

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

Expresión y Purificación de la Proteína Recombinante BIP de *Giardia lamblia* para Evaluar su Capacidad Inmunogénica en un Modelo Murino.

Tesis Profesional Práctica

Que para obtener el título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

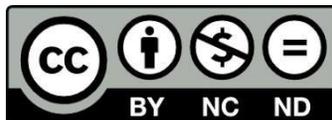
Thania María Garzón Lizárraga

Raúl Ignacio Rascón Samaniego

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

APROBACION DE TESIS

Los miembros del jurado designado para revisar la tesis de licenciatura de **Thania María Garzón Lizárraga** y **Raúl Ignacio Rascón Samaniego**, han dictaminado que el trabajo cumple satisfactoriamente como requisito para obtener el Título de **Químico Biólogo Clínico** otorgado por la Universidad de Sonora.

Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras

Presidente

M.C. María Lucila Rascón Durán

Secretario

M.C. Gloria Carolina López Romero

Vocal

M.C. Martha Judith Valdez Ortega

Suplente

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Biológica 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).

DEDICATORIA

Primeramente a Dios por estar siempre en mi vida, por haberme acompañado y guiado a largo de mi carrera. Me ha guiado por un camino que aunque no ha sido fácil, me ha dado la fortaleza para enfrentar cada obstáculo. Y le agradezco por poner a personas en mi camino con sabiduría, positivas y llenos de amor.

Iniciar una carrera profesional y terminarla de manera satisfactoria es un gran logro personal, pero sin las personas que han estado en el transcurso de mi vida, nunca lo hubiera logrado.

Le dedicó todo mi trabajo a mi madre, la mujer más fuerte que he conocido y que ha sacrificado todo para hacerme la mujer que soy el día de hoy, siempre brindándome su gran amor, comprensión e inmenso apoyo en cada meta y sueño que me he planteado. Sus regaños y consejos me han servido como guía en mi vida, educándome con amor y valores, los que me han servido en cada decisión que he tomado. Todo lo que he hecho es para que se sienta orgullosa de mí y gracias por darme la herencia más valiosa, mi educación. Te amo con todo mi corazón y agradezco a Dios por haberme dado a una madre extraordinaria.

A mi novio Daniel por todos estos años de amor y apoyo, siempre dando todo de él para hacerme reír en aquellos momentos difíciles, demostrándome que la vida sigue, que no estaré sola y que siempre estará mi lado. Ha sido mi compañero y cómplice en todo este proceso y le agradezco por comprender cada ausencia en aquellos momentos de trabajo y apoyarme en mis sueños. Te amo demasiado y gracias por todo.

Thania Garzón

DEDICATORIA

“Disfruta de tus éxitos, lo mismo que de tus planes, mantén el interés en tu propia carrera, por humilde que sea, ella es un verdadero tesoro en el fortuito cambiar de los tiempos.”

Desiderata, Max Ehrmann.

A Dios,

A mi padre Raúl Armando, a mi madre Rosela Elvira y a mi hermana Sofía Fernanda.

Raúl Rascón

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora y al Departamento de Ciencias Químico Biológicas, por su apoyo otorgado en el transcurso de nuestra formación profesional.

A nuestras familias por su apoyo incondicional en nuestras decisiones, y por brindarnos su amor siempre.

Al Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras por permitirnos formar parte de este proyecto y gran equipo de trabajo, esta oportunidad nos ha ayudado a integrar nuestra formación profesional. Gracias por su inmensa paciencia, por confiar en nosotros, y exigirnos cada vez más, haciéndonos mejores estudiantes, obviamente siendo todo “perfectible”. Que Dios lo bendiga siempre.

A nuestra M.C Lucila Rascón siempre estando ahí para nosotros, le agradecemos por todo su apoyo desde que nos conoció dándonos clases, hasta la culminación de este proyecto. Usted es un gran pilar para el laboratorio y sin sus consejos, indicaciones y regaños no lo hubiéramos logrado. La queremos mucho que Dios la bendiga.

A nuestra guía y compañera de trabajo cDra. Gloria Carolina López Romero, no sabemos cómo empezar a agradecerte todo el tiempo, paciencia que nos has dedicado, gracias por dejarnos formar parte de tu trabajo de doctorado, y poner esa confianza en nosotros. En este trabajo juntos, aparte de una relación profesional, se formó una amistad llena de buenos momentos en el laboratorio y en un largo viaje a San Diego. Que Dios te bendiga siempre y que te brinde muchos éxitos en tu formación profesional y personal.

A la M.C Martha Judith Valdez Ortega por su apoyo y disponibilidad siempre en el desarrollo experimental de este trabajo, y gracias por sus consejos, que Dios la bendiga siempre.

Gracias al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, al M.C Rafael Canette por su apoyo en el bioterio, así como también al Dr. José Luis Cárdenas del laboratorio de productos marinos, al Laboratorio de Alimentos por facilitarnos varios de los equipos que se utilizaron en este proyecto.

A todos nuestros maestros que nos otorgaron grandes conocimientos durante nuestra carrera, en especial al Dr. Enrique Bolado, cDra, Paola Gastelúm y M.C. Rosy Lerma, Dra Adriana Garibay, Dr Humberto Astiazarán, M.C. Moisés Navarro.

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

A nuestros compañeros de laboratorio: Alejandra, Brenda, David, Elia, Efraín, Erika, Francisco, Gloria, Jael, Lucía, Lulú, Paola, Samuel y Víctor, gracias por su compañía en esos arduos días de trabajo, en aquellos momentos de risas y bromas que hacían del laboratorio un lugar agradable, su amistad es muy valiosa para nosotros y esperamos que continúe a lo largo del tiempo.

A nuestros amigos de generación por su amistad, grandes momentos, que hacían que las clases y tiempos de estudio fueran más ligeros.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
RESUMEN	12
INTRODUCCIÓN	13
OBJETIVOS	15
Objetivo General	15
Objetivos Particulares	15
ANTECEDENTES	16
Giardiasis	16
Agente etiológico	16
Aspectos clínicos	18
Inmunología de la Giardiasis	19
Respuesta inmune innata	19
Respuesta inmune adaptativa	19
Proteínas antigénicas de <i>Giardia</i>	20
Proteína de unión a inmunoglobulinas (BIP)	21
METODOLOGÍA	24
Sobreexpresión de la proteína BIPr	24
Purificación de la Proteína de Unión a Inmunoglobulina recombinante (BIPr)	24
Cuantificación de BIPr en las fracciones obtenidas por Cromatografía de Afinidad Acoplada a Metales Inmovilizados (IMAC)	25
Perfil electroforético de la proteína BIPr purificada por IMAC	25
Diálisis de las fracciones de la purificación de BIPr	25
Modelo animal de experimentación	25

Inmunización de ratones C3H/HeN con BIPr	26
Títulación de anticuerpos policlonales IgG anti-BIPr	26
Cultivo de <i>G. lamblia</i>	27
Obtención de proteínas solubles de trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	27
Inmunorreconocimiento de BIP por anticuerpos policlonales generados en ratones C3H/HeN	27
Análisis de la respuesta inmune	28
Infección de ratones C3H/HeN con la cepa <i>G. lamblia</i> GS/M-83-H7	28
Inmunorreconocimiento de BIP por IgG sérica de ratones infectados con <i>G. lamblia</i>	28
Ensayo de proliferación de esplenocitos de ratones infectados con <i>G. lamblia</i> mediante el método de reducción de MTT (tetrazolio)	29
Ensayo de proliferación de esplenocitos con CFSE	29
RESULTADOS	31
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFÍA	48
ANEXOS	54

LISTA DE TABLAS

Tabla

		Página
I.	Efecto de la concentración de imidazol en la capacidad de elución de BIPr mediante IMAC	32
II.	Condiciones por grupo de análisis en la obtención de esplenocitos para los ensayos de proliferación.	39
III.	Principales características de la columna HisTrap de Alto rendimiento	43

LISTA DE FIGURAS

Figura

	Página
1. Ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i>	17
2. Diseño del plásmido de expresión pJexpress404/BIP	22
3. Optimización de condiciones para la expresión de BIPr	23
4. Perfil electroforético de BIPr eluída con imidazol a diferentes concentraciones	33
5. Anticuerpos IgG séricos de ratones C3H/HeN inmunizados con BIPr	35
6. Inmunorreconocimiento de la proteína BIP en extracto de <i>Giardia lamblia</i> con anticuerpos policlonales anti-BIPr	36
7. BIPr no es reconocida por anticuerpos IgG de ratones infectados con <i>G. lamblia</i>	37
8. La proteína BIP no estimula la proliferación de esplenocitos (Evaluados por el ensayo MTT) de ratones infectados con <i>G. lamblia</i>	40
9. La proteína BIP no estimula la proliferación de esplenocitos (Evaluados por citometría de flujo con CFSE) de ratones infectados con <i>G. lamblia</i>	41

RESUMEN

Giardia lamblia es un parásito protozoario causante de la giardiasis, una de las enfermedades gastrointestinales más comunes en el mundo. A pesar de ser un padecimiento con altas tasas de morbilidad, es poco lo que se conoce acerca de los antígenos que inducen una respuesta inmune protectora contra el parásito. El presente trabajo está enfocado en la expresión y purificación de la proteína BIP recombinante de *G. lamblia* para evaluar su capacidad inmunogénica en ratones C3H/HeN. La proteína BIP se expresó en un sistema recombinante en *Escherichia coli* y se aisló mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados, una vez purificada la proteína, se utilizó para inmunizar ratones con el fin de generar anticuerpos policlonales específicos para BIPr. Se infectaron ratones con trofozoitos de *G. lamblia* y se realizaron ensayos de inmunorreconocimiento para evaluar la respuesta inmune humoral. Adicionalmente se realizó un ensayo de proliferación de esplenocitos de ratones infectados a diferentes tiempos posteriores a la infección por los métodos de reducción de sales de tetrazolio (MTT) y la disminución de intensidad de fluorescencia de la carboxifluoresceína (CFSE) por citometría de flujo. Se aislaron 1.6 mg de proteína recombinante, con la cual se generaron anticuerpos policlonales que reconocieron fuertemente una banda proteica de aproximadamente 71 kDa en extracto antigénico de *Giardia*. Los sueros obtenidos de ratones infectados reconocieron una banda de 71 kDa en extracto antigénico GS/M-83-H7, sin embargo, la proteína BIPr no fue reconocida, de igual manera, no se observó proliferación *in vitro* de esplenocitos de ratones infectados cuando se estimularon con la proteína BIPr. En conjunto, los datos recabados sugieren que la proteína BIPr tiene una estructura y conformación similar a la proteína nativa, pero no es capaz de inducir una respuesta inmune en el modelo de infección utilizado. Es necesario realizar análisis a mayor profundidad y en diferentes modelos de infección para esclarecer el comportamiento inmunológico de la proteína BIP.

INTRODUCCIÓN

Giardia lamblia es un parásito protozoario flagelado intestinal que afecta a los seres humanos y muchos otros vertebrados (Lujan, 2006). Causa la enfermedad denominada giardiasis, siendo una de las causas más comunes de diarrea (Lujan, 2011). Esta infección puede ocasionar diferentes cursos de la enfermedad que varían desde asintomática pasando por un espectro amplio de sintomatología como dolor epigástrico, diarrea, náuseas, vómito y mala absorción de nutrientes. El curso de la infección puede ser aguda o crónica (Adam, 2001).

Este parásito posee dos estadios en su ciclo de vida, el estadio de quiste es la forma infectiva y es más resistente, ya que sus características estructurales le otorgan una prolongada supervivencia a cambios en el medio ambiente (Adam, 2001; Keserue y cols., 2011). La infección comienza por la ingestión de comida y agua contaminada con quistes del parásito. Cada quiste dentro del hospedero da lugar a dos trofozoítos, los cuales colonizan porciones del intestino delgado y se adhieren a la superficie del epitelio intestinal. Existen cambios de niveles de colesterol y pH durante el trayecto en el intestino que son hostiles para los trofozoítos, lo que comienza el proceso de enquistación y finalmente son expulsados en las heces (López y cols., 2015).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que existen más de 250 millones de personas en el mundo contagiadas con esta enfermedad y que se presentan aproximadamente 2.8 millones de nuevos casos al año, siendo una de las causas más comunes de diarrea en países industrializados, con una prevalencia del 15-30 % y aumentando este porcentaje del 20-60 % en países en vías de desarrollo como México (Savioli y cols., 2006).

Según lo reportado por el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica en el primer semestre del 2012, Sonora ocupó el quinto lugar con 654 casos de esta parasitosis (SSA, 2013) y actualmente hasta el mes de agosto del 2016 se encuentra en el octavo lugar (SSA 2016). Sin embargo, estudios epidemiológicos realizados por la Universidad de Sonora y el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) muestran que la incidencia de esta parasitosis en el estado es mucho mayor a la reportada por la secretaria de salud, donde las cifras varían de 16 a 37 casos por cada 100 habitantes y especialmente afectando a niños en edad escolar (Quihui y Morales, 2012; Miranda, 2009; Valenzuela 2006).

Existen diferentes tratamientos contra la giardiasis, los cuales pueden no ser tan eficaces, debido a factores tales como la resistencia a fármacos, reinfecciones, dosis insuficientes,

inmunosupresión, o retención del fármaco en páncreas o vesícula biliar, aunado a los posibles efectos secundarios (Leitsch, 2015). Entre los principales compuestos se encuentra el metronidazol, y aunque puede controlar la infección, puede producir efectos tales como cefalea, vértigos, náuseas, urticaria, entre otros (Gardner, 2001). También se ha reportado que el albendazol tiene una mayor actividad contra *G. lamblia* que el metronidazol (Cedillo y Muñoz, 1992), pero también presenta efectos secundarios similares.

A pesar de la alta incidencia de giardiasis en México y el mundo, son pocos los estudios que sustentan su complejidad antigénica, naturaleza bioquímica y participación en la respuesta inmune del hospedero (Chaudhuri y cols., 1997; Hanevik y cols., 2011; Saghaug y cols., 2015). El conocimiento y el papel que esos antígenos tienen en la respuesta inmune durante la infección son importantes para el entendimiento y aclaración de la enfermedad.

Se han realizados estudios que se enfocan en la búsqueda de proteínas inmunogénicas de *G. lamblia*, proponiendo diversos antígenos, entre ellos la proteína BIP que forma parte de la familia de las Hsp 70 (Proteínas de choque térmico) (Lee y cols., 2014; Quintero, 2008). BIP es una de las proteínas que se encuentran en el retículo endoplásmico y tiene como función el plegamiento y tránsito de otras proteínas, siendo esencial para el parásito. No obstante el conocimiento que se tiene acerca de esta proteína en *Giardia* como posible inmunógeno es escaso y es de importancia conocer los mecanismos involucrados y la respuesta inmune que se genera ante BIP durante el transcurso de infección con el parásito.

OBJETIVOS

Objetivo General

Expresar y purificar BIP recombinante de *Giardia lamblia* para su estudio como una potencial proteína inmunogénica

Objetivos Particulares

- Expresar la proteína BIP de *G. lamblia* en *Escherichia coli* Roseta gammi
- Purificar la proteína BIP mediante cromatografía de afinidad acoplado a metales (IMAC)
- Generar anticuerpos policlonales específicos anti-BIP en ratones
- Evaluar la capacidad de BIP recombinante para inducir una respuesta celular y humoral en un modelo de infección murino.

ANTECEDENTES

Giardiasis

Agente etiológico

Giardia lamblia fue descubierta por Van Leeuwenhoek en 1681, es un parásito protozoario, que posee dos núcleos bilateralmente situados, una membrana nuclear, citoesqueleto, sistema de endomembrana y flagelos (Adam, 2001), aunque es un organismo eucariota, carece de ciertos organelos como mitocondria, nucléolo y peroxisoma. También posee un disco ventral, que le confiere la característica de adherencia, la cual es esencial para su supervivencia y patogenicidad (Luján y Svärd, 2011).

El ciclo de vida de *Giardia lamblia* es muy sencillo, debido a que solo posee dos estadios; el quiste corresponde a la forma infectiva para el hospedero mediante transmisión fecal-oral (Lascurain y col., 1993; Faubert, 2000), morfología ovalada, mide aproximadamente 8-14 μm de largo y 7-10 μm de ancho, el espesor y composición de su pared lo hace resistente a condiciones ambientales tales como la lisis hipotónica (Ankarklev y col., 2010). El proceso de desenquistación se lleva a cabo cuando los quistes entran en contacto con los jugos gástricos del estómago, seguido por la acción de varias proteasas como cisteína proteasas que ayudan en este proceso (Ward y col., 1997), dando lugar a dos trofozoítos. El trofozoíto tiene morfología periforme, mide 12-15 μm de longitud y de 5-9 μm de ancho, posee dos núcleos y cuatro pares de flagelos, y un disco ventral, que tiene la función de adherirse. Factores como altos niveles de bilis, bajos niveles de colesterol y pH básico, propician que los trofozoítos vuelvan a enquistarse, iniciando así un nuevo ciclo de vida (Ankarklev y col., 2010).

