



# **UNIVERSIDAD DE SONORA**

## **DIVISIÓN DE INGENIERÍA**

**DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN POLÍMEROS Y  
MATERIALES**

**GENERACIÓN Y APLICACIÓN DE SENSORES BIOLÓGICOS PARA  
LA IDENTIFICACIÓN DE EPÍTOPES INMUNODOMINANTES DE  
PROTEÍNAS DE *Giardia lamblia* QUE ESTIMULAN UNA  
RESPUESTA INMUNOLÓGICA**

### **TESIS**

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIA DE MATERIALES**

Por:

**JAEL TERESA DE JESÚS QUINTERO VARGAS**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



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

## DEDICATORIAS

### **A Dios:**

Por concederme la oportunidad de vivir y las bendiciones regaladas para poder realizar su voluntad.

### **A mis padres:**

Enormemente dedico este trabajo a mis padres Ramón Octavio Quintero Cruz y María Vargas Castro por su infinito e incondicional apoyo moral, emocional y económico a lo largo de este tiempo. Gracias por siempre estar allí, por su entrega total, por las llamadas de atención, por las alegrías, por sus palabras de ánimo, por ser un ejemplo de vida que nos dejan a sus hijos un gran compromiso, por siempre guiarnos por el camino de la verdad y la justicia, por su caluroso amor. Por siempre estar allí en la salud y en la enfermedad. Los amo y estoy super orgullosa de ustedes. Espero algún día llegar a ser “Pasas y Nueces”. Los amo *mis viejos*.

### **A mis hermanos:**

Con todo mi amor a ustedes: Ana (china), Irene (nene), Ismael (maye) y Fernanda (wera) por su amistad y compañía, por ser cada uno de ustedes de forma tan especial un inmenso apoyo en todos los sentidos, por ponerme los pies en la tierra, por los raites, las despertadas, los eternos diez pesos que me prestaron, por sus consejos, por su confianza, por ser un ejemplo para mí. Los amo tanto y doy gracias a Dios el que me hayan tocado ustedes como hermanos.

También les agradezco a mis cuñis Giorgio, Sergio, Francely y Edgar por hacer tan grato el tiempo juntos.

A mis sobrinos:

Erick, Laisha, Tato, Checho, Dany y Jesucito les agradezco su existencia, la alegría y felicidad que siempre dejan a su paso. Los amo.

**A toda mi familia:**

A mi abue Angélica María, a todos mis tíos, primos y sobrinos (segundos y hasta terceros) que son muchísimos les agradezco sus palabras de ánimo, su compañía, las fiestas, la alegría que los caracteriza, su tiempo y amor. Especialmente a aquellos que se nos han adelantado: nana Lola, tata Félix, Fer, Nora y tía Kala que diera para que pudieran estar físicamente conmigo, pero sé que lo están en espíritu.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo económico para la realización de mis estudios de doctorado.

Mis mayores agradecimientos a la Universidad de Sonora por ser mi casa por tantos y tantos años. Orgullosamente Búho.

Agradezco al Departamento de Polímeros y Materiales (DIPM) de la Universidad de Sonora por todo el apoyo brindado durante mi formación doctoral, a todos mis maestros por sus enseñanzas y paciencia. De manera especial agradezco a las secretarias Lolita y Martha por su incondicional apoyo y disposición.

Agradezco al Departamento de Nutrición y Metabolismo del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) por permitirme el uso de sus instalaciones y equipos para la realización de este trabajo. De manera muy especial agradezco a las técnicas Bertha Isabel Pacheco y Diana Mendoza Bermudez por todo el apoyo técnico que me brindaron de manera incondicional durante la realización de esta investigación.

A los miembros del Cuerpo Académico de Bioquímica y Biología del Departamento de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad de Sonora, gracias por apoyarme siempre, por su amistad; gracias por la formación brindada.

A los miembros del comité de tesis, Dr. Enrique Velázquez Contreras, Dra. Adriana Garibay Escobar, Dr. Juan Carlos Gálvez Ruíz, Dr. Humberto Astiazarán García, Dr. Eduardo Ruíz Bustos y Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras por sus

valiosas observaciones y por su siempre disposición de apoyarme, gracias por todas sus enseñanzas y sobre todo gracias por brindarme su confianza.

A mi director de tesis Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras por la formación académica brindada durante todos estos años, por su paciencia, tolerancia, sinceridad y confianza en el desarrollo de este trabajo. De manera personal le agradezco sus preocupaciones, apoyo y amistad brindados durante mi permanencia en su equipo de trabajo.

De manera muy especial agradezco a la Dra. Adriana Garibay Escobar y al Dr. Humberto Astiazarán García por su incondicional apoyo, por sus palabras de motivación para el cumplimiento de mis metas.

Agradezco enormemente a la M.C. Lucila Rascón por su apoyo durante la realización de este trabajo, pero sobre todo agradezco su amistad, cariño y preocupación hacia nuestros intereses personales, nuestra relación paso de ser Maestro-mamá-alumno a amigas. Tiene un lugar especial en mi corazón. La quiero teacher. Agradezco a la M.C. Martha Judith Valdéz por su apoyo en la realización de este trabajo.

A mis amigos Paola, Denisse e Iván gracias por compartir un pedazo de su vida conmigo, les agradezco los tiempos de recreación, el apoyo y amistad. Los llevo en mi corazón.

A mis compañeras Alejandra López, Lulú Valencia y Priscila Arámbula por su apoyo y comprensión.

A todos mis hermanos en la felicidad y sufrimiento: Paola, Samuel, Lulú, Lucía, Efraín, Alejandra, Dorita, Luis Fernando, Carolina, Diana Carolina, Brenda, Ramses, Héctor, Erika, Wenceslao, Heriberto, Mario, Ana Laura, Sergio, Diana

Evelyn, Ivonne, Luisa, Adriana, Davisela y Jorge gracias por haber hecho transcurrir rápido el tiempo invertido en este trabajo, y por hacer la vida más alegre.

Agradezco a todos los que directa o indirectamente contribuyeron a la realización de este trabajo de investigación.

## ÍNDICE

	Página
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	iv
<b>LISTA DE TABLAS</b>	v
<b>RESUMEN</b>	vi
<b>ABSTRACT</b>	viii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	4
2.1 Sensores biológicos	4
2.2 Características generales de <i>G. lamblia</i>	4
2.3 Reconocimiento molecular y respuesta inmunológica contra <i>G. lamblia</i>	6
2.3.1 Mecanismos inmunológicos humorales contra <i>G. lamblia</i>	6
2.3.2 Mecanismos inmunológicos celulares contra <i>G. lamblia</i>	7
2.4 Reconocimiento molecular por linfocitos T a través del sensor biológico receptor de células T (RCT)	8
2.5 Procesamiento y presentación de antígeno	16
2.6 Proteínas inmunogénicas de <i>G. lamblia</i> reconocidas por modelos de infección murino	17
2.6.1 Proteínas inmunogénicas reconocidas por sensores biológicos de la respuesta inmune humoral	18
2.6.1.1 Generación de sensores biológicos (anticuerpos monoclonales)	19
2.6.2 Proteínas inmunogénicas reconocidas por sensores	

biológicos de la respuesta inmune celular	21
2.7 Proteínas inmunogénicas de <i>G. lamblia</i>	23
2.8 Espectrometría de masas	25
2.9 Predicción de epítopes que estimulan una respuesta inmune celular y humoral	28
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	29
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b>	30
4.1 Objetivos particulares	30
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	31
5.1 Cultivo de <i>G. lamblia</i>	31
5.2 Animales de experimentación	31
5.3 Obtención de extractos antigénicos solubles de <i>G. lamblia</i>	31
5.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE	32
5.5 Cultivo de hibridomas de células B y T	33
5.6 Reconocimiento antigénico del sensor biológico (anticuerpo monoclonal) por Western-blotting	34
5.7 Ensayo de inmunoadsorción de trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	35
5.8 Ensayo de aglutinación de trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	35
5.9 Análisis de citometría de flujo de trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	36
5.10 Microscopía confocal de trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	36
5.11 Caracterización y purificación de la proteína inmunogénica 5G8 de <i>G. lamblia</i>	37
5.12 Espectrometría de masas	38

5.13 Predicción de epítopes potenciales que estimulan una respuesta inmune celular y humoral	39
5.14 Análisis estadístico	40
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>41</b>
6.1 Reconocimiento específico de sensores biológicos (anticuerpos monoclonales) específicos de <i>G. lamblia</i>	41
6.2 Expresión de la proteína 5G8 en trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	43
6.3 La proteína 5G8 de <i>G. lamblia</i> es diferente a la proteína VSP H7	47
6.4 Ensayo de aglutinación de trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	49
6.5 Identificación de proteínas inmunogénicas por espectrometría de masas en tándem con un analizador de masas cuadrupolar	51
6.6 Predicción de epítopes potenciales que estimulan una respuesta inmune celular y humoral	55
<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>58</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>63</b>
<b>9. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO</b>	<b>64</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>65</b>
<b>11. ANEXOS</b>	<b>75</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema de <i>Giardia lamblia</i> .	5
2	Esquema de procesamiento y presentación de antígeno.	10
3	Representación esquemática de los sensores biológicos del complejo mayor de histocompatibilidad.	12
4	Representación esquemática de los bolsillos de unión del sensor biológico CMH clase II (haplotipo I-A <sup>K</sup> ).	15
5	La proteína de <i>G. lamblia</i> de 71 kDa es reconocida por sueros de ratones infectados y re-infectados.	42
6	Expresión de la proteína 5G8 en trofozoítos de <i>G. lamblia</i> .	44
7	Análisis por microscopia confocal de trofozoítos de <i>G. lamblia</i> .	45
8	Enriquecimiento de la población de trofozoítos de <i>G. lamblia</i> que expresan la proteína 5G8 en la superficie celular.	46
9	La proteína 5G8 de <i>G. lamblia</i> es diferente a la proteína VSP H7 (Variant Surface Protein H7).	48
10	Aglutinación de <i>G. lamblia</i> por el anticuerpo monoclonal 5G8.B5.	50
11	Proteína inmunogénica de <i>G. lamblia</i> BiP reconocida por el AcMo 5G8.B5.	53
12	Espectro de masas de un péptido correspondiente a la proteína inmunogénica BiP de <i>G. lamblia</i> .	54

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Proteínas inmunogénicas de <i>G. lamblia</i> identificadas por ESI	20
2	Principales proteínas inmunogénicas de <i>G. lamblia</i> .	24
3	El AcMo 5G8.B5 induce aglutinación en trofozoítos de <i>G. lamblia</i> .	49
4	Péptidos identificados por ESI-MS/MS correspondientes a la proteína inmunogénica BiP de <i>G. lamblia</i> .	52
5	Predicción de péptidos de la proteína BiP que se unen a la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad.	57
6	Predicción de péptidos de la proteína HEL que se unen a la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad.	57

## RESUMEN

*G. lamblia* es el agente causal de la giardiasis en humanos y varias especies animales. Las manifestaciones clínicas de la giardiasis se caracterizan por infecciones sintomáticas con diarrea, dolor abdominal, flatulencias, síndrome de malabsorción de nutrientes. Adicionalmente, en ciertos individuos la infección puede ser asintomática. La respuesta inmunológica juega un papel muy importante como un sensor biológico (por ejemplo: anticuerpos, CMH clase II) en la erradicación de la giardiasis. El conocimiento actual acerca de las moléculas de *G. lamblia* que inducen una respuesta inmune protectora es muy limitado, por lo cual el objetivo principal de este trabajo fue el identificar proteínas inmunodominantes de proteínas de *G. lamblia* mediante la utilización de sensores biológicos (anticuerpo monoclonal, molécula principal de histocompatibilidad clase II) en un modelo murino de infección. Previamente en nuestro laboratorio se generaron hibridomas de células T y B específicos para proteínas de *G. lamblia* (cepa GS/M-83-H7), mediante la fusión de células de timoma (hibridomas de células T) o de mieloma (hibridomas de células B) con células de ratones inmunizados con extractos proteicos de *G. lamblia* (hibridomas de células T), o células de ratones infectados con trofozoítos de *G. lamblia* (hibridomas de células B). Se generaron 7 hibridomas de células T específicos para proteínas de *G. lamblia*. Se identificaron algunas proteínas de *G. lamblia* potencialmente responsables de la inducción de una respuesta inmune celular. Los anticuerpos monoclonales (hibridomas de células B) generados reconocieron a una banda proteica de *G. lamblia* de masa molecular relativa de  $\pm 71$

kDa (proteína 5G8). Esta proteína fue también reconocida por sueros de ratones infectados y re-infectados. La proteína 5G8 se expresó en la superficie, así como en el interior, de trofozoítos. Adicionalmente, los anticuerpos específicos para esta proteína indujeron fuertemente la aglutinación (> 70-90 %) de trofozoítos de *G. lamblia* *in vitro*. En resumen este trabajo describe la identificación y caracterización parcial de proteínas Inmunogénicas de *G. lamblia*. Se generaron los primeros hibridomas de células T específicos para proteínas de *G. lamblia* descritos, así como, anticuerpos monoclonales específicos para la proteína inmunogénica 5G8 de *G. lamblia* que induce una respuesta inmunológica de tipo humoral, los cuales serán útiles para la caracterización bioquímica e inmunológica para este antígeno del parásito.

## ABSTRACT

*G. lamblia* is the causal agent of human giardiasis and in several animal species. The clinical manifestations of giardiasis are well characterized as symptomatic infections with diarrhea, abdominal pain, flatulence, malabsorption syndrome, and asymptomatic infections. The immune response plays an important role as a biosensor (i.e. antibodies, MHC class II) in *G. lamblia* clearance. However, our knowledge about specific antigens of *G. lamblia* that induce a protective immune response is limited. The main purpose of this study was to identify immunogenic proteins of *G. lamblia* that stimulate an immune response by using biosensors (monoclonal antibodies, mayor histocompatibility complex) in the mouse model. Previously, we generated T and B-cell hybridomas specific to *G. lamblia* (GS/M-83-H7) proteins. We generated T-cell hybridomas (7) specific for *G. lamblia* proteins by fusing T-cells from peyer patches and draining lymph nodes from immunized mice. We identified some immunogenic potentially proteins that could be responsible for the activation of the cellular immune response in the mouse model.

We generated B-cell hybridomas that produced monoclonal antibodies. Most of these moAbs recognized a band of  $\pm 71$  kDa (5G8 protein) wich was also recognized by serum from infected mice. Additionally, antibodies specific to 5G8 protein induced a strong agglutination ( $> 70-90$  %) of trophozoites. In summary, this study describes the identification and partial characterization of an immunogenic protein of *G. lamblia*, that plays an important role as biosensor inducing an immune response. Additionally, we generated the first T-cell hybridomas specific for *G. lamblia* proteins, furthermore we generated a panel of monoclonal antibodies specific to this protein which will be

useful for the biochemical and immunological characterization of this *Giardia* molecule of immunological interest.

## **1. INTRODUCCIÓN**

Los sensores biológicos son dispositivos que utilizan reacciones bioquímicas mediadas por macromoléculas (principalmente proteínas y ADN), organelos o células enteras para detectar los efectos de un compuesto químico mediante señales eléctricas, térmicas u ópticas (fluorescencia)<sup>1</sup>. Estos dispositivos son capaces de detectar un analito de carácter biológico de forma específica y convertir su presencia o concentración en señales que pueden ser fácilmente detectadas. Estos dispositivos tienen una amplia aplicación y se constituyen principalmente por tres componentes: un elemento de reconocimiento (anticuerpos, proteínas receptoras, entre otros), que detecta una molécula del medio donde se encuentren, una señal de traducción que convierte la señal biológica en una señal eléctrica, térmica u óptica (fluorescencia, luminiscencia, colorimetría) y finalmente un procesador de la señal<sup>1,2</sup>. Estas herramientas son ampliamente utilizadas durante el estudio de proteínas (proteómica). El principio fundamental de todos los procesos biológicos es el reconocimiento y la organización molecular. Las macromoléculas pueden interactuar con moléculas de tamaños variables (proteína, péptidos, carbohidratos, entre otros) con un alto grado de especificidad y de alta afinidad<sup>3</sup>. El reconocimiento molecular está regido por interacciones específicas de carácter no covalente. En la asociación de un receptor con su ligando (antígeno-anticuerpo, enzima-sustrato), están involucradas interacciones débiles, las cuales están definidas por energías termodinámicas involucradas en la asociación y selección de un sustrato hacia su receptor, implicando la existencia de un conjunto bien definido de interacciones y requerimientos espaciales entre ambas especies químicas, como

la complementariedad<sup>4,5</sup>. Las principales interacciones no covalentes que participan en el reconocimiento molecular en procesos biológicos son: puentes de hidrógeno, puentes salinos, fuerzas de van der Waals, interacciones electrostáticas, e interacciones hidrofóbicas<sup>5</sup>.

Cuando las interacciones no covalentes se presentan de forma cooperativa pueden existir complejos supramoleculares estables, como el complejo antígeno-anticuerpo (sensor biológico). La interacción de un antígeno con el sitio de unión de un anticuerpo, induce importantes cambios estructurales en el complejo (anticuerpo-antígeno). El ambiente acuoso (polar) permite la generación de una de las principales interacciones débiles, como lo es la interacción hidrofóbica<sup>5</sup>. En los sistemas biológicos, el reconocimiento molecular se lleva a cabo en microambientes acuosos, por lo cual, las interacciones hidrofóbicas son las que rigen dicho reconocimiento. Las interacciones hidrofóbicas son generadas por una tendencia de las moléculas no polares de las cadenas laterales de los aminoácidos a reducir la superficie del contacto termodinámicamente desfavorable con agua. Por consiguiente, el sitio de unión de un anticuerpo y un antígeno se encuentran cubiertos por moléculas de agua, las cuales son desplazadas, debido a la alta afinidad química entre el antígeno y anticuerpo. Otro tipo de interacciones débiles que rigen el reconocimiento molecular de un sistema biológico son conocidas como: fuerzas de van der Waals (dispersiones de London), puentes de hidrógeno, entre otras<sup>5,6</sup>. Este tipo de interacciones débiles en sumatoria son las responsables que una enzima reaccione con su sustrato, que un anticuerpo reconozca a su antígeno,

y las implicaciones de estos eventos en sistemas biológicos son de gran importancia para el desarrollo de una respuesta inmunológica.

El reconocimiento molecular de sensores biológicos en la inmunología es una herramienta importante que permite detectar la presencia de moléculas con secuencias de aminoácidos muy pequeñas (péptidos) y de muy bajas concentraciones, obteniendo como resultado la detección de una respuesta inmunológica inducida. Por lo cual, este estudio está enfocado en la detección e identificación a través de sensores biológicos (anticuerpo), de proteínas de *Giardia lamblia* que inducen una respuesta inmunológica, así como el estudio del reconocimiento molecular de dichas proteínas a la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (CMH II) (sensor biológico) a través de algoritmos como SYFPEITHI<sup>7</sup>.

La identificación de proteínas inmunogénicas de *G. lamblia*, a través de sensores biológicos, sentará las bases moleculares para el mejor conocimiento de los mecanismos inmunológicos y ayudará también en el futuro desarrollo de medidas profilácticas contra la giardiasis.

