

# UNIVERSIDAD DE SONORA

## DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL INDUCIDA  
POR TROFOZOITOS DE *Giardia lamblia* DE LAS CEPAS 5G8 (+)  
Y GS/M-83-H7 EN UN MODELO DE INFECCIÓN MURINO

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

CON OPCIÓN EN:

BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

MARÍA LOURDES VALENCIA PEÑA

Hermosillo, Sonora

Junio de 2013

# Repositorio Institucional UNISON



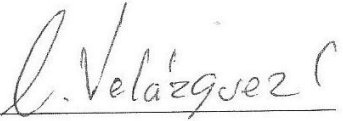
**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



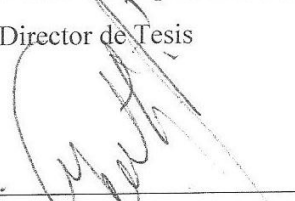
Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## FORMATO DE APROBACIÓN

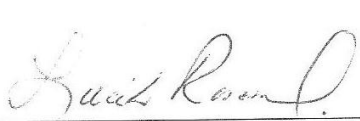
Los miembros del Comité de Tesis designado para revisar la Tesis de María Lourdes Valencia Peña, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito para obtener el Título de Licenciada en Biología con Opción en Biotecnología.



Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras  
Director de Tesis



Dr. Marco Antonio López Torres  
Sinodal Secretario



M.C. María Lucila Rascón Durán  
Sinodal



Dra. Gloria Irma Ayala Astorga  
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).

## CONTENIDO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vi
<b>RESUMEN</b> .....	viii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	3
II. 1. <i>Giardia lamblia</i> .....	3
II.2. Giardiasis.....	4
II.3. Respuesta Inmune a <i>G. lamblia</i> .....	6
II.4. Proteínas Antigénicas de <i>G. lamblia</i> .....	8
II.5. Modelo experimental .....	11
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	13
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	14
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	15
V.1. Objetivo General .....	15
V.2. Objetivos Específicos.....	15
<b>VI. METODOLOGÍA</b> .....	16
VI.1. Cultivos de <i>G.lamblia</i> .....	16
VI.2. Animales de Experimentación.....	16
VI.3. Obtención de Antígenos Solubles de <i>G. lamblia</i> .....	16
VI.4. Cuantificación de Proteína en el Extracto Antigénico Soluble de <i>G. lamblia</i> .....	17
VI.5. Inducción de la Giardiasis en el Modelo Murino .....	17
VI.6. Evaluación de la Respuesta Inmune Humoral.....	17
VI.7. Citometría de Flujo.....	18

VI.8. Evaluación de la Respuesta Inmune Humoral Mediada por IgG Sérica Mediante el Ensayo de ELISA .....	18
VI.9. Electrotransferencia e Inmunodetección (Western Blotting) .....	19
VI.10. Análisis Estadístico.....	20
<b>VII. RESULTADOS</b> .....	<b>21</b>
VII.1. Evaluación de la Respuesta Inmune Humoral Sistémica hacia Antígenos de Superficie de Trofozoítos de <i>G. lamblia</i> .....	21
VII.2. Análisis de la Respuesta Inmune Humoral Sistémica (IgG suero) hacia proteínas totales de cepas de <i>G. lamblia</i> GS-M-83-H7 y 5G8 (+) .....	24
VII.3. Identificación de Proteínas Inmunorreactivas de <i>G. lamblia</i> Reconocidas por Anticuerpos IgG Séricos de Ratones Infectados.....	26
<b>VIII. DISCUSIÓN</b> .....	<b>27</b>
<b>IX. CONCLUSIONES</b> .....	<b>30</b>
<b>X. LITERATURA CITADA</b> .....	<b>31</b>
<b>XI. APÉNDICE</b> .....	<b>35</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Ciclo de vida y respuesta inmunológica contra *G. lamblia*. Los síntomas son inducidos cuando existe una cierta concentración intestinal de trofozoítos, por lo general de seis a 15 días después de la infección. Las diferentes partes del sistema inmune intestinal se muestran en el orden en que ellos interactúan con *Giardia* durante la infección. El número de trofozoítos en el intestino durante la infección se representa por el área en azul. 8
- Figura 2 Análisis de microscopía confocal de la superficie de trofozoítos de *G. lamblia* GS/M-83-H7. Reconocimiento del anticuerpo monoclonal 5G8.B5 hacia la proteína 5G8 que se expresa en la superficie del parásito. 10
- Figura 3 Reconocimiento de antígenos de superficie mediante IgG inducidos durante la post-infección. Análisis de citometría de flujo utilizando trofozoítos de la cepas GS/M-83-H7 (1A) y 5G8 (+) (1B). 1) Control sin teñir, 2) anticuerpo monoclonal 5G8.B5, 3) Suero Pre-infección, 4 y 5) Suero de ratones infectados con GS/M-83-H7 de la 1ª y 6ª semana (p.i.) respectivamente, 6 y 7) Suero de ratones infectados con 5G8 (+). 22
- Figura 4 Reconocimiento de antígenos de superficie mediante IgG inducidos durante la post-reinfección. Análisis de citometría de flujo utilizando trofozoítos de la cepas GS/M-83-H7 (1A) y 5G8 (+) (1B). 1) Control sin teñir, 2) anticuerpo monoclonal 5G8.B5, 3) Suero Pre-infección, 4 y 5) Suero de ratones infectados con GS/M-83-H7 de la 1ª y 6ª semana (p.i.) respectivamente, 6 y 7) Suero de ratones infectados con 5G8 (+). 23
- Figura 5 Título de anticuerpos IgG séricos en ratones C3H/HeJ infectados con *Giardia lamblia*. Muestras de suero obtenidas semanalmente por espacio 25

de 6 semanas post-infección (A), y 6 semanas post-reinfección. (C), reconocieron antígenos de la cepa GS/M-83-H7. Estos mismos sueros post- infección (B) y post-reinfección (D) reconocieron proteínas de la cepa 5G8 (+). Se estableció un control, el cual consistió en un grupo de ratones que se inoculó con 200  $\mu$ L de PBS 1X. \*\*Los asteriscos indican la diferencia significativa con respecto al control negativo (suero pre-infección (barra color naranja)).

Figura 6 Perfil de inmunorreconocimiento de antígenos de *G. lamblia* que inducen 26  
respuesta de IgG. Análisis de Western-blotting que muestra el  
inmunorreconocimiento de IgG hacia proteínas de las cepas GS/M-83-H7  
(A) y 5G8 (+) (B). Carriles: 1) Suero preinfección, 2 y 4) suero de  
ratones infectados con la cepa GS/M-83-H7 de la 4<sup>a</sup> semana p.i. y 3<sup>a</sup>  
semana p.r.i. respectivamente, 3 y 5) suero de ratones infectados con la  
cepa 5G8 (+) de la 4<sup>a</sup> semana p.i. y 3<sup>a</sup> semana p.r.i. respectivamente, 6)  
Sobrenadante del anticuerpo monoclonal 5G8.



## RESUMEN

*G. lamblia* es el agente causante de giardiasis, infección parasitaria que se produce por la contaminación fecal/ oral en un medio de higiene precario, siendo una de las enfermedades intestinales humanas más comunes en todo el mundo. La giardiasis se caracteriza por ser una infección grave, debilitante, que afecta a miles de personas cada año, especialmente en los países en desarrollo. Las manifestaciones clínicas van de portador asintomático hasta llegar a desarrollar una infección crónica, donde puede presentar síntomas como pérdida de peso continua, anorexia y malabsorción. En la actualidad, no se cuenta con una vacuna en humanos para controlar y erradicar la infección por *G. lamblia*. Para lograr desarrollar ésta, primeramente se deben identificar, caracterizar, purificar o sintetizar los componentes que confieren inmunogenicidad a la vacuna, los antígenos. Para ello en el presente trabajo se comparó la respuesta inmune humoral inducida por trofozoítos de *G. lamblia* de la cepa 5G8 (+) con la inducida por la cepa GS/M-83-H7 en ratones C3H/HeJ. La respuesta inmune humoral generada en los ratones infectados se evaluó mediante análisis de ELISA indirecto, western-blotting y citometría de flujo. El análisis de citometría de flujo reveló que los trofozoítos 5G8 (+) expresan moléculas en la membrana plasmática más antigénicas que los trofozoítos GS/M-83-H7. Los anticuerpos inducidos durante la infección fueron capaces de reconocer diferentes poblaciones de trofozoítos de la cepa GS/M-83-H7. El perfil de inmunodetección hacia proteínas de *G. lamblia* indica un reconocimiento predominante hacia la banda de 71 kDa en ambas cepas (GS/M-83-H7 y 5G8 (+)). En conclusión, el presente trabajo, demuestra que trofozoítos de la cepa 5G8 (+) y GS/M-83-H7 son antigénicamente diferentes. La proteína 5G8 de *G. lamblia* es una molécula altamente inmunogénica la cual podría ser un candidato de estudio para el establecimiento de bases moleculares y celulares que conlleven al desarrollo de una vacuna contra la giardiasis.

## I. INTRODUCCIÓN

La parasitosis intestinal es un problema de salud pública a causa de la magnitud con la cual se presenta; asimismo, su trascendencia está ligada sobre todo a enfermedades secundarias como la anemia. Los agentes que pueden infectar el intestino humano son diversos, entre los parásitos que colonizan con mayor frecuencia el tracto gastrointestinal se encuentran: *Entamoeba histolytica* y *G. lamblia* (Rodríguez, 2003).

*G. lamblia* (sin. *G. duodenalis* o *G. intestinalis*) es el agente causante de giardiasis (Ekman, 2003). La infección parasitaria se produce por la contaminación fecal/ oral en un medio de higiene precario (Enríquez-Blanco et al., 2010). Las manifestaciones clínicas van de portador asintomático (Aggarwal y Nash, 1988) hasta una sensación de malestar intestinal, seguido de náuseas y anorexia. La fase aguda dura tres o cuatro días, aun cuando una infección aguda pueda desaparecer espontáneamente, se pueden desarrollar una infección crónica. Esta fase puede implicar dos o más años de diarrea intermitente. Durante esta fase crónica se pueden presentar síntomas como cansancio, dolor de cabeza, mialgia, pérdida de peso continua, anorexia y malabsorción (Wolfe, 1992).

Las enfermedades ocasionadas por los parásitos gastrointestinales como *G. lamblia* siguen siendo un importante problema de salud en países como México (Long et al., 2007). Según el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE, 2012), en el primer semestre del 2012, Sonora se ubicó en el quinto lugar con 654 casos. Esta situación sirve como referencia para iniciar actividades correspondientes a promover la salud, para ello es importante obtener estudios confiables que puedan ser útiles para disminuir estas cifras.

Hasta el momento, no se cuenta con un fármaco ideal con el que se logre un alto porcentaje de control y erradicación de la infección con pocos o ningún efecto indeseable (Cañete et al., 2004; Rodríguez et al., 1996). Existen fármacos cuyos efectos secundarios reducen su eficacia (Khaw y Panosian, 1995; Gardner y Hill, 2001) y además son capaces de generar cepas resistentes (Lemée et al., 2000). Ante esta situación y con las implicaciones que las infecciones parasitarias tienen en el desarrollo y la salud en todo el mundo, desde hace muchos años se intenta desarrollar vacunas eficaces contra ellas (Abbas et al., 2008). El tratamiento utilizando vacunas o inmunización tiene como objetivo prevenir la aparición de

enfermedades, e incluso erradicarlas a escala mundial imitando una infección por medio del patógeno o moléculas del agente patogénico contra el cual se desea generar protección.

Existe una gran cantidad de razones para justificar el desarrollo de una vacuna contra *Giardia*, las tres más importantes pueden ser las siguientes: i), *Giardia* se ha reconocido como un patógeno oportunista reemergente que afecta a los grupos de alto riesgo, tales como niños pequeños, ancianos y personas inmunocomprometidas; ii) la giardiasis es una infección grave, debilitante, que afecta a miles de personas cada año, especialmente en los países en desarrollo; iii) *Giardia* tiene potencial zoonótico y su principal vía de transmisión es a través del agua que se utiliza para beber, lavar alimentos y para higiene personal (Lee et al., 2011).