En la naturaleza existen diferentes especies del género *Giardia* que se pueden clasificar de la A hasta la H dependiendo de su ensamblaje genético, los ensamblajes infectivos para el humano, y de importancia clínica son los A y B (Xiao, 2008). Los factores que determinan la virulencia de algún brote de giardiasis no se encuentran esclarecidos por completo, sin embargo existen diferencias entre la patogenicidad y virulencia de los diferentes ensamblajes genéticos (Haque y col., 2005). Diversos estudios han intentado relacionar los síntomas entre los ensamblajes A (cepa WB-C6) y B cepa (GS/M-83-H7) con resultados contradictorios entre sí, esto debido a que la infección es causada por una mezcla de cepas (Solaymani, 2010).

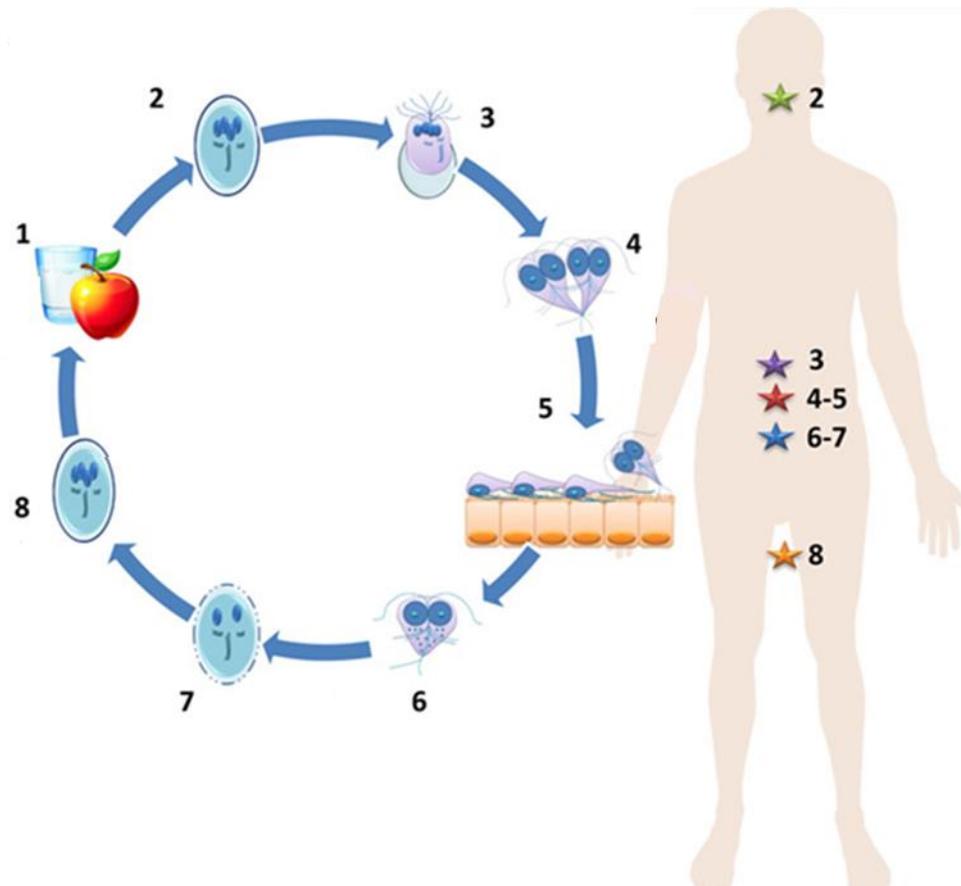


Figura 1. Ciclo de vida de *G. lamblia*. 1 y 2.- Ingestión de quistes por comida y agua contaminada, 3.- Desenquistamiento, 4.- Reproducción por fisión binaria del trofozoíto, 5.- Colonización del intestino delgado, 6 y 7.- Enquistamiento, 8.- Liberación de quistes a través de las heces. Adaptado de López y cols., 2015, *Parasite Immunology*, 37, 8, 394-406.

Aspectos clínicos

La enfermedad causada por *Giardia*, denominada giardiasis, es una de las enfermedades gastrointestinales más comunes en el mundo, puede presentarse de manera sintomática o asintomática. Del 20 % al 80 % de los sujetos infectados pueden presentar síntomas tales como, diarrea, náuseas, dolor epigástrico, vómito, pérdida de peso y mala absorción de nutrientes (Eckmann, 2003; Quintero, 2013; Astiazarán y col., 2009). Pueden existir diferentes factores que contribuyen a la presencia de estos síntomas, como la edad, el número de quistes ingeridos, la virulencia de la cepa de *Giardia* y el estado inmune del hospedero (Palm y col., 2003). Se ha encontrado que deficiencias en los mecanismos de respuesta humoral podría ser un factor determinante para que la infección sea o no sintomática en niños (Rajeshwari y col., 1996).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que existen alrededor de 250 millones de personas infectadas con este parásito en el mundo (WHO, 1996 y 2005). Debido a las diferencias en las condiciones sanitarias en el mundo, los países subdesarrollados como México, tienen una mayor prevalencia y recurrencia de este parásito que los países desarrollados. Por este motivo *G. lamblia* constituye un importante problema de salud pública global (Lujan, 2006; Quihui y Morales, 2011). Según informes de la Secretaría de Salud y la Dirección General de Epidemiología, Sonora se encuentra en el octavo lugar, hasta el mes de agosto del 2016 (SSA, 2016).

Aunque la incidencia reportada por instituciones de gobierno en México no es alarmante y no muestra a la giardiasis como una de las principales enfermedades por protozoarios, en diversos estudios realizados en diferentes comunidades de Sonora muestran prevalencias que van de los 28 al 37 % (Miranda, 2009; Valenzuela 2006).

Inmunología de la Giardiasis.

Respuesta inmune innata

La mucosa intestinal juega un papel importante dentro de los mecanismos de respuesta inmune innata del hospedero, evitando la unión de los trofozoítos a epitelio y de esta manera afectando mecanismos de colonización de *Giardia*. Por otro lado el movimiento peristáltico favorece la excreción del parásito.

El óxido nítrico, interviene en diferentes procesos contra la infección por *Giardia*. Posee características inmunomoduladoras, inhibe el proceso de enquistación y exquistación, y puede producir efectos citostáticos en los trofozoítos (Eckmann y cols., 2000; López y cols. 2015). Aunque estos dos procesos sean esenciales para el progreso de la infección, *Giardia* ha desarrollado estrategias para contrarrestar dichos efectos, como la capacidad que tiene para disminuir o inhibir la expresión de óxido nítrico epitelial *in vitro*.

Los fagocitos mononucleares son células que intervienen en procesos efectores y reguladores, observándose que ingieren trofozoítos de manera *in vitro*, observando las alteraciones morfológicas en los trofozoítos dentro del fagolisosoma (Hill y Pearson, 1987). Existen también algunos tipos de células como mastocitos, células dendríticas y células M (López y cols.2015), que facilitan la activación de la respuesta inmune adaptativa.

Respuesta Inmune Adaptativa

La respuesta inmune en mucosas ante antígenos parasitarios es regulada por las células T. Los grupos de linfocitos encontrados tanto intraepitelialmente (IEL) como en lámina propia (LPL) durante el período de infección corresponden al linaje CD8 positivo, y tienden a disminuir de concentración al llegar a la fase de eliminación de la infección (Ebert, 1999).

Al analizar la respuesta de un modelo de ratón deficiente en ciertas poblaciones celulares, se demostró que los linfocitos T CD4⁺ αβ son requeridos para la eliminación de la infección. En ratones atímicos se ha detectado una reducción de daño a nivel intestinal, específicamente en las microvellosidades, por otra parte, la población predominante de IEL y LPL fue de linfocitos T γδ (Ebert, 1999).

Diversos trabajos en investigación se han enfocado principalmente en evaluar la respuesta inmune humoral del hospedero ante la giardiasis y se ha demostrado que este mecanismo es de gran importancia para el aclaramiento de la infección, ya que durante la parasitosis se ha observado que aumentan los niveles de IgA e IgG principalmente, donde dicho incremento

correlaciona de manera proporcional con el aclaramiento de la infección (Velázquez y col., 2005; López y cols., 2015).

Proteínas antigénicas de *Giardia*

La caracterización de los antígenos de *G. lamblia* es importante para entender los mecanismos de defensa que desarrolla el hospedero, así como también los mecanismos de evasión que implementa el parásito. Se han descrito diversas proteínas antigénicas de *G. lamblia*, incluyendo proteínas de superficie variable de (VSPs), proteínas de la pared del quiste (CWPs), giardinas, tubulinas, arginina deaminasa, ornitina carbamoil transferasa y enolasa, entre otras (Langford et al. 2002, Abdul-Wahid y Faubert 2004).

Las giardinas se encuentran en el citoesqueleto de *Giardia*, y son definidas como una familia de aproximadamente 30 kDa, asociadas a los microtúbulos del disco ventral y axóstilo de la forma vegetativa. Existen diferentes tipos como lo son las α 1-giardina, α 2-giardina y β -giardinas (Faubert, 2000), siendo las α -giardinas expresadas constantemente durante el ciclo de vida del parásito.

Las VSP son proteínas que recubren la superficie del trofozoíto, tienen un peso molecular alrededor de 20 kDa a 200 kDa. Estas proteínas se encargan de la variabilidad antigénica. Existen aproximadamente 200 genes de VSPs en el genoma del parásito (Gargantini y cols., 2016) pero se presenta solo una clase de VSP a la vez en el trofozoíto, las cuales pueden cambiar cada 6 a 12 generaciones, esta característica puede participar en la capacidad de los trofozoítos para reinfectar al hospedero.

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 de proteínas inmunogénicas de *Giardia*. Se realizaron experimentos donde anticuerpos IgG séricos e IgA fecales de ratones infectados con la cepa GS/M-83-H7 reconocen a proteínas de aproximadamente 71 kDa (Velázquez y cols., 2005), adicionalmente, se evaluó la capacidad de varias fracciones de distintos pesos moleculares de una mezcla antigénica de *G. lamblia* GS/M-83-H7 de activar linfocitos T *in vitro*, utilizando hibridomas de células T específicos contra la misma cepa. Las fracciones de proteínas que fueron capaces de ser reconocidas y estimular a dichos hibridomas, se analizaron por espectrometría de masas donde se identificó entre otras proteínas a la proteína de choque térmico citosólica de aproximadamente 71 kDa. Por esto se ha propuesto a las HSP 70 como posibles proteínas inmunogénicas de *G. lamblia* (Quintero, 2008).

Proteína de unión a inmunoglobulina (BIP)

BIP es una proteína que fue inicialmente llamada proteína reguladora de glucosa 78 (GRP-78) en mamíferos. Pero después fue renombrada cuando se descubrió que esta proteína se une a las inmunoglobulinas en sus cadenas pesadas. Actualmente es un importante miembro de las Hsp70 y por su función se clasifican entre las chaperonas moleculares del retículo endoplásmico. Se ha descrito como potente señalizador intracelular y conocida por ser un importante antígeno en varios protozoarios como *Leishmania*, *Plasmodium*, *Toxoplasma* y *Trypanosoma* (Miller, 1999).

Estudios recientes han posicionado a BIP como una candidata para cumplir el papel de proteína inmunogénica en *G. lamblia*, identificándola como inductora de la respuesta inmune celular, activando a células dendríticas, células T y por ende estimulando la producción de citosinas como IL-2 e IFN- γ e induciendo la sobreexpresión de MHC-II (Lee y col., 2014).

Una de las líneas de estudio en nuestro equipo de trabajo se ha enfocado en caracterizar la proteína BIP y se optó por generarla en un sistema recombinante mediante la construcción de un plásmido con la secuencia de nucleótidos que codifican para la proteína BIP de *Giardia lamblia* GS/M-83-H7 (ATCC 50581) a partir de la base de datos genbank (EES99538.1) (ANEXO 1.1 y 1.2). El plásmido de expresión utilizado fue el pJexpress404 de DNA 2.0 (Figura 2) optimizada para la expresión en *Escherichia coli*. En el diseño de la secuencia de BIP se omitió la fracción de 47 aminoácidos en el N-terminal debido a que se ha reportado que la presencia de esta fracción muestra un comportamiento negativo en la expresión de la proteína recombinante (Soltys y col., 1996). A dicha secuencia, se le adicionó una cadena de 6 histidinas y una secuencia sensible a trombina.

El plásmido de expresión pJexpress404/BIP fue empleado para transformar bacterias *E. coli* Rosetta *gami* calcio competentes y seleccionadas mediante su resistencia al antibiótico ampicilina. La expresión de BIPr se evaluó en muestras del cultivo bacteriano en presencia o ausencia del inductor IPTG (figura 3 a). Los resultados muestran una adecuada expresión de BIPr lo cual se evidencia con la presencia de una banda de ~71 kDa en SDS- PAGE al 12 % en aquellas clonas que fueron inducidas con IPTG. Esta banda proteica no se observa en las clonas sin el inductor. Con el fin de obtener las condiciones adecuadas para sobreexpresar la proteína y proceder a purificarla, se evaluó la sobreexpresión de proteína a las 4 y 6 horas de incubación con IPTG (Figura 3 b). Por lo descrito anteriormente este trabajo se enfoca en la síntesis de la proteína BIP de *G. lamblia* para su caracterización y evaluar su posible carácter inmunogénico.

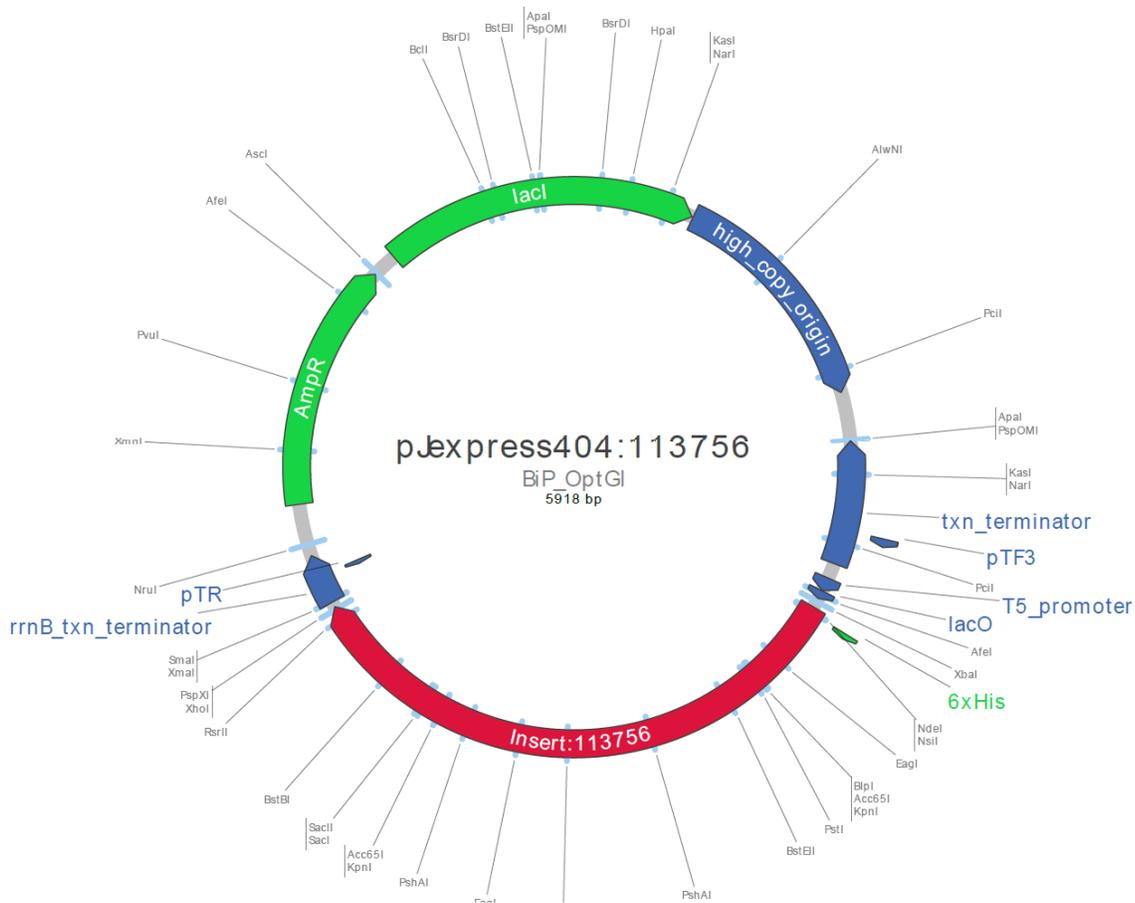


Figura 2. Diseño del plásmido de expresión pJexpress404/BIP. El plásmido comercial contiene un gen de resistencia a ampicilina (*Amp^R*), el promotor del fago T5, el represor *lac*, y el inserto de interés (1932 pb), correspondiente a la secuencia modificada de BIP, una secuencia que codifica para 6His en el N-terminal, una secuencia sensible a trombina adyacente a las 6His con un tamaño total de 5918 pb.

