

# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN POLÍMEROS Y MATERIALES

**“Caracterización Química e Inmunológica de Antígenos de  
*Giardia lamblia* que Inducen una Respuesta Inmunológica de  
Tipo Celular”**



**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS DE MATERIALES**

**PRESENTA:**

**JANEL TERESA DE JESÚS QUINTERO VARGAS**

**Hermosillo, Sonora**

**AGOSTO, DE 2008**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



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



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

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunohematología de la Universidad de Sonora bajo la dirección del Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras con apoyo del proyecto CONACYT P-46645M. Jael Teresa de Jesús Quintero Vargas recibió beca tesis del proyecto CONACYT P-46645M.

### **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi Alma Mater por haberme cobijado durante todo el tiempo de formación e instrucción en esta etapa, por tal motivo, espero retribuir en gran medida todo lo que se me ha otorgado.

Al Dr. Carlos Velázquez por su apoyo incondicional en mi formación profesional buscando siempre ese extra mas, gracias por su confianza, dedicación y paciencia.

A mi comité de tesis, al Dr. Enrique Velázquez, al Dr. Juan Carlos Gálvez al Dr. Humberto Astiazarán y a la Dra. Adriana Garibay por sus observaciones para hacer de este trabajo un producto de calidad.

A mis compañeros de laboratorio Anita, Paola, Dora, Claudia, Iracema, Pedro y Martín por compartir jornadas acumuladas de trabajo y estar siempre unidos en la batalla.

A la maestra Lucila Rascón por su calidad de servicio y apoyo incondicional que siempre ha tenido con sus hijos postizos, y por la gran amistad que cultivamos durante todo este preciado tiempo; Dios la bendiga por siempre.

## DEDICATORIAS

A Dios por haberme llamado a llevar su luz a la ciencia y por despertar en mí el deseo de conocer parte de su creación.

A mis padres, Dr. Ramón Quintero y María Vargas por impulsarme a continuar en la lucha diaria y por infundir en mí la fuerza en los días de desánimo, ustedes son la luz que guía mi camino. Estos logros son tanto míos como suyos.

A mis Hermanos Ana, Irene, Ismael y Fernanda por su amor filial que han sido fuente de ánimos y de alegría.

A Carlos Robles por el apoyo incondicional y la paciencia que haz tenido para conmigo, este logro también es tu logro, te amo.

A mis adorables sobrinos Erick, Laisha, Ismaelito, Sergio y Daniela, por llenar de alegría mi vida.

A mis cuñados Sergio, Edgar y Francely por ser parte de mis amores.

A mi abuela Angélica por su tierno cariño que me ha animado a perseverar en mis estudios, gracias abue.

A TODOS mis tíos, a TODOS pero a TODOS mis primos por su inapreciable amor.

A la familia Robles Romo por haber caminado junto conmigo en esta etapa de mi vida.

## INTRODUCCIÓN

*Giardia lamblia* es un protozoo unicelular flagelado. Es el principal responsable de infecciones parasitarias intestinales en el humano a nivel mundial, siendo el causante de la giardiasis. Presenta un ciclo de vida directo, con dos estadios, el quiste (estadio infectivo) y el trofozoíto (estadio vegetativo). La infección se presenta al ingerir alimentos o agua contaminados con quistes de *Giardia*, debido al pH ácido del estómago y a la acción de algunas enzimas digestivas se favorece su desenquistación, y por lo tanto la adherencia de la forma trófica al lumen intestinal, ocasionando la patología de la infección. Las nuevas formas vegetativas adheridas a la mucosa, se multiplican por fisión binaria longitudinal. Algunos trofozoítos se reenquistan en el colon, para protegerse de las condiciones adversas del medio, y son expulsados junto con las heces del hospedero, contaminando agua y alimentos, cerrándose el ciclo de vida (Faubert, 2000).

La giardiasis es la parasitosis intestinal más común en todo el mundo (Adam et al, 2001). La infección puede ser aguda y/o crónica, y sus efectos clínicos varían desde una parasitosis sintomática hasta una asintomática. Las manifestaciones clínicas inician dentro de la primera a la tercer semana posterior a la ingestión de quistes, y se caracteriza por la presencia de un cuadro diarréico agudo con deshidratación, dolor abdominal, náuseas, vómito, hiporexia, pérdida de peso, pudiendo manifestar signos y síntomas relacionados con anemia, diarreas crónicas asociadas con el síndrome severo de malabsorción de nutrientes (Eckmann, 2003; Palm y cols., 2003). La infectividad de *Giardia* depende de factores como la virulencia de la cepa con la cual el individuo se infectó, la dosis ingerida de quistes, la edad y el estado del sistema inmune del hospedero (Faubert, 2000). Los mecanismos por los cuales *Giardia* causa diarrea y el síndrome de malabsorción, no se conocen con

claridad. Los cambios histopatológicos que se desarrollan en la mucosa intestinal, varían de mínimos a severos, suficientes para causar enteropatías, atrofia en microvellosidades intestinales, atrofia en la permeabilidad intestinal, ocasionando malabsorción de grasas, vitaminas, sodio y glucosa, así como la disminución en la actividad de las enzimas digestivas como son proteasas, lipasas y disacaridasas (Goto *et al.*, 2002), pudiendo alterar el desarrollo corporal del huésped, no solo en individuos con infección sintomática, sino que también en individuos con giardiasis asintomática (Astiazarán H., *et al.*, 2000).

En individuos inmunocompetentes esta parasitosis es autolimitada en la gran mayoría de los casos, indicando mecanismos efectivos de defensa en el hospedero los cuales no se conocen con claridad, pero se le adjudican características multifactoriales. Al ser el sistema inmune un factor importante en la erradicación de la infección, diversos autores se han enfocado en el estudio de mecanismos inmunes que involucran el desarrollo, supervivencia y patogénia de *Giardia*.

El equilibrio inmunológico del organismo es desafiado por la presencia del parásito. La inmunidad innata, es la primer línea de defensa del sistema inmune, que involucra mecanismos bioquímicos y celulares no específicos presentes antes de que se produzca la infección y que están preparados para responder con rapidez ante ésta (Du Pasquier L, 2001), como lo son las barreras físicas (epitelios y mucosas) y químicas (moléculas anti-microbianas sintetizadas en las superficies epiteliales), células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos), células linfocíticas (*natural killer*, NK), el sistema del complemento, moléculas mediadoras de la inflamación, entre otras (Abbas y Lichtman, 2004). Contrastando con estos mecanismos, existe otra vía de defensa, en la cual la respuesta se debe a la exposición del agente infeccioso (*G. lamblia*), llamada inmunidad adaptativa. La cual se caracteriza por presentar gran especificidad por diferentes moléculas del parásito y capacidad de

reconocer y responder con mayor intensidad a la exposición del agente, en donde participan tanto moléculas (anticuerpos) con alta especificidad contra el agente, (inmunidad humoral), como células (linfocitos T, CPA, etc) capaces de confrontar al agente infeccioso. Teniendo en cuenta estas bases, es importante conocer los mecanismos inmunológicos involucrados en el control de la giardiasis, así como los procesos de erradicación de la misma.

La giardiasis es considerada un problema de salud pública en diversos países, sobre todo en aquéllos en vías de desarrollo entre los cuales se encuentra México. El Estado de Sonora ocupa el quinto lugar a nivel nacional con esta parasitosis, afectando principalmente a la población infantil (SSA, 2005). El conocimiento que se tiene acerca de los mecanismos de patogénesis y de respuesta inmunológica no son entendidos con claridad, por lo cual la meta principal de este trabajo es la identificación y caracterización de proteínas inmunogénicas de *Giardia*, permitiendonos así profundizar mas en conocimiento de los mecanismos inmunológicos relacionados con ésta parasitosis. Sentando así, las bases moleculares para un futuro desarrollo de medidas profilácticas contra *G. lamblia*.

## ANTECEDENTES

### I.- Generalidades de *G. lamblia*

*G. lamblia* presenta un ciclo de vida directo, con dos estadios, el quiste (estadio infectivo) y el trofozoíto (estadio vegetativo). El trofozoíto se caracteriza por poseer una forma piriforme, convexo dorsalmente, con una superficie ventral cóncava. Posee un disco ventral que le permite adherirse al lumen intestinal. Mide de 12-15  $\mu\text{m}$  de largo y de 5-9  $\mu\text{m}$  de ancho, consta de dos núcleos ovoides, los cuales están situados uno a cada lado de la línea media del cuerpo del trofozoíto, posee un cuerpo medio y cuatro pares de flagelos (anterior, posterior, caudal y ventral) que se originan del cuerpo basal en el polo anterior al núcleo (Figura 1A).

Los quistes son de forma elipsoidal y miden de 7-12  $\mu\text{m}$  de largo, las formas infectivas jóvenes contienen dos núcleos, y los maduros cuatro, los cuales se localizan en un extremo del organismo hasta el momento en que el parásito está listo para dividirse. Se caracterizan por poseer una rígida membrana externa rica en residuos de cisteína, y presenta un componente de galactosamina. Los quistes son capaces de sobrevivir por 3 meses en agua a 4°C (Faubert 2000), y son resistentes a procesos de cloración, lo que favorece la transmisión de la infección (Figura 1B).



**Figura 1.- Micrografía de *G. lamblia* A) Trofozoíto; B) Quiste.**

(Tomado de: [www.sfgate.com](http://www.sfgate.com) y [www.esmag.com](http://www.esmag.com), respectivamente.)

*G. lamblia* es considerado el microorganismo de más temprana división en la línea eucariótica de descendencia, debido a la carencia de organelos prominentes, que caracterizan a una célula eucariótica, como mitocondrias y peroxisomas (Adam, 2001), así como la presencia de retículo endoplásmico (RE) y aparato de Golgi anormales. Por estas razones el estudio biológico de *Giardia*, permite obtener el conocimiento sobre la evolución temprana de estructuras, así como de vías de transporte o síntesis de proteínas de células superiores eucarióticas, y sus adaptaciones celulares tardías en su estilo de vida parasítico.

Debido a la importancia clínica y evolutiva observada en *Giardia*, se ha secuenciado el genoma del parásito, lo cual lo convierte en un modelo de estudio muy atractivo para distintas líneas de investigación (Staffan, *et al.*, 2003).

## Características Antigénicas de *G. lamblia*

A lo largo de las últimas dos décadas, se ha logrado la identificación de ciertas moléculas importantes relacionadas con mecanismos de sobrevivencia de *Giardia* (Moore, 1982). Dentro de las principales moléculas aisladas se han encontrado *proteínas de choque térmico* (HSP, Heat Shock Protein) que son liberadas en respuesta a estrés por cambios bruscos de temperatura y pH; *lectinas*, que son glicoproteínas que se unen a azúcares específicos, se sugiere que juega un papel en los mecanismos de adhesión del trofozoíto a la superficie del intestino, localizadas en la superficie de membrana del trofozoíto. Muchas de las proteínas que se encuentran asociadas al citoesqueleto de *Giardia*, como lo son las *alfa-1 giardinas* y *7 giardinas*, *beta giardina* y la *alfa y beta-tubulina*, localizadas tanto en citoesqueleto y flagelos. Se han reportado otras relacionadas con funciones metabólicas como la alfa-enolasa, fructosa-1,6-bisfosfato aldosa, arginina deaminasa y ornitina carbamoil transferasa (Faubert, 2000, Malin *et al*, 2003, Adam, 2001, Weiland *et al*, 2003, Bienz *et al*, 2001, Téllez *et al*, 2005 y Nash, 2002).

De los diversos aislados de *Giardia* (WB, GS/M-83-H7, P-1, Nat, ES, ES/M, NIH, entre otras) se han encontrado diferencias en cuanto a su perfil de bandas detectadas en ensayos de electroforesis de agarosa para ADN con enzimas de restricción (Nash y Keister, 1985) que sugieren una composición proteínica diferente entre un aislado y otro, lo cual no es sorprendente, debido a las diferencias bioquímicas que existen entre las cepas, por lo cual resulta difícil la comparación de resultados entre distintas cepas, así como entre un laboratorio y otro.

Actualmente se utilizan diversas técnicas para poder conocer químicamente a las moléculas a través de la práctica de la tecnología proteómica. Dentro de los principales procedimientos se encuentra SDS-PAGE, electroforesis bidimensional y espectrometría de masas, en el cual nos enfocaremos en este estudio.

## II.- Espectrometría de masas

### **Generalidades de espectrometría de masas**

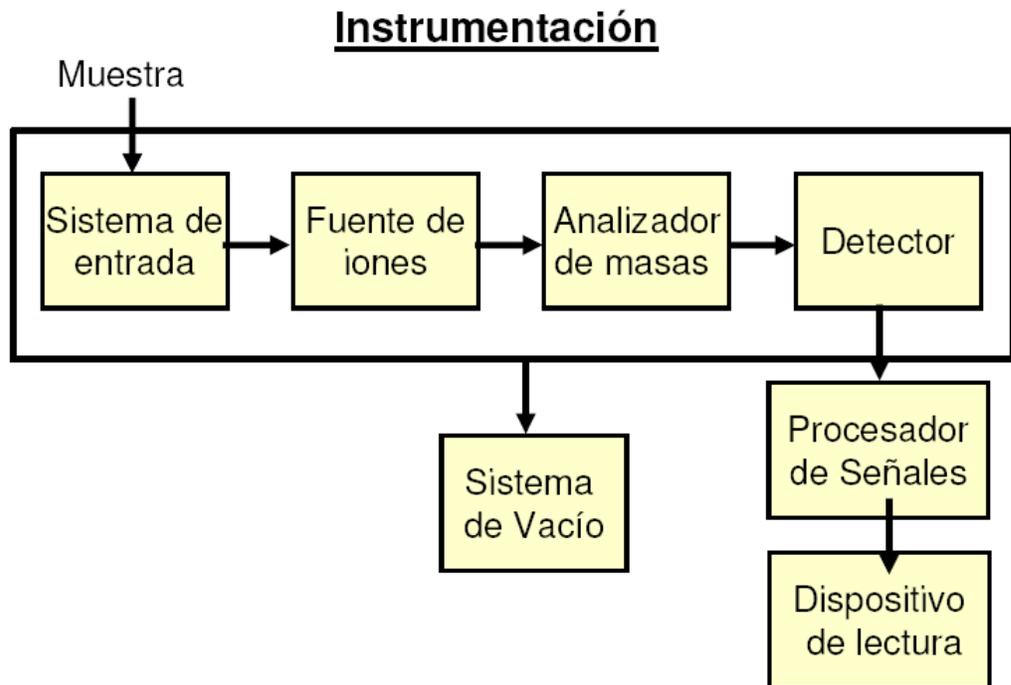
La espectrometría de masas es una técnica analítica que nos permite identificar y determinar estructuras, así como analizar trazas de moléculas en una mezcla química, obteniendo así la masa molecular y la abundancia de los componentes de dicha mezcla. Además nos permite estudiar interacciones no covalentes como el análisis de la unión proteína-ligando, con los cuales podemos identificar los ligandos específicos a determinados receptores. La combinación de espectrometría de masas con otras técnicas de separación como electroforesis bidimensional (2-D PAGE) y técnicas separativas líquidas como cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) y cromatografía líquida (LC) nos permite el fraccionamiento e identificación de proteínas partiendo de una mezcla heterogénea. (Erra, 2004).

### **Procedimiento**

El procedimiento de espectrometría de masas consta de varias fases, la introducción de la muestra, ionización, analizador de masas y detector de señal (Fig. 2).

### **Sistema de inducción de la muestra**

Inicialmente la muestra (proteínas) es digerida con una enzima (típicamente tripsina), la cual tiene un sitio de corte en las terminaciones carboxílicas de los aminoácidos arginina y lisina. Las muestras son inyectadas al equipo por una jeringa.



**Figura 2.- Esquema del procesamiento de una muestra en un espectrómetro de masas.** La muestra introducida al equipo sufre una fragmentación generando iones, éstos son pasados al analizador de masas y al detector para posteriormente analizar las señales obtenidas.

### **Sistema de Ionización**

Las fuentes de Ionización que existen son varias. Si la ionización es en fase gaseosa se utilizan las técnicas de impacto eléctrico (EI), ionización química (QI) y ionización de campo (FI). Por otro lados, si la ionización es en fase líquida, las técnicas utilizadas son: desorción de campo (FD), bombardeos con átomos rápidos (FAB), espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS), ionización por termonebulización (TS), ionización por electrovaporización (ESI, Electrospray Ionization), ionización química a presión atmosférica (APCI), desorción de matriz asistida por LASER (MALDI).

El sistema de ionización por elección para el análisis de péptidos es ESI, el cual nos provee de la formación de una familia de iones, a partir de un ión generado por la acción de desolvataciones. Ésta técnica no interfiere con los enlaces covalentes débiles o no covalentes, lo cual permite la observación de fragmentos de moléculas de proteínas, se utiliza en análisis puros, polares o polarizables y únicamente con solventes polares.

