyst wall. *Microbiol.* 150, 1237–1243.
- Keserue H., Füchslin H., Egli T. 2011. Rapid detection and enumeration of *Giardia lamblia* cysts in water samples by immunomagnetic separation and flow cytometric analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* P. 5420–5427.
- Keymeulen B., Vandemeulebroucke E., Ziegler A., Mathieu C., Kaufman L., Hale G., y col. 2005. Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med.* 352:2598–608. [PubMed: 15972866].
- Kolaskar A. S., Tongaonkar P. C. 1990. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS letters* 276: 172–174.
- Larocque, R., K. Nakagaki. 2003. Oral immunization of BALB/c mice with *Giardia duodenalis* recombinant cyst wall protein inhibits shedding of cysts. *Infect Immun.* 71(10): 5662-5669.
- Larsen J. E., Lund O., Nielsen M. 2006. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Research.* Doi:10.1186/1745-7580-2-2.
- Lee, P., Abdul-Wahid, A., Faubert, G. 2011. Vaccination against *Giardia*. 333-351p.
- Levitt M. 1978. Conformational preferences of amino acids in globular proteins. *Biochemistry.* 17(20):4277-4285
- Li W., Saraiya A. A., Wang C. C. 2013. Experimental verification of the identity of variant-specific surface proteins in *Giardia lamblia* trophozoites. *mBio* 4(3):e00321-13. doi: 10.1128/mBio.00321-13.
- Lopez C., Quintero J., Astiazarán H., Velázquez C. 2015. Host defences against *Giardia lamblia*. *Parasite Immunol*, 37, 394–406.
- Lujan, H. D., Svärd S. 2011. Antigenic Variation in *Giardia*, Ch. 16. *Giardia* a model organism. SpringerWeinNewYork (Ed.). P. 245-247. Wien, Austria.
- Lujan H. D., Mowatt M., Wu J., Lu Y., Lees A., Chance M., Nash T. 1995. Purification of a variant specific surface protein of *Giardia lamblia* and characterization of its metal-binding properties. *J Biol Chem.* 270: 13807–13813.

- Manser M., Granlund M., Edwards H., Saez A., Petersen E., Evengard B., Chiodini P. 2013. Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in clinical laboratories in Europe—a comparative study. *Clin Microbiol Infect.* 20: O65–O71.
- Marshall, M.M., Naumovitz, D., Ortega, Y.R., Sterling, C.R. 1997. Waterborne protozoan pathogens. *J Clin Microbiol.* 10:67-85.
- McLennan A., Bates A., Turner P., White M. 2012. BIOS Instant Notes in Molecular Biology. 4th ed. Garland Science. New York.
- Moss, D. M., Mathews, H. M. 1990. Antigenic variation of *Giardia lamblia* in the feces of Mongolian gerbils. *J Clin Microbiol.* 28(2): 254-257.
- Mowatt, M.R., Aggarwal, A., and Nash, T.E. 1991 Carboxyterminal sequence conservation among variant-specific surface proteins of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol* 49: 215–228.
- Nash, T.E. 2002. Surface antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Mol Microbiol.* 45: 585-590.
- Nash T. E., Lujan H. T., Mowatt M. R., Conrad J. T. 2001. Variant-specific surface protein switching in *Giardia lamblia*. *Infect Immun.* 69: 1922–1923.
- Nash T. E. 1997. Antigenic variation in *Giardia lamblia* and the host's immune response. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 352: 1369–1375.
- Nash T. E., Conrad J. T., Merritt J. W. 1990. Variant specific epitopes of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol.* 42:125–132.
- Nash T. E., Herrington D. A., Losonsky G. A. and Levine M. M. 1987. Experimental human infections with *Giardia lamblia*. *J Infect Dis.* 156: 974–984
- Nielsen M., Lund O., Buus S., Lundegaard C. 2010. MHC Class II epitope predictive algorithms. *Brit Soc Immunol* 130, 319–328.
- Owen R. L., Allen C. L., Stevens D. P. 1981. Phagocytosis of *Giardia muris* by macrophages in Peyer's patch epithelium. *Infect Immun.* 33:591-601.
- Palm, D., Weiland, M., Griffiths, W., Ljungström, I., Svärd, S. 2003. Identification of immunoreactive proteins during acute human Giardiasis. *J Infect Dis.* 187:1849-59.

- Pandey, Sh. 2010. Hybridoma technology for production of monoclonal antibodies. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. Volume 1, Issue 2, Article 017 ISSN 0976 – 044X.
- Papanastasiou P., Bruderer T., Li Y., Bommeli C., and Köhler P. 1997a. Primary structure and biochemical properties of a variant-specific surface protein of *Giardia*. Mol Biochem Parasitol 86: 13–27.
- Parker J. M, Guo D., Hodges R. S. 1986. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. Biochemistry 25: 5425–5432.
- Pavanelli W., Salazar F., Nogueira J., Conchon I., Noronha M., Abreu F, Nakagawa E., Ehara M. 2010. The effects of nitric oxide on the immune response during giardiasis. Braz J Infect Dis. 14(6):606-612.
- Pellequer J. L., Westhof E., Vanregenmortel M. H. 1993. Correlation between the Location of Antigenic Sites and the Prediction of Turns in Proteins. Immunology Letters 36: 83–100.
- Quintero, J., Figueroa, D.C. 2013. Identification of a *Giardia lamblia* immunogenic protein by using monoclonal antibodies generated from splenocytes derived from infected mice. Mem Inst Oswaldo Cruz .108(5):616-22.
- Quintero, J. 2013. Generación y aplicación de sensores biológicos para la identificación de epítopes inmunodominantes de proteínas de *Giardia lamblia* que estimula una respuesta inmunológica. Tesis de Doctorado. Universidad de Sonora. Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales. Hermosillo, Sonora, México.
- Rascón Durán, M. L. 2008. Caracterización bioquímica parcial de antígenos inmunodominantes de *Giardia lamblia* capaces de inducir una respuesta inmune humoral en un modelo murino. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias Químico-Biológicas. Hermosillo, Sonora, México.

- Reiner, D., Shinnick, T., Ardeshir, F., Gillin, F. 1992. Encystation of *Giardia lamblia* leads to expression of antigens recognized by antibodies against conserved heat shock proteins. *Infection and immunity*, p. 5312-5315.
- Rivero F.D., Saura A., Prucca C.G., Carranza P.G., Torri A., Lujan H.D. 2010. Disruption of antigenic variation is crucial for effective parasite vaccine. *Nat Med*; 16: 714 551-557
- Rohrer, L., K. H. Winterhalter, J. Eckert, and P. Kohler. 1986. Killing of *Giardia lamblia* by human milk is mediated by unsaturated fatty acids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30:254–257.
- Romero, C., Herrera, B. 2002. Síndrome Diarreico Infeccioso. 1a ed. Panamericana. México, D.F.
- Roxstrom-Lindquist K., Palm D., Reiner D., Ringqvist E., Svard S.G. *Giardia* immunity an update. *Trends Parasitol* 2006; 22: 26-31.
- Samaniego Soto, B. G. 2014. Evaluación de la Capacidad Protectora del Anticuerpo Monoclonal 5G8.B5 Durante la Infección Intestinal por *Giardia lamblia* en un Modelo Gerbil. Tesis de licenciatura. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias Químico-Biológicas. Hermosillo, Sonora, México.
- Samuelson, J. 2002. What *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* tell us about the evolution of eukaryotic diversity. *J Biosci. (Suppl. 3)* 27:559-565.
- Schlesinger, M. J. 1990. Heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 265:12111-12114.
- Singer, S.M., Nash, T.E. 2000. T-Cell dependent control of acute *Giardia lamblia* infection in mice. *Infect Immun.* 68(1): 170-175.
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 2012. Descripción y Comportamiento de las Enfermedades de Notificación Semanal. Síntesis Epidemiológica 2009. Secretaria de Salud. Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud.
- Smith P. D. 1985. Pathophysiology and immunology of giardiasis. *Annu Rev Med.* 36:295– 307.

- Snider D. P. and Underdown B. J. 1986. Quantitative and temporal analyses of murine antibody response in serum and gut secretions to infection with *Giardia muris*. *Infect Immun.* 52: 271–278.
- Solaymani-Mohammadi S., Singer S. M. 2010. *Giardia duodenalis*: the double-edged sword of immune responses in giardiasis. *Exp Parasitol.* 126: 292–297.
- Soliman, M., Taghi-Kilani, R., Abou-Shady, A., El-Mageid, S. 1998. Comparison of serum antibody responses to *Giardia lamblia* of symptomatic and asymptomatic patients. *Am J Trop Med Hyg.* 58:232-239.
- Steuart R. F., O’Handley R., Lipscombe R. J., Lock R. A., Thompson R. C. 2008. Alpha 2 giardin is an assemblage A-specific protein of human infective *Giardia duodenalis*. *Parasitol.* 135(14):1621-1627.
- Svärd S., Meng T., Hetsko M., McCaffery M. y Gillin F. 1998. Differentiation-associated surface antigen variation in the ancient eukaryote *Giardia lamblia*. *Mol Microbiol.* 30(5): 979–989.
- Switaj T. L., Winter K. J., Christensen S. R. 2015. Diagnosis and Management of Foodborne Illness. *Am Fam Physician.* 92(5):358-65.
- Tellez, A., Winiecka-Krusnell, J., Paniagua, M., Linder, E. 2003. Antibodies in mother’s milk protect children against Giardiasis. *Scand J Infect Dis.* 35:322-325.
- Valencia Peña, M. L. 2013. Evaluación de la respuesta inmune humoral inducida por trofozoítos de *Giardia lamblia* de las cepas 5G8 (+) y GS/M-83-H7 en un modelo de infección murino. Tesis de licenciatura. Universidad de Sonora. Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Hermosillo, Sonora México.
- Valenzuela Antelo O. 2006. Bioestadística aplicada. Unison. Hermosillo, Sonora.
- Vázquez Tsuji, O., Campos Rivera, T. 2009. Giardiasis, la parasitosis más frecuente a nivel mundial. *Rev del Centro de Inv.* 8, 31.
- Velázquez, C., Beltran, M. 2005. *Giardia lamblia* infection induces different secretory and systemic antibody responses in mice. *Parasite Immunol.* 27(9): 351-356.
- Vesey C. J., Peterson W. L. 1999. Review article: The management of Giardiasis. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13: 843-850.

- Weiland, M. E., Palm, J. E. 2003. Characterisation 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.
- Wolfe, M. 1992. Giardiasis. *Clin Microbiol Rev.* 5(1): 93-100.
- Zhang B., Liang S., Zhang C. 2012. SVMTriP: A Method to Predict Antigenic Epitopes Using Support Vector Machine to Integrate Tri-Peptide Similarity and Propensity. *PLoS ONE* 7(9): e45152.
- Yang Y. M., Adam R. D. 1995. Analysis of a repeat containing family of *Giardia lamblia* variant-specific surface protein genes: diversity through gene duplication and divergence. *J Eukaryot Microbiol.* 42:439 –444.
- Zell S.C., Budhraj M., Riggs J. L., Sorenson, S.K. 1990. Monoclonal antibody detection of *Giardia lamblia* cysts in human stool by direct immunofluorescence. *Journal of Wilderness Medicine* 1,203-207.

ANEXO 1

Cultivo de *G. lamblia*

Materiales:

- Incubadora a 37 °C.
- Tubos de ensayo 13 x 100 con tapón de rosca estériles.
- Pipetas serológicas estériles de 10, 5 y 1 mL.
- Pipetor (Drummond Broomal, Scientific CO).
- Mechero.
- Sistema de filtración (Steril aseptic system, millipore, 01730 Bradford MA).
- Filtros de poro 0.45 µm.
- Campana de flujo laminar (Purifier class II biosafety cabinet, Delta series, LABCONCO).

