

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Caracterización Parcial de la Respuesta Inmune Celular Contra la
Proteína Inmunogénica 5G8 de *Giardia lamblia*



TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta

Brenda Guadalupe Samaniego Soto

Hermsillo, Sonora

05 de diciembre de 2016

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

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



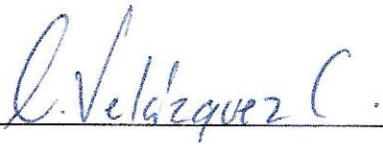
**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



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

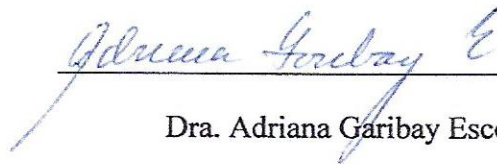
FORMA DE APROBACIÓN

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



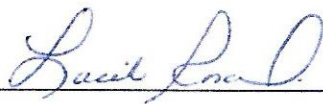
Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras

Director Académico



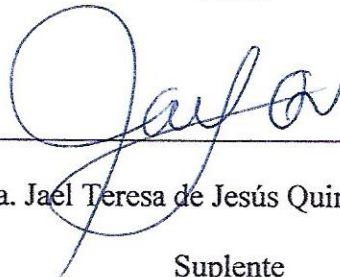
Dra. Adriana Garibay Escobar

Secretario



M.C. María Lucila Rascón Durán

Vocal



Dra. Jaél Teresa de Jesús Quintero Vargas

Suplente

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

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a mi familia. A mis queridos padres por el apoyo que me han brindado desde que inicie mi educación. Sin ustedes NADA de esto hubiera sido posible, por su infinito amor, comprensión e inmenso apoyo en cada meta que me propongo. Gracias a ustedes por ser mi más grande motivación para seguir adelante y luchar por mis sueños. A mi hermano Alan y cuñada Karolina, por estar siempre a mi lado en los momentos más difíciles, por ser un apoyo en las buenas y en las malas, muchas gracias a los dos.

Al Dr. Carlos Velázquez por ser un excelente ser humano, director, maestro y sobre todo amigo. Gracias por darme la oportunidad de realizar este trabajo contribuyendo en mi crecimiento profesional, por sus enseñanzas, su tiempo, su entera confianza y sobre todo la paciencia, sus consejos y creer en mí.

A mi querida M.C. Lucila Rascón, no sabe lo agradecida que estoy con usted por el gran apoyo que me ha brindado todos estos años, siempre está presente para brindar su ayuda con cariño y se ha convertido en mucho más que en una maestra para todos nosotros. Gracias maestra, lo requerí y sobre todo por las enseñanzas y consejos, además de haber sido para mí más que una guía en el laboratorio una entrañable amiga.

A mi querida amiga, compañera, maestra y sinodal, Dra. Jael Quintero, que desde un inicio fue la primera persona con la que trabajé en el laboratorio, gracias por todo su tiempo, dedicación para ayudarme a crecer y su amistad llena de buenos momentos. Muchísimas gracias Dra.

A la Dra. Adriana Garibay por ser parte importante de mi comité de tesis y una excelente profesora, gracias por haberme brindado siempre de su tiempo para hacer de este trabajo un producto de calidad.

Al Dr. Aldo Arvizú por su importante colaboración en este trabajo, mostrando siempre disponibilidad, apoyo y sobre todo paciencia. Muchas gracias por todo.

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

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

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

A mis queridos amigos del laboratorio: David, Ramses, Efraín, Lulú, Raúl, Víctor, Thania, Ale, Gloria, Samuel, Elia, Paola, Isaac, Lucía, Salvador, Max, Julio, entre otros gratos compañeros. Muchas gracias por enseñarme tantas cosas, siempre me escucharon, comprendieron, tuvieron paciencia, y sobre todo por su ayuda en la elaboración de este trabajo y por hacer del laboratorio un lugar tan agradable para trabajar.

¡Muchas gracias a todos!

Brenda Samaniego

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
OBJETIVOS	xii
RESUMEN	xiii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	4
<i>Giardia lamblia</i>	4
Giardiasis: aspectos clínicos	6
Proteínas inmunogénicas de <i>G. lamblia</i>	7
Mecanismos inmunológicos contra <i>G. lamblia</i>	9
Respuesta inmune innata contra <i>G. lamblia</i>	9
Respuesta inmune humoral contra <i>G. lamblia</i>	11
Respuesta inmune celular contra <i>G. lamblia</i>	12
Reconocimiento antigénico por parte de los linfocitos T	13
Procesamiento y presentación de antígeno	14
Modelo experimental	15
Análisis bioinformático	16
Predicción de epítopes que estimulan una respuesta inmune celular	17
Modelado molecular	17
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Animales de experimentación	20

Cultivo de líneas celulares	20
Cultivo de <i>G. lamblia</i>	21
Evaluación de la expresión superficial de la proteína 5G8 en trofozoítos de <i>G. lamblia</i> por citometría de flujo	21
Obtención de extracto proteico	22
Aislamiento de la proteína 5G8 mediante cromatografía de afinidad	22
Inmunodetección de la proteína 5G8 por Dot-Blotting	23
Electrotransferencia e inmunodetección de la banda proteica de ~ 71 kDa (Western-Blotting)	24
Identificación de péptidos a partir del análisis por espectrometría de masas ESI-MS/MS	25
Análisis bioinformático de las secuencias identificadas por espectrometría de masas ESI-MS/MS	25
Infección de ratones C3H/HeN con trofozoítos de <i>G. lamblia</i> 5G8 (+)	26
Ensayo de proliferación de esplenocitos de ratones infectados con <i>G. lamblia</i> mediante el método de reducción de MTT (Tetrazolio)	26
Expresión de CD69 en esplenocitos de ratones infectados con <i>G. lamblia</i>	27
Predicción de epítopes de células T	28
Análisis de interacciones estructurales <i>in silico</i> entre epítopes inmunodominantes de células T con moléculas del MHC-II	28
Análisis estadístico	29

RESULTADOS	30
Enriquecimiento de la proteína 5G8 de <i>G. lamblia</i> mediante inmunocromatografía de afinidad	30
La proteína 5G8 aislada del lisado celular de <i>G. lamblia</i> fue reconocida por el anticuerpo monoclonal 5G8.B5 y sueros de ratones infectados con el parásito	34
La proteína 5G8 de <i>G. lamblia</i> está constituida por una sola cadena polipeptídica y forma parte de la familia de las VSPs	36
La Proteína 5G8 fue capaz de inducir una respuesta inmune celular en esplenocitos de ratones infectados con <i>G. lamblia</i>	40
La proteína 5G8 cuenta Con 53 potenciales epítopes capaces de estimular Una respuesta inmune celular	45
Posibles interacciones estructurales <i>in silico</i> entre epítopes inmunodominantes de células T con moléculas del MHC-II	48
DISCUSIÓN	55
CONCLUSIONES	64
BIBLIOGRAFÍA	65
ANEXOS	77
ARTÍCULO ENVIADO PARA PUBLICACIÓN A LA REVISTA <i>PARASITOLOGY INTERNATIONAL</i> : “Isolation and partial characterization of an immunogenic antigen of <i>Giardia lamblia</i> ”	137

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Predicción de epítopes de la proteína 5G8, afines a las moléculas del MHC clase II de ratón (haplotipo I-A ^k) generados por la base de datos SYFPEITHI.	46
II. Interacciones químicas entre el MHC-II (haplotipo I-A ^k) con el epítope (67-81 aa) de la proteína 5G8 y el epítope (48-63 aa) de la proteína HEL.	54
III. La proteína 5G8 presenta epítopes conservados entre diferentes genotipos de <i>G. lamblia</i> .	63

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Ciclo de vida de <i>G. lamblia</i>	5
2.	Análisis de expresión de la proteína 5G8 en la superficie de <i>G. lamblia</i>	31
3.	Perfil de inmunorreconocimiento de antígenos de <i>G. lamblia</i> reconocidos por el anticuerpo monoclonal 5G8.B5	32
4.	Inmunorreconocimiento (Dot-Blotting) de la proteína 5G8 de <i>G. lamblia</i> en fracciones cromatográficas	33
5.	Perfil Electroforético (SDS-PAGE) e Inmunorreconocimiento de la proteína 5G8 de <i>G. lamblia</i>	35
6.	Péptidos identificados a partir de la banda proteica de ~ 71 kDa por Espectrometría de Masas ESI-MS/MS	37
7.	Péptidos identificados a partir de la banda proteica de ~ 71 kDa por Espectrometría de Masas ESI-MS/MS y su relación a nivel génico	38
8.	Estructura primaria y características de la proteína 5G8	39
9.	La proteína 5G8 estimula la proliferación de esplenocitos de ratones infectados con <i>G. lamblia</i> (evaluación cualitativa)	41
10.	La proteína 5G8 estimula la proliferación de esplenocitos de ratones infectados con <i>G. lamblia</i> (evaluación cuantitativa)	42
11.	La proteína 5G8 no estimula la proliferación de esplenocitos de ratones no infectados con <i>G. lamblia</i>	43
12.	La proteína 5G8 induce la activación de esplenocitos provenientes	

	de ratones infectados con <i>G. lamblia</i>	44
13.	Ubicación de los epítopes de la proteína 5G8 con mayor probabilidad de unión a las moléculas del MHC clase II de ratón (haplotipo I-A ^k) en la secuencia aminoacídica de la proteína 5G8	47
14.	Representación en superficie y en listón de la interacción por modelado molecular <i>in silico</i> entre el epítope de la proteína 5G8 (67-81 aa) y el MHC-II de ratón (haplotipo I-A ^k).	50
15.	Interacciones químicas entre el epítope de la proteína 5G8 (67-81 aa) y los bolsillos del MHC-II (haplotipo I-A ^k)	51

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar parcialmente la respuesta inmune celular contra la proteína inmunogénica 5G8 de *G. lamblia*.

Objetivos Específicos

- Aislar e identificar la proteína 5G8 de *G. lamblia*.
- Evaluar la respuesta inmune celular específica contra la proteína 5G8 a partir de esplenocitos de ratones infectados con *G. lamblia*.
- Predecir los epítopes de la proteína 5G8 con mayor probabilidad de unión a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (haplotipo I-A^k).
- Analizar *in silico* las posibles interacciones específicas entre epítopes inmunodominantes de la proteína 5G8 y el complejo principal de histocompatibilidad de clase II (haplotipo I-A^k).

RESUMEN

El protozooario *G. lamblia* es el parásito causal de giardiasis, infección parasitaria que se produce por la contaminación fecal/ oral en un medio de higiene precario, siendo una de las enfermedades intestinales humanas más comunes en todo el mundo. Las manifestaciones clínicas de esta infección varían desde el estado de portador asintomático hasta llegar a desarrollar un cuadro de diarrea severa, dolor abdominal, náuseas, malabsorción de nutrientes y pérdida de peso. En la actualidad, el tratamiento farmacológico contra la giardiasis llega a ser efectivo, sin embargo, tiene algunas limitantes importantes, como la inducción de efectos secundarios y la probable inducción de cepas resistentes. No se cuenta con una vacuna contra *G. lamblia* en humanos, esto es en gran medida por los limitados conocimientos que se tienen de la respuesta inmune durante la enfermedad. Para lograr desarrollar esta, primeramente se deben identificar, caracterizar, purificar o sintetizar los antígenos que confieren inmunogenicidad a la vacuna. Sin embargo, nuestro conocimiento sobre antígenos inmunogénicos de *G. lamblia* es limitado. Por esta razón, es importante entender los mecanismos inmunológicos que controlan y erradican la infección por este parásito intestinal. El presente estudio se enfocó en la caracterización e identificación de la proteína inmunogénica 5G8 de *G. lamblia* a través de la técnica analítica de espectrometría de masas y el posterior análisis por herramientas bioinformáticas, así como también la caracterización parcial de la respuesta inmune celular contra este antígeno.

La proteína 5G8 se aisló mediante una cromatografía de afinidad a partir de un lisado de trofozoítos de *G. lamblia*. La proteína 5G8 aislada (~ 71 kDa) fue analizada mediante espectrometría de masas. Se identificaron dos proteínas con masas moleculares relativas de ~ 28 kDa y ~ 38 kDa pertenecientes a la familia de Proteínas Variables de Superficie (VSPs). El análisis bioinformático permitió identificar un constructo, el cual fue traducido en una sola cadena polipeptídica compuesta de 607 aminoácidos y una masa molecular de ~ 61 kDa.

Adicionalmente, al evaluar la respuesta inmune celular, se observó una proliferación celular significativamente más alta ($p < 0.05$) en esplenocitos estimulados con la proteína 5G8 aislada y el lisado de trofozoítos de *G. lamblia* comparada con los que fueron estimulados con una proteína irrelevante utilizada como control negativo (HEL). Por otro lado, el porcentaje de expresión del marcador CD69 como indicativo de activación temprana en estos esplenocitos, se mostró más elevado en las células que estuvieron en contacto con el extracto proteico total y la proteína 5G8 de *G. lamblia* comparado con los esplenocitos con la proteína utilizada como control negativo (HEL).

Por último, el análisis de modelado molecular *in silico* proporcionó un acercamiento al posible sitio de unión e interacciones moleculares entre los péptidos inmunodominantes de la proteína 5G8 y las moléculas del MHC-II (haplotipo I-A^k). El resultado mostró una distribución uniforme y compacta del péptido con mayor inmunodominancia (67-81 aa) en la cavidad, favoreciendo su posible interacción con aminoácidos de los bolsillos del MHC-II (haplotipo I-A^k).

En conclusión, nuestros datos sugieren que la proteína 5G8 es una VSP (~ 71 kDa) codificada por un solo gen. Esta proteína puede inducir una respuesta inmune celular en esplenocitos de ratones infectados y re-infectados *G. lamblia*. Las interacciones químicas que se favorecen entre péptidos inmunodominantes con aminoácidos de los bolsillos del MHC-II nos permiten profundizar en el conocimiento de epítopes potenciales que desencadenan una respuesta inmune celular, los cuales podrían considerarse como blanco de futuros estudios.

La caracterización bioquímica e inmunológica de antígenos inmunogénicos proporcionará una mejor comprensión de la interacción *G. lamblia*-hospedero, y será importante para el desarrollo de estrategias de control eficaces contra la giardiasis.

INTRODUCCIÓN

Giardia lamblia es el protozoo patógeno responsable de la giardiasis, una de las infecciones parasitarias intestinales más comunes a nivel mundial en seres humanos y muchos otros vertebrados (Lujan, 2006; WHO, 2005). Esta infección puede presentar un curso asintomático, o bien, acompañarse de manifestaciones clínicas con un cuadro diarreico agudo o crónico asociado al síndrome severo de mala absorción de nutrientes, afectando principalmente a niños y adultos inmunocomprometidos (Adam, 2001; Eckmann, 2003; Lujan, 2006). Los factores que posiblemente contribuyen a la variación de las manifestaciones clínicas pueden ser: la virulencia de la cepa, el número de quistes ingeridos, la edad del hospedero y el estado del sistema inmune en el momento de la infección (Faubert, 2000).

El parásito presenta un ciclo de vida caracterizado por la existencia de dos estadios: el trofozoíto, que es el estadio vegetativo, y el quiste que es la forma infectiva, el cual tiene capacidad de sobrevivir fuera del hospedero (Adam, 2001; Ankarklev y col., 2010; Keserue y col., 2011). La infección se inicia al ingerir alimentos o agua contaminados con quistes de *G. lamblia*, donde el pH del estómago y la acción de algunas enzimas digestivas favorecen su desenquistamiento, y por lo tanto, la adherencia de la forma trófica al lumen intestinal ocasionando la patología de la infección. Los trofozoítos adheridos a la mucosa, se multiplican por fisión binaria longitudinal. Algunos trofozoítos reenquistan en el colon para protegerse de condiciones adversas del medio, y son expulsados junto con las heces del hospedero, contaminando agua y alimentos, cerrándose así el ciclo de vida (Eckmann y col., 2000; Faubert, 2000; Gillin y col., 1988).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que aproximadamente 250 millones de personas en el mundo están infectadas y que se presentan 2.8 millones de nuevos casos por año, siendo una de las causas más comunes de diarrea en países industrializados, con una prevalencia del 15-30 % y del 20-60 % en países en vías de desarrollo (Savioli y cols., 2006; WHO, 2005). México, es un país endémico con

prevalencias que varían desde el 5 al 60 %. Según la Secretaría de Salud y el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SSA), durante el 2013, Sonora se ocupó el quinto lugar (SSA, 2013) y actualmente hasta el mes de agosto del 2016 se encuentra en el octavo lugar (SSA, 2016).

En la actualidad, el tratamiento para la giardiasis está limitado a fármacos cuyos principios activos no son lo suficientemente eficaces y pueden causar efectos secundarios, como ejemplo encontramos a metronidazol que puede presentar cefalea, náuseas, vértigo, entre otros (Gardner, 2001). También se han registrado cepas de *Giardia* resistentes a dichos medicamentos. Además, es frecuente la re-infección luego del tratamiento debido a que estos individuos no generan mecanismos de defensas eficaces para eliminar el parásito (Lujan, 2006).

A pesar de la alta morbilidad asociada a *G. lamblia*, se conoce muy poco acerca de su complejidad antigénica, especialmente su naturaleza bioquímica y su participación en la respuesta inmune del hospedero (Chaudhuri y col., 1997). El conocimiento y el papel que esos antígenos tienen en la respuesta inmune durante la infección son importantes para el entendimiento de la enfermedad. Por tal motivo, se ha investigado la participación de la respuesta innata y adaptativa en los mecanismos de erradicación de la infección tanto en humanos como en modelos animales de experimentación (Eckmann, 2003). El equilibrio inmunológico del organismo es desafiado por la presencia del parásito. La inmunidad innata, es la primera línea de defensa del sistema inmune, que involucra mecanismos bioquímicos y celulares inespecíficos presentes antes de que se produzca la infección y que están preparados para responder con rapidez ante esta. 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 anticuerpos con alta especificidad contra el agente, (inmunidad humoral), como células T (inmunidad celular) capaces de confrontar al agente infeccioso. El conocimiento que se tiene acerca de los mecanismos de

patogénesis, la respuesta inmune involucrada en la giardiasis, así como la identificación y caracterización de los antígenos de este parásito, son limitados (Adam, 2001). Por esta razón, es importante la caracterización de antígenos inmunodominantes de *G. lamblia* que estimulan una respuesta inmune de tipo celular y humoral, comprendiendo así las bases inmunológicas moleculares y celulares que se llevan a cabo durante la infección por este parásito que puedan incidir en el futuro desarrollo de medidas profilácticas más eficaces contra la giardiasis.