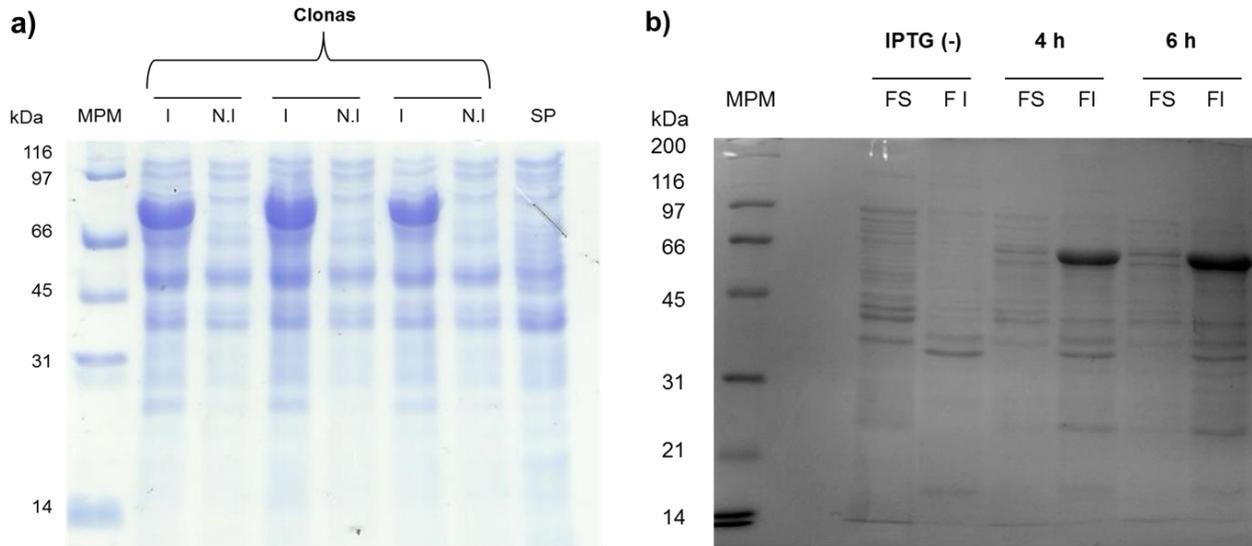


Figura 3. Optimización de condiciones para la expresión de BIPr. a) Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % condiciones reductoras y desnaturizantes, teñido en Coomassie. MPM: marcador de peso molecular, I: inducción con IPTG, N.I: no inducción, SP: clona sin el plásmido de expresión. b) Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % condiciones reductoras y desnaturizante evaluando tipo de muestra y el tiempo adecuado de IPTG. FS: fracción soluble, FI: fracción insoluble.

METODOLOGÍA

Sobreexpresión de la proteína BIPr

Con la finalidad de expresar la proteína BIPr se empleó la cepa de *Escherichia coli* Rosetta gami previamente transformada con el plasmido pJexpress404/BIP, la cual se cultivó en un litro de medio Terrific Broth a 37 °C durante 24 horas, y después se añadió el inductor IPTG 0.5 mM, el cual estuvo en contacto con el cultivo durante 4 horas.

Purificación de la Proteína de unión a inmunoglobulina recombinante (BIPr)

A partir de un litro de cultivo bacteriano, se obtuvo una pastilla a la cual se le añadió solución amortiguadora de unión a la columna (30 mM de imidazol) y se agregó una solución de inhibidor de proteasas [4-(2-amonoetil) 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). La muestra se sometió a tratamientos de lisis enzimática con lisozima (L6876, Sigma, St. Louis, MO, USA) a concentración final de 2 mg/mL, también se realizó lisis mecánica mediante sonicación (Brandon Sonifier 250, Shelton, CT, USA), sometiendo a la muestra a 6 ciclos de 10 segundos, a una amplitud de 20 %, manteniendo la muestra siempre fría. La separación de las fracciones soluble e insoluble se obtuvo por centrifugación a 4650 xg, 4 °C por 30 minutos. La fracción soluble se sometió a cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC) por medio de una columna preempaquetada HisTrap HP 1mL (GE), pasando 3 veces la muestra con un flujo de 0.5 mL/minuto, y utilizando un gradiente de elución, mediante soluciones amortiguadoras de diferentes concentraciones de imidazol (30 mM, 50 mM, 100 mM, 180 mM y 500 mM). Todo el procedimiento de purificación se llevó a cabo utilizando una bomba peristáltica EP-1 EconoPump (Bio-Rad Laboratories Inc.)

Cuantificación de BIPr en las fracciones obtenidas por Cromatografía de Afinidad a Metales Inmovilizados (IMAC)

La concentración de proteína en las fracciones se determinó mediante espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop 2000c UV-Vis Spectrophotometer® (ThermoScientific), a una longitud de onda de 280 nm utilizando 2 µL de cada fracción por lectura.

Perfil electroforético de la proteína BIPr purificada por IMAC

Con el objetivo de evaluar la expresión de BIPr y su purificación por IMAC, las fracciones que mostraron mayor concentración de proteína se sometieron a electroforesis SDS-PAGE al 12 % bajo condiciones reductoras y desnaturizantes (0.2 % SDS y 0.2 % β-mercaptoetanol) utilizando una cámara de electroforesis para minigeles (Mini-PROTEAN® 3 Electrophoresis Cell., Bio-Rad Laboratories Inc.) a 100 V constantes. Colocando un marcador de peso molecular, el lisado celular de *E.coli Rosetta gami* y en los carriles subsecuentes las fracciones de la purificación de la proteína soluble correspondientes del gradiente de imidazol 30 mM, 50 mM, 100 mM, 180 mM y 500 mM. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie.

Diálisis de las fracciones de la purificación de BIPr

Se realizó una mezcla de las fracciones que contenían una mayor cantidad de la proteína BIP, y se dializaron en solución reguladora de fosfato (PBS 1X) con el fin de eliminar la solución amortiguadora con imidazol con la que fueron eluidas. Se colocaron en una membrana Spectra/Por® Standard Grade Regenerated Cellulose que permite el paso de la solución reguladora de fosfato a la muestra, realizando 3 cambios de PBS cada 2 horas a 4°C en constante agitación.

Modelo animal de experimentación

Se utilizó la cepa de ratones C3H/HeN de 6 semanas de edad, proporcionadas por la Dra Maricela Montalvo Corral, del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Los animales se mantuvieron en el Bioterio del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la

Universidad de Sonora (DIPA) con fotoperiodos de 12 horas a 25 °C y alimentados con una dieta comercial para ratones (2018S Teklad global 18 % Protein Rodent Diets 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 silvestres.

Inmunización de ratones C3H/HeN con BIPr

Con la finalidad de generar anticuerpos policlonales contra la proteína BIP de *G. lamblia* se inmunizaron dos de ratones de la cepa C3H/HeN, cada uno con 10 µg de la proteína BIPr con la banda correspondiente en el perfil electroforético, se procesó, cortándola del gel de poliacrilamida y formando una emulsión con 200 µL de PBS y Antígeno Completo de Freund (ACF) para la primera inmunización. Se realizaron 5 refuerzos con intervalos de una semana entre cada refuerzo, con la banda proteica conteniendo BIPr y adyuvante Incompleto de Freund (AIF). Antes de cada procedimiento de inmunización se recolectaron muestras de suero, mismos que se mantuvieron en congelación a -80 °C, hasta su posterior uso.

Títulación de anticuerpos policlonales IgG anti-BIPr

Se determinó el título de anticuerpos policlonales anti-BIPr con el suero post inmunización mediante el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas indirecto (ELISA por sus siglas en inglés), colocando 25 µg de BIPr en cada pozo e incubándose a 4 °C en una placa de 96 pozos (Corning® 96 Well EIA/RIA Easy Wash), los sitios libres se bloquearon con PBS 1X- Leche Svelty 5 % durante una hora, y posteriormente se añadió el suero de ratón de cada inmunización a diferentes diluciones (1:1000, 1:5000, 1:10000, 1:20000 con PBS-BSA 0.1 %). Se utilizó un segundo anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón acoplado a HRP (1:1000 con PBS-BSA 0.1 %) y su sustrato ABTS + H₂O₂. Después de la incubación de cada anticuerpo se realizaron 5 lavados con PBS 1X-Tween 20 0.05 %. Finalmente se midió la densidad óptica después de 15 minutos de haberle añadido el sustrato en un lector de microplacas a una longitud de onda de 415nm.

Cultivo de *G. lamblia*

Se utilizó un cultivo axénico de trofozoítos de la cepa de *G. lamblia*, clona GS/M-83-H7 obtenidos de American Type Culture Collection (ATCC 50581). Los cultivos se mantuvieron en medio TYI-S33 modificado, suplementado al 10 % de suero de ternera recién nacida (NBCS. Microlab SU540). Los trofozoítos se incubaron a una temperatura de 37 °C en condiciones microaerofílicas.

Obtención de Proteínas solubles de Trofozoítos de *G. lamblia*

El extracto proteico soluble de *G. lamblia*, se obtuvo a partir de un cultivo 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 condiciones de 800 xg, a 4 °C, por 5 minutos. Una vez contenidos los trofozoítos en una pastilla, se resuspendieron en 700 µL de PBS y con la finalidad de prevenir la degradación de proteínas se agregaron 5 µL de una solución de inhibidores de proteasas, (4-(2-aminoetil) bencenosulfonilfluoruro (AEBSF), bestanina, leupeptina, pepstatina A, E-64 y 1,10-fenantrolina), 10 µL/microtubo (P2714, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Para asegurar la lisis completa, el contenido celular se sonicó (Brandson sonifer 250, Shelton, CT, USA) por tres ciclos de dos minutos a 30 ciclos/seg. Por último el extracto sonicado se centrifugó a 14 000 xg por 15 minutos a 4 °C (Chaudhuri et al, 1997) el sobrenadante con el antígeno soluble de *G. lamblia* se mantuvo en congelación a -80 °C hasta su uso (Rascón, 2008).

Inmunorreconocimiento de BIP por anticuerpos policlonales generados en ratones C3H/HeN

Con el objetivo de observar el inmunorreconocimiento de los anticuerpos policlonales anti-BIPr, se realizaron ensayos de Western Blotting, colocando la proteína BIPr purificada (1 µg) y el extracto proteico de *Giardia* (20 µg) en un gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones reductoras y desnaturizantes (0.2 % SDS y 0.2 % β-mercaptoetanol) y se realizó una separación por electroforesis, para ser transferidas a una membrana de nitrocelulosa en solución Tris-glicina pH 8.3 utilizando un sistema semi-seco (Semi-Dry Transfer Cell, Trans-Blot SD Cell, BIORAD). Una vez transferidas las muestras a la membrana, los sitios libres se bloquearon con una solución de

PBS 1X-leche Svelty semidescremada 5 % durante una hora. Posteriormente se removió el exceso de la solución bloqueadora, mediante un lavado con PBS, para después ser incubadas con los sueros de los ratones (1:20000 con PBS-BSA 0.1 %) durante 1 hora. Al termino se realizaron 5 lavados con PBS 1X-Tween 20 al 0.05 %, y las membranas se incubaron con una solución de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón acoplado a HRP (1:7500 con PBS-BSA 0.1 %) a temperatura ambiente por 1 hora. La reacción en las membranas se reveló por quimioluminiscencia utilizando soluciones reveladoras y fijadoras (Fujifilm) (Ávila, 2008).

Análisis de la respuesta inmune

Infección de ratones C3H/HeN con la cepa *G. lamblia* GS/M-83-H7

Para evaluar la producción de anticuerpos en un modelo de infección murino *in vivo*, se infectaron 2 ratones C3H/HeN de 6 semanas de edad con 5×10^6 trofozoitos de *G. lamblia* por via intra-gástrica suspendidos en 200 μ L de PBS esteril a un pH de 7.2. Previo a la infección se tomaron muestras de sangre, y después de la infección se continuó obteniendo sangre de estos ratones infectados cada 7 días.

Inmunorreconocimiento de BIP por IgG sérica de ratones infectados con *G. lamblia*

El inmunorreconocimiento de la proteína BIPr y BIP nativa de *G. lamblia* se evaluó mediante Western blotting, para lo cual se sometió a SDS-PAGE al 12 % en condiciones modificadas de desnaturalización y reducción (0.2 % SDS y 0.2 % β -mercaptoetanol), Se colocó la proteína BIPr purificada (0.5 μ g) y el extracto antigénico de *Giardia* (20 μ g) transferidas a una membrana de nitrocelulosa en solución Tris-glicina pH 8.3 utilizando un sistema semi-seco (Semi-Dry Tranfer Cell, Trans-Blot SD Cell, BIORAD). Una vez transferidas las muestras a la membrana, los sitios libres fueron bloqueados con una solución de PBS 1X-leche Svelty semidescremada 5 % durante una hora. Posteriormente se hicieron reaccionar con el suero de ratones infectados con *G. lamblia* GS/M-83-H7 de la 4^a semana post infección y suero pre inmune, a dilución 1:10 (PBS-BSA 0.1 %) durante una hora. Se realizaron 5 lavados con PBS 1X-Tween 20 al 0.05 %, y las membranas se incubaron con una solución de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón acoplado a HRP (1:7500 con PBS-BSA 0.1 %) a temperatura ambiente por 1 hora. La reacción antígeno-anticuerpo se

reveló por quimioluminiscencia (Thermo Scientific; 34080) utilizando soluciones de revelado (Fujifilm) (Ávila, 2008).

Ensayo de proliferación de esplenocitos de ratones infectados con *G. lamblia* mediante el método de reducción de MTT (tetrazolio)

Se incubaron 5×10^5 esplenocitos de ratones infectados con BIPr, Lisozima de huevo de gallina (HEL, L6876 Sigma, St. Louis, MO, USA) y Fitohemaglutinina-M (PHA, L8902 Sigma, St. Louis, MO, USA) a las concentraciones de 2, 10 y 50 nM (por triplicado) en un volumen final de 150 μ L, en placas de 96 pozos con fondo redondo a 37 °C y atmósfera de 5 % de CO₂, el análisis de proliferación se realizó a las 72, 96 y 120 horas respectivamente en el grupo sin infección y en los grupos de ratones infectados a los 7, 14, 21 y 28 días posteriores a la inoculación del parásito. Se agregaron 15 μ L de la solución de MTT (M5655 Sigma, St. Louis, MO, USA) (10 μ L por cada 100 μ L de cultivo) a cada pozo y se incubaron a 37 °C por 4 horas a los tiempos correspondientes a cada análisis. Posterior a la incubación, los cristales formados se disolvieron en 150 μ L de isopropanol ácido y agitación vigorosa. Una vez disueltos los cristales, se midió la densidad óptica en un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 570 nm y 630 nm como referencia, esto en menos de una hora después de agregar el isopropanol ácido (Mosmann, 1983). Se consideró estímulo positivo de proliferación cuando el índice de proliferación (D.O. células con estímulo/ células sin estímulo) fue mayor a 2.5 (Crawford y cols., 2004; Koen y cols., 2007; Milovanova, 2007).

Ensayo de proliferación de esplenocitos con CFSE

Se tiñeron 1×10^7 células con CFSE (5(6)-Diacetato de Carboxifluoresceína N-succinimidil Ester, 21888 Sigma, St. Louis, MO, USA) en 1 mL de PBS a una concentración de 0.1 μ M, dejándose 20 minutos a 37 °C, agitando suavemente a los 10 minutos de incubación; para detener la tinción, la solución de esplenocitos-CFSE se llevó a un volumen de 25 mL con D10F frío y se centrifugó a 500 xg por 7 minutos a 4 °C, posterior a esto, se realizaron dos lavados bajo las mismas condiciones (Lyons, 2000). Se incubó una cantidad 2×10^5 células con las proteínas BIPr de *G. lamblia*, HEL y PHA, a las concentraciones de 2, 10 y 50 nM en un volumen final de 150 μ L en placas de 96 pozos con fondo redondo a 37 °C y atmósfera de 5 % de CO₂. Las células fueron recolectadas a las 72, 96 y 120 horas respectivamente del grupo sin infección y en los grupos de

ratones infectados. Se midió la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo en un equipo FACSCanto II (Beckton and Dickinson, CA, USA). Los resultados se analizaron en base al porcentaje de células que resultaron con una disminución de fluorescencia (porcentaje de proliferación, %P).

RESULTADOS

Purificación de la Proteína de unión a inmunoglobulina recombinante (BIPr)

Con el fin de purificar la proteína BIP recombinante, a partir de un lisado de bacterias *Escherichia coli*, proveniente de 1 L de cultivo, se realizó una cromatografía IMAC, utilizando una columna preempaquetada HisTrap HP 1 mL (GE). Se realizó la sobreexpresión de BIPr con IPTG 0.5 mM, se obtuvo la fracción soluble del lisado celular con un peso de 2.52 gramos, el cual fue re suspendido en 20 mL de la solución de unión (30 mM de Imidazol) y se purificó mediante cromatografía IMAC, después de ser pasado tres veces por la columna HisTrap HP 1 mL (GE) a un flujo de 0.5 mL por minuto. La elución se realizó por un gradiente de concentración de Imidazol (30, 50, 80, 100, 180 y 500 mM), obteniéndose 207 fracciones de un mililitro cada una, las cuales se cuantificaron por espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop 2000c UV-Vis® (ThermoScientific).