Los antígenos de *Giardia* que poseen un potencial como antígenos diana, se separan en cinco grupos de acuerdo a sus propiedades fisiológicas y somáticas: las proteínas de shock térmico (HSP), éstas son proteínas chaperonas expresadas por las células con el fin de ayudarles a sobrevivir a las tensiones extrínsecas e intrínsecas. Las lectinas, glicoproteínas en la membrana plasmática de los trofozoítos. Las tubulinas, proteínas del citoesqueleto. Las giardinas representan una familia de proteínas que se encuentran sólo en *Giardia* y las proteínas variantes de superficie (VSP) (Lee et al., 2011).

En el presente trabajo se caracterizó parcialmente la respuesta inmune humoral hacia la proteína inmunogénica 5G8 de *G. lamblia*. Generando conocimiento sobre las proteínas inmunogénicas de este parásito y sentando bases para estudios futuros encaminados al desarrollo de una vacuna contra la giardiasis.

## II. ANTECEDENTES

### II. 1. *Giardia lamblia*

*G. lamblia* es un protozooario descubierto por Van Leeuwenhoek en 1681 (Botero y Restrepo, 2003; Khaw y Panosian, 1995), este protista pertenece al Filo Metamonada, Clase Trepomonadea, Orden Diplomonadida y Familia Hexamitidae (Thompson y Monis, 2011). Ésta familia se caracteriza por que sus miembros son diplozóicos flagelados que poseen orgánulos pares, entre ellos dos núcleos similares (Samuelson, 2002), además de la falta de mitocondrias y peroxisomas. Poseen también un único disco ventral (Thompson y Monis, 2011).

*Giardia* nada por el latido sincrónico de sus cuatro pares de flagelos, posee un disco ventral que está compuesto por microtúbulos y proteínas específicas del parásito llamadas giardinas (Samuelson, 2002), con el cual se adhiere en la parte superior del intestino delgado de humanos y otros mamíferos (Ali y Hill, 2003, Astiazarán et al., 2009); este parásito luminal tiene dos características que lo distinguen de otros eucariotas: (i) vive en condiciones microaerofílicas, (ii) carece de mitocondrias y de enzimas de la fosforilación oxidativa (Samuelson, 1999).

*Giardia* tiene un ciclo de vida simple en la que se alterna entre dos formas morfológica y bioquímicamente distintas: trofozoíto y quiste (Prucça y Lujan, 2009). El quiste de 10-12 micras de longitud (Ali y Hill., 2003), tiene forma ovalada con doble membrana, de 2 a 4 núcleos (Botero y Restrepo, 2003). El quiste es la forma infecciosa, de los cuales solo bastan 10 de ellos para establecer la infección (Gardner y Hill, 2001), éstos son ingeridos en el agua, alimentos contaminados o directamente por contacto fecal-oral. Inclusive moscas de la suciedad pueden llevar quistes de *G. lamblia* en su exoesqueleto que han adquirido a partir de fuentes insalubres. Una vez ingerido el quiste ocurre la exquistación, iniciada por el contacto con los ácidos gástricos, seguido por una secuencia de acontecimientos coordinados que conducen a la liberación de uno o dos trofozoítos (Svård et al., 1998; Gardner y Hill, 2001; Ali y Hill, 2003). Es importante que los trofozoítos no emerjan de los quistes en el estómago porque les afecta el ambiente ácido que existe ahí y los eliminaría (Boucher y Gillin, 1990).

El trofozoíto es la forma vegetativa de aproximadamente 15  $\mu\text{m}$  de longitud por 7  $\mu\text{m}$  de ancho, con dos núcleos de igual tamaño, que contienen una copia completa del genoma. Este trofozoíto infecta la parte superior del intestino delgado (duodeno), el cual tiene un pH alcalino favorable. Los trofozoitos pasan a través del intestino delgado al colon y ocurre nuevamente el enquistamiento (Gardner y Hill, 2001). Este trofozoíto tiene forma piriforme y posee una cavidad o ventosa que ocupa la mitad anterior de su cuerpo, la cual utiliza para fijarse a la mucosa intestinal. En la parte central, una barrera doble o axostilo de cuyo extremo anterior emergen 4 pares de flagelos, uno anterior, dos laterales y otro posterior. El axostilo es atravesado en el centro por dos estructuras en forma de coma llamadas cuerpos parabasales. Los dos núcleos poseen nucléolos centrales y están unidos entre sí por los rizoplastos que terminan en el extremo anterior del axostilo, en dos órganos puntiformes llamados blefaroplastos (Botero y Restrepo, 2003). En la fase de enquistamiento, el organismo es relativamente resistente a la cloración y ozonólisis y puede permanecer viable durante varias semanas (Ali y Hill, 2003).

## II.2. Giardiasis

La giardiasis es una de las enfermedades intestinales humanas más comunes en todo el mundo. Siendo, *G. lamblia* la única especie reconocida que se encuentra en la mayoría de los seres humanos y otros mamíferos (Ropolo et al., 2005). La Organización Mundial de la Salud estima que aproximadamente 250 millones de personas alrededor del mundo están infectadas con *Giardia* (Palm et al., 2003; Velázquez et al., 2005; Davids et al., 2006; Astiazarán et al., 2009).

Este protozooario es un importante agente causal de la diarrea aguda o crónica en humanos y ciertos animales (Bienz et al., 2001), siendo de esta manera uno de los causantes de enfermedades parasitarias mas comunes en todo el mundo y responsable de la diarrea endémica y epidémica (Nash y Mowatt, 1993). Puede dañar la mucosa intestinal directamente o causar malabsorción, afectando el acceso de nutrientes a la superficie de absorción de la mucosa (Boucher y Guillin, 1990; Long et al., 2010), como las grasas, glucosa, lactosa, xilosa,

la vitamina A y la vitamina B12 (Wolfe, 1992). Por lo que constituye un importante problema de salud pública (Edson et al., 1986).

La infección por *Giardia* origina una amplia variedad de manifestaciones clínicas, que van desde un estado de portador asintomático hasta la diarrea severa, dolor abdominal, náuseas, malabsorción y pérdida de peso (Astiazarán et al., 2009), síntomas que por lo general se presentan dos semanas después de la infección (Rivero et al., 2010). Además, se ha reportado que infecciones crónicas por *Giardia* pueden ocasionar retraso del crecimiento, urticaria, colecistitis y pancreatitis. Síntomas poco frecuentes incluyen artritis, arteritis de la retina e iridociclitis los cuales han respondido al tratamiento específico anti-*Giardia* (Wolfe, 1992).

Existen diversos factores que posiblemente contribuyen a la gran variedad de síntomas clínicos, incluyendo la virulencia de la cepa de *Giardia*, el número de quistes ingeridos, la edad del hospedero y el estado del sistema inmune del mismo, en el momento de la infección. La inmunidad humoral, así como celular, parecen ser importantes en el aclaramiento de la infección. Sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos implicados (Palm et al., 2003).

En la actualidad, el control de la infección se limita a productos químicos, pero se encuentran disponibles sólo algunas drogas, además existen problemas como efectos secundarios, resistencia a los medicamentos y una alta tasa de reinfección después del tratamiento en áreas endémicas (Rivero et al., 2010). Entre los medicamentos que son ampliamente usados está el albendazol y secnidazol, sin embargo, no son 100 % eficientes y pudieran, al igual que muchos antibióticos, generar cepas resistente, como ya se han reportado para albendazol (Lemée et al., 2000), metronidazol y furazolidona (Gamarro y Castanys, 1996). Además se ha reportado que en animales de experimentación el metronidazol crea radicales tóxicos que interfieren con la replicación del ADN (Khaw y Panosian, 1995).

La resistencia a los fármacos es sólo una de las posibles explicaciones que se pueden argumentar para explicar el fallo en el tratamiento antiparasitario, dado que la inaccesibilidad de los fármacos a los lugares de localización parasitaria o la biotransformación del fármaco en el hospedero son otros factores importantes a tener en cuenta (Gamarro y Castanys, 1996). Por lo que, el desarrollo de vacunas contra *G. lamblia* se considera un enfoque prometedor para el control de este parásito (Rivero et al., 2010).

### II.3. Respuesta Inmune a *G. lamblia*

El cuerpo humano está protegido contra agentes infecciosos y otras sustancias perjudiciales mediante células y moléculas efectoras que constituyen el sistema inmunitario. El sistema inmunitario tiene la capacidad de generar memoria inmunitaria que desarrollará inmunidad protectora contra dicho agente (Murphy et al., 2009). Sin embargo, en el caso de los parásitos, éstos evitan la inmunidad protectora reduciendo su capacidad inmunogénica e inhibiendo las respuestas inmunitarias del hospedero (Abbas et al., 2008).

En *G. lamblia* la incidencia de la infección parece estar en aumento y al mismo tiempo se hace evidente que se generan infecciones latentes en el organismo (Ridley y Ridley, 1976). Esto posiblemente se deba a la variación antigénica (VA) que presenta, un proceso que le podría permitir al parásito evadir la respuesta inmune del hospedero (Papanastasiou et al., 1997), ocasionando una infección crónica (Rivero et al. 2010), a las reinfecciones múltiples y a la determinación del espectro clínico (Svärd et al., 1998).

El tracto intestinal se enfrenta a un reto fisiológico en el que debe proporcionar un fácil acceso a los nutrientes ingeridos y también la protección contra los microbios transmitidos por los alimentos. Este desafío se encuentra con múltiples defensas del hospedero específicas y no específicas que establecen y mantienen una barrera intestinal selectiva (Davids et al., 2006). *G. lamblia* al ser ingerida activa múltiples componentes del sistema inmunitario innato y adaptativo (Singer, 2011), tanto humoral como celular (Wolfe, 1992) (Figura 1).

La presencia de la flora bacteriana en el tracto intestinal podría inhibir infecciones por *G. lamblia* a través de varios mecanismos, incluyendo la competencia por los recursos, la toxicidad directa, entre otros (Singer et al., 2001). Además, los monosacáridos N-acetil-glucosamina, N-acetil-galactosamina y fucosa, han demostrado inhibir la unión del parásito a las células epiteliales, pero no se sabe si los azúcares inhiben competitivamente con una lectina del parásito (Moncada et al., 2003).

Las defensinas, pequeños péptidos antimicrobianos producidos por las células de Paneth, pueden eliminar a los trofozoítos *G. lamblia* in vitro. El óxido nítrico inhibe la proliferación y diferenciación de los trofozoítos in vitro (Langford et al., 2002; Roxtröm-Lindquist y Palm, 2006). Niveles elevados de la quimiocina MCP-1, IFN-  $\gamma$ , Interleucina 4 (IL-4) e Interleucina

5 (IL-5), fueron asociados con el incremento en la duración de la infección por *Giardia* y un incremento de IL-8 se asoció con la disminución del tiempo de infección (Long et al., 2010). Los mastocitos (Li et al., 2004) e IL-6 influyen en la defensa inmune contra *Giardia* (Roxtröm-Lindquist y Palm, 2006). Considerados en conjunto, estos datos indican que los seres humanos son capaces de producir una amplia gama de citocinas en respuesta a la infección con *Giardia* (Singer, 2011).

La respuesta inmune por células B y células T son importantes para el control de las infecciones por *Giardia* (Astiazarán et al., 2009). Los anticuerpos de isotipo IgA son necesarios para la eliminación efectiva de *G. muris* y *G. lamblia* (Langford et al., 2002; Davids et al., 2006; Roxtröm-Lindquist y Palm, 2006; Long et al., 2007; Long et al., 2010;). La forma más probable en el que la IgA contribuye a la eliminación de la infección es inhibiendo la unión del trofozoíto de *Giardia* al epitelio intestinal (Heyworth, 1990; Langford, 2002).

Se ha demostrado también la presencia de anticuerpos IgG e IgM específicos a *Giardia* en suero de personas infectadas (Wolfe, 1992; Soliman et al., 1998). Aunado a esto, pacientes con hipogammaglobulinemia, donde los niveles de IgG e IgA se reducen, las infecciones son crónicas (Soliman et al., 1998; Palm et al., 2003). También se ha indicado que los individuos sintomáticos tienen significativamente mayor respuesta antiparasitaria de IgG1 e IgG3 cuando se comparan con los pacientes asintomáticos. El isotipo IgG1 se produce en los seres humanos en respuesta a antígenos polipeptídicos. Los anticuerpos monoclonales del isotipo IgG3 han demostrado aglutinar trofozoítos de *Giardia* in vitro y eliminarlos (Soliman et al., 1998).