ANTECEDENTES

Giardia lamblia

El parásito *G. lamblia* es un protozooario que presenta un ciclo de vida directo con dos estadios: el trofozoíto y el quiste (Figura 1). El trofozoíto mide 12-15 μm de longitud por 5-9 μm de ancho (Ankarklev y col., 2010), posee una superficie dorsal convexa y una superficie plana en la que se encuentra el disco ventral que le facilita la adhesión a la mucosa del intestino delgado superior (duodeno). Cuenta con 2 núcleos y 4 pares de flagelos. El quiste es de forma elipsoidal, mide aproximadamente 8-14 μm de largo y 7-10 μm de ancho, su superficie es lisa y su pared es doble y altamente resistente, lo que permite la supervivencia prolongada en una variedad de condiciones ambientales (Adam, 2001; Keserue y col., 2011). Las formas infectivas jóvenes poseen dos núcleos, y las formas maduras cuatro, los cuales se localizan en un extremo hasta el momento en que el parásito está listo para dividirse (Erlandsen y col., 1989; Erlandsen y col., 1990; Johnston y col., 2003; Keserue y col., 2011).

G. lamblia carece de organelos prominentes, que caracterizan a una célula eucariótica, como mitocondrias y peroxisomas, por lo tanto, es considerado un microorganismo de división temprana en la línea eucariótica de descendencia (Adam, 2001). Por esta razón el estudio de *Giardia* resulta de gran interés, ya que permite profundizar en el conocimiento de la evolución temprana de estructuras, así como vías de transporte o síntesis de proteínas de células eucarióticas superiores.

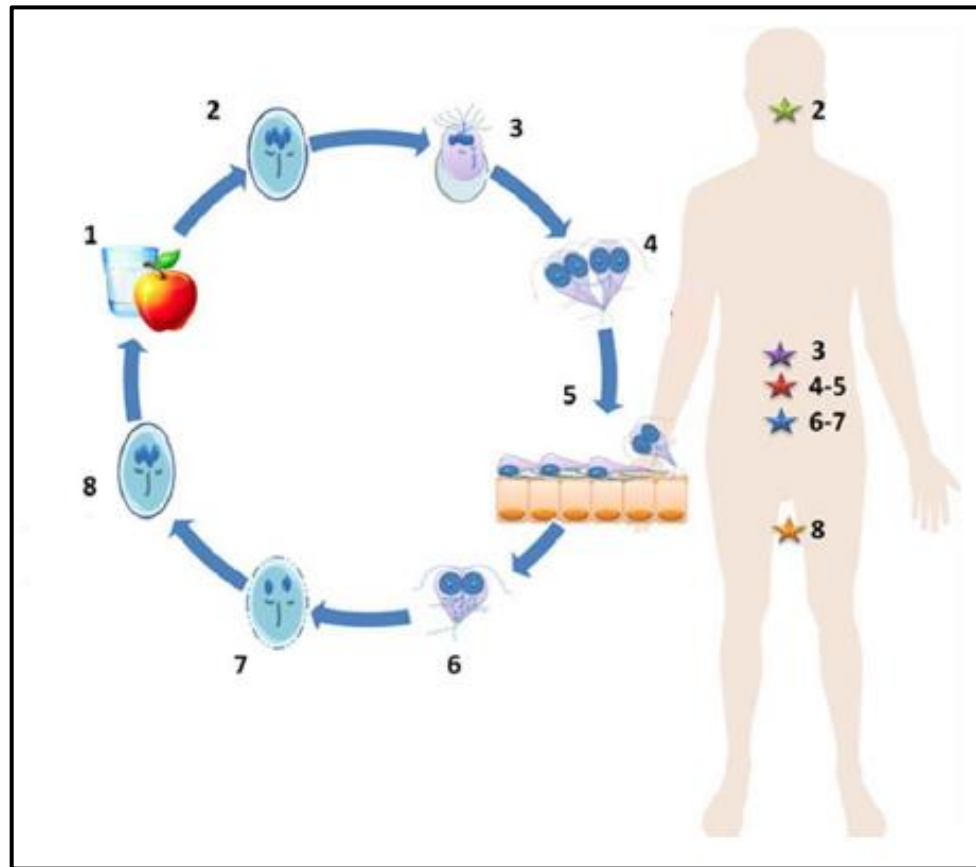


Figura 1. Ciclo de vida de *G. lamblia*. La infección inicia con la ingestión de quistes presentes en agua y alimentos contaminados (1 y 2). Posteriormente, la exposición al ambiente del estómago favorece el desenquistamiento (3). El trofozoito se reproduce por fisión binaria longitudinal (4), y coloniza el intestino delgado (5). Al presentarse condiciones adversas, se produce el enquistamiento (6 y 7), para finalmente ser liberados en forma de quistes a través de las heces y cerrar así el ciclo de vida (8). (López y col., 2015)

Giardiasis: Aspectos Clínicos

G. lamblia es el agente causal de la giardiasis, una de las infecciones gastrointestinales más comunes en todo el mundo. La infección origina una amplia variedad de manifestaciones clínicas, que van desde un estado de portador asintomático hasta la diarrea severa, dolor abdominal, náuseas, malabsorción y pérdida de peso (Astiazarán y col., 2009; Eckmann, 2003; Palm y col., 2003). Existen diversos factores que posiblemente contribuyen a la gran variedad de síntomas clínicos. Entre estos se encuentran la virulencia de la cepa de *Giardia*, el número de quistes ingeridos, la edad del hospedero y el estado del sistema inmune del mismo en el momento de la infección, ya que tanto la respuesta inmune humoral, como celular, son importantes en el control de la infección. Sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos implicados (Palm y col., 2003).

Esta patología es considerada un problema de salud pública en diversos países, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que existen alrededor de 250 millones de personas infectadas con este parásito en el mundo (WHO, 2005), afectando principalmente a países en vías de desarrollo entre los cuales se encuentra México, donde según informes de la Secretaría de Salud y del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Sonora se encuentra en el octavo lugar, hasta el mes de agosto del 2016 (SSA, 2016).

En la actualidad, el control de la infección se limita al uso de fármacos. Actualmente los antiparasitarios ampliamente utilizados son: metronidazol, tinidazol, albendazol y furazolidona (Vázquez y col., 2009). Sin embargo, al igual que muchos otros fármacos pueden tener efectos secundarios adversos y generar cepas resistentes, como ya se ha reportado para el metronidazol (Müller y col., 2007). La resistencia a los fármacos es sólo una de las posibles explicaciones que se pueden argumentar para explicar el fallo en el tratamiento antiparasitario. Así, el desarrollo de medidas profilácticas contra *G. lamblia* se considera un enfoque prometedor para el control de esta parasitosis (Rivero y col., 2010).

Proteínas Inmunogénicas de *Giardia lamblia*

Actualmente, no existe una vacuna disponible para la giardiasis humana. Por esta razón, es importante la identificación de antígenos inmunogénicos de *G. lamblia* que estimulen respuestas tanto humoral como celular (Astiazarán y col., 2009). La caracterización de antígenos de *G. lamblia* es de suma importancia en el conocimiento de los mecanismos de defensa del hospedero así como los mecanismos de la patogenicidad del parásito.

Dentro de los principales antígenos estudiados en *G. lamblia*, se encuentran las Proteínas Variables de Superficie (VSP, Variant-Specific Surface Protein), que se encuentran en la superficie del parásito, son escasamente glicosiladas (Papanastasiou y col., 1997) ricas en cisteína, con pesos moleculares documentados de 22 kDa a más de 200 kDa. Las VSPs sufren de variación antigénica, por lo que se ha cuestionado su valor como blancos moleculares de diagnóstico (Palm y col., 2003) y en el desarrollo de vacunas (Singer, 2000). Sin embargo, debido a que los mecanismos inmunológicos durante la infección se caracterizan por una fuerte respuesta hacia las VSPs, diversos estudios se han enfocado en evaluar la capacidad protectora de estas proteínas durante la giardiasis. La inducción de una respuesta inmune activa considerable contra *G. lamblia* utilizando un repertorio de VSPs se asocia con una reducción en los signos de la infección en un modelo experimental, mas no con la eliminación del parásito (Rivero y col., 2010). Dichos resultados son consistentes con estudios anteriores en humanos, mostrando que algunos individuos pueden estar infectados crónicamente y otros re-infectados con o sin síntomas, detectándose la presencia de anticuerpos secretores y sistémicos específicos para *Giardia* (Nash y col., 1987; Nash y col., 1990). Con base a esto, se podría hacer un replanteamiento de las estrategias actuales con respecto a la inmunoprofilaxis para los parásitos que presentan variación antigénica (Rivero, 2010).

Por otra parte, se han reportado otros antígenos de *G. lamblia*, como las proteínas de choque térmico (HSP, Heat Shock Protein), que son liberadas por el parásito en respuesta al estrés; lectinas, localizadas en la superficie de membrana del parásito e implicadas en los mecanismos de adhesión a la superficie del intestino. También se han identificado proteínas de la pared del quiste (CWP, Cyst Wall Protein) y proteínas

asociadas al citoesqueleto de *Giardia*, como son las giardinas y tubulinas. Por otro lado, también han sido reportadas proteínas relacionadas con funciones metabólicas como la enolasa, arginina deaminasa y ornitina carbamoil transferasa, (Davids y col., 2006; Faubert, 2000; López-Romero y col., 2015; Palm y col., 2003; Tellez y col., 2005).

El laboratorio de Inmunología y Biología Celular del Departamento de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad de Sonora se ha dedicado a la identificación y caracterización bioquímica e inmunológica de antígenos capaces de inducir una respuesta inmune humoral y celular. El análisis de muestras fecales y de sueros de ratones C3H/HeJ después de ser infectados y re-infectados con trofozoítos de *G. lamblia*, muestra que la IgA intestinal y anticuerpos IgG en suero se dirigen a un número limitado de bandas proteicas, con pesos moleculares de 48, 55, 63, 71, 86, 106, 131 y 159 kDa (Velazquez y col., 2005). Al utilizar anticuerpos monoclonales específicos contra *G. lamblia*, así como anticuerpos IgG generados durante la infección en el modelo murino, se observó que reconocen una proteína de ~ 71 kDa (Proteína 5G8). En estudios posteriores, se realizaron ensayos de citometría de flujo en los cuales se observó que sólo el 5 % de la población de la cepa GS/M-83-H7 de *G. lamblia* expresaban en la superficie del parásito la proteína 5G8. Basados en esta observación se enriqueció la población de trofozoítos de la cepa GS/M-83-H7, que expresa en la superficie celular este antígeno, dando como resultado un incremento en la población que expresan la proteína en la membrana plasmática del parásito de aproximadamente 70 %. A esta población se le llamó 5G8 (+) (Quintero y col., 2013). Con base en estos resultados, se caracterizó bioquímicamente la proteína 5G8. El análisis mediante espectrometría de masas, identificó a la proteína de ~ 71 kDa como una Proteína Variable de Superficie (Tesis de Maestría, Valdez, 2015; Quintero y col., 2016). Actualmente, el presente grupo de investigación se ha enfocado en el estudio de los mecanismos efectores de la respuesta inmune contra la proteína 5G8.

Además de conocer qué proteínas de este parásito son inmunogénicas y cuáles inducen una respuesta inmune protectora, es necesario obtener más información acerca del papel que juegan estas moléculas en el parásito, es decir, si son antígenos de

superficie, intracelulares, si son moléculas que son excretadas por *Giardia*, si pertenecen al grupo de las VSPs, las cuales son de gran importancia en los procesos de evasión de respuesta inmune por parte de *G. lamblia*, y por último conocer si dichas proteínas están presentes de manera constitutiva y si son conservadas entre las distintas cepas de este parásito. Este conocimiento es sumamente importante en el desarrollo de una vacuna efectiva contra *G. lamblia*.

Mecanismos inmunológicos 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 inmune innata y adaptativa en los mecanismos de eliminación de la infección tanto en humanos como en modelos animales de experimentación.

Respuesta Inmune Innata Contra *G. lamblia*

La primera línea de defensa contra la giardiasis, pertenece a elementos de la inmunidad innata. Debido a que *Giardia* coloniza el intestino delgado superior (duodeno) y se adhiere a la superficie del epitelio intestinal (Lujan, 2006), la mucosa intestinal juega un papel importante inhibiendo este proceso, que aunado al movimiento peristáltico del intestino afectan mecanismos de colonización del parásito y favorecen su excreción. Adicionalmente, la flora normal en el intestino puede inhibir la infección por *G. lamblia* a través de diferentes mecanismos que incluyen la competencia por recursos alimenticios, toxicidad e inducción de respuestas inmunes cruzadas (Falk y col., 1998). Existen mecanismos efectores a nivel de mucosas entre los cuales destacan productos antimicrobianos, sintetizados por células epiteliales, como es el Óxido Nítrico (NO) que presenta una actividad amplia contra bacterias y parásitos patógenos. El NO actúa inhibiendo el crecimiento del parásito sin afectar la viabilidad, actuando como citostático más que como un citotóxico para *G. lamblia* (Eckmann y col., 2000). Sin embargo, el parásito ha desarrollado estrategias para contrarrestar dichos efectos, como

la capacidad que tiene para inhibir *in vitro* la producción de NO epitelial (Pavanelli y col., 2010).

Varias citocinas poseen funciones en la regulación de los mecanismos celulares inespecíficos relacionados con el control de la giardiasis. Dentro de las citocinas que desempeñan un papel importante durante la infección, se encuentra la interleucina 6 (IL-6), que es un homodímero de 19-26 kDa; es considerada como una proteína proinflamatoria que actúa modulando la maduración y conmutación de las células B para producir IgA, así como también regulando la diferenciación de las células T (Kamda y col., 2012). 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 y col., 1995). En otros estudios, la interleucina con mayor título en pacientes con giardiasis, fue la IL-2 (glicoproteína de 14-17 kDa), seguida de la IL-4 (glicoproteína de 18 kDa), mientras que la IL-10 (glicoproteína de 34-40 kDa) no mostró elevación.

Algunas estirpes celulares en la respuesta inmune innata, pueden actuar de manera directa o indirecta. Estudios previos demostraron un incremento en la población de macrófagos en ratones infectados con *G. lamblia*, aunque han sido descritas como células reguladoras (Maloney y col., 2015). Por otra parte, se ha reportado que los macrófagos de la mucosa son capaces de ingerir *in vivo* trofozoítos de *G. lamblia* (Owen y col., 1981), resultado confirmado en un estudio posterior donde los trofozoítos fueron ingeridos por macrófagos de placas de Peyer, mejorando la actividad del estallido oxidativo de los macrófagos de la mucosa (Hill y col., 1990).

Los mastocitos, son células efectoras de la respuesta inmune que juegan un papel importante en el control de la infección contra parásitos. Estas células contribuyen en la supervivencia, proliferación y diferenciación de células B a células plasmáticas secretoras de anticuerpos de isotipo IgA. Modelos murinos deficientes de mastocitos, no pueden controlar la infección con *G. lamblia* (Li, 2004). Adicionalmente, los mastocitos y NO actúan en coordinación para inducir el peristaltismo, y desfavorecer la colonización del parásito en el intestino (Li y col., 2006).

Estudios previos sugieren la capacidad de *G. lamblia* para inducir una respuesta inmune humoral y celular, sin invadir el epitelio. El conocimiento acerca de la capacidad del parásito para inducir una respuesta inmune sistémica está limitado. Sin embargo, las células M y las células dendríticas están implicadas en el transporte de antígenos de *Giardia* hacia las placas de Peyer, dónde actúa la respuesta inmune adquirida.

Respuesta Inmune Humoral Contra *G. lamblia*

Cuando los mecanismos de la inmunidad innata no pueden eliminar al parásito, este continúa proliferando hasta desencadenar la respuesta inmune adaptativa, en la cual actúan mecanismos inmunológicos capaces de aclarar la infección. El parásito se adhiere y coloniza el duodeno, donde el principal mecanismo de defensa inmune está mediado por el Tejido Linfoide Asociado a Mucosas (MALT) el cual posee un gran número de células plasmáticas, reconocidas por ser grandes productoras y secretoras de anticuerpos IgA (Fagarasan y col., 2003).

Diversos reportes de investigación indican que el aclaramiento de la giardiasis en modelos murinos inmunocompetentes ocurre en 3-5 semanas después de la infección, estos datos se relacionan con el tiempo en el que se establece la inmunidad humoral (Eckman, 2003; Singer y col., 2000; Velazquez y col., 2005). Las infecciones repetidas en humanos y modelos animales han demostrado que después de una exposición inicial a *Giardia*, los individuos desarrollan inmunidad a una segunda infección o presentan menor daño patológico en el epitelio intestinal (Soleymani-Mohammadi y col., 2010).

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 (Faubert, 2000). Por otra parte, ciertos anticuerpos específicos anti-*giardia* como IgM e IgG presentan actividad citotóxica para el trofozoíto a través de mecanismos dependientes o independientes del sistema del complemento (Nash y col., 1987).

La inmunidad mediada por anticuerpos, en particular del isotipo IgA, contribuyen al mantenimiento de la inmunidad protectora contra la giardiasis. Los ratones deficientes en la producción de anticuerpos, principalmente del tipo IgA, no tienen la capacidad de eliminar a *G. lamblia* (Langford y col., 2002). Sin embargo, se ha reportado que ratones deficientes de células B infectados con *G. lamblia* son capaces de controlar la infección (Singer y col., 2000). Estos datos sugieren que tanto las células B, como los anticuerpos (principalmente IgA) son importantes, pero no es estrictamente necesario en el control de infecciones por *Giardia*.

Respuesta Inmune Celular Contra *G. lamblia*

Además de la acción de los anticuerpos sobre el parásito, existe otro proceso de defensa, conocido como inmunidad celular, la cual involucra diversas estirpes celulares que a través de la interacción de receptores específicos con moléculas antigénicas, juegan un papel importante en el control y eliminación del parásito. En la actualidad, el mecanismo desempeñado por las células B y T durante la giardiasis ha sido reportado; sin embargo, la identificación y caracterización de antígenos inmunodominantes de *G. lamblia* que estimulan una respuesta inmune celular es limitada. En humanos y en modelos murinos de infección, la presencia de trofozoítos de *G. lamblia* induce la proliferación de células T en mucosas y sangre periférica, con la subsecuente producción de INF- γ (Ebert, 2000). En otros estudios, se demostró que una disminución en las poblaciones de células T CD4⁺ en humanos y animales, favorece el desarrollo de la giardiasis crónica (Lujan y col., 2011; Singer y col., 2000).

Aunque está reportada la importancia del papel que juegan las células T durante el curso de la infección por *Giardia*, los mecanismos de acción son poco conocidos. En estudios previos, se demostró la relevancia de la memoria inmunológica contra el parásito, encontrándose células T CD4⁺ específicas para *Giardia* en la sangre periférica de individuos que se infectaron 5 años antes (Hanevik y col., 2011). Es posible que las células T CD4⁺ induzcan la activación, maduración y diferenciación de células B a

células plasmáticas para producir inmunoglobulinas específicas contra *Giardia* (López-Romero y col., 2015). Por otro lado, las células T también están asociadas con el daño patológico que causa alteraciones en la membrana apical de los enterocitos durante la giardiasis. En ratones atímicos infectados (carentes de células T) se ha detectado una disminución en daños a nivel de microvellosidades y en la reducción de la actividad de disacaridasas (Scott y col., 2002). La reconstrucción del timo con células T de un ratón infectado con *G. lamblia* disminuyó la carga parasitaria en el intestino, pero aumentó la atrofia de las microvellosidades intestinales, sugiriendo que el daño en el intestino del hospedero es desarrollado por la acción de las células T CD8⁺ (Scott, 2004). Estudios adicionales revelaron la presencia de grandes infiltrados de células T CD8⁺ en individuos con giardiasis sintomática, especialmente en aquellos que presentaban diarrea y flatulencia (El-Shazly y col., 2003). En este contexto, mientras que las células T CD4⁺ son importantes mediadores en los mecanismos de eliminación de *Giardia*, las células T CD8⁺ desempeñan un papel en la inmunopatología de la enfermedad, lo que indica que las células T juegan un papel doble durante giardiasis (López-Romero y col., 2015).