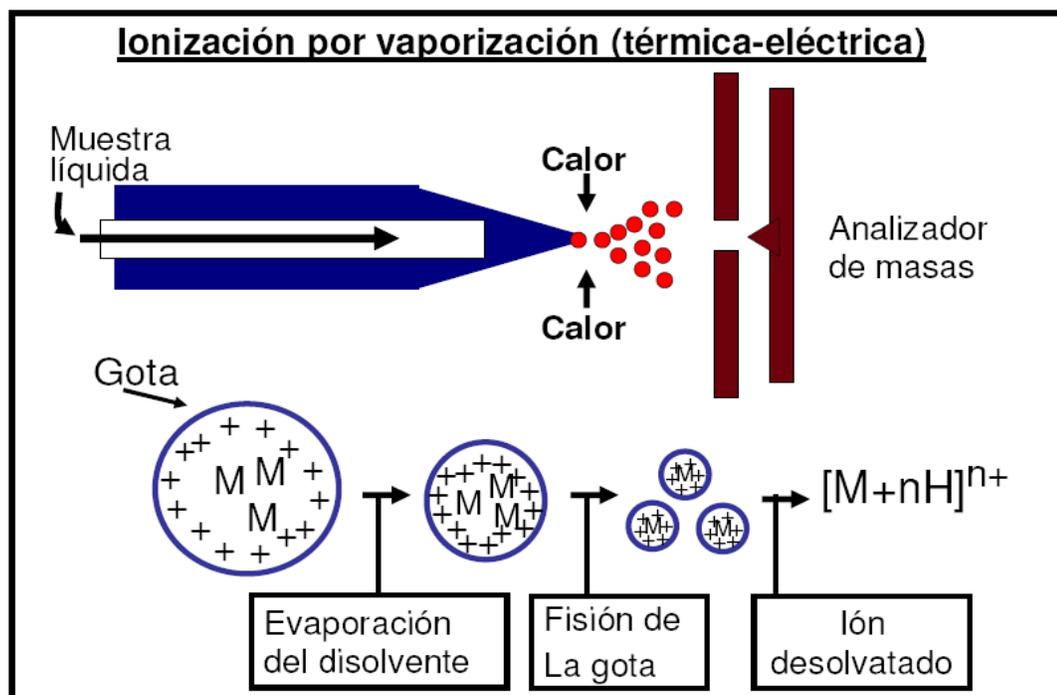
ESI es una técnica que requiere tener al analito en solución en un medio polar para poder aplicar un elevado campo eléctrico sobre él y poder generar iones moleculares gaseosos intactos. ESI genera una familia de iones moleculares policargados ( $z > 1$ ) a partir de un analito un determinado peso molecular ( $m$ ).

### **Electrovaporación (ESI)**

La ionización por ESI se basa en la generación de una nube de gotas, formadas por un solvente polar, cargadas eléctricamente, que son sometidas a la acción de un campo eléctrico fuerte. Los iones analizados pueden corresponder a moléculas enteras o a fragmentos de ellas.

El analito se introduce en una aguja, al equipo, que es mantenida en un alto potencial eléctrico. Al final de la aguja, la solución es dispersada en pequeñas gotitas altamente cargadas conteniendo moléculas de proteínas. Las microgotas cargadas electrostáticamente son sometidas a un fuerte campo eléctrico, sufren una contracción de volumen y sus componentes pasan al estado gaseoso, cuando el número de cargas electrostáticas del mismo signo, que se encuentran en la superficie de la gota, es mayor que las que puede estabilizar una gota del mismo tamaño teniendo en cuenta las repulsiones de Coulomb, se produce la explosión de Raleigh que es la liberación de moléculas de la superficie de la gota que pasan al estado gaseoso llevándose una o varias

cargas, con la finalidad de disminuir el número de cargas y las fuerzas repulsivas en la superficie. Dicha explosión genera una microgota cargada electrostáticamente de menor tamaño, la cual sigue teniendo en su superficie un número alto de cargas del mismo signo, y que por la acción del campo eléctrico aplicado, vuelve a contraerse, y si no cumple con la relación número de cargas repulsivas en la superficie de nuevo se produce una explosión de Raleigh (Fig. 3).



**Figura 3.- Proceso de ionización al cual son sometidas las moléculas por el método de ionización ESI.** La muestra se encuentra contenida en pequeñas gotas de solvente poliacargadas ( $z > 1$ ), debido a la inestabilidad que sufre en la superficie, las mismas explotan formándose pequeñas gotitas de solvente con las moléculas del analito.

Con las sucesivas contracciones y explosiones de la gota se van generando moléculas gaseosas ionizadas de los componentes originales de la misma, y por tanto de la solución de partida. Estos iones formados son transportados a la cámara de vacío del espectrómetro de masas, en donde son separados y detectados de acuerdo a su relación de masa/carga.

### **Aceleración de Iones**

Estos iones producidos son transferidos al analizador donde son acelerados y separados según su relación masa/carga ( $m/z$ ) utilizando diferentes principios físicos según el tipo de analizador que puede ser sector magnético y/o eléctrico, cuadrupolos, trampas de iones, analizadores de tiempo de vuelo, FT-ICR.

El acelerador de iones que se utilizó en este trabajo fue la trampa de iones cuadrupolar (QIT, Quadrupole Ion Trap)). El QIT consiste en tres electrodos hiperbólicos. Al aplicar un voltaje se genera un potencial de campo cuadrupolar en tercera dimensión, en donde los iones quedan atrapados en una trayectoria oscilante, pero estable. Durante la detección de los iones, el sistema de electrodos altera este movimiento oscilante y produce inestabilidades en la trayectoria de los iones y por lo cual éstos son liberados.

### **Detector**

Los iones procedentes del sistema acelerador llegan al detector el cual generalmente está constituido por un cátodo emisor que al recibir el impacto producido por las partículas cargadas emite electrones.

Estos electrones son acelerados hacia un diodo el cual emite varios electrones más al recibir el impacto de cada electrón. Este proceso se repite varias veces hasta obtenerse una cascada de electrones que llega al colector

lográndose una corriente fuertemente amplificada. La corriente obtenida puede amplificarse de nuevo por procedimientos electrónicos y se lleva a un sistema registrador.

### III.- Respuesta Inmune contra *G. lamblia*

La respuesta inmune contra *Giardia*, depende de diversos factores, y dentro de los más importantes se encuentra el estado inmunológico del hospedero. Debido a esto se ha investigado la participación de la respuesta innata y adaptativa en los mecanismos de eliminación de la infección tanto en humanos como en modelos animales de experimentación.

#### **Inmunidad Innata contra *G. lamblia***

Los primeros mecanismos involucrados en la respuesta inmune contra *Giardia*, pertenecen a elementos de la inmunidad innata. Debido a las características biológicas de *Giardia*, es muy probable que participen factores no inmunes en la susceptibilidad a la infección o en la duración y severidad de la misma. Por ejemplo, la leche materna humana posee actividades anti-giardíacas al eliminar a los trofozoítos independientemente de la presencia de anticuerpos secretorios específicos (IgA) (Gillin *et. al* 1983). Dicha actividad es atribuída a la presencia de sales biliares conjugadas, ácidos grasos insaturados y ácidos grasos libres (Faubert, 2001).

Aley (1994), reportó la actividad anti-giardíaca de péptidos catiónicos (defensinas) producidos por neutrófilos, que tienen la capacidad de destruir a los trofozoítos de *Giardia*, cuando son adicionadas a los medios de cultivo, con esto se demuestra la importancia de mecanismos inmunológicos no específicos en el control de la infección.

Existen mecanismos efectores a nivel de mucosas como lo son productos antimicrobianos, sintetizados por células epiteliales, como lo es el Óxido Nítrico (NO) que presenta una actividad amplia contra bacterias y parásitos patógenos (Fang, 1997, Brunet, 2001). Dichas actividades están

relacionadas con la neurotransmisión y regulación de la integridad de la barrera mucosal en el intestino (Wallace *et al*, 2000), evitando el desarrollo de los trofozoítos e inhibiendo la enquistación y desenquistación del parásito, son eliminarlos (Eckmann *et al*, 2000). Uno de los mecanismos de evasión de esta respuesta es la producción de inhibidores de dicha actividad contra *Giardia*.

Los mecanismos celulares inespecíficos relacionados con el control de la giardiasis están gobernados por la secreción de moléculas relacionadas con procesos inflamatorios y de hipersensibilidad llamadas interleucinas. Éstas moléculas, han sido relacionadas con procesos inflamatorios y de diferenciación de linfocitos B, como lo es la interleucina 6 (IL-6), que es un homodímero cuyo tamaño es de 19-26 kDa y es considerada como una proteína multifuncional que se produce por un gran número de células, incluyendo linfocitos T y macrófagos. En ratones deficientes de IL-6 infectados con trofozoítos de *G. lamblia* no fue posible el control de la fase aguda de la infección (Akira *et al*, 1995). De igual manera se han evaluado las interleucinas IL-2, IL-4 e IL-10 (glicoproteína de 14-17kDa, 18 kDa y 34-40 kDa, respectivamente) en pacientes con giardiasis, observándose que la interleucina con mayor título fue la IL-2, seguida de la IL-4, mientras que la IL-10 no mostró elevación. Por lo cual, los autores concluyen que la respuesta inmunológica T<sub>H</sub>2 es una vía predominante en el aclaramiento de la infección, ya que la IL-2 es un factor de crecimiento para linfocitos T estimulados por el antígeno, así como la expansión clonal de los mismos y la IL-4 estimula la aparición de linfocitos T<sub>H</sub>2 (Bayraktar *et al*, 2005).

Se ha estudiado la capacidad inflamatoria de *Giardia* en el hospedero y la relación que se presenta con algunas proteínas indicadoras de procesos inflamatorios como lo es el factor de necrosis tisular (TNF). Esta proteína es un homotrímero de 51 kDa producido principalmente por linfocitos T y macrófagos. La síntesis del TNF se desencadena fuertemente por la presencia de moléculas

de bacterias gram-negativas y de otros microorganismos infecciosos. En el caso de la giardiasis, se ha encontrado que TNF juega un rol importante en el control de la enfermedad. Ratones tratados con anticuerpos neutralizantes de TNF o deficientes de TNF, fueron infectados con trofozoítos de *Giardia*, y se observó en el intestino delgado de estos ratones un gran número de parásitos, indicando que TNF es importante para el control de la infección (Zhou, *et al.* 2007).

Dentro de las diferentes estirpes celulares en la respuesta inmune innata, se ha encontrado que los mastocitos juegan un papel importante en el control de la infección en modelos murinos, donde se observan cúmulos de células de mastocitos en el intestino delgado durante el aclaramiento de la infección (Erqiu Li *et al.*, 2004, Hardin, *et al.*, 1997).

El efecto anti-giardia de sueros provenientes de individuos infectados, aparenta ser también dependiente de la presencia de la vía clásica del complemento. Ésto se demostró al observar que el suero de un paciente con giardiasis puede eliminar más del 98% de trofozoítos en ensayos *in vitro*. Este efecto fué eliminado al calentar el suero a 56°C por 30 minutos, condiciones conocidas que inactivan el sistema de complemento (Hill, *et al.*, 1984).

Otros mecanismos innatos que contribuyen al aclaramiento de la infección es el movimiento peristáltico del intestino (Falk PG, 1998 y Cebra JJ, 1999). Existen muchas especies patógenas que compiten por espacios libres en la mucosa del intestino y que gracias a los comensales, su patogénia no puede llevarse a cabo. La flora normal puede inhibir la infección por *G. lamblia* a través diferentes mecanismos que incluyen la competencia por recursos alimenticios, toxicidad e inducción de respuestas inmunes cruzadas. Dichos efectos son observados en ratones deficientes de RAG, los cuales carecen de respuestas inmunes adaptativas (Nash y Singer, 2000)

## **Respuesta Inmune Humoral contra *G. lamblia***

En contraparte, existen mecanismos inmunológicos capaces de aclarar la infección como lo es la respuesta inmune humoral (mediada por anticuerpos). *G. lamblia* se duplica y se adhiere en la parte superior del intestino delgado, en donde el Tejido Linfoide Asociado a Mucosas (MALT) se encuentra involucrado en los procesos de eliminación de la infección (Fagarasan and Honjo, 2003). La importancia funcional de este tejido se debe a la presencia de un gran número de células plasmáticas, reconocidas por ser grandes productoras y secretoras de anticuerpos IgA (primariamente). Esta característica ha sido el motivo por el cual la mayoría de los estudios de la respuesta inmune contra *Giardia* se han avocado en la respuesta inmune humoral.

Diversos reportes de investigación describen a los linfocitos B como células infalibles para la erradicación de la giardiasis (Singer, 2000), ya que durante esta infección se observa una elevación en los títulos de anticuerpos (IgA en mucosas, IgM e IgE en suero) relacionados con respuestas contra agentes infecciosos que afectan el tracto intestinal. En pacientes hipogammaglobulinémicos, la importancia de la respuesta inmune humoral es crítica, debido a que por la ausencia de inmunoglobulinas, desarrollan cuadros clínicos prolongados de giardiasis, e incluso una giardiasis crónica. (Faubert, 2000; Palm y col, 2003).

En estudios *in vitro* se ha demostrado la actividad anti-giardia de anticuerpos contra trofozoítos, utilizando sueros de pacientes con giardiasis, que en su mayoría contenían IgA, y que es responsable de la actividad (Faubert, 2000). Por otra parte ciertos anticuerpos específicos anti-*giardia* como IgM e IgG, presentan actividades tóxicas para el trofozoíto a través de mecanismos dependiente o independientes del sistema del complemento (Nash, 1986). En ratones carentes de linfocitos B, así como animales

deficientes de IgM, IgG e IgA, se ha reportado el desarrollo de giardiasis crónica (Adam, 1991; Faubert 2000).

### **Respuesta Inmune Celular contra *G. lamblia***

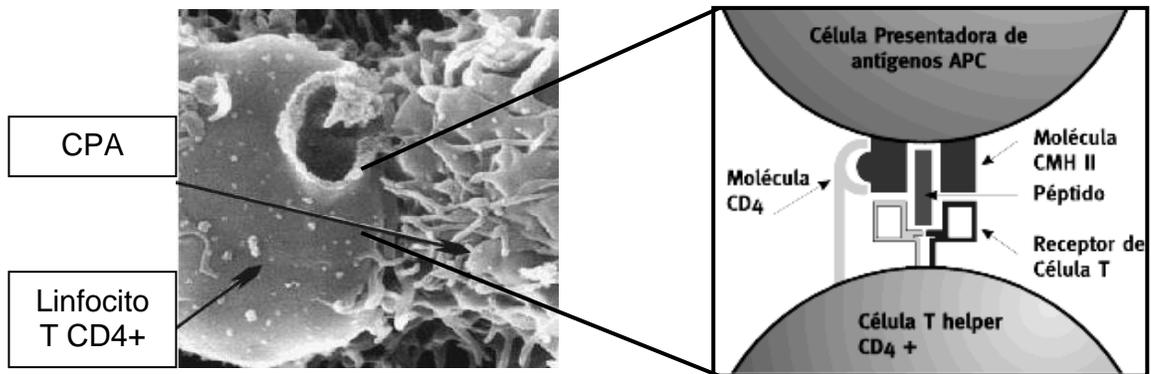
En la actualidad, son muy pocos los estudios enfocados en la respuesta inmune celular durante la giardiasis. El papel desempeñado por las células B y T durante la giardiasis ha sido bien documentado, pero la identificación y caracterización de antígenos de *Giardia* que estimulan una respuesta inmune celular son muy limitados o nulos. Se ha reportado que la inmunidad mediada por células (linfocitos T) juega un papel importante en la eliminación de la infección. Se ha reportado la proliferación de linfocitos T a nivel de mucosas y sangre periférica en individuos infectados con *Giardia*, observándose títulos altos de moléculas como INF- $\gamma$  (Ebert, 2000). En infecciones experimentales con *Giardia ssp.* en ratones, se ha ilustrado la importancia de INF- $\gamma$  en la eliminación de la infección, así como se demostró que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> producen esta citocina después de la estimulación con *Giardia* (Ebert, 1999).

En estudios con ratones deficientes de ciertas poblaciones celulares, han demostrado que los linfocitos T CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  son requeridos para la eliminación de la infección (Singer y Nash, 2000), mientras que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y linfocitos NK (Natural Killer) no juegan un papel importante (Heyworth *et al*). En ratones atímicos infectados (carentes de linfocitos T) se han detectado disminución en daños a nivel de microvellosidades y en la reducción de la actividad de ciertas enzimas (disacaridasas). La reconstitución del timo con células T de un ratón infectado con *Giardia* disminuyó la carga parasítica en intestino, pero aumentó la atrofia de las microvellosidades intestinales (Thomson y Mitchell, 1988). El flujo creciente de linfocitos intraepiteliales durante la infección por *Giardia* (Von Allmen, *et al*, 2004) en ratones es regulado por células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (Scott, *et al* 2004).