La respuesta inmune celular juega un papel importante en el control de la infección por *Giardia*. Se ha demostrado un papel fundamental de las células T CD4 + en el control de la giardiasis aguda (Roxtröm-Lindquist y Palm, 2006; Astiazarán et al., 2009; Singer, 2011).

Todos estos estudios han demostrado que los linfocitos T y B son importantes para controlar la infección por *Giardia* en ratones. Sin embargo, conocimiento actual conocimientos acerca de los antígenos específicos de *G. lamblia*, que inducen una respuesta inmune humoral y celular, sigue siendo limitado (Velázquez et al., 2005).



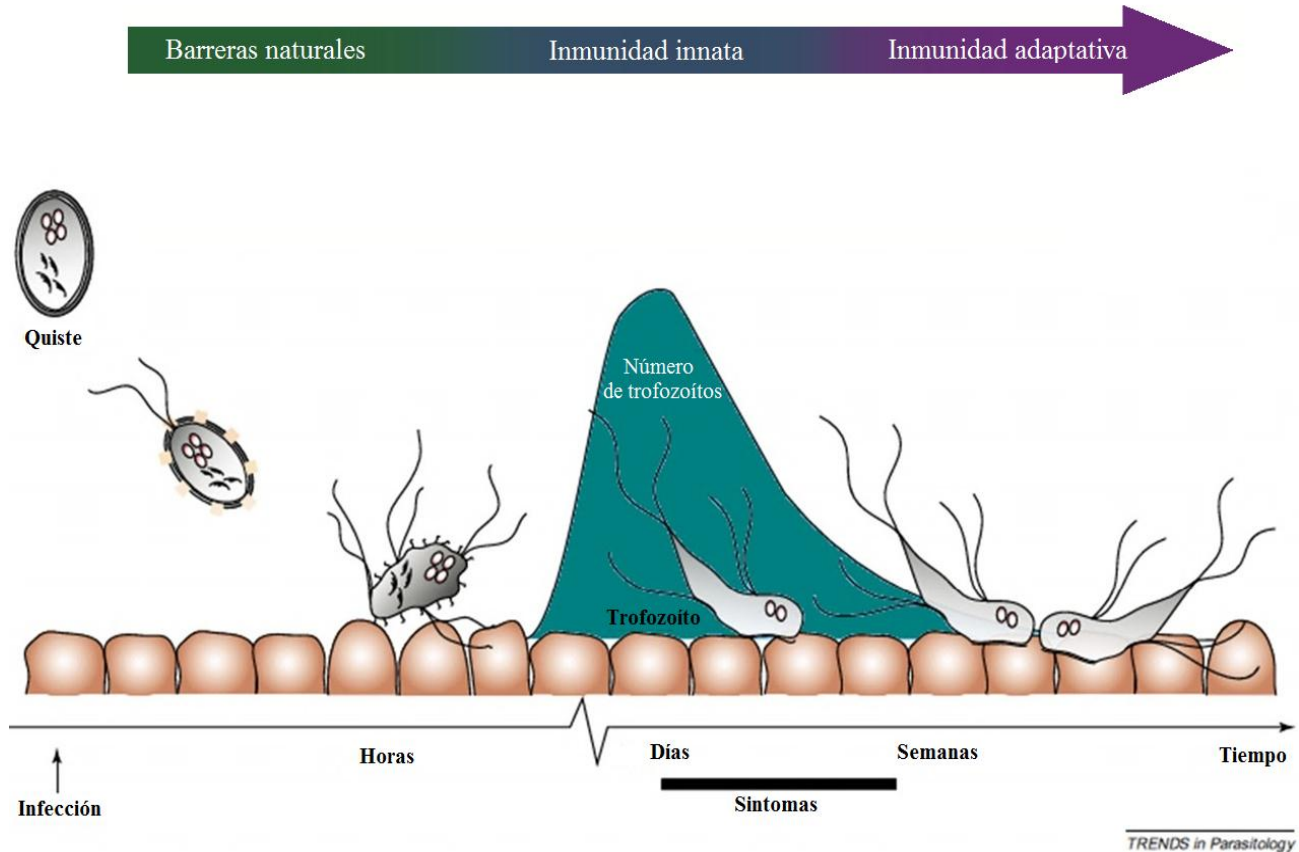


Figura 1. Ciclo de vida y respuesta inmunológica contra *G. lamblia*. Los síntomas son inducidos cuando existe una cierta concentración intestinal de trofozoítos, por lo general de seis a 15 días después de la infección. Las diferentes partes del sistema inmune intestinal se muestran en el orden en que ellos interactúan con *Giardia* durante la infección. El número de trofozoítos en el intestino durante la infección se representa por el área en azul (Imagen tomada de Roxtröm-Lindquist y Palm, 2006).

#### II.4. Proteínas Antigénicas de *Giardia lamblia*

En la actualidad, no existe una vacuna disponible para la giardiasis humana, por lo que es importante la identificación de antígenos inmunogénicos de *G. lamblia* que estimulan tanto anticuerpos protectores, como una respuesta inmune celular (Astiazarán et al., 2009).

Las VSP que cubren toda la superficie del parásito son los antígenos más estudiados en *G. lamblia*. Estas proteínas sufren variación antigénica, por lo que se ha cuestionado su valor como blancos moleculares de diagnóstico (Palm et al., 2003) y en el desarrollo de vacunas

(Singer, 2011). Las VSP predominantes de una población puede cambiar en respuesta a los anticuerpos o factores fisiológicos (Svärd et al., 1998), éstas varían en tamaño desde 20 a 200 kDa y son ricas en cisteína, un aminoácido que se encuentra principalmente en regiones Cys-XX-Cys distribuidos a lo largo de la región extracelular del polipéptido (Ropolo et al., 2005; Bienz et al., 2001; Nash y Mowatt, 1993; Davids et al., 2006).

Los antígenos de superficie diferentes a las VSPs que se han descrito, son pocos, entre los más estudiados se encuentran: proteínas de la superficie (polipéptidos de 82 kDa y 65 kDa), las giardinas en el citoesqueleto, proteínas de choque térmico, lectinas y tubulina en el disco y flagelos (Singer, 2011); una glicosilfosfatidilinositol anclada a la proteína de 49-kDa, varias proteínas entre 30 y 34 kDa y una proteína de unión a ácidos grasos de 8-kDa (Palm et al., 2003).

En el laboratorio de Inmunología y Biología Celular del Departamento de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad de Sonora se ha dedicado a la identificación y caracterización bioquímica e inmunológica de antígenos capaces de inducir una respuesta inmune humoral y celular. Velázquez et al. (2005) realizaron el análisis de muestras fecales y de sueros de ratones C3H/HeJ después de ser infectados y re-infectados con trofozoítos de *G. lamblia*, teniendo como resultado que la IgA intestinal y las respuestas de anticuerpos IgG en suero se dirige a un número limitado de bandas protéicas, con pesos moleculares de 48, 55, 63, 71, 86, 106, 131 y 159 kDa. Al utilizar hibridomas de células T específicos contra *G. lamblia* se observó que reconocían una fracción antigénica de 70 kDa, al analizar esta fracción mediante espectrometría de masas, se identificaron las siguientes proteínas: subunidad catalítica A vacuolar sintetasa (71537Da), proteína de choque térmico citosólica 70 (71633Da), proteína de unión a anticuerpos o BiP (BIP del inglés; Binding Immunoglobulin Protein) (74360Da), Complejo B IFT (75562Da), proteínas inducidas por estrés como la HSP-90 y la HSP-70 citosólica localizadas en las bandas proteicas de 71 kDa, y 63 kDa (Quintero, 2008; Rascón, 2008).

Ávila (2008), obtuvo 5 hibridomas de células B específicos hacia proteínas que se encuentran solamente en la superficie de la clona GS/M 83 H7 de *G. lamblia*, los cuales en su mayoría reconocieron una banda de 71 kDa (5G8). Esta banda proteica también es reconocida por anticuerpos IgG durante la infección en el modelo murino. En estudios posteriores, se caracterizó parcialmente la proteína reconocida por la mayoría de estos monoclonales. Se

realizaron ensayos de citometría de flujo en los cuales se observó que solo el 5% de la población de la cepa GS/M-83-H7 de *G. lamblia* expresaban en la superficie del parásito la proteína 5G8. Basados en esta observación se enriqueció la población de trofozoítos de la cepa GS/M-83-H7, que expresa en la superficie celular este antígeno (Figura 2), mediante la técnica de inmunoadsorción o panning, dando como resultado un incremento en la población que expresan la proteína en la membrana plasmática del parásito (aproximadamente 70%) (Cisneros y Glaus, 2010). Análisis de espectrometría de masas de esta proteína purificada sugirieron fuertemente que la proteína 5G8 pudiera ser la proteína BiP de *G. lamblia* (Quintero, 2008; Rascón, 2008).

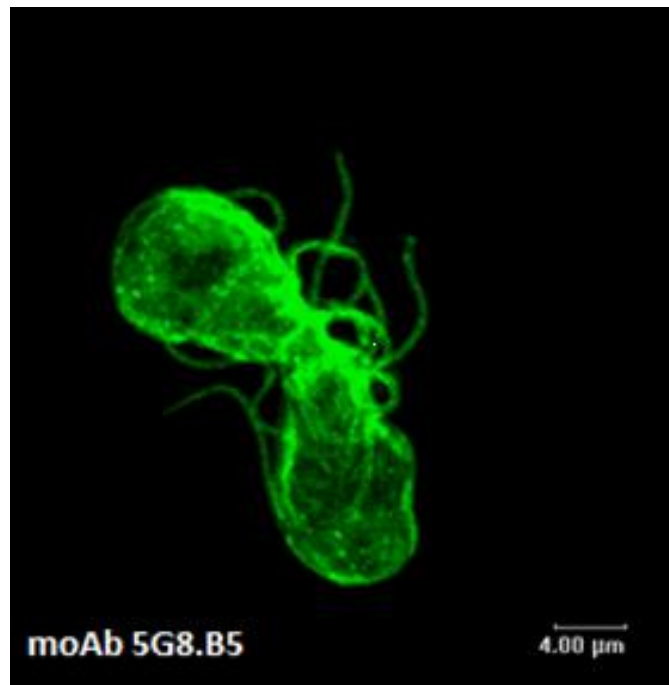


Figura 2: Análisis de microscopía confocal de la superficie de trofozoítos de *G. lamblia* GS/M-83-H7. Reconocimiento del anticuerpo monoclonal 5G8.B5 hacia la proteína 5G8 que se expresa en la superficie del parásito (Imagen tomada de Quintero et al., 2013).

## II.5. Modelo experimental

El sistema inmunitario evolucionó en el sentido de proteger a los vertebrados contra la infección por parte de microorganismos y parásitos mayores, pero la mayor parte de lo que se conoce sobre la inmunidad procede de estudios sobre las respuestas inmunitarias en los animales de laboratorio ante inyecciones de sustancias no infecciosas, tales como proteínas y polisacáridos extraños (Alberts et al., 2010).

Se han utilizado varios modelos animales para describir la biología y / o inmunidad a las infecciones por *Giardia*, lo que permite estudiar de las interacciones dinámicas que se producen entre el hospedero y el parásito (Byrd et al., 1994).

Basado en análisis genético, se pueden distinguir siete conjuntos distintos de *G. lamblia* (A a G). Los conjuntos A y B son responsables de la infección humana (Ali y Hill, 2003, Rivero et al., 2010) y así mismo se encuentran en una amplia variedad de mamíferos. Las asociaciones restantes muestran rangos de hospederos más restringidos: C y D se encuentra en los cánidos, E en el ganado, F en los gatos y G en roedores (Sprong et al., 2009).

El conjunto B predomina en los humanos; los animales domésticos juegan un papel importante en la gama de huéspedes del conjunto A (Sprong et al., 2009). Estos conjuntos están representados por aislados humanos GS y WB, respectivamente. El aislado GS es significativamente más patogénico en infecciones de humanos que lo que es el aislado WB (Adam, 2001), probablemente sea causado por su variación antigénica, ya que Aggarwal y Nash (1988) demostraron que in vitro sus antígenos de superficie cambian más rápidamente que los antígenos de superficie de WB. GS/M-83-H7 (Conjunto B) expresa VSP H7 (72kDa) como su antígeno de superficie principal (Bienz et al., 2001; Müller et al., 1996; Rivero et al., 2010).