Reconocimiento Antigénico por Parte de Linfocitos T

En la respuesta inmune adaptativa, el antígeno es reconocido por dos conjuntos de moléculas receptoras altamente variables, las inmunoglobulinas que sirven como receptor de antígenos en las células B y un receptor específico de antígeno en las células T. Los mecanismos efectores de la inmunidad humoral se desencadenan cuando las células B interactúan directamente con el patógeno, mientras que las células T no tienen contacto directo, sino que requieren la cooperación de células especializadas en el procesamiento y presentación de antígeno, llamadas células presentadoras de antígeno profesionales (CPA). Las células T pueden detectar a un microorganismo mediante la interacción con CPA, las cuales reconocen moléculas antigénicas del patógeno, lo endocitan e inician el procesamiento de este a pequeños fragmentos o péptidos, de los cuales solo algunos tienen la capacidad de unirse a moléculas del complejo principal de

histocompatibilidad (clase I o II) para posteriormente ser reconocidos por las células T a través de su receptor (TCR) (Cuendet y col., 2011). La capacidad de un péptido para interactuar con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y ser presentado a células T, se conoce como inmunodominancia y depende de las interacciones entre los residuos de las cadenas laterales de los aminoácidos con sitios específicos del surco de unión a péptidos del MHC (García, 1998). Las células T CD8⁺ reconocen péptidos de 8-11 aminoácidos unidos al MHC-I, mientras que las células T CD4⁺ reconocen péptidos con una longitud de 12-25 aminoácidos unidos al MHC-II (Janeway, 2008). Estudios cristalográficos y de interacción MHC-péptido nos han permitido conocer las estructuras de las moléculas del MHC de clase I y II, así como el gran polimorfismo del sitio de interacción con los péptidos presentados (Fremont y col., 1998); este surco de unión está conformado por cinco bolsillos, los cuales seleccionan residuos con características particulares como el tamaño, hidrofobicidad y cargas eléctricas, teniendo como resultado la unión del MHC y del péptido con la combinación satisfactoria de la preferencia de cada bolsillo de unión (Fremont y col., 1998). El reconocimiento de un péptido inmunodominante, da inicio a una respuesta inmune celular, de tal forma que un pequeño fragmento de antígeno induce una respuesta contra un patógeno. En la actualidad, el desarrollo de vacunas se enfoca en el estudio de estos fragmentos o péptidos inmunodominantes capaces de generar una respuesta inmunológica eficiente, disminuyendo de esta manera efectos adversos en el hospedero (Matthias, 2016).

Procesamiento y Presentación de Antígeno

La función protectora de las células T depende de su capacidad para reconocer células que han internalizado agentes patógenos o a sus productos. Los péptidos reconocidos por las células T CD4⁺ son en su mayoría derivados de antígenos extracelulares que requieren ser procesados antes de unirse a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (Clase II). Las CPA internalizan el antígeno soluble en vesículas endocíticas, donde se lleva a cabo un desdoblamiento por la reducción de puentes

disulfuro y degradación por acción de proteasas en las diferentes proteínas, teniendo como resultado la formación de fragmentos peptídicos, de los cuales solo algunos tienen capacidad de unión al MHC-II (Griffin y col., 1997; Wu y col., 2002; Villadangos y col., 2000).

Las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (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). El complejo CMH-Ii es transportado en endosomas, donde junto con moléculas como el HLA-DM y HLA-DO, regula la carga de los péptidos a las moléculas MHC-II (Doebele y col., 2000). Dentro de la hendidura de unión a péptidos del MHC-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⁺ (Janeway, 2008).

Modelo Experimental

Se han utilizado varios modelos animales para estudiar la biología y / o los mecanismos inmunológicos que se llevan a cabo durante la infección por *G. lamblia*. (Byrd y col., 1994). El modelo murino es una poderosa herramienta para estudiar los mecanismos inmunes efectores que se producen durante la giardiasis y tiene considerables ventajas sobre otros modelos animales. El sistema inmune del roedor está bien caracterizado y existe una extensa variedad de reactivos y tecnologías para su estudio. En investigaciones previas, se ha evaluado la capacidad infectiva de *Giardia* (GS/M-83-H7) en el modelo murino C3H/HeJ, encontrando que dicha cepa es capaz de inducir giardiasis en este modelo de forma estable por varios días (Velazquez y col., 2005). La cepa GS/M-83-H7 de *G. lamblia* puede infectar a roedores y a humanos. Esta cepa presenta la ventaja de

poder ser cultivada *in vitro*, por lo que es ampliamente utilizada para estudiar la inmunología de la giardiasis (Rivero y col., 2010).

Estudios genómicos han confirmado ocho genotipos distintos de *G. lamblia* (A - H). Actualmente, se conoce que los genotipos A y B son responsables de la infección humana (Caccio y col., 2008; Feng y col., 2011) y así mismo se encuentran en una amplia variedad de mamíferos. El conjunto B predomina en los humanos; los animales domésticos juegan un papel importante en la gama de hospederos del conjunto A (Sprong y col., 2009). Estos conjuntos están representados por aislados humanos GS y WB, respectivamente. El aislado GS es significativamente más patogénico en infecciones de humanos que el aislado WB (Adam, 2001), probablemente debido a que el aislado GS cambia sus antígenos de superficie más rápidamente que el WB (Nash, 1990). Lo anterior ha llevado a profundizar en el conocimiento de algunas cepas de *G. lamblia*, convirtiéndolo en un modelo de estudio muy atractivo para distintas líneas de investigación (Adam, 2001).

Análisis Bioinformático

Los avances de la biología molecular en los últimos años, han permitido la generación de una gran cantidad de información cuyo análisis requiere el uso de herramientas de cálculo altamente especializadas. La bioinformática, un importante componente matemático y computacional, que permite el desarrollo de nuevos algoritmos y estadísticas para establecer relaciones entre miembros de grandes grupos de datos, permitiendo crear modelos tridimensionales de receptores y ligandos, estudiar sus preferencias conformacionales, dilucidar la naturaleza y magnitud de las fuerzas interatómicas que gobiernan su interacción, etc. (Jenny Gu, 2009). La adquisición de nuevas y mejores herramientas computacionales ha hecho posible que la bioinformática se convierta en pieza clave para aplicaciones como filtro genético, diagnóstico molecular, hallazgo de nuevos fármacos, entre otros (Lesk, 2014).

Predicción de Epítopes que Estimulan una Respuesta Inmune Celular

En la actualidad, el uso de herramientas bioinformáticas en el estudio de los mecanismos inmunológicos que se llevan a cabo durante una infección, nos permite mejorar el desarrollo de medidas profilácticas contra enfermedades infecciosas. La predicción de epítopes (epítomos o epitopos) a través de estas herramientas, nos permite monitorizar potenciales secuencias de aminoácidos reconocidas por células T, basándose en la probabilidad de unión a las moléculas del MHC-I o MHC- II (Godkin y col., 2001; Dimitrov y col., 2013). La predicción más certera acerca de los péptidos inmunodominantes es fundamental para la identificación de epítopes de células T, así como, para el éxito en el diseño de vacunas basadas en péptidos o proteínas (Matthias, 2016). Uno de los algoritmos frecuentemente utilizados es SYFPEITHI (www.syfpeithi.de), que predice los péptidos con mayor afinidad química al sitio de unión (surco) del MHC-II, específicamente del haplotipo I-A^k de ratón, basándose en las características químicas de las cadenas residuales de los aminoácidos que constituyen los péptidos generados, donde el algoritmo califica los aminoácidos que tienen mayor afinidad al surco de unión (Rammensee y col., 1999). La interacción molecular entre péptido-MHC juega un papel esencial durante el desarrollo de una respuesta inmunológica. La caracterización química de estos péptidos ayudará a sentar las bases moleculares y celulares para el futuro desarrollo de medidas profilácticas contra la giardiasis.

Modelado Molecular

El desarrollo de nuevas medidas profilácticas tiene su inicio en la identificación de péptidos que se unen fuertemente y específicamente a moléculas del MHC. Una interacción fuerte es necesaria para la eficacia a bajas concentraciones, mientras que la especificidad permite minimizar los efectos secundarios (Lesk, 2014). El modelado molecular es un método que relaciona la estructura química con la actividad biológica, considerando las propiedades de las moléculas en tres dimensiones, así como el análisis

conformacional, la mecánica cuántica, los campos de fuerzas, la termodinámica estadística, y los gráficos moleculares interactivos (Jenny Gu, 2009).

El modelado molecular es la predicción de unión a ligando, que tiene como objetivo identificar el sitio de unión de una proteína, determinar la posición, orientación del ligando y finalmente estimar la afinidad. La base de esta herramienta es la identificación de complementariedad en tamaño, forma, distribución de carga, polaridad, y el potencial de interacciones hidrófobas y puentes de hidrógeno. Por otro lado, aunque es difícil estimar las afinidades, el modelado puede proporcionar información útil sobre las afinidades relativas. Esta función provee una puntuación adecuada que puede predecir la clasificación de los diferentes ligandos en el orden aproximado de afinidad, permitiendo la selectividad y la fijación de prioridades en pruebas experimentales (Lesk, 2014).

Dada la disponibilidad de los datos cristalográficos y de interacción MHC-péptido que se encuentran reportados (Fremont y col., 1998), el modelado molecular se ha convertido en un sistema capaz de predecir la unión de péptidos al MHC-II. Esta herramienta tiene una trayectoria creciente de éxito, al menos en el área de la identificación de pequeñas moléculas ligandos de blancos moleculares. En términos generales, el modelado molecular se puede separar en diferentes fases, iniciando con el análisis de la estructura de rayos X del MHC, que al combinarlo con potenciales péptidos de unión, el conjunto resultante de ligandos es posteriormente acoplado a un modelo receptor y calificado para una correlación apropiada de unión (Young, 2009).

En la actualidad, el uso de esta herramienta en el entendimiento de las interacciones moleculares durante una respuesta inmunológica, ayuda a establecer comparaciones entre teoría y datos experimentales, e incluso permite realizar predicciones cuantitativas, profundizando así, en el conocimiento de los principales mecanismos celulares y moleculares que se llevan a cabo durante una infección. La identificación de péptidos inmunodominantes mejorará el entendimiento de las interacciones *G. lamblia*-hospedero, y sentará las bases moleculares que ampliarán el

conocimiento acerca de los mecanismos inmunológicos relacionados durante una infección por *G. lamblia*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de Experimentación

Se utilizaron ratones de la cepa singénica C3H/HeN de 8 a 14 semanas de edad, proporcionadas por la Dra. Maricela Montalvo Corral, del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Estos fueron mantenidos en el Bioterio del Departamento de Investigaciones de Postgrado en Alimentación de la Universidad de Sonora (DIPA), con fotoperíodos de 12 horas a 25 °C, acceso a agua y alimentos *ad libitum*, con una dieta comercial para ratones (2018S de Teklad global diets 18 % protein Rodent diet sterilizable). Todos los procedimientos se llevaron a cabo bajo los términos y condiciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, concerniente al sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres.

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

Cultivo de Líneas Celulares

Se utilizaron cultivos de las siguientes líneas celulares: linfoma de células B, como células presentadoras de antígeno (M12.A^k C3.F6) (Wade y col., 1989), linfocitos T (CTLL-2) dependientes de IL-2 (ATCC TIB-214), células T BW5147 $\alpha^{-}\beta^{-}$ provenientes de timoma de ratón y esplenocitos de ratón específicos para proteínas de *G. lamblia*. Los cultivos celulares se mantuvieron en medio de cultivo DMEM (GIBCO L-1740631) suplementado al 10 % con suero fetal bovino (D10F) (GIBCO, L-1740631), en una atmósfera de CO₂ (5 %) a 37 °C.

Cultivo de *G. lamblia*

Se utilizaron cultivos axénicos de trofozoítos de la cepa de *G. lamblia*, clona GS/M-83-H7, obtenidos de American Type Culture Collection (ATCC). Los cultivos se mantuvieron en medio TYI-S33, suplementado con 10 % de suero de ternera recién nacida (MICROLAB, LM-8397) y 100 µg/mL de ceftriaxona (AMSA, Laboratorios, solución inyectable, 1G/1M/3.5mL). Los trofozoítos fueron incubados a una temperatura de 37 °C (L-C Incubator, Barnstead, Lab-Line) en condiciones microaerofílicas. Adicionalmente, bajo las mismas condiciones, se utilizó la cepa enriquecida por la técnica de inmunoadsorción a partir de la clona GS/M-83-H7, denominada 5G8 (+) (Quintero y col., 2013).

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

Para analizar el patrón de expresión de la proteína 5G8 superficialmente, se utilizaron cultivos confluentes de *G. lamblia*, los cuales se desprendieron utilizando agua-hielo por 10 minutos, después se realizó el conteo de los trofozoítos ajustando a una cantidad de 5×10^5 células por pozo en una placa de fondo cónico. Posteriormente, se llevaron a cabo 2 lavados con PBS a centrifugaciones de 800 g, 4 °C por 5 minutos. Después, se incubaron los trofozoítos con el AcMo 5G8.B5 (1 µg/mL) por 1 hora a 4 °C. Al terminar la incubación, se realizaron 2 lavados con PBS (800 g, 4 °C por 5 minutos) y se incubaron con el anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a isocianato de fluoresceína (FITC) diluido 1:200 con D5F al 0.02 % de NaN_3 por 1 hora a 4 °C, en total oscuridad. Finalmente, las células fueron lavadas 2 veces con PBS y resuspendidas en 200 µL de D5F al 0.05 % de NaN_3 . Posteriormente se fijaron con 200 µL de paraformaldehído al 2 % filtrado. El análisis fue realizado por citometría de flujo (Canto II FACS, Becton Dickinson, CA, USA).

Obtención de Extractos Proteicos

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

Aislamiento de la Proteína 5G8 Mediante Cromatografía de Afinidad

El aislamiento de la proteína 5G8 se llevó a cabo por medio de cromatografía de afinidad, en la cual se acopló el anticuerpo monoclonal 5G8.B5 a esferas de sefarosa 4B (Sigma, Cyanogen Bromide Activated Sepharose 4B). Para lograr lo anterior, primeramente se hidrataron las esferas de sefarosa con HCl 1 mM por 15 minutos a temperatura ambiente. Después, dichas esferas fueron lavadas con alrededor de un litro de HCl 1 mM y con solución reguladora de acoplamiento 1X. Al terminar los lavados, las esferas fueron transferidas a una solución que contiene el anticuerpo monoclonal

5G8.B5 y se incubaron por dos horas a temperatura ambiente, con movimiento constante para permitir la unión covalente del anticuerpo a las esferas de sefarosa. A continuación, se recuperaron las esferas en un embudo de vidrio sinterizado y, el líquido eluido fue analizado en un espectrofotómetro a una DO_{280} (NanoDrop 2000C Spectrophotometer, ThermoScientific) con la finalidad de conocer el rendimiento del acoplamiento del anticuerpo. En seguida, se transfirieron las esferas a otro tubo cónico que contenía glicina 0.2 M, pH 8.0, esto para bloquear cualquier sitio no reactivo en la sefarosa. Se mantuvo en incubación por dos horas a temperatura ambiente en movimiento constante. Por último, las esferas fueron lavadas con solución reguladora de acoplamiento y de $CH_3COONa-NaCl$ (pH 4.2) de manera alternada y finalmente con PBS al 0.02 % de azida de sodio.

Se utilizó un lisado de trofozoítos de *G. lamblia* 5G8 (+) (1 mg/mL), el cual se pasó 3 veces a través de una columna cromatográfica (12 gotas por minuto, 4 °C), después se eluyeron y recolectaron fracciones mediante cambio de pH, utilizando 416 μ L de glicina 0.1 M (pH 2.5) y en tubos Eppendorf conteniendo 83.4 μ L de Trizma 1 M (pH 8.0) lo cual generó un total de 10 fracciones que fueron evaluadas por dot blotting (utilizando el AcMo 5G8.B5) con la finalidad de conocer aquellas que contenían la proteína 5G8.

Inmunodeteccion de la Proteína 5G8 por Dot-Blotting

Para conocer en qué fracciones cromatográficas se encontraba la proteína 5G8 fue necesario realizar una inmunodetección por Dot-Blotting, el cual consistió en colocar 2 μ L de la fracción a analizar en una membrana de nitrocelulosa (Trans Blot, Transfer médium, Bio-Rad 162-0115). Dicha membrana se incubó en una solución de PBS al 5 % de leche en polvo (Svelty) libre de grasas para bloquear todo sitio de la membrana en la que no esté la proteína adsorbida. Posteriormente, se realizaron lavados con PBS, después, dicha membrana fue incubada con una solución de anticuerpo monoclonal 5G8.B5 (1 μ g/mL) y con el anticuerpo monoclonal aBDC.2 (Kanagawa, 2002) utilizado

control de isotipo IgG2b (1 µg/mL) por una hora a temperatura ambiente en movimiento constante. A continuación, se realizaron lavados con PBS. Al terminar, la membrana fue incubada con anticuerpo anti- IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano (diluido 1:7500 con PBS-0.1 % ABS) (ABS, albúmina bovina sérica) (Sigma, St. Louis MO, USA), por una hora a temperatura ambiente en movimiento constante.; se lavó la membrana con PBS cinco veces por cinco minutos cada lavado.

Posteriormente, la membrana de nitrocelulosa se incubó por 10 minutos con una mezcla 1:1 de luminol y peróxido de hidrógeno (Super Signal, West Pico Signal Chemiluminescent, Thermo scientific 34080). Finalmente, se procedió a revelar la señal emitida por la reacción antígeno-anticuerpo en un film de rayos X (Fujifilm) por medio del uso de soluciones reveladoras y de fijado (Fujifilm).

Electrotransferencia e Inmunodetección de la Banda Proteica de ~ 71 kDa (Western-Blotting)

Las proteínas del lisado, así como la proteína 5G8 de *G. lamblia* se separaron por SDS-PAGE al 12 % en condiciones modificadas (0.2 % SDS y 0.2 % β-mercaptoetanol) y fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa en un sistema semiseco de electrotransferencia a corriente constante (Semi-Dry Tranfer Cell, Trans-Blot SD Cell, BIORAD). Después de desteñir la membrana, esta fue bloqueada con una solución de PBS al 5 % de leche en polvo Svelty libre de grasas, por 1 hora. Enseguida, se realizaron lavados con PBS y la membrana de nitrocelulosa se incubó por una hora a temperatura ambiente en movimiento constante con el anticuerpo monoclonal 5G8.B5 (1 µg/mL), con el anticuerpo monoclonal aBDC.2 (Kanagawa, 2002) utilizado control de isotipo IgG2b (1 µg/mL), con suero de ratón C3H/HeN pre-infección (1:20) y con suero post-reinfección (1 infección cada 10 días por 3 ocasiones). A continuación, se realizaron lavados con PBS. Al terminar, la membrana fue incubada con anticuerpo anti- IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano (diluido 1:7500 con PBS-0.1 % ABS) (ABS, albúmina bovina sérica) (Sigma, St. Louis MO, USA), por una hora a temperatura

ambiente en movimiento constante., para después llevar a cabo lavados con PBS. Finalmente, se colocó la membrana en una mezcla 1:1 de luminol y peróxido de hidrógeno (Super Signal, West Pico Signal Chemiluminescent, Thermo scientific) revelando la señal emitida por la reacción antígeno-anticuerpo en un film de rayos X (Fujifilm) por medio del uso de soluciones reveladoras y de fijado (Fujifilm).