Reactivos:

Medio de Cultivo TYI-S-33 (Para 1 litro)

Tripticasa.....20 g
(*BBL Triticase Peptone Pancreatic Digest of Casein*) BD 211921 445 g.

Extracto de Levadura10 g
(*Bacto Yeast Extracto Technical*) BD 288620 500 g. LOT. 3290441

Dextrosa.....10 g
(*D – (+) – Dextrose*) SigmaD9434 500 g. Batch #108K0014

NaCl.....2 g
Sigma 5-5886

L-Cisteína.....	2 g
<i>(L-Cysteine Hydrochloride Monohydrate from non-animal Source) Sigma C6852-1006</i>	
Fosfato de Sodio dibásico.....	1 g
<i>Sigma S0876-1KG</i>	
Fosfato de Sodio monobásico.....	0.6 g
<i>Sigma S0751-500 g.</i>	
Bilis.....	0.6 g
<i>(Bile FromBovine and Ovine) Sigma B8381-1006</i>	
Ácido ascórbico.....	0.1 g
<i>(L-Ascorbic Acid) P.M.= 176 Sigma A5960-25G 065K0181</i>	
Citrato férrico amoniacal.....	0.023 g

Antibióticos:

Ceftriaxona 100 µg/mL (AMSA, Laboratorios, solución inyectable, 1G/1M/3.5mL).

Una vez disueltos los componentes en polvo, se ajusta el pH a 6.9 con NaOH. Adicionar el antibiótico ceftriaxona (100 µg/mL), Suplementar al 10 % con de suero de ternera recién nacida (MICROLAB, LOT. M-8397) y se afora a 1000 mL con agua ultrapura. Finalmente esterilizar por filtración con filtro de 0.45 µm.

Procedimiento:

1. Adicionar aproximadamente 7.5 mL de medio TYI-S-33 suplementado al 10 % con NBCS en un tubo de ensayo 13 x 100 estéril.
2. Adicionar 0.5 mL de cultivo de *G. lamblia* en confluencia (1×10^6 trofozoítos/mL).

El pase se realiza en condiciones completamente estériles, en una campana de flujo laminar Bioseguridad II.

ANEXO 2

Obtención de Extractos de Proteínas Solubles de *G. lamblia*

Reactivos:

Solución reguladora de fosfatos-salina (PBS) pH 7.2

Inhibidor de proteasas (23 mM 4-(2-aminoetil) fluoruro benceno sulfonilo (AEBSF), 0.3 mM pepstatina A, 0.3 mM E-64, 2 mM bestatina, y 100 mM de EDTA sódico (Sigma, St. Louis, MO, USA),

Procedimiento:

1. Colocar en agua hielo (10 min) los tubos que contengan los cultivos axénicos de trofozoítos de *G. lamblia* [trofozoítos 5G8 (+)].
2. Centrifugar a 800 g por 10 minutos a 4 °C (Fisher Scientific, MARATON 3000 R) y lavar 3 veces con PBS estéril pH 7.2.
3. Resuspender en 1.4 mL de PBS pH 7.2.
4. Obtener la concentración celular por un hematocitometro (5 µL de la suspensión celular + 995 µL de PBS, dilución 1:200). Tomar 20 µL de la suspensión + 20 µL de con azul de tripano (dilución 1:2) (Sigma, T-8154).
5. Adicionar 5 µL de inhibidor de proteasas (Sigma, St. Louis, MO, USA) y lisar las células sometiendo el microtubo a 3 ciclos de congelación y descongelación

(congelador -80 °C. Thermo Fisher Scientific modelo 703) hasta que la suspensión esté completamente congelada (aproximadamente 45 minutos).

6. Retirar del congelador y dejar descongelar a temperatura ambiente (aproximadamente 15 minutos).
7. Sonicar por 3 ciclos de 20 segundos a una amplitud de 10 % (Brandon Sonifier 250, Shelton, CT, USA) manteniendo el microtubo con el lisado de trofozoítos frío durante el proceso.
8. Centrifugar a 10,000 g a 4 °C por 20 min, recuperar el sobrenadante el cual contiene la mezcla heterogénea de proteínas solubles de *G. lamblia*. Almacenar a -80 °C hasta su uso.

ANEXO 3

Electroforésis en Geles de Poliacrilamida en Condiciones Ligeramente Desnaturalizantes y Reductoras (SDS-PAGE)

Reactivos:

*Acilamida/Bisacrilamida 30%

Acilamida.....30 g

N,N-metilen-bisacrilamida.....0.8 g

Mezclar en 100 mL de agua MiliQ. Filtrar la solución con un filtro de 0.45 μ m. Almacenar en frasco color ambar a 4°C. Descartar el reactivo después de 30 días para evitar la hidrólisis a ácido acrílico y amoníaco.

NOTA: La acrilamida monomérica es neurotóxica por lo cual se debe usar mascarilla y guantes durante su preparación.

*Trizma-base/SDS, pH 6.8 4X (Trizma-base 0.5 M conteniendo SDS al 0.4%).

Trizma-base.....6.05 g

Agua ultrapura.....40 mL

Ajustar el pH a 6.8 con HCl 1N, aforar a 100 mL. Filtrar con un filtro de 0.45 μ m de diámetro de poro y adicionar 0.4 g de SDS. Almacenar a 4°C.

*Trizma-base/SDS pH 8.8 4X (Trizma-base 1.5 M conteniendo SDS al 0.4%).

Trizma-base.....91 g

Agua ultrapura.....100 mL

Ajustar el pH a 8.8 con HCl 1N, aforar a 500 mL. Filtrar con un filtro de 0.45 µm de diámetro de poro y adicionar 2 g de SDS. Almacenar a 4°C.

*Persulfato de amonio (APS) al 10%

(NH₄)₂S₂O₈.....10 µg

Agua ultrapura100 µL

*TEMED (N,N,N,N-Tetrametilen diamina) (Directo)

*Buffer de corrida 1X, pH 8.3

Glicina.....72 g

Trizma-base.....15.1 g

SDS.....5 g

*Disolver en agua ultrapura y aforar a 1 L. Para obtener la solución de trabajo 1 X diluir 1:5 la solución stock con agua ultrapura y ajustar el pH a 8.3. Almacenar a 4 °C.

*Gel separador (2 minigeles de 6 X 8 cm y separador de 0.75 mm)

Acrilamida/Bisacrilamida 30 %/ 8 %.....6.0 mL

Buffer Tris 4X con SDS pH 8.8.....3.75 mL

Agua des-ionizada.....5.25 mL

Persulfato de amonio (PSA).....0.08 mL

TEMED.....0.018 mL

*Gel concentrador (2 minigeles de 6 X 8 cm y separador de 0.75 mm)

Acrilamida/Bisacrilamida 30 %/ 0.8 %..... 0.65 mL

Buffer Tris-SDS pH 6.8.....1.25 mL

Agua ultrapura.....3.05 mL

Persulfato de amonio.....0.07 mL

TEMED.....0.01 mL

*Solución reguladora muestra (“buffer” muestra) 2X. Tris 0.125 M, SDS 0.05 %, glicerol 20 % y 2-mercaptoetanol 0.05 %.

En un pequeño volumen de agua ultrapura disolver 0.38 g de Trizma-base.

Ajustar pH a 6.8 y adicionar los siguientes reactivos en campana ventilada:

SDS.....1 g

Glicerol.....5 mL

2-Mercaptoetanol.....2.5 mL

Azul de bromofenol.....0.5 mg

Aforar a 25 mL con agua ultrapura y almacenar en congelación.

*Alcohol etílico al 70 % (1 L)

Alcohol etílico absoluto (96 %). 729.17 mL

Agua ultrapura 270.83 mL

*Solución Azul de Coomassie

Metanol. 50 % (v/v)

Azul de Coomassie brillante R-250. 0.05 % (v/v)

Ácido acético. 10 % (v/v)

Agua ultrapura 40 % (v/v)

*Solución Desteñidora I

Metanol. 50 % (v/v)

Ácido acético. 10 % (v/v)

Agua ultrapura 40 % (v/v)

*Solución Desteñidora II

Metanol. 5 % (v/v)

Ácido acético. 7 % (v/v)

Agua ultrapura 88 % (v/v)

Procedimiento:

Ensamblar los vidrios en el equipo para geles de 0.75 mm.

Preparar el gel de separación al 12 %:

Acrilamida/Bisacrilamida 30 % / 8 %.....6 mL

Buffer Tris 4X/SDS pH 8.8.....3.75 mL

Agua ultrapura5.25 mL

Persulfato de amonio.....0.08 mL

TEMED.....0.018 mL

Mezclar bien y colocar la solución en los vidrios, adicionar alcohol etílico al 70 % y dejar polimerizar a temperatura ambiente.

Preparar el gel concentrador al 12 %:

Acrilamida/bisacrilamida 30 % / 8 %.....0.65 mL

Buffer tris 4X/SDS pH 8.8.....1.25 mL

Agua ultrapura.....3.05 mL

Persulfato de amonio.....0.07 mL

TEMED.....0.01 mL

Mezclar bien y colocar la solución en los vidrios, colocar el peine para crear los pocillos y dejar polimerizar a temperatura ambiente.

1. Adicionar el gel de separación al 12 % de 0.75 mm de grosor. Mezclar muy bien y colocar el gel en los vidrios y adicionar unas gotitas de alcohol etílico al 70 % con una pipeta Pasteur, evitando la formación de burbujas.
2. Dejar polimerizar por aproximadamente una hora a temperatura ambiente.
3. Adicionar el gel concentrador, con pozos de 5 mm de ancho aproximadamente y poner el peine que formará los pozos inmediatamente después de colocar la solución del gel separador entre los vidrios para electroforesis. Dejar polimerizar por una hora a temperatura ambiente.
4. Realizar una dilución del extracto antigénico soluble de *G. lamblia* 1:5 con solución de buffer muestra 6X en un microtubo. Mezclar muy bien la solución de antígeno en el vórtex.
5. Tomar 8 μ L de Marcador Peso Molecular (MPM)
6. Cargar la muestra antigénica y MPM en los pozos respectivos y correr a 100 Voltios constantes por aproximadamente una hora y media, evitando liberar el frente del gel.

ANEXO 4

Determinación de Proteína Por el Micrométodo de Bradford

Reactivos:

Reactivo de Bradford (Sigma, B-6916)

Material:

- Microtubos cónicos (Eppendorf) de 1.5 mL.
- Micropuntas (1 y 100 μ L).
- Micropipetas (100-1000 y de 10-100 μ L).
- Placas de 96 pozos (fondo plano).
- Lector de microplacas con filtro de 570 nm (Multiskan EX, ThermoLabsystem).

Procedimiento:

1. Preparar diluciones seriadas a partir de un estándar de albúmina (ABS, Biorad, Quick Start Bradford Protein Assay Kit 1 #500-0201) a una concentración de 1.4 mg/mL en PBS. Obtener las siguientes concentraciones; 0.088, 0.177, 0.355 y 0.710 mg/mL.
2. Adicionar 5 μ L de la solución de ABS, de la muestra problema y del control negativo de PBS en los pozos de la placa por triplicado.
3. Adicionar por pozo 250 μ L del reactivo de Bradford, incubar por 15 min a temperatura ambiente y medir la densidad óptica en un lector de microplacas a 570 nm.
4. Graficar la curva estándar de ABS y obtener la ecuación, así como su coeficiente de correlación para confirmar la confiabilidad de los datos.
5. Obtener la concentración de proteína de la muestra problema.

ANEXO 5

Inmunodetección de la Proteína 5G8 en Antígeno de *G. lamblia*

Reactivos:

- Buffer de transferencia 10X, pH 8.3 (Tris/Glicina 0.039 M, 10X, pH 8.3)

Tris base.....30.3 g

Glicina.....144.0 g

Aforar hasta 1L con agua desionizada y ajustar el pH con glicina, no con HCl o NaOH.