La concentración inicial de la fracción soluble del lisado celular de *E. coli* Rosetta gami (*LEc*) fue de 53.1 mg/mL, y después de pasar por la columna fue de 35.9 mg/mL, reteniéndose 18 mg de proteína total. Se seleccionaron las fracciones con las concentraciones más altas de proteína total de cada elución a diferentes concentraciones de imidazol mostradas en la Tabla I y se corrieron en un gel de poliacrilamida al 12 % SDS-PAGE de 0.75 mm de espesor. La banda de 71 kDa se observa intensamente en las fracciones eluidas con 80 y 180 mM de imidazol (Figura 4). Las fracciones 83 a 86 y 161 a 165 se juntaron y dializaron en PBS 1X. La concentración de proteína fue de 0.262 mg/mL obteniéndose un total de 1.6 mg de la proteína BIPr purificada .

Tabla I. Efecto de la concentración de imidazol en la capacidad de elución de BIPr mediante IMAC

Fracción	Concentración (mg/mL)	Concentración de Imidazol (mM)
LEc	53.91	30
LEc3	35.92	30
3	2.86	30
43	0.077	50
81	0.304	80
82	0.078	80
83	0.113	80
84	0.181	80
85	0.158	80
86	0.182	80
121	0.158	100
122	0.171	100
123	0.077	100
124	0.185	100
125	0.079	100
126	0.132	100
161	0.249	180
162	0.239	180
163	0.402	180
164	0.206	180
165	0.213	180
166	0.18	180
201	0.234	500
202	0.265	500
203	0.246	500
204	0.223	500
205	0.309	500
206	0.205	500
207	0.210	500

LEc: Lisado de *E. coli*, LEc3: Lisado de *E. coli* después de tres pases por la columna

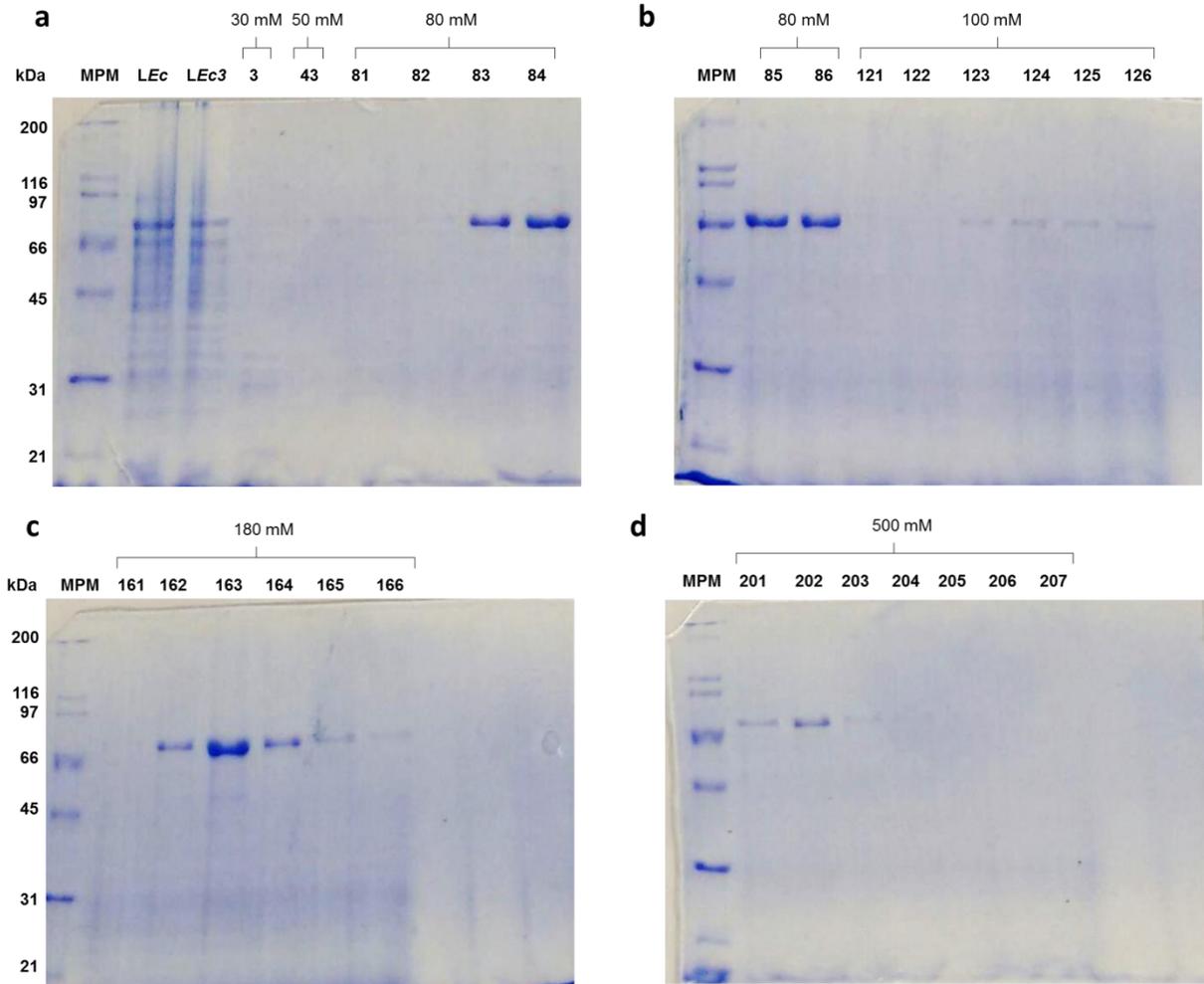


Figura 4. Perfil electroforético de BIPr eluída con imidazol a diferentes concentraciones. Electroforesis SDS-PAGE 12 % de las principales fracciones de la purificación de BIPr. Teñidas con azul de Coomassie. Cada carril contiene 15 uL de la fracción correspondiente. **(a)** Lisado celular y fracciones eluídas con 30, 50 y 80 mM de imidazol. **(b)** Fracciones eluídas con 80 y 100 mM de imidazol. **(c)** Fracciones eluídas con 180 mM de imidazol. **(d)** Fracciones eluídas con 50 Mm De imidazol LEc: Lisado de *Escherichia coli*, LEc3: Lisado de *Escherichia coli* después de tres pases por la columna, MPM: Marcador de peso molecular

Generación de anticuerpos policlonales anti BIPr

Con el fin de obtener anticuerpos policlonales contra la proteína BIP se procedió a inmunizar dos ratones con 10 µg la proteína BIPr una vez cada siete días durante cinco semanas. Se recolectaron muestras de sueros posteriores a cada inmunización. Con el fin de evaluar el título de anticuerpos de clase IgG anti BIPr en cada suero de inmunización, se realizó un ensayo de ELISA indirecto. Para el ensayo se recubrieron los pozos de placas para ELISA con 0.25 µg de la proteína BIPr y se hicieron reaccionar con diferentes diluciones de los sueros. En cada dilución probada se observa presencia de anticuerpos contra BIPr. Se observó un comportamiento similar en ambos ratones, incrementando la cantidad de anticuerpos anti-BIPr a partir de la 3ª semana de inmunización y después manteniéndolo el título de anticuerpos constante (Figura 5).

Inmunorreconocimiento de los anticuerpos policlonales anti-BIPr

Para evaluar la especificidad de los anticuerpos policlonales anti-BIPr y el reconocimiento de la proteína BIP nativa de *G. lamblia*, se realizó un ensayo de inmunorreconocimiento, para lo cual se mezcló el suero de la 3ª inmunización del ratón 1 y el de la 4ª inmunización del ratón 2, y se hicieron reaccionar con 20 µg de extracto proteico GS/M-83-H7 y 1 µg de BIPr purificada. El suero policlonal anti-BIPr reconoció la BIPr y al antígeno BIP nativo presente en el extracto proteico de *G. lamblia* GS/M83-H7. Como control se utilizaron sueros pre-inmunes, los cuales fueron negativos (Figura 6).

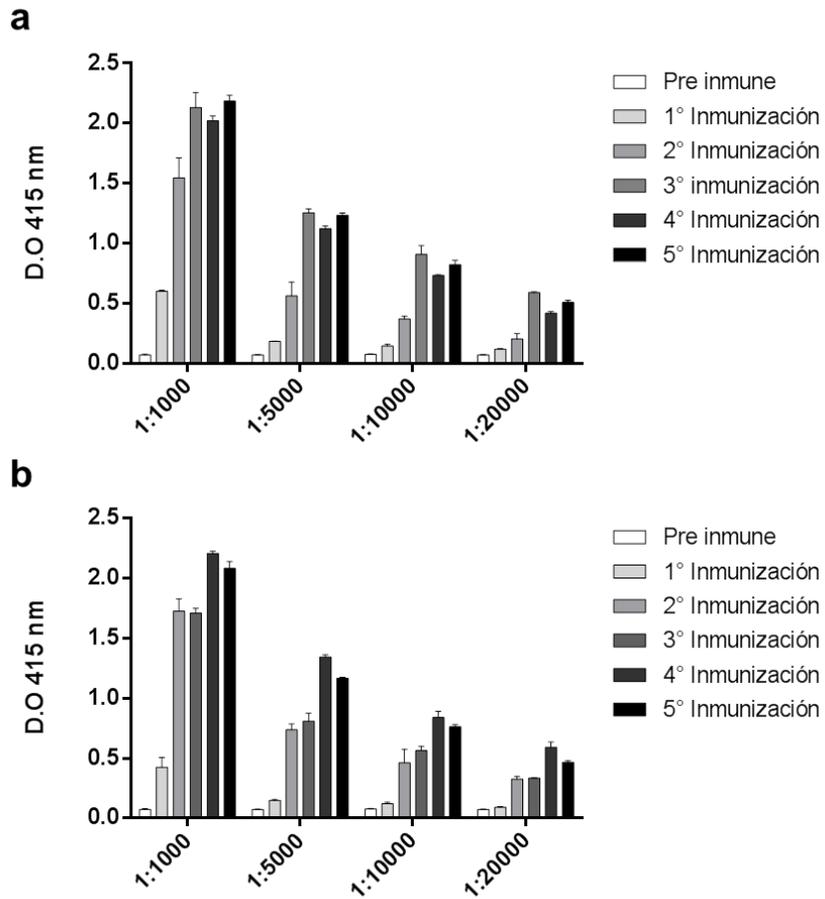


Figura 5. Anticuerpos IgG séricos de ratones C3H/HeN inmunizados con BIPr. Muestras de sueros recolectadas de los ratones a y b, 7 días post-inmunización. Datos mostradas en el eje X, representan dilución correspondiente de cada uno de los sueros.

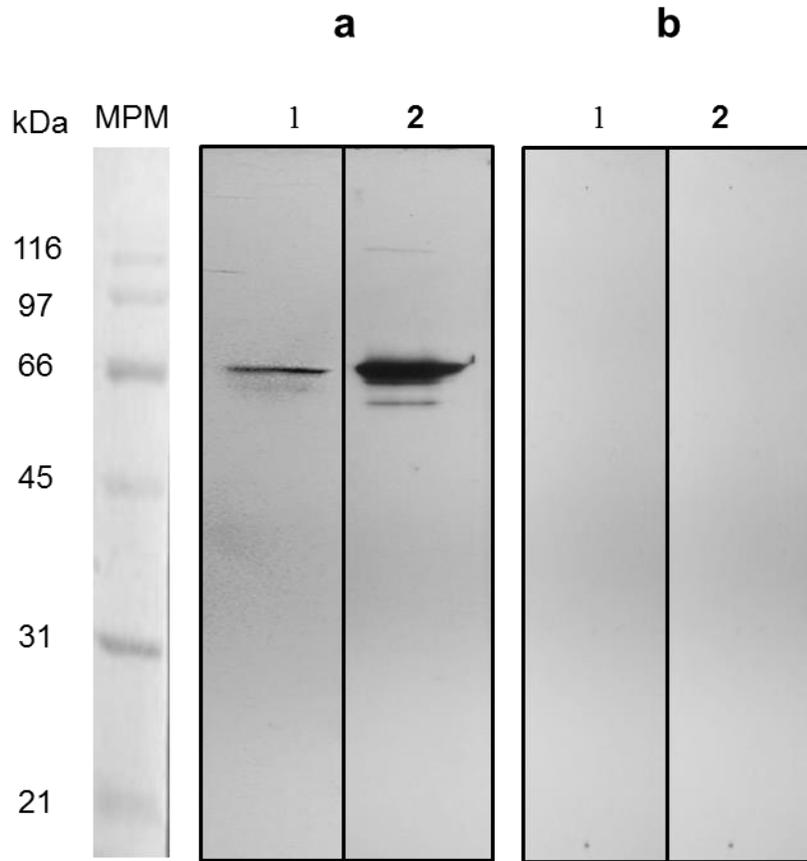


Figura 6. Inmunorreconocimiento de la proteína BIP en extracto de *Giardia lamblia* con anticuerpos policlonales anti-BIPr. (1) Extracto proteico de *Giardia lamblia* GS/M83-H7 20 μ g, (2) Proteína BIPr 1 μ g. (a) Suero de ratones C3H/HeN inmunizados con BIPr 1:20000. (b) Suero pre inmune de ratones C3H/HeN.

Evaluación de la respuesta inmune humoral

Con el objetivo de evaluar la respuesta inmune humoral sistémica contra la proteína BIP de *Giardia* después de haber generado una infección con el parásito, se realizó una prueba de inmunorreconocimiento con suero de ratones infectados con *G. lamblia* GS/M-83-H7, los cuales se hicieron reaccionar con extracto proteico GS/M83-H7 y BIPr. Se observó reconocimiento de varias proteínas en el extracto de GS/M83-H7, con masas moleculares de 50 a 100 KDa. Incluyendo la banda de 71 KDa, previamente reportada por Velázquez y cols. (2005). Sin embargo, el suero de ratones infectados no reconoció a BIPr bajo las condiciones experimentales utilizadas (Figura 7).

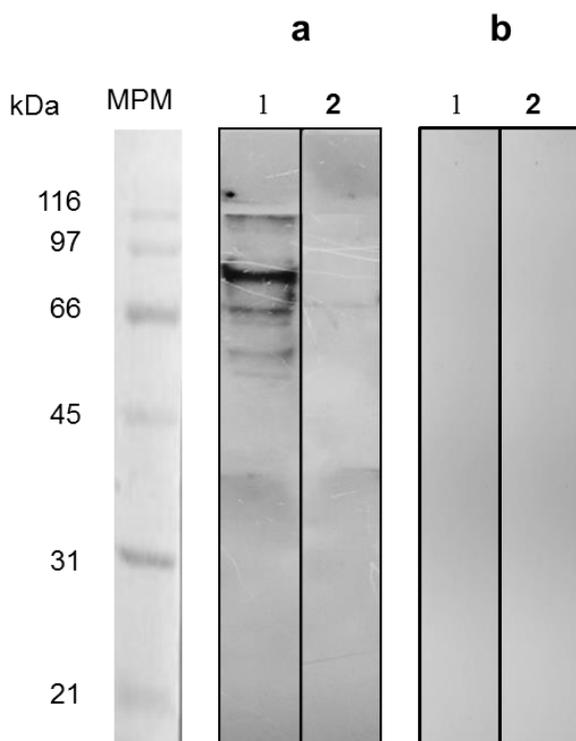


Figura 7. BIPr no es reconocida por anticuerpos IgG de ratones infectados con *G. lamblia*. MPM: Marcador de peso molecular. (1) Extracto proteico de *Giardia lamblia* GS/M83-H7 30µg, (2) Proteína BIPr 1µg. **(a)** Suero de la 4ª semana post infección con GS/M83-H7 1:10 **(b)** Suero preinmune 1:10.

Análisis de proliferación celular

Cuando se monta una respuesta inmune contra determinado antígeno se activan y proliferan linfocitos que poseen en su membrana receptores capaces de reconocer única y específicamente a este mismo. Si el organismo entra en contacto con este particular antígeno, como consecuencia se producirá una proliferación de las células que posean los receptores para tal antígeno, a esto se le denomina expansión clonal y es parte fundamental en el proceso de erradicación de una infección (Abbas, 2014). Con esto en mente, se diseñó un modelo de infección *in vivo* con ratones de la cepa C3H-HeN infectados con *G. lamblia* GS/M-83-H7, se formaron cuatro grupos los cuales se sacrificaron a los 7, 14, 21 y 28 días post infección más un grupo de ratones control que no fueron infectados, de los cuales se obtuvieron los esplenocitos con una viabilidad entre 87 y 92 % (Tabla II) y se cultivaron por 72, 96 y 120 horas con los diferentes estímulos (BIPr y HEL a 2, 10 y 50 nM). Se incluyó un control de proliferación con PHA a las mismas concentraciones.