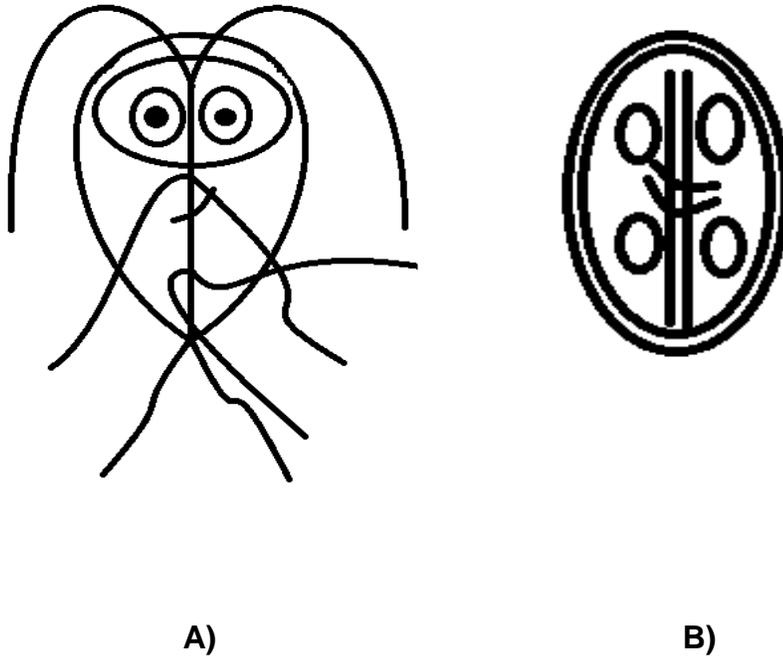
## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Sensores Biológicos**

Los sensores biológicos (biosensores) son híbridos de materiales biológicos, con la capacidad de reconocer a un nivel molecular otras sustancias, acoplados a un traductor electrónico<sup>1</sup>. Estos materiales presentan un amplio rango de aplicaciones (detección de contaminantes ambientales de tierra y agua, detección de gases, en sistemas electrónicos)<sup>2</sup>. En sistemas biológicos, los biosensores son aplicados como materiales de detección, utilizando elementos que presentan alta afinidad como enzimas, receptores celulares, ADN y anticuerpos que pueden detectar diversas moléculas (proteínas) de manera específica. Los fluoróforos o enzimas son usualmente utilizados como señal de detección<sup>1-3,5</sup>.

### **2.2 Características generales de *G. lamblia***

*G. lamblia* es un parásito intestinal que habita la parte alta del intestino delgado. Presenta un ciclo de vida simple, alternando dos formas de vida diferentes, el trofozoíto (Figura 1A) el cual representa el estado vegetativo, ya que coloniza el intestino delgado del hospedero, y el quiste (Figura 1B) que representa el estado infectivo, y esta forma de vida es la que infecta al hospedero.



**Figura 1.- Esquema de *G. lamblia*. A) Trofozoíto y B) Quiste**

*G. lamblia* carece de organelos prominentes, que caracterizan a una célula eucariótica, como mitocondrias y peroxisomas<sup>8</sup>, así como la presencia de retículo endoplásmico (RE). Se ha observado la presencia de aparato de Golgi en *G. lamblia* durante la diferenciación a quiste<sup>8</sup>. Este parásito es considerado como el microorganismo de más temprana división en la línea eucariótica de descendencia. Estas razones hacen atractivo el estudio biológico de *G. lamblia*, obteniendo el conocimiento sobre la temprana evolución de sus estructuras, el transporte o síntesis de proteínas de células superiores eucarióticas, así como sus adaptaciones celulares tardías en su estilo de vida parasítico. Lo anterior ha llevado a secuenciar

por completo el genoma de algunas cepas de *G. lamblia*, convirtiéndolo en un modelo de estudio muy atractivo para distintas líneas de investigación<sup>8</sup>.

### **2.3 Reconocimiento molecular y respuesta inmunológica contra *G. lamblia***

La erradicación de la infección por giardiasis depende de diversos factores, dentro de los más importantes se encuentran, la dosis de ingesta de trofozoítos y el nivel de la respuesta inmune del hospedero debido al reconocimiento molecular de *G. lamblia*. Por tal motivo, se ha investigado la participación de la respuesta innata y adaptativa en los mecanismos de erradicación de la infección tanto en humanos como en modelos animales de experimentación<sup>9</sup>.

#### **2.3.1 Mecanismos inmunológicos humorales contra *G. lamblia***

La respuesta inmunológica humoral es un mecanismo especializado para la eliminación de microorganismos extracelulares y moléculas antigénicas. *G. lamblia* coloniza el duodeno, el cual se encuentra recubierto por mucosas donde la respuesta inmunológica humoral se caracteriza por la producción de inmunoglobulinas del tipo A (IgA) generadas por linfocitos B, las cuales actúan como sensores biológicos, detectando y erradicando a *G. lamblia* del hospedador<sup>10</sup>. En modelos murinos de infección, se producen sensores biológicos (IgA) específicos a proteínas de *G. lamblia*, responsables de la erradicación de la infección<sup>11</sup>. Esta característica ha sido el motivo por el cual la mayoría de los estudios de la respuesta inmune contra *G. lamblia* se han abocado en la respuesta inmune humoral.

Durante la infección las concentraciones de estos sensores biológicos se incrementan (IgA en mucosas, IgM e IgG en suero) por lo que la presencia de linfocitos B (célula productora de anticuerpos) es crítica para la erradicación de la giardiasis. Se ha estudiado el papel importante que juegan estas moléculas durante la infección en ratones carentes de linfocitos B, así como animales deficientes de IgM, IgG e IgA, debido a que se desarrolla la infección de manera crónica<sup>8,12</sup>. En pacientes inmunocomprometidos, que presentan bajos títulos de inmunoglobulinas (hipogammaglobulinémicos), se desarrollan cuadros clínicos prolongados de giardiasis, e incluso una giardiasis crónica<sup>12,13</sup>. Algunos sensores biológicos presentan efectos tóxicos (IgM e IgG) en trofozoítos a través de mecanismos dependientes o independientes del sistema del complemento, eliminando así la infección<sup>14</sup>.

### **2.3.2 Mecanismos inmunológicos celulares contra *G. lamblia***

La respuesta inmunológica celular involucra diversas estirpes celulares, que a través de receptores o sensores biológicos, reconocen con especificidad una molécula antigénica, desempeñando los linfocitos T un papel importante en la eliminación de la infección.

En humanos y en modelos murinos de infección, la presencia de trofozoítos de *G. lamblia* induce la proliferación de linfocitos T en mucosas y sangre periférica y la subsecuente producción de INF- $\gamma$ <sup>15</sup>, por lo cual los linfocitos T CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  son requeridos para la eliminación de la giardiasis<sup>14,15</sup>. La reconstitución de timo con células T de ratones infectados con *G. lamblia* disminuye la carga parasitaria en

intestino, pero aumenta la atrofia de las microvellosidades intestinales<sup>16-18</sup>. En contraparte, se ha estudiado que las atrofas en el intestino del hospedero son desarrolladas por la acción de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (citotóxicos). En individuos con giardiasis sintomática, donde se observaron grandes infiltrados linfocíticos (CD8<sup>+</sup>), especialmente en aquellos que presentaban diarrea y flatulencia. Los autores sugieren que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> están relacionados con las patologías desarrolladas durante la infección<sup>18,19</sup>.

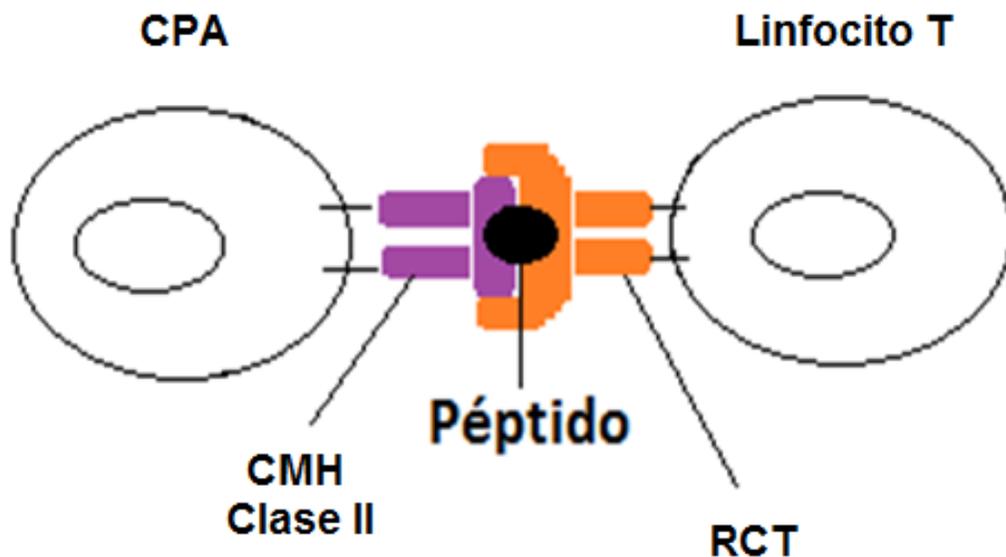
#### **2.4 Reconocimiento molecular por linfocitos T a través del sensor biológico receptor de células T (RCT)**

La interacción RCT, sensor biológico en linfocitos T, con péptidos antigénicos presentes en el sensor biológico (CMH), constituye un proceso definitivo para que se lleve a cabo una respuesta inmunológica del tipo celular<sup>20</sup>.

Los mecanismos de defensa del organismo se activan al ingresar al hospedero agentes extraños o sus productos. En la respuesta inmunológica celular los linfocitos B y T están profundamente involucrados. Las células B se activan a través de su sensor biológico RCB (receptor de células B) con el antígeno en forma nativa y desencadenan una respuesta inmunológica humoral, mientras que las células T no tienen contacto de esta forma con el antígeno, sino que necesitan el apoyo de células especializadas en el procesamiento y presentación de antígeno, llamadas células presentadoras de antígeno profesionales (CPA). Las CPA reconocen proteínas antigénicas del parásito, también a través de sensores biológicos, e inician el procesamiento de las mismas hasta exponerlas en su

superficie celular unidas a los sensores biológicos CMH (clase I o II), para el posterior reconocimiento por parte de los linfocitos T a través de su RCT, actuando como un sensor biológico. El reconocimiento molecular de péptidos, es un evento esencial que da inicio a una respuesta inmune celular. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> reconocen antígenos de tamaño relativamente cortos (8-11 aminoácidos), en fragmentos de proteínas (péptidos) unidos al sensor biológico CMH (clase I), mientras que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> reconocen antígenos de mayores longitudes unidos al sensor biológico CMH clase II (12-25 aminoácidos) (Figura 2). Los primeros estudios cinéticos de las interacciones péptido-CMH revelaron que muchos péptidos diferentes se unen con moderada o alta estabilidad a cualquier CMH dado, con tiempos medios de minutos a meses para la disociación del péptido<sup>21</sup>.

Análisis estructurales (cristalografía de rayos X) del complejo péptido-CMH (I-A<sup>k</sup>/HEL) han revelado diversos elementos estructurales únicos para la molécula del CMH clase II. Así como han revelado la estructura de dichas moléculas [CMH (clase I y II)] y la forma en que éstos interaccionan con los péptidos presentados<sup>22</sup>.



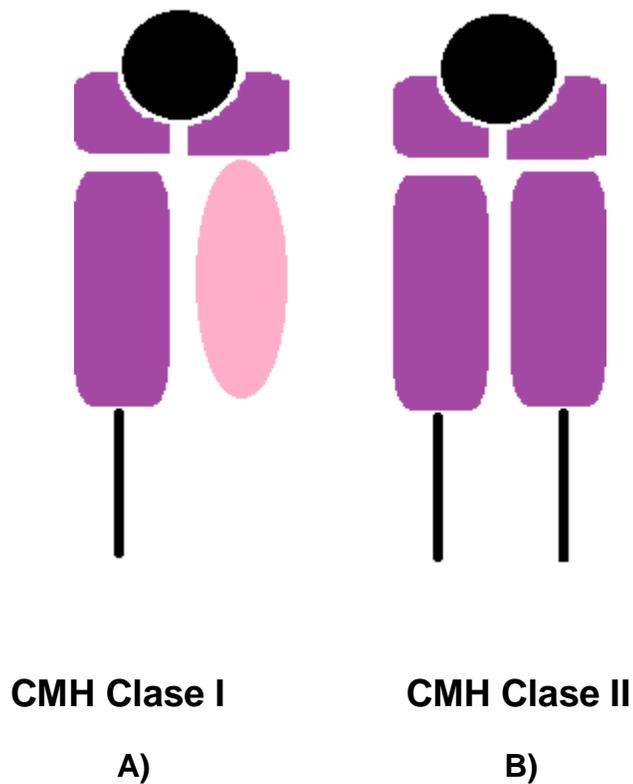
**Figura 2.- Esquema de procesamiento y presentación de antígeno.** Las CPA, presentan los péptidos inmunodominantes por medio de las moléculas del CMH clase II a los linfocitos T CD4+ a través del RCT.

Las moléculas del CMH clase I son expresadas ubicuamente en las estirpes celulares nucleadas. En contraste, las moléculas del CMH clase II son expresadas en células especializadas como las CPA [linfocitos B, células dendríticas (CD) y macrófagos] y en menor proporción en otros tipos celulares como: fibroblastos, células endoteliales de intestino, mastocitos, entre otros.

Los sensores biológicos del CMH clase I y II son proteínas de membrana integrales de tipo I. Presentan tres regiones, una citoplasmática, una transmembranal y por último la región extracelular, constituida por 2 cadenas: la  $\alpha$  y  $\beta$ -2 microglobulina (CMH clase I), la  $\alpha$  y  $\beta$  (CMH clase II). En la región  $\alpha$  y  $\beta$  del

CMH clase II se localiza la hendidura de unión a péptidos, la cual presenta residuos polimorfos, que son aminoácidos que varían entre los diferentes alelos del CMH.

Los sensores biológicos del CMH clase I (Figura 3A) son glicoproteínas de membrana que presentan una cadena  $\alpha$  pesada (44 kDa) de tres subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ . A dicha cadena se le asocia un segundo polipéptido denominado  $\beta$ -2 microglobulina (12 kDa) el cual es codificado por un cromosoma distinto al del *mhc*. Este dímero se estabiliza al asociarse un péptido antigénico y son reconocidas por el RCT en los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Los sensores biológicos del CMH clase II (Figura 3B) son también glicoproteínas de membrana de tipo I, que consisten en dos cadenas, la cadena  $\alpha$  (de 32-34 kDa) y  $\beta$  (de 28-29 kDa), unidas entre sí de manera no covalente por puentes disulfuro, y son reconocidas por los RCT de los linfocitos CD4<sup>+</sup>, jugando un papel importante como sensores biológicos, detectando la presencia de péptidos provenientes de proteínas inmunogénicas de *G. lamblia*. Los segmentos aminoterminales  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  (así como los segmentos  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  del CMH I) de las cadenas, interactúan para formar la hendidura de unión a péptidos, ya que es el área donde se localizan residuos polimórficos, tanto en su interior como en su alrededor. Los segmentos  $\alpha 2$  y  $\beta 2$ , están plegados en dominios de inmunoglobulina y no son polimórficos<sup>23</sup>.



**Figura 3.- Representación esquemática de los sensores biológicos del complejo mayor de histocompatibilidad.** A) CMH clase I, B) CMH clase II. Las moléculas del CMH son glicoproteínas de membrana que presentan tres regiones, una extracelular donde se encuentra el sitio de unión a péptidos, una transmembranal e intracelular. Las principales diferencias entre las moléculas de clase I y II radican en su estructura y presentación de péptidos.

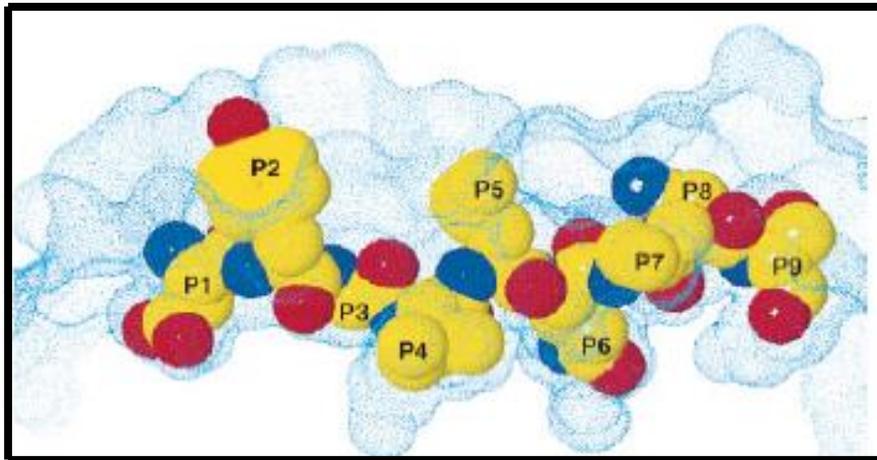
En estudios cristalográficos y de interacción del complejo sensor biológico (CMH)-péptido se ha demostrado similitud en las conformaciones de la unión peptídica a las moléculas de CMH clase I y II. Las moléculas de clase I interactúan con las terminales amino y carboxílicas del péptido unido. Estas terminaciones junto con el péptido unido al sensor biológico CMH restringen la longitud de los péptidos de 8 a 10 aminoácidos<sup>22</sup>.

Sin embargo, el sitio de unión a péptidos de las moléculas de clase II es abierto en las dos terminaciones, y las interacciones de los péptidos son más difusas debido a que es permitido que exista mayor variabilidad en la longitud (10-28 aminoácidos). Estos biosensores se han caracterizado en términos a su funcionalidad en mecanismos inmunológicos, debido a que se unen a fragmentos de antígenos. Esta interacción activa a células T específicas a antígenos para generar una respuesta inmunológica en contra del antígeno patrón, de tal forma que un pequeño fragmento de antígeno induce una respuesta inmunológica en contra de un antígeno completo. Esta idea es implementada en el desarrollo de vacunas en base a los péptidos antigénicos responsables de generar una respuesta inmunológica<sup>24</sup>.

La afinidad de unión de los sensores biológicos del CMH clase II con los péptidos, depende de las interacciones entre los residuos de las cadenas laterales de los aminoácidos con ciertos sitios específicos del surco de unión a péptidos de la molécula del CMH. Las interacciones químicas gobernadas en estas uniones son de tipo reversible debido a la naturaleza del comportamiento de asociación y disociación del complejo RCT-péptido-CMH (RCT-p-CMH), siendo los principales

tipos de unión: puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals y en menor proporción los puentes salinos. Se ha determinado la estructura química del sensor biológico CMH y se ha encontrado un sitio de gran polimorfismo que interacciona con los péptidos que le son presentados a las células T; este surco de unión a péptidos está conformado por cinco bolsillos (“pockets”) esenciales para la asociación de los péptidos (P1, P3, P4, P6, P7 y P9), los cuales preferencialmente aceptan residuos con características particulares como lo son el tamaño apropiado, hidrofobicidad y cargas eléctricas, lo cual trae como resultado la unión del péptido al biosensor con la combinación satisfactoria de la preferencia de cada bolsillo de unión. Los bolsillos P1, P4, P6, P7 y P9 interactúan con las cadenas laterales de los aminoácidos, mientras que los bolsillos P2, P5 y P8 interactúan con el RCT<sup>22</sup> (Figura 4). El primer aminoácido del sitio de unión a péptidos, es el P1, el cual presenta una fuerte preferencia por el ácido aspártico. Según estudios cristalográficos, este ácido embona perfectamente en el sitio P1 del CMH haplotipo I-A<sup>K</sup> <sup>22</sup>. El P1 es el de mayor relevancia en la interacción CMH-péptido debido a que, al inducir sustituciones del ácido aspártico en P1 por asparagina causa cambios desfavorables en la unión peptídica. El P4 no está tan restringido como P1 e indistintamente prefiere residuos hidrofóbicos (isoleucina, valina y leucina) y tolera un gran número de sustituciones, sin interferir en la unión peptídica. El P6 es el segundo sitio con mayor restricción en cuanto a preferencias de residuos, la cual consiste predominantemente en ácido glutámico y residuos de glutamina. El P7 presenta poca restricción, y gran diversidad de residuos se han encontrado en este sitio. Finalmente, el P9 preferentemente acepta residuos pequeños, comúnmente

serina o treonina<sup>22</sup> (Figura 4). El entendimiento de la interacción péptido-sensor biológico (CMH) tiene gran interés debido a que es útil durante el desarrollo de vacunas, así como el entendimiento del plegamiento e interacción de macromoléculas.



**Figura 4.- Representación esquemática de los bolsillos de unión del sensor biológico CMH clase II (haplotipo I-A<sup>K</sup>). Superficie de la hendidura de unión a péptidos del complejo pCMH<sup>22</sup>.**

## 2.5 Procesamiento y presentación de antígeno

Los péptidos reconocidos por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son en su mayoría derivados de proteínas exógenas que requieren cierta forma de procesamiento antes de ser unidos al sensor biológico (CMH Clase II)<sup>25-28</sup>. El antígeno soluble es internalizado a las CPA por diferentes vías como endocitosis mediada por receptores, macropinocitosis, entre otras. En la región citosólica se forman vacuolas que contienen el antígeno soluble capturado, el cual sufre un desdoblamiento por la reducción de los puentes disulfuro presentes en las diferentes proteínas<sup>27</sup>. De manera consecutiva, se presenta una degradación del antígeno por la acción de proteasas (principalmente cisteinil, asparatinil) a pH bajo.