- Buffer de transferencia 1X Tris-Glicina pH 8.3

Tris glicina 10X.....100 mL

Metanol200 mL

SDS.....1 g

Agua deionizada.....800 mL

Ajustar pH antes de aforar con NaOH o HCl

- Solución de bloqueo (PBS pH 7.2, leche descremada svelty ® 5 %)

PBS 1X pH 7.2.....20 mL

Leche svelty ®.....2 g

Mezclar en vortex. Usar esta solución recién preparada.

PBS-ABS 1 %

PBS 1X pH 7.2.....10 mL

ABS.....0.1 g

Reactivos para el sistema de revelado

Solución luminol-H₂O₂. Mezclar un volumen de luminol con un volumen igual de H₂O₂. Para una membrana control se requiere 200 µL de dicha mezcla, para un control de dot-blotting se requieren 50 µL.

Solución reveladora Kodak. Para preparar 400 mL:

1. Agregar 200 mL de agua destilada.
2. Adicionar 87 mL de la solución reveladora GBX y mezclar bien.
3. Llevar a un volumen final de 400 mL con agua destilada y mezclar perfectamente (113 mL de agua).
5. Almacenar la solución en recipientes ámbar y protegidos de la luz a temperatura ambiente.

Solución Fijadora Kodak. Para preparar 400 mL:

1. Agregar 200 mL de agua destilada.
2. Adicionar 87 mL de solución fijadora GBX y mezclar bien.
3. Llevar a un volumen final de 400 mL con agua destilada y mezclar perfectamente (113 mL de agua).
4. Almacenar la solución en recipientes ámbar y protegidos de la luz a temperatura ambiente.

Materiales:

Tubos de ensaye 13X100

Micropuntas de 100 µL

Micropipetas de 10-100 μ L

Pinzas

Recipientes de plástico

Papel adherente transparente

Equipo:

Modelo No. Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell, No. de serie 221BR 51543, 50W, 25 VDC.

Fuente de poder (Ec-Apparatus Corporation, EC500)

Método:

1. Correr una SDS-PAGE 12 % con una solución de extracto proteico de *G. lamblia* en geles preparativos.
2. Electrotransferirlo a membranas de nitrocelulosa (NC) en condiciones semisecas.
3. Colocar el gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulosa y dos pads (BIORAD) en solución de transferencia 1X, pH 8.3 por 5 a 15 minutos.
4. Organizar de la siguiente manera los pads: pad, membrana de NC, gel de poliacrilamida y pad. Eliminar en cada paso las burbujas que se forman por la solución reguladora pasando un tubo limpio sobre la capa.
5. Electrotransferir en un sistema semi seco (Modelo No. Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell, No. de serie 221BR 51543, 50W, 25 VDC) por 1 hora 15 minutos a 15 V, y amperaje recomendable no más de 0.1 A. (para geles de 1.5 mm).
6. Almacenar la membrana de NC a -20 °C hasta su uso.

7. Teñir el gel transferido con azul de Comassie para confirmar la adecuada transferencia del antígeno.

Inmunodetección:

1. Bloquear las membranas de NC electrotransferidas con PBS 1X-ABS 1 %-leche 5 % por 1 hora a temperatura ambiente.

2. Enjuagar la membrana con PBS 1X para quitar el exceso de solución bloqueadora.

3. Adicionar el primer anticuerpo a una concentración de 1 µg/mL (AcMo 5G8.B5 y Ac Control de Isotipo aBDC.2, IgG2b) con PBS-ABS 0.1 %.

4. Incubar en agitación por 1 hora a temperatura ambiente.

5. Realizar 5 lavados de 5 minutos con PBS 1X, pH 7.2

6. Adicionar el segundo anticuerpo (cabra anti-ratón α -IgG peroxidasa conjugada, SIGMA) 1:7500 con PBS-ABS 0.1 %.

7. Incubar en agitación por 1 hora a temperatura ambiente.

8. Realizar 5 lavados de 5 minutos con PBS 1X, pH 7.2

9. Colocar las tiras de membrana en papel transparente y adicionar 100 µL de la solución quimioluminiscente: una parte de luminol mas una parte de H₂O₂. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.

10. Exponer las tiras de 30-60 segundos a una película y revelar manualmente.

Proceso de revelado manual: El proceso de exposición y revelado se realiza en un cuarto oscuro:

- Exponer la película 10 segundos en la solución reveladora.

-Enjuagar en agua por 10 segundos.

-Exponer la película 10 segundos en la solución fijadora.

-Enjuagar en agua por 10 segundos y deje secar.

ANEXO 6

Tinción Superficial e Intracelular de Trofozoítos de *G. lamblia*

Soluciones:

PBS 1X, pH 7.2 frío.

DMEM-N_aN₃ 0.05 %

Paraformaldehído

Tinción Intracelular:

1. Fijar trofozoítos de *G. lamblia* por 30 minutos con 1 % de paraformaldehído.
2. Lavar (2 veces) con PBS frío, los trofozoítos se permeabilizaron por 5 minutos con 0.1 % de Triton X-100 a temperatura ambiente.

Tinción Superficial:

1. Para la tinción superficial los trofozoítos fueron no permeabilizados.
2. Lavar (2 veces) con PBS frío.
3. Incubar a 4 °C por 1 hora con el AcMo 5G8.B5 (1 µg/mL) o con el control de isotipo aBDC.2 (IgG2b, 1 µg/mL).
4. Lavar 2 veces con PBS frío.

5. Incubar los trofozoítos por 1 hora a 4 °C con el anticuerpo anti-ratón IgG de cabra conjugado con FITC (diluido a 1:200 con 0.05 % de N_aN_3 -DMEM).
6. Lavar 2 veces con PBS frío.
7. Analizar la expresión de la proteína 5G8 por medio de un citómetro de flujo Becton Dickinson (Canto II FACS, CA, USA), o analizar la expresión de la proteína 5G8 por microscopía confocal.

ANEXO 7

Inducción de Giardiasis en el Modelo Gerbil

Reactivos

1. Solución reguladora de fosfatos (PBS) 10 X, pH 7.2

NaH₂PO₄.....1.9 g

Na₂HPO₄.... 12 g

NaCl..... 85 g

Disolver en 800 mL de agua desionizada, ajusta pH a 7.2 con un Potenciómetro (HANNA Instruments. pH 211) y aforar a 1000 mL con agua desionizada. Para preparar PBS 1X, diluír 1:10 con agua desionizada.

Durante su uso en el proceso de infección mantener el PBS a 4 °C

Método

1. Someter a los gerbos a infectar a 6 o 9 horas de ayuno, con el fin de favorecer la infección.
2. Mantener el cultivo de trofozoítos de *G. lamblia* por 20 minutos en agua-hielo para liberar los trofozoítos adheridos a la pared del tubo.
3. Lavar los trofozoítos 3 veces en solución PBS 1X, pH 7.2, usando centrífuga (Thermo IEC Marathon 3000R, Fisher Scientific) a 800 g por 5 minutos a 4 °C.
4. Para su cuantificación en el hemacitómetro (cámara Neubauer) se toma una alícuota de estos trofozoítos y se hace una dilución 1:20 con PBS 1X y una posterior dilución 1:2 con azul de triptano.

5. Después del último lavado resuspender la pastilla de trofozoítos en PBS 1X y ajustar a 1×10^6 trofozoítos en 200 μ L de PBS 1X.

6. Con ayuda de una jeringa para alimentación forzada, se inoculan por vía oral 200 μ L de la suspensión de trofozoítos a temperatura ambiente.

Nota: Mantener trofozoítos de *G. lamblia* a 4 °C durante toda su manipulación y antes de inocular.

ANEXO 8

Aislamiento y Purificación de Anticuerpos Monoclonales

Material:

- Incubadora a 37 °C.
- Cajas de cultivo estériles.
- Pipetas serológicas estériles de 10, 5 y 1 mL.
- Pipetor (Drummond Broomal, Scientific CO).
- Sistema de filtración (Steril aseptic system, millipore, Bradford MA 01730).
- Filtros de poro 0.45 μm .
- Sefarosa (Proteína A 4B, P-9424).
- Campana de flujo laminar (Purifier class II biosafety cabinet, Delta series, LABCONCO).

Procedimiento:

1. Cultivar los hibridomas (aBDC.2 o 5G8.B5) en condiciones normales, 37 °C en atmósfera de 5 % de CO₂.
2. Recolectar 3 litros del sobrenadante, almacenarlo en congelación hasta su uso.
3. Limpiar con HCl 1 mM una columna Bio-Rad y las mangueras, empacar en la columna la matriz de sefarosa la cual tiene proteína A.

4. Pasar los 3 litros de sobrenadante por la columna y una vez unidos los anticuerpos a la proteína A, eluir con 1.5 mL de glicina 0.1 M (pH 2.5) y recolectar en distintas fracciones en tubos de vidrio de 13 X 100 con 300 μ L de trizma 1M (pH 8).
5. Determinar la cantidad de proteína presente en las fracciones de interés, utilizando un espectrofotómetro de UV a 280 nm, en una cubeta de cuarzo. Almacenar las fracciones con mayor concentración de proteína a -80 °C, hasta su uso.
6. Realizar el pase del sobrenadante tres veces.
7. Mezclar, concentrar y dializar las fracciones seleccionadas. Realizar una SDS-PAGE para observar la pureza de la purificación.

ANEXO 9

Protocolo de Acoplamiento de Anticuerpo 5G8 a Esferas Preactivadas de Sefarosa

Método:

1. Preparar 500 mL de solución reguladora de acoplamiento.

0.1 M NaHCO₃.....4.2 g

0.5 M NaCl.....14.61 g

2. Descongelar 2.5 mg de Ac 5G8.B5. Concentración 1 mg/mL.

Diluir en 300 mL con agua ultrapura, ajustar el pH a 8.3 con NaOH (10 N) y aforar a 500 mL.

3. Colocar el Ac descongelado en una membrana de diálisis.

Colocar 2.5 mL del Ac (2.5 mg) más 2.5 mL de solución reguladora de acoplamiento, y dializar contra 3 L de solución reguladora de acoplamiento. Utilizar membranas de tubo Spectra/Por3 (MWCO 3,500). Part. Num 132720.

4. Dejar dializando toda la noche a 4 °C contra 2 L de solución reguladora de acoplamiento.

5. Remover el Ac del tubo de diálisis con una jeringa.

6. Medir la D.O. de la solución a 280 nm, contra blanco de reactivo. Puede ser necesario diluir la muestra 1:20 con solución reguladora de acoplamiento.

Calcular la cantidad de Ac en la solución de la siguiente manera:

$DO_{280} \times (FD \ 20) \times (1/1.35 \text{ mg/mL}) = \text{mg de Ac Total}$

7. Pesar un gramo de sefarosa 4B (activada con bromuro de cianógeno) (Sigma, C-9142), por cada 10 mg de Ac que se recupere en el paso 5 (Por 2.5 mg de Ac recuperado, pesar 0.25 g de sefarosa 4B).

8. Hidratar las esferas de sefarosa con 1 L de HCl (1 mM), esto se hace en un sistema con un embudo de vidrio incorporado a un matraz Kitasato, con una bomba de vacío.

NOTA: No dejar que se sequen las esferas durante los lavados. Incubar por 30 minutos en la solución de HCl (1 mM).

9. Lavar las esferas con solución reguladora de acoplamiento 1X, para eliminar los residuos de HCl. En el último lavado, dejar que el buffer se drene hasta el nivel del tope de las esferas.

10. Transferir las esferas (lo más rápido posible) a un tubo falcon de 15 mL, conteniendo el Ac dializado, raspando el embudo de cristal con una espátula.

11. Colocar el tubo, conteniendo el Ac y las esferas, en un rotador por 2 horas a temperatura ambiente (determinar el volumen de la solución de anticuerpo y de las esferas para una posterior determinación de concentración de Ac unido y liberado de las esferas). A este nivel el Ac se acopla a las esferas.

NOTA: El tubo debe estar sellado con parafilm.