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

El análisis de EM se llevó a cabo utilizando un sistema de HPLC Microbore (Surveyor, Thermo. San Jose, CA), y un ESI-MS/MS (Electrospray tandem mass spectrometer) LCQ Deca (Finnigan, San Jose, CA). Las muestras fueron introducidas a la columna analítica utilizando un inyector automático Surveyor (Topógrafo, Thermo, San Jose, CA), el eluyente de la columna de HPLC fue directamente sometido a la fuente de ionización de electrospray de un espectrómetro de masas Thermo LCQ Deca con trampa de iones.

Los datos de MS/MS fueron analizados utilizando el sistema computarizado SEQUEST (Bioworks 3.1, Thermo) (Quintero, 2016).

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

Los resultados generados por espectrometría de masas se analizaron utilizando herramientas bioinformáticas, como bases de datos y algoritmos en los que se realizaron comparaciones tanto de las secuencias individuales (~ 28 y 38 kDa) como del constructo denominado 5G8 (Anexo 11 y 12). Algunas de las herramientas utilizadas fueron: Alineamientos de secuencias, BLASTn (secuencia de nucleótidos), BLASTp (secuencia de aminoácidos), localización dentro del genoma de *G. lamblia*, transcripción y traducción de secuencias nucleotídicas, estimación de masa molecular de proteínas,

modelado de la estructura primaria, ubicación de motivos y dominios, predicción de epítopes para linfocitos T, acoplamiento molecular, etc. (Tesis de Maestría, Valdez, 2015).

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

Infección de Ratones C3H/HeN con Trofozoítos de *G. lamblia* 5G8 (+)

Se formó un grupo de cinco ratones de 8 a 14 semanas de edad, el cual fue infectado y re-infectado (P.R.I.) en 3 ocasiones (10 días de diferencia entre cada infección) con 5×10^6 trofozoítos de *G. lamblia* (GS/M-83-H7) 5G8 (+) resuspendidos en 200 μ L de PBS estéril a un pH 7.2. Finalmente, diez días después de la última infección, se tomaron muestras de suero de los ratones y fueron sacrificados. Enseguida, se extrajo el bazo de cada uno y se homogeneizaron con medio DMEM suplementado al 10 % con suero fetal bovino (D10F) (Larocque, et al., 2003).

Ensayo de Proliferación de Esplenocitos de Ratones Infectados con *G. lamblia* Mediante el Método de Reducción de MTT (Tetrazolio)

Los esplenocitos se obtuvieron a partir de la disección del bazo de ratones previamente infectados con trofozoítos de *G. lamblia* 5G8 (+). Se incubaron 5×10^5 células con

extracto proteico de trofozoítos 5G8 (+), proteína 5G8 aislada, lisozima de huevo de gallina (HEL, L6876 Sigma, St. Louis, MO, USA) utilizada como control negativo, y como control positivo se usó fitohemaglutinina-M (PHA, L8902 Sigma, St. Louis, MO, USA). Se evaluaron concentraciones de 10, 5 y 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el caso del extracto proteico y 50, 100 y 200 nM para el resto de las proteínas (ambos por triplicado) en un volumen final de 150 μL , en placas de 96 pozos con fondo redondo a 37 °C y atmósfera de 5 % de CO_2 . Se agregaron 15 μL de la solución de MTT (M5655 Sigma, St. Louis, MO, USA) (10 μL por cada 100 μL de cultivo) a cada pozo y se incubaron a 37 °C por 4 horas a los tiempos correspondientes a cada análisis. Posterior a la incubación, los cristales formados se disolvieron en 150 μL de isopropanol ácido y agitación vigorosa. Una vez disueltos los cristales, se midió la densidad óptica en un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 570 nm y 630 nm como referencia, esto en menos de una hora después de agregar el isopropanol ácido (Mosmann, 1983).

Expresión de CD69 en Esplenocitos de Ratones Infeccionados con *G. lamblia*

El análisis de la expresión del marcador de activación temprana CD69, se llevó a cabo utilizando esplenocitos que se obtuvieron y se estimularon bajo las mismas condiciones que se mencionan en el ensayo anterior. La tinción consistió en colocar 500,000 células/tubo, se lavaron con 4 mL de PBS frío bajo las condiciones de 650 g, por 7 minutos a 4 °C. Las células se resuspendieron e incubaron con el anticuerpo anti-CD69-PE y su respectivo control de isotipo (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, diluido con D5F al 0.02 % de NaN_3) por 30 minutos a 25 °C. Posteriormente, se lavaron con PBS a las condiciones antes mencionadas. Acto seguido, las células se resuspendieron en 200 μL de PBS y 200 μL de paraformaldehído al 2 % filtrado. El análisis fue realizado por citómetro de flujo (Canto II FACS, Becton Dickinson, CA, USA).

Predicción de Epítopes de Células T

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

Análisis de Interacciones Estructurales *in silico* Entre Epítopes Immunodominantes de Células T Con Moléculas Del MHC-II

En este trabajo se utilizó modelado molecular *in silico* con el fin de analizar los posibles sitios de interacción péptido-MHC de clase II y dar un acercamiento a la explicación molecular sobre el mecanismo de presentación de antígeno a las células T. Como receptor se usó la estructura cristalográfica del MHC-II (haplotipo I-A^k) (Fremont y col., 1998) y como ligandos se probaron 5 péptidos seleccionados con base a la predicción de epítopes de células T por SYFPEITHI. El proceso se llevó a cabo en el software MOE (Molecular Operating Environment) version 2015.10 MOE (Química Computing Group, Inc., Montreal, QC, Canada) ejecutado en el sistema operativo Mac OSX.

Previo al análisis se prepararon el receptor y ligandos. Para ello, se definió como receptor al complejo principal de histocompatibilidad MHC de clase II (haplotipo I-A^k) y se optimizó para determinar el más bajo potencial de energía global para los diferentes grupos químicos ionizables de sus cadenas laterales. Posteriormente, se identificaron las cavidades y posibles sitios de unión de los ligandos en la proteína. La cavidad para el mdodelado fue determinada después de analizar las dimensiones, carga electrostática y

sitios de contacto comprendidos acordes con el mecanismo involucrado en la presentación de antígeno. Por otro lado, la preparación de ligandos consistió en la asignación de cargas parciales y la generación sistemática de conformaciones distintas de baja energía para cada molécula (confómeros).

Análisis Estadístico

El análisis de los resultados de proliferación por MTT se llevó a cabo, según la naturaleza de los datos, por medio de la prueba no paramétrica Wilcoxon, la cual consiste en un diseño donde se encuentran dos variables correlacionadas, de tipo cuantitativo continuo, cuya distribución no es semejante a la curva normal (Valenzuela, 2006).

El análisis fue realizado por el programa estadístico IBM® SPSS® Statistics Version 20.

RESULTADOS

Enriquecimiento de la Proteína 5G8 de *G. lamblia* Mediante Inmunocromatografía de Afinidad

Estudios previos han reportado la expresión de la proteína 5G8 en la superficie de trofozoítos de *G. lamblia* (Quintero y col., 2013), con base en esto, se analizó por citometría de flujo el nivel de expresión de la proteína 5G8 en cultivos de trofozoítos de *G. lamblia* 5G8 (+). El anticuerpo monoclonal 5G8.B5 reconoció al ~ 83 % de la población analizada (Figura 2C). El anticuerpo control de isotipo aBDC.2 no reconoció a esta población celular.

Con el objetivo de aislar la proteína 5G8 de *G. lamblia* reconocida por el anticuerpo monoclonal 5G8.B5 (Figura 3), se partió de cultivos axénicos de trofozoítos 5G8 (+), obteniendo un extracto proteico (~ 30 mg de proteína total a partir de aproximadamente 300×10^6 trofozoítos). Esta solución de proteína se sometió al proceso de cromatografía de afinidad. Las fracciones cromatográficas recuperadas de la columna fueron analizadas mediante un ensayo de Dot-Blotting para conocer específicamente en qué fracciones se encontraba la proteína 5G8. En la figura 4 se observa que la proteína 5G8 se identificó en las fracciones de la 4 a la 10.

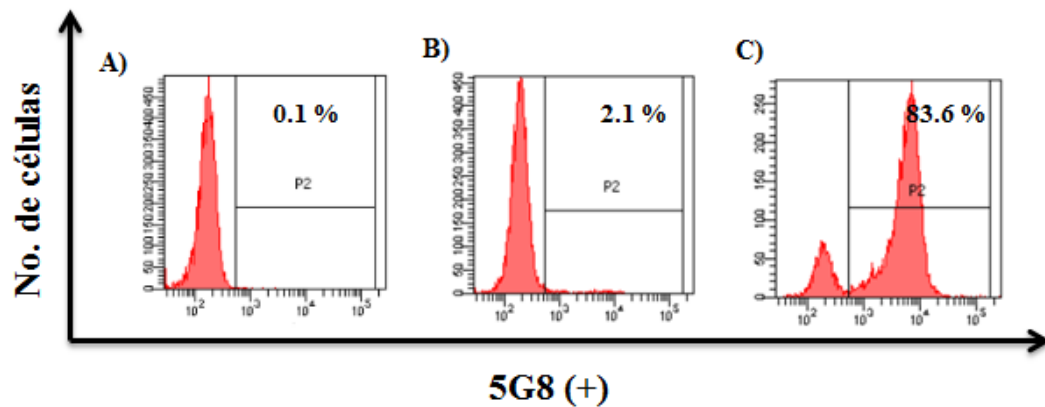


Figura 2. Análisis de expresión de la proteína 5G8 en la superficie de *G. lamblia*. Análisis de citometría de flujo utilizando trofozoítos de la cepa GS/M-83-H7 (5G8 (+)) y el anticuerpo monoclonal 5G8.B5. **A)** Control sin teñir, **B)** Anticuerpo monoclonal control de isotipo (IgG2b) y **C)** Anticuerpo monoclonal 5G8.B5 (IgG2b) purificado.

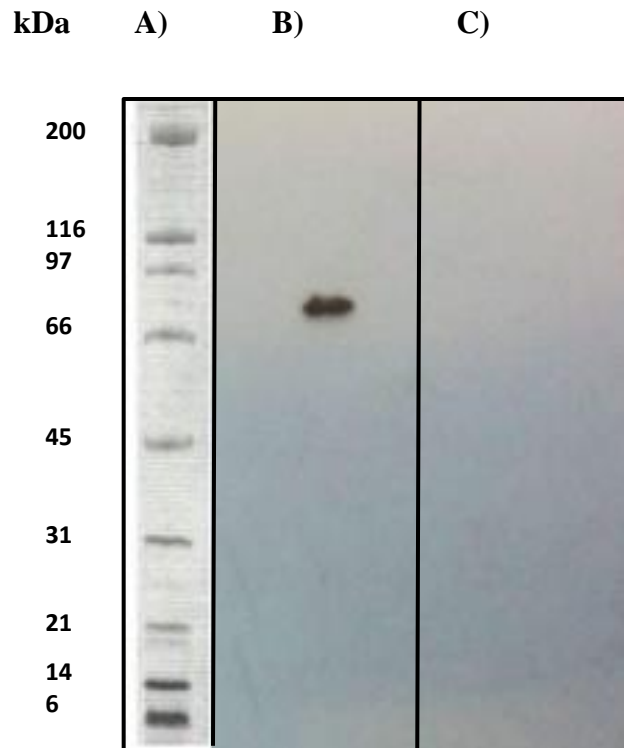


Figura 3. Perfil de inmunorreconocimiento de antígenos de *G. lamblia* reconocidos por el anticuerpo monoclonal 5G8.B5. Análisis de Western-blotting que muestra el inmunorreconocimiento del anticuerpo monoclonal 5G8.B5 hacia proteínas solubles de *G. lamblia* GS/M-83-H7, 5G8 (+). Carriles: **A)** marcador de peso molecular, **B)** anticuerpo monoclonal 5G8.B5 (IgG2b) y **C)** anticuerpo monoclonal aBDC.2 (IgG2b) utilizado como control de isotipo.

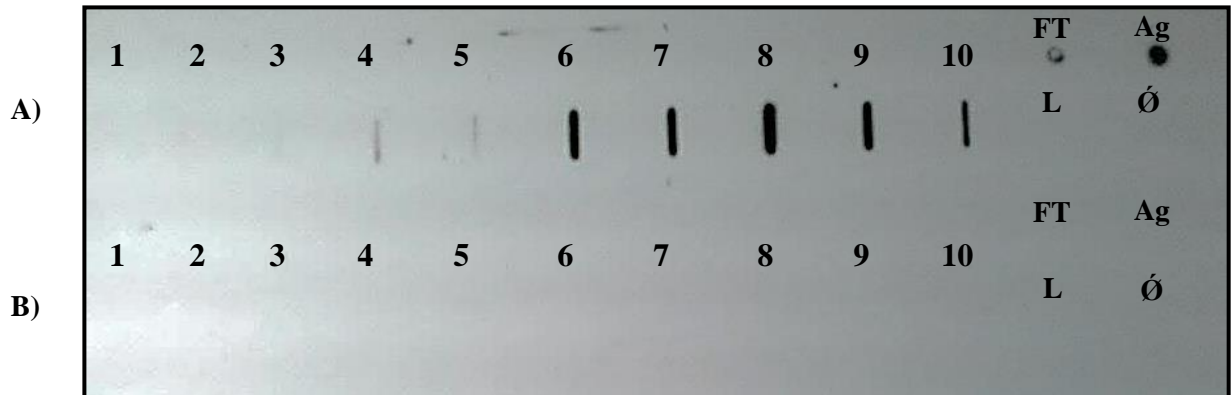


Figura 4. Inmunorreconocimiento (Dot-Blotting) de la proteína 5G8 de *G. lamblia* en fracciones cromatográficas. En una membrana de nitrocelulosa se colocó 2 μ L de cada fracción eluida (volumen total de 200 μ L/fracción), adicionalmente se utilizó un lisado de trofozoítos de *G. lamblia* como controle positivo (Ag), así como controles negativos de lavado (L) y buffer de elución (\emptyset). **A)** Inmunorreconocimiento de las fracciones eluidas del primer proceso cromatográfico incubadas con el anticuerpo monoclonal 5G8.B5 (IgG2b). **B)** Inmunorreconocimiento de las fracciones eluidas del primer proceso cromatográfico incubadas con el anticuerpo monoclonal control de isotipo aBDC.2 (IgG2b).

La Proteína 5G8 Aislada Del Lisado Celular de *G. lamblia* Fue Reconocida por el Anticuerpo Monoclonal 5G8.B5 y Sueros de Ratones Infectados con el Parásito

El aislamiento de la proteína 5G8 se analizó mediante electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12 %. Posteriormente, se realizó un Western-Blotting para evaluar el reconocimiento antigénico del anticuerpo monoclonal 5G8.B5, así como de sueros de ratones P.R.I. hacia la banda proteica con masa molecular relativa de ~ 71 kDa. El anticuerpo monoclonal 5G8.B5 mostró un reconocimiento evidente hacia una banda de ~ 71 y ~ 150 kDa, mientras que los sueros P.R.I solo reconocieron a la banda de ~ 71 kDa (figura 5. Carril: 4 y 6). El anticuerpo monoclonal aBDC.2 (IgG2b) utilizado como control de isotipo y el suero de ratones pre-infección no reconocieron ninguna proteína (figura 5. Carril: 5 y 7). El doble reconocimiento del anticuerpo monoclonal 5G8.B5 hacia las bandas proteicas de ~ 71 y ~ 150 kDa permitió realizar el análisis del patrón electroforético bajo condiciones modificadas (Materiales y métodos) (Figura 5. Carril: 3), así como condiciones desnaturalizantes y reductoras (Figura 5. Carril: 2). En el primer gel (condiciones desnaturalizantes y reductoras) se observó una banda proteica con masa molecular relativa de ~ 71 kDa, correspondiendo a la proteína de interés (5G8). Sin embargo, bajo condiciones modificadas se observaron dos bandas proteicas adicionales (~ 150 y 200 kDa). Este resultado sugiere la presencia de una posible asociación de la proteína de ~ 71 kDa (forma agregada de la proteína) o con otras proteínas.

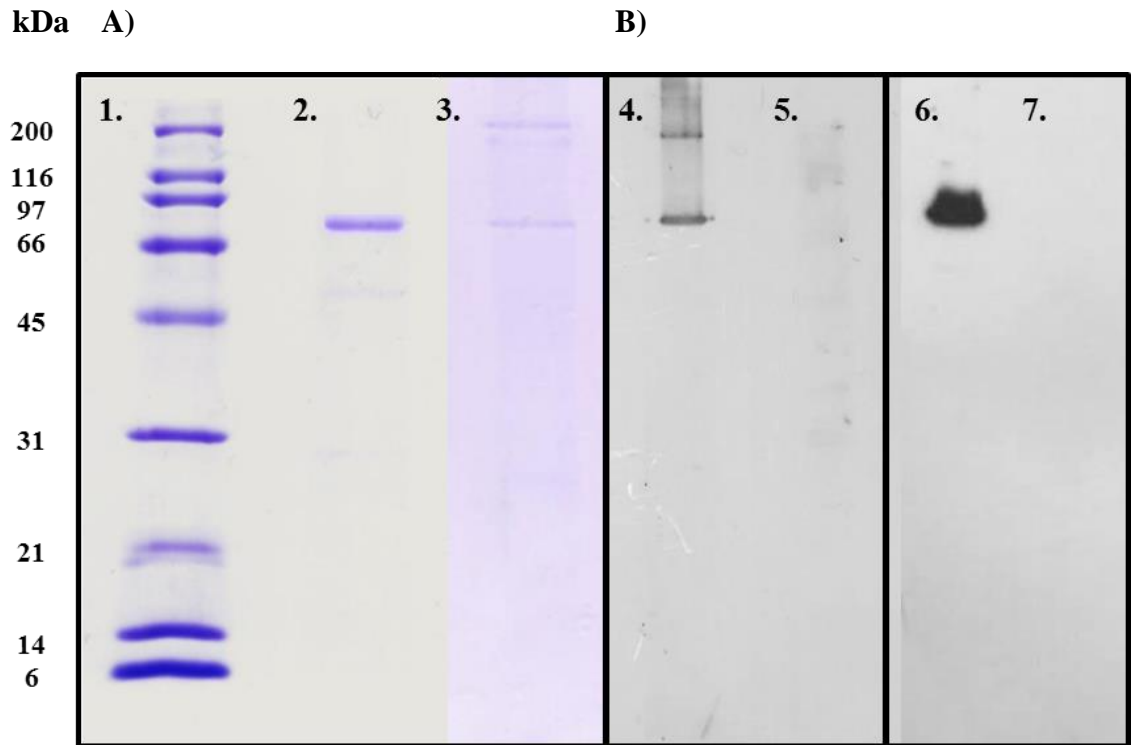


Figura 5. Perfil Electroforético (SDS-PAGE) e inmunorreconocimiento de la proteína 5G8 de *G. lamblia*. La proteína se aisló mediante cromatografía de afinidad utilizando el anticuerpo monoclonal específico 5G8.B5. En el panel número **A)** se observa el patrón electroforético de la proteína 5G8 en condiciones desnaturalizantes (**2**) y condiciones modificadas (**3**). El panel **B)** muestra un análisis de reconocimiento inmunogénico del anticuerpo monoclonal 5G8.B5 (**4**) y sueros P.R.I. (**6**) hacia la proteína 5G8. No hubo reconocimiento por el anticuerpo monoclonal aBDC.2 (IgG2b) utilizado como control de isotipo (**5**), ni por suero de ratón pre-infección (**7**).