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) (Scout *et al*, 2004). En individuos con giardiasis sintomática 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 (El-Shazly, 2003).

## **Reconocimiento Antigénico por parte de Linfocitos T**

Los mecanismos de defensa del organismo se activan al ingresar al hospedero microorganismos extraños. En la respuesta inmunológica celular los linfocitos B y T están profundamente involucrados. Las células B se activan al tener un contacto directo con el microorganismo y desencadena una respuesta inmunológica humoral, mientras que las células T no tienen contacto directo, 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 moléculas antigénicas (péptidos) del microorganismo e inician el procesamiento las mismas hasta exponerlas en su superficie con la ayuda de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (clase I ó II), para el posterior reconocimiento por parte de los linfocitos T a través de su receptor de células T (RCT). Este reconocimiento de péptidos, es un evento esencial que da inicio a una respuesta inmune celular. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> reconocen antígenos en una forma relativamente corta (8-11 aminoácidos), en fragmentos de proteínas (péptidos) unidos al complejo principal de histocompatibilidad I (MHC clase I), mientras que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> reconocen antígenos de mayores longitudes unidos al MHC clase II (12-25 aminoácidos) (Fig. 4). Gracias a la cristalografía de rayos X se conocen las estructuras de las moléculas del MHC (clase I y II), así como la forma en que éstos interaccionan con los péptidos presentados (Fremont, and Unanue, 1998).



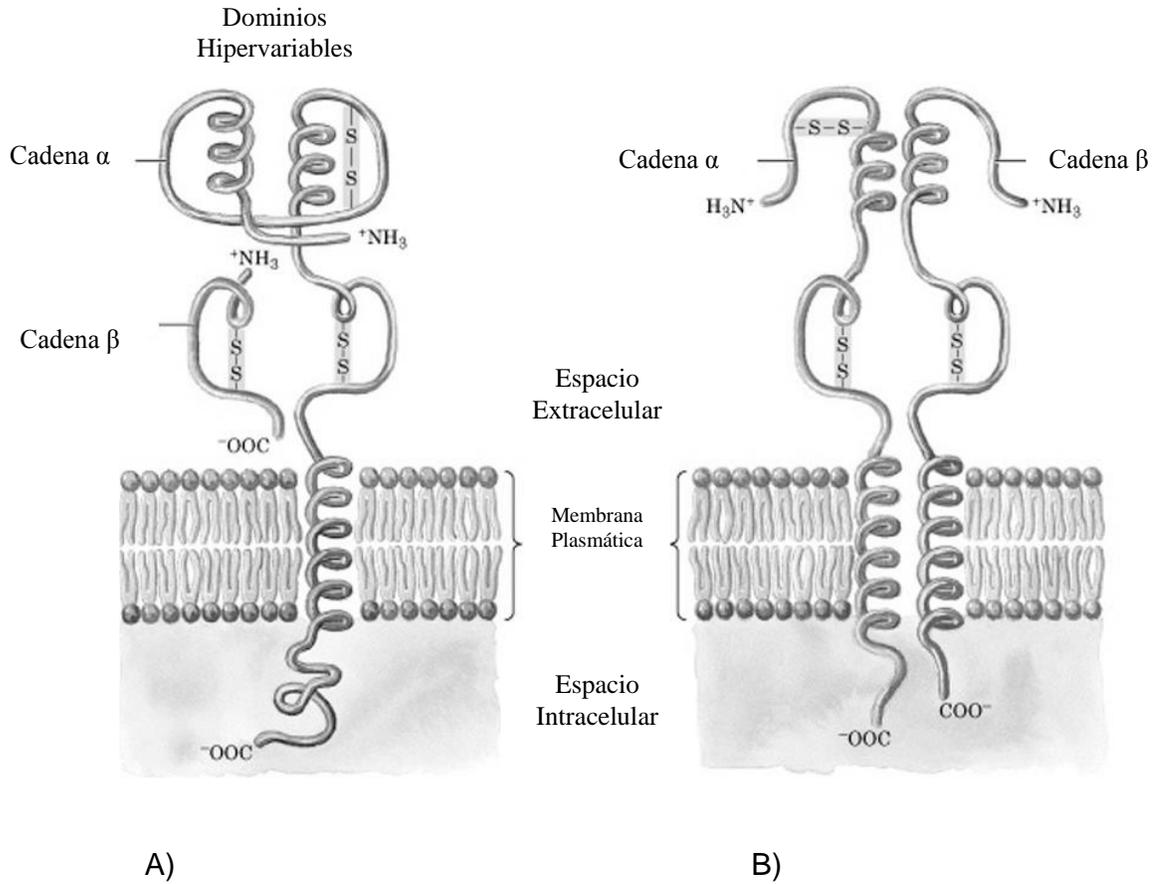
**Figura 4.- Interacción célula presentadora de antígeno y linfocito T CD4<sup>+</sup>.** Las células presentadoras de antígeno profesionales, presentan pequeñas fracciones de proteínas con la ayuda de moléculas del complejo de histocompatibilidad clase II, a receptores de células T de linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

Las moléculas del MHC clase I son expresadas ubicuamente en las estirpes celulares nucleadas. En contraste, las MHC clase II son expresadas en CPA como Linfocitos B, células dendríticas (CD) y macrófagos, y en menor proporción en otros tipos celulares como: fibroblastos, células endoteliales de intestino, mastocitos, etc. (van Bergen J, 1999).

Las moléculas del MHC clase I y II son proteínas de membrana integrales de tipo I. Presentan tres regiones, una citoplasmática (cola carboxílica), otra transmembranal (25 aminoácidos hidrófobos transmembranosos) y por último la región extracelular, en la cual se localiza una hendidura de unión a péptidos y presenta residuos polimorfos, que son aminoácidos que varían entre los diferentes alelos del MHC.

Las moléculas del complejo MHC clase I (Fig. 5A) 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 (de peso molecular de 12 kDa) el cual es codificado por un

cromosoma distinto al de las moléculas del MHC. Este dímero se estabiliza al asociarse un péptido antigénico y son reconocidas por su RCT (Receptor de Células T) por los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Las moléculas del MHC clase II (Fig. 5B) son también glicoproteínas de membrana de tipo I, que consisten de dos cadenas, la cadenas  $\alpha$  (de 32-34 kDa) y la  $\beta$  (de 28-29 kDa), unidas entre si covalentemente por puentes disulfuro, son reconocidas por los RCT de los linfocitos CD4<sup>+</sup>. Los segmentos aminotermiales  $\alpha$ 1 y  $\beta$ 1 (así como los segmentos  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 del MHC 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.



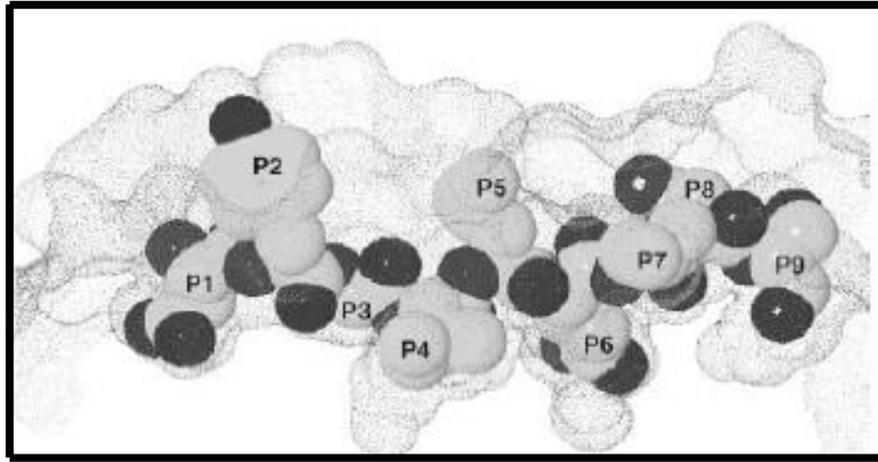
**Figura 5.- Representación Esquemática del Complejo Principal de Histocompatibilidad.** A) MHC clase I, B) MHC clase II. Las moléculas del MHC son glicoproteínas de membrana que presentan tres regiones, la extracelular donde se encuentra el sitio de unión a péptidos, la transmembranal y la intracelular. 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 MHC-péptido se ha demostrado similitud en las conformaciones de la unión peptídica a las moléculas de MHC 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 a la molécula de MHC, restringen la longitud de los péptidos de 8 a 10 aminoácidos. 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 (de 10-28 aminoácidos). Las moléculas de MHC han sido caracterizadas 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 que responsables de generar una respuesta inmunológica.

La afinidad con la cual se une el MHC 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 MHC. Las interacciones químicas gobernadas en estas uniones son de tipo reversible debido a la naturaleza del comportamiento de asociación y disociación del complejo RCT-pMHC, y los principales tipos de unión son: puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals y en menor proporción los puentes salinos (García, KC, *et al* 1998). Gracias al estudio cristalográfico se ha determinado la estructura química del MHC y se ha encontrado un sitio de gran polimorfismo el cual interacciona con los péptidos que le son presentados a las células T, este surco de unión a péptidos está conformado por cinco

bolsillos o 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. Esto trae como resultado la unión de la molécula de MHC y del péptido con la combinación satisfactoria de la preferencia de cada bolsillo de unión. Los bolsillos P1, P4, P6, P7 y P9 interaccionan con los aminoácidos de las cadenas residuales de los péptidos, mientras que los bolsillos P2, P5 y P8 interaccionan con el RCT (Fig. 6) (Fremont DH *et al*, 1998). El primer aminoácido de la zona *core*, es el P1 y se localiza en el extremo N-terminal del motivo, es el más importante para la interacción y se denomina ancla.

El pocket 1 (P1) presenta una fuerte preferencia por el ácido aspártico. Según estudios cristalográficos se ha observado que este ácido embona perfectamente en el sitio P1 del MHC haplotipo I-A<sup>K</sup> (Fremont DH *et al*, 1998). El P1 es el de mayor relevancia en la interacción MHC-péptido, debido a que al inducir sustituciones del ácido aspártico en P1 por asparagina causa cambios desfavorables en la unión peptídica. El pocket 4 (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 pocket 6 (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 pocket 7 (P7) presenta poca restricción, y gran diversidad de residuos se han encontrado en este sitio. Finalmente, el pocket 9 (P9) preferentemente acepta residuos pequeños, comúnmente serina o treonina (Fig. 6) (Fremont DH *et al*, 1998).



**Figura 6.- Representación Esquemática de los pockets de las moléculas de MHC Clase II (haplotipo I-A<sup>K</sup>).** Superficie de la hendidura de unión a péptidos del complejo pMHC. (Tomado de Fermont DH, D Monnale, CA Nelson, WA Hendrickson y ER Unanue. Crystal Structure of I-A<sup>K</sup> in Complex with a Dominant Epitope of Lysozyme. *Immunity* 8:305-317,1998)

### **Procesamiento y Presentación de Antígeno**

Los péptidos reconocidos por los linfocitos CD4<sup>+</sup> son en su mayoría derivados de proteínas exógenas que requieren cierta forma de procesamiento antes de ser accesibles a unirse a las moléculas de MHC clase II (Harding 1997; Riese y Chapman, 2000; Villadangos, Ploegh 2000). 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 debido a la reducción de los puentes disulfuro presentes en las diferentes proteínas (Jensen, 1995). De manera consecutiva

se presenta una degradación del antígeno por la acción de proteasas (principalmente cisteinil, asparatinil) a pH bajo (Watts, 2001).

Las moléculas del MHC 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) (Busch *et al*, 2000). El complejo MHC-Ii son transportados en endosomas, incluyendo compartimentos multilamelares y multivesiculares, o en fagolisosomas (Ramachandra y Harding, 2000). Este complejo junto con moléculas accesorias como el HLA-DM y HLA-DO regulan la carga de los péptidos a las moléculas MHC clase II (Busch *et al*, 2000). Dentro de la hendidura de unión a péptidos del MHC 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 excitados en la superficie celular para la presentación a linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Robinson y Delvig, 2002).

### **Espectrometría de Masas y Proteínas**

Actualmente, la secuenciación peptídica mediante EM es uno de los procedimientos más utilizados en proteómica para la identificación de proteínas. La identificación se lleva a cabo mediante la secuenciación de uno o más péptidos obtenidos por digestión enzimática de la proteína de interés. La digestión se lleva a cabo comúnmente con una enzima específica como la tripsina, que produce péptidos de digestión con unas características de secuencia que producen espectros de fragmentación muy informativos y que facilitan la determinación de la secuencia. Así, la tripsina produce péptidos de un tamaño medio (entre 500 y 1800 Da) muy adecuado para la secuenciación.

EM es una herramienta analítica que ha sido utilizada para identificar moléculas pequeñas, como péptidos. Para que se induzca una respuesta inmunológica celular es esencial que los péptidos antigénicos sean expuestos en las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad y sean reconocidos por los RCT. Las moléculas de MHC se unen a péptidos reconociendo solamente una pequeña secuencia de aminoácidos (core peptides) de nueve residuos. Las dos clases de moléculas difieren en el tamaño de los bolsillos de unión a péptidos. El sitio de unión a péptidos de las moléculas MHC clase II, permite tener una heterogeneidad de longitudes de péptidos, complicando así la localización de los motivos de unión, ya que no presentan una posición común respecto a las terminaciones de péptido (Rudensky, *et al*, 1991). En la secuencia de aminoácidos de 9 residuos, las posiciones 1, 4, 6, 7 y 9 son las de mayor importancia.

Espectrometría de masas permite también la estimación individual de los péptidos así como su complejidad respecto a todo el repertorio de péptidos (Hunt *et al*, 1992). De tal modo que como resultado final del procesamiento y presentación de proteínas antigénicas, las CPA exponen una gran cantidad de diferentes péptidos de los cuales unos cuantos serán reconocidos y estimularán una respuesta inmunológica. Por lo cual, la cantidad de complejos p-MHC requeridas para el reconocimiento por parte de los linfocitos T varía de miles a uno solo (Crotzer *et al*, 2000).

El predecir la afinidad de un péptido es importante para el desarrollo racional de vacunas (Godkin *et al*, 2001). Teniendo el conocimiento sobre las preferencias de aminoácidos que presenta la molécula de MHC, es posible predecir los epitopes responsables de la unión de una proteína en específico. Utilizando algoritmos (tal como SYFPEITHI) que nos provean de información acerca de los péptidos formados para conocer su afinidad para interactuar con las moléculas del MHC.

El objetivo principal del presente estudio es el identificar y caracterizar proteínas inmunogénicas de *G. lamblia* que estimulan a células T, con el fin de evaluar la respuesta inmune celular durante la giardiasis. El análisis de la respuesta inmunológica durante la giardiasis se ha avocado principalmente al estudio de la respuesta inmune humoral, pero son pocos los reportes que han asociado a los mecanismos celulares y moleculares que intervengan en la erradicación de la infección. Estos estudios se respaldarán con la utilización de metodologías inmunológicas como la producción de hibridomas específicos contra *Giardia*, así como de espectroscopía de masas para poder elucidar la secuencia de aminoácidos de dichos péptidos, apoyándonos en bases de datos que provean información a cerca de la secuenciación del genoma de *G. lamblia* para una mejor caracterización química y molecular de las proteínas. La identificación de moléculas del parásito relevantes para el sistema inmune favorecerá nuestro entendimiento de la interacción *G. lamblia*–hospedero, y sentará las bases moleculares que ampliarán nuestro conocimiento acerca de los mecanismos inmunológicos relacionados durante una infección con *G. lamblia*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Animales de Experimentación**

Se utilizaron ratones de la cepa singénica C3H/HeJ (000659) de 8-12 semanas de edad, adquiridos en The Jackson Laboratories (Maine, USA). EL mantenimiento de los ratones se llevo a cabo 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.

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

El mantenimiento de los cultivos de *G. lamblia* (cepas GS/M-83-H7 (ATCC 50581) y WB cepa C6 (ATCC 50803), aislado clínico YJJ (Tapia y Ávila, 2007)) se llevó a cabo en medio TYI-33 suplementado al 10 % con suero fetal bovino y mantenidos a 37 °C en condiciones microaerofílicas (Anexo 1).

### **Obtención de Extractos Antigénicos Solubles de *G. lamblia***

Los extractos de la mezcla antigénica de proteínas de *G. lamblia* se obtuvieron por el método de Gottstein *et al.* (1990), con ligeras modificaciones. A partir de cultivos en fase logarítmica de crecimiento de *G. lamblia*, los trofozoítos se centrifugaron y se adicionó al botón celular inhibidores de

proteasas (Ver Anexos) seguidos de ciclos de congelación/descongelación en nitrógeno líquido. Después, la suspensión se sometió a procesos de sonicación y centrifugación, hasta obtener una mezcla antigénica de proteínas a la cual se le determinó la concentración de proteína mediante el método de Bradford (Ver Anexos). Los extractos de antígeno soluble se almacenaron a -20 °C hasta su uso, para ensayos inmunoquímicos, e inmunológicos que involucran el procesamiento y presentación de antígeno. Se realizaron electroforesis de SDS-PAGE de las proteínas de los extractos antigénicos de *G. lamblia* en geles de poliacrilamida (12%) y se utilizó un marcador de peso molecular de amplio rango como referencia de peso (BioRad, Hercules, CA, USA). Ésta técnica se utilizó para observar el patrón electroforético característico de las cepas de *G. lamblia* y determinar la pureza de la extracción.