12. Recuperar las esferas en el embudo de vidrio. Medir la DO 280 de la solución, para asegurar el acoplamiento del anticuerpo. Menos del 5 % del Ac no se va a unir a las esferas y se quedará en la solución.

ANEXO 10

Enriquecimiento de la Población de *G. lamblia* 5G8 (+) Mediante la Técnica de Inmunoadsorción

1. Incubar en una placa de 6 pozos 50 µg de anticuerpo monoclonal 5G8.B5 en cada pozo durante una hora a 37 °C.
2. Retirar la solución de anticuerpo utilizando una micropipeta y bloquear los sitios libres de anticuerpo en el pozo con 1 mL de PBS-BSA 1 % estéril durante una hora a 37 °C.
3. Realizar cinco lavados suaves con PBS estéril, y agregar 2×10^6 trofozoítos de *G. lamblia* de la cepa GS/M-83-H7 en cada pozo previamente resuspendidos en PBS-BSA al 1 %.
4. Incubar durante 20 minutos a 4 °C en agitación constante y decantar de manera suave utilizando una micropipeta, realizar cinco lavados con PBS estéril.
5. Adicionar medio de cultivo TYI-S33 suplementado con 10 % de suero de ternera recién nacida (MICROLAB, LOT. M-8397) e incubar por 10 minutos a 4 °C.
6. Recuperar los trofozoítos con una micropipeta y mantener en cultivo hasta obtener una cantidad suficiente.
7. Realizar una inmunotinción indirecta utilizando el anticuerpo monoclonal 5G8.B5 y evaluar el patrón de expresión superficial de los trofozoítos mediante citometría de flujo.

ANEXO 11

Secuencias

Aminoácidos

11.1.- 28 kDa

MLNKFALVAVILQIARAAC TPGTETTNC KDGACNVQIGGETYCSQC YTTSEAPVDGVCTA
STDSKCTKQDTQNGTCKS CAANYFLFKGGCYQIGQSPGSLICQTASNTD GICQTKDGYF
TVSDATATQDSCVACGD ENCATCTVGAEQQKCSKCKADGKMYLKKNTG SETGTCVTADEC
TAAKDYTTDDTSSEPNGK TCKACSAKVENCASCSSEGACQK CASGFVLEGSNCVKSDCST
ENCKTCTNPKAANEACTAC VTMFLTPPASA

Sequence Length: 271 aa

11.2.- 38 kDa

EGSNVCVKSDCSTENCKT CTNPKAANEACTACVTGMFLTP TGQCIDECVTISGYYGTADGK
CKKCEVANCVVCGATGACD LCADGFYGS SSKCYESCKNCKGATASDCTAC PAGRALIYG
DDPTKGTGEGCTTGTGKG ACKACDLTIDGTKYCSACDTATEY PQNGVCATPTARASSCQ
SQNVASGACNTCENGFFKM NGGCYSTS QLPGSTVCVTAPTGGTCTKSE PGYNVNSGTLVT
CGVGCAECTNSDSCTTCA SGYVKL TSAATCTKCDAGCATCTTAA STCSTCADGYLNSK
CIACDKSDGSIAGVKDCL SCAAPSGSTGPVLCYLVRDSASV NKGLSSGAIAGISVAVIV
VVGGLVGFLCWWFICRGKA

Sequence Length: 379 aa

11.3.- Constructo 71 kDa (5G8)

MLNKFALVAVILQIARAAC TPGTETTNC KDGACNVQIGGETYCSQC YTTSEAPVDGVCTASTDS
KCTKQDTQNGTCKS CAANYFLFKGGCYQIGQSPGSLICQTASNTD GICQTKDGYFTVSDATAT
QDSCVACGDENCATCTVG AEQQKCSKCKADGKMYLKKNTG SETGTCVTADECTAAKDYTTDDTS
SEPNGK TCKACSAKVENCASCSSEGACQK CASGFVLEGSNCVKSDCSTENCKTCTNPKAANEAC
TACVTGMFLTPTGQC IDECVTISGYYGTADGKCKKCEVANCVVCGATGACD LCADGFYGS SSK
CYESCKNCKGATASDCTAC PAGRALIYGDDPTKGTGEGCTTGTGKG ACKACDLTIDGTKYCSA
CDTATEY PQNGVCATPTARASSCQS QNVASGACNTCENGFFKM NGGCYSTS QLPGSTVCVTAPT
GGTCTKSE PGYNVNSGTLVTCGVGCAECTNSDSCTTCA SGYVKL TSAATCTKCDAGCATCTTAA
STCSTCADGYLNSKCIACDKSDGSIAGVKDCL SCAAPSGSTGPVLCYLVRDSASV NKGLSS
GAIAGISVAVIVVVGGLVGFLCWWFICRGKA

Sequence Length: 607 aa

Nucleótidos

11.4.- 28 kDa

ATGTTGAATAAAATTTGCCCTTGTAGCCGTAATTCTCCAGATCGCCCGGGCCGCCTGCACG
CCAGGCACTGAAACTACTAACTGCAAGGATGGCGCATGCAACGTCCAGATTGGCGGTGAG
ACATACTGCTCGCAGTGCTACACAACAAGCGAAGCACCAGTTGATGGGGTATGCACAGCA
AGTACTGATTCTAAATGCACAAAACAGGATACCCAAAATGGCACTTGTAAATCCTGCGCA
GCGAACTACTTCCTCTTTAAGGGAGGGTGTATCAAATCGGACAATCTCCCGGTAGTTTG
ATTTGTCAAACCTGCAAGCAACACCGATGGAATCTGTCAAACCTTGTAAAGGATGGCTACTTC
ACGGTTTTAGACGCTACTGCTACTCAGGACTCCTGTGTTGCCTGCGGGGACGAGAAGTGC
GCAACGTGCACAGTAGGAGCAGAACAGCAGAAGTGCAGCAAGTGAAGGCCGACGGCAAG
ATGTACCTGAAGAAGAATACTGGTAGTGAGACAGGCACCTGCGTCACTGCCGACGAGTGC
ACAGCAGCCAAGGATTATTACACAGACGATACCAGCAGTGAACCAAATGGTAAGACGTGC
AAGGCGTGCAGCGCAAAGGTGGAGAAGTGTGCTTCCTGCAGCAGTGAAGGAGCCTGCCAG
AAGTGCGCCTCTGGCTTTGTATTGGAGGGATCGAACTGCGTCAAGAGCGATTGCAGTACC
GAGAAGTGAAGACGTGCACCAACCCGAAGGCAGCCAACGAGGCCTGCACAGCGTGTGTT
ACTGGCATGTTTCTACCCACCGGCCAGTGCATAG

Sequence Length: 816 bp

11.5.- 38 kDa

GAGGGATCGAACTGCGTCAAGAGCGATTGCAGTACCGAGAAGTGAAGACGTGCACCAAC
CCGAAGGCAGCCAACGAGGCCTGCACAGCGTGTGTTACTGGCATGTTTCTACCCCGACC
GGCCAGTGCATAGACGAGTGCCTAACTATCTCCGGCTACTACGGAACAGCTGATGGCAAG
TGCAAGAAATGCGAAGTTGCTAACTGCGTCGTCTGCGGGGCAACTGGAGCGTGCATCTT
TGCGCTGACGGCTTCTACGGTTCGAGCTGCTCTAAGTGTACGAGAGCTGCAAGAATTGC
AAAGGAGCTACTGCCAGCGACTGCACAGCGTGCCCTGCTGGGAGGGCGCTCATCTACGGA
GATGATCCCAAGGGCAGTGCAGGAGAGGGTTGCACGACAGGCACAGGGAAAGGTGCA
TGTAAGGCATGCGATTTAACGATCGACGGGACGAAGTACTGCTCTGCCTGTGACACGGCT
ACTGAATATCCGCAGAACGGCGTGTGTGCGACGCCACTGCACGTGCCTCCTCGTGTGAG
AGCCAAAATGTTGCTAGTGGTGCCTGCAATACTTGTGAAAATGGCTTCTTCAAGATGAAC
GGGGGCTGCTACTCCACCAGCCAGCTCCCGGGGTGACGGTGTGCGTCACTGCGCCGACC
GGAGGAACATGCACCAAATCAGAGCCGGGCTACAATGTGAATAGCGGCACCCTTGTAACC
TGTGGTGTGGCTGCGCTGAGTGTACCAACTCTGATTCATGTACTACATGTGCATCTGGA
TATGTCAAGCTCACTAGTGTGCCACTTGACAAAAGTGCAGCGTGGGTGTGCCACGTGT
ACAAGTGTGCCTCAACCTGCAGCACCTGCGCCGACGGTACTACCTCTCTAACAGCAAG
TGCATCGCGTGCAGAAAAGCGATGGCAGCATCGCCGGCGTCAAAGACTGCCTGAGCTGC
GCGGCTCCATCTGGCAGCACTGGCCCTGTCTCTGCTACCTCGTGAGGGACAGCGCCTCG
GTCAACAAGGGCGGCCTCAGCAGCGGGGCGATCGCGGGGATCTCCGTGCGAGTAATAGTC
GTTGTGCGGGGCTCGTGGCTTCTCTGCTGGTGGTTTCATCTGCAGGGGCAAGGCGTGA

Sequence Length: 1140 bp

11.6.- Constructo 71 kDa (5G8)

ATGTTGAATAAATTTGCCCTTGTAGCCGTAATTCTCCAGATCGCCCGGGCCGCCTGCACGCCAG
GCACTGAAACTACTAACTGCAAGGATGGCGCATGCAACGTCCAGATTGGCGGTGAGACATACTG
CTCGCAGTGCTACACAACAAGCGAAGCACCAGTTGATGGGGTATGCACAGCAAGTACTGATTCT
AAATGCACAAAACAGGATACCCAAAATGGCACTTGTAATCCTGCGCAGCGAACTACTTCCTCT
TTAAGGGAGGGTGTCTATCAAATCGGACAATCTCCCGGTAGTTTGTATTGTCAAACCTGCAAGCAA
CACCGATGGAATCTGTCAAACCTTGTAAGGATGGCTACTTCACGGTTTCAGACGCTACTGCTACT
CAGGACTCCTGTGTTGCCTGCGGGGACGAGAAGTGCGCAACGTGCACAGTAGGAGCAGAACAGC
AGAAGTGCAGCAAGTGAAGGCCGACGGCAAGATGTACCTGAAGAAGAATACTGGTAGTGAGAC
AGGCACCTGCGTCACTGCCGACGAGTGCACAGCAGCCAAGGATTATTACACAGACGATAACCAGC
AGTGAACCAAATGGTAAGACGTGCAAGGCGTGCAGCGCAAAGGTGGAGAAGTGTGCTTCCTGCA
GCAGTGAAGGAGCCTGCCAGAAGTGCGCCTCTGGCTTTGTATTGGAGGGATCGAACTGCGTCAA
GAGCGATTGCAGTACCGAGAAGTGAAGACGTGCACCAACCCGAAGGCAGCCAACGAGGCCTGC
ACAGCGTGTGTTACTGGCATGTTTCTCACCCCGACCGCCAGTGCATAGACGAGTGCCTAACTA
TCTCCGGCTACTACGGAACAGCTGATGGCAAGTGAAGAAATGCGAAGTTGCTAACTGCGTCTGT
CTGCGGGGCAACTGGAGCGTGCATCTTTGCGCTGACGGCTTCTACGGTTCGAGCTGCTCTAAG
TGCTACGAGAGCTGCAAGAATTGCAAAGGAGCTACTGCCAGCGACTGCACAGCGTGCCCTGCTG
GGAGGGCGCTCATCTACGGAGATGATCCACCAAGGGCACGTGCGGAGAGGGTTGCACGACAGG
CACAGGGAAAGGTGCATGTAAGGCATGCGATTTAACGATCGACGGGACGAAGTACTGCTCTGCC
TGTGACACGGCTACTGAATATCCGCAGAACGGCGTGTGTGCGACGCCGACTGCACGTGCCTCCT
CGTGTGAGAGCCAAAATGTTGCTAGTGGTGCATGCAATACTTGTGAAAATGGCTTCTTCAAGAT
GAACGGGGGCTGCTACTCCACCAGCCAGCTCCCGGGTGCACGGTGTGCGTCACTGCGCCGACC
GGAGGAACATGCACCAAATCAGAGCCGGGCTACAATGTGAATAGCGGCACCCTTGTAACCTGTG
GTGTTGGCTGCGCTGAGTGTACCAACTCTGATTCATGTACTACATGTGCATCTGGATATGTCAA
GCTCACTAGTGTGCCACTTGACAAAAGTGCAGCGCTGGGTGTGCCACGTGTACAACCTGCTGCC
TCAACCTGCAGCACCTGCGCCGACGGGTACTACCTCTCTAACAGCAAGTGCATCGCGTGCAGACA
AAAGCGATGGCAGCATCGCCGGCGTCAAAGACTGCCTGAGCTGCGCGGCTCCATCTGGCAGCAC
TGGCCCTGTCTCTGTACCTCGTGAGGGACAGCGCCTCGGTCAACAAGGGCGGCCCTCAGCAGC
GGGGCGATCGCGGGGATCTCCGTGCGAGTAATAGTCGTTGTGCGGGGCCTCGTCCGGCTTCTCT
GCTGGTGGTTCATCTGCAGGGGCAAGGCGTGA