Se utilizaron dos técnicas para medir la proliferación de esplenocitos, la primera fue el ensayo de MTT descrito por Mosmann en el cual se mide la reducción del compuesto MTT a sales de tetrazolio (Mosmann, 1983). Se consideró un estímulo positivo de proliferación cuando el IP resultó ser igual o mayor a 2.5. Los IP de las células estimuladas con la proteína BIP fueron ligeramente más altos que los de las que fueron estimuladas con HEL, especialmente en el grupo de ratones sin infección y a los 7 DPI, el resto de los grupos tuvo un comportamiento similar. Sin embargo, ningún grupo sobrepasó el punto de corte establecido (Figura 9) (Anexo 15). El ensayo de proliferación celular con CFSE mide la cantidad de veces que las células proliferan mediante la disminución de la intensidad de fluorescencia emitida por el colorante. El análisis por citometría de flujo arrojó datos similares, donde los %P más elevados se obtuvieron a las 72 horas, con las concentraciones de BIP y PHA de 50 nM y en los grupos sin infección y a los 7 DPI (Figura 10).

Tabla II. Condiciones por grupo de análisis en la obtención de esplenocitos para los ensayos de proliferación.

Tiempo	Sexo	Peso del ratón (g)	Peso del bazo (g)	Células por bazo ($\times 10^6$)	Viabilidad celular (%)
SI	M	14.65	0.04	32.5	92
	H	15.97	0.04		
	H	16.62	0.07		
7 DPI	M	18.76	0.03	115.5	89
	M	15.67	0.06		
	H	13.76	0.06		
	H	15.32	0.07		
	H	13.14	0.05		
	H	13.14	0.05		
14 DPI	M	18.32	0.05	42.0	90
	M	16.69	0.04		
	H	13.81	0.05		
	H	13.08	0.03		
	H	13.67	0.06		
21 DPI	M	21.30	0.06	75.25	92
	M	18.63	0.07		
	H	17.53	0.06		
	H	15.53	0.07		
	H	15.57	0.06		
28 DPI	M	20.63	0.08	48.25	87
	M	23.85	0.08		
	H	18.91	0.09		
	H	19.05	0.06		

SI: Sin infección, DPI: Días post infección, H: Hembra, M: Macho

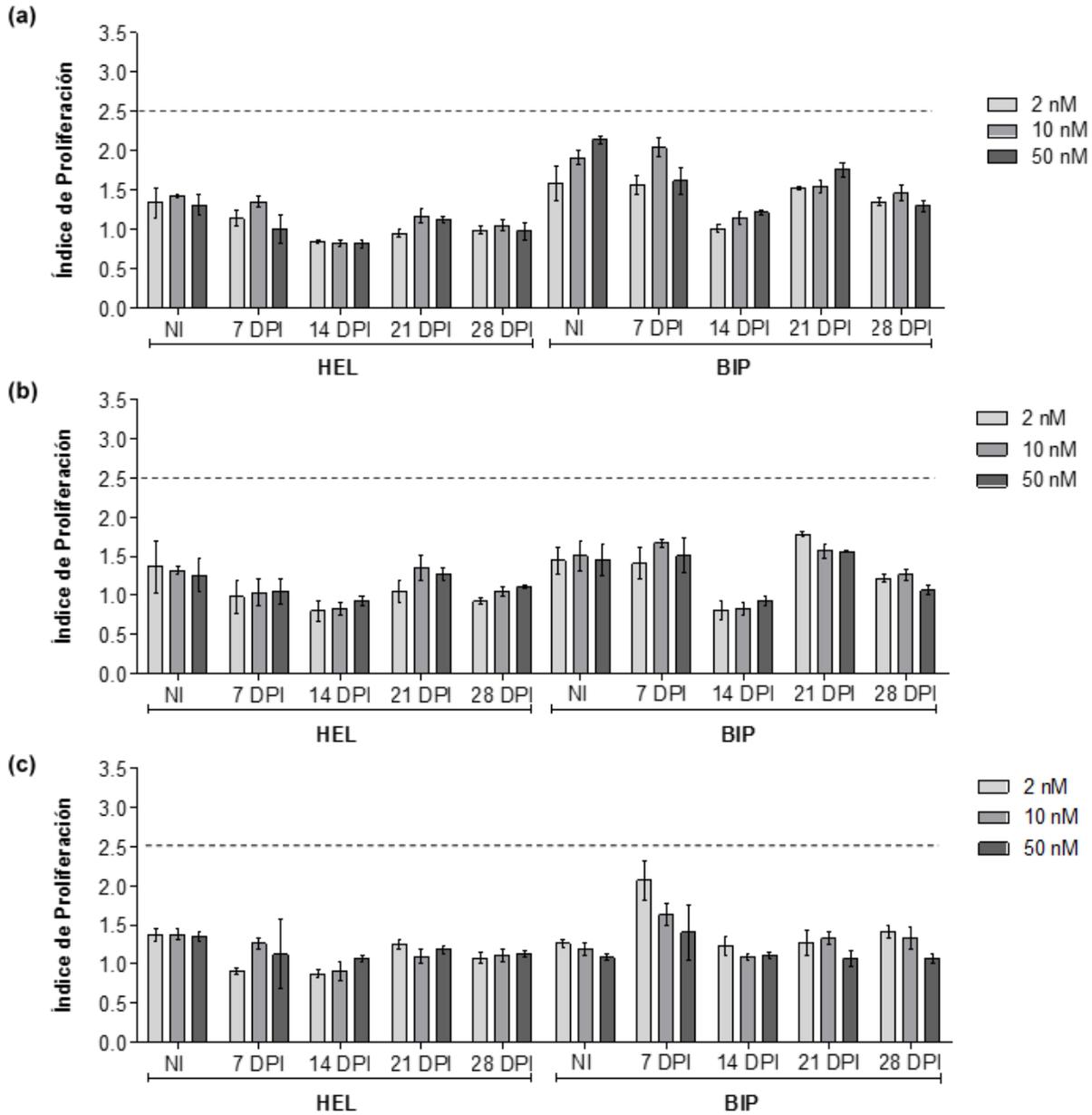


Figura 8. La proteína BIP no estimula la proliferación de esplenocitos (Evaluados por el ensayo MTT) de ratones infectados con *G. lamblia*. NI: No infectados. DPI: Días post infección. IP: Índice de proliferación **(a)** IP a las 72 horas de cultivo. **(b)** IP a las 96 horas de cultivo. **(c)** IP a las 120 horas. Se consideró una proliferación positiva al estímulo, cuando el IP fue superior a 2.5.

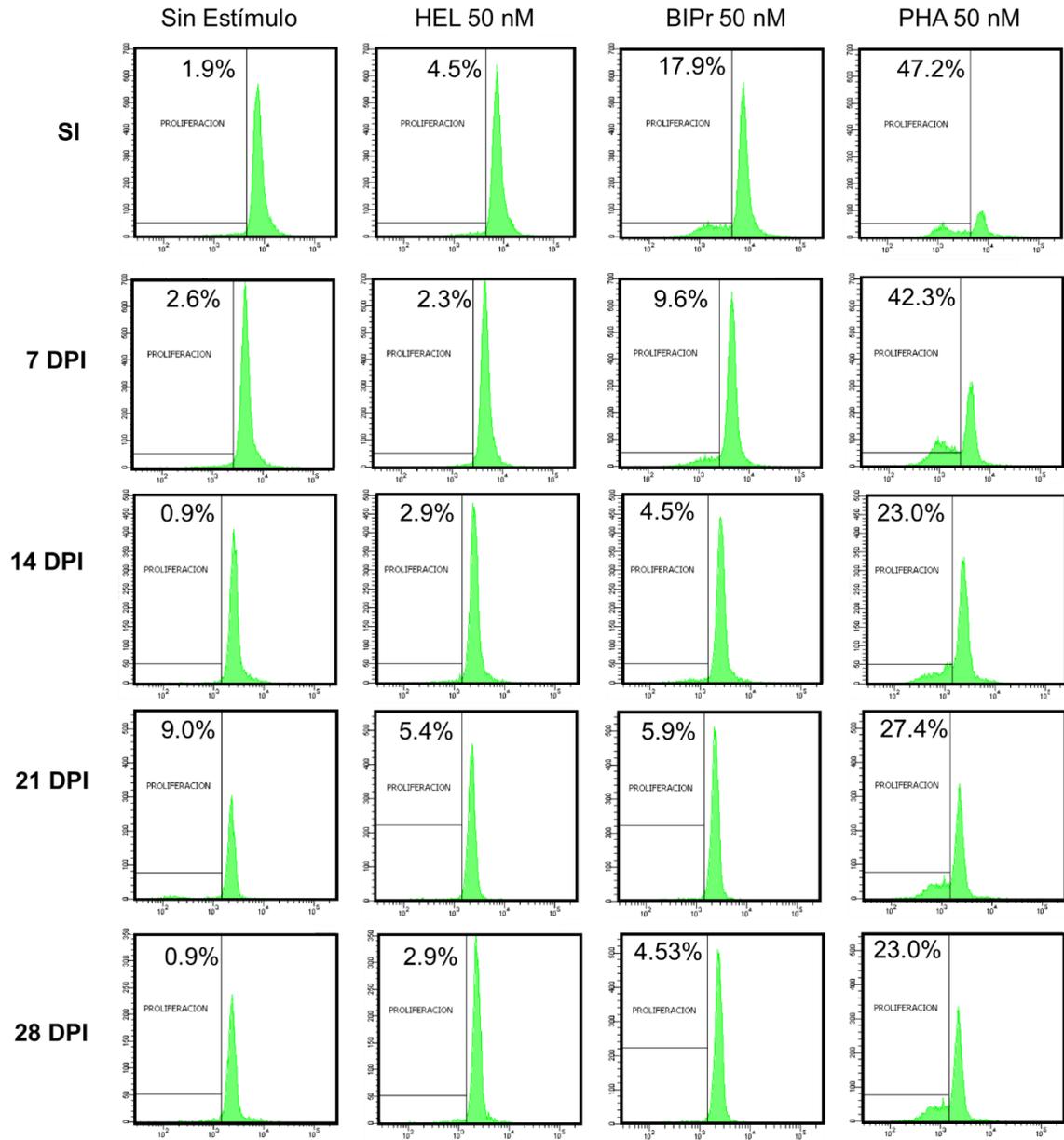


Figura 9. La proteína BIP no estimula la proliferación de esplenocitos (Evaluados por citometría de flujo con CFSE) de ratones infectados con *G. lamblia*. NI: No infectados. DPI: Días post infección.

DISCUSION

El presente trabajo describe el método por el cual se sobreexpresó y purificó la proteína BIP de *Giardia lamblia* de manera recombinante para el análisis de la respuesta inmune de un modelo murino de infección.

La proteína BIP, es miembro de la familia de las Hsp70, las cuales se han descrito como candidatas para cumplir un papel importante como antígeno en varios protozoarios (Miller, 1999) y otros organismos (Druar y cols., 2008; Zügel y Kaufmann, 1999) aunado a esto, también se ha reportado a BIP como una proteína con caracter inmunogénico que es reconocida por anticuerpos policlonaes anti-*Giardia* (Lee y cols., 2014). Nuestro equipo de trabajo también reportó a BIP como una de las posibles proteínas con capacidad de estimular a hibridomas de células T en un modelo murino de infección (Quintero, 2008). Con el objetivo de contar con más elementos que permitan generar información sobre proteínas de *G. lamblia* y su papel en los mecanismos inmunológicos, se expresó BIP en un sistema recombinante y se purificó por cromatografía de afinidad a metales (IMAC).

A partir de 1 litro de cultivo de *Escherichia coli* Rosetta gami transformadas con el plásmido de expresión de BIP se logró purificar obteniendo un total de 1.6 mg. Esta cantidad nos indica un bajo rendimiento de la columna, ya que se reporta que la columna HisTrap HP 1mL tiene una capacidad dinámica de unión de 40 mg/mL totales de proteínas (Manual HisTrap™ HP, 1 mL y 5 mL, GE, 2005). La capacidad dinámica de unión (CDU) se define como la cantidad la proteína de interés que se unirá a la resina bajo condiciones de flujo establecidas (Do y cols., 2008), siendo las mismas que utilizamos en nuestro experimento (flujo: 0.25 mL/min a 1 mL/min). La CDU disminuye si se aumenta el tamaño la proteína, los espacios entre los poros de la fase estacionaria pueden limitar el acceso de las proteínas (cola de histidinas) a los sitios funcionales dentro de la matriz (iones de níquel), debido a factores estéricos, sólo algunos de los grupos iónicos, en este caso el Ni^{2+} están disponibles para unirse con las proteínas y la capacidad de unión disminuye (Janson, 2011), esto concuerda con el rendimiento obtenido en la purificación, ya que la masa molecular de BIPr es de 71 kDa aproximadamente, mientras que las proteínas utilizadas para calcular la CDU de la columna fueron de 20 a 43 kDa (Tabla III).

Tabla III. Principales características de la columna HisTrap de Alto rendimiento

Matriz	Altamente reticulada de agarosa esférica, 6 %
Tamaño medio de partícula	34 µm
Capacidad de iones metálicos	~15 µmol Ni ²⁺ /mL medio
Capacidad dinámica de unión **	Al menos 40 mg de proteína marcada con (His) 6 /mL de medio
Velocidad de flujo recomendada	1 y 5 mL/min para 1 y 5 mL de columna, respectivamente
Max. velocidades de flujo	4 y 20 mL/min para la columna 1 y 5 mL, respectivamente
Compatibilidad durante el uso	Estable en todos los tampones usados comúnmente, agentes reductores, desnaturalizantes y detergentes.
Estabilidad química	0,01 M HCl, NaOH 0,1 M. Probado durante 1 semana a 40°C. 1 M NaOH, ácido acético 70 %. Probado durante 12 horas. SDS al 2 %. Probado durante 1 hora. 30 % de 2-propanol. Probado durante 30 minutos
Debe evitarse en tampones	Agentes quelantes, por ejemplo, EDTA, EGTA, citrato
Estabilidad del pH	a corto plazo (≤ 2 horas): 2-14 a largo plazo (≤ 1 semana): 3-12
Almacenamiento	20 % de etanol
Temperatura de almacenamiento	4 °C a 30 °C

** Condiciones de capacidad dinámica de unión:

Muestra:	1 mg/mL proteína etiquetada (His) 6 pura (Mr 28 000 o 43 000) en tampón de unión (QB, 10 % determinación) o proteína etiquetada -(His) 6 ligada a partir del extracto de <i>E. coli</i>
Volumen de la columna	0,25 mL o 1 mL
Velocidad de flujo	0,25 mL/min o 1 mL/min
Tampón de unión	20 mM de fosfato de sodio, 0,5 M NaCl, imidazol 5 mM, pH 7,4
Tampón de elución	20 mM de fosfato de sodio, 0,5 M NaCl, 0,5 M imidazol, pH 7,4

Modificada del Manual HisTrap™ HP, 1 mL and 5 mL, General Electric Healthcare, 2005

Otro factor que puede influir en la eficiencia de la expresión es el promotor. El plásmido utilizado posee el promotor T5, que aunque tiene un buen funcionamiento, al compararlo con otros promotores, su expresión de proteínas es menor (DNA 2.0, Inc., USA). Este promotor es de alto número de copias y generalmente se asume que a un alto número de copias del plásmido resulta en un alto número de copias del gen de interés, y por lo tanto, la cantidad de proteína recombinante es mayor. Sin embargo, algunas veces el empleo de plásmidos con alto número de copias también induce una alta carga metabólica para la bacteria, que se refleja en una reducción en la velocidad de crecimiento y el rendimiento de síntesis de la proteína de interés (Lara, 2011). Así también, esta sobrecarga de expresión ocasionada por promotores fuertes puede provocar que la proteína a menudo sea incapaz de adquirir su conformación nativa ya sea parcial o totalmente y que sea segregada dentro de los cuerpos de inclusión (Baneyx, 1999).

En los ensayos de inmunorreconocimiento realizados se observó que los anticuerpos policlonales anti BIP reconocen tanto a la proteína recombinante que se purificó y a la nativa presente en extractos protéicos GS/M-83-H7 (~71 kDa), lo que sugiere que la proteína recombinante tiene una conformación espacial similar a la BIP nativa. Esto nos indica que la proteína BIP recombinante puede utilizarse como una herramienta para el estudio análogo de la proteína BIP de *G. lamblia*.

Se evaluó el inmunorreconocimiento de anticuerpos IgG séricos obtenidos a partir de ratones infectados con la cepa GS/M-83-H7 hacia el extracto proteico total de *Giardia* y hacia la BIPr purificada mediante Western blotting. Se observó que los anticuerpos generados tras la cuarta semana posterior a la infección no reconocen a la proteína BIPr, pero si a diferentes proteínas del extracto de la cepa de *Giardia*, incluso a una banda de peso similar a la de BIP, sin embargo es posible que existan otras proteínas del mismo peso molecular que sean capaces de estimular la respuesta inmune en el ratón. Quintero y cols., han propuesto una proteína de aproximadamente 71 kDa con propiedades inmunogénicas (Quintero y cols., 2013), los datos obtenidos en este estudio sugieren que la proteína BIP no es una de las principales proteínas diana de la respuesta humoral generada en el modelo murino de infección utilizado.