Los ratones son infectados naturalmente por *G. muris*, el cual también se somete a la variación antigénica, pero no infecta a humanos y no puede ser cultivada in vitro (Prucça y Luján, 2009). La cepa GS/M-83-H7 de *G. lamblia* puede infectar a ratones y a humanos. Esta cepa presenta la ventaja de poder ser cultivada in vitro, por lo que es ampliamente utilizada para estudiar la inmunología de la giardiasis (Rivero et al., 2010)

Se ha evaluado la capacidad infectiva de las cepas WB-C6 y GS/M-83-H7 tanto en jerbos, como en ratones C3H/HeJ, encontrando que la cepa WB solo es capaz de infectar al jerbo. Sin embargo, la cepa GS/M-83-H7 es capaz de inducir giardiasis en el modelo murino C3H/HeJ de forma estable por varios días. Los resultados concuerdan con lo descrito previamente en la literatura (Byrd et al., 1994). El modelo de ratón es una poderosa herramienta para estudiar los mecanismos inmunes efectoros que se producen durante la infección por *Giardia* y tiene considerables ventajas sobre otros modelos animales. El sistema inmune del ratón está bien caracterizado y existe una extensa variedad de reactivos y tecnologías para el estudio de su sistema inmune (Velázquez et al., 2005).

### **III. JUSTIFICACIÓN**

La caracterización de la respuesta inmune humoral hacia la proteína 5G8, brindará conocimiento sobre las proteínas inmunogénicas de *Giardia lamblia*, sentando bases para estudios futuros encaminados al desarrollo de una vacuna contra este parásito.

#### **IV. HIPÓTESIS**

La cepa de *Giardia lamblia* 5G8 (+) que expresa altos niveles de la proteína inmunogénica 5G8, induce una respuesta inmune humoral diferente a la generada por la cepa GS/M-83-H7.

## **V. OBJETIVOS**

### **V.1. Objetivo General**

Comparar la respuesta inmune humoral inducida por trofozoítos de *G. lamblia* de la cepa 5G8 (+) con la inducida por la cepa GS/M-83-H7 en ratones C3H/HeJ.

### **V.2. Objetivos Específicos**

Comparar la respuesta humoral mediada por IgG inducida por trofozoítos de *G. lamblia* de la cepa 5G8 (+), con la inducida por la cepa GS/M-83-H7 en función al tiempo de infección.

Determinar el perfil de reconocimiento de proteínas antigénicas de la cepa GS/M-83-H7 y 5G8 (+).



## **VI. METODOLOGÍA**

### **VI.1. Cultivos de *Giardia 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) y cultivos de trofozoítos de la cepa 5G8 (+) cultivadas en medio TYI-S33 (Apéndice 1), suplementado con 10 % de suero de ternera recién nacida (NBCS. GIBCO. Invitrogen 16010). Los trofozoítos fueron incubados a una temperatura de 37 °C en condiciones microaerófilas.

### **VI.2. Animales de Experimentación**

Para el modelo experimental murino, se utilizaron ratones de la cepa singénica C3H/HeJ de 8 a 14 semanas de edad, éstos fueron obtenidos de “The Jackson Laboratory of Maine” (USA). Los animales se mantuvieron en el Bioterio del Departamento de Investigaciones de Postgrado en Alimentación (DIPA), con un ciclo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, a una temperatura de 25 °C y alimentación y acceso a agua ad libitum.

La selección de esta cepa de ratón se basó en estudios previos que reportan una mayor susceptibilidad a la infección intestinal por *G. lamblia* en este modelo (Byrd et al.,1994).

### **VI.3. Obtención de Antígenos Solubles de *G. lamblia***

Para la obtención de extractos antigénicos solubles de *G. lamblia*, se inició con un cultivo confluyente de trofozoítos de *G. lamblia* (aprox.  $100 \times 10^6$  trofozoítos), los cuales fueron lavados con solución reguladora de fosfatos (PBS), pH 7.2, a 4 °C. Después del último lavado, la pastilla de trofozoítos se resuspendió en 700  $\mu$ L de PBS y se sometió a tres ciclos de congelación- descongelación en un congelador (Thermo Fisher Scientific) -80 °C y temperatura ambiente respectivamente, antes del proceso de congelación- descongelación, se

le adicionó 5  $\mu\text{L}$  de un cocktail de inhibidores de proteasas (4-(2-aminoetil) bencenfulfonilfluoruro (AEBSF), bestanina, pepstatina, A,E-64, leupeptina y 1,10-fenantiolina., SIGMA). Se sonicó tres veces (Brandson sonifier 250, Shelton, Ct. USA) durante dos minutos a treinta ciclos (Apéndice 4). Finalmente se centrifugó a 14,000 g, por 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante *G. lamblia* se mantuvo en congelación a -80 °C hasta su uso (Rascón, 2008).

#### **VI.4. Cuantificación de Proteína en el Extracto Antigénico Soluble de *G. lamblia***

La determinación de la concentración de proteína en el extracto antigénico se realizó mediante el método de Bradford. La concentración de proteína por mililitro se estimó a partir de curvas de calibración, utilizando albúmina sérica bovina (BSA) (concentración 1 mg/mL) como estándar. Una vez obtenida la curva, se preparó la muestra antigénica a analizar en una dilución 1:10 con PBS, se hizo reaccionar con reactivo Bradford (BIO-RAD) y posteriormente se determinó la densidad óptica (D.O.) de esta solución a 595 nm en un lector de microplaca.

#### **VI.5. Inducción de la Giardiasis en el Modelo Murino**

Para el diseño del estudio se conformaron tres grupos de 3 ratones cada uno. Al grupo 1, considerado grupo control negativo, se le administró 200  $\mu\text{L}$  de solución reguladora de fosfatos salino (PBS). A los grupos 2 y 3 se les administró  $5 \times 10^6$  trofozoítos de *G. lamblia* GS/M-83-H7 y 5G8 (+) respectivamente, suspendidos en 200  $\mu\text{L}$  de PBS estéril a un pH 7.2. Los resultados se presentaron como post-infección. A la semana 6 post-infección se repitió este mismo esquema de infección para inducir la re-infección (Apéndice 2).

#### **VI.6. Evaluación de la Respuesta Inmune Humoral**

Para evaluar la respuesta inmune humoral, se obtuvieron muestras de sangre de la vena de la cola de los ratones, previo a la inducción de la infección (controles negativos o pre-infección)

y semanalmente, por espacio de 6 semanas en la post-infección y post-reinfección. Éstas se centrifugaron a 2500 rpm por 10 minutos (Apéndice 3), para obtener las muestras de suero para su posterior análisis por ELISA, Western-blotting y citometría de flujo.

### **VI.7. Citometría de Flujo**

Para el análisis por citometría de flujo se utilizaron cultivos confluentes de trofozoítos de *G. lamblia* GS/M-83-H7 y 5G8 (+) (aprox.  $8 \times 10^6$  trofozoítos), los cuales fueron lavados (cada lavado consistió en centrifugación por 5 min a 4 °C a 1800 rpm y se resuspendió con solución de fosfatos (PBS 1X), pH 7.2, a 4 °C). Se depositaron  $5 \times 10^5$  trofozoítos en cada pozo y se incubaron con el suero obtenido de los ratones infectados y re infectados con *Giardia* (diluido 1:20 en D5F-0,05 %  $\text{NaN}_3$ ), durante 1 hora a 4 °C. Después de dos lavados que consistían en resuspender la pastilla de trofozoítos con 200  $\mu\text{L}$  de PBS 1X frío y centrifugación a 1800 rpm a 4 °C por 5 minutos, los trofozoítos se incubaron con anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a isocianato de fluoresceína (FITC) (diluido 1:200 con D5F-0,05 %  $\text{NaN}_3$ ) durante 1 hora a 4 °C. Después los trofozoítos se lavaron nuevamente, se centrifugaron y se resuspendieron en 200  $\mu\text{L}$  de D5F-  $\text{NaN}_3$ .0,05 % y se fijaron con 200  $\mu\text{L}$  de paraformaldehído al 2 %. Su análisis fue mediante el equipo FACS (Canto II, Becton Dickinson, CA, EE.UU.) (Quintero et al., 2013).

### **VI.8. Evaluación de la Respuesta Inmune Humoral Mediada por IgG Sérica Mediante el Ensayo de ELISA**

El antígeno soluble de *G. lamblia* se adicionó a pozos de una placa de ELISA (2.5  $\mu\text{g}$  de antígeno/pozo) utilizando un volumen de 50  $\mu\text{L}$  por pozo de solución reguladora de carbonatos de pH 9.6. Se incubó la solución por 1 hora a 37 °C o toda la noche a 4 °C. Posteriormente los sitios libres de antígeno del pozo fueron bloqueados con albúmina sérica bovina (BSA) al 1 % en PBS pH 7.2 por 1 hora a temperatura ambiente. Una vez bloqueados, se realizaron lavados con PBS 1X pH 7.2- Tween 0.05 %. Finalmente se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de la dilución 1:10 de los sueros a estudiar y se dejó incubar durante una hora a temperatura

ambiente y en agitación. Posterior a los lavados de la placa (5 veces con PBS 1X pH 7.2), se adicionaron 50  $\mu$ L a cada pozo de una solución de anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP) en dilución 1:1000, por una hora, en agitación constante a temperatura ambiente. Por último se agrega el sustrato específico para la enzima ( $H_2O_2$ ) y ABTS (ácido 2,2-azino-6,3diethylbenzotriazolinsulfónico) como cromógeno (Apéndice 7). El cambio de color de este último es directamente proporcional a la unión antígeno-anticuerpo y se mide la Densidad óptica (D.O.) a 415 nm en un lector de microplacas Multiskan EX (Thermo LabSystem) (Rascón, 2008).

### **VI.9. Electrotransferencia e Inmunodetección (Western Blotting)**

La separación electroforética de los antígenos solubles de *G. lamblia* se realizó en geles de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE), con el uso de una cámara de electroforesis para minigeles (Mini-PROTEAN® 3 Electrophoresis Cell., BIO-RAD). Las muestras se corrieron a 100 voltios constantes por aproximadamente 1 hora 30 min (Apéndice 5). Las proteínas de *G. lamblia* separadas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa utilizando un sistema semi-seco (Apéndice 6). Una vez transferidas las proteínas se tiñeron con rojo de Ponceau. Después de desteñir la membrana, ésta se bloqueó con leche descremada 5 %- PBS (1X)-BSA 1 % durante una hora y se lavó con PBS 1X, la membrana se incubó con los sueros que en el análisis de ELISA presentaron mayor título de IgG (1:10), durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación constante. Después de 5 lavados con PBS 1X de 5 min. cada uno, las membranas se incubaron con anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano (1:7500) a temperatura ambiente por 1 hora. Posterior a otros 5 lavados, se le adicionó una mezcla 1:1 de luminol y peróxido de hidrógeno y se dejó reaccionar por 10 minutos a temperatura ambiente, al término, se retiró el exceso de luminol- $H_2O_2$  y se procedió a revelar la reacción antígeno-anticuerpo por quimioluminiscencia, utilizando soluciones reveladoras y fijadoras (Fujifilm) (Ávila, 2008).

### **VI.10. Análisis Estadístico**

Para comparar los títulos de anticuerpos IgG obtenidos en los sueros de los ratones infectados con *Giardia lamblia* durante la infección experimental, se utilizó el análisis U de Mann Whitney con valor de significancia estadística menor o igual a 0.05.