Las moléculas del sensor biológico (CMH) son sintetizadas *de novo* en el retículo endoplásmico (RE), en donde son ensambladas y transportadas al aparato de Golgi, bajo la regulación de moléculas accesorias incluyendo la cadena invariante (Ii)<sup>29</sup>. El complejo CMH-Ii es transportado en endosomas, incluyendo compartimentos multilamelares y multivesiculares o en fagolisosomas. Este complejo, junto con moléculas accesorias como el HLA-DM y HLA-DO, regula la carga de los péptidos a las moléculas CMH clase II<sup>29</sup>. Dentro de la hendidura de unión a péptidos del sensor biológico CMH clase II, se encuentra asociado un péptido derivado de la cadena invariante llamado CLIP, el cual es disociado por las moléculas HLA-DM y permite la unión de péptidos provenientes de antígenos solubles procesados. Esta unión es llevada a cabo en endosomas que son exocitados en la superficie celular para la presentación a linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

El entendimiento del reconocimiento molecular en una respuesta inmunológica durante la giardiasis, permite el conocimiento de los principales mecanismos celulares y moleculares que intervienen en la eliminación de la infección. La identificación de proteínas inmunogénicas apoyará el mejor entendimiento de las interacciones *G. lamblia*–hospedero, y sentará las bases moleculares que ampliarán el conocimiento acerca de los mecanismos inmunológicos relacionados durante una infección por *G. lamblia*.

## **2.6 Proteínas inmunogénicas de *G. lamblia* reconocidas por modelos de infección murino**

El conocimiento acerca de los mecanismos inmunológicos involucrados en el control de la infección por *G. lamblia*, es poco profundo. La respuesta inmunológica (celular y humoral) juega un papel muy importante en el control de infecciones por *G. lamblia*. Hasta el momento, no se ha desarrollado una vacuna específica contra la giardiasis en humanos. Un paso esencial en el desarrollo de una vacuna efectiva es que ésta, controle y prevenga efectivamente la infección, por lo cual el conocimiento de las proteínas inmunogénicas de *G. lamblia* es importante para el desarrollo de las mismas.

### **2.6.1 Proteínas inmunogénicas reconocidas por sensores biológicos de la respuesta inmune humoral**

Durante las últimas tres décadas se han redoblado esfuerzos para conocer las proteínas inmunogénicas que juegan un papel importante durante la giardiasis. Nuestro grupo de investigación ha enfocado sus esfuerzos en el conocimiento profundo acerca de los mecanismos químicos, inmunológicos y bioquímicos que se desarrollan en la infección por *G. lamblia*. La identificación de proteínas inmunogénicas es un objetivo clave para el desarrollo de vacunas. Uno de los objetivos primordiales ha sido la identificación de proteínas inmunogénicas de *G. lamblia* que induzcan una respuesta inmunológica humoral, así como una respuesta inmune celular. Se ha descrito que en el modelo de infección murino adulto (C3H/HeJ), durante la giardiasis, se generan anticuerpos durante una respuesta inmunológica secretora (IgA fecales) y sistémica (IgG sérico) en la infección primaria y secundaria por *G. lamblia*<sup>30</sup>. Los ratones infectados por *G. lamblia* muestran elevaciones en los niveles de anticuerpos intestinales (IgA) y séricos (IgG) específicos para proteínas de *G. lamblia*, siendo este tiempo en el cual la carga parasitaria en los ratones infectados decrece considerablemente, lo cual sugiere que la respuesta de anticuerpos juega un papel importante durante la erradicación de la infección por *G. lamblia*<sup>30</sup>.

La abundancia relativa detectada de anticuerpos IgA en extractos fecales fue mucho mayor en comparación con la abundancia de anticuerpos IgG; estos resultados son reforzados con el hecho de que *G. lamblia*, siendo un patógeno luminal, habita estrictamente en la mucosa intestinal del intestino delgado (no

invasivo), permitiendo así una mejor estimulación del sistema inmune en mucosas que del sistema inmune periférico. Por medio de análisis por Western-blotting se lograron identificar proteínas con una diversidad de masas moleculares relativas: 48, 55, 63, 71, 86, 106, 131 y 159 kDa. La cepa de *G. lamblia* GS/M-83-H7 expresa constitutivamente la bien caracterizada VSP H7 (71 kDa) y se ha reportado que la respuesta de anticuerpos séricos y sistémicos es dirigida hacia esta proteína<sup>30-33</sup>, por lo cual los resultados inicialmente sugerían que la proteína de 71 kDa fuera VSP H7. Algunas de las proteínas identificadas por espectrometría de masas se muestran en la tabla 1<sup>34</sup>.

#### **2.6.1.1 Generación de sensores biológicos (anticuerpos monoclonales)**

Los sensores biológicos, como los anticuerpos dentro en un sistema biológico, juegan un papel central en la respuesta inmune humoral. Los linfocitos B son células especializadas en la secreción de anticuerpos en plasma sanguíneo y otros fluidos corporales, los cuales reconocen a los antígenos<sup>33</sup>. En la respuesta inmune humoral, los anticuerpos juegan un papel importante como sensores biológicos en la erradicación de la infección por *G. lamblia*<sup>29,34-36</sup>.

Tabla 1.- Proteínas inmunogénicas de *G. lamblia* identificadas por ESI

Proteína	Masa Molecular Relativa (kDa)	No. de Identificación
Nek cinasa	16.0	gi 157436618 gb EDO80832.1
Factor 1 A de iniciación de translocación en eucariotes	18.1	gi 157436484 gb EDO80699.1
$\beta$ - giardina	30.8	gi 2144818 pir  SJGQBG
Enolasa	48.2	gi 157437452 gb EDO81662.1
Aminoacil-histidil dipeptidasa	55.1	gi 157433256 gb EDO77502.1
VSP-H7	56.8	gi 159143 gb AAA18202.1
Cadena pesada de dineína	62.3	gi 157434527 gb EDO78757.1
BiP	72.6	gi 468016 gb AAA19123.1

Proteínas de *G. lamblia* identificadas por ESI-MS/MS provenientes de 2D SDS-PAGE<sup>34</sup>.

Los hibridomas de células B son una herramienta poderosa para la caracterización bioquímica e inmunológica de antígenos, ya que son células inmortales productoras de anticuerpos monoclonales (AcMos) que se generan a partir de la fusión de esplenocitos provenientes de ratones (infectados o inmunizados) con células de mieloma, obteniendo finalmente una célula híbrida productora de AcMos, los cuales funcionan como sensores biológicos. Previamente en nuestro grupo de investigación, se generaron hibridomas de células B específicos para proteínas de *G. lamblia*, a partir de ratones infectados (C3H/HeJ) con la cepa GS/M-83-H7, los cuales produjeron AcMos (1B10, 2C9.D11, 3C10.E5, 3D10, 5G8.B5, 5F4, 4C7, 3C5 y 3C6). Estos anticuerpos son específicos hacia una proteína inmunogénica de *G. lamblia*<sup>37</sup>. La identificación y caracterización de la proteína inmunogénica que reconoce el sensor biológico permitirá ahondar en el conocimiento del desarrollo de la respuesta inmunológica contra el parásito intestinal *G. lamblia*, asimismo nos permitirá sentar las bases moleculares para el futuro desarrollo de una vacuna contra esta parasitosis.

### **2.6.2 Proteínas inmunogénicas reconocidas por sensores biológicos de la respuesta inmune celular**

La identificación de proteínas inmunogénicas durante la infección por *G. lamblia* se ha enfocado mayoritariamente en antígenos específicos que estimulan a linfocitos B. Sin embargo, es muy poca la información encontrada sobre antígenos que induzcan una respuesta en células T. La respuesta inmune celular juega un papel importante en el control de la giardiasis<sup>9,12</sup>.

Se ha observado que en ratones inmunodeficientes o atímicos los linfocitos T CD4+ tienen un papel crítico en el control de la infección por *Giardia*<sup>16</sup>. Los hibridomas de células T son una herramienta ilimitada de células T específicas hacia algún antígeno, se generan a partir de la fusión de linfocitos T activados con células de timoma. Los hibridomas de células T son utilizados para identificar proteínas inmunogénicas, así como para monitorizar el procesamiento y presentación de antígenos de células T a través de los sensores biológicos CMH clase I y II. Los primeros hibridomas de células T específicos para proteínas de *G. lamblia* (9B10, 4D5 y 10G5) descritos en la literatura reconocen proteínas inmunogénicas de diversas masas moleculares relativas (40-46, 65-77, y 90-110 kDa)<sup>37</sup>. Algunos autores han reportado proteínas inmunogénicas de *G. lamblia* que son reconocidas por la respuesta inmune humoral sistémica (IgG) y secretoria (IgA)<sup>4,12,37-40</sup>. Algunos de estos antígenos comparten masas moleculares relativas de los antígenos reportados por Astiazaran et al. (2009)<sup>37</sup>, sugiriendo que la respuesta de células T dependientes de anticuerpos requieren la activación de células B por células T cooperadoras que reconocen al mismo antígeno. Los linfocitos T cooperadores regulan la producción de anticuerpos, así como el isotipo que determinará la función efectora del anticuerpo<sup>36,44,45</sup>.

## 2.7 Proteínas inmunogénicas de *G. lamblia*

Algunos autores han identificado proteínas inmunogénicas de *G. lamblia*, las cuales son reconocidas durante la respuesta inmune sistémica y humoral en humanos y ratones infectados con trofozoítos de *G. lamblia*<sup>13,31,36</sup>. El conocimiento acerca de los antígenos específicos de *G. lamblia* que inducen una respuesta inmune protectora son muy limitados. Algunas de las proteínas identificadas están relacionadas con el metabolismo, movilidad y síntesis de proteínas de *G. lamblia* (Tabla 2).

*G. lamblia* sufre un proceso denominado variación antigénica, y ocurre *in vitro* en todos los aislados<sup>48-50</sup>. Consiste en la variación de la secuencia de aminoácidos de las proteínas presentes en la superficie (VSP<sub>s</sub>, Variable Surface Proteins) de todo el cuerpo de los trofozoítos. Poblaciones derivadas de un solo trofozoíto contienen un pequeño número de individuos expresando una de muchas posibles proteínas variables de superficie, debido a que sólo uno de aproximadamente 200 genes que codifican para proteínas de VSP, se expresa a la vez en la superficie de cada trofozoíto. Esta modificación de VSP ha sido observada cada 6-13 generaciones y su cambio ocurre espontáneamente durante el procesamiento de intercambio de VSP<sup>36</sup>. Algunos autores sugieren que estas moléculas son empleadas para evadir la respuesta inmunológica por parte de *G. lamblia* dentro del hospedero<sup>36</sup>.

Tabla 2.- Principales proteínas inmunogénicas de *G. lamblia*

Proteína	Masa Molecular Relativa (kDa)	Humano			Ratón	
		Svärd SG 2003 <sup>13</sup>	Svärd SG & Téllez A 2005 <sup>44</sup>	Eckmann L 2006 <sup>9</sup>	Faubert 2004 <sup>46</sup>	Müller N 1996 <sup>47</sup>
GTA-1	20	*				
ADI	25	*	*	*		
TSA 417	25	*	*			
β-giardina	27	*		*		
GTA-2	27	*				
SALP-1	27	*				
α-1-giardina	32	*	*	*		
α-2-giardina	33	*		*		
α-7.3-giardina	33	*	*			
OCT	33.5	*	*	*		
α-7.1-giardina	34	*		*		
α-11-giardina	35			*		
α-2-tubulina	36	*		*		
FBA	37	*	*	*		
UPL-1	38	*		*		
CWP-2	39				*	
Enolasa	50	*	*	*		
β-tubulina	55	*	*			
VSP H7	72					*

Otras moléculas inmunogénicas son las proteínas de choque térmico (HSP, Heat Shock Protein), las cuales se liberan en respuesta a estrés por cambios bruscos de temperatura y pH como ocurre en estómago e intestino delgado. Algunas de las proteínas descritas se encuentran relacionadas en diversos procesos dentro de la biología de *Giardia*, como lo son las  $\alpha$ -1 giardinas, 7 giardinas,  $\beta$ -giardina,  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina, localizándose en el citoesqueleto y flagelos. También se han reportado otras relacionadas con funciones metabólicas como la  $\alpha$ -enolasa, fructosa-1,6-bisfosfato aldosa, arginina deaminasa y la ornitina carbamoil transferasa<sup>8,46-51</sup>.

Esta diversidad de proteínas encontradas en *G. lamblia* provoca que entre cada aislado de *G. lamblia* exista una diferencia en el perfil electroforético durante una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)<sup>52</sup>. Debido a las diferencias bioquímicas entre los diferentes aislados, resulta difícil la comparación de resultados entre distintas cepas.

## **2.8 Espectrometría de masas**

Espectrometría de masas (EM) es una técnica analítica que provee de información cualitativa (estructura, secuencia de aminoácidos) y cuantitativa (masa molecular o concentración) acerca de una muestra<sup>53-55</sup>. La fuente de ionización a utilizar principalmente para proteínas es ionización por “electrospray” (ESI-MS, Electrospray Ionization Mass Spectrometry). El análisis por ESI, se puede hacer provocando una ionización positiva o negativa. Se selecciona la polaridad de los iones que se desea analizar mediante el voltaje del capilar. Permite la obtención del

ión molecular, y si se desea obtener una fragmentación, se puede inducir aumentando el voltaje en la punta del cono del capilar. Este proceso se utiliza con frecuencia en espectrometría de masas en tándem. La ESI de especies poliméricas, proporciona espectros que contienen una serie de múltiples iones cargados del siguiente tipo:  $[M+nH]n+$  y  $[M-nH]n-$ <sup>53</sup>. Las moléculas de interés son introducidas a una fuente de ionización del espectrómetro de masas, donde son ionizados para adquirir una carga positiva o negativa. Los iones viajan a través de un analizador de masas y llegan a diferentes partes del detector de acuerdo a la relación masa/carga ( $m/z$ )<sup>53</sup>. El analizador cuadrupolar, es más frecuentemente utilizado en espectrometría de masas en tándem, consiste en cuatro barras paralelas, separadas entre ellas, a las que se aplica un potencial de corriente continua, sobre el que se superpone un potencial de radiofrecuencia. Los iones atraviesan el interior de las barras y el campo creado en ellas actúa a modo de filtro, determinando qué iones alcanzarán el detector<sup>53-55</sup>. Sólo algunos iones alcanzarán el detector dependiendo del campo de radiofrecuencia aplicado así como de su relación  $m/z$ . Después de que los iones hacen contacto con el detector, se generan señales que son grabadas en una computadora, donde se observa un espectro. El espectro resultante es un gráfico que representa la abundancia relativa de los iones producidos (% de abundancia relativa de los iones producidos) respecto de su relación masa/carga ( $m/z$ )<sup>53</sup>. La señal correspondiente a un ión aparece en forma de varios picos que corresponden a la distribución estadística de los distintos isótopos del ión. Al utilizar espectrometría de masas en tándem (MS/MS) se utilizan varios espectrómetros de masas, el primer espectrómetro sirve para seleccionar un

ión determinado entre los iones producidos en el sistema de ionización. A partir del espectro de masas generado, se selecciona el ión precursor. Se introduce en una cámara de colisión, en la que se bombea un gas. Los iones moleculares son acelerados por un potencial eléctrico hasta obtener una energía cinética alta y en la cámara colisionan con las moléculas del gas (argón)<sup>53-55</sup>. En la colisión parte de la energía cinética se transfiere al péptido, y se fragmenta el ión precursor en pequeños fragmentos neutros y otros iones. Estos fragmentos del ión precursor, entran en el segundo espectrómetro de masas donde son analizados para dar un nuevo espectro de masas. La información obtenida por espectrometría de masas es esencialmente cualitativa, como es la determinación de masa molecular o la información sobre la estructura a partir de los fragmentos obtenidos, pero también se pueden realizar análisis cuantitativos utilizando patrones internos o externos con límites de detección desde picomoles a femtomoles. El ión molecular (M+) brinda la información más valiosa en el espectro de masas. Su masa y composición elemental indican las fronteras dentro de las cuales se tienen que encontrar los fragmentos estructurales que se detecten en el espectro de masas<sup>53</sup>.

En la proteómica, la espectrometría de masas es una herramienta utilizada para identificar moléculas pequeñas, como péptidos. La secuenciación de péptidos, en procesos biológicos e inmunológicos es de gran importancia para el desarrollo de vacunas<sup>55</sup>.

## **2.9 Predicción de epítopes que estimulan una respuesta inmune celular y humoral**

Las vacunas hoy en día siguen siendo el instrumento de profilaxis contra enfermedades infecciosas, con innumerables beneficios a la humanidad<sup>56</sup>. La predicción de epítopes (epítotos o epitotos), pequeña secuencia de aminoácidos reconocida por el sistema inmunitario, a través de la bioinformática es un método que nos permite monitorizar epítopes potenciales para células T, basándose en la unión al sensor biológico CMH clase I o CMH clase II<sup>56,57</sup>. La predicción más certera acerca de los péptidos que se unen al CMH es fundamental para la identificación de epítopes de células T, así como, para el éxito en el diseño de vacunas basadas en péptidos o proteínas. Uno de los algoritmos frecuentemente utilizados es SYFPEITHI<sup>7</sup> ([www.syfpeithi.de](http://www.syfpeithi.de)), que se basa en la predicción de epítopes que se unen al sensor biológico (CMH clase II) con mayor afinidad química, basándose en las características químicas de las cadenas residuales de los aminoácidos que constituyen a los péptidos generados, así como los mismos requerimientos químicos del sitio de unión a péptidos del sensor biológico CMH clase II<sup>7</sup>. El reconocimiento molecular es un proceso entre un ligando y su sensor (antígeno-anticuerpo, péptido-CMH) y juega un papel muy importante durante el desarrollo de una respuesta inmunológica. El caracterizar químicamente estos péptidos ayudará a sentar las bases moleculares<sup>57</sup> y celulares para el futuro desarrollo de medidas profilácticas contra la giardiasis.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Los sensores biológicos son herramientas con múltiples aplicaciones, en la medicina son utilizados en la detección de moléculas de agentes patógenos como *G. lamblia*. La giardiasis es la infección gastrointestinal por el protozooario de mayor importancia epidemiológica a nivel mundial. El estado de Sonora se ha ubicado entre los primeros lugares con prevalencia de giardiasis. Los programas de erradicación de infecciones, como la giardiasis, se ven obstaculizados debido al poco conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el control y eliminación de la misma. En la Universidad de Sonora se han realizado estudios de investigación sobre la infección por *G. lamblia*, donde se ha logrado la caracterización parcial de proteínas inmunogénicas de *G. lamblia* que inducen una respuesta inmunológica, a través del uso de sensores biológicos con la finalidad de sentar las bases moleculares para poder profundizar más en el conocimiento de los mecanismos involucrados en la relación huésped-parásito.

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Generar y aplicar sensores biológicos (anticuerpo monoclonal, molécula principal de histocompatibilidad clase II) para la identificación de epítopes inmunodominantes de proteína de *G. lamblia* que estimulan una respuesta inmunológica.

##### **4.1 Objetivos Particulares**

1. Caracterizar parcialmente proteínas inmunodominantes de *G. lamblia* específicas para hibridomas de células T.
2. Generar anticuerpos monoclonales (sensores biológicos) específicos para proteínas inmunodominantes de *G. lamblia* en un modelo murino de infección.
3. Caracterizar bioquímica e inmunológicamente la proteína de *G. lamblia* que reconoce el sensor biológico (anticuerpo monoclonal) 5G8.B5.
4. Identificar los epítopes inmunodominantes de *G. lamblia* que induzcan una respuesta inmunológica de tipo celular y humoral por medio de bioinformática.
5. Evaluar la capacidad aglutinante *in vitro* del anticuerpo monoclonal en trofozoítos de *G. lamblia*.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Cultivo de *G. lamblia***

Se utilizaron cultivos axénicos de trofozoítos de *G. lamblia* [GS/M-83-H7 y 5G8 (+)] conservados en medio de cultivo TYI-S-33, suplementado con NBCS (suero de ternera recién nacida) al 10% y antibióticos<sup>58</sup>. Se incubaron a 37°C en condiciones microaerofílicas (ver anexo 1).