La respuesta inmune celular tiene una importante función como mecanismo inmunológico de defensa dentro de la inmunidad adaptativa, en ella participan esencialmente los linfocitos T. Una vez que las células presentadoras de antígeno han procesado y expuesto en su superficie las determinantes antigénicas específicas para el antígeno y estas son reconocidos por el TcR de los linfocitos T, se desencadena una serie de reacciones que culminan en la activación del linfocito T específico para el antígeno presentado y este comienza a replicarse. A esta proliferación se le denomina expansión clonal (Murphy, 2008., Abbas, 2014). Con el objetivo de evaluar la

capacidad linfoproliferativa de la proteína BIP se utilizó el ensayo de MTT descrito por Mosmann y el análisis de la dilución de fluorescencia de la CFSE descrito por Lyons, aunque con fundamentos diferentes las dos tienen la finalidad de medir la proliferación de las células al ser estimuladas por un antígeno específico (Mosmann, 1983; Lyons, 2000). Para los ensayos de MTT se consideró reacción de proliferación positiva cuando el IP fue mayor a 2.5, este es un valor arbitrario que puede variar de 1.5 a 3 dependiendo del escrutinio del investigador, un punto de corte alto ayuda a reducir la variación intra experimento, además de eliminar la proliferación basal de las células (Crawford y cols., 2004; Venken y cols., 2007; Milovanova, 2007). Bajo las condiciones en las que se realizó el ensayo de MTT, la proteína BIP no estimuló ($IP < 2.5$) a los esplenocitos infectados a ninguna concentración evaluada, sin embargo, el grupo de ratones no infectados y al día 7 post-infección presentaron un ligero aumento en los IP al ser estimulados con BIP 50 nM. De la misma manera, en los ensayos de dilución de fluorescencia de la CFSE los porcentajes de proliferación fueron menores que los obtenidos con PHA, y también se observa la misma tendencia observada en los resultados del MTT a los 7 DPI y el grupo de ratones no infectados.

Los resultados que se muestran en nuestro trabajo difieren de los obtenidos por Lee en 2014 (Lee y cols., 2014), donde la proteína BIP de la misma cepa de *G. lamblia* utilizada si tiene la capacidad de activar la respuesta inmune celular. Uno de los aspectos a considerar en los ensayos realizados por Lee, es que las células dendríticas y linfocitos T provenían de ratones no infectados con *Giardia*, primero, las células dendríticas se estimularon con BIP *in vitro* y posteriormente estas células se utilizaron para estimular linfocitos T; mientras que en nuestro trabajo las células utilizadas en el ensayo de proliferación, provenían de ratones infectados con la cepa GS/M83-H7 de *G. lamblia*. También el contraste de resultados puede deberse a que el modelo de estudio es diferente. Lee y cols., utilizaron ratones de la cepa de ratón Balb/C. Una de las razones por la cual el sistema implementado por Lee reconoció a BIP como proteína inmunogénica es el modelo murino que utilizó, los ratones de la cepa Balb/C expresan un H2 de tipo d, por otra parte el modelo C3H/HeN utilizado en este trabajo expresa un haplotipo k (Goldsby, 1999), esta diferencia podría llevar a un reconocimiento antigénico diferente para la misma proteína.

Hasta hoy, el único estudio publicado que aborda el comportamiento inmunológico y bioquímico de BIP de *Giardia*, es el reportado por Lee y cols., sin embargo, con otros parásitos y organismos también se obtiene resultados contradictorios, donde BIP puede fungir como una molécula inmunomoduladora (Corrigan y cols., 2004 y 2009), y otros donde se propone como un estimulante del sistema inmune e incluso un agente terapéutico (Carrillo y cols., 2008).

La tecnología recombinante es una herramienta que provee muchas ventajas al momento de estudiar una proteína en específico. En este trabajo se sobreexpresó y purificó la proteína BIP de *Giardia lamblia* en un sistema recombinante, con la cual se realizaron diversos ensayos evaluando su capacidad de estimular la respuesta inmune humoral y celular en ratones C3H/HeN. Aunque los resultados bajo las condiciones utilizadas no mostraron evidencia de que BIP sea una proteína inmunogénica, es de interés profundizar en su caracterización con técnicas más específicas y con otros modelos de infección.

CONCLUSIONES

- Se sobreexpresó y purificó la proteína BIP de *G. lamblia* en un sistema recombinante.
- La proteína BIP recombinante es conformacionalmente similar a la proteína BIP de *G. lamblia* de la cepa GS/M83-H7.
- La proteína BIP no es reconocida por anticuerpos IgG generados en una infección de ratones C3H/HeN.
- BIP no induce la proliferación *in vitro* de esplenocitos de ratones C3H/HeN infectados con *G. lamblia* GS/M83-H7.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas AK., Lichtman AH, Pillai S. (2014). Inmunología básica: Funciones y trastornos del sistema inmunitario. 4ª ed. Barcelona España. Elsevier España. 347 p.
- Abdul-Wahid A, Faubert GM (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.
- Adam RD. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*. 14 (3): 447-75.
- Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG. (2010). Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nature Reviews. Microbiology*, 8 (6): 413-22.
- Astiazaran-García, H, Quintero J, Vega R, Briceño P, Oviedo C, Rascón L, Garibay-Escobar A, Velázquez C. (2009). Identification of T-cell stimulating antigens from *Giardia lamblia* by using *Giardia*-specific T-cell hybridomas. *Parasite Immunology*, 31 (3): 132-139.
- Ávila Barceló JR. (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.
- Baneyx F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*. 10 (5): 411-421
- Carrillo E, Crusat M, Nieto J, Chicharro C, Thomas MC, Martínez E, Valladares B, Moreno J. (2008). Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine*. 26 (15): 1902-11.
- Cedillo-Rivera R, Muñoz O. (1992). In-vitro susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *Journal of Medical Microbiology*, 37 (3): 221-4.
- Chaudhuri PP, Das D, Sarkar S, Muñoz ML, Das P. (1997). Biochemical and immunological characterization of soluble antigens of *Giardia lamblia*. *Parasitology Research*, 83 (6) 604-610.
- Corrigall VM, Bodman-Smith MD, Brunst M, Cornell H, Panayi GS (2004). "Inhibition of antigen-presenting cell function and stimulation of human peripheral blood mononuclear cells to express an anti-inflammatory cytokine profile by the stress protein BIP: relevance to the treatment of inflammatory arthritis". *Arthritis and Rheumatism* 50 (4): 1164–71.
- Corrigall VM, Bodman-Smith MD, Brunst M, Cornell H, Panayi GS. (2004). Inhibition of antigen-presenting cell function and stimulation of human peripheral blood mononuclear cells to

- express an anti-inflammatory cytokine profile by the stress protein BIP: relevance to the treatment of inflammatory arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 50 (4): 1164-71.
- Corrigall VM, Vittecoq O, Panayi GS (2009). "Binding immunoglobulin protein-treated peripheral blood monocyte-derived dendritic cells are refractory to maturation and induce regulatory T-cell development". *Immunology* 128 (2): 218–26.
- Crawford MP, Yan SX, Ortega SB, Mehta RS, Hewitt RE, Price DA, Stastny P, Douek DC, Koup RA, Racke MK, Karandikar NJ. (2004). High prevalence of autoreactive, neuroantigen specific CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novelflow cytometric assay. *Blood* 103 4222.
- DNA 2.0, (2012). Case Study: Promoter Panel Results. Disponible en: <https://www.dna20.com/services/panel-test> (Fecha de acceso: 14 de agosto de 2016).
- Do T, Ho F, Heidecker B, Witte K, Chang L, Lerner L. (2008). A rapid method for determining dynamic binding capacity of resins for the purification of proteins. *Protein Expression and Purification*. 60 (2): 147-50.
- Druar C, Yu F, Barnes JL, Okinaka RT, Chantratita N, Beg S, Stratilo CW, Wiersma EJ. (2008). Evaluating *Burkholderia pseudomallei* BIP proteins as vaccines and BIP antibodies as detection agents. *Fems Immunology and Medical Microbiology*. 52 (1): 78-87.
- Ebert EC. (1999). *Giardia* induces proliferation and interferon (gamma) production by intestinal lymphocytes. *Gut*. 44, 9903, 342.
- Eckmann L, Gillin FD. (2001). Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions I. Pathophysiological aspects of enteric infections with the lumen-dwelling protozoan pathogen *Giardia lamblia*. *AmJ Gastrointest Liver and Physiology*. 280:G1-6. *Infection and Immunity*. (46): 377-383.
- Eckmann L, Laurent F, Langford TD, Hetsko ML, Smith JR, Kagnoff MF, Gillin FD. (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*. *Journal of Immunology*. 164 (3): 1478-87.
- Eckmann L. (2003). Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite Immunology*. 25 (5): 259-270.
- Faubert GM. (2000). Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clinical Microbiology*. 13 (1): 35-54. *Epidemiology and Infection* (109): 1–22.
- Gardner TB, Hill DR. (2001). Treatment of giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*. 14 (1): 114-28.
- Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne B A, Kuby, J. (2000). *Kuby immunology*. 4th ed. New York: W.H. Freeman. 670 p.

- Hanevik K, Kristoffersen E, Svard S, Bruserud O, Ringqvist E, Sornes S, Langeland N. (2011). Human Cellular Immune Response Against *Giardia lamblia* 5 Years After Acute Giardiasis. *Journal of Infectious Diseases*. 204 (11): 1779-1786.
- Haque R, Roy S, Kabir M, Stroup SE, Mondal D, Houpt ER.(2005). *Giardia* assemblage A infection and diarrhea in Bangladesh. *The Journal of Infectious Diseases*. (192): 2171–2173
- Hill DR, Pearson RD. (1987). Ingestion of *Giardia lamblia* trophozoites by human mononuclear phagocytes. *Infection and Immunity*. 55 (12): 3155-61.
- Janson JC. (2011). Protein purification: Principles, high resolution methods, and applications. 3^a ed. Hoboken, N.J: John Wiley & Sons. 517 p.
- Koen V, Marielle T, Niels H, Veerle S, Karen H, Jean-Luc R, Piet S. (2007) A CFSE based assay for measuring CD4+CD25+ regulatory T cell mediated suppression of auto-antigen specific and polyclonal T cell responses, *Journal of Immunological Methods*.322 (1–2): 1-11
- Langford T, Dianne H, Michael P, Boes M, Chen J, Kagnoff MF, Gillin FD, Eckmann L. (2002). Central Importance of Immunoglobulin A in Host Defense against *Giardia spp.* *American Society for Microbiology*.
- Lara AR. (2011). Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista mexicana de ingeniería química*. 10(2): 209-223
- Lascrain R, Mora ME, Acosta G, Santos JI. (1993). Prevalencia de anticuerpos contra *Giardia lamblia* en suero de cordón umbilical y en sangre periférica materna. *Biología Médica del Hospital Infantil Mexicano*. 50: 27-30.
- Lee HY, Kim J, Noh HJ, Kim HP, Park SJ. (2014). *Giardia lamblia* binding immunoglobulin protein triggers maturation of dendritic cells via activation of TLR4-MyD88-p38 and ERK1/2 MAPKs. *Parasite Immunology*. 36 (12): 627-646.
- Leitsch D. (2015). Drug Resistance in the Microaerophilic Parasite *Giardia lamblia*. *Current Tropical Medicine Reports*. 2 (3): 128-135.
- López-Romero G, Quintero J, Astiazarán-García H, Velázquez C. (2015). Host defences against *Giardia lamblia*. *Parasite Immunology*. 37 (8): 394-406.
- Luján HD, Svärd S. (2011). *Giardia: A model organism*. Wien: Springer.
- Luján HD. (2006). *Giardia* y giardiasis. *Medicina Buenos Aires*. 66 (1): 70-74.
- Lyons AB. (2000). Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *Journal of Immunological Methods*. 243: 147-154.
- Manual HisTrap™ HP, 1 mL and 5 mL (2005). General Electric Healthcare

- Miller CMD, Smith NC, Johnson AM. (1999) Cytokines, nitric oxide, heat shock proteins and virulence in *Toxoplasma*. *Parasitol Today*. 15: 418–422.
- Milovanova TN. (2007) Comparative analysis between CFSE flow cytometric and tritiated thymidine incorporation tests for beryllium sensitivity *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company 1552-4957
- Miranda Ozuna, J.F. (2009). Caracterización genotípica de aislados clínicos y zoonóticos de *Giardia lamblia* del estado de Sonora. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65: 55-63.
- Müller J, Sterk M, Hemphill A, Muller N. (2007). Characterization of *Giardia lamblia* WB C6 clones resistant to nitazoxanide and to metronidazole. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 60 (2): 280-287.
- Müller N, Gottstein B. (1998). Antigenic variation and the murine immune response to *Giardia lamblia*. *International Journal for Parasitology*. 28 (12): 1829-1839
- Murphy K., Travers P, Walport M, Janeway C. (2008). *Janeway's immunobiology*. 7th ed. New York: Garland Science. 887 p.
- Palm JE, Weiland ME, Griffiths WJ, Ljungström I, Svärd SG. (2003). Identification of immunoreactive proteins during acute human giardiasis. *The Journal of Infectious Diseases*. 187 (12): 1849-59.
- Quihui-Cota L, Morales-Figueroa GG. (2012). Persistence of intestinal parasitic infections during the national de-worming campaign in schoolchildren of northwestern Mexico: A cross-sectional study. *Annals of Gastroenterology*. 25 (1): 57-60.
- Quintero J, Figueroa DC, Barcelo R, Breci L, Astiazaran-García H, Rascón L, Robles-Zepeda R, Velázquez C. (2013). Identification of an immunogenic protein of *Giardia lamblia* using monoclonal antibodies generated from infected mice. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 108 (5): 616-22.
- 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. Hermosillo, Sonora. México
- Rajeshwari K, Jaggi N, Aggarwal V, Kalra KK, Mittal SK, Baveja U. (1996). Determinants of symptomatic giardiasis in childhood. *Tropical Gastroenterology: Official Journal of the Digestive Diseases Foundation*. 17, 2.

- Rascón-Duran ML. (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.
- Saghaug CS, Sørnes S, Peirasmaki D, Svard S, Langeland N, Hanevik K. (2016). Human Memory CD4+ T Cell Immune Responses against *Giardia lamblia*. *Clinical and Vaccine Immunology*: Cvi. 23 (1): 11-8.
- Savioli L, Smith H, Thompson A. (2006). *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “Neglected Diseases Initiative”. *Trends in Parasitology*. 22 (5): 203-8.
- Secretaría de Salud. (2013). Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información. Dirección General de Epidemiología.
- Secretaría de Salud. (2016). Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información. Dirección General de Epidemiología.
- Solaymani-Mohammadi S, Singer S. (2010). *Giardia duodenalis*: The double-edged sword of immune responses in Giardiasis. *Experimental Parasitology*. 126 (3): 292-297.
- Soltys BJ, Falah M, Gupta RS. (1996). Identification of endoplasmic reticulum in the primitive eukaryote *Giardia lamblia* using cryoelectron microscopy and antibody to BIP. *Journal of Cell Science*. 109 (7): 190-9.
- Syed AA, Hill DR. (2003). *Giardia intestinalis*. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 16: 453-460.
- Valdez López MA. (2015). Caracterización inmunoquímica de la proteína inmunogénica 5G8 de *Giardia lamblia* y evaluación de su posible papel protector en un modelo gerbil. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias Químico-Biológicas. Hermosillo, Sonora, México.
- Valenzuela Félix SV. (2006). Parasitosis intestinales en niños escolares antes y un mes después de la administración de albendazol por la campaña nacional de diferentes comunidaes de Sonora. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México.
- Velázquez C, Beltrán M, Ontiveros N, Rascón L, Figueroa DC, Granados AJ, Hernandez-Martinez J, Astiazaran-Garcia H. (2005). *Giardia lamblia* infection induces different secretory and systemic antibody responses in mice. *Parasite Immunology*. 27 (9): 351-356.
- Ward W, Alvarado L, Rawlings ND, Engel JC, Franklin C, McKerrow JH. (1997). A primitive enzyme for a primitive cell: the protease required for excystation of *Giardia*. *Cell*. 89 (3): 437-44.

World Health Organization [WHO]. (1996). The World Health Report. Geneva: World Health Organization.

World Health Organization [WHO]. (2005). Disponible en: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/en/S01.pdf (Fecha de acceso: 09 de junio de 2016)

Xiao L, Fayer R. (2008). Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int J Parasitol* 38: 1239-1255

Zügel U, Kaufmann SH. (1999). Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 12 (1): 19-39.