### **Cultivo de Líneas Celulares e Hibridomas**

Se utilizaron cultivos de las siguientes líneas celulares : linfomas de células B, como células presentadoras de antígeno (M12.A<sup>K</sup>C3.F6) (Wade *et al*, 1989), linfocitos T (CTLL-2) dependientes de IL-2 (ATCC TIB-214), células T BW5147 $\alpha\beta^-$  provenientes de timoma de ratón e hibridomas de células T específicos para proteínas de *G. lamblia* como 2F9, 4D5, 6D10, 8B9, 9B10, 10F7 y 10G5 (Vega, 2003). Los cultivos celulares se mantuvieron en medio de cultivo DMEM suplementado al 5 % con suero fetal bovino (SFB) al 5%, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> (5%) a 37 °C (Anexo 3).

## **Estandarización de Cultivo de Linfocitos T**

La línea celular CTLL-2 (ATCC TIB-214) son dependientes de IL-2 para proliferar y presentan la característica de tener un ciclo vida de tres días. Estas células provienen del ratón *mus musculus* de la cepa C57BL/6 (The Jackson Laboratory, 000664) y son utilizadas en bioensayos para la determinación de IL-2. Se establecieron las condiciones óptimas para utilizar a las células CTLL-2 como un bio-indicador de activación de hibridomas de células T.

## **Identificación Inmunológica de Proteínas Antigénicas de las Distintas Cepas de *G. lamblia* Capaces de Estimular Hibridomas de Células T**

### **Elución pasiva de proteínas de *G. lamblia* a partir de geles SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes y reductoras**

La elución pasiva de proteínas a partir de geles de poliacrilamida se obtuvo a partir del método de *Scheer, et al* (2001) con ligeras modificaciones. El extracto antigénico de *Giardia* se sometió a electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras. Los geles (12 %) preparados tuvieron un grosor de 1.5 mm, cargando una cantidad de 500 µg de antígeno soluble. Los geles se corrieron por 1 hora a 90 volts, y después el gel se lavó con agua Milli Q y se cortaron 6 tiras del gel de 1 cm de ancho. Estas fracciones se introdujeron a una jeringa, macerándolas con el embolo, este proceso se hizo 5 veces. El gel macerado se colocó en tubos cónicos de 15 mL para centrifugación (Corning Costar, NY USA) con 1 mL de H<sub>2</sub>O grado MillieQ dejándolo eluir por 24 h a 4°C.

Después de este tiempo, las fracciones se centrifugaron (1000 xg) por 10 minutos para obtener el sobrenadante. Se corrió una SDS-PAGE al 12% de las fracciones obtenidas para confirmar la pureza de la elución. Las fracciones eluidas de los geles con concentraciones desconocidas de proteínas, se probaron con un volumen de 5 y 7.5  $\mu\text{L}$  y se probaron en ensayos de procesamiento y presentación de antígeno.

Las fracciones probadas que activaron a hibridomas de células T se subfraccionaron en tres bandas de aproximadamente 0.3 cm y se sometieron a procedimientos de elución pasiva, dejándolos incubar por 24 horas a 4 °C. Los sobrenadantes se recuperaron y se utilizaron en bioensayos de procesamiento y presentación de antígeno.

### **Ensayos con Hibridomas de Células T**

Para la caracterización inmunológica de proteínas se utilizaron hibridomas de células T previamente producidos en nuestro laboratorio, tras la inmunización de ratones con extracto proteico de *G. lamblia* (cepa GS/M-83-H7), los cuales se sometieron a ensayos de presentación de antígeno. Los hibridomas utilizados fueron 2F9, 6D10, 8B9, 9B10 y 10F7, y la CPA utilizada, que es un linfoma de células B, M12.A<sup>k</sup>C3.F6. Los cultivos se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL. Se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular de hibridomas T y 50  $\mu\text{L}$  de CPA en microplacas de 96 pozos en fondo plano (Corning Costar, NY, USA), colocando finalmente 100,000 células/pozo de los hibridomas y 50,000 células/pozo de las células presentadoras de antígeno. Para evaluar la activación de células T y la caracterización inmunológica de péptidos de *Giardia*, se utilizó la mezcla antigénica de *Giardia* a una concentración de 20 y 40  $\mu\text{g/mL}$ , fracciones de la elución pasiva de

proteínas de concentración desconocida a un volumen de 5 y 7.5  $\mu\text{L}$ , así como las subfracciones de las fracciones positivas. Los ensayos se incubaron de 20-24 horas a 37°C en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%, después de este tiempo de incubación, se recuperó el sobrenadante de los pozos y se transfirió a otra placa congelándola a -20°C por 24 horas. Después de éste tiempo, la placa se descongeló y se evaluó el nivel de IL-2 indirectamente, utilizando la línea celular dependiente de IL-2 para proliferar. Los cultivos de CTLL-2 se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL y se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular en la placa que previamente contenía 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante de los ensayos de presentación de antígeno. La placa se incubó de 24-27 horas a 37 °C. Después de este tiempo se evaluó la proliferación y viabilidad de las células por medio del método de MTT (3-(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2, 5-difeniltetrazolio bromuro).

### **Ensayo de MTT**

La reducción de la sal de tetrazolio se ha utilizado como un ensayo colorimétrico que permite la evaluación de la proliferación y viabilidad celular de un cultivo, a través de la reducción de la sal de tetrazolio MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio bromuro) por células metabólicamente activas. Dicha reducción se efectúa bajo la acción de enzimas deshidrogenasas presentes en células activas. El resultado es la formación de cristales púrpuras intracelulares, que son solubilizados con isopropanol ácido y cuantificados espectrofotométricamente en un lector de microplacas a 570-655 nm (Anexo 5).

## **Identificación de Proteínas Inmunogénicas de *G. lamblia* que Estimulen a Linfocitos T**

### **Espectrometría de Masas**

Una vez identificadas las bandas proteicas provenientes de geles fraccionados de SDS-PAGE que estimularon a los hibridomas de células T, se inició el análisis por espectrometría de masas de los antígenos seleccionados. Esto se llevó a cabo en el laboratorio de espectrometría de masas del Departamento de Bioquímica y Biofísica Molecular de la Universidad de Arizona (USA), bajo la supervisión de la Dra. Linda Brechi.

Las proteínas de *G. lamblia* identificadas en las fracciones se sometieron a una digestión enzimática con tripsina, digiriéndolas a péptidos, los cuales se inyectaron al equipo de espectrometría de masas, el cual tienen acoplado un RP-HPLC (Finnigan Liquid Chromatography Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometer; Finnigan, San Jose CA). Los péptidos se identificaron por su masa y la secuenciación de los péptidos se obtuvo por el análisis de espectrometría de masas Tandem MS/MS. El análisis de secuencia de las proteínas se realizó utilizando un programa de secuenciación SEQUEST empleando una estación de trabajo ICIS (ICIS Work Station, Finnigan).

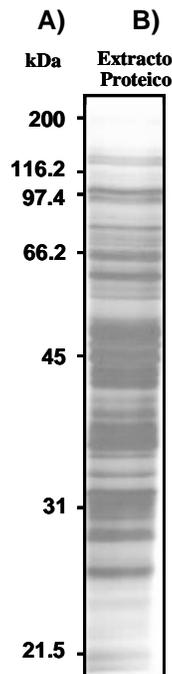
Este programa compara los espectros de masas experimentales obtenidos con espectro de masas predichos. La información obtenida acerca de la secuenciación de aminoácidos de los antígenos de *G. lamblia*, se analizó y comparó con la base de datos generada por el proyecto Genoma de *G. lamblia*. Esto junto con el algoritmo SYFPEITHI (Rammensee *et al* 1995, 1997) (<http://www.syfpeithi.de/>), nos permitió encontrar epítopes con afinidad a las moléculas del MHC clase II (I-A<sup>K</sup>).

Éstos epítopes (dados por la base de datos) presentan una longitud de 15 aminoácidos, los cuales son organizados por el algoritmo obteniendo la siguiente secuencia 123456789012345, los primero y últimos tres aminoácidos corresponden a las terminaciones aminas y carboxílicas de los péptidos. Los nueve aminoácidos restantes (456789012) pertenecen a los epítopes que interaccionan directamente con los bolsillos de unión a péptidos de la molécula del MHC Clase II.

## RESULTADOS

### Obtención de la Mezcla Proteica Antigénica de *G. lamblia*

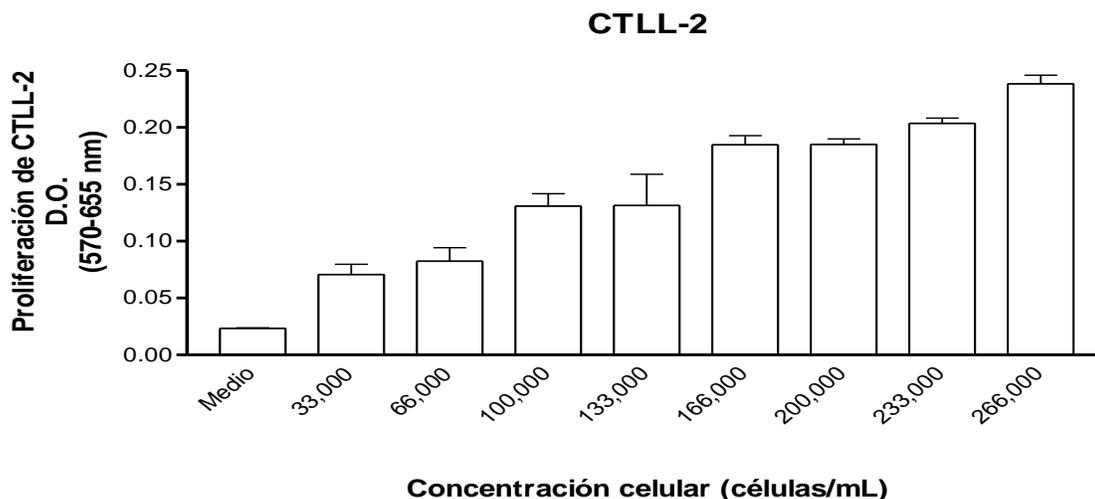
Se cultivaron axenicamente trofozoítos de *G. lamblia* en fase logarítmica de crecimiento, con el objetivo de obtener una mezcla final de proteínas antigénicas de *Giardia*. A partir de un cultivo de  $100 \times 10^6$  de trofozoítos se recuperaron  $7.0 \pm 1.0$  mg (Briceño y Oviedo, 2007) de proteína. El extracto proteico de *G. lamblia* se sometió a electroforesis (SDS-PAGE) en condiciones desnaturalizantes y reductoras, obteniéndose un perfil de bandas separadas en base a su peso molecular, observándose una mezcla antigénica heterogénea de proteínas de diferentes masas moleculares entre 20-200 kDa (Fig. 7, carril B).



**Figura 7.- Patrón electroforético del extracto de proteínas de *G. lamblia* cepa GS/M-83-H7.** Carril A: Marcadores de Peso molecular. Carril B: Extracto soluble de proteínas de *G. lamblia* GS/M-83-H7.

## Estandarización de Cultivo de Linfocitos T (CTLL-2)

Para evaluar los bioensayos de procesamiento y presentación de antígeno fue necesario estandarizar la concentración celular óptima de la línea dependiente de IL-2 (CTLL-2). Se evaluaron diferentes concentraciones de la línea celular (33,000; 66,000; 100,000; 133,000; 166,000; 200,000; 233,000 y 266,000 células/mL  $\mu$ L), al tiempo cero se adicionó la sal de tetrazolio y se incubó por 4 horas. Después de este tiempo de incubación, se tomó la lectura a 570-655 nm. Se observó una relación directamente proporcional entre la concentración celular y la absorbancia obtenida (proliferación celular). La concentración óptima seleccionada fue de 266,000 células/mL debido a la absorbancia basal generada durante el cultivo de las células. Esto nos permite evaluar los bioensayos de procesamiento y presentación de antígeno sin obtener una absorbancia de fondo que interfieran con los resultados.



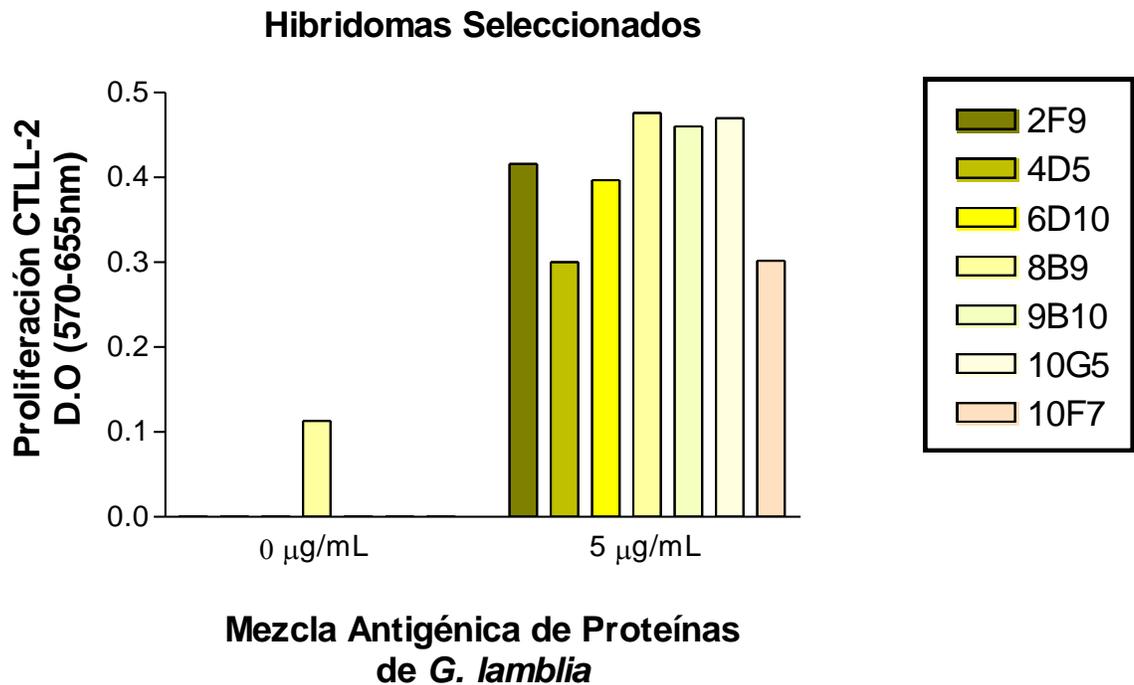
**Figura 8.- Estandarización de cultivos de Linfocitos T.** Las células CTLL-2 se colocaron a diferentes concentraciones, se adicionó la sal de MTT y se obtuvo una lectura de absorbancia (570-655 nm).

## Activación de Hibridomas de Células T

Los hibridomas de células T constituyen una herramienta muy útil que nos permite la identificación de proteínas provenientes de *G. lamblia*, ya que estas células presentan una especificidad para proteínas del mismo. La producción de éstos hibridomas de células T se realizó inmunizando a un grupo de ratones de la cepa C3H/HeJ con el extracto de proteínas de *G. lamblia* (Vega, 2004).

Para corroborar la especificidad de los hibridomas de células T por proteínas de *G. lamblia*, se estableció un sistema de procesamiento y presentación de antígeno *in vitro*, utilizando a una célula presentadora de antígeno (CPA) que expone en su membrana complejos de MHC asociados a péptidos (de *G. lamblia*), los cuales son presentados a los hibridomas de células T.