### **5.2 Animales de experimentación**

Se utilizó la cepa singénica C3H/HeJ de ocho a catorce semanas de edad, adquiridos en The Jackson Laboratories (Maine, USA). Los animales fueron mantenidos en el bioterio del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad de Sonora (DIPA), con fotoperíodos de 12 horas a 25°C y alimentados con una dieta comercial para ratones. Esta cepa de ratón es susceptible a la infección por *G. lamblia* clona GS/M-83-H7<sup>58</sup>. El manejo de los animales en experimentación, se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

### **5.3 Obtención de extractos antigénicos solubles de *G. lamblia***

Los antígenos solubles de *G. lamblia* se obtuvieron por el método de Gottstein *et al.* (1990)<sup>31</sup> con ligeras modificaciones. Trofozoítos provenientes de cultivos confluentes fueron cosechados durante su fase logarítmica y enfriados en hielo por

15 min. Cien millones de trofozoítos fueron lavados tres veces con una solución salina de fosfatos estéril (PBS, phosphate buffer saline) y se resuspendieron en 1.5 mL de PBS, y fueron congelados tres veces (nitrógeno líquido) y descongelados a TA. Después, se sometieron a 30 ciclos (2 min) de sonicación (Brandon sonifier 250, Shelton, CT, USA) en presencia de inhibidores 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). El detrito celular fue removido por centrifugación (10 000 g por 30 min). La concentración de proteína de la preparación de antígeno soluble fue determinada por el micrométodo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) (ver anexo 2).

#### **5.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE**

El análisis electroforético de las proteínas de los extractos antigénicos de *G. lamblia* se llevó a cabo en geles de poliacrilamida (12%), usando protocolos estándares de electroforesis (ver anexo 3). Esta técnica se utilizó para observar el patrón electroforético característico de la cepa GS/M-83-H7 de *G. lamblia* y determinar la pureza de la extracción, para posteriormente determinar la concentración por el micrométodo de Bradford (ver anexo 4).

## 5.5 Cultivo de hibridomas de células B y T

Previamente en nuestro laboratorio se generaron hibridomas de células B y de células T específicos para proteínas de *G. lamblia*. Los hibridomas de células T se generaron a partir de ratones (C3H/HeJ) inmunizados en los cojinetes plantares con el extracto proteico de trofozoítos de *G. lamblia* (GS/M-83-H7) (100 µg del extracto proteico). Se preparó una suspensión celular a partir de nódulos linfáticos de ratones después de 7 días de inmunización. Después de 72 h de re-estimulación *in vitro* con el extracto proteico de *G. lamblia* (5 µg/mL), los linfocitos T fueron fusionados con el timoma BW5147 $\alpha\beta^-$ , obteniéndose hibridomas de células T específicos para proteínas de *G. lamblia*. Los viales se seleccionaron en base a su sensibilidad antigénica.

Los hibridomas de células B se generaron a partir de ratones (C3H/HeJ) infectados con la cepa GS/M-83-H7<sup>31</sup>. Ratones de 8 a 14 semanas de edad fueron infectados y re-infectados utilizando una cánula para alimentación forzada infectando vía intragástrica con  $5 \times 10^6$  trofozoítos de *G. lamblia* (GS/M-83-H7) y sacrificados por dislocación cervical. Se extrajeron células de bazo y se fusionaron con el mieloma P3 x 63.Ag8. Se generaron hibridomas de células B, productores de anticuerpos monoclonales (AcMos) específicos para proteínas de *G. lamblia*. De los hibridomas generados se seleccionó el hibridoma de células B 5G8.B5, con base en la capacidad de producir grandes cantidades de AcMo.

Los hibridomas de células B y T se mantuvieron con medio de cultivo modificado de Dulbecco's (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Sigma, St. Louis, MO, USA), suplementado con suero fetal bovino (SFB) (GIBCO Invitrogen) al 5%, a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> (ver anexo 5).

### **5.6 Reconocimiento antigénico del sensor biológico (anticuerpo monoclonal) mediante Western-blotting**

Proteínas solubles de *G. lamblia* fueron separadas por SDS-PAGE (12%) bajo condiciones reductoras modificadas. El extracto proteico de *G. lamblia* (500 µg) se mezcló con un volumen igual de solución reguladora de muestra 2X modificada (0.2% SDS, 0.2% 2-mercaptoetanol). Las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa por 20 min, usando un sistema de electrotransferencia semi-seco (Owl HEP-1, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) con una corriente de 120 mA. Las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas por 1 h a TA con PBS al 5% de leche en polvo libre de grasas y 1% de albúmina de suero bovina (BSA, bovine serum albumin) TA. Después del bloqueo, las membranas fueron incubadas con suero de ratón (pre-infección, infección y re-infección, diluido 1:25), suero de ascitis anti-VSPH7 (AcMo G10/4), AcMo 5G8.B5 y anticuerpos de control de isotipo [IgG2b, (Sigma, St. Louis MO, USA) e IgG2a 40F], a una concentración de 5 µg/mL, por una hora a TA. Después de 5 lavados con PBS las membranas fueron incubadas con anticuerpo de cabra específico a IgG de ratón conjugado a HRP

(diluido 1:7500 con BFS-0.1% BSA) (Sigma, St. Louis MO, USA), por 1 h a TA. Las membranas fueron lavadas y reveladas usando quimioluminiscencia [kit de SuperSignal West Pico Chemoluminescent Substrate kit (Thermo scientific, Rockford, IL, USA)] (ver anexo 6).

### **5.7 Ensayo de inmunoadsorción de trofozoítos de *G. lamblia***

Una placa de seis pozos (Corning, USA) fue cubierta con una solución del AcMo 5G8.B5 a una concentración de 25 µg/mL en PBS estéril por 1 hora a 37°C. Los pozos fueron bloqueados con PBS-BSA 1% por 1 h a 37°C. Después de cinco lavados con PBS frío estéril,  $2 \times 10^6$  trofozoítos de *G. lamblia*, previamente incubados a 4°C, se resuspendieron en 1 mL de PBS-BSA 1% y se adicionaron a cada pozo incubándose por 20 min a 4°C. Después de cinco lavados con PBS frío estéril, 2 mL de medio TYI-S-33 suplementado con NBCS al 10% fue adicionado a los pozos y se incubó por 10 min a 4°C. Las células adheridas se cosecharon y cultivaron con medio TYI-S-33 (NBCS 10%) (ver anexo 7).

### **5.8 Ensayo de aglutinación de trofozoítos de *G. lamblia***

Dos millones de trofozoítos fueron adicionados a una placa de seis pozos (Corning, USA) e incubados a 4°C por 1 h en agitación constante, con diferentes concentraciones del AcMo 5G8.B5 y del anticuerpo control de isotipo (0, 0.625, 1.2,

2.5, 5 y 10 µg/mL) en PBS frío. La aglutinación en los trofozoítos fue visualizada por microscopía óptica (ver anexo 8).

### **5.9 Análisis por citometría de flujo de trofozoítos de *G. lamblia***

Trofozoítos de *G. lamblia* fueron fijados por 30 min con 1% de paraformaldehído (Sigma, St. Louis MO, USA) en 0.05% de NaN<sub>3</sub>-DMEM (Sigma, St. Louis MO, USA) a TA. Después de dos lavados con PBS frío, los trofozoítos se permeabilizaron por 5 min con 0.1% de Triton X-100 (Sigma, St. Louis MO, USA) a TA. En algunos casos los trofozoítos no fueron permeabilizados (tinción de superficie celular). Seguidos de dos lavados con PBS frío, las células fueron incubadas por 1 h con el AcMo 5G8.B5 (5 µg/mL) o con el anticuerpo control de isotipo (5 µg/mL) a 4°C. Después de tres lavados con PBS frío, los trofozoítos fueron incubados con el anticuerpo de cabra específico a IgG de ratón conjugado a FITC (diluido 1:200 con 0.05% de NaN<sub>3</sub>-DMEM) (Sigma, St. Louis, MO, USA). Posterior a tres lavados con PBS frío los trofozoítos fueron colectados usando un citómetro de flujo (Canto II FACS, Becton Dickinson, CA, USA) (Ver anexo 9).

### **5.10 Microscopía confocal de trofozoítos de *G. lamblia***

Trofozoítos de *G. lamblia* obtenidos a partir de cultivos confluentes se lavaron con PBS frío bajo condiciones de esterilidad. Las células se fijaron en una laminilla por 15 min con paraformaldehído al 3.7%. Para bloquear los sitios libres, la laminilla se colocó en una solución de PBS con leche al 1% y SFB al 5% por 1 h. Después de

tres lavados con PBS frío, las laminillas se tiñeron (tinción superficial o tinción intracelular) en una cámara de humedad usando los AcMos 5G8.B5 (IgG2b) y anticuerpo control de isotipo (IgG2b), por 1 h a una concentración de 5 µg/mL. Después de dos lavados con PBS frío, las laminillas se incubaron por 1 h con el anticuerpo de cabra específico a IgG de ratón conjugado a FITC (diluido a 1:100) (Sigma, St. Louis, MO, USA) (ver anexo 9). Las laminillas teñidas fueron preservadas con medio de montaje (Vectashield) y analizadas en microscopía confocal (TCP-SP2 Confocal Lasser Scaning microscope; Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania). Las muestras fueron observadas a través de un lente de inmersión (100 X) plan apocromático (NA:1.32).

### **5.11 Caracterización y purificación de la proteína inmunogénica 5G8 de *G. lamblia***

Con la finalidad de aislar y purificar la proteína 5G8, se realizó una cromatografía de afinidad. Se purificó el AcMo 5G8.B5 (ver anexo 10) y se acopló a esferas de sefarosa 4B (Sigma, Cyanogen Bromide Activated Sepharose 4B) (ver anexo 11). A partir de un cultivo axénico de trofozoítos 5G8 (+) se generó un extracto proteico (50 mg), el cual se incubó por 2 hr a 4°C con el anticuerpo acoplado a las esferas. La proteína aislada se eluyó por cambio de pH. Para poder confirmar el aislamiento de la proteína 5G8 se realizaron ensayos de Western-blotting utilizando el AcMo 5G8.B5 (ver anexo 6). A partir de los geles de SDS-PAGE y de las membranas de nitrocelulosa provenientes de Western-blotting, se generó un corte de la banda

correspondiente a  $\approx 71$  kDa. Las muestras provenientes de SDS-PAGE se redujeron con ditioneitol (DTT, Dithiothreitol) (10 mM) y fueron digeridas con tripsina (12.5 ng/mL), y secadas a TA, para finalmente ser cargadas al equipo de HPLC. Las bandas de nitrocelulosa se degradaron enzimáticamente con tripsina. Posteriormente, las muestras fueron resuspendidas en acetonitrilo al 2% y ácido fórmico al 0.1% y secadas al vacío para ser analizadas por un espectrómetro de masas.

## **5.12 Espectrometría de masas**

El análisis de espectrometría de masas (EM) se llevó a cabo utilizando un sistema de HPLC Micropore (Surveyor, Thermo, San Jose, CA), y un ESI-MS/MS (Electrospray tandem mass spectrometer) LCQ Deca (Finnigan, San Jose, CA). Se empaclaron columnas (6 cm x 100 mm) con resina Zorbax C18, 100 Å, 5  $\mu$ m, a una presión de 500 psi, dentro de columnas con puntas para “electrospray” hechas de sílica fundida ESI. Se aplicó un voltaje de 1.8 kV utilizando un electrodo de oro. Las muestras fueron introducidas a la columna analítica utilizando un inyector automático Surveyor (Topógrafo, Thermo, San Jose, CA). El eluyente de la columna de HPLC fue directamente sometido a la fuente de ionización de electrospray de un espectrómetro de masas Thermo LCQ Deca con trampa de iones.

Los péptidos fueron eluidos en un gradiente utilizando ácido fórmico al 0.1% (solución A) y ácido fórmico con 0.1% de acetonitrilo (solución B), a un flujo de 500 nL/min. La columna inicialmente se lavó con la solución A por 10 minutos, después los péptidos fueron eluidos en un gradiente lineal de solventes de 0 a 50% de

solución B en un intervalo de 60 minutos, seguido de 50-98% de solución B por 5 minutos y después un lavado de 5 minutos con 98% de solución B. Se utilizó el sistema computacional Xcalibur para realizar el reconocimiento automático de los picos, el escaneo de iones hijos a partir de los tres más intensos. Se analizaron los picos de acuerdo a: la masa 400-1500 amu, MS/MS del ión más abundante del escaneo, MS/MS del segundo ion más abundante y MS/MS del tercer ión más abundante. Los datos de MS/MS fueron analizados utilizando el sistema computarizado SEQUEST (Bioworks 3.1, Thermo). Los espectros obtenidos fueron comparados contra secuencias de proteínas de *G. lamblia*<sup>59</sup> (www.ncbi.nlm.nih.gov). Los espectros se compararon contra otras bases de datos de contaminantes comunes de laboratorio. Se consideraron las modificaciones de los péptidos por oxidación de metionina y carbamidometilación de cisteína. La tolerancia en los péptidos y las masas de los fragmentos fue de 2.5 y 0.5 Da, respectivamente (ver anexo 12).

### **5.13 Predicción de epítopes potenciales que estimulan una respuesta inmune celular y humoral**

Con la finalidad de predecir epítopes potenciales de proteínas inmunogénicas reconocidas durante la infección por *G. lamblia*, se utilizó la base de datos para ligantes del CMH (bioinformática) SYFPEITHI<sup>7</sup>. Para realizar el análisis se introdujo la secuencia de aminoácidos de la proteína inmunogénica a analizar, el algoritmo arrojó una serie de péptidos que potencialmente pudieran unirse a la molécula del CMH clase II (I-A<sup>k</sup>).

De forma paralela se analizó una proteína control [HEL (Hen Egg Lysozyme)] la cual ha sido caracterizada bioquímica e inmunológicamente<sup>22</sup>, así mismo ha sido utilizada como una proteína antigénica que induce fuertemente una respuesta inmunológica celular<sup>37,58-62</sup>. Se analizaron los péptidos obtenidos para ambas proteínas infiriendo la inmunogenicidad de los péptidos obtenidos para la proteína inmunogénica de *G. lamblia* 5G8.

#### **5.14 Análisis estadístico**

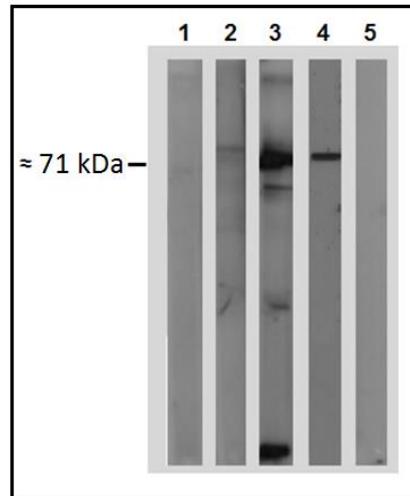
Para analizar las diferencias en la expresión de la proteína 5G8 en la superficie y en el interior de los trofozoítos de *G. lamblia*, se utilizaron los métodos no paramétricos Kruskal-Wallis y Tuckey (Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, (2002)). La significancia estadística fue aceptada cuando  $p < 0.05$ .

## **6. RESULTADOS**

### **6.1 Reconocimiento específico de sensores biológicos (anticuerpos monoclonales) específicos de *G. lamblia***

Para evaluar el reconocimiento antigénico del AcMo 5G8.B5, se realizaron análisis de Western-blot. Se encontraron considerables dificultades al evaluar el reconocimiento del AcMo 5G8.B5, en condiciones estándar de análisis. Optimizando las condiciones de Western-blotting, eventualmente se obtuvieron resultados por medio de la reducción en la concentración de SDS y 2-mercaptoetanol previo a la corrida electroforética (SDS-PAGE). Esas observaciones indican que el reconocimiento del AcMo 5G8.B5 fue sensible a las condiciones de SDS y 2-mercaptoetanol, sugiriendo que este AcMo reconoce epítopes conformacionales en el antígeno 5G8 de *G. lamblia*.

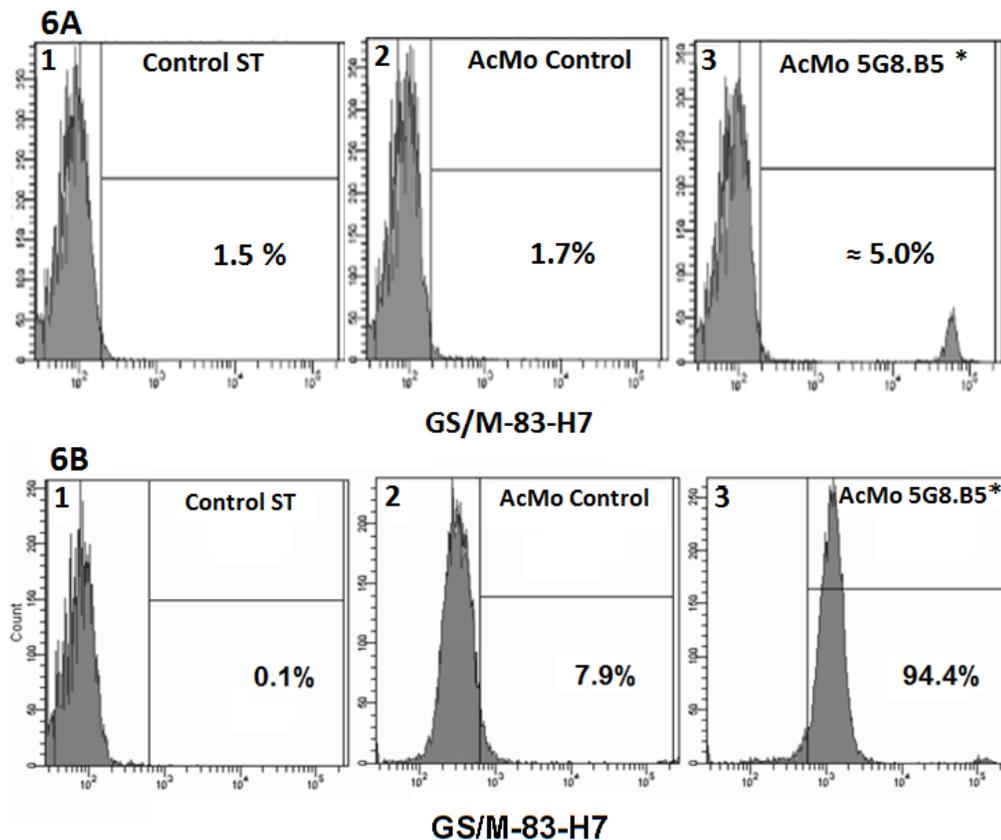
El hibridoma de células B 5G8.B5 reconoció una banda con una masa molecular relativa de  $\approx 71$  kDa. Adicionalmente, esta banda inmunogénica fue reconocida por sueros de ratones infectados y re-infectados (Figura 5).