ANEXO 1

Secuencias de BIP

1.1 BIP *Giardia intestinalis* ATCC 50581 GenBank: EES99538.1

>gi|253742871|gb|EES99538.1| Bip [*Giardia intestinalis* ATCC 50581]

M**ISSRVNQKEYTKIKMIALVFAALALAETIIGIDLGTTYSCVAVSRA**GQVEIIPNELGARVTPSYVA
FTADGERLVGDAAKNYAPISPENTIFDVKRLIGRKFDDPEVQKDMKLLPYKVINKDGRPFVQLSG
TNLPKELQXKIMSPEEISAMVLTKMKTIAEDYLGEKITKAVVTVPAYFSDSQRSATKDAGRIAGLD
VVRIINEPTSSSIAYGLDKKTQETSGKAKNILVFDCGGGTHDVSILSVDSGVFEVLATAGNTHLG
GEDFDRRLLDHFIAIFKKKNNIDLSITNTGDKAKDMAVKKAISRLRREIEAGKRQLSTASSVQIVVD
SLIDGVDFSESLTRAKFEELNIDLFKKSIPVEQVLRDAKLKTTDIDEVVLVGGSTRIPKIRQLLQD
YFNGKALNKDINADEAVAWGAAVQASILSGAKDHDVLLIDVTPLTLGIETQGGIMTPLIERNYIP
VKKSKIFSTVQDQQTVMVKIQVYEGERSMVKDNLLGNFDLNDIPPAPRGTPQIEVTFEIDSNLIL
TVSAVEKSSGKEESITIKNDRGRLESEDEINRLVREAEFEAEEDKINRERAEARNAFETIVSITTTQT
TADKEGNIVDKISSDDLEKVKEAIKEAQDWLRDNTDASKEEIEEEKSKFEKVVQPILGENFGRSA
SAGGSGPEYDYAEKDEL

1.2 BIP *Giardia intestinalis* ATCC 50581 GenBank: EES99538.1 (MODIFICADA)

>gi|253742871|gb|EES99538.1| Bip [*Giardia intestinalis* ATCC 50581]

-46aa's del N-terminal + Poli-Histidinas (6) + secuencia sensible a trombina (6aa's).

Modificada aminoácido 107 **X**→**N** (tomada de ATCC 50803) MW calculada. 70.97KDa

M**HHHHHHLVPRGS**GQVEIIPNELGARVTPSYVAFTADGERLVGDAAKNYAPISPENTIFDVKRLI
GRKFDDPEVQKDMKLLPYKVINKDGRPFVQLSGTNLPKELQ**N**KIMSPEEISAMVLTKMKTIAEDY
LGEKITKAVVTVPAYFSDSQRSATKDAGRIAGLDVVRIINEPTSSSIAYGLDKKTQETSGKAKNIL
VFDCGGGTHDVSILSVDSGVFEVLATAGNTHLGGEDFDRRLLDHFIAIFKKKNNIDLSITNTGDKA
KDMAVKKAISRLRREIEAGKRQLSTASSVQIVVDSLIDGVDFSESLTRAKFEELNIDLFKKSIPVE
QVLRDAKLKTTDIDEVVLVGGSTRIPKIRQLLQDYFNGKALNKDINADEAVAWGAAVQASILSGA
KDHDVLLIDVTPLTLGIETQGGIMTPLIERNYIPVKKSKIFSTVQDQQTVMVKIQVYEGERSMVKD
NLLGNFDLNDIPPAPRGTPQIEVTFEIDSNLILTVSAVEKSSGKEESITIKNDRGRLESEDEINRLV
REAEFEAEEDKINRERAEARNAFETIVSITTTQTTADKEGNIVDKISSDDLEKVKEAIKEAQDWLR
DNTDASKEEIEEEKSKFEKVVQPILGENFGRSASAGGSGPEYDYAEKDEL

ANEXO 2

Cultivo de *E. coli* Rosetta gami

Reactivos:

- Medio de cultivo TB (Terrific Broth) Para 1 litro

Triptona	12 g
Extracto de Levadura	24 g
Glicerol	4 mL
Agua desionizada	896 mL

- Mezclar hasta que se hayan disuelto los componentes y después esterilizar por autoclave 20 minutos a 15 psi (1.05 Kg/cm²) en ciclo líquido.
- Dejar enfriar la solución a 60 °C o menos y añadir 100 mL de la siguiente solución reguladora de fosfatos estéril.

KH ₂ PO ₄ 0.17 M	2.31 g
K ₂ HPO ₄ 0.72 M	12.54 g
Agua desionizada	90 mL

- Una vez preparado el medio se procede a realizar un pre inóculo el cual consiste en

Solución reguladora de Fosfatos (KH ₂ PO ₄ 0.17 M y K ₂ HPO ₄ 0.72 M)	400 µL
Cepa <i>E. coli</i> Rosetta gami calcio competentes	100 µL
Ampicilina	4 µL
Medio de cultivo TB (Terrific Broth)	3496 µL

- Incubar la solución anterior durante 24 horas a 37 °C.
- Después colocarlo en un 1 litro de cultivo Terrific Broth.
- Verificar el crecimiento bacteriano basándose en la densidad óptica (~ 0.6 a 600 nm).
- Una vez alcanzada esta densidad óptica, agregar IPTG 0.5 mM (1000 X) y dejar el cultivo incubando durante 4 horas a 37 °C en agitación.

ANEXO 3

Pastilla de *E. coli* Rosetta gami

- Una vez obtenido el cultivo de *E. coli* Rosetta gami, dividir el litro de cultivo en tubos de 50 mL y centrifugarlos 3800 g, 30 minutos a 4 °C.
- Colocar el sobrenadante obtenido nuevamente a centrifugar a la mismas condiciones
- Resuspender cada pastilla obtenida en solución reguladora de fosfato (PBS 1X) (todo el procedimiento se realiza en frío).

Para 1 litro de solución reguladora de fosfato (10 X):

Fosfato de sodio monobásico	1.9 g
Fosfato de sodio dibásico	12 g
NaCl	85 g

Aforar a 1000 mL con agua desionizada, ajustar el pH a 7.2 con NaOH 1M y almacenar a temperatura ambiente.

- Centrifugar nuevamente cada pastilla resuspendida a 3800 g, 30 minutos a 4 °C.
- Una vez más separar el sobrenadante del precipitado y juntar todos en un solo tubo de 50 mL y resuspender con PBS 1X.
- Decantar el todo sobrenadante hasta que quede seca la pastilla y guardar a -80 °C.

ANEXO 5

Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones ligeramente desnaturizantes y reductoras (SDS-PAGE)

Reactivos:

- Acilamida/Bisacrilamida 30 %
Acrilamida 30 g
N,N-metilen-bisacrilamida 0.8 g

Mezclar en 100 mL de agua ultrapura. Filtrar la solución con un filtro de 0.45 μm . 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 0.5M conteniendo SDS al 0.4 %)
Trizma-base 30 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 μm de diámetro de poro y adicionar 0.4 g de SDS. Almacenar a 4 °C.

- Trizma-base/SDS, pH 8.8 4X (Trizma-base 1.5M 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 (PSA) al 10 %
(NH₄)₂S₂O₈ 10 μg
Agua ultrapura 100 μL

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

- Buffer de corrida 1X, pH 8.3

Glicina	72 µg
Trizma-base	15.1 g
SDS	5 g

Disolver el agua ultrapura y aforar a 1 L. para obtener la solución de trabajo 1X 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 desionizada	5.25 mL
Persulfato de amonio (PSA)	0.08 mL
TEMED	0.018 mL

- Gel separador (2 minigeles de 6 x 8 cm y separador de 0.75 mm)

Acrilamida/Bisacrilamida 30 %/8 %	0.65 mL
Buffer Tris 4X con SDS pH 8.8	1.25 mL
Agua des-ionizada	3.05 mL
Persulfato de amonio (PSA)	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-Mercaptoestanol	2.5 mL
Azul de bromofenol	0.5 mg

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

- 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 Destiñidora I

Metanol	50 % (v/v)
Ácido acético	10 % (v/v)
Agua ultrapura	40 % (v/v)

- Solución Destiñidora 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 ultrapura	5.25 mL

Persulfato de amonio	0.08 mL
----------------------	---------

TEMED	0.18 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 6.8	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.

ANEXO 6

Inmunización de Animales de Experimentación

Reactivos

- Proteínas solubles
- Adyuvante completo de Freund de DIFCO (B.D. Franklin, Lakes, NJ. USA)
- Adyuvante Incompleto de Freund de DIFCO

Materiales y Equipo

- Vórtex
- Frasco pequeño de vidrio con tapón de rosca
- Micropipetas y micropuntas nuevas
- Jeringas

Procedimiento

- Realizar una electroforesis de la proteína de interés, en un gel preparativo de 0.75 mm a 1.5 mm de grosor.
- Someter el gel en tinción con Azul de Comassie y desteñir con las soluciones descritas en el ANEXO 5.
- Cortar la banda del gel, y macerarla con PBS 1X.
- Para la inmunización inicial, administrar 10 µg de proteína por vía intraperitoneal con ayuda de una jeringa (200 µL). El antígeno está en presencia de Adyuvante completo de Freund (200 µL de antígeno + 200 µL de adyuvante, Mezclar con vórtex antes de administrar el antígeno). Para las inmunizaciones siguientes (5 a 6 semanas), repetir el procedimiento del punto anterior. Sustituir por Adyuvante Incompleto de Freund.

Antes de cada inmunización, obtener muestras de suero:

- Limpiar la punta de la cola de ratones con una torunda impregnada de etanol al 70 % y permitir secar.
- Con una navaja de un filo, cortar la punta de la cola y recoger las gotas de sangre, aproximadamente 300 µL, en un microtubo eppendorf.
- Dejar reposar las muestras de sangre por 30 minutos y posteriormente centrifugarlas en una microcentrífuga (Labnet Spectrafuge 7M) a 1000 xg por 10 minutos.

Procedimiento

- Adsorber a los pozos de la placa de ELISA, 0.25 µg de la proteína purificada en 50 µL de solución reguladora de carbonatos pH 9.6 por pozo.
- Incubar por una hora a 37°C o toda la noche a 4°C.
- Lavar cada pozo de la placa con PBS 1X-Tween 20 (0.05 %), 5 veces.
- Llenar cada pozo con 50 µL de solución bloqueadora (PBS 1X-BSA 1 %), incubar una hora a temperatura ambiente y en constante rotación.
- Lavar cada pozo de la placa con PBS 1X pH 7.2-Tween 20 (0.05 %), 5 veces.
- Adicionar 50 µL del primer anticuerpo (suero de inmunización) en diluciones seriadas de 1:1000 hasta 1:20 000 e incubar una hora a temperatura ambiente y en constante rotación.
- Lavar cada pozo de la placa con PBS 1X pH 7.2-Tween 20 (0.05 %), 5 veces.
- Adicionar 50 µL del segundo anticuerpo (cabra anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa) diluido 1:1000 en PBS 1X, incubar una hora a temperatura ambiente y en constante rotación.
- Lavar cada pozo de la placa con PBS 1X pH 7.2-Tween 20 (0.05 %), 5 veces.
- Adicionar 50 µL de solución reveladora (ABTS + H₂O₂ al 30 %).
- Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Medir la densidad óptica a 415 nm en el lector de microplaca.

ANEXO 8

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
Extracto de Levadura	10 g
Dextrosa	10 g
NaCl	2 g
L-Cisteína	2 g
Fosfato de sodio dibásico	1 g
Bilis	0.6 g
Ácido ascórbico	0.1 g
Citrato férrico amoniacal	0.023 g

Antibióticos:

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

Una vez disueltos los componentes en polvo, se ajusta el pH a 6.9 con NaOH. Adicionar el antibiótico ceftriaxona, suplementar al 10 % con el 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:

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

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

ANEXO 9

Obtención de extracto 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:

- Colocar en agua hielo (10 minutos) los tubos que contengan los cultivos de trozoítos de *G. lamblia*.
- 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.
- Resuspender en 1.4 mL de PBS pH 7.2.
- Obtener la concentración celular por un hematocitometro (dilución1:200) y una dilución 1:2 con azul de tripano para en conteo.
- 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).
- Retirar del congelador y dejar descongelar a temperatura ambiente (aproximadamente 15 minutos).
- 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 trozoítos frío durante el proceso.
- Centrifugar a 10 000 xg a 4 °C por 20 minutos, recuperar el sobrenadante el cual contiene la mezcla heterogénea de proteínas solubles de *G. lamblia*. Almacenar a -80 °C hasta su uso.

ANEXO 10

Electrotransferencia e inmunodetección (Western-Blotting)

Método:

- Colocar el gel de poliacrilamida realizado durante la electroforesis, membrana de nitrocelulosa y dos cojinetes (BIO-RAD) en solución de transferencia 1X, pH 8.3 por 15 minutos.
- Ordenar de la siguiente manera: cojinete (Extra thick blot paper Filter paper Bio-Rad Laboratories Inc, EEUU), membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm (Bio-Rad Laboratories Inc, EEUU, gel de poliacrilamida y cojinete, eliminando la mayor cantidad de burbujas con la ayuda de un tubo de ensaye.
- Electrotransferir en sistema semiseco (Semi-Dry Blotting System, IMM-1-A, Serie 11798) por 20 minutos a 15 V constantes.
- Una vez terminada la transferencia la membrana se puede almacenar a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ envuelta en papel aluminio.

Inmunodetección

- Bloquear los sitios libres de la membrana con leche Svelty al 5 % en PBS-BSA 1% por 1 hora.
- Lavar membranas con PBS para remover el exceso de solución de bloqueo.
- Agregar primer anticuerpo y dejar incubarse por 1 hora en agitación constante.
- Enjuagar las membranas con PBS 1X y realizar 5 lavados de 5 minutos en agitación constante con PBS 1X 0.05 % Tween 20.
- Agregar el segundo anticuerpo (cabra anti-ratón anti-IgG peroxidasa conjugada) en una dilución 1:75000 con PBS 1X-BSA 0.01 % e incubar durante una hora en agitación constante, posteriormente enjuagar membrana suavemente y realizar 5 lavados como se mencionan en el paso 4.
- Quitar el exceso de solución de lavado con PBS 1X y remover el exceso manteniendo húmeda la membrana.
- Mezclar la solución de Luminol y peróxido de hidrogeno en dilución 1:2 (Super Signal, Best Pico, Chemiluminescent Substrat, prod 34080, Lot No. EB60813, Pierce, Thermo Scientific).
- Cubrir la membrana de nitrocelulosa con la solución Luminol-peróxido e incubar por 10 minutos manteniendo la membrana húmeda.

- Montar la membrana de nitrocelulosa en un casete de Revelado (Hypercassette, Amersham Biosciences, UK).
- En oscuridad, exponer la membrana dentro del casete por 30 segundos a una película fotográfica (Fuji Medical X-RAY Film, 100NIF, FUJIFILM Corporation, Tokio, Japón).
- Revelar reacción en oscuridad:
 - a. Enjuagar la película fotográfica por 10 segundos en solución Reveladora (GBX Developer and Replenisher, Carestream Health Inc).
 - b. Enjuagar la película fotográfica por 10 segundos en agua.
 - c. Enjuagar la película fotográfica por 10 segundos en solución fijadora (GBX Fixer and Replenisher, Carestream Health Inc.).
 - d. Enjuagar la película fotográfica por 10 segundos en agua.

ANEXO 11

Infección de Animales de Experimentación

Reactivos

- PBS 1X pH 7.2 esterilizado por filtración al vacío con poro de 0.45 μm , o por autoclave 121 °C, 15 lb por 20 minutos

Procedimiento

- Someter a los ratones a infectar a 6 o 9 horas de ayuno, con el fin de favorecer la infección.
- Mantener el cultivo de trofozoítos de *G. lamblia* por 20 minutos en agua-hielo para liberar las células adheridas a la pared del tubo.
- Lavar los trofozoítos 3 veces en PBS 1X, usando centrífuga (Thermo IEC Marathon 3000R, Fisher Scientific) a 1800 rpm por 5 minutos a 4°C.
- Disolver pastilla en 1.4 mL de PBS 1X frío y estéril.
- Para su cuantificación en hemacitómetro, tomar una alícuota y hacer dilución adecuada con PBS 1X y azul de tripano.
- Después del último lavado, resuspender la pastilla de trofozoítos en PBS 1X y ajustar la concentración a 5×10^6 de trofozoítos en 200 μL de PBS 1X.
- Con ayuda de una jeringa para alimentación forzada, inocular por vía oral, 200 μL de la suspensión de trofozoítos a temperatura ambiente.

Nota: mantener trofozoítos a 4°C durante toda su manipulación y antes de inocular.

ANEXO 12

Aislamiento de esplenocitos con solución de lisis

Solución de lisis

- NH_4Cl 150 mM (4.02 g)
- KHCO_3 10 mM (0.1 g)
- $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0.1 mM (18.6 mg)
- Se puede sustituir por 100 μL de EDTA 0.5 M, pH 8
- Aforar a 500 mL con agua MiliQ y ajustar pH entre 7.2 y 7.4
- Esterilizar por filtración
- Almacenar a 4 °C, Descartar después de un mes.