## VII. RESULTADOS

### VII.1. Evaluación de la Respuesta Inmune Humoral Sistémica hacia Antígenos de Superficie de Trofozoítos de *G. lamblia*

Con la finalidad de analizar si la infección por las cepas de *G. lamblia* (utilizadas en este estudio (GS/M-83-H7 y 5G8 (+)) indujeron respuestas inmunes diferentes, se realizó una inmunotinción indirecta utilizando sueros de ratones infectados y se evaluó el patrón de reconocimiento antigénico mediante citometría de flujo. Ambas cepas de *G. lamblia* indujeron anticuerpos de la clase IgG específicos contra antígenos de superficie del parásito. Se detectaron anticuerpos a partir de los 7 días p.i en el grupo de ratones infectados con 5G8 (+). El patrón de reconocimiento antigénico fue diferente por parte de los anticuerpos generados por la infección de las cepas 5G8 (+) y GS/M-83-H7. La respuesta inmune humoral reconoció a la gran mayoría de los trofozoítos de 5G8+ ( $\approx 66-95\%$ , Figura 3B y fig. 4B). En contraste, estos anticuerpos reconocieron solamente el  $\approx 25\%$  de la población de trofozoítos de la cepa GS/M-83-H7 (Figura 3A y 4A). Durante la reinfección de los ratones, se mantuvo el patrón de reconocimiento antigénico diferente hacia ambas cepas de *G. lamblia*. Se observó una respuesta inmune humoral mayor durante la reinfección con ambas cepas de *Giardia* (Fig. 4A y fig. 4B) (Apéndice 8). El grupo control que se inoculó con PBS no presentó anticuerpos específicos anti- *G. lamblia*.

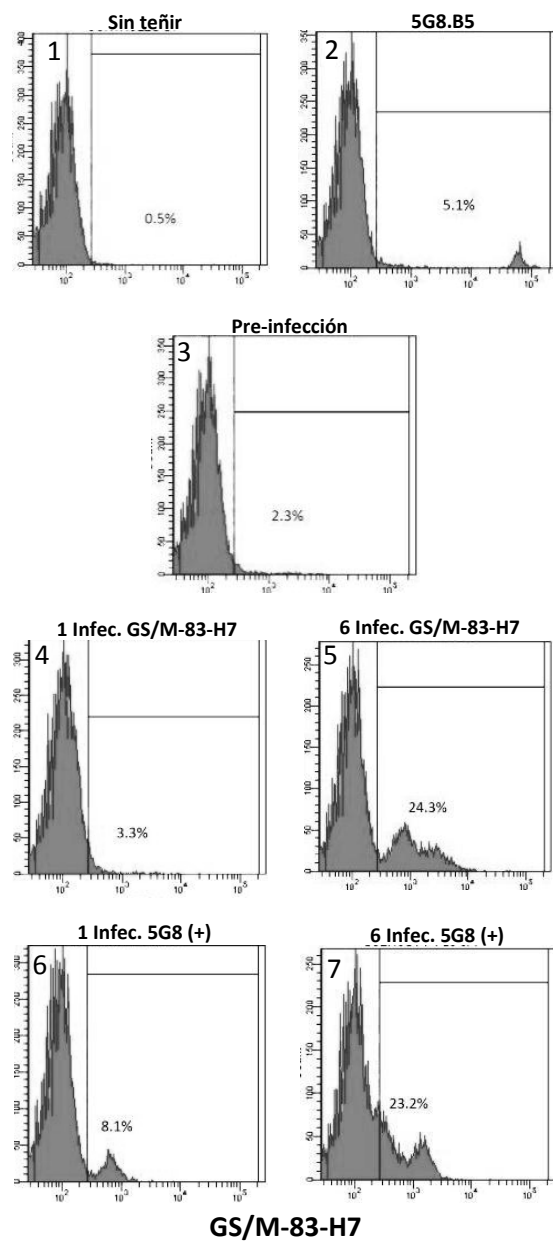
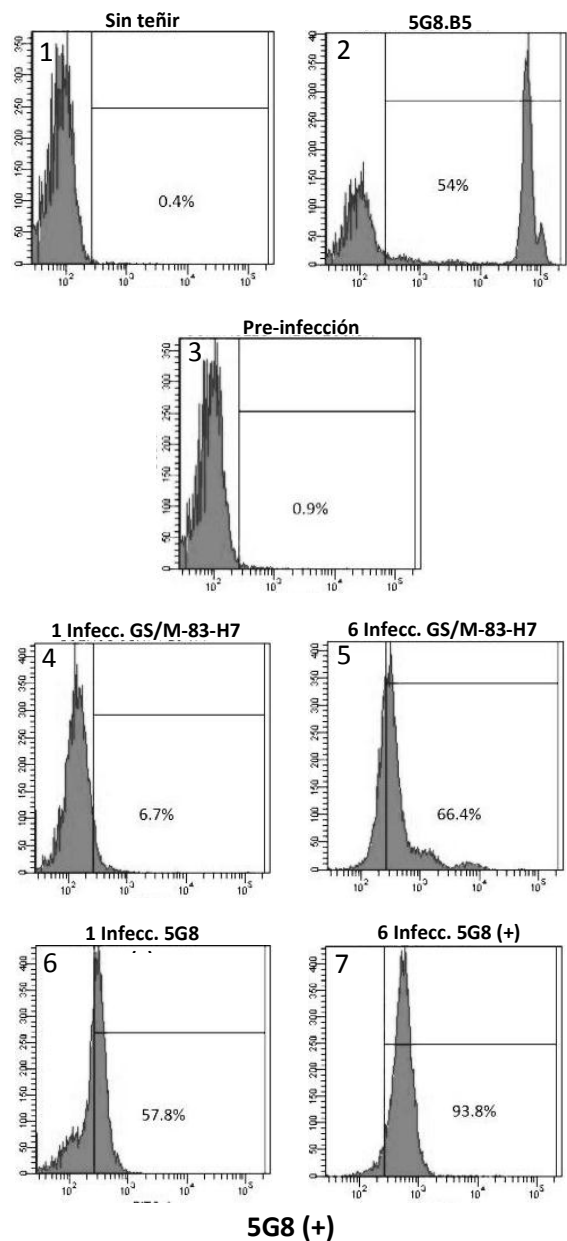
**A****B**

Figura 3. Reconocimiento de antígenos de superficie mediante IgG inducidos durante la post-infección. Análisis de citometría de flujo utilizando trofozoítos de la cepas GS/M-83-H7 (1A) y 5G8 (+) (1B). 1) Control sin teñir, 2) anticuerpo monoclonal 5G8.B5, 3) Suero Pre-infección, 4 y 5) Suero de ratones infectados con GS/M-83-H7 de la 1ª y 6ª semana (p.i.) respectivamente, 6 y 7) Suero de ratones infectados con 5G8 (+).

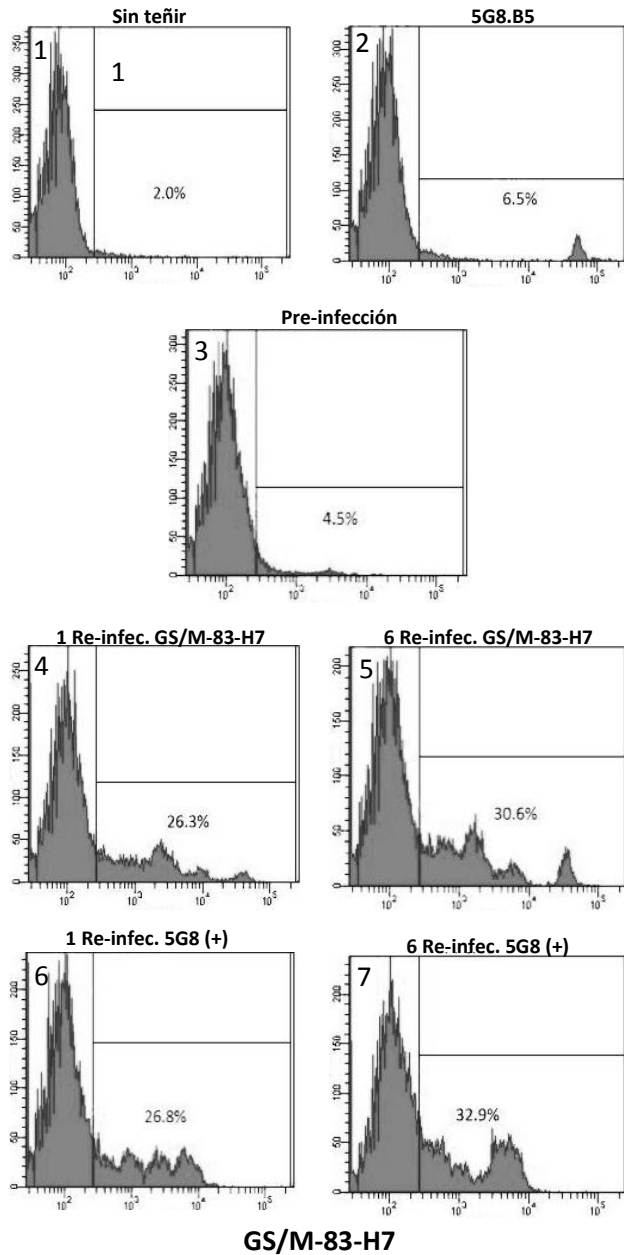
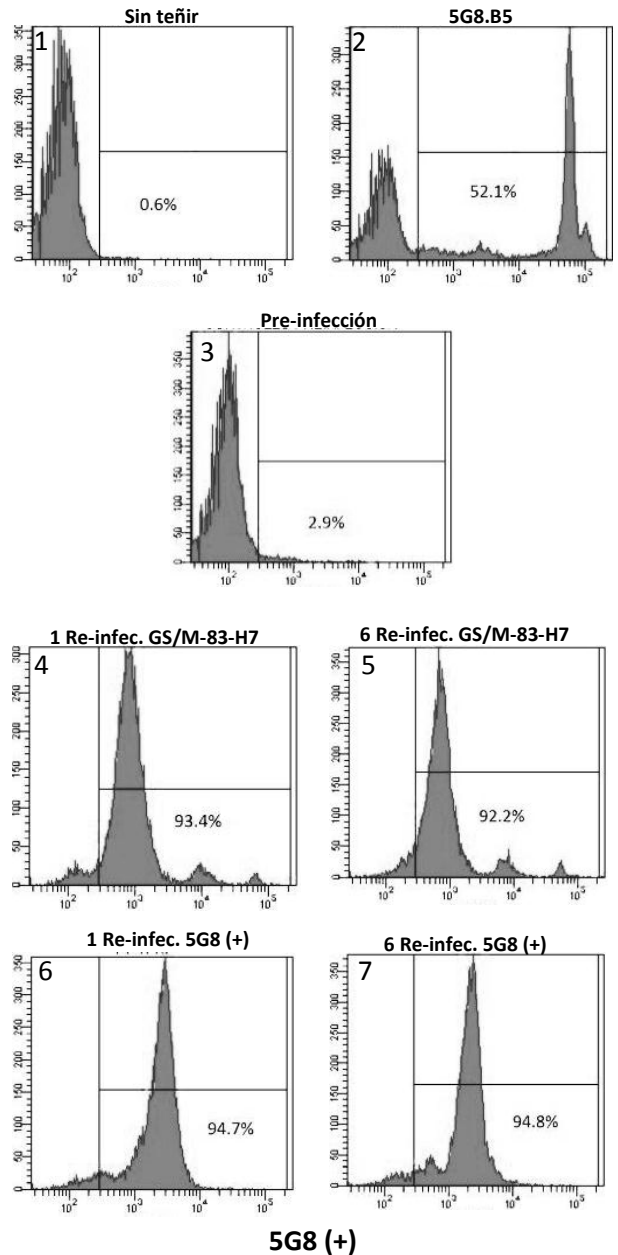
**A****B**

Figura 4. Reconocimiento de antígenos de superficie mediante IgG inducidos durante la post-reinfección. Análisis de citometría de flujo utilizando trofozoítos de la cepas GS/M-83-H7 (1A) y 5G8 (+) (1B). 1) Control sin teñir, 2) anticuerpo monoclonal 5G8.B5, 3) Suero Pre-infección, 4 y 5) Suero de ratones infectados con GS/M-83-H7 de la 1ª y 6ª semana (p.i.) respectivamente, 6 y 7) Suero de ratones infectados con 5G8 (+).