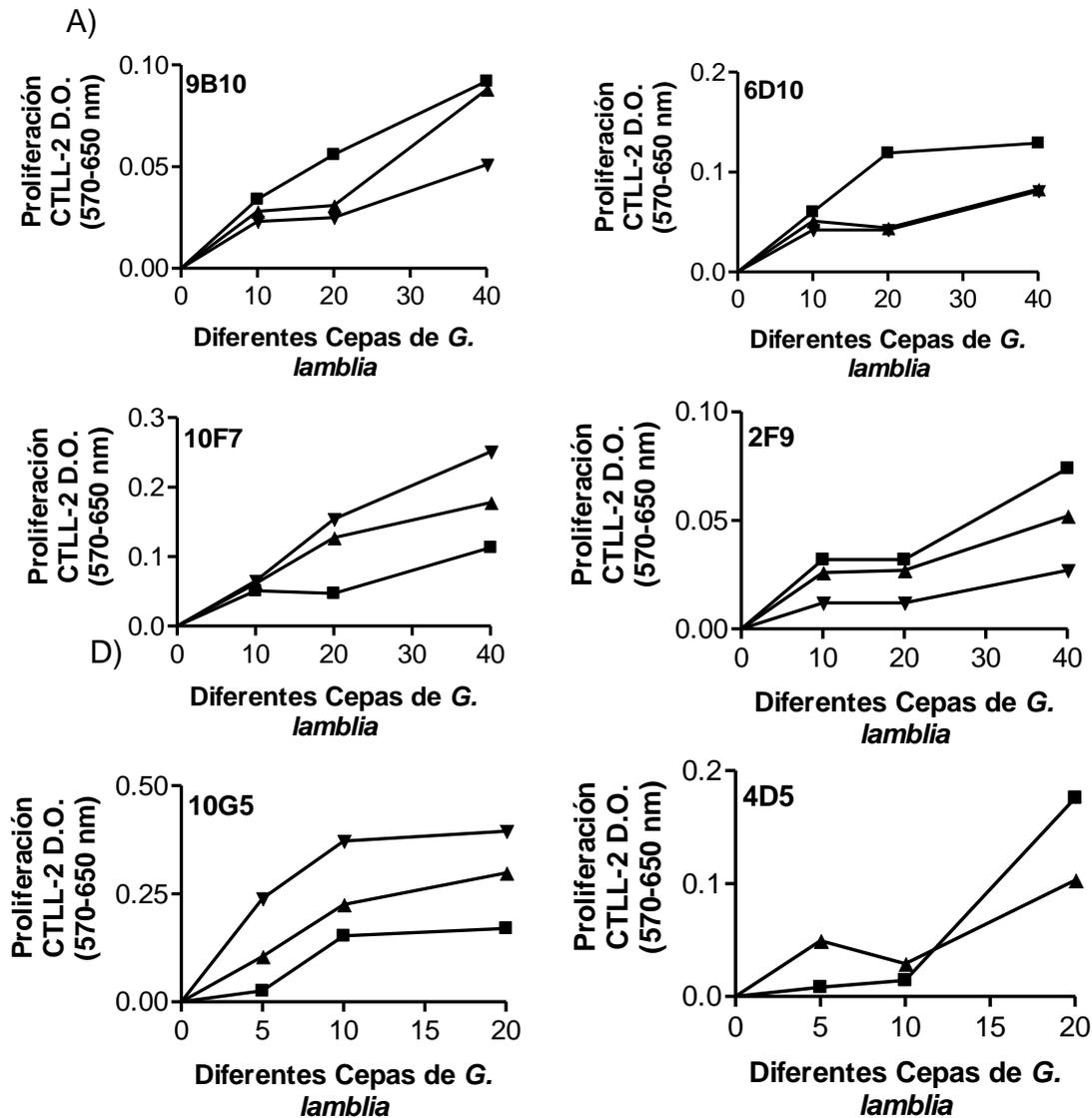
La selección inicial de clonas se realizó evaluando la especificidad de los hibridomas con la mezcla antigénica de proteínas de *G. lamblia*. Se seleccionaron 7 hibridomas: 2F9, 4D5, 6D10, 8B9, 9B10, 10G5 y 10F7 por su reconocimiento a la mezcla antigénica de *G. lamblia* (Vega Fernández, 2004). Los hibridomas se incubaron con la CPA en presencia de la mezcla de proteínas solubles de *G. lamblia* a una concentración de 5 µg/mL (Fig. 9). Después de este tiempo de incubación, al sobrenadante recuperado del ensayo se le determinaron los niveles de IL-2 utilizando la línea celular CTLL-2. Se utilizó IL-2 exógena como control positivo de proliferación de dicha línea.



**Figura 9.- Selección inicial de hibridomas de células T específicos para *G. lamblia*.** Para la primer selección de los hibridomas, éstos se incubaron toda la noche con CPA (M12.A<sup>k</sup>.C3F6) en presencia de 5 µg/mL de la mezcla de proteínas solubles de *G. lamblia* y como control negativo D5F. La presentación de antígeno fue medida como se describe en materiales y métodos. La respuesta de los hibridomas fue determinada por bioensayos de CTLL-2. IL-2 exógena fue utilizada como control positivo de proliferación de las células CTLL-2.

Los bioensayos de activación de hibridomas de células T demuestran que en los extractos de proteínas obtenidos a partir de la cepa GS/M-83-H7 existen proteínas específicas que estimulan a los hibridomas (Fig. 9).

La variación antigénica es un proceso que ocurre en ciertos microorganismos (Rivera, 2002; Adam, 2001). En *Giardia* los mecanismos de variación antigénica han sido estudiados al observar variaciones en las proteínas de superficie que recubren al cuerpo del trofozoíto. Teniendo en cuenta que *G. lamblia* sufre este proceso, se probó la activación de los hibridomas con diferentes cepas, se utilizaron las cepas de referencia GS/M-83-H7, WBC6 y el aislado clínico del Estado de Sonora YJJ. Estos ensayos se realizaron con la finalidad de conocer si las proteínas antigénicas se conservaban entre las diferentes cepas de giardias utilizadas. Los hibridomas de células T 2F9, 4D5, 6D10, 9B10, 10F7 y 10G5 se activaron con los extractos proteicos provenientes de las tres cepas utilizadas pero en magnitudes diferentes. En la figura 10A se muestran a los hibridomas 9B10 Y 6D10 con mayor activación frente a las proteínas antigénicas de la cepa GS/M-83-H7, mientras que el hibridoma 10F7 (Fig. 10B) mostró mayor actividad con el aislado clínico YJJ, los hibridomas 4D5 Y 10G5 (Fig. 10D) mostraron mayor actividad con la cepa WBC6; el hibridoma que menor actividad mostró con los diferentes antígenos fue el 2F9 (Fig 10 C).

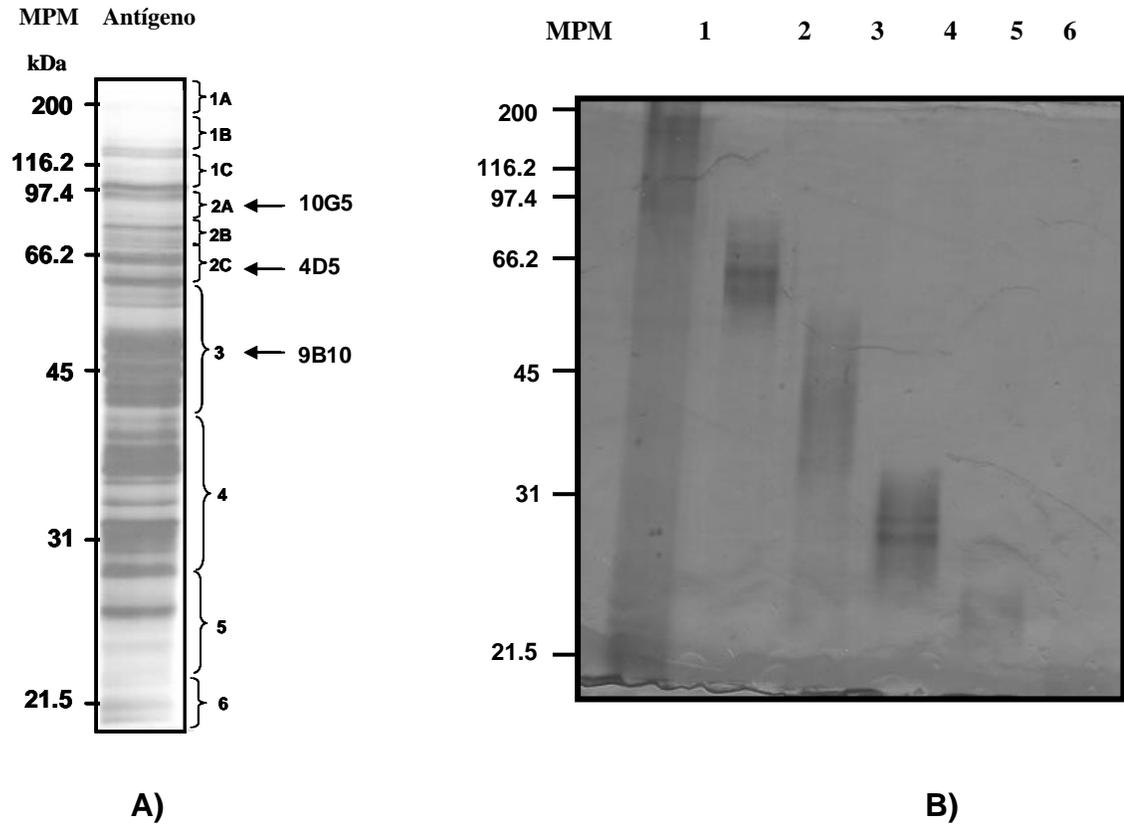


**Figura 10.- Activación de los hibridomas con proteínas de *G. lamblia* de diferentes cepas.** Activación de los hibridomas de células T incubándolos con antígeno de diferentes cepas a diferentes concentraciones (0, 10, 20 y 40 µg/mL), los hibridomas 4D5 y 10G5 se probaron en menores concentraciones (0, 5, 10, y 20 µg/mL). A) 9B10 y 6D10, estos hibridomas mostraron mayor activación al incubarlos con antígenos de la cepa GS/M-83-H7, mientras que B) el hibridoma 10F7 mostró especificidad por proteínas presentes en el antígeno YJJ. C) El hibridoma que menor actividad mostró con los diferentes antígenos fue el 2F9 y D) los hibridomas 10G5 y 4D5 mostraron mayor actividad al incubarlos con antígenos de la cepa WBC6.

## **Identificación de Proteínas Antigénicas en Distintas Cepas de *G. lamblia* Capaces de Estimular Hibridomas de Células T.**

### **Proteínas de *G. lamblia* que Estimulan a Hibridomas de Células T**

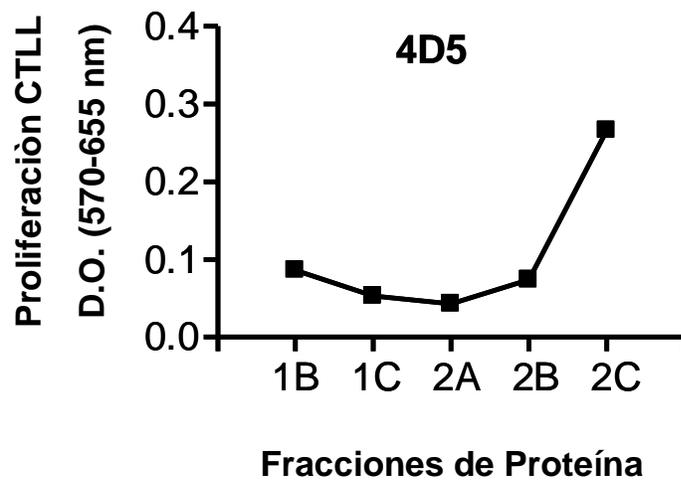
Con el fin de conocer que proteínas son las responsables de la activación de los hibridomas de células T, se seleccionaron tres hibridomas que son activados más intensamente con proteínas solubles de *G. lamblia*, 4D5, 9B10 y 10G5 (Briceño y Oviedo, 2007). Para poder conocer que proteínas son las responsables de la activación de éstos hibridomas de células T, se obtuvieron fracciones a partir de la mezcla de proteínas de *G. lamblia*. Ésto se llevo a cabo separando la mezcla en electroforésis (SDS-PAGE). Se realizaron cortes al gel obteniendo seis fracciones con diferentes masas relativas (Ver Anexos). Las proteínas de cada fracción se eluyeron pasivamente de los geles. Para confirmar la presencia de las proteínas eluídas se realizó una electroforésis de las mismas (Fig 11B). Las proteínas eluídas se sometieron a bioensayos de procesamiento y presentación de antígeno utilizando los hibridomas seleccionados 4D5, 9B10 y 10G5 (Fig. 12, 13 y 14, respectivamente) en base a su activación por la mezcla antigénica total. La finalidad de estos ensayos es la de conocer en que fracción se encuentran contenidas las proteínas que activan a dichos hibridomas.



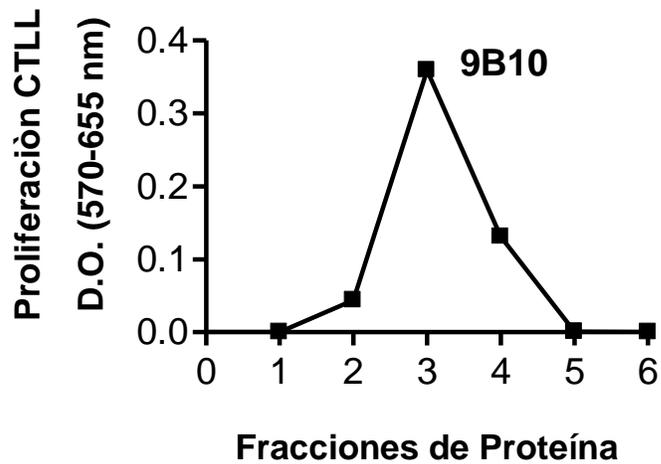
**Figura 11.- Elución pasiva de proteínas de geles de poliacrilamida.**

A) Separación de proteínas de *G. lamblia* por SDS-PAGE en geles de 1.5mm de ancho al 12 %, los geles fraccionados se maceraron y se eluyeron pasivamente las proteínas.

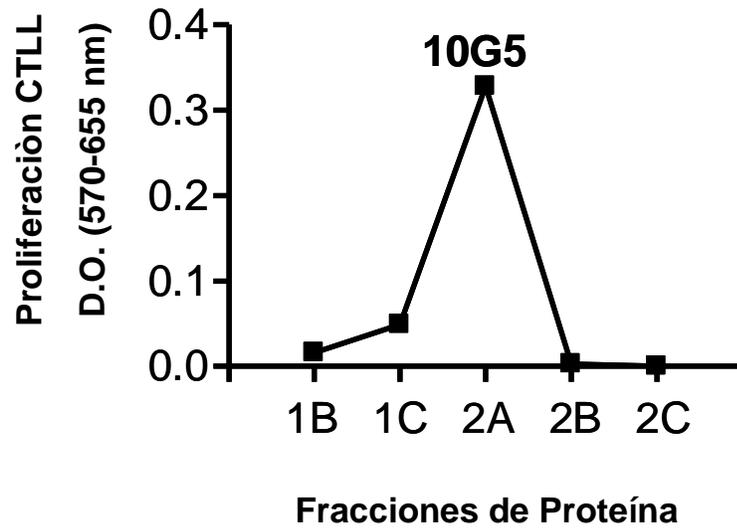
B) Confirmación de la separación y pureza de las proteínas eluidas por SDS-PAGE, se observan las fracciones correspondientes a la masa relativa eluidas.



**Figura 12.- Activación del hibridoma 4D5 con proteínas eluidas de fracciones a partir de SDS-PAGE.** Los hibridomas de células T fueron incubados toda la noche con las CPA (M12.AKC3.F6), a diferentes volúmenes de las proteínas eluidas de las fracciones 1B, 1C, 2A, 2B y 2C (10  $\mu$ L). La activación fue determinada por bioensayos con CTLL-2.



**Figura 13.- Activación del hibridoma 9B10 con proteínas eluidas de fracciones a partir de SDS-PAGE.** Los hibridomas de células T fueron incubados toda la noche con las CPA (M12.AKC3.F6), a diferentes volúmenes de las proteínas eluidas de las fracciones 2, 3 y 4 (7.5  $\mu$ L).

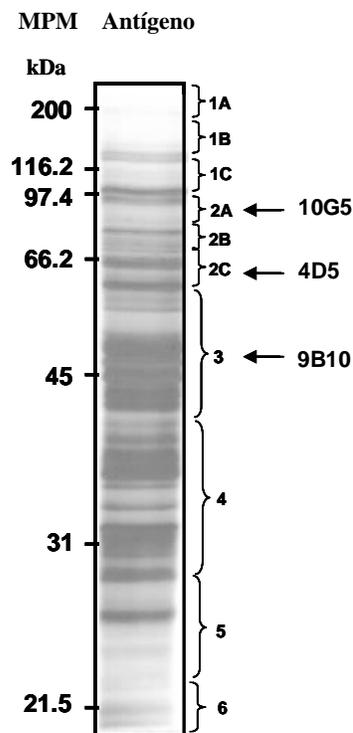


**Figura 14.- Activación del hibridoma 10G5 con proteínas eluidas de fracciones a partir de SDS-PAGE.** El hibridoma 10G5 se incubó con la CPA a diferentes volúmenes de las fracciones obtenidas (20  $\mu$ L). La activación fue determinada por bioensayos con CTLL-2.