Procedimiento

- Utilizar material y reactivos estériles
- En una placa de Petri con 5 mL de medio de cultivo, macerar el tejido con el pie de una jeringa
- Filtrar la suspensión celular por organza en un tubo de 50 mL
- Lavar la placa con 15 mL más de medio de cultivo y filtrarlo por organza en el mismo tubo
- Centrifugar a 1500 rpm (500 xg) por 7 minutos a 4 °C
- Descartar el sobrenadante, no decantar. Utilizar una pipeta
- Resuspender suavemente el botón celular en aproximadamente 500 μL de PBS,
- Agregar solución de lisis (ACK) a temperatura ambiente (25 °C) 5 mL/bazo
- Agitar en Vortex® a potencia baja (4 o 5) por 2 segundos
- Detener reacción de lisis a los 2 minutos después de agregar ACK con DMEM frío llevando a un volumen de 25 mL
- Centrifugar a 1500 rpm (500 xg) por 7 minutos a 4 °C
- Descartar el sobrenadante, no decantar. Utilizar una pipeta
- Resuspender el botón celular en DMEM frío. Utilizar un volumen pequeño (1 mL aproximadamente) para desprender el botón celular y después llevar a un volumen de 25 mL
- Filtrar por organza
- Centrifugar a 1500 rpm (500 xg) por 7 minutos a 4 °C

- Descartar el sobrenadante, no decantar. Utilizar una pipeta
- Resuspender en 5 mL de D10F frío y contar células en cámara de Neubauer

Ajustar células a la concentración deseada para el experimento en D10F.

ANEXO 13

Ensayo de reducción del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)

- Agregar 15 μL de MTT 5 mg/mL a cada pozo (150 μL cultivo)(10 μL MTT por cada 100 μL de cultivo celular en el pozo).
- Incubar a 37 °C por 4 horas.
- Agregar 150 μL de Isopropanol-HCl.
- Disolver completamente los cristales de formazán.
- Leer en lector de microplaca a 530 nm y 630 de referencia.

ANEXO 14

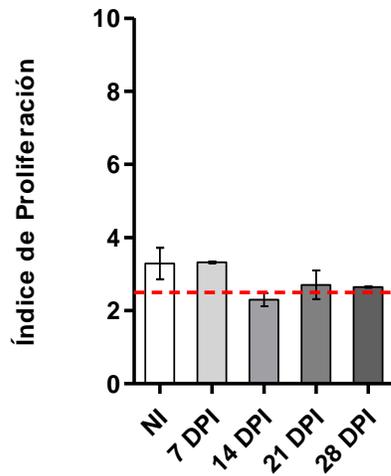
Tinción con Carboxifluoresceína succinimidil ester (CFSE)

- Utilizar material y reactivos estériles.
- La tinción se debe realizar en PBS a 37 °C, si las células se encuentran suspendidas en medio de cultivo centrifugar a 1500 rpm (500 xg) por 7 minutos a 4 °C diluyendo la muestra con PBS.
- Ajustar las células a teñir a una concentración de 1×10^7 células/mL.
- Descongelar CFSE, el vial de CFSE esta disuelto en DMSO. Hacer dilución de CFSE con PBS a la concentración deseada al momento.
- Ejemplo: Se tiñeron 1×10^7 células en 1 mL a una concentración de CFSE de 1 μ M.
- Resuspender células en 998 μ L de PBS a 37 °C.
- Agregar 2 μ L de CFSE 500 μ M a la suspensión de células en PBS.
- Para ajustar las concentraciones de CFSE utilizar $C1V1=C2V2$.
- Inmediatamente después de agregar CFSE a las células, agitar en Vortex® a baja potencia (4 o 5) por 2 segundos e incubar a 37 °C por 20 minutos. Agitar suavemente a los 10 minutos de incubación para una tinción homogénea.
- Detener la tinción agregando D10F frío hasta un volumen de 20 mL
- Lavar dos veces con D10F (1500 rpm (500 xg) por 7 minutos a 4 °C).
- Ajustar células a la concentración deseada en el experimento en medio D10F.

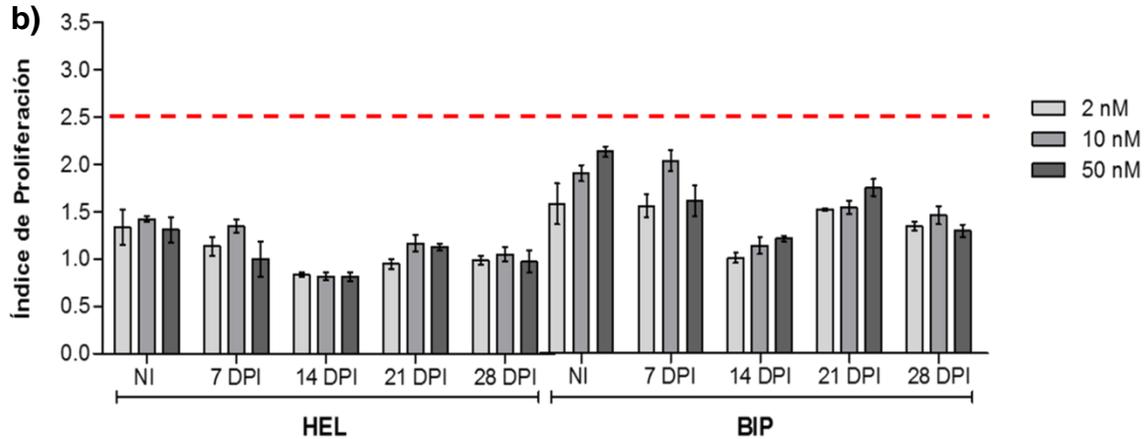
ANEXO 15

La proteína BIP no estimula la proliferación de esplenocitos de ratones infectados con *G. lamblia* (Análisis de MTT).

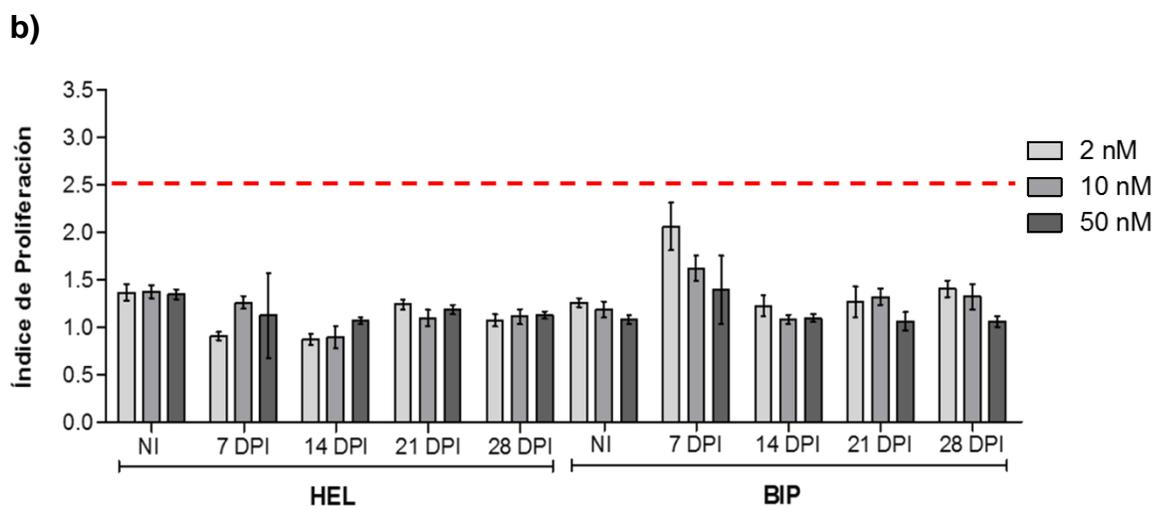
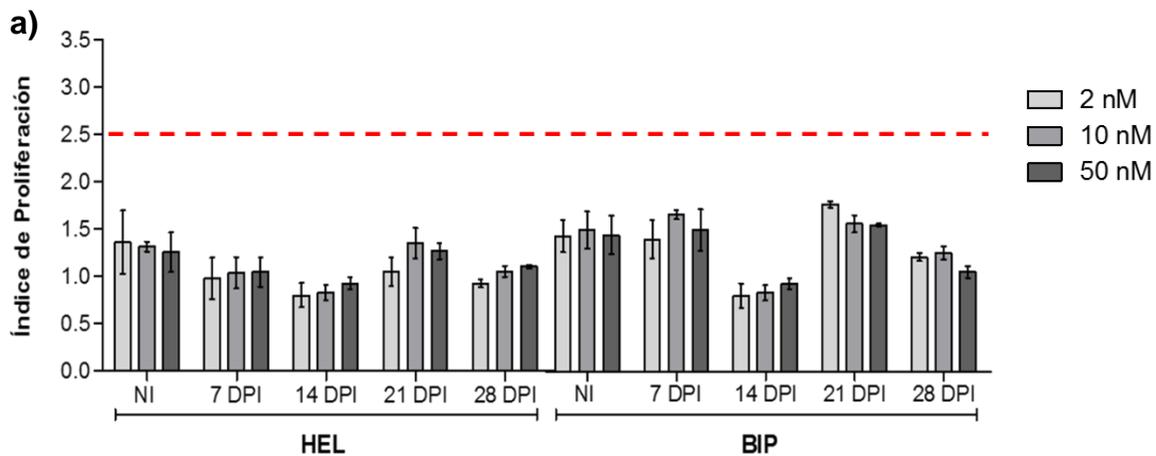
a)



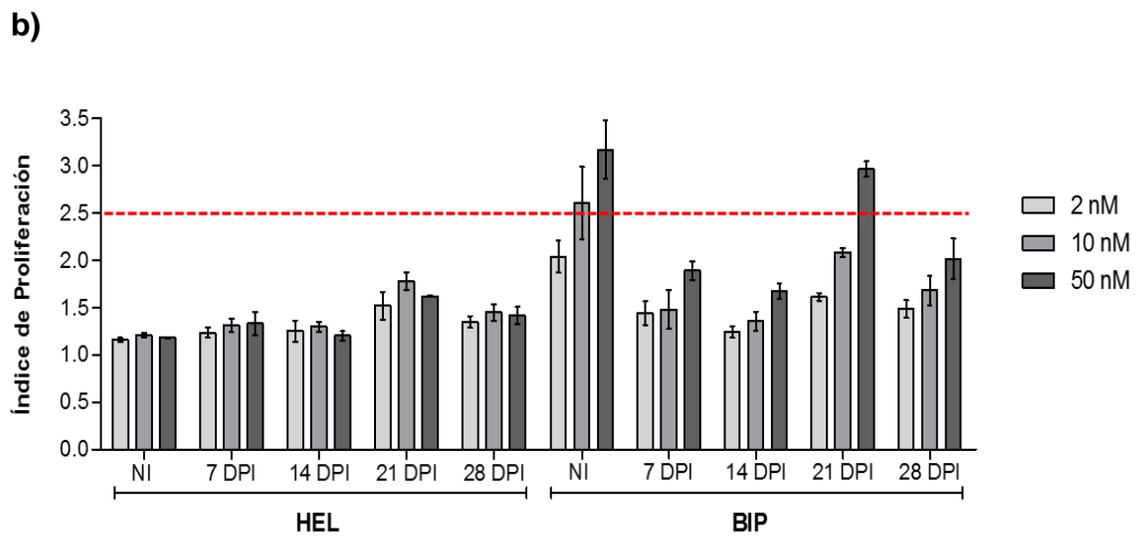
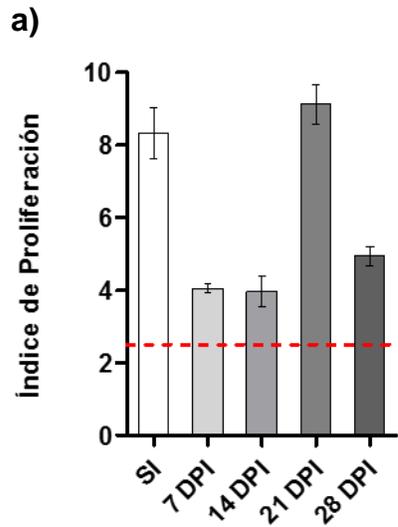
b)



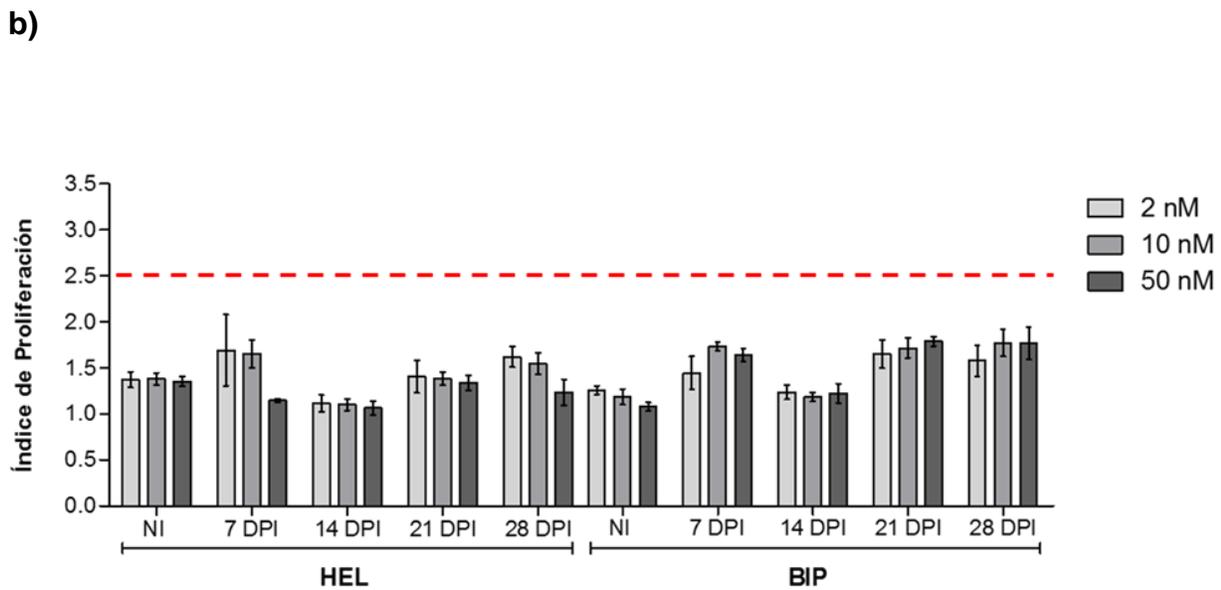
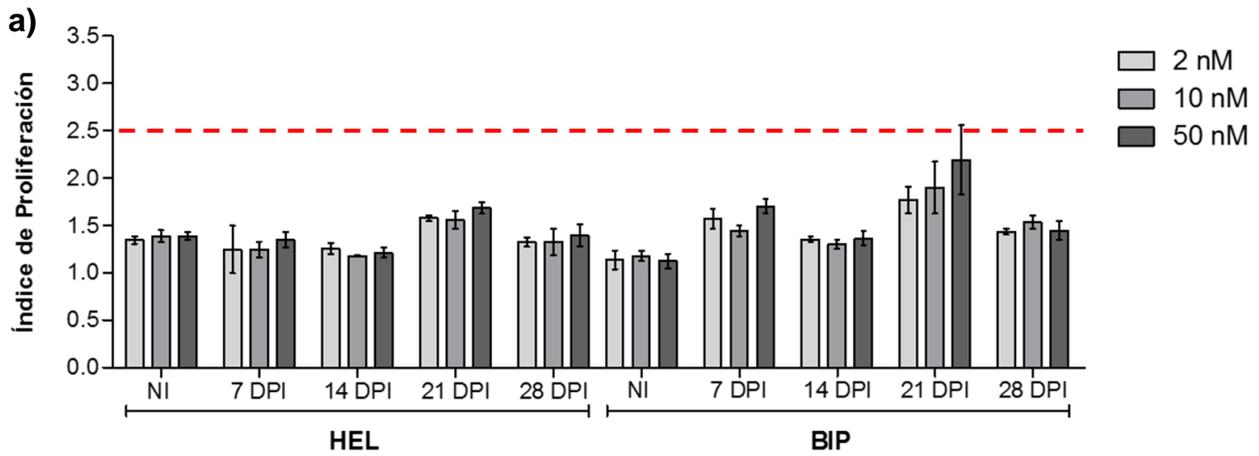
Ensayo MTT # 1 a) PHA 50 nM a las 72 horas de cultivo. b) Proliferación de esplenocitos estimulados con HEL y BIP a las 72 horas de cultivo.



Ensayo MTT # 1 a) Proliferación de esplenocitos estimulados con HEL y BIP a las 96 horas de cultivo. **b)** 120 horas de cultivo



Ensayo MTT # 2 a) PHA 50 nM a las 72 horas de cultivo. **b)** Proliferación de esplenocitos estimulados con HEL y BIP a las 72 horas de cultivo.



Ensayo MTT # 2 a) Proliferación de esplenocitos estimulados con HEL y BIP a las 96 horas de cultivo. **b)** 120 horas de cultivo