Sequence Length: 1824 bp

ANEXO 12

Alineamientos

Blastp

12.1.- 28 kDa vs 38 kDa

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
80.1 bits(196)	1e-21	Compositional matrix adjust.	39/39(100%)	39/39(100%)	0/39(0%)
Query 229	EGSNVCVKSDCSTENCKTCTNPKAANEACTACVTGMFLTP		267		
	EGSNVCVKSDCSTENCKTCTNPKAANEACTACVTGMFLTP				
Sbjct 1	EGSNVCVKSDCSTENCKTCTNPKAANEACTACVTGMFLTP		39		

Blastn

12.2.- 28 kDa, 38 kDa vs Genoma de *Giardia lamblia*

28kDa

> [AHHH01000109](#) | organism=Giardia Assemblage B isolate GS B | version=2013-1125
| length=40569 | SO=contig
Length=40569

Score = 1472 bits (1632), Expect = 0.0
Identities = 816/816 (100%), Gaps = 0/816 (0%)

Strand = Plus/Plus

```
Query 1      ATGTTGAATAAAATTTGCCCTTGTAGCCGTAATTCTCCAGATCGCCCGGCCGCTGCACG 60
|
Sbjct 38377  ATGTTGAATAAAATTTGCCCTTGTAGCCGTAATTCTCCAGATCGCCCGGCCGCTGCACG 38436

Query 61     CCAGGCACTGAAACTACTAACTGCAAGGATGGCGCATGCAACGTCCAGATTGGCGGTGAG 120
|
Sbjct 38437  CCAGGCACTGAAACTACTAACTGCAAGGATGGCGCATGCAACGTCCAGATTGGCGGTGAG 38496

Query 121    ACATACTGCTCGCAGTGCTACACAACAAGCGAAGCACCAGTTGATGGGGTATGCACAGCA 180
|
Sbjct 38497  ACATACTGCTCGCAGTGCTACACAACAAGCGAAGCACCAGTTGATGGGGTATGCACAGCA 38556

Query 181    AGTACTGATTCTAAATGCACAAAACAGGATACCCAAAATGGCACTTGTAATCCTGCGCA 240
|
Sbjct 38557  AGTACTGATTCTAAATGCACAAAACAGGATACCCAAAATGGCACTTGTAATCCTGCGCA 38616

Query 241    GCGAACTACTTCCTCTTTAAGGGAGGGTGTCTATCAAATCGGACAATCTCCCGGTAGTTG 300
|
Sbjct 38617  GCGAACTACTTCCTCTTTAAGGGAGGGTGTCTATCAAATCGGACAATCTCCCGGTAGTTG 38676
```

```

Query 301   ATTTGTCAAACCTGCAAGCAACACCGATGGAATCTGTCAAACCTGTAAGGATGGCTACTTC 360
          |||
Sbjct 38677 ATTTGTCAAACCTGCAAGCAACACCGATGGAATCTGTCAAACCTGTAAGGATGGCTACTTC 38736

Query 361   ACGGTTTCAGACGCTACTGCTACTCAGGACTCCTGTGTGCCTGCGGGGACGAGAAGTGC 420
          |||
Sbjct 38737 ACGGTTTCAGACGCTACTGCTACTCAGGACTCCTGTGTGCCTGCGGGGACGAGAAGTGC 38796

Query 421   GCAACGTGCACAGTAGGAGCAGAACAGCAGAAGTGCAGCAAGTCAAGGCCGACGGCAAG 480
          |||
Sbjct 38797 GCAACGTGCACAGTAGGAGCAGAACAGCAGAAGTGCAGCAAGTCAAGGCCGACGGCAAG 38856

Query 481   ATGTACCTGAAGAAGAATACTGGTAGTGAGACAGGCACCTGCGTCACTGCCGACGAGTGC 540
          |||
Sbjct 38857 ATGTACCTGAAGAAGAATACTGGTAGTGAGACAGGCACCTGCGTCACTGCCGACGAGTGC 38916

Query 541   ACAGCAGCCAAGGATTATTACACAGACGATACCAGCAGTGAACCAAATGGTAAGACGTGC 600
          |||
Sbjct 38917 ACAGCAGCCAAGGATTATTACACAGACGATACCAGCAGTGAACCAAATGGTAAGACGTGC 38976

Query 601   AAGGCGTGCAGCGCAAAGGTGGAGAAGTGTGCTTCCTGCAGCAGTGAAGGAGCCTGCCAG 660
          |||
Sbjct 38977 AAGGCGTGCAGCGCAAAGGTGGAGAAGTGTGCTTCCTGCAGCAGTGAAGGAGCCTGCCAG 39036

Query 661   AAGTGCGCCTCTGGCTTTGTATTGGAGGGATCGAACTGCGTCAAGAGCGATTGCAGTACC 720
          |||
Sbjct 39037 AAGTGCGCCTCTGGCTTTGTATTGGAGGGATCGAACTGCGTCAAGAGCGATTGCAGTACC 39096

Query 721   GAGAACTGCAAGACGTGCACCAACCCGAAGGCAGCCAACGAGGCCTGCACAGCGTGTGTT 780
          |||
Sbjct 39097 GAGAACTGCAAGACGTGCACCAACCCGAAGGCAGCCAACGAGGCCTGCACAGCGTGTGTT 39156

Query 781   ACTGGCATGTTTCTCACCCACCGCCAGTGCATAG 816
          |||
Sbjct 39157 ACTGGCATGTTTCTCACCCACCGCCAGTGCATAG 39192

```

38kDa

```

> AHHH01000398 | organism=Giardia_Assemblage_B_isolate_GS_B | version=2013-1125
| length=3083 | SO=contig
Length=3083

```

```

Score = 2057 bits (2280), Expect = 0.0
Identities = 1140/1140 (100%), Gaps = 0/1140 (0%)

```

Strand = Plus/Plus

```

Query 1     GAGGGATCGAACTGCGTCAAGAGCGATTGCAGTACCGAGAACTGCAAGACGTGCACCAAC 60
          |||
Sbjct 2     GAGGGATCGAACTGCGTCAAGAGCGATTGCAGTACCGAGAACTGCAAGACGTGCACCAAC 61

Query 61    CCGAAGGCAGCCAACGAGGCCTGCACAGCGTGTGTTACTGGCATGTTTCTCACCCCGACC 120
          |||
Sbjct 62    CCGAAGGCAGCCAACGAGGCCTGCACAGCGTGTGTTACTGGCATGTTTCTCACCCCGACC 121

Query 121   GGCCAGTGCATAGACGAGTGCCTAACTATCTCCGGCTACTACGGAACAGCTGATGGCAAG 180
          |||
Sbjct 122   GGCCAGTGCATAGACGAGTGCCTAACTATCTCCGGCTACTACGGAACAGCTGATGGCAAG 181

Query 181   TGCAAGAAATGCGAAGTTGCTAACTGCGTCGTCTGCGGGGCAACTGGAGCGTGCATCTT 240
          |||
Sbjct 182   TGCAAGAAATGCGAAGTTGCTAACTGCGTCGTCTGCGGGGCAACTGGAGCGTGCATCTT 241

```

```

Query 241  TGCGCTGACGGCTTCTACGGTTCGAGCTGCTCTAAGTGCTACGAGAGCTGCAAGAATTGC 300
          |||
Sbjct 242  TGCGCTGACGGCTTCTACGGTTCGAGCTGCTCTAAGTGCTACGAGAGCTGCAAGAATTGC 301

Query 301  AAAGGAGCTACTGCCAGCGACTGCACAGCGTGCCTGCTGGGAGGGCGCTCATCTACGGA 360
          |||
Sbjct 302  AAAGGAGCTACTGCCAGCGACTGCACAGCGTGCCTGCTGGGAGGGCGCTCATCTACGGA 361

Query 361  GATGATCCCACCAAGGGCACGTGCGGAGAGGGTTGCACGACAGGCACAGGAAAGGTGCA 420
          |||
Sbjct 362  GATGATCCCACCAAGGGCACGTGCGGAGAGGGTTGCACGACAGGCACAGGAAAGGTGCA 421

Query 421  TGTAAGGCATGCGATTTAACGATCGACGGGACGAAGTACTGCTCTGCCTGTGACACGGCT 480
          |||
Sbjct 422  TGTAAGGCATGCGATTTAACGATCGACGGGACGAAGTACTGCTCTGCCTGTGACACGGCT 481

Query 481  ACTGAATATCCGCAGAACGGCGTGTGTGCGACGCCGACTGCACGTGCCTCCTCGTGTGCA 540
          |||
Sbjct 482  ACTGAATATCCGCAGAACGGCGTGTGTGCGACGCCGACTGCACGTGCCTCCTCGTGTGCA 541

Query 541  AGCCAAAATGTTGCTAGTGGTGCCTGCAATACTTGTGAAAATGGCTTCTTCAAGATGAAC 600
          |||
Sbjct 542  AGCCAAAATGTTGCTAGTGGTGCCTGCAATACTTGTGAAAATGGCTTCTTCAAGATGAAC 601

Query 601  GGGGGCTGCTACTCCACCAGCCAGCTCCCGGGGTCGACGGTGTGCGTCACTGCGCCGACC 660
          |||
Sbjct 602  GGGGGCTGCTACTCCACCAGCCAGCTCCCGGGGTCGACGGTGTGCGTCACTGCGCCGACC 661

Query 661  GGAGGAACATGCACCAAATCAGAGCCGGGCTACAATGTGAATAGCGGCACCCTTGTAAAC 720
          |||
Sbjct 662  GGAGGAACATGCACCAAATCAGAGCCGGGCTACAATGTGAATAGCGGCACCCTTGTAAAC 721

Query 721  TGTGGTGTGGCTGCGCTGAGTGTACCAACTCTGATTTCATGTACTACATGTGCATCTGGA 780
          |||
Sbjct 722  TGTGGTGTGGCTGCGCTGAGTGTACCAACTCTGATTTCATGTACTACATGTGCATCTGGA 781

Query 781  TATGTCAAGCTCACTAGTGTGCCACTTGACAAAAGTGCAGCGCTGGGTGTGCCACGTGT 840
          |||
Sbjct 782  TATGTCAAGCTCACTAGTGTGCCACTTGACAAAAGTGCAGCGCTGGGTGTGCCACGTGT 841

Query 841  ACAACTGCTGCCTCAACCTGCAGCACCTGCGCCGACGGGTAACCTCTCTAACAGCAAG 900
          |||
Sbjct 842  ACAACTGCTGCCTCAACCTGCAGCACCTGCGCCGACGGGTAACCTCTCTAACAGCAAG 901

Query 901  TGCATCGCGTGCACAAAAGCGATGGCAGCATCGCCGGCGTCAAAGACTGCCTGAGCTGC 960
          |||
Sbjct 902  TGCATCGCGTGCACAAAAGCGATGGCAGCATCGCCGGCGTCAAAGACTGCCTGAGCTGC 961

Query 961  GCGGCTCCATCTGGCAGCACTGGCCCTGTCTCTGCTACCTCGTGAGGGACAGCGCCTCG 1020
          |||
Sbjct 962  GCGGCTCCATCTGGCAGCACTGGCCCTGTCTCTGCTACCTCGTGAGGGACAGCGCCTCG 1021

Query 1021  GTCAACAAGGGCGGCTCAGCAGCGGGGCGATCGCGGGGATCTCCGTCGCAGTAATAGTC 1080
          |||
Sbjct 1022  GTCAACAAGGGCGGCTCAGCAGCGGGGCGATCGCGGGGATCTCCGTCGCAGTAATAGTC 1081

Query 1081  GTTGTGCGGGGCTCGTCGGCTTCTCTGCTGGTGGTTCATCTGCAGGGGCAAGGCGTGA 1140
          |||
Sbjct 1082  GTTGTGCGGGGCTCGTCGGCTTCTCTGCTGGTGGTTCATCTGCAGGGGCAAGGCGTGA 1141