## Identificación de Epítopes Inmunogénicos de *G. lamblia* que Estimulen a Linfocitos T.

### Proteínas de *G. lamblia* que Estimulan a Hibridomas de Células T

Al realizar la identificación de proteínas de *G. lamblia* encontramos que ciertas fracciones proteicas extraídas de los geles (SDS-PAGE) estimulan de manera específica a los hibridomas 4D5, 9B10 y 10G5 (Fig. 15). Para poder conocer las proteínas responsables de dicha actividad analizamos las fracciones proteicas mediante espectrometría de masas.



**Figura 15.- Bandas proteicas responsables de la activación de los hibridomas 4D5, 9B10 y 10G5.** SDS-PAGE al 12%, las proteínas que estimulan a los hibridomas poseen una masa molecular relativa aproximada de 100, 70 y 60-40 kDa para los hibridomas 10G5, 4D5 y 9B10, respectivamente.

El análisis por espectrometría de masas se realizó en un espectrómetro de masas acoplado a un equipo de RP-HPLC (Cromatografía Líquida-Espectrómetro de masas con trampa de iones cuadrupolar, Finnigan, San José CA). Se identificaron diferentes proteínas para cada fracción analizada como se muestran en las tablas 1, 3 y 4. La identificación de estas proteínas se hizo en base al análisis de espectrometría de masas y la utilización de la base de datos del genoma de *Giardia*. Los datos obtenidos por espectrometría de masas se encuentran en la sección de anexos (Ver anexo 9).

Tabla 1.- Proteínas identificadas en la fracción 2C que potencialmente estimulan al hibridoma 4D5.

<b>Nombre</b>	<b>Peso Molecular (Daltons)</b>	<b>ORF</b>
Glicrealdehído 3 fosfato deshidrogenada	36336	6687
Ornitina carbamiltransferasa	36437	10311
Proteína de choque térmico 90-alfa	36990	13864
Proteína Hipotética	40411	13272
Proteína de choque térmico 90-alfa	43438	98054
Factor de elongación 1-alfa	49105	112304
Beta-tubulina	50050	101291
Alfa-tubulina	50552	103676
Arginina deaminasa	64132	112103
Subunidad catalítica A vacuolar sintetasa	71537	7532
ATP		
Proteína de Choque Térmico Citosólica 70	71633	88765
Proteína de unión a anticuerpos	74360	17121
Complejo B IFT	75562	15428

Transquetolasa	77564	9704
Acetil coenzima A sintetasa	78101	13608
Dinamina	79513	14373
Fosfolipasa B cinasa cadena catalítica	85289	10698
gamma		
Proteína 21.1	87609	27925
Familia ATPasa AAA	96360	16867
Alcohol deshidrogenada	97134	93358
Factor de elongación	99626	17570
Beta adaptina	122832	21423

---

De acuerdo al análisis de las proteínas identificadas, se observó que el hibridoma 4D5 es activado por proteínas provenientes de *G. lamblia* con una masa molecular aproximada de 70 kDa, por consiguiente se restringió el análisis de proteínas, focalizándonos en aquellas con masas moleculares aproximadamente de 70 kDa.

Tabla 2.- Proteínas identificadas en la fracción 2C de masa molecular relativa de  $\approx$  70 kDa que potencialmente estimulan al hibridoma 4D5

<b>Masa Molecular (Daltones)</b>	<b>Proteína</b>
71633	Proteína de choque térmico citosólica 70
74360	Proteína de unión a anticuerpos
75562	Complejo B IFT
77564	Transquetolasa
78101	Acetil coenzima A sintetasa

---

Tabla 3.- Proteínas identificadas en la fracción 3 que potencialmente estimulan al hibridoma 9B10.

<b>Masa Molecular (Daltones)</b>	<b>Proteína</b>
43438	Proteína de Choque Térmico HSP 90-alfa
49105	Factor de Elongación 1-alfa
50050	Beta tubulina
50552	Alfa-tubulina
58324	Alanina aminotransferasa
60526	Piruvato cinasa
61501	Enzima málica
64132	Arginina deaminasa 2,3-bisfosfoglicerato-independiente
65091	Fosfoglicerato mutasa
65361	Fosfoproteína Inducida de estrés 1
65971	Lisil-tRNA sintetasea
66236	Protein 21.1

Tabla 4.- Proteínas identificadas en la fracción 1C que potencialmente estimulan al hibridoma 10G5.

<b>Nombre</b>	<b>Peso Molecular (Daltons)</b>	<b>ORF</b>
Enzima convertidota endotelial 2	24495	5013
Beta tubulina	24632	101291
Alfa-4-giardina	33614	7799
Carbamato quinasa	33879	16453

Proteína L5 ribosomal	33895	17395
UPL-1	34283	9779
Gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa	36336	6687
Ornitina carbamoiltransferasa	36437	10311
HSP 90-alfa	36990	13864
Proteína hipotética	40411	13272
Fosfoglicerato quinasa	43602	90872
Factor de elongación alfa-1	49105	112304
Beta-tubulina	50050	136020
Alfa-tubulina	50552	103676
L-serina deshidratasa	57067	24662
Alanina aminotransferasa	58324	12150
Arginina deaminasa	64132	112103
Piruvato quinasa	70738	3206
HSP70 Citosólica	71633	88765
Transquetolasa	77564	9704
Protein 21.1	93944	8174
Familia AAA ATPasa	96360	16867
Proteína hipotética	96760	14963
Alcohol dehidrogenasa	97134	93358
Piruvato, fosfato diquinasa	97659	9909
Factor de elongación 2	99626	17570
Proteína de cuerpo medio	100584	16343
Acil-CoA sintetasa	106725	86511
Quinesina-3	114615	102101
Enzima E1 conjugada a ubiquitina	121422	10661
Importina subunidad beta-3	127678	15106
Piruvato-flavodoxina oxidoreductasa	131803	17063
Cadena pesada dineina	601123	17478

Grp94/Hsp90

99823

15247

La activación generada por el hibridoma 10G5 fue inducida por proteínas contenidas en las fracciones provenientes de SDS-PAGE, con una masa molecular relativa aproximadamente de 100 kDa. Debido a esto se realizó una restricción de proteínas, en cuanto su peso molecular, focalizándonos solo en aquellas con masas aproximadamente de 100 kDa, como se representa en la tabla 5.

Tabla 5.- Proteínas identificadas en la fracción 1C de masa molecular relativa de  $\approx$  100 kDa que potencialmente estimulen al hibridoma 10G5

<b>Masa Molecular (Daltones)</b>	<b>Proteína</b>
99823	Grp94/Hsp90 Proteína de Cuerpo
100584	Medio
127678	Importuna Subunidad beta-3

Las proteínas identificadas en las fracciones provenientes de los geles de electroforesis por espectrometría de masas, son las que potencialmente activan a éstos hibridomas, por lo cual es importante conocer cuales son las interacciones generadas entre las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad y los epítopes de las proteínas.

## Predicción de Epitopes de *G. lamblia* que se Unen a Moléculas del MHC clase II

En éste trabajo utilizamos la base de datos SYFPHEITHI, la cual nos provee de información acerca de los epitopes de una proteína dada, que interactúan con la molécula del MHC en base a su secuencia de aminoácidos. Éstas son proteínas inmunogénicas predichos por el algoritmo, como posibles motivos de unión a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad y probables responsables de la activación de los hibridomas de células T. En la tabla 6 se muestran los epitopes de la proteína *beta tubulina* perteneciente a *G. lamblia* identificada como una de las activadoras para el hibridoma 9B10 encontrada en la fracción 3. En esta tabla se describe en la columna primera la posición en la que se encuentra el epítope dentro de la proteína. En la segunda columna se muestra la secuencia de los aminoácidos que conforman al epítope. Las tablas de los epitopes responsables de la estimulación de los hibridomas 4D5 y 10G5 se encuentran en la sección de anexos (Ver Anexo 8).

Tabla 6.- Epitopes potenciales que se unen a la molécula de MHC clase II que induzcan la activación del hibridoma 9B10

<b>SYFPEITHI</b>		
Posición	Secuencia	Puntuación
115	<b>A</b> V L <b>D</b> V <b>V</b> R K E S E A C D C	26
174	<b>K</b> V S <b>D</b> T <b>V</b> V E P Y N A T L S	24
86	<b>R</b> P D <b>N</b> F <b>V</b> F G Q S G A G N N	22
280	<b>I</b> Y R <b>A</b> L <b>T</b> V P E L V S Q M F	22

413	S N M <b>N D L V S E Y Q Q Y Q E</b>	22
64	I L V <b>D L E P G T M D S V R A</b>	20
85	F R P <b>D N F V F G Q S G A G N</b>	20
223	G D L <b>N H L V S L V M S G C T</b>	20
7	I Q A <b>G Q C G N Q I G A K F W</b>	16
36	Y R G <b>D S E L Q I E R I N V Y</b>	16
45	E R I <b>N V Y F N E A A G G R Y</b>	16
402	G M D <b>E M E F T E A E S N M N</b>	16
149	T L L <b>I A K I R E E Y P D R M</b>	14
173	P K V <b>S D T V V E P Y N A T L</b>	14
183	Y N A <b>T L S V H Q L V E H A D</b>	14
186	T L S <b>V H Q L V E H A D E V F</b>	14
219	C P T <b>Y G D L N H L V S L V M</b>	14
284	L T V <b>P E L V S Q M F D N K N</b>	14
326	V D E <b>Q M L N I Q N K N S S Y</b>	14
367	F I G <b>N S T C I Q E L F K R V</b>	14
368	I G N <b>S T C I Q E L F K R V G</b>	14
424	Q Y Q <b>E A G V D E G E E F E E</b>	14
23	V I S <b>D E H G V D P S G E Y R</b>	12
181	E P Y <b>N A T L S V H Q L V E H</b>	12
329	Q M L <b>N I Q N K N S S Y F V E</b>	12
401	E G M <b>D E M E F T E A E S N M</b>	12
61	P R A <b>I L V D L E P G T M D S</b>	10
123	E S E <b>A C D C L Q G F Q I C H</b>	10

125	<b>E</b> A C <b>D</b> C <b>L</b> Q G F Q I C H S L	10
194	<b>E</b> H A <b>D</b> E <b>V</b> F C I D N E A L Y	10
221	<b>T</b> Y G <b>D</b> L <b>N</b> H L V S L V M S G	10
227	<b>H</b> L V <b>S</b> L <b>V</b> M S G C T S C L R	10
324	<b>K</b> E V <b>D</b> E <b>Q</b> M L N I <b>Q</b> N K N S	10
364	<b>A</b> A T <b>F</b> I <b>G</b> N S T C I <b>Q</b> E L F	10
415	<b>M</b> N D <b>L</b> V <b>S</b> E Y Q Q Y Q E A G	10
418	<b>L</b> V S <b>E</b> Y <b>Q</b> Q Y Q E A G V D E	10
428	<b>A</b> G V <b>D</b> E <b>G</b> E E F E E E E D F	10
432	<b>E</b> G E <b>E</b> F <b>E</b> E E E D F G D E Y	10

---

## DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como objetivo la caracterización e identificación de proteínas responsables de la activación de hibridomas de células T. El desarrollo de la respuesta inmunológica celular durante la giardiasis es un evento muy importante. Existe poca información acerca de los procesos de eliminación y control de esta parasitosis. Nuestro grupo de trabajo previamente generó hibridomas de células T contra proteínas de *G. lamblia* (Vega, 2003), cabe mencionar que en la literatura no existe ningún reporte de a cerca de la generación de hibridomas de células T específicos para proteínas de *G. lamblia*, por lo que éstos son los primeros hibridomas descritos y constituyen una herramienta esencial en el estudio del procesamiento y presentación de antígeno, en el reconocimiento molecular por parte de linfocitos T y células presentadoras de antígeno, así como en la identificación de proteínas que induzcan su activación. Los hibridomas de células T se generaron utilizando proteínas antigénicas de *G. lamblia* de la cepa GS/M-83-H7 y presentan activación y especificidad en presencia de dichas proteínas (Fig. 9).

La variación antigénica es un proceso que ocurre en ciertos microorganismos como micoplasma, parásitos, virus (Rivera, 2002). En *Giardia* los mecanismos de variación antigénica han sido estudiados al observar variaciones proteicas en las superficies de los trofozoítos, estos mecanismos no son entendidos con claridad, algunos autores los sugieren como vías de evasión de la respuesta inmune (Nash TE, 1997). Las cepas de *G. lamblia* tienen la característica de presentar diferencias en su perfil proteico, (Bienz *et al*, 2001, Nash and Keister 1985), pero aún así se conservan ciertas proteínas. Los hibridomas de células T mostraron activación hacia proteínas antigénicas de las cepas WB clona C6 y YJJ (Figura 10) de la siguiente manera: los hibridomas 9B10 y 6D10 muestran mayor activación por la mezcla antigénica de la cepa GS/M-83-H7; mientras que los hibridomas 4D5 y 10G5 mostraron mayor

activación con la cepa de referencia WB clona C6; y el hibridoma 10F7 presentó especificidad por proteínas del aislado clínico YJJ, lo que sugiere que estos aislados comparten proteínas que activan a estos hibridomas de células T de manera conservada, lo cual es muy interesante ya que en las bases moleculares de desarrollo de vacunas siempre se buscan moléculas conservadas entre organismos de la misma especie.

La caracterización de proteínas inmunogénicas es de gran utilidad para poder identificar los epitopes de las proteínas responsables que induzcan una respuesta inmunológica de tipo celular. Mediante el uso de espectrometría de masas se identificaron las proteínas contenidas en las fracciones obtenidas por electroforesis SDS-PAGE (Tablas 1, 2 y 3). Los hibridomas de células T 4D5, 9B10 y 10G5 son estimulados por proteínas de *G. lamblia* de diferentes grupos y masas moleculares relativas ( $\approx 70$  kDa,  $\approx 60-40$  kDa y  $\approx 100$  kDa, respectivamente), Estas proteínas son potencialmente las responsables de la activación de los hibridomas de células T. Cabe mencionar que dentro de este grupo, se encuentran proteínas reportadas previamente con relación a la respuesta inmune humoral y nunca a la respuesta inmune celular.

Estas proteínas son procesadas y presentadas por células presentadoras de antígeno profesionales a los hibridomas de células T. Para que se lleve a cabo este reconocimiento los péptidos formados interaccionan con las moléculas del MHC clase II. Esta interacción es esencial para la activación de los hibridomas de células T. La predicción de péptidos (SYFPEITHI) nos permitió observar que a partir de estas proteínas se generan una serie de posibles péptidos responsables de la respuesta inmunológica que pudieran acoplarse a la molécula del MHC clase II. Es necesario confirmar experimentalmente que dichas predicciones acerca de los péptidos generados sean los responsables de la activación de los diferentes hibridomas de células T específicos para proteínas de *G. lamblia*.

En este trabajo se identificaron químicamente proteínas de *G. lamblia* que inducen una activación en hibridomas de células T, dicha identificación se llevo a cabo gracias a la utilización de la técnica analítica de espectrometría de masas, junto con, las metodologías de proteómica y la base de datos de *Giardia*, fue posible la identificación y comparación de las secuencias de las proteínas obtenidas.

## CONCLUSIONES

- ✓ Los hibridomas 2F9, 4D5, 6D10, 8B9, 9B10, 10F7 Y 10G5 generados previamente son específicos para proteínas de *G. lamblia*.
- ✓ Se establecieron condiciones de elución de proteínas de *G. lamblia* a partir de geles de poliacrilamida
- ✓ Se identificaron proteínas de *G. lamblia* en las fracciones obtenidas a partir de geles de poliacrilamida, dentro de las cuales se encuentran las proteínas responsables de la activación de los hibridomas de células T.
- ✓ Los hibridomas de células T mostraron activación hacia proteínas antigénicas presentes en las diferentes cepas de *G. lamblia*, lo cual sugiere la presencia de proteínas conservadas entre los diferentes aislados.
- ✓ Se identificaron proteínas que activan a hibridomas de células T 4D5, 9B10 y 10G5 con masas moleculares relativas de  $\approx 70$  kDa,  $\approx 60-40$  kDa y  $\approx 100$  kDa, respectivamente.
- ✓ Se predijo la formación de los epítopes potenciales de proteínas de *G. lamblia* que interactúan con las moléculas MHC clase II (I-A<sup>k</sup>), mediante el uso de algoritmos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abbas AK. and Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology. 5ta. Edition. *Elsevier Science Editorial* 2004; pp 4-7.
- Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews* 2001; 14: 447–475.
- Akira S., Yoshida K., Tanaka T., Taga T. and Kishimoto T. Targeted disruption of the IL-6 regulated genes: gp130 and NF-IL-6. *Immunology Reviews*. 1995; 148:221–253.
- Aley, S., M. Zimmerman, M. Hetsko, M. E. Selstedt, and F. D. Gillin. Killing of *Giardia lamblia* by cryptdins and cationic neutrophil peptides *Infection and Immunity* 1994; 62:5397–5403.
- Bienz M., Siles-Lucas M., Wittwer P. and Müller N. vsp Gene Expresión by *Giardia lamblia* Clone GS/M-83-H7 During Antigenic Variation In Vivo and In Vitro. *Journal of Infection and Immunology* 2001; 5278-5285.
- Bienz M., Wittwer P., Zimmermann V. and Muller N. Molecular characterisation of a predominant antigenic region of *Giardia lamblia* variant surface protein H7. *International Journal of Parasitology* 2001; 31: 827–832.
- Briceño P. Y Oviedo C. Identificación Bioquímica e Inmunológica de Antígenos Inmunodominantes de *G. lamblia* que Inducen la Activación de Hibridomas de Células T. Tesis de Licenciatura, 2007.
- Brunet LR. Nitric oxide in parasitic infections. *International Immunopharmacology* 2001; 1: 1457–1467.
- Busch R., Doebele RC., Patil NS., Pascine A. and Mellins ED. Accessory molecules for MHC Class II peptide loading. *Current Opinion Immunology*. 2000; 12:99-106.