## VII.2. Análisis de la Respuesta Inmune Humoral Sistémica (IgG suero) hacia proteínas totales de cepas de *G. lamblia* GS-M-83-H7 y 5G8 (+)

Con el fin de evaluar el título de anticuerpos específicos de la clase IgG en sueros de ratones infectados con las cepas de *G. lamblia* GS/M-83-H7 y 5G8 (+), se utilizó el ensayo de inmunoadsorción de ELISA indirecto. Los resultados mostraron diferencias en el reconocimiento antigénico hacia lisados de proteínas de *G. lamblia* de las cepas GS/M-83-H7 y 5G8 (+) (Figura 5B). El título de anticuerpos en los ratones infectados con GS/M-83-H7 mostró un aumento en la primera semana después de la infección (D.O. a 415 nm fue de  $0.148 \pm 0.007$ ), sin embargo, este incremento no fue constante durante el transcurso de la infección (Fig. 5A). En los ratones que fueron infectados con 5G8 (+) no se detectaron anticuerpos específicos contra ninguna de las cepas de *G. lamblia* estudiadas (D.O. a 415 nm de  $0.109 \pm 0.002$ ; Fig. 5B) Por otro lado y contrario a lo esperado, en el proceso de re-infección no se observó un incremento importante o significativo en el título de anticuerpos IgG, respecto a la primo-infección (Fig. 5C y D).

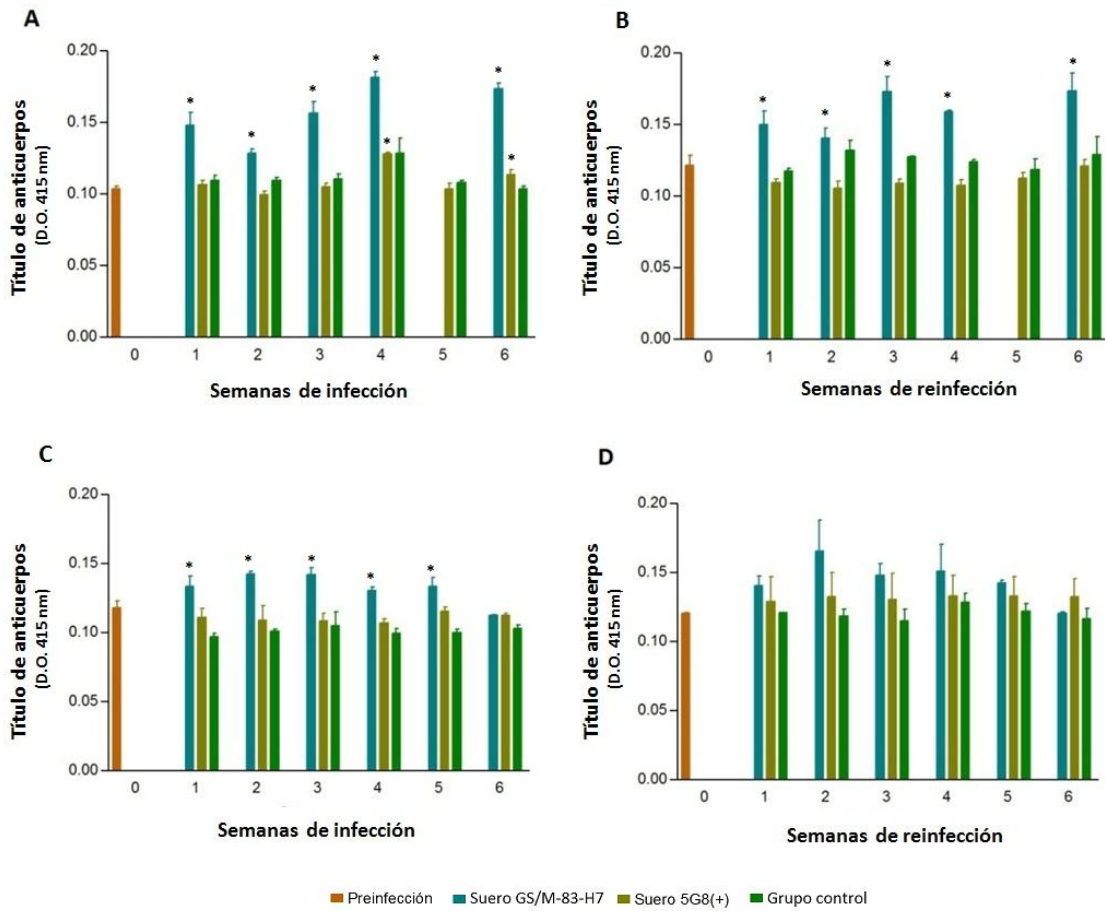


Figura 5. Título de anticuerpos IgG séricos en ratones C3H/HeJ infectados con *G. lamblia*. Muestras de suero obtenidas semanalmente por espacio de 6 semanas post-infección (A), y 6 semanas post-reinfección. (C), reconocieron antígenos de la cepa GS/M-83-H7. Estos mismos sueros post- infección (B) y post-reinfección (D) reconocieron proteínas de la cepa 5G8 (+). Se estableció un control, el cual consistió en un grupo de ratones que se inoculó con 200  $\mu$ L de PBS 1X. \*Los asteriscos indican la diferencia significativa con respecto al control negativo (suero pre-infección (barra color naranja)).

### VII.3. Identificación de Proteínas Inmunorreactivas de *G. lamblia* Reconocidas por Anticuerpos IgG Séricos de Ratones Infectados

Con la finalidad de comparar el perfil de reconocimiento antigénico de los anticuerpos séricos generados durante la infección de ratones con las cepas de *G. lamblia* GS/M-83-H7 y 5G8 (+) se realizó un ensayo de Western-blotting. La infección por ambas cepas indujo una respuesta inmune humoral contra un número limitado de bandas proteicas de diversos pesos moleculares de 63, 71, 131 y  $\approx$ 200 kDa, presentando mayor inmunorreactividad hacia la banda de 71kDa (Proteína 5G8) (Figura 6).

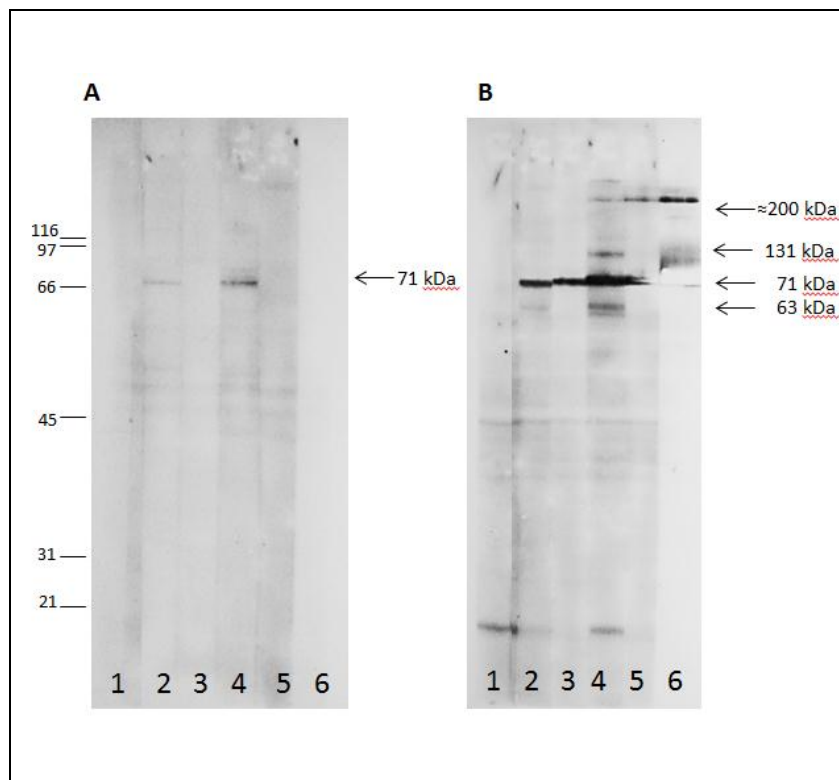


Figura 6. Perfil de inmunorreconocimiento de antígenos de *G. lamblia* que inducen respuesta de IgG. Análisis de Western-blotting que muestra el inmunorreconocimiento de IgG hacia proteínas de las cepas GS/M-83-H7 (A) y 5G8 (+) (B). Carriles: 1) Suero preinfección, 2 y 4) suero de ratones infectados con la cepa GS/M-83-H7 de la 4<sup>a</sup> semana p.i. y 3<sup>a</sup> semana p.r.i. respectivamente, 3 y 5) suero de ratones infectados con la cepa 5G8 (+) de la 4<sup>a</sup> semana p.i. y 3<sup>a</sup> semana p.r.i. respectivamente, 6) Sobrenadante del anticuerpo monoclonal 5G8.

## VIII. DISCUSIÓN

El presente estudio describe un análisis serológico de la respuesta inmune humoral generada en ratones, durante un proceso de infección con *G. lamblia*. Este trabajo proporciona conocimiento sobre la proteína inmunogénica de *G. lamblia* 5G8 y la respuesta humoral inducida por trofozoítos de *G. lamblia* de las cepas 5G8 (+) y GS/M-83-H7. Para las infecciones experimentales, se utilizaron ratones C3H/HeJ, que en estudios anteriores han demostrado ser susceptibles a la infección por *G. lamblia* (Byrd et al., 1994). La respuesta que se generó durante la infección con estos trofozoítos se evaluó en el transcurso de las semanas, mediante análisis de ELISA indirecto, western-blotting y citometría de flujo, con el fin de demostrar la capacidad inmunogénica de la proteína 5G8. El análisis de citometría de flujo reveló que los trofozoítos 5G8 (+) expresan moléculas en la membrana plasmática más antigénicas que los trofozoítos GS/M-83-H7, al ser reconocidos en su totalidad por los anticuerpos inducidos durante la infección. La producción de una respuesta inmune adecuada requiere una determinada concentración de inmunógenos (Rojas, 2004) y más de la mitad de la población de trofozoítos 5G8+ expresan la proteína 5G8, a diferencia de la cepa GS/M-83-H7 que sólo el 5 % de la población de estos trofozoítos la expresan en la superficie (Quintero et al., 2013). Los anticuerpos inducidos durante la infección fueron capaces de reconocer diferentes poblaciones de trofozoítos de la cepa GS/M-83-H7, lo que indica la heterogeneidad antigénica de esta cepa, la cual previamente ha sido reportada en estudios in vitro por Aggarwal y Nash (1988).

Los resultados de ELISA aparentemente sugieren que el suero de ratones infectados con 5G8 (+) no contiene anticuerpos específicos hacia los antígenos de *G. lamblia*, esto podría deberse a la sensibilidad del método de ELISA utilizado y/o a una baja concentración de proteína en la mezcla antigénica de *G. lamblia* que se utilizó en este procedimiento, debido a que claramente mediante el método de citometría de flujo y western blotting se revela la presencia inequívoca de anticuerpos específicos anti-*G. lamblia*.

En el presente estudio, el análisis por western-blotting se usó para identificar las proteínas inmunogénicas de las dos cepas de *Giardia* estudiadas GS/M-83-H7 y 5G8 (+) y para detectar posibles diferencias en los patrones de reconocimiento de los anticuerpos

inducidos durante la infección. El perfil de inmunorreconocimiento hacia proteínas de *G. lamblia* de la cepa 5G8 (+), indica un reconocimiento predominante hacia la banda de 71 kDa, misma que aparentemente no es reconocida en la cepa GS/M-83-H7 por los anticuerpos de ratones infectados (post-infección) con 5G8 (+), lo cual podría deberse a una diferencia en la concentración de proteína 5G8 existente en ambas cepas y es posible que durante el proceso de transferencia antigénica hacia la membrana de nitrocelulosa durante el desarrollo de la técnica de western blotting la cantidad de antígeno sea menor en las membranas con mezcla antigénica proveniente de lisados de trofozoítos GS/M-83-H7, y/o a la especificidad que se indujo en estos ratones, al presentar los trofozoítos en su mayoría la proteína inmunogénica 5G8, a diferencia de los trofozoítos GS/M-83-H7 que muestran una mayor diversidad de proteínas inmunogénicas. El reconocimiento hacia esta proteína 5G8 (proteína de 71 kDa) ha sido reportada en trabajos anteriores (Velázquez et al., 2005; Quintero et al., 2013). En la literatura se reporta que proteínas como la VSPH7, la cual es la proteína variable de superficie característica de la cepa GS/M-83-H7, es un antígeno muy inmunogénico y presenta una movilidad relativa en geles cercano a 72 kDa (Bienz et al., 2003), sin embargo, se ha demostrado por medio de espectrometría de masas y citometría de flujo que existen diferencias significativas entre la proteína de estudio y la VSPH7 (Quintero et al., 2013), estos mismos análisis sugirieron fuertemente que la proteína 5G8 es la proteína BiP, la cual aparece aproximadamente en la banda de 70 kDa (Soltys et al., 1996, Lujan y Mowatt, 1996). BiP es un homólogo de la proteína de choque térmico HSP-70 (Varela, 2011) y entre sus funciones está la translocación de proteínas a través de la membrana del RE (Soltys et al., 1996). Algunas proteínas de choque térmico son antigénicas y otras pueden transportar péptidos a la membrana celular para presentarlos a células del sistema inmune (Rojas, 2004). Las proteínas de *G. lamblia* de la familia hsp70 están entre los antígenos más dominantes, reconocidos por el sistema inmune del huésped (Lujan y Mowatt, 1996).