**Figura 5.- La proteína de *G. lamblia* de 71 kDa es reconocida por sueros de ratones infectados y re-infectados. 1. Suero pre-infección, 2. Suero de ratones infectados [quinta semana post infección (p.i.)], 3. Suero de ratones re-infectados [segunda semana post re-infección (p.r.i.)], 4. AcMo 5G8.B5 y 5. Anticuerpo control de isotipo (IgG2b).**

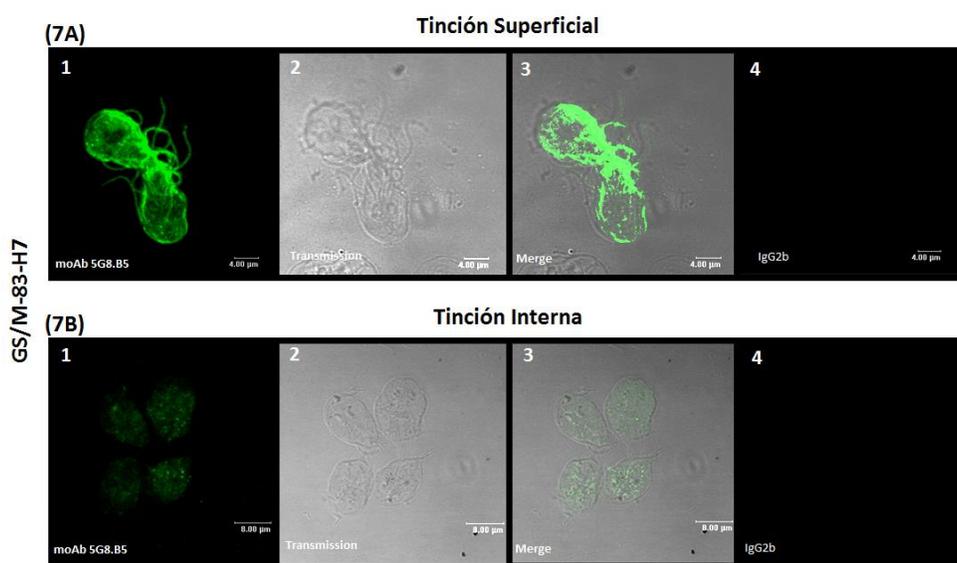
## **6.2 Expresión de la proteína 5G8 en trofozoítos de *G. lamblia***

Con el objetivo de conocer el nivel y el patrón de expresión de la proteína 5G8 en trofozoítos de *G. lamblia* (GS/M-83-H7), se realizaron análisis por citometría de flujo. Casi todos los trofozoítos GS/M-83-H7 permeabilizados ( $\approx 94\%$ ) expresaron la proteína 5G8 (Figura 6B). Sólo un porcentaje pequeño ( $\approx 5\%$ ) de esos trofozoítos expresaron altos niveles ( $10^4$ - $10^5$  IMF, unidades de intensidad media de fluorescencia) de la proteína 5G8 en la superficie celular (Figura 6A).



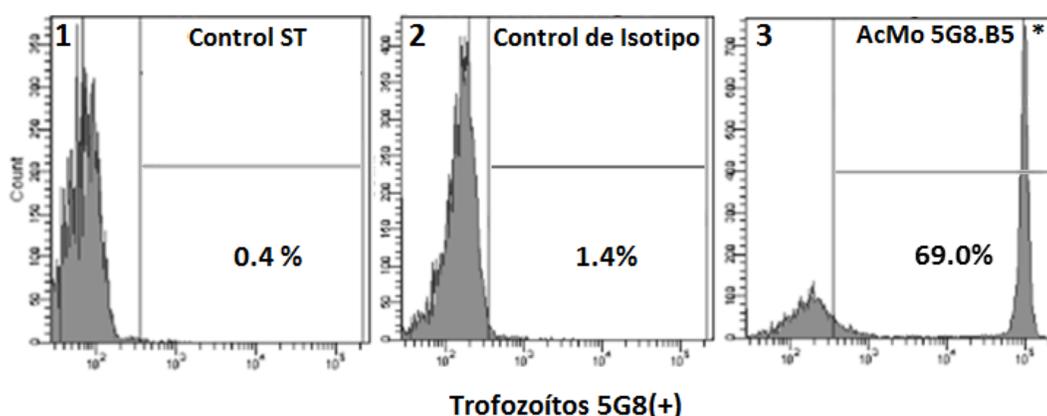
**Figura 6.-** Expresión de la proteína 5G8 en trofozoítos de *G. lamblia*. Se llevaron a cabo análisis por FACS utilizando el AcMo 5G8.B5 y los anticuerpos control (isotipos IgG2b e IgG2a). **6A** Tinción superficial en trofozoítos de *G. lamblia* (GS/M-83-H7): **1.** Células control sin teñir, **2.** AcMo control [40F (IgG2a)] y **3.** AcMo 5G8.B5. **6B** Tinción intracelular en trofozoítos de *G. lamblia* (GS/M-83-H7): **1.** Células control sin teñir, **2.** AcMo control (40F (IgG2a)) y **3.** AcMo 5G8.B5. Los asteriscos indican las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al control de anticuerpo.

El análisis por microscopía confocal confirmó que la proteína 5G8 se encontraba en la superficie celular (Figura 7A) y en el interior de los trofozoítos (Figura 7B). La proteína 5G8 se encontró como una marca intensa y difusa en todo el cuerpo del trofozoíto, incluyendo el disco ventral y los flagelos (Figura 7A.1).



**Figura 7.- Análisis de microscopía confocal de trofozoítos de *G. lamblia*.** Tinción superficial **7A** y tinción interna **7B**: **1.** AcMo 5G8.B5, **2.** Imagen de microscopía de transmisión, **3.** Unión del AcMo 5G8.B5 y microscopía de transmisión, **4.** Anticuerpo control de isotipo (IgG2b).

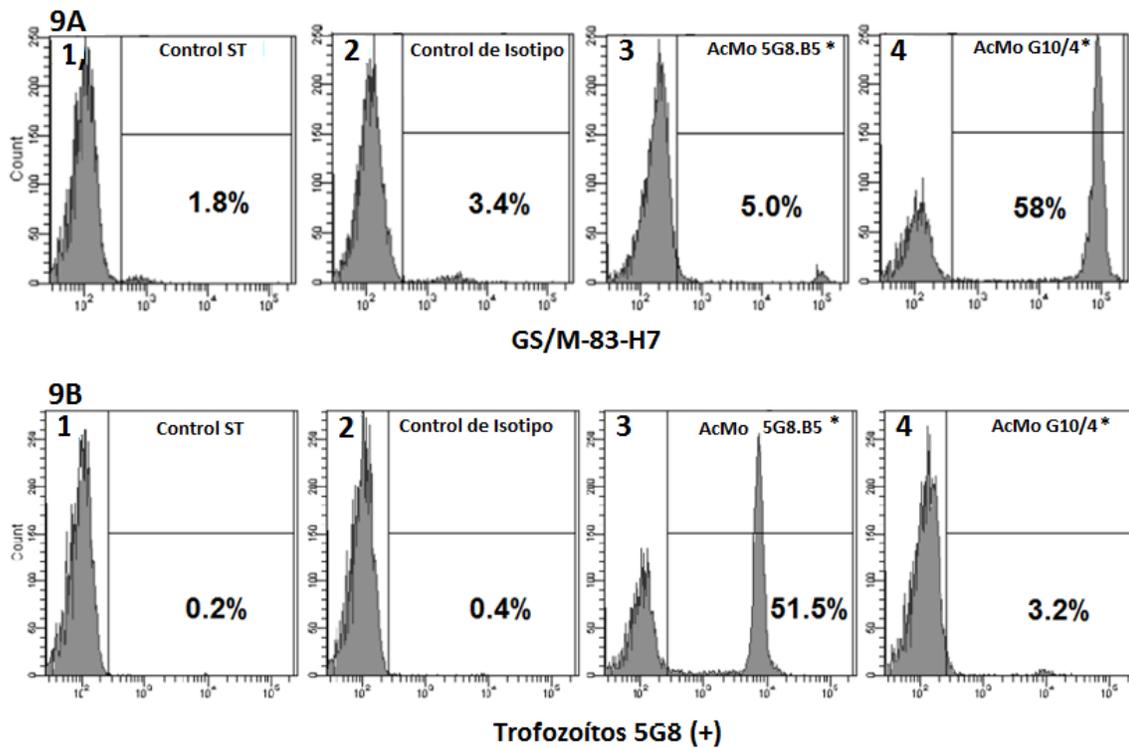
Con la finalidad de caracterizar la proteína 5G8, se enriqueció la población de trofozoítos que expresa la proteína 5G8 en la superficie celular por la técnica de “panning” usando el AcMo 5G8.B5. Cincuenta a setenta por ciento de la población enriquecida [trofozoítos 5G8 (+)] expresa la proteína 5G8 en la superficie celular (Figura 8).



**Figura 8.- Enriquecimiento de la población de trofozoítos de *G. lamblia* que expresan la proteína 5G8 en la superficie celular.-** Se realizaron análisis por FACS utilizando el AcMo 5G8.B5 y el anticuerpo control de isotipo (IgG2b). Cincuenta a setenta por ciento de la población enriquecida [trofozoítos 5G8 (+)] expresó la proteína 5G8 en la superficie celular. **1)** Células control no teñidas, **2)** Anticuerpo control de isotipo y **3)** AcMo 5G8.B5. Los asteriscos indican las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al anticuerpo control.

### **6.3 La proteína 5G8 de *G. lamblia* es diferente a la proteína VSP H7**

Las proteínas variables de superficie (VSPs) son proteínas inmunogénicas que recubren por completo la superficie de *G. lamblia*. Únicamente una sola VSP se expresa en la superficie de los trofozoítos de *G. lamblia* en cualquier momento<sup>63</sup>. La clona de *G. lamblia* GS/M-83-H7 expresa constitutivamente la proteína inmunogénica VSP H7. La predicción de la masa molecular de esta proteína es de 56.8 kDa, pero en electroforesis de SDS-PAGE, la migración de esta proteína es considerablemente alta (cerca de 72 kDa). Con el propósito de conocer si los antígenos de *Giardia* VSP H7 y 5G8 corresponden a la misma molécula, se evaluó la expresión de esos antígenos en la superficie celular de los trofozoítos de *G. lamblia* [GS/M-83-H7 y 5G8 (+)] por citometría de flujo, utilizando los AcMos específicos para las proteínas VSP H7 (G10/4) y 5G8 (5G8.B5). El reconocimiento antigénico de los dos AcMos, fue claramente diferente (Figura 9) indicando que las proteínas 5G8 y VSPH7 son moléculas diferentes.



**Figura 9.- La proteína 5G8 de *G. lamblia* es diferente a la proteína VSP H7 (Variant Surface Protein H7).**- Se realizaron análisis por FACS utilizando los AcMos: G10/4 ( $\alpha$ -VSP H7), 5G8.B5 ( $\alpha$ -5G8) y anticuerpo control de isotipo (IgG2b). Tinción superficial de *G. lamblia* GS/M-83-H7 (**9A**) y trofozoítos 5G8 (+) (**9B**). **1)** Células control sin teñir, **2)** Anticuerpo control de isotipo, **3)** AcMo 5G8.B5 y **4)** AcMo G10/4. Los asteriscos indican las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al anticuerpo control.

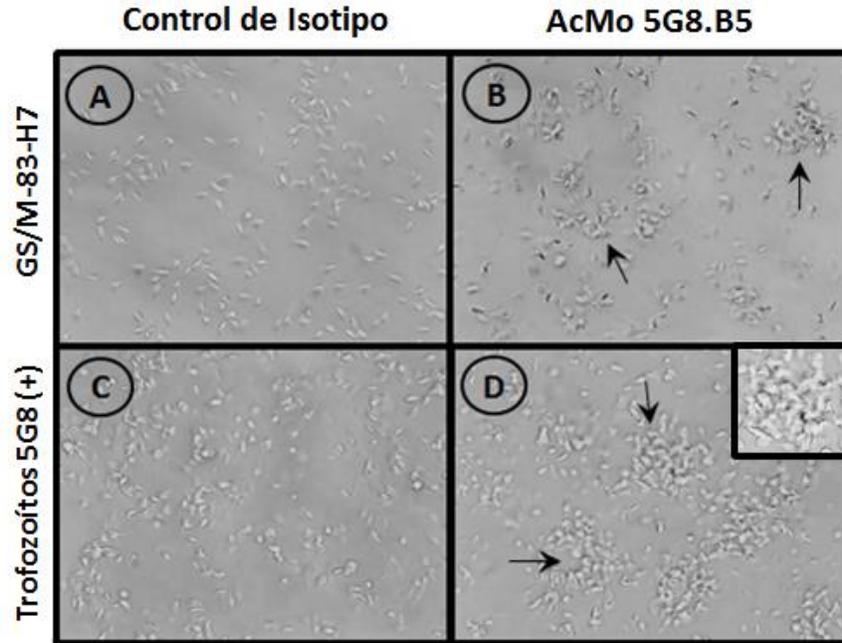
#### 6.4 Ensayo de aglutinación de trofozoítos de *G. lamblia*

La capacidad aglutinante del AcMo 5G8.B5 se evaluó en los cultivos de trofozoítos GS/M-83-H7 y 5G8 (+). El AcMo 5G8.B5 indujo una fuerte aglutinación a los trofozoítos 5G8 (+) a las diferentes concentraciones probadas (Tabla 3). Se observaron grandes grumos de células aglutinadas a la concentración de anticuerpo de 2.5 y 5.0 µg/mL (Figura 10). En contraste, el AcMo 5G8.B5 mostró menor capacidad aglutinante en los trofozoítos GS/M-83-H7 (Tabla 3, Figura 10). El control de anticuerpo del mismo isotipo pero irrelevante, no mostró capacidad de aglutinación en células de *Giardia*, a ninguna concentración de anticuerpo probada.

Tabla3.- El AcMo 5G8.B5 induce aglutinación en trofozoítos de *G. lamblia*

Anticuerpo (µg/mL)	Anticuerpo Control de Isotipo	AcMo 5G8.B5
0	-	-
0.6	±	+
1.2	±	++
2.5	±	+++
5	±	+++
10	±	++

a: -:< 1%; ±: 1-10%; +: 11-30% (bajo); ++: 31-60% (medio); +++: 61-90% (alto).  
Loos resultados son representativos de tres experimentos independientes.



**Figura 10.- Aglutinación de *G. lamblia* por el anticuerpo monoclonal 5G8.B5.**

La capacidad de aglutinación del AcMo 5G8.B5 fue evaluada en la cepa GS/M-83-H7 y en la población de trofozoítos 5G8 (+). Control de isotipo (**A** y **C**), AcMo 5G8.B5 (**B** y **D**) a diferentes concentraciones (0, 0.6, 1.2, 2.5, 5 y 10  $\mu\text{g/mL}$ ).

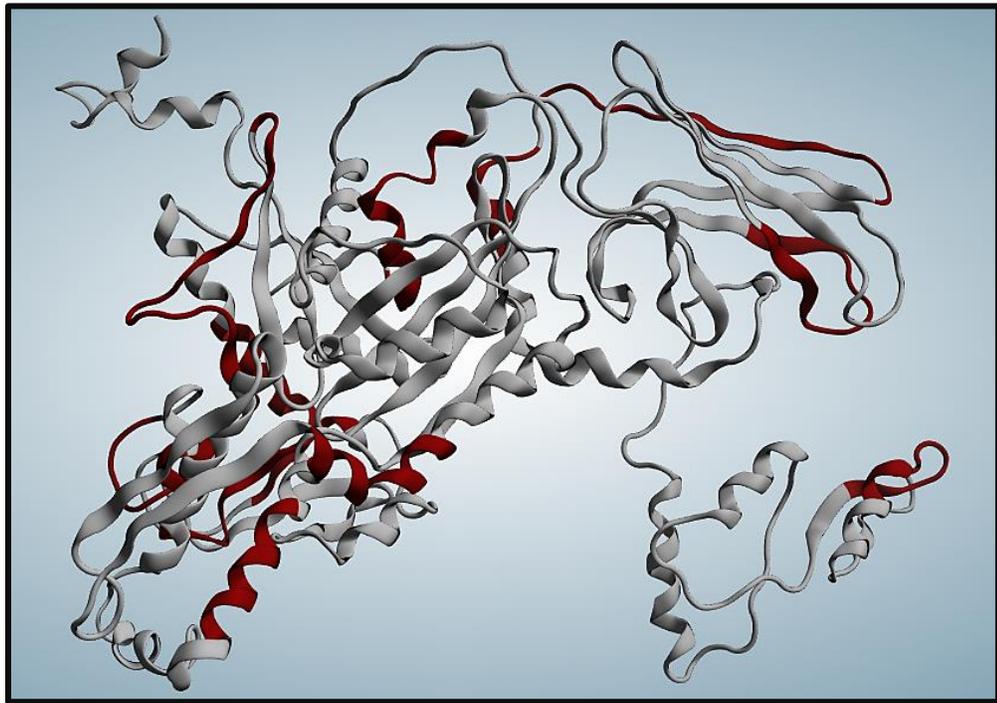
## 6.5 Identificación de proteínas inmunogénicas por espectrometría de masas en tándem con un analizador de masas cuadrupolar.

El método de ionización por electrospray (ESI-MS/MS) es preferencialmente empleado en la proteómica, debido a que permite la identificación de proteínas, en concentraciones muy bajas (femtomolar)<sup>53-55</sup>.

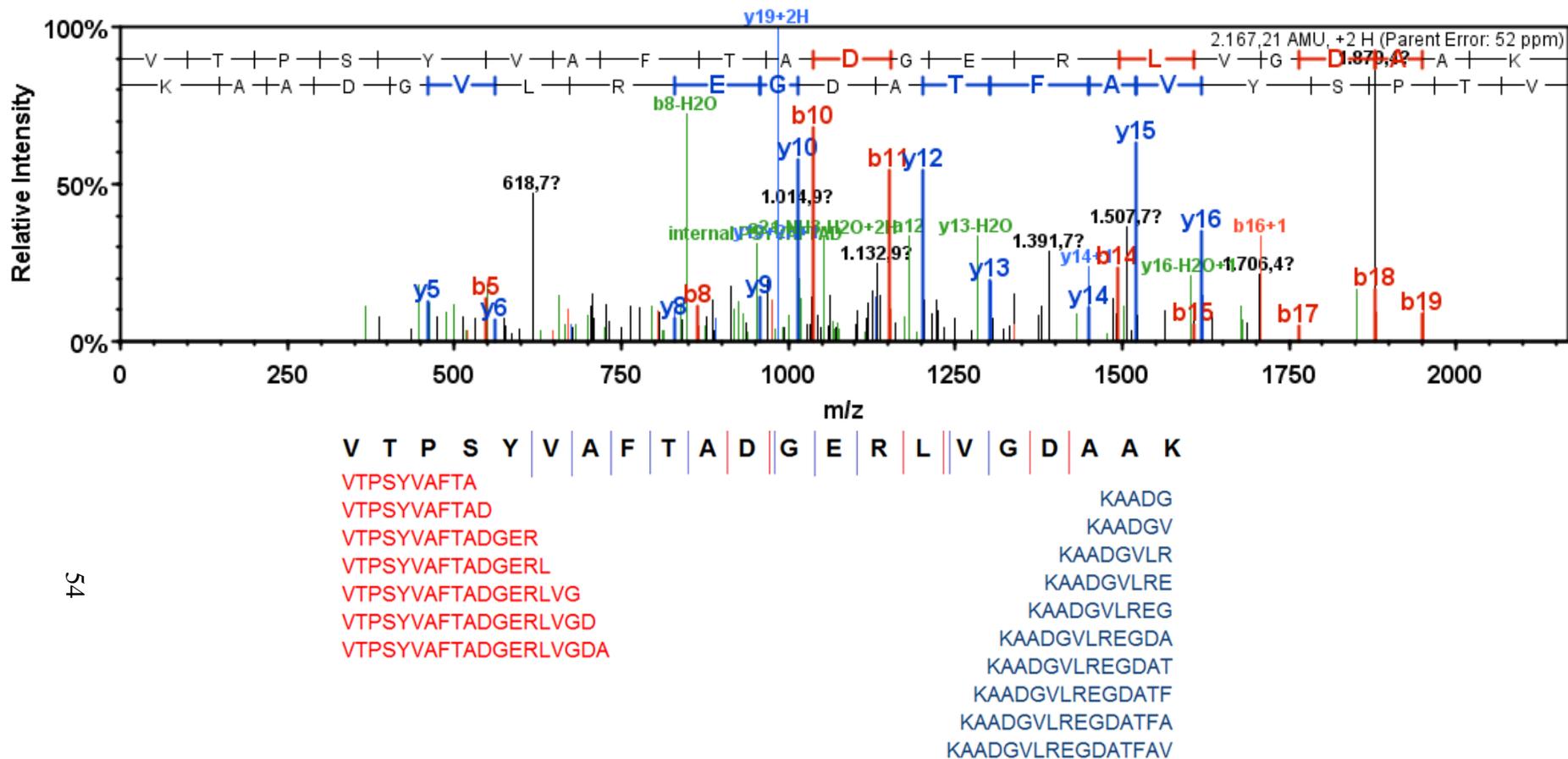
Con el fin de identificar la proteína inmunogénica de *G. lamblia* 5G8, se realizó un análisis de EM a partir de cortes de la banda proteica proveniente de geles de SDS-PAGE y membranas de nitrocelulosa de una masa molecular relativa a  $\approx$  71 kDa, la cual fue reconocida por el anticuerpo monoclonal 5G8.B5. Las muestras conteniendo las bandas proteicas fueron alquiladas, reducidas y digeridas enzimáticamente (tripsina). Después de separar los péptidos por cromatografía (HPLC), se inyectaron a un espectrómetro de masas ESI-MS/MS para ser ionizados, fragmentados y analizados.