La Proteína 5G8 de *G. lamblia* Está Constituida Por Una Sola Cadena Polipeptídica y Forma Parte de la Familia de las VSPs

Con el objetivo de identificar la proteína inmunogénica 5G8 de *G. lamblia*, se recurrió a espectrometría de masas. El análisis de la banda proteica de ~ 71 kDa permitió la identificación de dos proteínas de diferente masa molecular (28 y 38 kDa) (Figura 6). El análisis de espectrometría de masas identificó para la proteína de 28 kDa, un total de 11 péptidos pertenecientes a la familia denominada Proteínas Variables de Superficie, VSP de *G. lamblia* (gi|559179812) con un 76 % de cobertura. Para la proteína de 38 kDa se identificaron un total de 12 péptidos, provenientes de otra proteína de *G. lamblia*, también perteneciente a la familia de VSP (gi|559177553) mostrando un 46 % de cobertura.

Al analizar ambas secuencias de aminoácidos, se observa que el segmento carboxilo terminal de la secuencia perteneciente a la proteína de 28 kDa, coincide con el segmento amino terminal de la secuencia de 38 kDa (Anexo 12). Con el fin de comprobar si la proteína 5G8 es el producto de la expresión de un único gen, se realizó una comparación de secuencias nucleotídicas (BLASTn) empleando las secuencias de nucleótidos reportadas para las cadenas polipeptídicas de 28 y 38 kDa (Anexo 13). Dicho análisis identificó una región de homología entre ambas, coincidiendo con lo observado en su contraparte aminoacídica (Figura 7). Adicionalmente, se encontraron ciertas mutaciones, como deleciones y sustituciones, que al ser corregidas de manera puntual en el segmento de nucleótidos, se obtuvo un marco de lectura completo que genera un producto proteico compuesto de 607 aminoácidos y una masa molecular de ~ 61 kDa. Finalmente, al analizar la secuencia completa de aminoácidos, todos los péptidos que habían sido identificados por ESI-MS/MS se encontraron presentes con una cobertura del 60.2 %, sugiriendo fuertemente que la proteína 5G8 está constituida de una sola cadena polipeptídica, y además, forma parte de la familia de VSPs de *Giardia* (Figura 8) (Tesis de Maestría, Valdez, 2015; Quintero y cols., 2016).

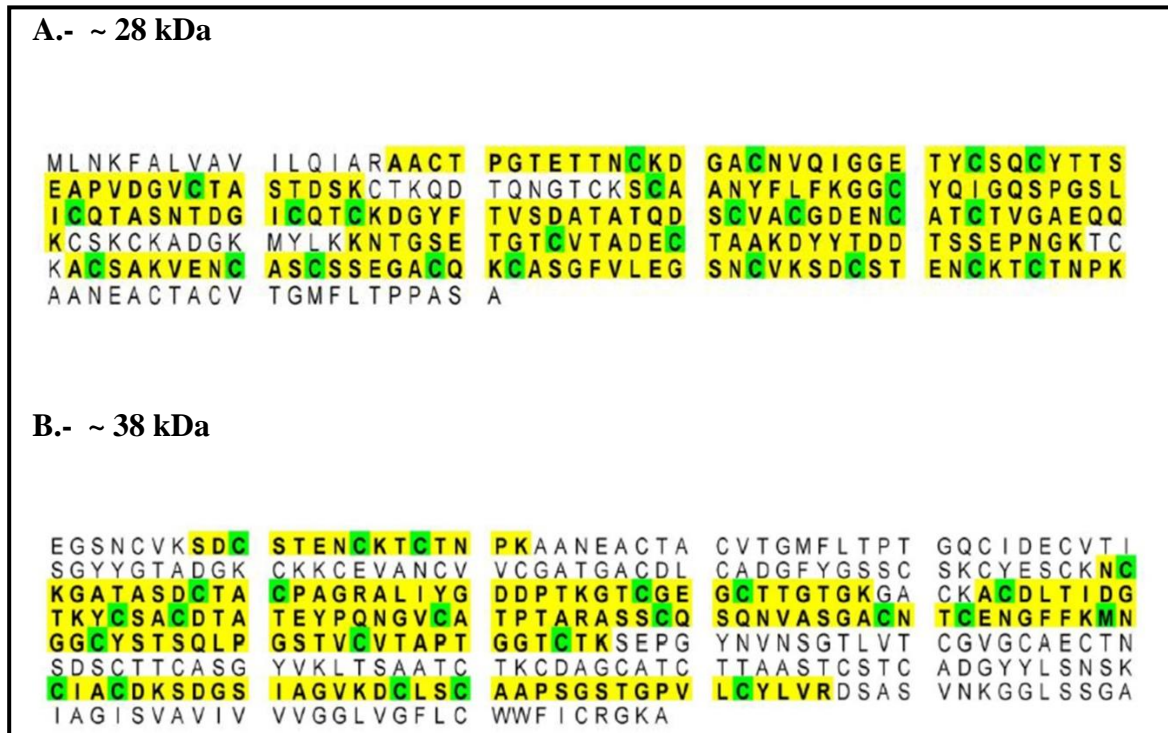


Figura 6. Péptidos identificados a partir de la banda proteica de ~ 71 kDa por Espectrometría de Masas ESI-MS/MS. **A):** Proteína Variable de Superficie (*Giardia intestinalis*), gi|559179812 (100 %) masa molecular ~ 28 kDa, 11 péptidos exclusivos (segmentos amarillos), 206/271 aminoácidos (76 % de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

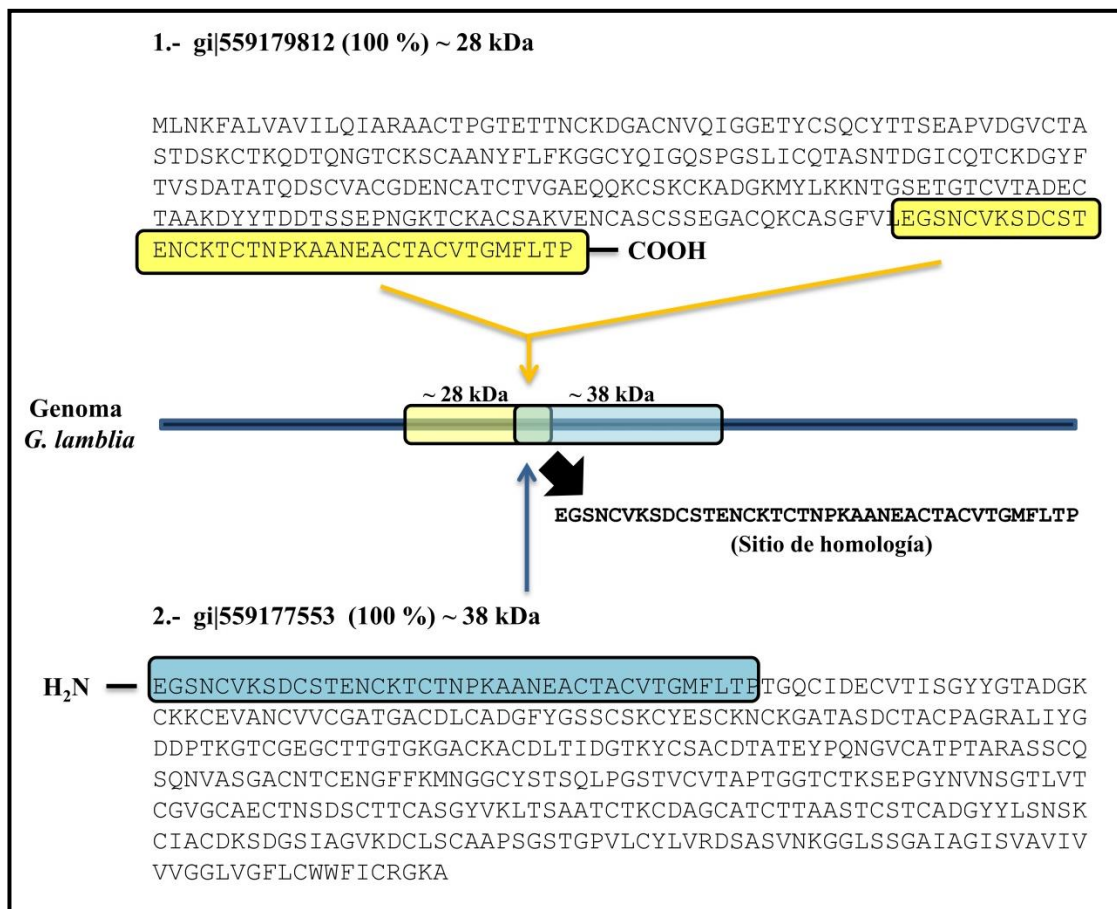


Figura 7. Péptidos identificados a partir de la banda proteica de ~ 71 kDa por Espectrometría de Masas ESI-MS/MS y su relación a nivel génico. **1.-** Proteína Variable de Superficie (*Giardia intestinalis*), con un masa molecular de ~ 28 kDa. Se muestra señalado con amarillo el segmento final de la secuencia que coincide con la sección inicial de la segunda proteína (sitio de homología). **2.-** Proteína Variable de Superficie (*Giardia intestinalis*), con una masa molecular de ~ 38 kDa, donde el segmento inicial de la secuencia es señalado con azul. Se considera que ambas secuencias en conjunto forman una sola proteína a nivel génico (Tesis de maestría, Valdez, 2015., Quintero y col., 2016).

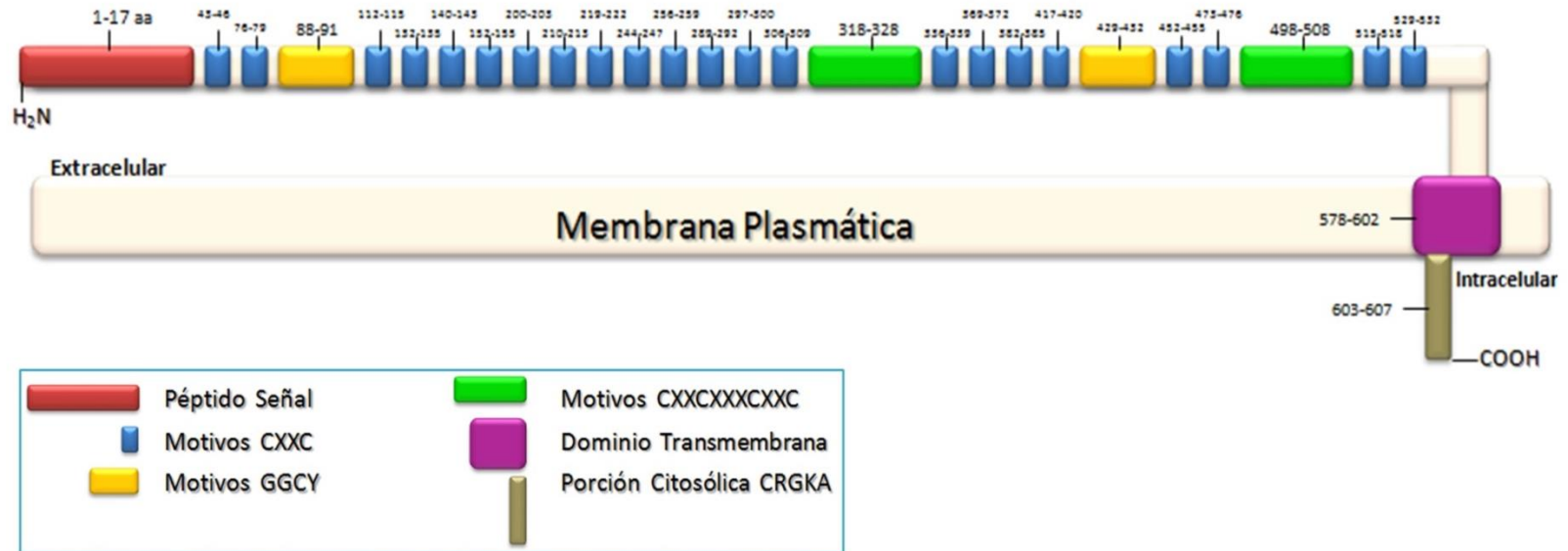


Figura 8. Estructura primaria y características de la proteína 5G8. Cadena polipeptídica (607 aminoácidos), péptido señal (color rojo), motivos CXXC (color azul), motivo CXXCXXXCXXC (color verde), motivos GGCY (color amarillo), porción citosólica CRGKA (color café), dominio transmembrana (color morado) (Tesis de maestría, Valdez, 2015., Quintero y col., 2016).

La Proteína 5G8 Fue Capaz de Inducir Una Respuesta Inmune Celular en Esplenocitos de Ratones Infectados Con *G. lamblia*

La respuesta inmune contra un determinado antígeno induce un proceso llamado expansión clonal, en el cual intervienen la activación y proliferación de células con capacidad de reconocimiento específico hacia este antígeno y es parte fundamental en el proceso de erradicación de una infección (Janeway, 2008). Con el objetivo de evaluar la respuesta inmune celular hacia la proteína 5G8 de *G. lamblia*, se infectaron en repetidas ocasiones ratones de la cepa C3H/HeN con trofozoítos de *G. lamblia* 5G8 (+) (materiales y métodos). Células de bazo de los grupos de animales fueron evaluados en ensayos de proliferación celular en presencia de diferentes concentraciones de las proteínas 5G8 y HEL (50, 100 y 200 nM).

La proliferación de esplenocitos se evaluó de manera cualitativa a las 72 horas, observando la presencia de focos de proliferación en esplenocitos estimulados con la proteína 5G8 y el extracto antigénico total de *G. lamblia* (Figura 9). Posteriormente, se determinó cuantitativamente la proliferación celular mediante dos técnicas. La primera fue el ensayo de MTT, donde la proliferación celular de los esplenocitos estimulados con la proteína 5G8 aislada y el extracto antigénico total de *G. lamblia* fue significativamente más alta que los que fueron estimulados con una proteína irrelevante utilizada como control negativo (HEL) (Figura 10). Los esplenocitos de ratones no infectados no mostraron proliferación estadísticamente significativa, descartando un efecto mitogénico por parte de la proteína 5G8 (Figura 11). Por otro lado, se evaluó la expresión del marcador CD69 en esplenocitos de ratones infectados y re-infectados con *G. lamblia*, como indicativo de activación temprana en las células estimuladas bajo las mismas condiciones que el ensayo de MTT. El análisis por citometría de flujo arrojó datos similares a los del ensayo anterior, donde esplenocitos que estuvieron en contacto con el extracto proteico total y la proteína 5G8 de *G. lamblia* presentaron un porcentaje de expresión de CD69 más elevado (> 10 %) que los esplenocitos con la proteína utilizada como control negativo (HEL) (< 10 %) (Figura 12).

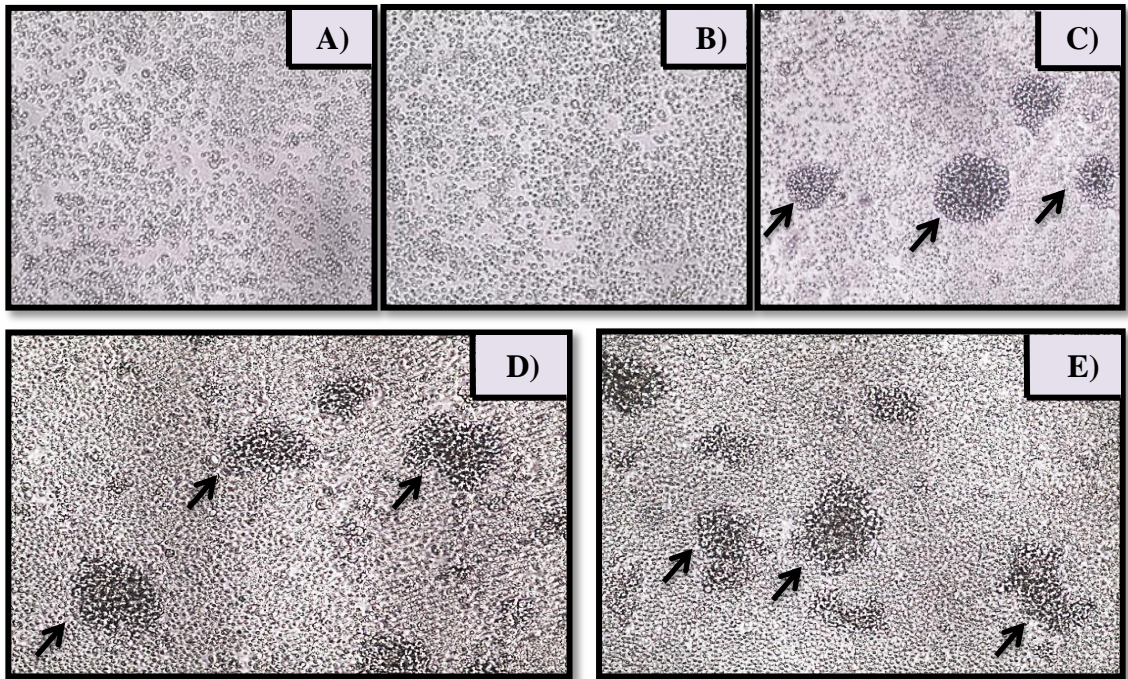


Figura 9. La proteína 5G8 estimula la proliferación de esplenocitos de ratones infectados con *G. lamblia*. Evaluación cualitativa de la proliferación celular a las 72 horas con diferentes estímulos: **A)** Basal. **B)** Proteína control negativo HEL (200 nM). **C)** Proteína control positivo Fitohemaglutinina-M (200 nM). **D)** Extracto proteico total de *G. lamblia* (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y **E)** Proteína 5G8 aislada (200 nM). Los focos de proliferación se aprecian en ambas condiciones evaluadas (D y E) y en el control positivo (C) (señalados con flechas).