```

```

> AHHH01000109 | organism=Giardia_Assemblage_B_isolate_GS_B | version=2013-11-25
| length=40569 | SO=contig
Length=40569

```

Score = 1855 bits (2056), Expect = 0.0
Identities = 1096/1140 (96%), Gaps = 1/1140 (0%)

Strand = Plus/Plus

```
Query 1 GAGGGATCGAACTGCGTCAAGAGCGATTGCAGTACCGAGAACTGCAAGACGTGCACCAAC 60
      |||
Sbjct 39061 GAGGGATCGAACTGCGTCAAGAGCGATTGCAGTACCGAGAACTGCAAGACGTGCACCAAC 39120

Query 61 CCGAAGGCAGCCAACGAGGCCTGCACAGCGTGTGTTACTGGCATGTTTCTCACCCCGACC 120
      |||
Sbjct 39121 CCGAAGGCAGCCAACGAGGCCTGCACAGCGTGTGTTACTGGCATGTTTCTCACCCCGACC-ACC 39179

Query 121 GGCCAGTGCATAGACGAGTGCCTAACTATCTCCGGCTACTACGGAACAGCTGATGGCAAG 180
      |||
Sbjct 39180 GGCCAGTGCATAGACGAGTGCCTAACTATCTCCGGCTACTACGGAACAGCTGATGGCAAG 39239

Query 181 TGCAAGAAATGCGAAGTTGCTAACTGCGTCGTCTGCGGGGCAACTGGAGCGTGCACCTT 240
      |||
Sbjct 39240 TGCAAGAAATGCGAAGTTGCTAACTGCGTCGTCTGCGGGGCAACTGGAGCGTGCACCTT 39299

Query 241 TGCCTGACGGCTTCTACGGTTCGAGCTGCTCTAAGTGTACGAGAGCTGCAAGAATTGC 300
      |||
Sbjct 39300 TGCCTGACGGCTTCTACGGTTCGAGCTGCTCTAAGTGTACGAGAGCTGCAAGAATTGT 39359

Query 301 AAAGGAGTACTGCCAGCGACTGCACAGCGTGCCTGTGGGAGGGCGCTCATCTACGGA 360
      |||
Sbjct 39360 AAAGGAGTACTGCCAGCGACTGCACAGCGTGCCTGTGGGAGGGCGCTCATCTACGGA 39419

Query 361 GATGATCCCACCAAGGGCACGTGCGGAGAGGGTGCACGACAGGCACAGGAAAGGTGCA 420
      |||
Sbjct 39420 GATGATCCCACCAAGGGCACGTGCGGAGAGGGTGCACGACAGGCACAGGAAAGGTGCA 39479

Query 421 TGTAAGGCATGCGATTTAACGATCGACGGGACGAAGTACTGCTCTGCCTGTGACACGGCT 480
      |||
Sbjct 39480 TGTAAGGCATGCGATTTAACGATCGACGGGACGAAGTACTGCTCTGCCTGTGACACGGCT 39539

Query 481 ACTGAATATCCGAGAACGGCGTGTGTGCGACCGCGACTGCACGTGCCTCCTCGTGCCAG 540
      |||
Sbjct 39540 ACTGAATATCCGAGAACGGCGTGTGTGCGACCGCGACTGCACGTGCCTCCTCGTGCCAG 39599

Query 541 AGCCAAAATGTTGCTAGTGGTGCCTGCAATACTTGTGAAAATGGCTTCTTCAAGATGAAC 600
      |||
Sbjct 39600 AGCCAAAATGTTGCTAGTGGTGCCTGCAATACTTGTGAAAATGGCTTCTTCAAGATGAAC 39659

Query 601 GGGGGCTGCTACTCCACCAGCCAGCTCCCGGGGTCGACGGTGTGCGTCACTGCGCCGACC 660
      |||
Sbjct 39660 GGGGGCTGCTACTCCACCAGCCAGCTCCCGGGGTCGACGGTGTGCGTCACTGCGCCGACC 39719

Query 661 GGAGGAACATGCACCAAATCAGAGCCGGGCTACAATGTGAATAGCGGCACCCTTGTAACC 720
      |||
Sbjct 39720 GGAGGAACATGCACCAAATCAGAGCCGGGCTACAATGTGAATAGCGGCACCCTTGTAACC 39779

Query 721 TGTGGTGTGGCTGCGCTGAGTGTACCAACTCTGATTCATGTACTACATGTGCATCTGGA 780
      |||
Sbjct 39780 TGTGGTGTGGCTGCGCTGAGTGTACCAACTCTGATTCATGTACTACATGTGCATCTGGA 39839

Query 781 TATGTCAAGCTCACTAGTGTGCCACTTGACAAAAGTGCAGCGCTGGGTGTGCCACGTGT 840
      |||
Sbjct 39840 TATGTCAAGCTCACTAGTGTGCCACTTGACAAAAGTGCAGCGCTGGGTGTGCCACGTGT 39899

Query 841 ACAACTGCTGCCTCAACCTGCAGCACCTGCGCCGACGGGTACTACCTCTCTAACAGCAAG 900
      |||
Sbjct 39900 ACAACTGCTGCCTCAACCTGCAGCACCTGCGCCGACGGGTACTACCTCTCTAACAGCAAG 39959

Query 901 TGCATCGCGTGCACAAAAGCGATGGCAGCATCGCCGGCGTCAAAGACTGCCTGAGCTGC 960
```

```

Sbjct 39960 |||||
TGCATCGCGTGCACAAAAGCGATGGCAGCATCGCCGGCGTCAAAGACTGCCTGAGCTGC 40019
Query 961 GCGGCTCCATCTGGCAGCACTGGCCCTGTCTCTGCTACCTCGTGAGGGACAGCGCCTCG 1020
|||
Sbjct 40020 GCGGCTCCATCTGGCAGCACTGGCCCTGTCTCTGCTACCTCGTGAGGGACAGCGCCTCG 40079
Query 1021 GTCAACAAGGGCGGCCTCAGCAGCGGGGCGATCGCGGGGATCTCCGTCGCAGTAATAGTC 1080
|||
Sbjct 40080 GTCAACAAGGGCGGCCTCAGCAGCGGGGCGATCGCGGGGATCTCCGTTGCCGGGTTGTG 40139
Query 1081 GTTGTGCGGGGCCTCGTCGGCTTCTCTGCTGGTGGTTCATCTGCAGGGGCAAGGCGTGA 1140
|||
Sbjct 40140 GTAGTTGGAGGACTAGTTGGATTCTCTGCTGGTGGTTCGTCGCGCGAAAGGCGTGA 40199

```

12.3.- 28 kDa vs Genoma de *Giardia lamblia*

AHHH01000109 | organism=Giardia_Assemblage_B_isolate_GS_B | version=2013-11-25
| length=40569 | SO=contig
Length=40569

Score = 1472 bits (1632), Expect = 0.0
Identities = 816/816 (100%), Gaps = 0/816 (0%)

Strand = Plus/Plus

```

Query 1 ATGTTGAATAAAATTTGCCCTTGTAGCCGTAATTCTCCAGATCGCCCGGGCCGCTGCAGC 60
|||
Sbjct 38377 ATGTTGAATAAAATTTGCCCTTGTAGCCGTAATTCTCCAGATCGCCCGGGCCGCTGCAGC 38436
Query 61 CCAGGCACTGAACTACTAAGGATGGCGCATGCAACGTCAGATTGGCGGTGAG 120
|||
Sbjct 38437 CCAGGCACTGAACTACTAAGGATGGCGCATGCAACGTCAGATTGGCGGTGAG 38496
Query 121 ACATACTGCTCGCAGTGCTACACAACAAGCGAAGCACCAGTTGATGGGGTATGCACAGCA 180
|||
Sbjct 38497 ACATACTGCTCGCAGTGCTACACAACAAGCGAAGCACCAGTTGATGGGGTATGCACAGCA 38556
Query 181 AGTACTGATTCTAAATGCACAAAACAGGATACCCAAAATGGCACTTGTAAATCCTGCGCA 240
|||
Sbjct 38557 AGTACTGATTCTAAATGCACAAAACAGGATACCCAAAATGGCACTTGTAAATCCTGCGCA 38616
Query 241 GCGAACTACTTCTCTTTAAGGGAGGGTGTATCAAATCGGACAATCTCCCGGTAGTTTG 300
|||
Sbjct 38617 GCGAACTACTTCTCTTTAAGGGAGGGTGTATCAAATCGGACAATCTCCCGGTAGTTTG 38676
Query 301 ATTTGTCAAACGCAAGCAACACCGATGGAATCTGTCAAACGTTGTAAGGATGGCTACTTC 360
|||
Sbjct 38677 ATTTGTCAAACGCAAGCAACACCGATGGAATCTGTCAAACGTTGTAAGGATGGCTACTTC 38736
Query 361 ACGGTTTCAGACGCTACTGCTACTCAGGACTCCTGTGTGCTGCGGGGACGAGAAGTGC 420
|||
Sbjct 38737 ACGGTTTCAGACGCTACTGCTACTCAGGACTCCTGTGTGCTGCGGGGACGAGAAGTGC 38796
Query 421 GCAACGTGCACAGTAGGAGCAGAACAGCAGAAGTGCAGCAAGTGAAGGCCGACGGCAAG 480
|||
Sbjct 38797 GCAACGTGCACAGTAGGAGCAGAACAGCAGAAGTGCAGCAAGTGAAGGCCGACGGCAAG 38856
Query 481 ATGTACCTGAAGAAGAATACTGGTAGTGAGACAGGCACCTGCGTCACTGCCGACGAGTGC 540
|||
Sbjct 38857 ATGTACCTGAAGAAGAATACTGGTAGTGAGACAGGCACCTGCGTCACTGCCGACGAGTGC 38916