En la banda analizada, se identificó principalmente un total de 13 péptidos provenientes de una proteína inmunogénica de *G. lamblia* (Tabla 4). Comparando estos resultados con las secuencias de proteínas reportadas en la base de datos de *G. lamblia* (*GiardiaDB*)<sup>59</sup>, estos péptidos presentan un 100% de probabilidad de pertenecer a la proteína de *G. lamblia* BiP (Binding Immunoglobulin Protein) (Figura 11). En el espectro de masas se observó el patrón de fragmentación típico del péptido VTPSYVAFTADGERVGDAAK, el cual pertenece a la proteína inmunogénica BiP (Figura 12).





**Figura 11.- Proteína inmunogénica de *G. lamblia* BiP reconocida por el AcMo 5G8.B5. En rojo se muestra la distribución de los péptidos identificados por ESI-MS/MS.**



54

**Figura 12.- Espectro de masas de un péptido correspondiente a la proteína BiP de *G. lamblia*.** La banda proteica de  $\approx 71$  kDa, reconocida por el AcMo 5G8.B5, fue recortada a partir de una membrana de nitrocelulosa (western blot) y digerida enzimáticamente. Los péptidos generados fueron separados por HPLC y analizados mediante espectrometría de masas (ESI-MS/MS). El espectro de masas mostró el patrón de fragmentación del péptido VTPSYVAFTADGERLVGDAAK correspondiente a la proteína BiP.

La proteína BiP pertenece a la familia de proteínas de choque térmico (HSP, heat shock protein), las cuales son proteínas reguladas por el estrés celular, ocasionado por la temperatura, ausencia de nutrientes esenciales, cambios de pH, entre otros. BiP actúa como una molécula chaperona que asiste en la traslocación de polipéptidos nacientes a través de la membrana del RE, así como su subsecuente plegamiento y oligomerización en algunos organismos<sup>15,67</sup>.

### **6.6 Predicción de epítopes potenciales que estimulan una respuesta inmune celular y humoral**

La predicción de péptidos a través de algoritmos<sup>7</sup> provee de información sustancial acerca de las secuencias de aminoácidos de los epítopes de proteínas inmunogénicas que potencialmente induzcan una respuesta inmunológica, lo que nos ayudará a sentar las bases moleculares acerca de los mecanismos involucrados durante la infección por *G. lamblia*. Con el fin de identificar los epítopes de la proteína inmunogénica BiP de *G. lamblia* [ID gi|159118513 ATCC (50803)], que potencialmente se une, a la molécula del CMH clase II, se utilizó el predictor de epítopes SYFPEITHI<sup>7</sup>.

Al analizar la secuencia de la proteína BiP en el algoritmo, se encontró una serie de secuencias de aminoácidos con alta probabilidad, de unirse al sitio de unión de la molécula del CMH clase II (Tabla 5) como la secuencia del aminoácido 244 a 258 (LSVDSGVFEVLATAG), el cual presenta un registro de unión (score) a 32% de unirse al sitio de unión a péptidos, seguido por la secuencia 404 a 418

(LNKDINADEAVAWGA) con un puntaje de 26, entre otros. Estos resultados sugieren que las secuencias analizadas cumplen con los requerimientos o restricciones del CMH clase II. Utilizando la secuencia de la proteína modelo HEL encontramos una serie de secuencias de aminoácidos que potencialmente se unen a la molécula del CMH clase II, debido a que cumplen con las restricciones de aminoácidos de la molécula del CMH (Tabla 6). La secuencia de mayor afinidad de la proteína HEL fue 49-63 (GSTDYGILQINSRWW), con un puntaje máximo de 32%, funcionalmente es un fuerte inductor de la respuesta inmune celular *in vitro*<sup>37</sup>, comparándolo con secuencias identificadas en la proteína BiP, se encontraron epítopes con el mismo registro de unión que pudieran estimular eficientemente la respuesta inmune celular durante la infección por *G. lamblia*.

Tabla 5.- Predicción de péptidos de la proteína BiP que se unen a la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad

Posición	Bolsillos de unión a péptidos															Score	
				P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5		
BiP																	
224	L	S	V	D	S	G	V	F	E	V	L	A	T	A	G	32	
404	L	N	K	D	I	N	A	D	E	A	V	A	W	G	A	26	
237	G	T	H	D	V	S	I	L	S	V	D	S	G	V	F	24	
295	K	A	K	D	M	A	V	K	K	A	I	S	R	L	R	24	

Tabla 6.- Predicción de péptidos de la proteína HEL que se unen a la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad.

Posición	Bolsillos de unión a péptidos															Score	
				P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5		
HEL																	
49-63	G	S	T	D	T	G	I	L	Q	I	N	S	R	W	W	32	
71-85	G	S	R	N	L	C	N	I	P	C	S	A	L	L	S	20	
84-98	L	S	S	D	I	T	A	S	V	N	C	A	K	K	I	18	
13-27	K	R	H	G	L	D	N	Y	R	G	Y	S	L	G	N	14	

Secuencias de aminoácidos de la proteína BiP de *G. lamblia* y la proteína modelo HEL, analizadas mediante el algoritmo SYFPEITHI. Se muestran las secuencias que presentan un registro de unión favorable a la molécula del CMH clase II.

## **7. DISCUSIÓN**

En este trabajo se han utilizado sensores biológicos (anticuerpos monoclonales, CMH clase II) con la finalidad de investigar las proteínas y posibles epítopes de *G. lamblia* que induzcan una respuesta inmunológica (celular o humoral), así como su caracterización bioquímica de la misma. Los mecanismos inmunológicos involucrados en la erradicación de la infección por *G. lamblia* no están completamente dilucidados. La respuesta inmune (humoral y celular) juega un papel importante para el control de la infección por *Giardia*<sup>13,19,25,58,64-68</sup>. El desarrollo de una vacuna contra esta infección se ha visto obstaculizado por la falta de conocimiento acerca de las proteínas de *Giardia* que inducen una respuesta protectora durante la infección.

El descubrimiento y aplicación de las vacunas ha tenido un importante impacto a nivel mundial. Las vacunas, históricamente, se han generado a partir de la atenuación completa de un patógeno (desde 1796). El diseño de nuevas vacunas ha llevado a la búsqueda puntual de las moléculas relacionadas con una infección. Gracias a la bioinformática es posible predecir a través de procesos como la presentación de antígeno, cuales moléculas más inmunogénicas son las que están involucradas durante una infección<sup>7</sup>.

En el presente estudio se generaron AcMos específicos para antígenos de *G. lamblia*, a partir de esplenocitos de ratones infectados, los cuales permitieron la caracterización parcial a un nivel bioquímico e inmunológico de una proteína altamente inmunogénica reconocida por el sistema inmune de ratones infectados

por *G. lamblia*. El reconocimiento antigénico de la mayoría de los AcMos generados fue hacia una banda proteica correspondiente a una masa molecular relativa de  $\approx$  71 kDa (proteína 5G8). La respuesta secretora (IgA en heces) y sistémica (IgG en suero) de anticuerpos en una infección (*G. lamblia*) primaria y secundaria en ratones adultos (C3H/HeJ) reconocen esta proteína<sup>30</sup>. Estudios adicionales serán necesarios para la caracterización a un nivel molecular de esta proteína.

Se indujo la aglutinación *in vitro* de trofozoítos de *G. lamblia*, utilizando el AcMo 5G8.B5, sugiriendo que la proteína 5G8 de *Giardia* puede inducir anticuerpos específicos en el hospedero infectado, que promueven la aglutinación de *Giardia*, lo que pudiera evitar la colonización del hospedero por el parásito. Experimentos futuros en nuestro grupo de investigación serán enfocados a analizar esta hipótesis.

El análisis por citometría de flujo reveló que la proteína 5G8 se expresa dentro de los trofozoítos de *G. lamblia* (> 90% del total de la población celular), y sólo un bajo porcentaje ( $\approx$ 5%) de esos trofozoítos expresan altos niveles de la proteína 5G8 en la superficie celular. El patrón de expresión de este antígeno indica que la proteína 5G8 está siendo transportada por el sistema de tráfico vesicular hacia la membrana<sup>69-71</sup>. Futuros estudios son necesarios para poder localizar el sitio específico de la proteína, y su relación con el tráfico vesicular en el interior de *G. lamblia*.

*G. lamblia* experimenta variación antigénica, proceso que consiste en la variación de las proteínas de superficie que recubren por completo la superficie celular de los trofozoítos. La cepa GS/M-83-H7 expresa constitutivamente la

proteína variable de superficie (VSPs) H7 (VSPH7), la cual presenta una masa molecular relativa de  $\approx 56$  kDa, pero la migración de esta proteína en geles de electroforesis SDS-PAGE es considerablemente alta ( $\approx 72$  kDa). La migración de la proteína VSPH7 varía con la preparación de los geles de acrilamida<sup>72</sup>.

La proteína VSPH7 se expresa en la superficie de los trofozoítos y es inmunogénica. Los análisis por citometría de flujo muestran un patrón de reconocimiento de anticuerpos diferente entre los AcMo específicos para las proteínas 5G8 y VSPH7, indicando que esas moléculas de *Giardia* son proteínas diferentes. Estos resultados en conjunto con el análisis de espectrometría de masas sugieren fuertemente que la proteína inmunogénica de *G. lamblia* de 71 kDa es la proteína BiP. Analizando la predicción de epítopes de la proteína BiP podemos inferir que esta proteína también puede inducir una respuesta inmunológica celular. Es necesario profundizar más en estudios con el fin de poder conocer las bases moleculares de las interacciones de los sensores biológicos con sus moléculas específicas, para poder profundizar en el conocimiento de este proceso.

Una de las HSP mejor caracterizadas es BiP (GRP78)<sup>64</sup>, inicialmente identificada como: Binding Immunoglobulin Protein (BiP)<sup>65</sup>. BiP contiene un péptido señal en la región carboxiterminal de retención en el retículo endoplásmico (RE)<sup>66</sup>. BiP actúa como una molécula chaperona que asiste en la traslocación de polipéptidos nacientes a través de la membrana del RE, así como su subsecuente plegamiento y oligomerización<sup>15,67</sup>. En células eucariotas superiores, BiP actúa como una proteína chaperona localizada en el lumen del (RE), organelo celular en

el cual se lleva a cabo la síntesis de proteínas y lípidos<sup>66</sup>. Las proteínas chaperonas funcionan como proteínas de control de calidad del RE, previniendo que el estrés celular desnaturalice las proteínas citosólicas o de membrana. Las proteínas aberrantes son destinadas a su destrucción en el proteosoma.

*G. lamblia* es considerado un atractivo organismo de estudio evolutivo debido a que carece de organelos prominentes, que caracterizan a una célula eucariótica, como mitocondrias y peroxisomas<sup>8</sup>, así como la presencia de retículo endoplásmico evolucionado. Se ha observado la presencia de aparato de Golgi en *G. lamblia* durante la diferenciación a quiste<sup>8</sup>. Por lo anterior *G. lamblia* es considerado como el microorganismo de más temprana división en la línea eucariótica de descendencia<sup>14</sup>. Estas razones hacen atractivo el estudio biológico de *G. lamblia*, obteniendo el conocimiento sobre la temprana evolución de sus estructuras, el transporte o síntesis de proteínas de células superiores eucarióticas, así como sus adaptaciones celulares tardías en su estilo de vida parasítico.

En resumen, este estudio describe la identificación y caracterización parcial de una proteína inmunogénica de *G. lamblia* a través del uso de sensores biológicos (anticuerpos monoclonales y CMH clase II). Adicionalmente se generó un panel de anticuerpos monoclonales específicos para esta proteína los cuales serán de gran utilidad para la caracterización bioquímica e inmunológica de esta molécula del parásito.

El conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados durante un proceso infeccioso, permitirá el entendimiento de la interacción huésped-parásito, y

sentará las bases moleculares para el futuro desarrollo de medidas profilácticas contra *G. lamblia*.

## **8. CONCLUSIONES**

1. Se generaron sensores biológicos (hibridomas de células T, así como para células B) específicos para proteínas de *G. lamblia*.
2. Se caracterizó inmunológicamente a la proteína inmunogénica de *G. lamblia* reconocida por el anticuerpo monoclonal (5G8.B5), la cual se encuentra expresándose en la superficie, así como en el interior de trofozoítos de *G. lamblia*. El anticuerpo monoclonal 5G8.B5 reconoce una banda proteica de *G. lamblia* de aproximadamente 71 kDa (proteína 5G8).
3. Se identificaron por ESI/MS-MS epítopes provenientes de la proteína de *G. lamblia* 5G8, indicando que la proteína 5G8 es la chaperona BiP.
4. La proteína BiP posee epítopes potenciales que estimulan a células T capaces de unirse eficientemente a las moléculas del CMH clase II (I-A<sup>k</sup>).
5. La respuesta de anticuerpos anti-proteína 5G8 de *G. lamblia* induce la aglutinación de trofozoítos, sugiriendo que este antígeno pudiera inducir una respuesta inmune humoral protectora durante la infección por *G. lamblia*.

## **9. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO**

- Generar la proteína BiP recombinante.
- Evaluar el papel protector de BiP *in vivo* en un modelo de infección murino en ratones C3H/HeJ.
- Evaluar el reconocimiento molecular: proteína recombinante/ anticuerpo monoclonal 5B8.B5.
- Generar hibridomas de células T y B específicos para la proteína BiP recombinante.
- Caracterizar termodinámicamente la unión de la proteína recombinante BiP con el anticuerpo 5B8.B5, para profundizar más en los conocimientos de reconocimiento molecular de esta interacción biológica.
- Analizar la regulación de la expresión en la superficie celular de la proteína BiP en trofozoítos de *G. lamblia* (diferentes cepas).

## **10. BIBLIOGRAFÍA**

1. Fetz, V., Knauer, S.K., Bier, C., von Kries, J.P. y Stauber, R.H. 2009. Translocation biosensors-cellular system integrators to dissect CRM1-dependent nuclear export by chemogenomics. *Sensors*. 9: 5423-5445.
2. Tothill, I.E. and Turner, A.P.F. 2003. *Biosensors*. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Academic: New York; pp. 489-499.
3. Perozzo, R., Folkers, G., y Scapozza, L. 2004. Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects. *J Recept Sig Transd*. 24: 1-52.
4. Lehn J.M. *Supramolecular Chemistry, Concepts and Perspectives*. VCH, New York, 1995, Capítulo 2.
5. Stryer, L. *Biochemistry*; W. H. Freeman and Company, New York, 2007, Capítulo 2.
6. Gokel G.W. *Advances in Supramolecular Chemistry*. Connecticut, 1997, Capítulo 1.
7. Rammensee, H.G., Bachmann, J., Emmerich, N., Bachor, O. y Stevanovic, S. 1999. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *J Immunogenetics*. 50: 213-219 ([www.syfpeithi.de](http://www.syfpeithi.de)).
8. Adam, R.D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev*. 14: 447-475.
9. Eckmann, L. 2003. Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite Immunol*. 25: 259-270.

10. Singer, S.M. y Nash, T.E. 2000. The role of normal flora in *Giardia lamblia* infections in mice. *J Infect Dis.* 181: 1510-1512.
11. Fagarasan, S. y Honjo, T. 2003. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nat Rev Immunol.* 3: 63-72.
12. Faubert, G. 2000. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev.* 13: 35-54.
13. Palm, J.E., Weiland, M.E., Griffiths, W.J., Ljungstrom, I. y Svärd, S.G. 2003. Identification of immunoreactive proteins during acute human giardiasis. *The J Infect Dis.* 187: 1849-1859.
14. Lujan, H.D., Mowatt, M.R., Conrad, J.T. y Nash, T.E. 1996 Increased expression of the molecular chaperone BiP/GRP78 during the differentiation of a primitive eukaryote. *Biol Cell.* 86: 11-18.
15. Ebert, E.C. 2000. *Giardia* induces proliferation and interferon gamma production by intestinal lymphocytes. *Gut.* 44 342-346.
16. Singer, S.M. y Nash, T.E. 2000. T-cell dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect Immun.* 68: 170-175.
17. VonAllmen, N. 2004. Experimental infections of neonatal mice with cyst of *Giardia lamblia* clone GS/M-83-H7 are associated with an antigenic reset of the parasite. *Infect Immun.* 72: 4705-4771.
18. Scott, K.G., Yu, L.C. y Buret, A.G. 2004. Role of CD8+ and CD4+ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. *Infect Immun.* 72: 3536-3542.

19. El-Shazly, A.M., El-Bendary, M., Saker, T., Rifaat, M.M., Saleh, W.A. y El-Nemr, H.I. 2003. Cellular immune response in giardiasis. *J Egypt Soc Parasitol.* 33: 887-904.
20. Cuendet, M.A., Zoete, V. y Michielin, O. 2011. How T cell receptors interact with peptide-MHCs: a multiple steered molecular dynamics study. *Proteins.* 79: 3007-3024.
21. Kasson, P.M., Rabinowitz, J.D., Schmitt, L., Davis, M.M. y McConnell, H.M. 2000. Kinetics of peptide binding to the class II MHC protein I-E<sup>k</sup>. *J Biochem.* 39: 1048-1058.
22. Fremont, D.H., Monnaie, D., Nelson, C.A., Hendrickson, W.A. y Unanue, E.R. 1998. Crystal structure of I-A<sup>k</sup> in complex with a dominant epitope of lysozyme. *Immunity.* 8: 305-317.
23. Van Bergen, J., Ossendorp, F., Jordens, R., Mommaas, A.M., Drijfhout, J.W. y Koning, F. 1999. Get into the groove! Targeting antigens to MHC class II. *Immunol Rev.* 172: 87-96.
24. Holland, C.J., Cole, DK. y Godkin A. 2013. Re-directing CD4 T cell responses with the flanking residues of MHC class II-bound peptides: the core is not enough. *Front Immunol.* 4 172: 1-9.
25. Griffin, J.P., Chu, R. y Harding, C.V. 1997. Early endosomes and a late endocytic compartment generate different peptide-class II MHC complexes via distinct processing mechanisms. *J Immunol.* 158: 1523-1532.

26. Wu, Z.Q., Shen, Y., Khan, A.Q., Chu, C.L., Riese, R., Chapman, H.A., Kanagawa, O. y Snapper, C.M. 2002. The mechanism underlying T cell help for induction of an antigen-specific in vivo humoral immune response to intact *Streptococcus pneumoniae* is dependent on the type of antigen. *J Immunol.* 168: 5551-5557.
27. Villadangos, J.A. y Ploegh, H.L. 2000. Proteolysis in MHC class II antigen presentation: who's in charge?. *Immunity.* 12: 233-239.
28. Jensen, P.E. 1995. Antigen unfolding and disulfide reduction in antigen presenting cells. *Semin Immunol.* 7: 347-353.
29. Doebele, R.C., Busch, R., Scott, H.M., Pashine, A. y Mellins, E.D. 2000. Determination of the HLA-DM interaction site on HLA-DR molecules. *Immunity.* 13: 517-527.
30. Velazquez, C., Beltran, M., Ontiveros, N., Rascon, L., Figueroa, D.C., Hernandez-Martinez, J., Hernandez, J., Astiazaran-Garcia, H. y Granados, A.J. 2005. *Giardia lamblia* infection induces different secretory and systemic antibody responses in mice. *Parasite Immunol.* 27: 351-356.
31. Gottstein, B., Harriman, G.R., Conrad, J.T. y Nash, T.E. 1990. Antigenic variation in *Giardia lamblia* – cellular and humoral immune response in a mouse model. *Parasite Immunol.* 12: 659-673.
32. Snider, D.P. y Underdown, B.J. 1986. Quantitative and temporal analyses of murine antibody response in serum and gut secretions to infection with *Giardia muris*. *Infect Immun.* 52: 271-278.