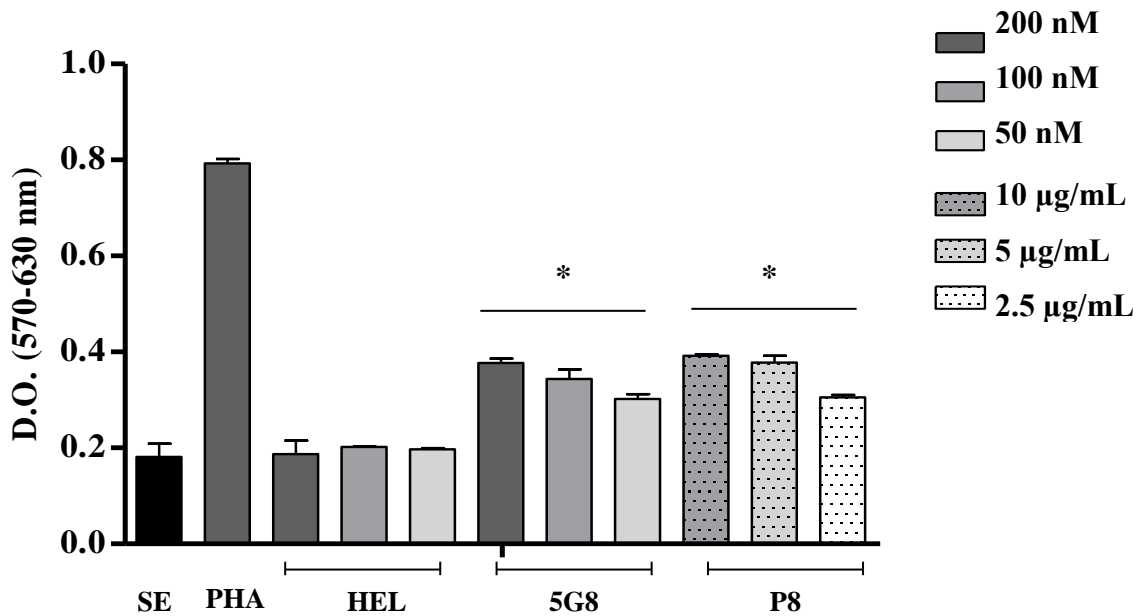


Figura 10. La proteína 5G8 estimula la proliferación de esplenocitos de ratones infectados con *G. lamblia*. Evaluación cuantitativa por MTT de la proliferación celular a las 96 horas con diferentes estímulos. SE: Sin estímulo. Adicionalmente, el análisis de proliferación celular a las 72, 120 y 144 horas también mostró diferencias significativas (Anexo 17). *El asterisco indica la diferencia significativa entre el grupo tratado con la proteína 5G8 y el extracto proteico P8 con respecto a los grupos control (SE y HEL).

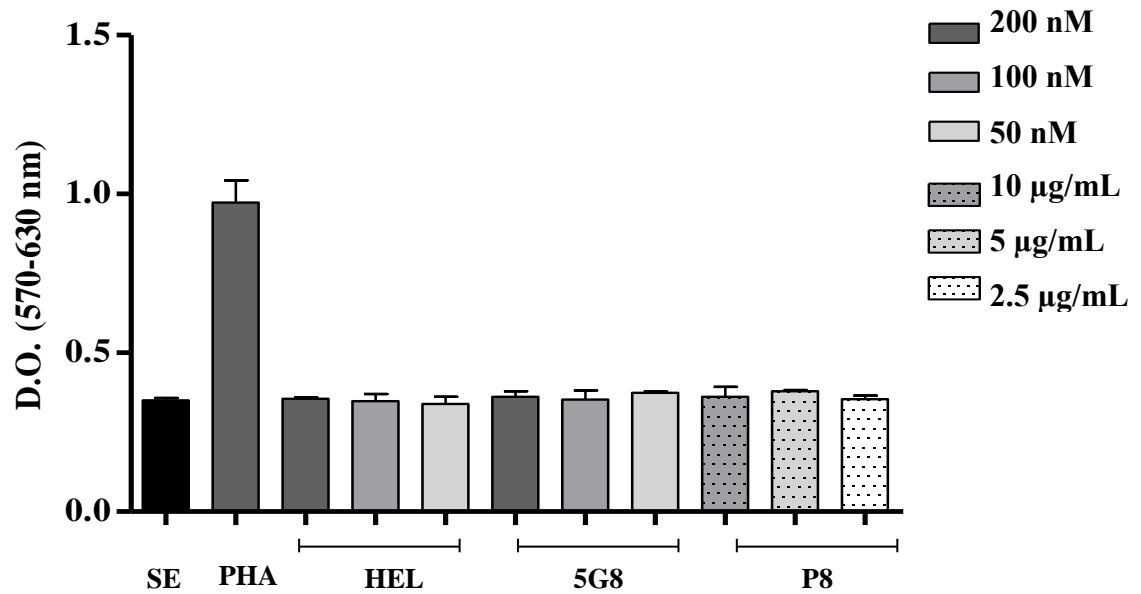


Figura 11. La proteína 5G8 no estimula la proliferación de esplenocitos de ratones no infectados con *G. lamblia*. Evaluación cuantitativa por MTT de la proliferación celular a las 96 horas con diferentes estímulos. SE: Sin estímulo.

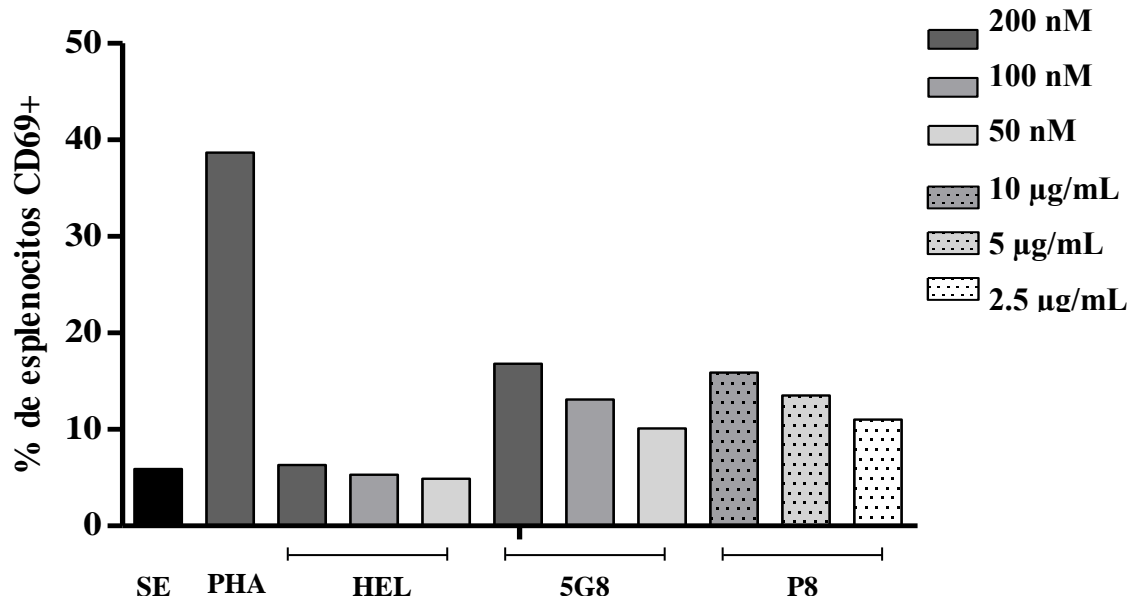


Figura 12. La proteína 5G8 induce la activación de esplenocitos provenientes de ratones infectados con *G. lamblia*. Evaluación de la expresión de CD69 a las 72 horas. SE: Sin estímulo. El análisis por citometría de flujo se muestra en el Anexo 18.

La Proteína 5G8 Cuenta Con 53 Potenciales Epítopes Capaces de Estimular Una Respuesta Inmune Celular

A partir de la secuencia aminoacídica de la proteína 5G8 de *G. lamblia*, se utilizó el algoritmo de predicción SYFPEITHI para identificar potenciales epítopes del antígeno 5G8 que unan con mayor afinidad química al sitio de unión (surco) de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MCH-II). Dicho análisis, mostró como resultado la predicción de 53 epítopes de la proteína 5G8 con afinidad al MHC-II (haplotipo I-A^k) (Anexo 19). Sin embargo, se seleccionaron los primeros cinco péptidos con mayor probabilidad de unión al MHC-II para posteriores análisis. En la tabla I se muestran los cinco péptidos, donde nueve aminoácidos centrales representan el motivo de unión a las moléculas del MHC-II. Adicionalmente, los epítopes de mayor puntaje de afinidad predichos por la base de datos, fueron señalados dentro de la secuencia de aminoácidos de la proteína 5G8, conociendo su ubicación exacta en el polipéptido (Figura 13).

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

Posición	Secuencia del péptido															Score
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	
67	T	K	Q	D	T	Q	N	G	T	C	K	S	C	A	A	26
95	Q	S	P	G	S	L	I	C	Q	T	A	S	N	T	D	22
186	Y	Y	T	D	D	T	S	S	E	P	N	G	K	T	C	20
114	T	C	K	D	G	Y	F	T	V	S	D	A	T	A	T	18
121	T	V	S	D	A	T	A	T	Q	D	S	C	V	A	C	18

H₂N — MLNKFALVAVILQIARAACPGETTNCCKDGACNVQIGGETYCSQCYTTSEA
 PVDGVCTASTDSKCTKQDTQNGTCKSCAANYFLFKGGCYQIGQSPGSLICQT
 ASNTDGIQCTCKDGYFTVSDATATQDSCVACGDENCATCTVGAEQQKCSKCK
 ADGKMYLKKNTGSETGTCVTADECTAAKDYTTDDTSSEPNGKTKKACSAKVE
 NCASCSSEGACQKQKASGFVLEGSNCVKSDCSTENCKTCTNPKAANEACTACV
 TGMFLTPTGQCIDECVTISGYYGTADGKCKKCEVANCVVCGATGACDLCADG
 FYGSSCSKCYESCKNCKGATASDCTACPAGRALIYGDDPTKGTCGEGCTTGT
 GKGACKACDLTIDGTKYCSACDTATEYPQNGVCATPTARASSCQSQNVASGA
 CNTCENGFFKMNGGCYSTSQLPGSTVCVTAPTGGTCTKSEPGYNVNSGTLVT
 CGVGCAECTNSDSCTTCASGYVKLTSAACTKCDAGCATCTTAASTCSTCAD
 GYYLSNSKCIACDKSDGSIAGVKDCLSCAAPSGSTGPVLCYLVRDSASVNGK
 GLSSGAIAGISVAVIVVVGGLVGLVFLCWWFICRGKA — **COOH**

Figura 13. Ubicación de los epítopes de la proteína 5G8 con mayor probabilidad de unión a las moléculas del MHC clase II de ratón (haplotipo I-A^k) en la secuencia aminoacídica de la proteína 5G8. El epítoto No.1 (color azul) comprende del residuo 67-81; el epítoto No. 2 (color rojo) comprende del residuo 95-109; el epítoto No.3 (color verde) comprende del residuo 186-200; el epítoto No.4 (color amarillo) comprende del residuo 114-128; y finalmente el epítoto No.5 (color morado) comprende del residuo 121-135.

Posibles Interacciones Estructurales *in silico* Entre Epítopes Inmunodominantes de Células T Con Moléculas Del MHC-II

Se llevaron a cabo análisis de modelado molecular *in silico* con el objetivo de dar un acercamiento al posible sitio de unión e interacciones moleculares entre 5 péptidos inmunodominantes de la proteína 5G8 y las moléculas del MHC-II (haplotipo I-A^k). Este ensayo se llevó a cabo utilizando como modelo de estudio la interacción del péptido inmunodominante de la lisozima de huevo de gallina HEL (48-63 aa) con el MHC-II (haplotipo I-A^k) (10.2210/pdb/1ak/pdb) (Fremont y col., 1998), esta interacción es de suma importancia para explicar el mecanismo de presentación de antígeno a las células T. La cavidad para el modelado se seleccionó de acuerdo a su localización, dimensión y carga electrostática de los residuos expuestos al solvente.

El análisis de interacción del epítipo inmunodominante de la proteína 5G8 (67-81 aa) con el MHC-II (haplotipo I-A^k) se muestra como representación en superficie (Figura 14-A) y en listón (Figura 14-B), mientras que el análisis de los otros epítopes se muestra en el Anexo 20. Se observó una distribución uniforme y compacta del péptido en la cavidad, favoreciendo su posible interacción con aminoácidos de los bolsillos del MHC-II (haplotipo I-A^k). Los datos obtenidos coinciden con los resultados de interacción del péptido inmunodominante de la lisozima de huevo de gallina (48-63 aa) con el MHC-II (haplotipo I-A^k) utilizado como modelo de estudio, donde el péptido de la proteína 5G8 interactúa principalmente con los bolsillos 1, 4, 6, 7 y 9 (Fremont y col., 1998). El bolsillo 1 es una cavidad donde se encuentra una arginina muy conservada que puede formar interacciones electrostáticas con el ácido aspártico del epítipo seleccionado. Esto da lugar a una interacción iónica fuerte y estable en un ambiente oculto, que puede ser alterada al cambiar el aminoácido del péptido o bien el de la cavidad (Figura 15-A). El bolsillo 4 no se restringe estrictamente a un aminoácido en particular como el bolsillo 1, este muestra preferencia por aminoácidos hidrofóbicos de tamaño mediano, aunque también se reporta la interacción con asparagina (Fremont y col., 1998), sugiriendo la posible formación de puentes de hidrogeno con aminoácidos polares dentro del bolsillo. Sin embargo, es importante mencionar que pueden existir

interacciones entre el enlace peptídico del epítipo y la cadenas laterales de aminoácidos presentes en esta cavidad (Figura 15-B). La treonina es un aminoácido polar que posee un grupo hidroxilo y metilo, favoreciendo la interacción en condiciones polares o no polares con el bolsillo 6, siendo la segunda cavidad con restricción específica hacia aminoácidos polares como treonina o asparagina (Figura 15-C). Se ha reportado que el bolsillo 7 interacciona con diversos aminoácidos excepto aquellos cargados positivamente, en este análisis se observa la interacción de una cisteína, la cual puede formar enlaces covalentes entre grupos tiol, o bien puede formar puentes de hidrógeno con aminoácidos polares como la tirosina presente en esta cavidad (Figura 15-D). Por otro lado, el bolsillo 9 interacciona con aminoácidos pequeños como la serina, dando pie a la formación de puentes de hidrógeno (Figura 15-E). Finalmente, los bolsillos 3, 5 y 8 quedan altamente expuestos al solvente para interactuar con el receptor de la célula T. Todas las interacciones analizadas se resumen en la Tabla II, donde se puede apreciar que la mayoría de estas coinciden con los estudios reportados para la interacción del péptido inmunodominante de la lisozima de huevo de gallina HEL (48-63 aa) con el MHC-II (haplotipo I-A^k) (Fremont y col., 1998).

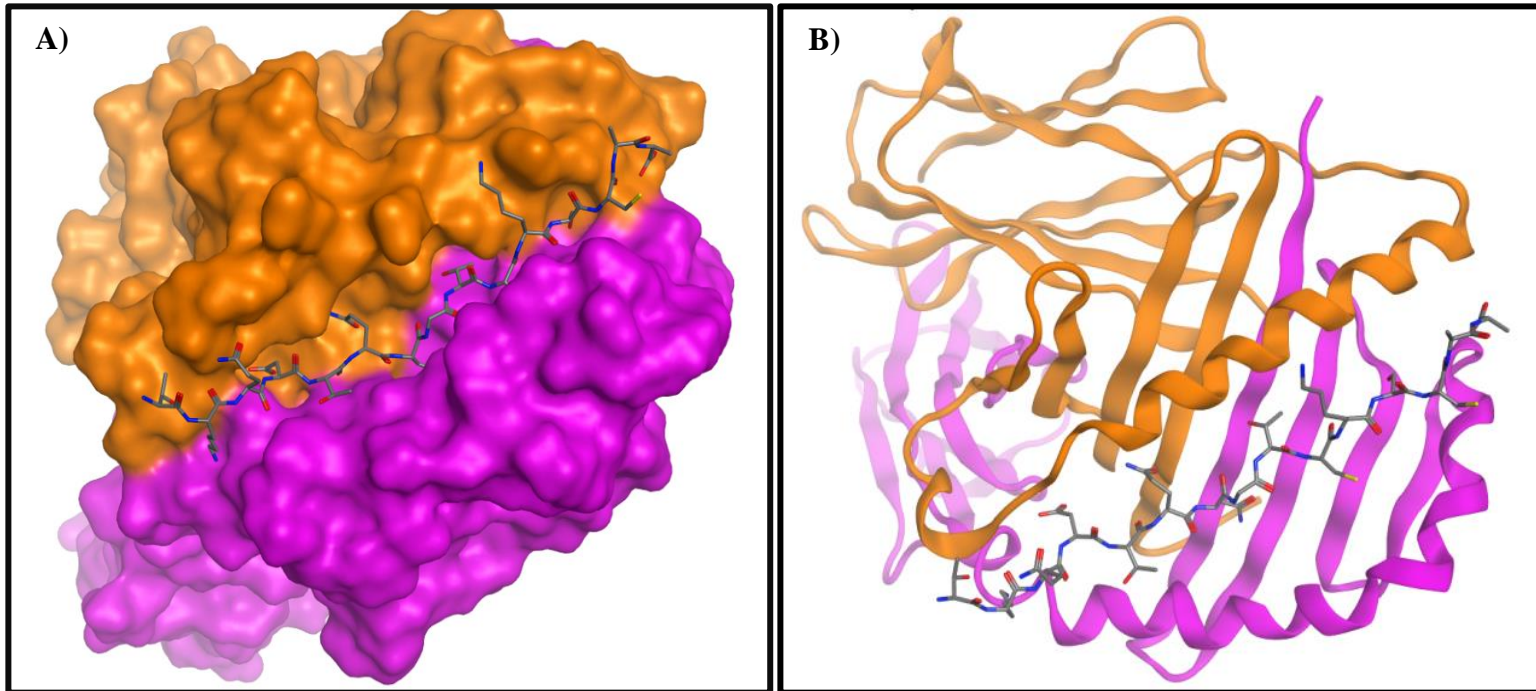
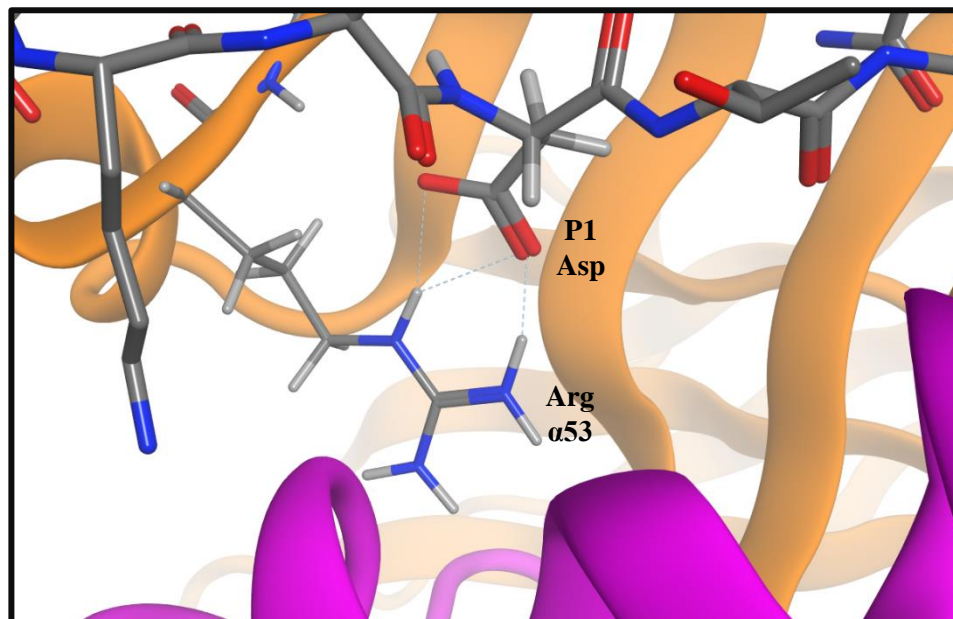
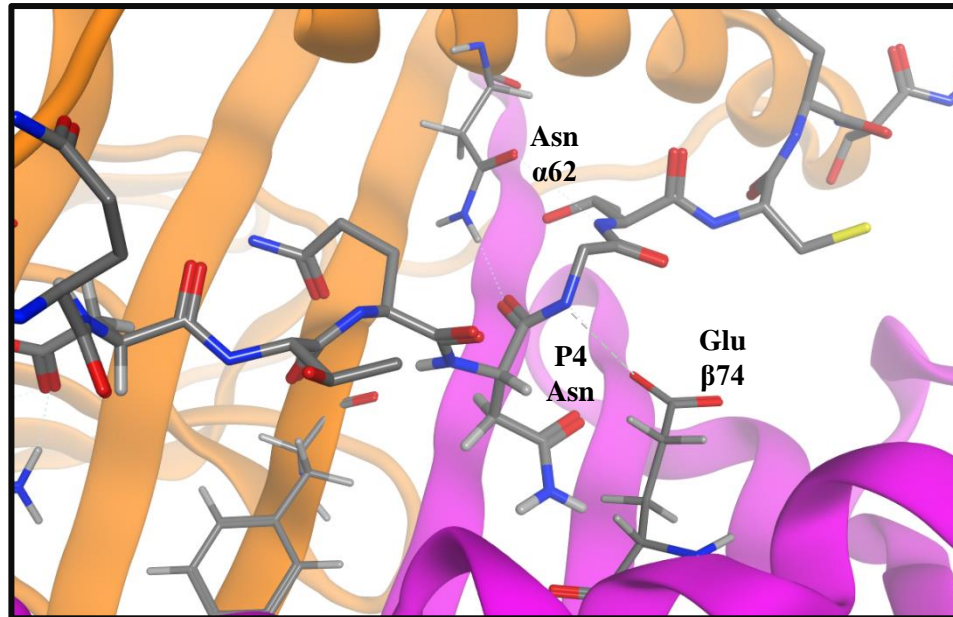