```

```

Query 541 ACAGCAGCCAAGGATTATTACACAGACGATACCAGCAGTGAACCAAATGGTAAGACGTGC 600
          |||
Sbjct 38917 ACAGCAGCCAAGGATTATTACACAGACGATACCAGCAGTGAACCAAATGGTAAGACGTGC 38976

Query 601 AAGGCGTGACGCGCAAAGGTGGAGAACTGTGCTTCCTGCAGCAGTGAAGGAGCCTGCCAG 660
          |||
Sbjct 38977 AAGGCGTGACGCGCAAAGGTGGAGAACTGTGCTTCCTGCAGCAGTGAAGGAGCCTGCCAG 39036

Query 661 AAGTGCGCCTCTGGCTTTGTATTGGAGGGATCGAACTGCGTCAAGAGCGATTGCAGTACC 720
          |||
Sbjct 39037 AAGTGCGCCTCTGGCTTTGTATTGGAGGGATCGAACTGCGTCAAGAGCGATTGCAGTACC 39096

Query 721 GAGAACTGCAAGACGTGCACCAACCCGAAGGCAGCCAACGAGGCCTGCACAGCGTGTGTT 780
          |||
Sbjct 39097 GAGAACTGCAAGACGTGCACCAACCCGAAGGCAGCCAACGAGGCCTGCACAGCGTGTGTT 39156

Query 781 ACTGGCATGTTTCTCACCCACCGGCCAGTGCATAG 816
          |||
Sbjct 39157 ACTGGCATGTTTCTCACCCACCGGCCAGTGCATAG 39192

```

12.4.- 38 kDa vs Genoma de *Giardia lamblia*

AHHH01000109 | organism=Giardia_Assemblage_B_isolate_GS_B | version=2013-11-25
 | length=40569 | SO=contig
 Length=40569

Score = 1855 bits (2056), Expect = 0.0
 Identities = 1096/1140 (96%), Gaps = 1/1140 (0%)

Strand = Plus/Plus

```

Query 1 GAGGGATCGAACTGCGTCAAGAGCGATTGCAGTACCGAGAACTGCAAGACGTGCACCAAC 60
          |||
Sbjct 39061 GAGGGATCGAACTGCGTCAAGAGCGATTGCAGTACCGAGAACTGCAAGACGTGCACCAAC 39120

Query 61 CCGAAGGCAGCCAACGAGGCCTGCACAGCGTGTGTTACTGGCATGTTTCTCACCCGACC 120
          |||
Sbjct 39121 CCGAAGGCAGCCAACGAGGCCTGCACAGCGTGTGTTACTGGCATGTTTCTCACCC-ACC 39179

Query 121 GGCCAGTGCATAGACGAGTGCCTAACTATCTCCGGCTACTACGGAACAGCTGATGGCAAG 180
          |||
Sbjct 39180 GGCCAGTGCATAGACGAGTGCCTAACTATCTCCGGCTACTACGGAACAGCTGATGGCAAG 39239

Query 181 TGCAAGAAATGCGAAGTTGCTAACTGCGTCGTCTGCGGGGCAACTGGAGCGTGCACCTT 240
          |||
Sbjct 39240 TGCAAGAAATGCGAAGTTGCTAACTGCGTCGTCTGCGGGGCAACTGGAGCGTGCACCTT 39299

Query 241 TGCCTGACGGCTTCTACGGTTCGAGCTGCTCTAAGTGCTACGAGAGCTGCAAGAATTGC 300
          |||
Sbjct 39300 TGCCTGACGGCTTCTACGGTTCGAGCTGCTCTAAGTGCTACGAGAGCTGCAAGAATTGT 39359

Query 301 AAAGGAGCTACTGCCAGCGACTGCACAGCGTGCCTTGCTGGGAGGGCGCTCATCTACGGA 360
          |||
Sbjct 39360 AAAGGAGCTACTGCCAGCGACTGCACAGCGTGCCTTGCTGGGAGGGCGCTCATCTACGGA 39419

Query 361 GATGATCCCACCAAGGGCACGTGCGGAGAGGGTTGCACGACAGGCACAGGGAAAGGTGCA 420
          |||
Sbjct 39420 GATGATCCCACCAAGGGCACGTGCGGAGAGGGTTGCACGACAGGCACAGGGAAAGGTGCA 39479

```

```

Query 421      TGTAAGGCATGCGATTTAACGATCGACGGGACGAAGTACTGCTCTGCCTGTGACACGGCT 480
              |||
Sbjct 39480    TGTAAGGCATGCGATTTAACGATCGACGGGACGAAGTACTGCTCTGCCTGTGACACGGCT 39539

Query 481      ACTGAATATCCGCAGAACGGCGTGTGTGCGACGCCGACTGCACGTGCCTCCTCGTGTGAG 540
              |||
Sbjct 39540    ACTGAATATCCGCAGAACGGCGTGTGTGCGACGCCGACTGCACGTGCCTCCTCGTGTGAG 39599

Query 541      AGCCAAAATGTTGCTAGTGGTGCCTGCAATACTTGTGAAAATGGCTTCTTCAAGATGAAC 600
              |||
Sbjct 39600    AGCCAAAATGTTGCTAGTGGTGCCTGCAATACTTGTGAAAACGGCTTCTTCAAGATGAAC 39659

Query 601      GGGGGCTGCTACTCCACCAGCCAGCTCCCGGGGTCGACGGTGTGCGTCACTGCGCCGACC 660
              |||
Sbjct 39660    GGGGGCTGCTACTCCACCAGCCAGCTCCCGGGGTCGACGGTGTGCGTCACTGCGCCGACC 39719

Query 661      GGAGGAACATGCACCAAATCAGAGCCGGGCTACAATGTGAATAGCGGCACCCTTGTAACC 720
              |||
Sbjct 39720    GGAGGAACATGCACCAAATCAGAGCCGGGCTACAATGTGAATAGCGGCACCCTTGTAACC 39779

Query 721      TGTGGTGTGGCTGCGCTGAGTGTACCAACTCTGATTCATGTACTACATGTGCATCTGGA 780
              |||
Sbjct 39780    TGTGGTGTGGCTGCGCTGAGTGTACCAACTCTGATTCATGTACTACATGTGCATCTGGA 39839

Query 781      TATGTCAAGCTCACTAGTGTGCCACTTGACAAAAGTGCACGCTGGGTGTGCCACGTGT 840
              |||
Sbjct 39840    TATGTCAAGCTCACTAGTGTGCCACTTGACAAAAGTGCACGCTGGGTGTGCCACGTGT 39899

Query 841      ACAACTGCTGCCTCAACCTGCAGCACCTGCGCCGACGGGTACTACCTCTCTAACAGCAAG 900
              |||
Sbjct 39900    ACAACTGCTGCCTCAACCTGCAGCACCTGCGCCGACGGGTACTACCTCTCTAACAGCAAG 39959

Query 901      TGCATCGCGTGCACAAAAGCGATGGCAGCATCGCCGGCGTCAAAGACTGCCTGAGCTGC 960
              |||
Sbjct 39960    TGCATCGCGTGCACAAAAGCGATGGCAGCATCGCCGGCGTCAAAGACTGCCTGAGCTGC 40019

Query 961      GCGGCTCCATCTGGCAGCACTGGCCCTGTCTCTGCTACCTCGTGAGGGACAGCGCCTCG 1020
              |||
Sbjct 40020    GCGGCTCCATCTGGCAGCACTGGCCCTGTCTCTGCTACCTCGTGAGGGACAGCGCCTCG 40079

Query 1021     GTCAACAAGGGCGGCCTCAGCAGCGGGGCGATCGCGGGGATCTCCGTCGCAGTAATAGTC 1080
              |||
Sbjct 40080    GTCAACAAGGGCGGCCTCAGCAGCGGGGCGATCGCGGGGATCTCCGTTGCCGCGGTTGTG 40139

Query 1081     GTTGTGCGGGGCCTCGTCGGCTTCCTCTGCTGGTGGTTCATCTGCAGGGGCAAGGCGTGA 1140
              |||
Sbjct 40140    GTAGTTGGAGGACTAGTTGGATTCTCTGCTGGTGGTTCATCTGCAGGGGCAAGGCGTGA

```

12.5.- Constructo 70 kDa (5G8) vs Genoma de *Giardia lamblia*

```

> AHHH01000109 | organism=Giardia Assemblage B isolate GS B | version=2013-11-25
| length=40569 | SO=contig
Length=40569

```

```

Score = 3088 bits (3424), Expect = 0.0
Identities = 1780/1824 (98%), Gaps = 1/1824 (0%)

```

```

Strand = Plus/Plus

```

```

Query 1      ATGTTGAATAAATTTGCCCTTGTAGCCGTAATTCTCCAGATCGCCCGGGCCGCTGCACG 60
              |||

```

Sbjct	38377	ATGTTGAATAAATTTGCCCTTGTAGCCGTAATTCTCCAGATCGCCCGGCCGCTGCACG	38436
Query	61	CCAGGCACTGAACTACTAACTGCAAGGATGGCGCATGCAACGTCCAGATTGGCGGTGAG	120
Sbjct	38437	CCAGGCACTGAACTACTAACTGCAAGGATGGCGCATGCAACGTCCAGATTGGCGGTGAG	38496
Query	121	ACATACTGCTCGCAGTGCTACACAACAAGCGAAGCACCAGTTGATGGGGTATGCACAGCA	180
Sbjct	38497	ACATACTGCTCGCAGTGCTACACAACAAGCGAAGCACCAGTTGATGGGGTATGCACAGCA	38556
Query	181	AGTACTGATTCTAAATGCACAAAACAGGATACCCAAAATGGCACTTGTAAATCCTGCGCA	240
Sbjct	38557	AGTACTGATTCTAAATGCACAAAACAGGATACCCAAAATGGCACTTGTAAATCCTGCGCA	38616
Query	241	GCGAACTACTTCCTCTTTAAGGGAGGGTGTATCAAATCGGACAATCTCCCGGTAGTTTG	300
Sbjct	38617	GCGAACTACTTCCTCTTTAAGGGAGGGTGTATCAAATCGGACAATCTCCCGGTAGTTTG	38676
Query	301	ATTTGTCAAACCTGCAAGCAACACCGATGGAATCTGTCAAACCTGTAAGGATGGCTACTTC	360
Sbjct	38677	ATTTGTCAAACCTGCAAGCAACACCGATGGAATCTGTCAAACCTGTAAGGATGGCTACTTC	38736
Query	361	ACGGTTTCAGACGCTACTGCTACTCAGGACTCCTGTGTGCCTGCGGGGACGAGAAGTGC	420
Sbjct	38737	ACGGTTTCAGACGCTACTGCTACTCAGGACTCCTGTGTGCCTGCGGGGACGAGAAGTGC	38796
Query	421	GCAACGTGCACAGTAGGAGCAGAACAGCAGAAGTGCAGCAAGTCAAGGCCGACGGCAAG	480
Sbjct	38797	GCAACGTGCACAGTAGGAGCAGAACAGCAGAAGTGCAGCAAGTCAAGGCCGACGGCAAG	38856
Query	481	ATGTACCTGAAGAAGAATACTGGTAGTGAGACAGGCACCTGCGTCACTGCCGACGAGTGC	540
Sbjct	38857	ATGTACCTGAAGAAGAATACTGGTAGTGAGACAGGCACCTGCGTCACTGCCGACGAGTGC	38916
Query	541	ACAGCAGCCAAGGATTATTACACAGACGATACCAGCAGTGAACCAAATGGTAAGACGTGC	600
Sbjct	38917	ACAGCAGCCAAGGATTATTACACAGACGATACCAGCAGTGAACCAAATGGTAAGACGTGC	38976
Query	601	AAGGCGTGCAGCGCAAAGGTGGAGAACTGTGCTTCCTGCAGCAGTGAAGGAGCCTGCCAG	660
Sbjct	38977	AAGGCGTGCAGCGCAAAGGTGGAGAACTGTGCTTCCTGCAGCAGTGAAGGAGCCTGCCAG	39036
Query	661	AAGTGCGCCTCTGGCTTTGTATTGGAGGGATCGAACTGCGTCAAGAGCGATTGCAGTACC	720
Sbjct	39037	AAGTGCGCCTCTGGCTTTGTATTGGAGGGATCGAACTGCGTCAAGAGCGATTGCAGTACC	39096
Query	721	GAGAACTGCAAGACGTGCACCAACCCGAAGGCAGCCAACGAGGCCTGCACAGCGTGTGTT	780
Sbjct	39097	GAGAACTGCAAGACGTGCACCAACCCGAAGGCAGCCAACGAGGCCTGCACAGCGTGTGTT	39156
Query	781	ACTGGCATGTTTCTACCCCGACCGGCCAGTGCATAGACGAGTGCCTAACTATCTCCGGC	840
Sbjct	39157	ACTGGCATGTTTCTACCCCGACCGGCCAGTGCATAGACGAGTGCCTAACTATCTCCGGC	39215
Query	841	TACTACGGAACAGCTGATGGCAAGTGCAGAAATGCGAAGTTGCTAACTGCGTCTGCTGC	900
Sbjct	39216	TACTACGGAACAGCTGATGGCAAGTGCAGAAATGCGAAGTTGCTAACTGCGTCTGCTGC	39275
Query	901	GGGGCAACTGGAGCGTGCATCTTTGCGCTGACGGCTTCTACGGTTTCGAGCTGCTCTAAG	960
Sbjct	39276	GGGGCAACTGGAGCGTGCATCTTTGCGCTGACGGCTTCTACGGTTTCGAGCTGCTCTAAG	39335
Query	961	TGCTACGAGAGCTGCAAGAATTGCAAAGGAGCTACTGCCAGCGACTGCACAGCGTGCCCT	1020
Sbjct	39336	TGCCACGAGAGCTGCAAGAATTGCTAGCGGGGCCACTGCAGAGGACTGCACAGCGTGCCCT	39395
Query	1021	GCTGGGAGGGCGCTCATCTACGGAGATGATCCCAAGGGCACGTGCGGAGAGGGTTGC	1080