Es un gran reto para la investigación en inmunología y parasitología el desarrollo de estrategias que favorezcan la inmunidad contra parásitos protozoarios (Lopes et al., 2012). La importancia que se le da a *Giardia* como problema de salud (Eckman, 2003; Edson et al., 1986), ha llevado a diversos investigadores a realizar estudios enfocados en el desarrollo de una vacuna capaz de estimular la producción de anticuerpos protectores (Lee et al., 2011). Los resultados obtenidos en este estudio contribuyen en la caracterización bioquímica e

inmunológica de antígenos altamente inmunogénicos del parásito *G. lamblia*, lo cual es importante para el establecimiento de bases científicas sólidas para en el desarrollo de una vacuna contra la infección intestinal provocada por este parásito.

## **IX. CONCLUSIONES**

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, se concluye que:

Los trofozoítos de la cepas de *G. lamblia* 5G8 (+) y GS/M-83-H7 son antigénicamente diferentes.

La población de trofozoítos 5G8 (+) expresa en su membrana plasmática mayor número de moléculas antigénicas que la población de trofozoítos GS/M-83-H7.

La infección con las cepas de *G. lamblia* 5G8 (+) y GS/M-83-H7 induce una respuesta inmune humoral predominantemente hacia la proteína de 71kDa.

## X. LITERATURA CITADA

- Abbas A., Lichtman A., Pillai S. 2008. Inmunología Celular y Molecular. Sexta edición. El sevier. Estados Unidos.
- Adam R. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. Clinical Microbiology Reviews. 14(3):447-445.
- Aggarwal A. y Nash T. E. 1988. Antigenic Variation of *Giardia lamblia* In Vivo. Infection and Immunity 56(6): 1420-1423
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2010. Biología Molecular de la Célula. Quinta edición. Garland Science. Estados Unidos.
- Ali S. A. y Hill D. R. 2003. *Giardia intestinalis*. Current Opinion in Infectious Diseases 16:453-460
- Astiazarán G. H., Quintero J., Vega R., Briceño P., Oviedo C., Rascón L. Garibay E. A. Castillo Y. F., Robles Z., Hernández J. y Velázquez C. 2009. Identification of T-cell stimulating antigens from *Giardia lamblia* by using *Giardia* -specific T-cell hybridomas. Parasite Immunology 31: 132-139
- Ávila Barceló, J.R. 2008. Generación de anticuerpos monoclonales específicos contra antígenos inmunodominantes de *Giardia lamblia*. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias Químico-Biológicas. Hermosillo, Sonora, México.
- Bienz M., Siles-Lucas M., Wittwer P. y Müller N. 2001. *vsp* Gene Expression by *Giardia lamblia* Clone GS/M-83-H7 during Antigenic Variation In Vivo and In Vitro. Infection and Immunity 69: 5278-5285.
- Botero D. y Restrepo M. 2003. Parasitosis Humanas. Corporación para Investigaciones Biológicas. Bogotá, Colombia.
- Boucher, S.E. y Guillin F.D. 1990. Excystation of in vitro-derived *Giardia lamblia* cyst. Infection and Immunity 58: 3516-3522.
- Byrd L. G., Conrad J. T. y Nash T. T. 1994. *Giardia lamblia* Infections in Adult Mice. Infection and Immunity 62: 3583-3585.
- Cañete R., González M. E., Almirall P. y Figueroa I. 2004. Infección por *Giardia* y Giardiosis. Revista Panamericana de Infectología 6(3):41-48.
- Cisneros N. y Glaus 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.
- Davids B., Palm J., Housley M., Smith J., Andersen Y. Martin M., Hendrickson B., Johansen F., Svärd S., Gillin F. y Eckmann L. 2006. Polymeric Immunoglobulin Receptor in Intestinal Immune Defense against the Lumen-Dwelling Protozoan Parasite *Giardia*. The Journal of Immunology 177: 6282-6290.
- Eckman L. 2003. Mucosal defences against *Giardia*. Parasite Immunology 25: 259-270.
- Edson C., Farthing M., Thorley-Lawson D. y Keusch G. 1986. An 88,000-Mr *Giardia lamblia* surface protein which is immunogenic in humans. Infection and Immunity 54(3): 621-625.
- Enríquez-Blanco H., Schneider R. y Rodríguez J. 2010. Síndrome de Intestino Irritable y otros Trastornos Relacionados. Fundamentos biopsicosociales. 62 p. En: Diagnóstico diferencial: Giardiasis. Editorial Médica Panamericana. México.



- Gamarro F. y Castanys S. 1996. Mecanismos de Resistencia a fármacos en parásitos. En: Rivas López y López- López. Parasitología Molecular. CSIC. España.
- Gardner T. y Hill D. 2001. Treatment of Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews* 14: 114-128
- Heyworth M. 1990. Biological Significance of *Giardia*-Specific Antibodies. *The Western Journal of Medicine* 152(3): 293-295
- Khaw M. y Panosian C. 1995. Human Antiprotozoal Therapy: Past, Present, and Future. *Clinical Microbiology Reviews* 8: 427-439
- Langford T., Housley M., Boes M., Chen J., Kagnoff M., Gillin F., Eckmann L. 2002. Central Importance of Immunoglobulin A in Host Defense against *Giardia* spp. *Infection and Immunity* 70:11-18.
- Lee P., Abdul-Wahid A. y Faubert G. 2011. Vaccination Against *Giardia*. 333-351p. En: Luján Hugo D. y Svärd Staffan. *Giardia A Model Organism*. Springer-Verlag/Wien. New York, EEUU.)
- Lemée V., Zaharia I., Nevez G., Rabodonirina M., Brasseur P., Ballet J y Favennec L. 2000. Metronidazole and albendazole susceptibility of 11 clinical isolates of *Giardia duodenalis* from France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46:819-821
- Li E., Zhou P., Petrin Z., y Singer S. 2004. Mast cell-dependent control of *Giardia lamblia* infections in mice. *Infection and Immunity* 72: 6642-6649.
- Long K., Rosado J., Montoya Y., Solano M., Hertzmark E., DuPont H. y Santos J. 2007. Effect of Vitamin A and Zinc Supplementation on Gastrointestinal Parasitic Infections Among Mexican Children. *American Academy of Pediatrics* 120: 846-855.
- Long K., Rosado J., Santos J., Haas M., DuPont H., Nanthakumar N. y Estrada-García T. 2010. Associations between Mucosal Innate and Adaptive Immune Responses and Resolution of Diarrheal Pathogen Infections. *Infection and Immunity* 78:1221-1228.
- Lopes M., Zamboni D., Luján H. y Rodrigues M. 2012. Immunity to Protozoan Parasites. *Journal of Parasitology Research* 2012:1-3
- Lujan, H. D., M. R. Mowatt, Conrad J. y Nash T. 1996. Increased expression of the molecular chaperone BiP/GRP78 during the differentiation of a primitive eukaryote. *Biology of the Cell* 86(1): 11-18
- Moncada D., Kammanadiminti S. y Chadee K. 2003. Mucin and Toll-like receptors in host defense against intestinal parasites. *Trends in Parasitology* 19(7): 305-311.
- Müller N., Stäger S. y Gottstein B. 1996. Serological Analysis of Antigenic Heterogeneity of *Giardia lamblia* Variant Surface Proteins. *Infection and Immunity*. 64(4):1385-1390
- Murphy K., Travers P. y Walport M. 2009. *Inmunobiología de Janeway*. McGraw Hill. Séptima edición. Estados Unidos.
- Nash T. y Mowatt M. 1993. Variant-specific surface proteins of *Giardia lamblia* are zinc-binding proteins. *Microbiology* 90:5489-5493.
- Palm D., Weiland M., Griffiths W., Ljungström I. y Svärd S. 2003. Identification of Immunoreactive Proteins during Acute Human Giardiasis. *The Journal of Infectious Diseases* 187:1849-59.
- Papanastasiou P., McConville M. J., Ralton J. y Köhler T. 1997. The variant-specific surface protein of *Giardia*, VSP4A1, is a glycosylated and palmitoylated protein. *Biochemical Journal* 322:49-56.
- Prucca C. y Lujan H. 2009. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Cellular Microbiology* 11: 1706- 1715.

- Quintero J. 2008. Caracterización química e inmunológica de antígenos de *Giardia lamblia* que inducen una respuesta inmunológica de tipo celular. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias Químico-Biológicas. Hermosillo, Sonora, México.
- Quintero J., Figueroa D., Barcelo R., Breci L., Astiazaran-García H., Rascon L., Robles-Zepeda R., Garibay-Escobar A., Velazquez-Contreras E., Leon A., Hernandez-Hernandez J. y Velazquez C. 2013. Identification of an immunogenic protein of *Giardia lamblia* using monoclonal antibodies generated from infected mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro 108:1-7.
- 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.
- Ridley M. y Ridley D. 1976 Serum antibodies and jejunal histology in giardiasis associated with malabsorption. *Journal of Clinical Pathology* 29: 30-34.
- Rivero F., Saura A., Prucca C., Carranza P., Torri A. y Lujan H. 2010. Disruption of antigenic variation is crucial for effective parasite vaccine. *Nature medicine* 16(5):551-557.
- Rodríguez G., 2003. Epidemiología de la parasitosis intestinal en México. *Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica* 20:1-3
- Rodriguez H., Canut B. y Martin S. 1996. Seasonal prevalences of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in children attending day care centers in Salamanca (Spain) studied for a period of 15 months. *European Journal of Epidemiology* 12:291-295
- Rojas Montoya W. 2004. Inmunología. Décima tercera edición. Corporación para Investigación Biológica. 13 ed. Colombia.
- Ropolo A., Saura A., Carranza P. y Lujan H. 2005. Identification of Variant-Specific Surface Proteins in *Giardia muris* Trophozoites. *Infection and Immunity* 73: 5208-5211.
- Roxstrom-Lindquist, K., D. Palm, Reiner D., Ringqvist E. y Svärd S. 2006. *Giardia* immunity-an update. *Trends in Parasitology* 22(1): 26-31.
- Samuelson J. 2002. What *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* tell us about the evolution of eukaryotic diversity. *Journal of Biosciences (Suppl. 3)* 27: 559–565.
- Samuelson J. 1999. Why Metronidazole Is Active against both Bacteria and Parasites. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43: 1533-1541.
- Singer S., Elmendorf H., Conrad J. y Nash T. 2001. Biological Selection of Variant-Specific Surface Proteins in *Giardia lamblia*. *The Journal of Infectious Diseases* 183:119–24
- Singer S. 2011. Immunology of giardiasis. 319-328 p. En: Luján Hugo D. y Svärd Staffan. *Giardia A Model Organism*. Springer-Verlag/Wien. New York, EEUU.
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 2012. Descripción y Comportamiento de las Enfermedades de Notificación Semanal. Síntesis Epidemiológica 2009. Secretaría de Salud. Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud.
- Soliman M., Taghi-Kilani R., Abou-Shady A. y El-Mageid S. 1998. Comparison of serum antibody responses to *Giardia lamblia* of symptomatic and asymptomatic patients. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 58: 232–239
- Soltys B., Falah M. y Gupta R. 1996. Identification of endoplasmic reticulum in the primitive eukaryote *Giardia lamblia* using cryoelectron microscopy and antibody to BiP. *Journal of Cell Science* 109: 1909-1917.
- Sprong H., Caccio S. y van der Giessen J. 2009. Identification of Zoonotic Genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 3(12): 558.