- Byrd LG., Conrad JT., and Nash TE. *Giardia lamblia* infections in adult mice. *Infection and Immunity* 1994; 62: 3583–3585.
- Cebra JJ. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *American Journal of Clinical Nutrition* 1999; 69:1046S–51S.
- Crotzer VL., Christian RE., Brooks JM., Shabanowitz J., Settlege RE., Marto JA., Withe FM., Rickinson AB., Hunt DF. and Engelhard VH. Immunodominance Among EBV-Derived Epitopes Restricted by HLA-B27 Does Not Correlate with Epitope Abundance in EBV-Transformed B-Lymphoblastoid Cell Lines. *Journal of Immunology* 2000; 164:6120-6129.
- Du Pasquier L. The immune system of invertebrates and vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 2001; 129:1-15.
- Ebert E.C. *Giardia* induces proliferation and interferon gamma production by intestinal lymphocytes. *Gut* 1999; 44, 342-346.
- Eckmann L, Laurent F, Langford TD *et al.* Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. *Journal of Immunology* 2000; 164: 1478–1487.
- Eckmann L. and Gillin FD. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial–mucosal interactions I. Pathophysiological aspects of enteric infections with the lumen-dwelling protozoan pathogen *Giardia lamblia*. *American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology* 2001; 280: G1–G6.
- Eckmann L. Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite Immunology* 2003; 25: 259–270.

- Erra-Balsells R. “Del vuelo de las proteínas y de cómo lograrlo” (Espectrometría de masa ESI). *Revista Química Viva* 2004, Número 3, año 3.
- Falk PG., Hooper LV., Midtvedt T. and Gordon JI. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1998; 62:1157–70.
- Fang FC. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *Journal of Clinical Investigation* 1997; 99: 2818–2825.
- Farthing MJ. The molecular pathogenesis of giardiasis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1997; 24, 79-88.
- Faubert G. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clinical Microbiology Reviews* 2000; 13: 35–54.
- Fremont DH., Monnaie D., Nelson CA., Hendrickson WA. and Unanue ER. Crystal Structure of I-Ak in Complex with a Dominant Epitope of Lysozyme. *Immunity* 1998; 8, 305–317.
- Garcia, K.C. et al. Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self peptide-MHC antigen. *Science* 1998; 279, 1166–1172.
- Gillin FD., Reiner D., and Wang CS. Human milk kills parasitic intestinal protozoa. *Science* 1983; 221:1290–1292.
- Godkin AJ., Smith KJ., Willis A., Tejada-Simon MV., Zhang J., Elliott T. and AVS. Naturally processed hla class ii peptides reveal highly conserved immunogenic flanking region sequence preferences that reflect antigen processing rather than peptide-mhc interactions. *Journal of Immunology* 2001; 166:6720-6727.

- Hardin JA., Buret AG., Olson ME., Kimm MH. and Gall DG. Mast cell hyperplasia and increased macromolecular uptake in an animal model of giardiasis. *Journal of Parasitology* 1997; 83:908-912.
- Harding CV. MHC Molecules and Antigen processing. Heidelberg: Springer-Verlag, 1997.
- Heyworth MF., Carlson JR. and Ermak TH. Clearance of *Giardia muris* infection requires helper/inducer T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* 1987; 165: 1743–1748.
- Hill DR. and Pearson RD. Ingestion of *Giardia lamblia* trophozoites by human mononuclear phagocytes. *Infection and Immunity* 1987; 55: 3155–3161.
- Hill DR., Burge JJ., and Pearson RD. Susceptibility of *Giardia lamblia* trophozoites to the lethal effect of human serum. *Journal of Immunology* 1984; 132:2046–2052.
- Hunt DF., Henderson RA., Shabanowitz J., Sakaguchi K., Michel H., Sevilir N., Cox A., Apella E. and Engelhard VH. Pillars article: Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* 1992; 255: 1261-1263.
- Jensen PE. Antigen unfolding and disulfide reduction in antigen presenting cells. *Seminars in Immunology* 1995, 7:347-353.
- Li E., Zhou P., Petrin Z. and Singer SM. Mast Cell-Dependent Control of *Giardia lamblia* Infections in Mice. *Infection and Immunity* 2004; p. 6642–6649.
- Mehmet RB., Nihayet M. and Rıza D. Role of IL-2, IL-4 and IL-10 in Patients Infected with *Giardia lamblia*. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2005; 29: 160-162.
- McArthur AG., Morrison HG., Nixon JE., Passamaneck NQ., Kim U., Hinkle G., Crocker MK., Holder M.E., Farr R., Reich CI., Olsen GE., Aley SB., Adam RD., Gillin FD. and Sogin ML. The *Giardia* genome

project database. *FEMS Microbiology Letters* 2000; 189, 271-273.

- Moore GW., Sogandares-Bernal F., Dennis MV., Root DM., Beckwith D. and van Voorhis D. Characterization of *Giardia lamblia* trophozoite antigens using polyacrylamide gel electrophoresis, high-performance liquid chromatography, and enzyme-labeled immunosorbent assay. *Veterinary Parasitology* 1982; 10:229–237.
- Nash TE. and Keister DB. Differences in excretory-secretory products and surface antigens among 19 isolates of *Giardia*. *Journal of Infectology* 1985; 152, 1166-1171.
- Nash TE. Antigenic variation in *Giardia lamblia* and the host's immune response. *Philosophical Transactions The royal Society B Biological Sciences* 1997; 29, 352(1359): 1369–1375.
- Owen RL., Allen CL. and Stevens DP. Phagocytosis of *Giardia muris* by macrophages in Peyer's patch epithelium in mice. *Infection and Immunity* 1981; 32:591–601.
- Paget TA, Kelly ML, Jarroll EL, Lindmark DG, Lloyd D The effects of oxygen on fermentation in *Giardia lamblia*. *Molecular Biochemical Parasitology* 1993; 57(1):65-71.
- Philippe H., Lopez P., Brinkmann H., Budin K., Germot A., Laurent J., Moreira D., Muller M. and Le Guyader H. Early-branching or fast-evolving eukaryotes? An answer based on slowly evolving positions. *Proc. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.* 2000; 267, 1213,1221.
- Rammensee, Friede and Stevanovic. MHC ligands and peptide motifs: 1st listing, *Immunogenetics* 1995; 41, 178-228.
- Rammensee, Bachmann and Stevanovic. MHC ligands and peptide motifs. *Landes Bioscience* 1997.
- Ramachandra L. and Harding CV. Phagosomes acquire nascent and recycling Class II MHC molecules but primarily use nascent

molecules in phagocytic antigen processing. *Journal of Immunology* 2000; 164:5103- 5112.

- Riese RJ. and Chapman HA. Cathepsins and compartmentalisation in antigen presentation. *Current Opinion Immunology*. 2000; 12:107-113.
- Rivera-Tapia. Variación antigénica en micoplasmas. *Gaceta Medica Mexicana* 2002; 138 (3): 289-290.
- Roberts-Thomson IC., and Mitchell GF. Giardiasis in mice. Prolonged infections in certain mouse strains and hypothyroid (nude) mice. *Gastroenterology* 1978; 75:42–46.
- Robinson JH. and Delvig AA. Diversity in MHC class II antigen presentation. *Journal of Immunology*. 2002; 105:252-262.
- Rudensky AY., Preston-Hurlburt P., Hong SC., Barlow A., Janeway CA Jr. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 1991; 353:622-627.
- Scott K.G. Role of CD8+ y CD4+ lymphocytes in jejunal injury during murine giardiasis. *Infection and Immunity* 2004; 72, 3536-3542.
- Scheer JM. and Rayan CA. A Method for the Quantitative Recovery of Proteins from Polyacrylamide Gels. *Analytical Biochemistry* 2001; 298, 130-132.
- Sette and J. Fikesy . Epitope-based vaccines: an update on epitope identification, vaccine design and delivery. *Current Opinion in Immunology* 2003; 15:461–470.
- Singer SM. and Nash TE. The Role of Normal Flora in *Giardia lamblia* Infections in Mice. *Journal of Infectious Diseases* 2000; 181.
- Singer SM. and Nash TE. T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. *Infection and Immunity* 2000; 68: 170–175.

- Staffan G. Svard, Per Hagblom and J.E. Daniel Palm. *Giardia lamblia* a model organism for eukaryotic cell differentiation. *FEMS Microbiology Letters* 2003; 218, 3-7.
- Téllez A., Palm D., Weiland M., Alemán J., Winiecka-Krusnell J., Linder E. And Svärd S. Secretory Antibodies Against *Giardia intestinalis* in lactating Nicaraguan Women. *Parasite Immunology* 2005; 27,163-169.
- van Bergen J., Ossendorp F., Jordens R., Mommaas AM., Drijfhout JW. and Koning F. Get into the groove! Targeting antigens to MHC class II. *Immunological Reviews* 1999; 172:87-96.
- Vega Fernández. Identificación y Caracterización inmunológica de Antígenos que Estimulan una Respuesta Inmune Celular en un Modelo Murino de *Giardia lamblia*. Tesis de Maestría. CIAD. 2004.
- Villadangos JA. and Ploegh HL. Proteolysis in MHC Class II antigen presentation: Who is in Charge? *Immunity* 2000; 12:233-239.
- VonAllmen, N. Experimental infections of neonatal mice with cyst of *Giardia lamblia* clone GS/M-83-H7 are asociated with an antigenic reset of the parasite. *Infection and Immunity* 2004; 72 4705-4771.
- Wade WF., Chen ZZ., Maki R., McKercher S., Palmer E., Cambier JC. and Freed JH. Altered I-A protein-mediated transmembrane signaling in b cells that express truncated I-A<sup>K</sup> protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989; 86:6297.
- Wallace JL & Miller MJ. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. *Gastroenterology* 2000; 119: 512–520.
- Watts C. Antigen processing in endocytic compartment. *Current Opinion Immunology*. 2001; 13;26-31.
- William E. Paul. *Fundamental Immunology*. 4ta Edition. PP 263-264.

- Zhou P., Li E., Shea-Donohue T. and Singer SM.. Tumour necrosis factor  $\alpha$  contributes to protection against *Giardia lamblia* infection in mice. *Parasite Immunology* 2007; 29, 367–374.

## ANEXOS

### Anexo 1

#### Cultivo de *G. lamblia*

##### Material

- 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, Bradford MA 01730)
- Filtros de poro 0.45 µm
- Campana de flujo laminar (Purifier class II biosafety cabinet, Delta series, LABCONCO)

##### Medio de Cultivo TYI-S-33

Bilis.....	50 mg
Tripticasa.....	2.0 g
Extracto de levadura.....	1.0 g
Dextrosa.....	1.0 g
Cloruro de Sodio.....	0.2 g
L-Cisteína.....	0.2 g

L-Ascórbico.....	0.01 g
Citrato Férrico Amoniacal.....	2.3 mg
Fosfato Monobásico.....	60 mg
Fosfato Dibásico.....	100 mg

Se ajusta el pH a 6.9 con NaOH 10N y se afora a 100 mL con agua bidestilada. Se agrega 0.2 mL de antibiótico (Rosephin). Se suplementa con 10 mL de suero bovino (SIGMA). Se Filtra el medio de cultivo en el sistema de filtración con filtro de 0.45µm.

### Procedimiento

1. Colocar aprox. 7.5 mL de medio TYI-S-33 suplementado al 10% con suero bovino en un tubo de ensayo 13 x 100 estéril.
2. Adicionar 0.5 mL de cultivo de *G. lamblia* GS-H7 en confluencia ( $1 \times 10^6$  trofozoitos/mL).

La transferencia se realiza en condiciones completamente estériles, en una campana de flujo laminar, reduciendo los riesgos de contaminación.

## Anexo 2

### Obtención de la mezcla antigénica de proteínas de *G. lamblia*

1. Se necesitan cultivos axénicos de trofozoítos de *G. lamblia* de la cepa GS/M-83-H7, WBC6, YJJ en tubos de ensayo con tapón de rosca.
2. Se mantienen en hielo por 15 min, para que las *Giardias* se despeguen del vidrio.
3. Se centrifugan a 800xg por 10 minutos a 4° C (Se resuspenden y se juntan en 2 tubos).
4. Lavar 3 veces con PBS estéril pH 7.2, centrifugando a 800xg 10 minutos a 4° C. Cada lavado es con 10 mL.
5. Resuspender en 1.4 mL de PBS pH 7.2.
6. Se realiza una cuenta celular en hemacitómetro con una dilución 1:100. Por otro lado se realiza la lisis celular (1.5 ml de suspensión en tubo eppendorf).
7. Congelar y descongelar 3 veces en Nitrógeno líquido a temperatura ambiente
8. Adicionar 5µL de inhibidores de proteasa.
9. Sonicar a 20 ciclos por 2 minutos (2 veces)
10. Centrifugar a 14,000 xg a 4°C por 15 min
11. Se obtiene el sobrenadante que es el antígeno soluble.

## Anexo 3

### Preparación del medio de cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (D-MEM)

Los medios de cultivo celular constituyen un elemento fundamental para el cultivo “*in vitro*” de células, tejidos, desarrollo de embriones, etc. Los medios de cultivo tienen una serie de componentes generales y específicos cuya presencia y concentración estará en dependencia del objetivo que se persiga en su utilización. También pueden contener por ejemplo extractos naturales, según su finalidad y debe quedar claro que no todos llevan un complemento completo de todos los factores. El medio de cultivo D-MEM se utiliza para cultivos de todo tipo de líneas celulares, tiene mayor concentración de aminoácidos y vitaminas, que otros medios de cultivo. Este medio de cultivo se suplementa con suero fetal bovino al 5% o al 10% según sea la aplicación.

#### 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-ALDRICH. H-3784)
- Penicilina/estreptolisina.
- β-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 deionizada o ultra pura agitar un poco asegurando que quede bien disuelto.

Para preparar 1 litro de D-MEM:

D-MEM .....	13.37 g
L-arginina HCl .....	0.116 g
L-asparagina anhydrous.....	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.....	1.0 mL

2.- Los reactivos líquidos como (a), (b) y (c) y el polvo D-MEM se deben de añadir dentro de la campana, utilizando pipetas estéril para evitar contaminación.

3.- Una vez añadidos todos los reactivos; el medio se debe de esterilizar por medio de filtración empleando un filtro Millipore de 0.22 µm.

4.- Ya filtrado el medio, pasarlo a un frasco de vidrio estéril y etiquetarlo con nombre de quien lo preparo y la fecha.

5.- Colocar pruebas de esterilidad para asegurar que el medio de cultivo no este contaminado.

6.- Guardar el medio de cultivo bajo refrigeración a 4 °C hasta su uso.

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

## **Anexo 4**

### **Evaluación de la proliferación y viabilidad celular**

Una suspensión celular se caracteriza por presentar un número de partículas microscópicas dispersas en un fluido. Habitualmente será necesario determinar tanto la densidad de las células en la suspensión como el porcentaje de éstas que son viables. Para determinar la densidad de las células se emplean diferentes técnicas, desde la relativamente simple cámara de conteo celular de la que existen numerosas variantes, entre ellas la que empleamos (cámara de Neubauer), hasta equipos automáticos de conteo celular como el "Cell Coulter" de la empresa Beckman-Coulter.

La cámara de Neubauer o hemacitómetro es utilizada generalmente para la cuenta de células sanguíneas como son los eritrocitos (glóbulos rojos) y linfocitos (glóbulos blancos), pero también puede ser utilizada para conteo de otros tipos de células. En el presente trabajo se utilizó este método de conteo celular el cual también nos ayudo a determinar la viabilidad de las células.

#### **Equipo:**

- ✓ Campana de flujo laminar (Purifier Class II Biosafety Cabinet, delta series, LABCONCO).
- ✓ Micropipeta de volumen variable de 100-1000  $\mu\text{L}$ .
- ✓ Micropipeta de volumen variable de 2-20  $\mu\text{L}$ .
- ✓ Cámara de Neubauer Bright light hemacytomether (Hausser scientific).
- ✓ Microscopio Invertido (Leica).
- ✓ Microscopio óptico (Leica).