Sbjct	39396	 GCCGGGAGGGCGCTCATCTACGGAGATGATCCCACCAAGGGCAGTGCGGAGAGGGCTGC	39455
Query	1081	ACGACAGGCACAGGGAAAGGTGCATGTAAGGCATGCGATTTAACGATCGACGGGACGAAG	1140
Sbjct	39456	 ACGACAGGCACAGGGAAAGGTGCATGTAAGGCATGCGATTTAACGATCGACGGGACGAAG	39515
Query	1141	TACTGCTCTGCCTGTGACACGGCTACTGAATATCCGCAGAACGGCGTGTGTGCGACGCCG	1200
Sbjct	39516	 TACTGCTCTGCCTGTGACACGGCTACTGAATATCCGCAGAACGGCGTGTGTGCGACGCCG	39575
Query	1201	ACTGCACGTGCCTCCTCGTGTGACAGCCAAAATGTTGCTAGTGGTGCCTGCAATACTTGT	1260
Sbjct	39576	 ACTGCACGTGCCTCCTCGTGTGACAGCCAAAATGTTGCTAGTGGTGCCTGCAATACTTGT	39635
Query	1261	GAAAATGGCTTCTTCAAGATGAACGGGGCTGCTACTCCACCAGCCAGCTCCCGGGTTCG	1320
Sbjct	39636	 GAAAACGGCTTCTTCAAGATGAACGGGGCTGCTACTCCACCAGCCAGCTCCCGGGTTCG	39695
Query	1321	ACGGTGTGCGTCACTGCGCCGACCGGAGGAACATGCACCAAATCAGAGCCGGGCTACAAT	1380
Sbjct	39696	 ACGGTGTGCGTCACTGCGCCGACCGGAGGAACATGCACCAAATCAGAGCCGGGCTACAAT	39755
Query	1381	GTGAATAGCGGCACCCTTGTAACCTGTGGTGTGGCTGCGCTGAGTGTACCAACTCTGAT	1440
Sbjct	39756	 GTGAATAGCGGCACCCTTGTAACCTGTGGTGTGGCTGCGCTGAGTGTACCAACTCTGAT	39815
Query	1441	TCATGTACTACATGTGCATCTGGATATGTCAAGCTCACTAGTGTGCCACTTGACAAAAG	1500
Sbjct	39816	 TCATGTACTACATGTGCATCTGGATATGTCAAGCTCACTAGTGTGCCACTTGACAAAAG	39875
Query	1501	TGCGACGCTGGGTGTGCCACGTGTACAACCTGCTGCCTCAACCTGCAGCACCTGCGCCGAC	1560
Sbjct	39876	 TGCGACGCTGGGTGTGCCACGTGTACAACCTGCTGCCTCAACCTGCAGCACCTGCGCCGAC	39935
Query	1561	GGGTACTACCTCTCTAACAGCAAGTGCATCGCGTGCACAAAAGCGATGGCAGCATCGCC	1620
Sbjct	39936	 GGGTACTACCTCTCTAACAGCAAGTGCATCGCGTGCACAAAAGCGATGGCAGCATCGCC	39995
Query	1621	GGCGTCAAAGACTGCCTGAGCTGCGCGGCTCCATCTGGCAGCACTGGCCCTGTCTCTGC	1680
Sbjct	39996	 GGCGTCAAAGACTGCCTGAGCTGCGCGGCTCCATCTGGCAGCACTGGCCCTGTCTCTGC	40055
Query	1681	TACCTCGTGAGGGACAGCGCCTCGGTCAACAAGGGCGGCTCAGCAGCGGGCGATCGCG	1740
Sbjct	40056	 TACCTCGTGAGGGACAGCGCCTCGGTCAACAAGGGCGGCTCAGCAGCGGGCGATCGCG	40115
Query	1741	GGGATCTCCGTGCGAGTAATAGTCGTTGTCGGGGCCCTCGTTCGGCTTCCTCTGCTGGTGG	1800
Sbjct	40116	 GGGATCTCCGTGCGAGTAATAGTCGTTGTCGGGGCCCTCGTTCGGCTTCCTCTGCTGGTGG	40175
Query	1801	TTCATCTGCAGGGCAAGGCGTGA	1824
Sbjct	40176	 TTCGTCTGCCGCGAAAGGCGTGA	40199

ANEXO 13

Predicción de Epítopes

13.1.-Células B

13.1.1.-Bepipred linear epitope prediction

No.	Start	End	Peptide	Length
1	18	32	ACTPGTETTNCKDGA	15
2	36	38	QIG	3
3	40	42	ETY	3
4	47	77	YTTSEAPVDGVCTASTDS KCTKQDTQNGTCK	31
5	92	99	QIGQSPGS	8
6	105	111	ASNTDGI	7
7	120	130	FTVSDATATQD	11
8	132	135	CVAC	4
9	138	140	ENC	3
10	145	157	VGAEQQKCSKCKA	13
11	166	201	NTGSETGTCVTADECTAA KDYITDDTSSEPNKTKCK	36
12	212	220	SCSSEGACQ	9
13	233	254	CVKSDCSTENCKTCTNPK AANE	22
14	269	271	GQC	3
15	281	290	YYGTADGKCK	10
16	313	315	FYG	3
17	327	340	NCKGATASDCTACP	14
18	346	369	IYGDDPTKGTGEGGCTTG TGKGAC	24
19	381	382	YC	2
20	386	415	DTATEYPQNGVCATPTAR ASSCQSQNVASG	30
21	417	419	CNT	3
22	430	439	GCVSTSQLPG	10
23	442	462	VCVTAPTGGTCTKSEPGY NVN	21
24	476	484	CTNSDSCTT	9

25	498	498	C	1
26	501	501	C	1
27	506	506	A	1
28	508	518	CTTAASTCSTC	11
29	533	540	DKSDGSIA	8
30	549	556	AAPSGSTG	8
31	567	577	ASV NKGLSSG	11

13.1.2. - Emini surface accessibility prediction

No.	Start	End	Peptide	Length
1	22	28	GTETTNC	7
2	46	53	CYTTSEAP	8
3	61	75	STDSKCTKQDTQNGT	15
4	146	151	GAEQQK	6
5	155	170	CKADGKMYLKKNTGSE	16
6	183	199	AKDY Y TDDTSSEPNGKT	17
7	246	252	CTNPKAA	7
8	348	353	GDDPTK	6
9	387	393	TATEYPQ	7
10	433	438	STSQLP	6
11	453	462	TKSEPGYNVN	10
12	565	570	DSASVN	6

13.1.3. - kolaskar & tongaonkar antigenicity prediction

No.	Start	End	Peptide	Length
1	4	21	KFALVAVILQIARAACP	18
2	30	36	DGACNVQ	7
3	40	49	ETYCSQCYTT	10
4	51	61	EAPVDGVCTAS	11
5	76	105	CKSCAANYFLFKGGCYQI GQSPGSLICQTA	30
6	109	125	DGICQTCKDGYFTVSDA	17
7	129	138	QDSCVACGDE	10
8	140	157	CATCTVGAEQQKCSKCKA	18
9	172	185	GTCVTADECTAAKD	14
10	200	237	CKACSAKVENCASCSSEG ACQKCASGFVLEGSNCVK SD	38
11	253	263	NEACTACVTGM	11
12	267	282	PTGQCIDECVTISGY	16
13	288	312	KCKKCEVANCVCGATGA CDLCADG	25
14	315	328	GSSCSKCYESCKNC	14
15	333	348	ASDCTACPAGRALIYG	16
16	368	375	ACKACDLT	8
17	379	388	TKYCSACDTA	10
18	393	400	QNGVCATP	8
19	403	420	RASSQSQNVASGACNTC	18
20	431	447	CYSTSQLPGSTVCVTAP	17
21	464	476	GTLVTCGVGCAEC	13
22	482	534	CTTCASGYVKLTSAACT KCDAGCATCTTAASTCST CADGYLNSKCIACDK	53
23	539	552	IAGVKDCLSCAAPS	14
24	555	566	TGPVLCYLVRDS	12

13.2.-Células T

Pos	1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5	score
67	TKQDTQNGTCKSCAA	26
95	QSPGSLICQTASNTD	22
186	YYTDDTSSEPNGKTC	20
114	TCKDGYFTVSDATAT	18
121	TVSDATATQDSCVAC	18
182	AAKDYYTDDTSSEPN	18
308	LCADGFYGSSECSKCY	18
370	KACDLTIDGTKYCSA	18
533	DKSDGSIAGVKDCLS	18
541	GVKDCLSCAAPSGST	18
28	CKDGACNVQIGGETY	16
87	KGGCYQIGQSPGSLI	16
127	ATQDSCVACGDENCA	16
130	DSCVACGDENCATCT	16
136	GDENCATCTVGAEQQ	16
142	TCTVGAEQQKCSKCK	16
171	TGTCVTADECTAAKD	16
200	CKACSAKVENCASCS	16
212	SCSSEGACQKCASGF	16
266	TPTGQCIDECVTISG	16
270	QCIDECVTISGYGT	16
293	EVANCVVCGATGACD	16
391	YPQNGVCATPTARAS	16
402	ARASSCQSQNVASGA	16
422	NGFFKMNGGCYSTSQ	16
475	ECTNSDSC TTCASGY	16
564	RDSASV NKGGLSSGA	16
4	KFALVAVILQIARAA	14
5	FALVAVILQIARAAC	14
6	ALVAVILQIARAAC T	14
21	PGTETT NCKDGACNV	14

31	GACNVQIGGETYCSQ	14
70	DTQNGTCKSCAANYF	14
94	GQSPGSLICQTASNT	14
105	ASNTDGGICQTCKDGY	14
116	KDGYFTVSDATATQD	14
193	SEPNGKTCKACSAKV	14
201	KACSAKVENCASCSS	14
203	CSAKVENCASCSSSEG	14
221	KCASGFVLEGSNCVK	14
228	LEGSNCVKSDCSTEN	14
247	TNPKAANEACTACVT	14
304	GACDLCADGFYGS	14
346	IYGDDPTKGTGEGC	14
405	SSCQSQNVASGACNT	14
484	TCASGYVKL TSAATC	14
499	TKCDAGCATCTTAAS	14
520	DGYYSNSKCIACDK	14
524	LSNSKCIACDKSDGS	14
536	DGSIAGVKDCLSCAA	14
556	GPVLCYLVRDSASVN	14
557	PVLCYLVRDSASV NK	14
567	ASV NKGLSSGAIAG	14