Figura 14. Representación en superficie (A) y en listón (B) de la interacción por modelado molecular *in silico* entre el epítipo de la proteína 5G8 (67-81 aa) y el MHC-II de ratón (haplotipo I-A^k). La cadena α y β del MHC-II se representan en amarillo y morado respectivamente, mientras que el péptido (67-81 aa) con color gris.

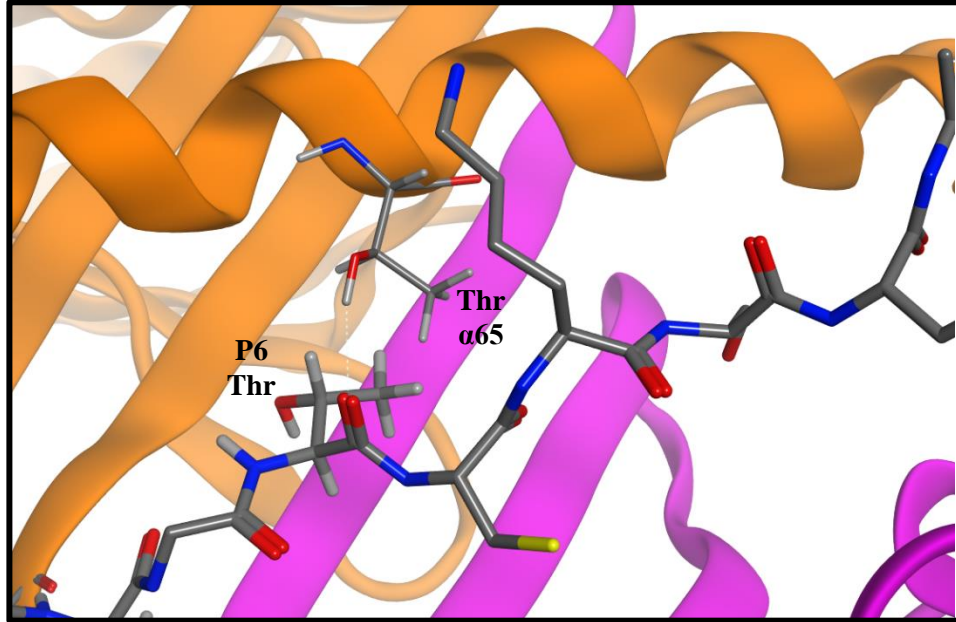
A)



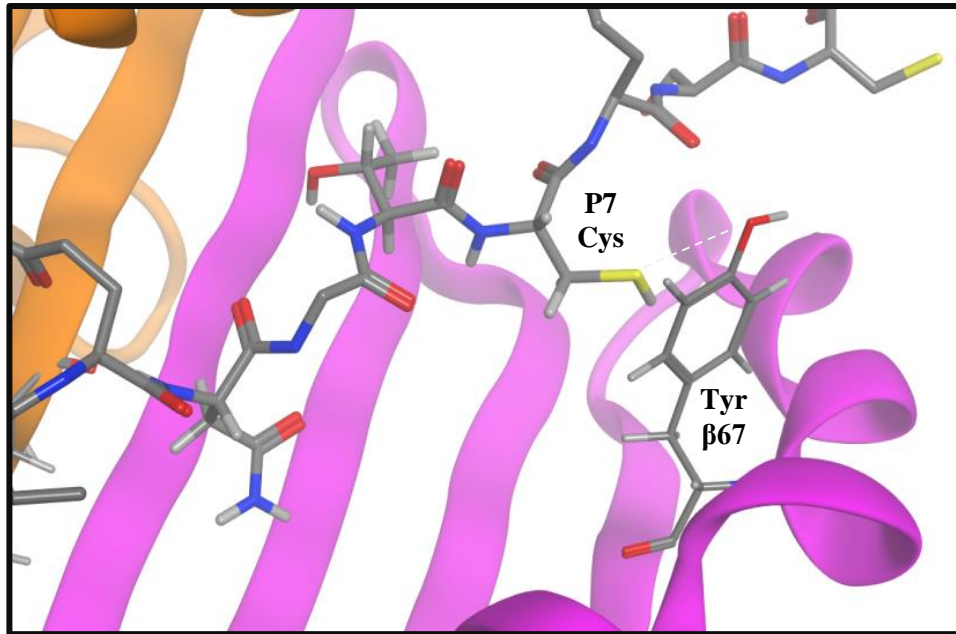
B)



C)



D)



E)

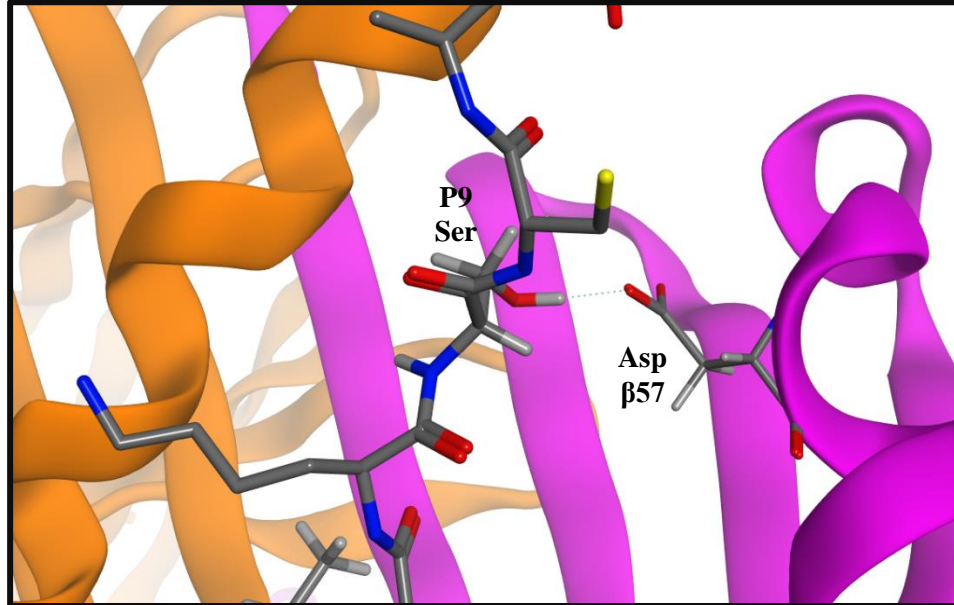


Figura 15. Interacciones químicas entre el epítoto de la proteína 5G8 (67-81 aa) y los bolsillos del MHC-II (haplotipo I-A^k). A) Interacción electrostática en el bolsillo 1 entre el ácido aspártico del epítoto y una arginina conservada en la cadena α del MHC-II. Interacciones no covalentes, específicamente puentes de hidrógeno entre: B) La asparagina de la cadena α y el ácido glutámico de la cadena β en el bolsillo 4 con el enlace peptídico del epítoto. C) La treonina del epítoto y una treonina presente en la cadena α del bolsillo 6. D) La cisteína del péptido y una tirosina la cadena β en el bolsillo 7. E) La serina del epítoto y un ácido aspártico de la cadena β en el bolsillo 9. La cadena α y β del MHC-II se representan en amarillo y rosa respectivamente, mientras que el péptido (67-81 aa) con color gris.

Tabla II. Interacciones químicas entre el MHC-II (haplotipo I-A^k) con el epítoto (67-81 aa) de la proteína 5G8 y el epítoto (48-63 aa) de la proteína HEL.

Pocket	5G8	Interacción intermolecular	HEL	Interacción intermolecular¹
1*	T		G	
2*	K		S	Puente de H con Arg α 53
3*	Q		T	van der Waals Arg α 53
1	D	Electrostática Arg α 53	D	Electrostática Arg α 53
2	T	Puente de H Asn β 82	T	Puente de H Asn β 82
3	Q		G	
4	N	Puente de H Asn α 62, Glu β 74	I	Puente de H Tyr α 9
5	G		L	
6	T	Puente de H Thr α 65	Q	Puente de H Asn α 62
7	C	Puente de H Tyr β 67	I	Puente de H Tyr β 30
8	K		N	
9	S	Puente de H Asp β 57	S	Puente de H Asp β 57
4*	C		R	van der Waals Ile α 72
5*	A		W	van der Waals His α 68
6*	A		W	

*Aminoácidos de anclaje

¹ (Fremont y col., 1998)

DISCUSIÓN

Con la finalidad de caracterizar parcialmente la respuesta inmune celular específica contra la proteína 5G8 de *G. lamblia*, el presente estudio describe el análisis e identificación de la estructura primaria de esta proteína, así como su potencial capacidad en la inducción de una respuesta inmune de tipo celular en contra de la infección por este parásito.

Diversos estudios sugieren que el control de la giardiasis, requiere de la respuesta inmune humoral y celular coordinadas (Singer y col., 2000). Sin embargo, este parásito puede evadir la inmunidad protectora reduciendo su capacidad inmunogénica e inhibiendo las respuestas inmunitarias del hospedero. En la actualidad, el conocimiento que se tiene acerca de los mecanismos de patogénesis, de la respuesta inmune involucrada en la giardiasis, así como la identificación y caracterización de los antígenos de este parásito, son limitados (Adam, 2001). Trabajos de investigación se han enfocado principalmente en evaluar la respuesta inmune humoral del hospedero en contra de *G. lamblia* y se ha demostrado que este mecanismo es importante en el control de la infección por este parásito, ya que durante la parasitosis se ha observado que aumentan los niveles de IgA e IgG, principalmente, y que el aumento del título de anticuerpos está relacionado con el aclaramiento de la infección (Velazquez y col., 2005). Por otro lado, se ha evaluado la respuesta inmune celular, otro proceso importante en el mecanismo de control y eliminación del parásito, ya que se ha observado un aumento en la proliferación de células T en mucosas y sangre periférica durante la giardiasis en humanos y en modelos murinos de infección (Ebert, 2000). Así mismo, otros estudios han demostrado que una disminución en las poblaciones de células T CD4⁺ en humanos y animales, favorece el desarrollo de la giardiasis crónica (Lujan y col., 2011; Singer y col., 2000). A pesar de que está reportada la importancia del papel que juegan las células B y T durante el curso de esta infección, los mecanismos de acción son poco conocidos.

Dentro de los principales antígenos estudiados en *G. lamblia*, se encuentran las proteínas de choque térmico (HSP, Heat Shock Protein), que son liberadas por el

parásito en respuesta al estrés; lectinas, localizadas en la superficie de membrana del parásito e implicadas en los mecanismos de adhesión a la superficie del intestino. También se han identificado proteínas de la pared del quiste (CWP, Cyst Wall Protein) y proteínas asociadas al citoesqueleto de *Giardia*, como son las giardinas y tubulinas. Por otro lado, también han sido reportadas proteínas relacionadas con funciones metabólicas como la enolasa, arginina deaminasa y ornitina carbamoil transferasa, (Davids y col., 2006; Faubert, 2000; López-Romero y col., 2015; Palm y col., 2003; Tellez y col., 2005). Las Proteínas Variables de Superficie (VSP, Variant-Specific Surface Protein) que se encuentran en la superficie del parásito, son otros de los principales antígenos estudiados en *Giardia*.

Estudios previos de nuestro grupo de investigación, han descrito la proteína 5G8 con una masa molecular relativa de ~ 71 kDa, la cual es reconocida tanto por la respuesta secretora (IgA en heces) como sistémica (IgG en suero) de ratones infectados por *G. lamblia* (Velazquez y col., 2005). Adicionalmente, resultados obtenidos por espectrometría de masas ESI-MS/MS, sugieren fuertemente que la proteína 5G8 pertenece a la familia de VSPs. Con el fin de encontrar genes homólogos y conocer su función, se realizó un análisis bioinformático de alineamiento de secuencias, BLAST, en el que se compara la secuencia obtenida contra una gran cantidad de secuencias reportadas en la base de datos GiardiaDB, obteniendo de esta manera mayor información acerca de la identificación de esta proteína. El análisis nos permitió conocer proteínas con un alto porcentaje de homología con respecto al constructo de ~ 61 kDa de la proteína 5G8, entre las que resultaron: QR46_3107 (97 %), GSB_153033 (70 %), GSB_154953 (63 %), entre otras (Tesis de doctorado, López, 2016). Estas proteínas forman parte de la familia de VSPs. Dentro de sus características principales destacan la presencia de abundantes motivos de cisteína, masas moleculares de 20 – 200 kDa, poseen una secuencia variable perteneciente al N- terminal y una cola hidrofóbica en el C-terminal con la secuencia invariable de aminoácidos CRGKA y una región transmembranal (Mowatt y col., 1991; Ankarklev y col., 2010). Estas características fundamentales en la clasificación de las VSPs permiten sugerir que la proteína 5G8

pertenece a esta familia. Para continuar con el análisis bioinformático, se utilizó el constructo génico de la proteína 5G8 de ~ 71 kDa, en el cual se identificó una delección de la base nitrogenada Guanina en la secuencia correspondiente a la proteína de ~ 28 kDa, esta delección provoca un marco de lectura abierto que codifica únicamente para esta proteína y al mismo tiempo, una secuencia de aminoácidos (PASA) que termina con la homología, seguido de un codón de paro que trunca a la proteína. Por el contrario, la inserción de esta base nitrogenada Guanina, a través de correcciones puntuales, el marco de lectura codifica un producto proteico de 607 aminoácidos y con masa molecular de ~ 61 kDa y que adicionalmente, conserva los péptidos identificados por el análisis de espectrometría de masas. Estos datos en conjunto con las evidencias experimentales discutidas anteriormente, sugieren la existencia de un gen que codifica para una sola proteína, es decir, la proteína 5G8 proviene de la expresión de un solo gen. La expresión de este tipo de proteínas (VSP) en *Giardia* está regulada por ARN de interferencia (RNAi) y la interrupción de esta vía genera trofozoítos que expresan simultáneamente numerosas VSPs (Lujan, 2006). Previos análisis de citometría de flujo revelaron que la proteína 5G8 se expresa dentro de los trofozoítos de *G. lamblia* (> 90 % del total de la población celular), y sólo un bajo porcentaje (~ 5 %) de esos trofozoítos expresan altos niveles de la proteína en la superficie celular. El patrón de expresión de este antígeno indica que la proteína 5G8 está siendo transportada por el sistema de tráfico vesicular hacia la membrana. Futuros estudios son necesarios para poder localizar el sitio específico de la proteína, y su relación con el tráfico vesicular en el interior de *G. lamblia* (Quintero y col., 2013).

Debido a que los mecanismos inmunológicos durante la infección se caracterizan por una fuerte respuesta hacia las VSPs, estudios previos se han enfocado en evaluar la capacidad protectora de estas proteínas durante la giardiasis. La inducción de una respuesta inmune activa considerable contra *G. lamblia* utilizando un repertorio de VSPs, se asocia con una reducción en los signos de la infección en un modelo experimental, sugiriendo un posible papel protector (Rivero y col., 2010). Estos datos podrían ser útiles en el desarrollo de estrategias para la elaboración de una medida

profiláctica contra la giardiasis (Lujan y col., 2011; Lopez-Romero y col., 2015). Con base en esto, se realizó un ensayo de inmunorreconocimiento de anticuerpos IgG séricos obtenidos a partir de ratones infectados y re-infectados con la cepa GS/M-83-H7 5G8 (+) (previamente generada en nuestro laboratorio mediante inmunoadsorción) hacia la proteína 5G8 asilada. El análisis muestra un reconocimiento predominante hacia la proteína 5G8 (~ 71 kDa) por parte de los anticuerpos generados después de cinco infecciones, así como también por el anticuerpo monoclonal 5G8.B5 específico para esta proteína. El reconocimiento hacia esta proteína 5G8 (proteína de 71 kDa) ha sido reportada en trabajos anteriores (Velazquez y col., 2005; Quintero y col., 2013; Quintero y col., 2016). Adicionalmente se observa un reconocimiento del anticuerpo monoclonal 5G8.B5 hacia una banda de ~ 150 kDa, sugiriendo la asociación de la proteína de ~ 71 kDa consigo misma (forma agregada de la proteína) o con otras proteínas. Estos datos sugieren, al igual que otros estudios reportados, que la respuesta inmune humoral juega un papel importante durante esta parasitosis.