33. Gottstein, B., Deplazes, P. y Tanner, I. 1993. *In vitro* synthesized immunoglobulin-a from Nu/+ and reconstituted Nu/Nu mice against a dominant surface-antigen of *Giardia lamblia*. *Parasitol Res.* 79: 644-648.
34. Rascón L. Tesis de Maestría, Universidad de Sonora, Marzo, 2008.
35. Paul, W.E. *Fundamental Immunology*, Lippincott-Raven: Maryland 1998; chapter 8 and 9.
36. Nash, T.E., Banks, S.M., Alling, D.W., Merrit, Jr. J.W. y Conrads J.T. 1990. Frequency of variant antigens in *Giardia lamblia*. *Exp Parasitol.* 71: 415-421.
37. Astiazaran-Gracia, H., Quintero, J., Vega, R., Briceño, P., Oviedo, V., Rascon, L., Garibay-Escobar, A., Castillo, Yañez, F.J., Robles-Zepeda, R., Hernandez, J. y Velazquez, C. 2009. Identification of T-cell stimulating antigens from *Giardia lamblia* by using *Giardia*-specific T-cell hybridomas. *Parasite Immunol.* 31: 132-139.
38. Ávila, R. Tesis de Especialidad en Inmunohematología, Universidad de Sonora, Marzo, 2008.
39. Rópolo, A.S. y Touz, M.C. 2010. A lesson in survival, by *Giardia lamblia*. *ScientificWorldJournal.* 10: 2019-2031.
40. Soltys, B.J., Falah, M. y Gupta, R.S. 1996. Identification of endoplasmic reticulum in the primitive eukaryote *Giardia lamblia* using cryoelectron microscopy and antibody Bip. *J Cell Sci.* 109: 1909-1917.
41. Lujan, H.D., Mowatt, M.R., Conrad, J.T., Bowers, B. y Nash, T.E. 1995. Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich

- repeats. Implications for secretory granule formation and protein assembly into the cyst wall. *J Biol Cell*. 270: 29307-29313.
42. Lee, P., Abdul-Wahid, A. y Faubert, G.M. 2009. Comparison of the local immune response against *Giardia lamblia* cyst wall protein 2 induced by recombinant *Lactococcus lactis* and *Streptococcus gordonii*. *Microbes Infect*. 1: 20-28.
43. Fagarasan, S. y Honjo, T. 2003. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nat Rev Immunol*. 3: 63-72.
44. Téllez, A., Palm, D., Weiland, M., Almenán, J., Winiecka-Krusnell, J., Linder, E. y Svärd, S. 2005. Secretory antibodies against *Giardia intestinalis* in lactating Nicaraguan Women. *Parasite Immunol*. 27: 163-169.
45. Davids, B.J., Palm, J.E., Housley, M.P., Smith, J.R., Andersen, Y.S., Martin, M.G., Hendrickson, B.A., Johansen, F.E., Svärd, S.G., Gillin, F.D. y Eckmann, L. 2006. Polymeric immunoglobulin receptor in intestinal immune defense against the lumen-dwelling protozoan parasite *Giardia*. *J Immunol*. 177: 6281-6290.
46. Abdul-Wahid, A. y Faubert, G.M. 2004. Similarity in cyst wall protein (CWP) trafficking between encysting *Giardia duodenalis* trophozoites and CWP-expressing human embryonic kidney-293 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 324: 1069-1080.

47. Müller, N., Stäger, S. y Gottstein, B. 1996. Serological analysis of antigenic heterogeneity of *Giardia lamblia* variant surface proteins. *Infect Immun.* 64: 1385-1390.
48. Weiland, M.E, Palm, J.E., Griffiths, W.J., McCaffery, J.M. y Svärd, S.G. 2003. Characterisation of alpha-1 giardin: an immunodominant *Giardia lamblia* annexin with glycosaminoglycan-binding activity. *Int J Parasitol.* 33: 1341-1351.
49. Nash, T.E. 2002. Surface antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Mol Microbiol.* 45: 585-590.
50. Bienz, M., Siles-Lucas, M., Wittwer, P. y Müller, N. 2001. vsp gene expression by *Giardia lamblia* clone GS/M-83-H7 during antigenic variation in vivo and in vitro. *Infect Immun.* 69: 5278-5285.
51. Tellez, A., Winiecka-Krusnell, J., Paniagua, M. y Linder, E. 2003. Antibodies in mother's milk protect children against giardiasis. *Scand J Infect Dis.* 35: 322-325.
52. Nash, T.E., y Keister, D.B. 1985. Differences in excretory-secretory products and surface antigens among 19 isolates of *Giardia*. *J Infect Dis.* 6: 1166-1171.
53. Ho, C.S., Lam, C.W.K., Chan, M.H.M., Cheung, R.C.K., Law, L.K., Lit, L.C.W., Ng, K.F., Suen, M.W.M. y Tai, H.L. 2003. Electrospray ionisation mass spectrometry: Principles and clinical applications. *Clin Biochem* 24: 3-12.

54. Bienvenut, W. V. *Acceleration and improvement of protein identification by mass spectrometry*, Springer: The Netherlands, 2005; Chapter 8.
55. Cole, R.B. *Electrospray ionization mass spectrometry. Fundamentals instrumentation and application*. Wiley-Interscience, New Orleans, 1997; Part I, II and III.
56. Godkin, A.J., Smith, K.J., Willis, A., Tejada-Simon, M.V., Zhang, J., Elliott, T. y Hill, A.V. 2001. Naturally processed HLA class II peptides reveal highly conserved immunogenic flanking region sequence preferences that reflect antigen processing rather than peptide-MHC interactions. *J Immunol.* 166: 6720-6727.
57. Dimitrov, I., Garnev, P., Flower, D.R. y Doytchinova, I. 2013. T-cell epitope vaccine design by immunoinformatics *Open Biol.* 3:120139.
58. Byrd, L.G., Conrad, J.T. y Nash, T.E. 1994. *Giardia lamblia* infections in adult mice. *Infect Immun.* 62: 3583-3585.
59. GiardiaDB y TrichDB: integrated genomic resources for the eukaryotic protist pathogens *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis*. 2009 ([http://giardiadb.org/giardiadb/.](http://giardiadb.org/giardiadb/))
60. Weber, P., Raynaud, I., Ettouati, L., Trescol-Biémont, M-C., Carrupt, P-A., Paris, J., Rabourdin-Combe, C., Gerlier, D., y Testa, B. 1998. Molecular modeling of hen egg lysozyme HEL(52-61) peptide binding to I-AK MHC Class II molecule. *Inter Immunol.* 10: 1753-1764.

61. Velazquez, C., Vidavsky, I., van der Drift, K., Gross, M.L. y Unanue, E.R. 2002. Chemical identification of a low abundance lysozyme peptide family bound to I-Ak histocompatibility molecules. *J. Biol. Chem.* 277: 42514-42522.
62. Gugasyan, R., Velazquez, C., Vidavsky, I., Deck, B.M., van der Drift, K., Gross, M.L. y Unanue, E.R. 2000. Independent selection by I-Ak molecules of two epitopes found in tandem in an extended polypeptide antigen. *J Immunol.* 165: 3206-3213.
63. Touz, M.C., Rópolo, A.S., Rivero, M.R., Vranchy, C.V., Conrad, J.T., Svärd, S.G. y Nash, T.E. 2008. Arginine deaminase has multiple regulatory roles in the biology of *Giardia lamblia*. *J Cell Sci.* 121: 2930-2938.
64. Munro, S. y Pelham, H.R.B. 1986. An Hsp70-like protein in the ER: Identity with the 78 kDa glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell.* 46: 291-300.
65. Shiu, R.P.C, Pouyssegur, J. y Pastan, I. 1997. Glucose depletion accounts for the induction of two transformation sensitive membrane proteins in Rous sarcoma virus transformed chick embryo fibroblast. *Proc Natl Acad Sci USA.* 74: 3840-3844.
66. Chen, W.T. y Lee, A.S. *Measurement and modification of the expression level of the chaperone protein and signaling regulator GRP78/BiP in mammalian cells.* Methods in Enzymology, 2011; chapter 13.

67. Dierks, T., Klappa, P., Wiech, H. y Zimmermann, R. 1993. The role of molecular chaperones in protein transport into the endoplasmic reticulum. *Phil Trans R Soc Lond B*. 339: 335-341.
68. Langford, T.D., Gillin, F.D., Housley, M.P., Kagnoff, M.F. y Eckmann, L. 2000. B cell dependent and independent host defenses against *Giardia*. *Gastroenterology*. 118: A324.
69. Langford, T.D., Housley, M.P. y Boes, M. 2002. Central importance of immunoglobulin a in host defense against *Giardia spp.* *Infect Immun*. 70: 11-18.
70. Roxstrom-Lindquist, K., Palm, D., Reiner, D., Ringqvist, E. y Svärd, S.G. 2006. *Giardia* immunity – an update. *Trends Parasitol*. 22: 26 -31.
71. Lujan, H.D. y Touz, M.C. 2003. Protein trafficking in *Giardia lamblia*. *Cell Microbiol*. 5: 427-434.
72. Nash, T.E. y Mowatt, M.R. 1992. Characterization of a *Giardia lamblia* variant-specific surface protein (Vsp) gene from isolate Gs/M and estimation of the Vsp gene repertoire size. *Mol Biochem Parasitol*. 51: 219-227.

## **11. ANEXOS**

### **Anexo 1**

Cultivo de *G. lamblia*

Materiales:

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

Reactivos:

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

Trypticasa.....	20 g
(BBL Triticase petone pancreatic digest of casein) BD 211921 445 g.	
Extracto de Levadura .....	10 g
(Bacto Yeast Extract Technical) BD 288620 500 g. LOT. 0055682	
Dextrosa.....	10 g
(D – (+) – Dextrose) Sigma D9434 500 g. Batch #108K0014	
NaCl.....	2 g
Sigma 5-5886	
L–Cisteína.....	2 g
(L-Cysteine hydrochloride monohydrate from non-animal Sorce) Sigma C6852-1006	
Fosfato de Sodio dibásico.....	1 g
Sigma S0876-1KG	
Fosfato de Sodio monobásico.....	0.6 g
Sigma S0751-500 g.	
Bilis.....	0.6 g
(Bile from bovine and ovine) Sigma B8381-1006	
Ácido ascórbico.....	0.1 g
(L-Ascorbic Acid) P.M.= 176 Sigma A5960-25G 065K0181	
Citrato férrico amoniacal.....	0.023 g

Una vez disueltos los componentes en polvo, se ajusta el pH a 6.9 con NaOH. Adicionar el antibiótico ceftriaxona (100 µg/mL). Suplementar al 10% con suero de ternera recién nacida (GIBCO Invitrogen 16-010) y se afora a 1000 mL con agua ultrapura. Finalmente, esterilizar por filtración con una membrana de 0.45 µm.

Procedimiento:

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

El pase se realiza en condiciones estériles (campana de flujo laminar Bioseguridad II).

## Anexo 2

Obtención de extractos antigénicos solubles de *G. lamblia*

Reactivos:

Solución reguladora de fosfatos-salina (PBS) pH 7.2

Inhibidores de proteasas (Sigma, P-2714)

Nitrógeno líquido

Procedimiento:

1. Colocar en agua hielo (15 min) los tubos que contengan los cultivos axénicos de trofozoítos de *G. lamblia* en crecimiento logarítmico [GS/M-83-H7, trofozoítos 5G8 (+)].
2. Centrifugar a 800 g por 10 min a 4°C y lavar 3 veces con PBS estéril pH 7.2.
3. Resuspender en 1.4 mL de PBS pH 7.2.
4. Obtener la concentración celular mediante un hematocitometro (5 µL de la suspensión celular + 995 µL de PBS, dilución 1:200). Tomar 20 µL de la suspensión + 20 µL de con azul de tripano (dilución 1:2) (Sigma, T-8154).
5. Congelar y descongelar con nitrógeno líquido a TA y adicionar 5 µL de inhibidor de proteasas (Sigma, P-2714).
6. Sonicar a 30 ciclos por 2 min (Brandon Sonifer 250, Shelton, CT, USA)

7. Centrifugar a 14,000 g a 4°C por 15 min, recuperar el sobrenadante el cual contiene la mezcla heterogénea de proteínas solubles de *G. lamblia*. Almacenar a -80°C hasta su uso.

### Anexo 3

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

### Reactivos:

#### 1. Acilamida/Bisacrilamida 30%

Acrilamida.....30 g

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

Mezclar en 100 mL de agua MiliQ. Filtrar la solución con un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$ . Almacenar en frasco color ámbar 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.

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

Trizma-base.....6.05 g

Agua ultrapura.....40 mL

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

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

Trizma-base.....91 g

Agua ultrapura.....100 mL

Ajustar el pH a 8.8 con HCl 1N, aforar a 500 mL. Filtrar con un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y adicionar 2 g de SDS. Almacenar a 4°C.

4. Persulfato de amonio (APS) al 10%

$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ .....10  $\mu\text{g}$

Agua ultrapura.....100  $\mu\text{L}$

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

6. Buffer de corrida 1X, pH 8.3

Glicina.....72 g

Trizma-base.....15.1 g

SDS.....5 g

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

7. Debido a que considerables obstáculos se encontraron para poder determinar el reconocimietno molecular del AcMo 5G8.B5, se modificaron las condiciones desnaturalizantes y reductoras de la solución reguladora de muestra 2X estandares. Se disminuyó la concentración de Tris 0.125 M, SDS 0.05%, glicerol 20% y 2-mercaptoetanol 0.05% de la solución reguladora muestra modificada ("buffer" muestra) 2X.

En un pequeño volumen de agua ultrapura disolver 0.38 g de Trizma-base. Ajustar pH a 6.8 y adicionar los siguientes reactivos en campana ventilada:

SDS.....1 g  
Glicerol.....5 mL  
2-Mercaptoetanol.....2.5 mL  
Azul de bromofenol.....0.5 mg

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

8. Alcohol etílico al 70% (1 L)

Alcohol etílico absoluto (96 %).....729.17 mL  
Agua ultrapura .....270.83 mL

Solución Azul de Coomassie

Metanol.....50% (v/v)  
Azul de Coomassie brillante R-250...0.05% (v/v)  
Ácido acético.....10% (v/v)  
Agua ultrapura .....40% (v/v)

9. Solución Desteñidora I

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

10. Solución Desteñidora II

Metanol.....5% (v/v)  
Ácido acético.....7% (v/v)  
Agua ultrapura .....88% (v/v)

Procedimiento:

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

2. Preparar el gel de separación al 12%:

Acilamida/Bisacilamida 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.....	0.018 mL

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

3. Preparar el gel concentrador al 12%:

Acilamida/bisacilamida 30%/8%.....	0.65 mL
Buffer tris 4X/SDS pH 8.8.....	1.25 mL
Agua ultrapura.....	3.05 mL
Persulfato de amonio.....	0.07 mL
TEMED.....	0.01 mL

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

4. Mezclar la solución antigénica con solución reguladora muestra 2X y cargar la mezcla en los pocillos del gel, cargar 8  $\mu$ L del marcador de peso molecular (MPM).

5. Correr la muestra a 100 voltios constantes por aproximadamente una hora y media, evitando liberar el frente del gel.

## Anexo 4

### Determinación de proteína por el micrométodo de Bradford

Reactivos:

Reactivo de Bradford (Sigma, B-6916)

Material:

- Microtubos cónicos (eppendorf) de 1.5 mL.
- Micropuntas (1 y 100  $\mu$ L).
- Micropipetas (100-1000 y de 10-100  $\mu$ L).
- Placas de 96 pozos (fondo plano).
- Lector de microplacas con filtro de 570 nm (Multiskan EX, Thermolabsystem).

Procedimiento:

1. Preparar diluciones seriadas a partir de un estándar de albúmina (BSA, Biorad, Quick Start Bradford Protein Assay Kit 1 #500-0201) a una concentración de 1.4 mg/mL en PBS. Obtener las siguientes concentraciones; 0.088, 0.177, 0.355 y 0.710 mg/mL.
2. Adicionar 5  $\mu$ L de la solución de BSA, de la muestra problema y del control negativo de PBS en los pozos de la placa por triplicado.

3. Adicionar por pozo 250  $\mu\text{L}$  del reactivo de Bradford, incubar por 15 min a TA y medir la densidad óptica en un lector de microplacas a 570 nm.
4. Graficar la curva estándar de BSA y obtener la ecuación, así como su coeficiente de correlación para confirmar la confiabilidad de los datos.
5. Obtener la concentración de proteína de la muestra problema.

## Anexo 5

### Cultivo de líneas celulares e hibridomas

#### Material:

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

#### Reactivos:

D-MEM (GIBCO CAS. 12100-061)

L-arginina-HCl (SIGMA A-5131)

L-asparagina anhidro (SIGMA A-4159)

NaHCO<sub>3</sub> (SIGMA S-5761)

Piruvato de sodio (Biowhittaker Walkersville, CAS 13-115E)

L-glutamina (Biowhittaker Walkersville, CAS 17-605E)

HEPES (SIGMA H-3784)

Penicilina/estreptomicina (SIGMA P-4333).

2-mercaptoetanol (Merck. 4213005)

- ✓ Equipo:
- ✓ Báscula digital
- ✓ Sistema de filtración (sterile aseptic system, Millipore corporation).
- ✓ Bomba de vacío.
- ✓ Pipetas serológicas.
- ✓ Micropipetas.
- ✓ Puntas para micropipetas.

Procedimiento:

1.- Pesar los reactivos indicados y verterlos en un vaso de precipitado que contenga agua ultrapura, agitar un poco asegurando que quede bien disuelto.

Para preparar 1 litro de DMEM:

DMEM.....	13.37 g
L-arginina HCl.....	0.116 g
L-asparagina anhidra.....	0.036 g
NaHCO <sub>3</sub> .....	2.0 g
(a) Piruvato de sodio.....	10.0 mL
(b) L-glutamina.....	7.5 mL
(c) Penicilina/estreptomicina (1000x).....	1.0 mL

- 2.- Los reactivos líquidos (a, b y c) y el polvo DMEM se deben de añadir dentro de la campana, utilizando pipetas estériles para evitar contaminación.
- 3.- Una vez añadidos todos los reactivos; el medio se debe esterilizar por medio de filtración empleando un filtro Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$ .
- 4.- Ya filtrado el medio, pasarlo a un frasco de vidrio estéril y etiquetarlo con nombre de quién lo preparó y la fecha.
- 5.- Colocar pruebas de esterilidad para asegurar que el medio de cultivo no esté contaminado.
- 6.- Almacenar el medio de cultivo bajo refrigeración a 4°C hasta su uso.

NOTA: Para preparar el medio D5F o D10F, se debe suplementar el medio DMEM al 5 ó 10%, según su aplicación, con suero fetal bovino, previamente inactivado con calor.

Las líneas celulares e hibridomas se mantienen en cajas de cultivo de 25  $\text{cm}^2$ , bajo condiciones de 5% de  $\text{CO}_2$ . Cada tres días realizar un subcultivo a una concentración de 10,000 células/mL.

## Anexo 6

### Inmunodetección de la proteína 5G8 en antígeno de *G. lamblia*

#### Reactivos:

- Solución reguladora de transferencia 10X, pH 8.3 (Tris/Glicina 0.039 M, 10X, pH 8.3)  
Tris base.....30.3 g  
Glicina.....144.0 g  
Aforar hasta 1L con agua desionizada y ajustar el pH con glicina, no con HCl o NaOH.
- Solución reguladora de transferencia 1X Tris-Glicina pH 8.3  
Tris glicina 10X.....100 mL  
Metanol .....200 mL  
SDS.....1 g  
Agua deionizada.....800 mL  
Ajustar pH antes de aforar con NaOH o HCl
- Solución de bloqueo (PBS pH 7.2, leche descremada svelty ® 5%)  
PBS 1X pH 7.2.....20 mL  
Leche svelty ®.....2 g  
Mezclar en vortex. Usar esta solución recién preparada.