**Material:**

- ✓ Puntas estériles para micropipeta.
- ✓ Tubos eppendorf de 1.5 mL.
- ✓ Azul de Tripán (SIGMA. T8154).
- ✓ Gradilla para tubos eppendorf.

**Procedimiento:**

1.- Tomar un frasco de cultivo celular y observarlo al microscopio invertido para descartar contaminación y verificar el estado del cultivo celular.

2.- Desprender las células adheridas a la superficie del frasco por medio de “golpecitos” moderados.

3.- Extraer aproximadamente 100  $\mu\text{L}$  del cultivo celular con una pipeta serológica de 1 mL estéril y depositarlos en un tubo de microcentrifugación.

4.- Con una micropipeta, tomar 20  $\mu\text{L}$  del cultivo contenido en el tubo de microcentrifugación y agregarlo a otro tubo al cual previamente se le agregó 20  $\mu\text{L}$  de colorante azul de tripan obteniendo así una dilución 1:2 (factor dilución. En este caso el factor volumen es de  $1 \times 10^4$  para expresar la concentración celular en mililitros).

5.- Con ayuda de la micropipeta, tomar 10  $\mu\text{l}$  de la suspensión de células y colorante y dejarlo que fluya por debajo del cubreobjetos en el hemacitómetro hasta que el área de la cuadrícula se llene, evitando que se derrame o entren

burbujas en el área de conteo, en caso de que esto suceda, se debe de montar de nuevo la cámara.

Para determinar la viabilidad celular se emplean el método de tinción con azul tripán. El azul tripán es un colorante que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana.

Así pues las células que aparecen en el microscopio, de color azul, son consideradas no viables. Así mismo las células blancas, por exclusión, a células viables es un error pues por este método se sobrevalora la viabilidad de las células en la suspensión, determinando como inviables sólo aquellas con la membrana rota.

6.- El porcentaje de viabilidad se puede calcular de la siguiente manera:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{Número de células viables contadas}}{\text{Total de células contadas}} \times 100$$

7.- La proliferación celular se evaluará mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$\text{Proliferación} = \frac{\text{Número de células contadas}}{\text{Número de cuadros contados}} \times 2 \times 10,000$$

## **Anexo 5**

### **Método Colorimétrico de la Sal de Tetrazolio (MTT)**

La sal de tetrazolio (MTT) se utiliza para evaluar la proliferación y viabilidad de un cultivo celular. Éste es un ensayo colorimétrico en el cual interviene la reducción de la sal de tetrazolio a cristales de formazan, ésto únicamente ocurre en células metabólicamente activas. A mayor proliferación celular mayor formación de los cristales y mayor será la señal generada. Los resultados se obtienen a través de un lector de microplacas.

### **Preparación de una solución de MTT de 5 mg/mL**

#### **Reactivos:**

- ✓ MTT (SIGMA: M2128)
  
- ✓ PBS 1X estéril.

#### **Equipo auxiliar:**

- ✓ Campana de flujo laminar (Purifier Class II Biosafety Cabinet, delta series, LABCONCO).
- ✓ Báscula digital.
- ✓ Espátula.
- ✓ Jeringa.
- ✓ Filtros de .22 um (Millipore GSWP02500)
- ✓ Vortex.

### **Procedimiento:**

- 1.- Pesar una cantidad pequeña de MTT en un tubo falcon de 50 mL.
- 2.- Con ayuda de una pipeta estéril, disolver el MTT con la cantidad necesaria de PBS estéril para ajustar a una concentración de 5 mg/mL. Agitar en vortex.
- 3.- Esterilizar la solución por filtración con ayuda de una jeringa estéril y un filtro Millipore de 0.22  $\mu\text{m}$ . Recuperar la solución filtrada a un tubo falcon estéril de 15 mL.
- 4.- La solución se debe de mantener protegida de la luz y a -30 C hasta su uso.

### **Evaluación de la proliferación celular por el método de MTT**

- 1.- Añadir MTT (10  $\mu\text{L}$  por cada 100  $\mu\text{L}$  de medio) a cada pozo de la placa que contiene las células a cuantificar.
- 2.- Incubar la placa durante 4 horas a 37 °C.
- 3.- Después de este tiempo; añadir isopropanol ácido (100  $\mu\text{L}$  0.04 N a cada pozo). Mezclar hasta disolver los cristales color púrpura oscuro formados.
- 4.- Incubar la placa durante 10 minutos a temperatura ambiente para asegurar la disolución total de los cristales.
- 5.- Leer la placa en un lector de ELISA con filtros de 570 nm y 655 nm.
- 6.- Graficar las absorbancias.

## **Anexo 6**

### **Elución Pasiva de Proteínas de Geles en Condiciones Desnaturalizantes y Reductoras (SDS-PAGE).**

1. Se utilizan geles preparativos de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) al 12% de 1.5 mm de ancho, con una concentración de 500 µg de la mezcla antigénica.
2. Dividir cuidadosamente en 6 fracciones de aproximadamente 1 cm. Estas a su vez se cortan en 3 fracciones de aprox. 0.33 cm y colocar en tubos de vidrio.
3. Se pasa en 5 ocasiones por jeringas de 3cc<sup>3</sup> y se recuperan en un eppendorf de 1.5ML.
4. Agregar 1.3 mL de agua destilada. Agitar vigorosamente en vortex.
5. Incubar a 4° C toda la noche. Al día siguiente agitar de nuevo.
6. Centrifugar a 1000xg por 15 minutos para sedimentar el gel.
7. Obtener el sobrenadante.
8. Lavar el sobrenadante obtenido en microcentricones de 30 kDa con PBS diluido 1:10. Estos lavados se realizan tres veces para eliminar el exceso de SDS.
9. Resuspender en la décima parte del volumen obtenido con agua destilada.

## **Anexo 7**

### **Protocolo de ensayo de activación de hibridomas de células T.**

1. Contar las líneas celulares a trabajar, CPA y los hibridomas de células T. El conteo celular se realiza en la cámara de Neubauer en los cuadros de blancos.
2. Ajustar la concentración a  $1 \times 10^6$  células/mL. Adicionar 100  $\mu$ L de la suspensión células de células T y 50  $\mu$ L de la suspensión celular de CPA.
3. Realizar diluciones del antígeno (stock). La concentración debe de ser 4X, para después diluirla a 1X. Por pozo finalmente tenemos un volumen de 100  $\mu$ L de células T + 50  $\mu$ L de CPA + 50  $\mu$ L de Dilución del antígeno.
4. Colocar en una microplaca de 96 pozos en fondo plano las células y las diluciones del antígeno.
5. Tomar de la palca petri 50  $\mu$ L de CPA con la pipeta micropipeta multicanal y pasarlos a una placa de 96 pozos de fondo plano.
6. Incubar la placa de 96 pozos de fondo plano a 37° C, de 20-24 horas
7. Después de éste tiempo de incubación, parar 100  $\mu$ L de cada pozo, transferirlo a una placa nueva y congelar la placa a -20° C. DE 20-24 horas.

8. Determinar los niveles de IL-2 de la placa con la línea celular CTLL-2.
9. Realizar 5 lavados de 15 mL de DMEM al cultivo de CTLL-2, después contar y colocar una cantidad de 40,000 células/pozo, a la
10. Introducir al ensayo controles con IL-2 exógena (Ver Anexo 5).

Se deben incluir los controles positivos y negativos de CTLL.

POSITIVO: 50  $\mu$ L de suspensión celular + 100  $\mu$ L de medio D5F + 10  $\mu$ L IL-2.

NEGATIVO: 50  $\mu$ L de suspensión celular + 150  $\mu$ L de medio D5F.

11. Incubar toda la noche a 37° C en atmósfera de CO<sub>2</sub> 5 %.
12. Después de éste tiempo de incubación se adiciona MTT.

## Anexo 8

### Tablas de los epitopes predichos por el algoritmo SYFPEITHI que estimulan a las hibridomas 4D5, 9B10 y 10G5.

Tabla 1.- Epitopes potenciales que se unen a la molécula de MHC clase II que induzcan la activación del hibridoma 4D5

<b>SYFPEITHI</b>			
	<b>Péptido</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Puntuación</b>
<b>Proteína de Choque Térmico</b>	353	M L R <b>D F F N G R E L S</b> K N V	24
	367	V N P <b>D E A V A Y G A S</b> V Q A	24
	535	A K E <b>D E K I R E G Q K</b> A R N	24
	214	V D P <b>S S G V F E V K A</b> T A G	22
	59	C A L <b>N P E N T I F D A K</b> R L	20
	457	L T K <b>D N N L L G T F D</b> L G G	18
	569	I S D <b>D D K K K I E T A</b> V N E	18
<b>Proteína Unidora de Anticuerpos</b>	244	L S V <b>D S G V F E V L A</b> T A G	32
	404	L N K <b>D I N A D E A V A</b> W G A	26
	568	A E E <b>D K I N R E R A E</b> A R N	24
	295	K A K <b>D M A V K K A I S</b> R L R	24
	197	L D V <b>V R I I N E P T S S</b> S I	22
	213	Y G L <b>D K K T Q E T S G</b> K A K	20
	402	K A L <b>N K D I N A D E A</b> V A W	20

	68	FTADGERLVGDAAKN	18
<b>IFT Complejo B</b>	377	AEVDAEVAKRCSSTD	24
	500	AELDATLQQKKRDLA	24
	86	TVCLLNLNESRSMAD	22
	240	TQINSQNEIRRAALN	20
	145	IPADYMVDPQIQTLL	18
	336	GSPDEEDNEQEKMSE	18
<b>Transquetolasa</b>	150	VVGDGCLQEGVSAEA	32
	214	KNGN TGLEELRSVIG	28
	451	GIRNGALSEVPAIHV	28
	552	ALDDVPNSSARAVLK	24
	12	AIRCLSVDQVNAANS	22
	275	IGVNPDLFHVSEV	20
	375	VLGDSMLIGSADLAS	18
	583	NITDGKHLILLSGS	18
<b>Acetil Coenzima A</b>	77	DSIDVVIVVIPS KAV	24
	305	PKGDNFVIVTNAGGP	24
	660	EILNGVRGQPRSDIK	22
	478	KVDNERIKKIAGAR	20
	123	MEQDLTKICKDAGIR	18

Tabla 2.- Epitopes potenciales que se unen a la molécula de MHC clase II que induzcan la activación del hibridoma 10G5

<b>SYFPEITHI</b>				
	<b>Péptido</b>		<b>Secuencia</b>	<b>Puntuación</b>
	678	692	PKDDVSN <del>EE</del> KEKER	24
	546	560	AIEDKKNKEEIMHLL	24
	95	109	IIEDTGIGMNKEEMI	16
	678	692	PKDDVSN <del>EE</del> KEKER	24
	75	89	GEGDTPMEINISVDT	18
<b>Grp94/Hsp90</b>	11	25	LCV <del>S</del> ASDHQNKAKYE	16
	499	513	KEYDNYVSELIKDGI	24
	277	291	VVEDGATGEKKASTA	26
	29	43	ETT <del>NLL</del> DIIVHSLYS	14
	451	465	IVD <del>S</del> SIRINLSREF	14
	304	318	GKKDPQSFQDAEKAV	18
	270	284	DVFDAPLVVEDGATG	18
	693	707	PDTDIPDRTEDEKLLA	12
	857	871	TQLEGTSSQESSNST	16
	99	113	TGIGMNKEEMITNLG	10
	839	853	ECDDDLDP <del>EETA</del> TMV	26
	209	223	GDS <del>DEDE</del> KNDSVIP	18
	186	200	GLE <del>DQADTV</del> AVAAIK	18
	775	789	NID <del>DI</del> YQSIADSM	32
<b>Importina</b>	662	676	IEFDNVNEFAVTDDD	18
<b>Subunidad <math>\beta</math>-3</b>	1104	1118	DQTNANLIEGANTVL	20

	852	866	MVSDTVDDFSDAIAT	18
	331	345	GLFDDTLTQAWLTSE	24
	470	484	MAQDPCIAVAAHSLG	16
	998	1012	VVKSGELVSKEALAA	14
	209	223	GDSDDDEDEKNDVIP	18
	775	789	NIDDIDIYQSIADSM	32
	839	853	ECDDDLDP EETA TMV	26
	951	965	TKLNKEWVEINQVCC	16
	102	116	TDIDGLHRQLVALKN NELDGYNRERQARE	26
	627	641	H	32
	254	268	QIDDANSSASSEHEL	10
<b>Proteína del</b>	223	237	RQRDELQRQLDTIRR	20
<b>Cuerpo Medio</b>	465	479	IKYDQLAREKAALET	26
	78	92	SAVSRYISEIWASQS	22
	685	699	RARDVEMLELRHKAM	18
	741	755	EMSDKLIEFEMIMDD	16
	499	513	RSDLNALREKAADYE	22
	52	66	NTLDEAVQILVDSGK	16
	396	410	TEIDTLISDRRALET	24
	60	74	ILVDSGKEEADKLG F	18
	146	160	AAAVEEIMQLKAQID	22
	699	713	MDVDTLVEEKQRLEM	24

## Anexo 9

### Datos de EM de las fracciones analizadas de tres proteínas

6687Glyceraldehyde	336	36336	7.2	(GAPDH)	K.SM*KPEEIPWGK.T
*	1319.11	0	3619.2	483.2	K.DAELHITGGCK.R
*	1202.03	0	5558.7	1079.1	K.VISNASCTTNCLAPLAM*VVNK.K
*	2280.08	0	4622.4	729.9	K.EGLM*TTVHAVTATQLPVDGPSK.K
*	2269.44	0	8601.8	1038.4	R.SCGANVIPSSTGAAK.A
*	1420.77	0	3837.1	528.4	R.VPVPDVSVDLTCTLEK.D
*	1873.55	0	4952.7	1054	K.DATYDEICAEIKR.A
*	1585.46	0	6962.6	895.1	M.LNSRFVKLVAWYDNEFGYANK.L
*	2535.64	0	5529.7	657.8	K.LVAWYDNEFGYANK.L
*	1690.76	0	5529.7	1658.4	
112304 elongation	442	49105	8.4	factor-1 alpha	K.HINLVVIGHVDNGK.S
	1516.66	0	8987.8	654.6	K.STLTGHLIYK.C
	1133.8	0	5658.6	892.3	R.EHATLANTLGIK.T
	1268.94	0	7136.7	1149.7	K.SDKM*PWYEGPCLIDAIDGLK.A
	2325.21	0	6270.3	335.4	R.LPIQDVYK.I
	977.04	0	3796.6	743.9	K.ISGVGTVPAGR.V
	1014.47	0	4816.9	608.7	R.VETGELAPGM*K.V
	1147.9	0	5534.6	1024.2	K.VVFAPTSQVSEVK.S
	1392.48	0	3744	634.5	K.AGPGDNVGFNVR.G
	1202.68	0	3176.3	197.5	K.AGPGDNVGFNVR.G
	1204	0	4553.6	783.5	K.KGYVVDVTDNDPPVGCK.S
	1806.15	0	3240.3	604.4	K.M*VPQKPLCCETFNDYAPLGR.F
	2413.21	0	4236.4	511.7	R.TVAVGIIQEIDKEEFKPKK.G

Locus	Length	MolWt	pI	Descriptive Name	Sequence
Unique	M+H+	CalcM+H+	TotalIntensity	SpScore	
1 103676 Tubulin	454	50552	5.1	alpha-1 chain	Q.HDGQMPSDKTIGGGDDAFNTFFSETGAGK.H
	2989.37	0	6931.3	448	K.TIGGGDDAFNTFFSETGAGK.H
	1992.84	0	7590.7	1123.5	R.AVFVDLEPTVVDEV.R.A
	1689.72	0	4470.8	941.8	R.QLYHPEQLISGKEDAANNYAR.G
	2418.24	0	7311.2	686.5	K.EIVDLVLD.R.V
	1071.96	0	2569	151.6	K.EIVDLVLD.R.V
	1073.63	0	7285	777.9	K.LADNCSGLQGFLIFHSFGGGTGAGFGSLFLER.L
	3336.02	0	9915.1	1601.5	R.NLDIERPTYTNLNR.L
	1720.38	0	5615.8	412.6	R.LIAQCISSTASLR.F
	1534.67	0	5212.9	1153	R.IHFPLCSYAPIISSEK.A
	1863.39	0	3696	544.6	K.LSVAELTNSVFEPANM*M*VK.C
	2113.79	0	6946.7	789.9	K.DVNAIAVIK.T
	1013.83	0	6799	702.7	R.TIQFVDWCPTGFK.V
	1600.5	0	5578.7	993.2	K.VGINYQPPTVIPGGDLAK.V
	1840.02	0	2969.7	734.2	Q.PPTVIPGGDLAK.V

1164.99	0	5260.8	777	R.AFVHWYVGEEM*EEGEFSEAR.E
2347.04	0	7313.7	1273.4	