- Svärd S., Meng T., Hetsko M., McCaffery M. y Gillin F. 1998. Differentiation-associated surface antigen variation in the ancient eukaryote *Giardia lamblia*. *Molecular Microbiology* 30(5): 979–989
- Thompson R. y Monis P. 2011. Taxonomy of *Giardia* Species. 3-15 p. En: Luján Hugo D. y Svärd Staffan. *Giardia A Model Organism*. Springer-Verlag/Wien. New York, EEUU.
- Varela Munita, M. F. 2011. TGF- $\beta$ 1 previene el estrés de retículo endoplásmico y la muerte celular inducida por Isquemia/Reperfusión simulada en fibroblastos cardiacos de rata. Tesis de Licenciatura. Universidad de Chile. Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica. Santiago, Chile.
- Velazquez C., Beltran M., Ontiveros N., Rascon L., Figueroa D. C, Granados A., Hernandez-Martinez J., Hernandez J. y Astiazaran G. 2005. *Giardia lamblia* infection induces different secretory and systemic antibody responses in mice. *Parasite Immunology* 27: 351- 356
- Wolfe M. 1992. Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews* 5: 93-100.

## XI. APÉNCIDE

### Apéndice 1

#### Cultivo de *G. lamblia*

##### Medio TYI-S-33

Tripticasa (BBL Triticase Petone Pancreatic Digest of Casein) BD 211921 445 gr. –LOT. 0097483	20 g
Levadura extracto (Bacto Yeast Extracto Technical) BD 288620 500 gr. LOT. 0055682	10 g
Dextrosa (D – (+) – Dextrose) SigmaD9434 500 gr. Batch #108K0014	10 g
NaCl Sigma 5-5886	2 g
L–Cisteína (L-Cysteine Hydrochloride Monohydrate from non-animal Source) Sigma C6852-1006 Batch #019K10362	2 g
Fosfato de Na dibásico Sigma S0876-1KG Batch #057K0040	1 g
Fosfato de Na monobásico Sigma S0751-500G Batch #067K0110	0.6 g
Bilis (Bile From Bovine and Ovine) Sigma B8381-1006 Batch #098K0012	0.6 g
Acido ascórbico (L-Ascorbic Acid) P.M.= 176 Sigma A5960-25G 065K0181	0.1 g
Citrato férrico amoniacal	0.023 g

Estas cantidades son para preparar 1000 mL de medio TYI, para ello se ajusta el pH a 6.9 con NaOH y se afora a la cantidad de 900 mL con agua miliQ, agregar 1 mL de antibiótico Ceftriaxona (IM, 1 gr. Roche). Suplementar con 100 mL de suero de ternera recién nacida (NBCS. GIBCO. Invitrogen 16010) y filtrar en un sistema con motor al alto vacío con filtro de 0.45 µm.

## Apéndice 2

### Infección de ratones

#### Reactivos

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

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ...1.9 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.... 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, diluir 1:10 con agua desionizada.

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

#### Método

1. Someter a los ratones 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 trofozoitos 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 1800rpm por 5 min. a 4°C.
4. Para su cuantificación en el hemacitómetro (cámara Neubauer) se toma una alícuota de estos trofozoíos 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  $5 \times 10^6$  trofozoítos en 200  $\mu$ L de PBS 1X.
6. Con ayuda de una jeringa para alimentación forzada, se inoculan por vía oral 200  $\mu$ 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.

## Apéndice 3

### **Extracción de sangre de animales infectados**

#### Método

1. Limpiar la punta de la cola de los ratones con una torunda de etanol al 70% y permitir secar.
2. Con una navaja de un filo, cortar la punta de la cola en un ángulo de 45 grados y recoger las gotas de sangre en un microtubo (Eppendorf 1.5 mL) aproximadamente 200  $\mu$ L.
3. Dejar reposar las muestras de sangre por 30min. y posteriormente centrifugarlas en una microcentrífuga (Labnet Spectrafuge 7M) a 2500 rpm por 10 minutos.
4. Extraer el suero de las muestras y mantenerlos a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

## Apéndice 4

### Obtención de antígeno soluble de *G. lamblia*

#### Reactivos

1. Solución reguladora de fosfatos 1 X, pH 7.2 (Ver apéndice 2)
2. Inhibidores de proteasas (4-(2-aminoetil)bencenfulfonilfluoruro (AEBSF), bestanina, pepstatina, A,E-64, leupeptina y 1,10-fenantiolina., SIGMA.)

#### Método

1. Colocar cultivo de *G. lamblia* a confluencia (13 tubos 13 x 100), en un baño de agua-hielo por 15 minutos, lo cual permite que los trofozoítos adheridos al vidrio se despeguen.
2. Juntar los cultivos en tubos falcon de 50 mL.
3. Lavar por 3 ocasiones los tubos de cultivo con 1 mL de PBS y juntar con los cultivos en los tubos falcon.
4. Centrifugar (Centrífuga (Maraton 3000r, Fisher Scientific) a 1800 rpm por 10 minutos y descartar el sobrenadante y juntar las células en un solo tubo falcon.
5. Lavar los trofozoítos por 2 ocasiones con 10 mL de PBS 1X y resuspender los trofozoítos en 1 mL de PBS 1X y colocarlos en microtubos de 1.5 mL y adicionar 5 µL de cocktail de proteasas
6. Lisar las células sometiendo el microtubo a congelación (congelador -80°C. Thermo Fisher Scientific modelo 703) hasta que la suspensión esté completamente congelada (aproximadamente 45 minutos).
7. Retirar del congelador y dejar descongelar a temperatura ambiente (aproximadamente 15 minutos).
8. Repetir el paso 6 y 7 por 3 ocasiones y posterior a esto sonicar 30 ciclos por 2 minutos. Repetir el procedimiento 3 veces.
9. Centrifugar (microcentrífuga. Labnet Spectrafuge 7M) a 14,000 xg por 15 minutos a 4 °C y colectar el sobrenadante (extracto antigénico).
10. Cuantificar contenido de proteínas totales por medio del método Bradford y guardar el extracto proteico en congelación a -30 °C, hasta su uso.

## Apéndice 5

### **Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE)**

#### Reactivos

1. Acrilamida/ Bisacrilamida 30%/8%

Acrilamida ..... 30g

N, N'-metinél-bisacrilamida ...0.8g

Mezclar en un volumen de 100 mL de agua desionizada. Filtrar la solución con un filtro de 0.45 µm. Almacenar en frasco color ámbar a 4°C.

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

2. Trizma base/SDS, pH 6.8 4X (Trizma- base 0.5 M conteniendo SDS 1 0.4%)

Trizma base ..... 6.05 g

Agua deionizada..... 40 mL

Ajustar el pH a 6.8 con HCl 1 N y aforar a 100 mL. Filtrar con filtro 0.45 µm y adicionar 0.4 g de SDS. Almacenar a 4 °C.

3. Trizma-base, pH 8.8 4X (Trizma-base 1.5 M, conteniendo 0.4% SDS)

Trizma base ..... 91 g

Agua deionizada ..... 300 mL

Ajustar el pH a 8.8 con HCl 1N y aforar a 500 mL con agua ultrapura y pasar esta solución por un filtro de 0.45 µm y adicionar 2 g de SDS. Almacenar a 4 °C

4. Persulfato de amonio (PSA) al 10%

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>8</sub>..... 10 µg

Agua ultrapura ..... 100 µL

5. TEMED (N, N, N', N'- Tetrametilendiamina)



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

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

7. 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

8. 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 litro

Para obtener la solución de trabajo 1X, diluir 1:5 la solución stock con agua deionizada y ajustar el pH a 8.3. Almacenar en refrigeración.

9. Solución reguladora de muestra (Buffer muestra) 2X.

En un pequeño volumen de agua deionizada disolver a 0.38 g de trizma-base. Ajustar e pH a 6.8 y añadir 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 deionizada y almacenar a -20 °C.

## Método

1. Ensamblar los vidrios en el equipo para geles de 0.75 mm; asegurándose que no haya fuga de líquido, colocando un poco de alcohol etílico al 70 %. Descartar el alcohol y secar el remanente.
2. 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.
3. Dejar polimerizar por aproximadamente una hora a temperatura ambiente.
3. Adicionar el gel concentrador al, 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  $\mu$  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.

## Apéndice 6

### **Electrotransferencia e Inmunodetección (Western-Blotting)**

#### Método

1. Colocar el gel de poliacrilamida realizado durante la electroforesis, membrana de nitrocelulosa y dos pads (BIO- RAD) en solución de transferencia 1X, pH 8.3 por 5 a 15 minutos.
2. Acomodar de la siguiente manera: pad, membrana de nitrocelulosa, gel de poliacrilamida, y pad, eliminando en cada paso las burbujas que pudieron haberse formado por el buffer pasando un tubo limpio sobre la capa.
3. Electrotransferir en un sistema semiseco (Semi-Dry Blotting System, modelo IMM-1-A, no. de serie 11798) por 20 minutos a 120 mili amperes constantes.
4. Almacenar la membrana de nitrocelulosa a -25° C hasta su uso posterior.
5. Teñir el gel electrotransferido con azul de Coomassie para confirmar la adecuada transferencia del antígeno.

#### Inmunodetección

1. Bloquear las membranas de nitrocelulosa electrotransferidas con Ag de *Giardia*, con leche descremada 5 %- PBS 1X- BSA 1 % por 1 hora.
2. Enjuagar membranas con PBS 1X para quitar el exceso de solución bloqueadora.
3. Eliminar el exceso de PBS 1X y agregar el primer anticuerpo (suero de ratones infectados). Dejar incubar por 1 hora en agitación constante.
4. Enjuagar las tiras suavemente y realizar 5 lavados con PBS 1X, pH 7.2, por 5 minutos.
5. Agregar el segundo anticuerpo (cabra anti-ratón anti IgG peroxidasa conjugada) en dilución 1:7500 con PBS 1X-BSA 0.01 % e incubar durante una hora en agitación constante. Posteriormente enjuagar las tiras suavemente y realizar 5 lavados con PBS 1X, pH 7.2, por 5 minutos.
6. Realizar 5 lavados con PBS 1X, pH 7.2 de 5 minutos. Después de quitar el exceso de agua (NO DEJAR SECAR), y agregar aproximadamente la solución reveladora: una parte de

luminol con una parte de peróxido de hidrógeno (Super Signal, best Pico, Chemiluminescent Substrate, prod no. 34080, Lot No. EB60813, Pierce) a cada una de las tiras y dejar incubar por 10 minutos aproximadamente.

7. Exponer las tiras por 30 segundos a una película y revelar por medio de un proceso de revelado manual: El proceso de exposición y revelado se realiza en un cuarto oscuro: • Exponer la película 10 segundos en solución reveladora. • Enjuagar en agua por 5 a 10 segundos. • Mantener la película en solución fijadora por 10 segundos. • Quitar el exceso de solución enjuagando la película con agua varias veces. • Dejar secar

## Apéndice 7

### **Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (ELISA)**

#### Método

1. Adsorber a los pozos de la placa de ELISA, 2.5 µg de extracto de proteínas antigénicas de *G. lamblia* utilizando 50 µL de solución reguladora de carbonatos de pH 9.6 por pozo.
2. Incubar 1 hr a 37 °C o toda la noche a 4 °C.
3. Lavar cada pozo de la placa con 250 µL PBS 1X pH 7.2- Tween 0.05%, 5 veces.
4. Llenar cada pozo con 50 µL de solución bloqueadora (PBS 1X- BSA 1 %), incubar 1 hora a temperatura ambiente y en constante rotación.
5. Lavar cada pozo de la placa con 250 µL PBS 1X pH 7.2- Tween 0.05%, 5 veces..
6. Adicionar 50 µL del primer anticuerpo (sueros obtenidos semanalmente) a una dilución 1:10 e incubar 1 hora a temperatura ambiente y en constante rotación.
7. Lavar cada pozo de la placa con 250 µL PBS 1X pH 7.2- Tween 0.05%, 5 veces.
8. Adicionar 50 µL de 2do. Ac (cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa) diluido 1:1000 en PBS 1X, incubar 1 hora a temperatura ambiente y en constante rotación.
9. Lavar cada pozo de la placa con 250 µL PBS 1X pH 7.2- Tween 0.05%, 5 veces.
10. Adicionar 50 µL de solución reveladora (ABTS- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ), por cada 1000 µL de ABTS se adiciona 1 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %.
11. Incubarla por 15 minutos a temperatura ambiente. Y posteriormente medir la D.O. a 415 nm en el lector de ELISA.