PBS-BSA 1%

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

BSA.....0.1 g

### **Reactivos para el sistema de revelado**

**Solución luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Mezclar un volumen de luminol con un volumen igual de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para una membrana control se requiere 200 µL de dicha mezcla, para un control de dot-blot se requieren 50 µL.

**Solución reveladora Fuji.** Para preparar 400 mL:

1. A 100 mL de agua agregar 99.8 mL de solución A, mezclar bien.
2. Agregar 10.5 mL de la solución B, mezclar.
3. Adicionar 10.5 mL de la solución C, mientras agita.
4. Llevar a un volumen final de 400 mL con agua destilada y mezclar perfectamente (172.2 mL de agua).
5. Almacenar la solución en recipientes ámbar y protegidos de la luz a TA.

**Solución Fijadora.** Para preparar 400 mL:

1. A 100 mL de agua, agregar 100 mL de la solución A y mezclar completamente.
2. Adicionar 15.8 mL de solución B y mezclar bien.
3. Aforar a 400 mL con agua destilada (184.2 mL de agua) y mezclar bien.

4. Almacenar la solución en recipientes ámbar y protegidos de la luz a TA.

**NOTA:** Descartar la solución reveladora si ésta presenta un color café muy oscuro. La solución fijadora se deberá descartar si presenta una coloración amarillenta o café.

**Materiales:**

Tubos de ensaye 13X100

Micropuntas de 100 µL

Micropipetas de 10-100 µL

Pinzas

Recipientes de plástico

Papel adherente transparente

**Equipo:**

Semi-Dry Blotting system, modelo IMM-I-A, no. de serie 11798

Fuente de poder (Ec-Apparatus Corporation, EC500)

**Método:**

1. Correr una SDS-PAGE 12% con una solución de extracto proteico de *G. lamblia* en geles preparativos.
2. Electrotransferirlo a membranas de nitrocelulosa (NC) en condiciones semisecas.

3. Colocar el gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulosa y dos pads (BIORAD) en solución de transferencia 1X, pH 8.3 por 5 a 15 minutos.
4. Organizar de la siguiente manera los pads: pad, membrana de NC, gel de poliacrilamida y pad. Eliminar en cada paso las burbujas que se forman por la solución reguladora pasando un tubo limpio sobre la capa.
5. Electrotransferir en un sistema semi seco (Semi-Dry Blotting System, modelo IMM-1-A, no. de serie 11798) por 25 minutos a 120 mA constantes.
6. Almacenar la membrana de NC a -80°C hasta su uso.
7. Teñir el gel transferido con azul de Comassie para confirmar la adecuada transferencia del antígeno.

### **Inmunodetección:**

1. Bloquear las membranas de NC electrotransferidas con PBS 1X-BSA 1%-leche 5% por 1 h a TA.
2. Enjuagar la membrana con PBS 1X para quitar el exceso de solución bloqueadora.
3. Adicionar el primer anticuerpo a una concentración de 5 µg/mL (AcMo 5G8.B5 y Ac Control de Isotipo 40F) con PBS-BSA 0.1%.

4. Incubar en agitación por 1 h a TA.
5. Realizar 5 lavados con PBS 1X, pH 7.2
6. Adicionar el segundo anticuerpo (cabra anti-ratón  $\alpha$ -IgG peroxidasa conjugada, SIGMA) 1:7500 con PBS-BSA 0.1%.
7. Incubar en agitación por 1 h a TA.
8. Realizar 5 lavados con PBS 1X, pH 7.2
9. Colocar las tiras de membrana en papel transparente y adicionar 100  $\mu$ L de la solución quimioluminiscente: una parte de luminol mas una parte de  $H_2O_2$ .  
Incubar por 10 min a TA.
10. Exponer las tiras de 30-60 s a una película y revelar manualmente.

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

- Exponer la película 10 s en la solución reveladora.
- Enjuagar en agua por 10 s.
- Exponer la película 10 s en la solución fijadora.
- Enjuagar en agua por 10 s y deje secar.

## Anexo 7

### Ensayo de Inmunoadsorción

#### Soluciones:

PBS 1X, pH 7.2 frío.

TYI-S-33 10% NBCS

AcMo 5G8.B5 a 25 µg/mL

Anticuerpo control de isotipo 40F a 25 µg/mL

#### Materiales:

Placas de fondo plano de seis pozos Corning.

Incubadora de CO<sub>2</sub>.

Refrigerador o cuarto frío a 4°C.

#### Método:

1. Cubrir una placa de 6 pozos con la solución de AcMo 5G8.B5 y otra del anticuerpo control de isotipo 40F (25 µg/mL).
2. Incubar 1 h a 37°C.
3. Retirar el exceso de solución de anticuerpo y bloquear la placa con PBS-BSA 1% por 1 h a 37°C.
4. Lavar 5 veces con PBS 1X, pH 7.2 frío.
5. Agregar  $2 \times 10^6$  trofozoítos de *G. lamblia*, previamente incubados a 4°C.

6. Lavar 5 veces con PBS 1X, pH 7.2 frío.
7. Adicionar 2 mL de TYI-S-33 al 10% NBCS, e incubar por 10 min a 4°C.
8. Cosechar las células adheridas y evaluar su expresión por citometría de flujo.

## Anexo 8

### Ensayo de Aglutinación

#### **Soluciones:**

PBS 1X, pH 7.2 frío.

AcMo 5G8.B5 (25 µg/mL).

Anticuerpo control de isotipo 40F (25 µg/mL).

#### **Materiales:**

Placas de fondo plano de seis pozos Corning.

Incubadora de CO<sub>2</sub>.

Refrigerador o cuarto frío a 4°C.

#### **Método:**

1. Cubrir una placa con  $2 \times 10^6$  de trofozoítos de *G. lamblia*.
2. Adicionar diferentes concentraciones (0, 0.625, 1.2, 2.5, 5 y 10 µg/mL) del AcMo 5G8.B5, así como del anticuerpo control de isotipo (CI).
3. Incubarlos 1 h a 4°C.
4. Analizar la generación de grumos por microscopía óptica con un aumento de 10X.

## Anexo 9

Tinción superficial e intracelular de trofozoítos de *G. lamblia*

### Soluciones:

PBS 1X, pH 7.2 frío.

DMEM-N<sub>a</sub>N<sub>3</sub> 0.05%

Paraformaldehído

### Tinción Intracelular:

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

### Tinción Superficial:

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

5. Incubar los trofozoítos por 1 h a 4°C con el anticuerpo anti-ratón IgG de cabra conjugado con FITC (diluido a 1:200 con 0.05% de  $\text{NaN}_3$ -DMEM).
6. Lavar 3 veces con PBS frío.
7. Analizar la expresión de la proteína 5G8 por medio de un citómetro de flujo Becton Dickinson (Canto II FACS, CA, USA), o analizar la expresión de la proteína 5G8 por microscopía confocal.

## Anexo 10

### Aislamiento y Purificación de Anticuerpos Monoclonales

#### Material:

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

#### Procedimiento:

1. Cultivar los hibridomas (40F ó 5G8.B5) en condiciones normales, 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.
2. Recolectar 3 litros del sobrenadante, almacenarlo en congelación hasta su uso.
3. Limpiar con HCl 1 mM una columna Bio-Rad y las mangueras, empaçar en la columna la matriz de sefarosa la cual tiene proteína A.

4. Pasar los 3 litros de sobrenadante por la columna y una vez unidos los anticuerpos a la proteína A, eluir con 1.5 mL de glicina 0.1 M (pH 2.5) y recolectar en distintas fracciones en tubos de vidrio de 13 X 100 con 300  $\mu$ L de trizma 1M (pH8).
5. Determinar la cantidad de proteína presente en las fracciones de interés, utilizando un espectrofotómetro de UV a 280nm, en una cubeta de cuarzo. Almacenar las fracciones con mayor concentración de proteína a  $-80^{\circ}\text{C}$ , hasta su uso.
6. Realizar el pase del sobrenadante tres veces.
7. Mezclar, concentrar y dializar las fracciones seleccionadas. Realizar una SDS-PAGE para observar la pureza de la purificación.

## Anexo 11

### Protocolo de acoplamiento de anticuerpo 5G8 a esferas preactivadas de Sefarosa

#### Método:

1. Preparar 500 mL de solución reguladora de acoplamiento.  
0.1 M NaHCO<sub>3</sub>.....4.2 g  
0.5 M NaCl.....14.61 g
2. Descongelar 2.5 mg de Ac 5G8.B5. Concentración 1 mg/mL.  
Diluir en 300 mL con agua ultrapura, ajustar el pH a 8.3 con NaOH (10 N) y aforar a 500 mL.
3. Colocar el Ac descongelado en una membrana de diálisis.  
Colocar 2.5 mL del Ac (2.5 mg) más 2.5 mL de solución reguladora de acoplamiento, y dializar contra 3 L de solución reguladora de acoplamiento. Utilizar membranas de tubo Spectra/Por3 (MWCO 3,500). Part. Num 132720.
4. Dejar dializando toda la noche a 4°C contra 2 L de solución reguladora de acoplamiento.
5. Remover el Ac del tubo de diálisis con una jeringa.
6. Medir la D.O. de la solución a 280 nm, contra blanco de reactivo.  
Puede ser necesario diluir la muestra 1:20 con solución reguladora de acoplamiento.

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

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

7. Pesar un gramo de sefarosa 4B (activada con bromuro de cianógeno) (Sigma, C-9142), por cada 10 mg de Ac que se recupere en el paso 5 (Por 2.5 mg de Ac recuperado, pesar 0.25 g de sefarosa 4B).
8. Hidratar las esferas de sefarosa con 1 L de HCl (1 mM), esto se hace en un sistema con un embudo de vidrio incorporado a un matraz Kitazato, con una bomba de vacío.  
  
NOTA: No dejar que se sequen las esferas durante los lavados. Incubar por 30 minutos en la solución de HCl (1 mM).
9. Lavar las esferas con solución reguladora de acoplamiento 1X, para eliminar los residuos de HCl. En el último lavado, dejar que el buffer se drene hasta el nivel del tope de las esferas.
10. Transferir las esferas (lo más rápido posible) a un tubo falcon de 15 mL, conteniendo el Ac dializado, raspando el embudo de cristal con una espátula.
11. Colocar el tubo, conteniendo el Ac y las esferas, en un rotador por 2 h a TA (determinar el volumen de la solución de anticuerpo y de las esferas para una posterior determinación de concentración de Ac unido y liberado de las esferas). A este nivel el Ac se acopla a las esferas.

NOTA: El tubo debe estar sellado con parafilm.

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

## Anexo 12

Procesamiento de muestras para espectrometría de masas.

### A. Preparación de muestras a partir de membranas de nitrocelulosa

Método:

1. Sobreponer film revelado sobre tira de nitrocelulosa para ubicar la banda proteica de interés. Cortar pedazo de nitrocelulosa correspondiente a la banda de interés.
2. Lavar tres veces con 1.5 mL de solución reguladora de bicarbonato de sodio 20 mM (pH 7.4) por cinco minutos cada lavado a TA, para remover el anticuerpo pegado seguido de tres lavados adicionales con 1.5 mL de glicina 100 mM (pH 2.4) por 10 minutos cada uno a TA. Finalmente, lavar las bandas con 1.5 mL de solución reguladora de bicarbonato de sodio 20 mM (pH 7.4) por cinco minutos.
3. Bloquear la membrana de nitrocelulosa con 0.55 mL de polivinilpirrolidona (PVP-40) al 0.5% en ácido acético 100 mM a 37°C por 30 minutos.
4. Lavar las bandas de nitrocelulosa seis veces con agua ultrapura para quitar el exceso de PVP-40.

5. Añadir tripsina (12.5 ng/mL en solución reguladora de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 50 mM, pH 8.0) a las bandas de nitrocelulosa y se incuban toda la noche a 37°C.
6. Después de la digestión, las muestras son secadas al vacío, se disuelven en acetona (90  $\mu\text{L}/4\text{mm}^2$  nitrocelulosa). Agitar en el vórtex e incubar por 30 minutos a TA.
7. Remover cuidadosamente la acetona y se secan al aire los péptidos precipitados.
8. Resuspender péptidos en 20  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo al 2% en ácido fórmico al 0.1%.
9. Sonicar (Branson Water Bath Sonifier) las soluciones por 10 minutos antes del análisis por MS.

## B. Digestión manual en gel con tripsina

Método:

Soluciones (preparase al día de su uso):

$\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mM

$\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM en acetonitrilo (ACN) 50%

ACN 50%/ácido fórmico 2%

DTT 10 mM en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM

Iodoacetamida 55 mM en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM

Tripsina 12.5 ng/mL en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM

1. Cortar la banda de proteína teñida (por  $\text{AgNO}_3$  o azul de Coomassie) y, si es mayor que  $1 \text{ mm}^3$ , cortar en pequeños pedazos con un bisturí o navaja sobre una placa de vidrio. Utilizar suficiente agua para evitar que dichas piezas se sequen.
2. Transferir a un tubo eppendorf de propileno de 0.65 mL, quitar el exceso de agua.
3. Lavar brevemente con 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mM, para asegurar que la piezas estén a un pH correcto.

### **Geles teñidos con $\text{AgNO}_3$ :**

4. Añadir solución decolorante a cada tubo e incubar en un agitador hasta que no se observe nada teñido. Lavar las piezas de gel dos veces con  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$

100 mM, de 5 a 10 minutos y otras dos veces con agua ultrapura, hasta que el gel se destiña completamente.

5. Quitar el exceso del líquido, lavar por 5 minutos con 200  $\mu$ L de una solución de acetonitrilo al 50%/  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM al 50% después lavar con ACN al 100% por 5 minutos para deshidratar las piezas de gel. Agitar en vórtex durante las incubaciones. Quitar el ACN y dejar secar por 10 minutos o concentrar al vacío (speedvac) sin calentar. Las piezas de gel deben de presentar una coloración blanca.

#### **Geles teñidos con Coomassie:**

- 4<sup>a</sup>. Añadir con 200  $\mu$ L de una solución de acetonitrilo al 50%/  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM al 50% después lavar con ACN al 100% agitar en vórtex por 10 minutos. Las piezas del gel deben estar claras, si permanecen azules repetir este paso.
- 5<sup>a</sup>. Quitar el exceso de líquido, lavar por 15 minutos con 200  $\mu$ L una solución de acetonitrilo al 50%/  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM al 50%, después 5 minutos con ACN al 100% para deshidratar las piezas de gel. Agitar en vórtex durante las incubaciones. Quitar el ACN y dejar secar por 10 minutos o concentrar al vacío (speedvac) sin calentar. Las piezas de gel deben de presentar una coloración blanca.

### **Reducción y alquilación:**

6. Cubrir las piezas de gel con 50  $\mu\text{L}$  de DTT 10 mM en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mM. Agitar en vórtex, centrifugar brevemente, reducir proteínas de 45-60 minutos a 56 °C.
7. Enfriar a TA, quitar la solución de DTT y añadir 50  $\mu\text{L}$  de iodoacetamida 55 mM en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mM. Agitar en vórtex, centrifugar brevemente, incubar por 45 minutos en cuarto oscuro a TA.
8. Descartar iodoacetamida.
9. Lavar los fragmentos de gel con  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  por 5 minutos en agitación en vórtex después dos veces con ACN 50%/50%  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM por 5 minutos con agitación en vórtex. Deshidratar con 100  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo.
10. Remover el líquido remanente y secar con speedvac,

### **Digestión con tripsina:**

11. Cubrir las piezas de gel con una solución (20  $\mu\text{L}$ ) de tripsina (12.5 ng/mL).
12. Rehidratar los fragmentos de gel a 4°C por 30 minutos en solución reguladora conteniendo  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM y tripsina.
13. Centrifugar brevemente, añadir, más  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  con la finalidad de cubrir los pedazos de gel (25  $\mu\text{L}$ ).
14. Digerir toda la noche a 37°C .

### **Extracción de péptidos:**

15. Transferir el sobrenadante de la solución de digestión dentro de un tubo limpio de 0.65 mL.
16. Añadir a los fragmentos de gel, 30  $\mu$ L de ACN al 50% y ácido fórmico al 2%, incubar y agitar en vórtex por 20 minutos, centrifugar brevemente y sonicar por 5 minutos e baño de agua sin calentar. Remover el sobrenadante y combinar con el sobrenadante de la solución de digestión inicial.
17. Repetir el paso 16, para dar un volumen al extracto de péptido combinando alrededor de 60  $\mu$ L.
18. Agitar en vórtex los extractos digeridos, reducir el volumen (speddvac) de 5-10  $\mu$ L. No deje secar.
19. Tomar el remanente de 5-10  $\mu$ L y centrifugar a 14,000 rpm por 10 minutos para remover micropartículas. Transferir el sobrenadante con bastante cuidado a un tubo de propileno de 0.65 mL. Almacenar la muestra a -80 °C hasta su análisis por espectrometría de masas.

## Anexo 13

Productos obtenidos:

1. I Simposium Internacional en Infección, Nutrición y Regulación de la Respuesta Inmune” CIAD, A.C., USON. Hermosillo, Sonora. 30 y 31 de Octubre, 2008.
2. Participación en la “XVI Reunión de Investigación en Salud 2009” como autor y expositor oral del trabajo “Identificación de Proteínas de Giardia lamblia que inducen la activación de hibridomas de células T”. Comité Estatal Interinstitucional para la Formación y Capacitación de Recursos Humanos e Investigación en Salud”. Con sede en la Universidad Tecnológica de Nogales Hermosillo Sonora. 25 de Abril del 2009.
3. “VII Coloquio Bienal de Ciencias de Materiales. Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales. Hermosillo, Sonora, México. 20-22 de mayo 2009. Quintero-Vargas J., Vega-Fernández M.R., Oviedo-Mora C.A., Briceño-Durán J.P., Rascón-Duran L., Garibay-Escobar A., Figueroa-Ojeda D.C., Hernández-Hernández J.M., Breci L., Astiazarán-García H., Velázquez-Contreras C.A. *Identificación de Proteínas Inmunogénicas de Giardia lamblia que Activan Células T.*
4. Participación con cartel a la Reunión Universitaria De Investigación en Materiales 2009. Departamento de Física de la Universidad de Sonora. 2, 3 y 4 de diciembre 2009. Quintero Vargas J., Rascón-Durán L., Garibay-

Escobar A., Figueroa Ojeda D., Hernández-Hernández J., Breci L., Astiazarán-García H., Velázquez-Contreras C.A. *Identificación de Proteínas de Giardia lamblia Responsables de la Activación de Hibridomas de Células T.*

5. “XIX Congreso Nacional de Inmunología”. Sociedad Mexicana de Inmunología, A.C. Cancún, Quintana-Roo, México. 08-12 de marzo del 2010.
6. “IX Coloquio Bienal de Ciencias de Materiales. Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales. Hermosillo, Sonora, México. 01-04 de marzo 2011. Quintero-Vargas J., Rascón-Duran L., Garibay-Escobar A., Figueroa-Ojeda D.C., Hernández-Hernández J.M., Breci L., Ruíz-Bustos E., Valdez-Ortega M.J., Astiazarán-García H., Velázquez-Contreras C.A. *Reconocimiento Molecular: Identificación de Proteínas Inmunogénicas de Giardia lamblia que Activan a Hibridomas de Células T.*

Publicaciones en revistas indizadas:

- 1. Identification of T-cell stimulating antigens from *Giardia lamblia* using *Giardia*-specific T-cell hybridomas.** Astiazarán-García H, **Quintero J**, Vega R, Briceño P, Oviedo C, Rascón L, Garibay-Escobar A, Castillo-Yañez FJ, Robles-Zepeda R, Hernández J, Velázquez C. *Parasite Immunol* 2009; 31 132–139.
- 2. Identification of an immunogenic protein of *Giardia lamblia* using monoclonal antibodies generated from infected mice.** Jael Quintero, Diana Carolina Figueroa, Rafael Barceló, Linda Breci, Humberto Astiazarán-García, Lucila Rascón, Ramón Robles-Zepeda, Adriana Garibay-Escobar, Enrique Velázquez-Contreras, Gloria León Ávila, Jose Manuel Hernández-Hernández, Carlos Velázquez. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro 2013.