La primera fase de la inmunidad humoral es el reconocimiento de antígenos extraños dentro del organismo por células B a través de su receptor de membrana BCR. Sin embargo, a pesar de la interacción con antígeno, la célula B no se activa hasta ser estimulada por la respuesta inmune celular. Una vez que las células presentadoras de antígeno han procesado y expuesto en su superficie las determinantes antigénicas específicas para el antígeno y estas son reconocidos por el TCR de las células T, desencadenando una serie de reacciones que culminan en la activación de la célula T específica para el antígeno presentado, dando lugar a una proliferación denominada expansión clonal (Janeway, 2008). En el presente trabajo, se evidencia de una manera clara la capacidad que tiene la proteína 5G8 para inducir una respuesta inmune de tipo celular. Con el fin de evaluar la capacidad linfoproliferativa de la proteína 5G8 en esplenocitos de ratones infectados con *G. lamblia*, se utilizó el ensayo de MTT descrito por Mossman y el análisis de expresión de CD69 como marcador de activación de temprana. La proliferación observó a partir de las 72 horas, con la presencia de focos de proliferación en esplenocitos estimulados con la proteína 5G8 y el extracto proteico total

de un lisado de trofozoítos de *G. lamblia*. Cuantitativamente, dicha proliferación fue significativamente más alta que en trofozoítos estimulados con una proteína irrelevante utilizada como control negativo (HEL). Dicha expansión clonal sugiere la inducción de una respuesta inmune celular contra la proteína 5G8, en la cual intervienen la activación y proliferación de células con capacidad de reconocimiento específico hacia este antígeno, contribuyendo de esta manera en el proceso de erradicación del parásito durante la infección. Adicionalmente, los esplenocitos de ratones sin infección no mostraron proliferación significativa bajo las mismas condiciones, descartando de esta manera un efecto mitogénico por parte del antígeno. Por otro lado, se evaluó la expresión del marcador CD69, el cual pertenece a la superfamilia de las lectinas tipo-C y se induce en etapas tempranas tras la activación de linfocitos T con una amplia variedad de estímulos. El ensayo se llevó a cabo en esplenocitos de ratones re-infectados con *G. lamblia* como indicativo de activación temprana en las células estimuladas bajo las mismas condiciones que el ensayo de MTT. Por citometría de flujo se observó que los esplenocitos expuestos al extracto proteico y a la proteína 5G8 de *G. lamblia* mostraron mayor expresión de CD69 comparado con los trofozoítos expuestos a HEL y sin tratamiento. Los resultados sugieren la capacidad de la proteína 5G8 para inducir activación temprana de células, contribuyendo en la caracterización de la respuesta inmune celular contra este antígeno de *G. lamblia*. Sin embargo, deben realizarse futuros estudios con el propósito de establecer las condiciones experimentales óptimas y profundizar en el conocimiento de los mecanismos que se llevan a cabo durante esta respuesta.

Como se mencionó anteriormente, pocos estudios se han enfocado en la investigación de antígenos inmunogénicos de este parásito. Por esta razón, es importante incrementar el conocimiento acerca de las proteínas que inducen una respuesta inmune humoral y celular de carácter protector (Lopez-Romero y col., 2015). Debido a que el presente estudio se enfoca en la caracterización de la respuesta inmune de tipo celular, la predicción de epítopes de células T *in silico*, resulta una herramienta de gran importancia en la identificación de aquellos epítopes que desencadenan una mayor

respuesta de este tipo. Actualmente, los modelos computacionales complementan el área experimental a través del eficiente análisis de interacción entre péptidos y moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Dichos modelos han sido aplicados exitosamente en la predicción de epítopes de células T en enfermedades infecciosas, cáncer, autoinmunidad y alergias (Bing y col., 2009). Las células T pueden detectar a un microorganismo mediante la interacción con células presentadoras de antígeno, las cuales reconocen moléculas antigénicas del patógeno, lo endocitan e inician el procesamiento de este a pequeños fragmentos o péptidos, de los cuales sólo algunos tienen la capacidad de unirse moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (clase I o II) para posteriormente ser reconocidos por las células T a través de su receptor (TCR) (Cuendet, 2011). La capacidad de un péptido para interactuar con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y ser presentado a células T, se conoce como inmunodominancia y depende de las interacciones entre los residuos de las cadenas laterales de los aminoácidos con sitios específicos del surco de unión a péptidos del MHC (García, 1998). La predicción de estos epítopes se basa en las propiedades de sus aminoácidos tales como la hidrofiliidad (Parker y col., 1986; Hopp y col., 1981), accesibilidad al solvente (Emini y col., 1985), estructura secundaria (Pellequer y col., 1993; Levitt, 1978), flexibilidad (Karplus y col., 1985), localización de los residuos (Larsen y col., 2006) y antigenicidad (Kolaskar y col., 1990).

En este trabajo, se determinaron las secuencias de la proteína 5G8 con mayor probabilidad de unión a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC-II) (haplotipo I-A^k), que pudieran ser responsables de la activación de la respuesta inmune celular. El análisis arrojó 53 epítopes probables, de los cuales se seleccionaron los cinco con mayor puntaje para ser analizados mediante modelado molecular. Dada la disponibilidad de los datos cristalográficos y de interacción del péptido inmunodominante de la lisozima de huevo de gallina (HEL) (48-63 aa) con el MHC-II (haplotipo I-A^k) (Fremont y col., 1998), se llevaron a cabo análisis de modelado molecular *in silico* con el objetivo de dar un acercamiento al posible sitio de unión e interacciones moleculares de la proteína 5G8 y las moléculas del MHC-II (haplotipo I-

A^k). Los datos obtenidos coinciden altamente con los estudios reportados por Fremont, observando una distribución uniforme y compacta de los péptidos de la proteína 5G8 en la cavidad, favoreciendo interacciones principalmente de tipo electrostáticas y puentes de hidrógeno con aminoácidos de los bolsillos 1, 4, 6, 7 y 9 del MHC-II. Por otro lado, la mayoría de los aminoácidos de anclaje presentaron características similares a los reportados en otros modelos de estudio (Fremont y col., 1998). El uso de esta herramienta en el entendimiento de las interacciones moleculares durante una respuesta inmunológica, ayuda a establecer comparaciones entre teoría y datos experimentales, e incluso permite realizar predicciones cuantitativas, profundizando así en el conocimiento de los principales mecanismos celulares y moleculares que se llevan a cabo durante una infección.

En la actualidad, el descubrimiento de epítopes capaces de inducir una respuesta inmune de tipo celular, podrían considerarse blancos de estudio para posteriores análisis e investigaciones concernientes a la generación de una posible medida profiláctica efectiva contra el parásito. El análisis de alineamiento de secuencias aminoacídicas de la proteína 5G8 con otras VSPs de *Giardia*, permitió conocer una gran cantidad de proteínas con diferente porcentaje de homología, ubicando dentro de estas algunos de los epítopes de la proteína 5G8 con mayor probabilidad de unión al MHC-II (haplotipo I-A^k). La presencia de epítopes conservados de la proteína inmunogénica 5G8 en otras VSPs, permite considerar a esta proteína como posible candidata para el desarrollo de medidas profilácticas contra la giardiasis (Tabla III) (Tesis de doctorado, López, 2016., Quintero y col., 2016).

Es un gran reto para la investigación en inmunología y parasitología el desarrollo de estrategias que favorezcan la inmunidad contra parásitos protozoarios. La importancia de la giardiasis como problema de salud pública (Eckman, 2003), ha llevado a diversos investigadores a realizar estudios enfocados en el desarrollo de medidas profilácticas capaces de estimular una respuesta inmune protectora (Lee y col., 2011). Los resultados obtenidos en este estudio contribuyen en la caracterización bioquímica e inmunológica de antígenos altamente inmunogénicos del parásito *G. lamblia*, lo cual es importante

para el establecimiento de bases científicas sólidas para el desarrollo de una vacuna contra la infección intestinal provocada por este parásito. Posiblemente, profundizando más en el estudio de la respuesta inmune celular y humoral, se podría mejorar el conocimiento que se tiene sobre los mecanismos inmunológicos involucrados durante este proceso infeccioso, permitiendo el entendimiento de la interacción hospedero-parásito, y sentando las bases moleculares para el futuro desarrollo de medidas profilácticas contra *G. lamblia*.

Tabla III. La proteína 5G8 presenta regiones conservadas en otras Proteínas Variables de Superficie en diferentes genotipos de *G. lamblia* (Tesis de doctorado, López, 2016., Quintero y col., 2016).

#	Name ^a	Access number ^b	Isolate	Genotype	Protein size (aa)	Cover (%) ^c	Identity (%) ^c	Positives (%) ^c	Gaps (%) ^c	Reference
1	QR46_3107	KWX12887.1	BAH15c1	B	607	100	97	98	0	Wielinga C. 2015
2	GSB_153033	ESU41143.1	GS_B	B	732	87	70	79	2	Adam R.D. 2013
3	GSB_154953	ESU40281.1	GS_B	B	679	100	63	72	3	Adam R.D. 2013
4	TSA4	gi 136441	WB	A	713	97	51	61	7	Gillin,F.D. 1990
5	GLP15_2640	EFO61461.1	P15	E	745	100	48	59	11	Jerlstrom-Hultqvist,J. 2010
6	DHA2_150066	ESU39141.1	DH	A2	747	81	48	58	12	Adam R.D. 2013
7	VSP-54	EDO80151.1	WB	A	682	99	46	57	12	Morrison,H.G. 2007
8	DHA2_150893	ESU38743.1	DH	A2	702	100	46	56	13	Adam R.D. 2013
9	VSP-116	EDO78106.1	WB	A	699	99	44	53	16	Morrison,H.G. 2007
10	GLP15_625	EFO62362.1	P15	E	682	99	42	53	14	Jerlstrom-Hultqvist,J. 2010

a. Todas las proteínas analizadas corresponden a VSPs

b. Número de acceso a GeneBank

c. Valores en porcentaje obtenidos mediante BLAST de cada VSP evaluada con respecto ala proteína 5G8.

CONCLUSIONES

- Se aisló y determinó la secuencia aminoacídica de la proteína 5G8, identificándose como una Proteína Variable de Superficie (VSP).
- La proteína 5G8 aislada fue reconocida por IgG de ratones infectados y re-infectados con *G. lamblia*.
- La proteína 5G8 indujo activación en esplenocitos de ratones infectados con *G. lamblia* en condiciones *in vitro*.
- Se identificaron los epítopes inmunodominantes de *G. lamblia* con capacidad de inducir una respuesta inmune de tipo celular utilizando un algoritmo de predicción.
- Se analizaron *in silico*, las posibles interacciones específicas entre epítopes inmunodominantes de la proteína 5G8 y el complejo principal de histocompatibilidad de clase II (haplotipo I-A^k).

BIBLIOGRAFÍA

- Adam, R.D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev.* 14: 447-475.
- Adam, R.D., Dahlstrom, E.W., Martens, C.A., Bruno, D.P., Barbian, K.D., Ricklefs, S.M., Hernandez, M.M., Narla, N.P., Patel, R.B., Porcella, S.F., Nash, T.E. 2013. Genome sequencing of *Giardia lamblia* genotypes A2 and B isolates (DH and GS) and comparative analysis with the genomes of genotypes A1 and E (WB and Pig). *Genome Biol Evol.* 5:2498-2511.
- Akira, S., Yoshida, K., Tanaka, T., Taga, T. y Kishimoto, T. 1995. Targeted disruption of the IL-6 regulated genes: gp130 and NF-IL-6. *Immunology Reviews.* 148:221-253.
- Ankarklev J., Jerlström-Hultqvist J., Ringqvist E., Troell K., Svärd S. 2010. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nature Rev Microbiol.* doi:10.1038/nrmicro2317.
- Astiazarán-García, H., Quintero, J., Vega, R., Briceño, P., Oviedo, C., Rascón, L., Garibay-Escobar, A., Castillo, Y. F., Robles, Z., Hernández, J. y Velázquez, C. 2009. Identification of T-cell stimulating antigens from *Giardia lamblia* by using *Giardia* - specific T-cell hybridomas. *Parasite Immunology.* 31: 132–139.
- Bienz M., Siles-Lucas M., Wittwer P. y Müller N. 2001. VSP Gene Expression by *Giardia lamblia* Clone GS/M-83-H7 during Antigenic Variation *In Vivo* and *In Vitro*. *Infection and Immunity.* 69: 5278–5285.
- Bing, W., Kun, Y., Genyan, L., Fangyi, X., Feng, Z. y Yun, C. 2009. Computational prediction and identification of Epstein-barr virus latent membrane protein 2A antigen-specific CD8⁺ T-cell epitopes. *Cell Mol Immunol.* 6(2):97-103.
- Byrd L.G., Conrad J.T. y Nash T.T. 1994. *Giardia lamblia* Infections in Adult Mice. *Infection and Immunity.* 62: 3583-3585.

- Caccio, S.M. y Ryan U. 2008. Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol Biochem Parasitol.* 160: 75–80.
- Chaudhuri, P. Das, P. Sarkar, S. y Munoz, M.L., 1997. Biochemical and immunological characterization of soluble antigens of *Giardia lamblia*. *Parasitology Res.* 83: 604-10.
- Cuendet, M.A., Zoete, V. y Michielin, O. 2011. How T cell receptors interact with peptide-MHCs: a multiple steered molecular dynamics study. *Proteins.* 79: 3007-3024.
- Dauids B.J., Palm J.E. y Housley M.P. 2006. Polymeric immunoglobulin receptor in intestinal immune defense against the lumen-dwelling protozoan parasite *Giardia*. *J Immunol.* 177: 6281–6290.
- Dimitrov, I., Garnev, P., Flower, D.R. y Doytchinova, I. 2013. T-cell epitope vaccine design by immunoinformatics. *Open Biol.* 3:120139.
- Doebele, R.C., Busch, R., Scott, H.M., Pashine, A. y Mellins, E.D. 2000. Determination of the HLA-DM interaction site on HLA-DR molecules. *Immunity.* 13: 517-527.
- Ebert, E.C. 2000. *Giardia* induces proliferation and interferon gamma production by intestinal lymphocytes. *Gut.* 44 342-346.
- Eckmann, L. 2003. Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite Immunol.* 25: 259-270.
- Eckmann, L., Laurent, F., Langford, T.D., Hetsko, M.L., Smith, J.R., Kagnoff, M.F. y Gillin, F.D. 2000. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. *J Immunol.* 164:1478-1487.

- Emini E.A., Hughes J.V., Perlow D.S. y Boger J. 1985. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *Journal of virology*. 55: 836–839.
- Erlandsen, S.L., Bemrick W.J. y Pawley J. 1989. High-resolution electron microscopic evidence for the filamentous structure of the cyst wall in *Giardia muris* and *Giardia duodenalis*. *J. Parasitol.* 75:787–797.
- Erlandsen, S.L., Bemrick W.J., Schupp D.E., Shields J.M., Jarroll E.L., Sauch J.F. y Pawley J.B. 1990. High-resolution immunogold localization of *Giardia* cyst wall antigens using field emission SEM with secondary and backscatter electron imaging. *J. Histochem. Cytochem.* 38:625–632.
- Falk, P.G., Hooper, L.V., Midtvedt, T. y Gordon, J.I. 1998. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62:1157-70.
- Faubert, G. 2000. Immune Response to *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol.* 13(1): 35-54.
- Feng Y. y Xiao L. 2011. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev.* 24: 110–140.
- Fremont, D.H., Monnaie, D., Nelson, C.A., Hendrickson, W.A. y Unanue, E.R. 1998. Crystal structure of I-A^k in complex with a dominant epitope of lysozyme. *Immunity*. 8: 305-317.
- García, K.C. 1998. Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self peptide-MHC antigen. *Science*. 279, 1166-1172.
- Gardner, T. y Hill, D. 2001. Treatment of Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* P. 114–128.
- Gilles, H.M., 1999. Giardiasis Protozoal Diseases, Primera edición. Oxford University Press Inc. U.S.A.

- Gillin, F.D., Hagblom, P. J., Harwood, S., Aley, D., Reiner, M., McCaffery, M., Guiney, D. 1990. Isolation and expression of the gene for a major surface protein of *Giardia lamblia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87:4463–4467.
- Gillin F.D., Reiner D.S., Boucher S.E. 1988. Small-Intestinal Factors Promote Encystation of *Giardia lamblia* *In Vitro*. *Infect. Immun.* P. 705-707.
- Gillin, F.D., Reiner, D. y Wang, C.S. 1983. Human milk kills parasitic intestinal protozoa. *Science*. 221:1290-1292.
- Godkin, A.J., Smith, K.J., Willis, A., Tejada-Simon, M.V., Zhang, J., Elliott, T. y Hill, A.V. 2001. Naturally processed HLA class II peptides reveal highly conserved immunogenic flanking region sequence preferences that reflect antigen processing rather than peptide-MHC interactions. *J Immunol*. 166: 6720-6727.
- Gottstein, B. y Nash, T. E., 1991. Antigenic variation in *Giardia lamblia*: infection of congeniallity athymic nude and scid mice. *Parasite immunology*. 13: 649-59.
- Griffin, J.P., Chu, R. y Harding, C.V. 1997. Early endosomes and a late endocytic compartment generate different peptide-class II MHC complexes via distinct processing mechanisms. *J Immunol*. 158: 1523-1532.
- Hanevik K., Kristoffersen E. y Svard S. 2011. Human cellular immune response against *Giardia lamblia* 5 years after acute giardiasis. *J Infect Dis*. 204: 1779–1786.
- Heyworth, M.F., Carlson, J.R., y Ermak, T.H. 1987. Clearance of *Giardia muris* infection requires helper/inducer T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* 165: 1743-1748.
- Hill D. y Pohl R. 1990. Ingestion of *Giardia lamblia* trophozoites by murine Peyer's patch macrophages. *Infect Immun*. 58:3202-7.

- Hopp T.P., Woods K.R. 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 78: 3824–3828.
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M. y Shlomchik, M. 2001. *Immunobiology*, quinta edición. Garland Publishing. U.S.A.
- Jerlström-Hultqvist, O., Franzén, J., Ankarklev, F., Xu, E., Nohýnková, J.O., Andersson, S.G., Svärd, B. 2010. Genome analysis and comparative genomics of a *Giardia intestinalis* assemblage E isolate. *BMC Genomics*. 7:11:543.
- Johnston, S.P., Ballard M.M., Beach M.J., Causer L. y Wilkins P.P. 2003. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 41:623–626.
- Karplus P.A., Schulz G.E. 1985. Prediction of chain flexibility in proteins – a tool for the selection of peptide antigens. *Naturwissenschaften* 72: 212–213.
- Keserue H., Fuchslin H. y Egli T. 2011. Rapid detection and enumeration of *Giardia lamblia* cysts in water samples by immunomagnetic separation and flow cytometric analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* P. 5420–5427.
- Kolaskar A.S., Tongaonkar P.C. 1990. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS letters*. 276: 172–174.
- Langford T.D., Housley M.P. y Boes, M. 2002. Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia* spp. *Infect Immun.* 70: 11–18.
- Larocque, R. y Nakagaki, K. 2003. Oral immunization of BALB/c mice with *Giardia duodenalis* recombinant cyst wall protein inhibits shedding of cysts. *Infect Immun.* 71(10): 5662-5669.

- Larsen J.E., Lund O. y Nielsen M. 2006. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Research*. Doi:10.1186/1745-7580-2-2.
- Lascurain, R., Mora, M.E., Acosta, G. y Santos, J.I., 1993. Prevalencia de anticuerpos contra *Giardia lamblia* en suero de cordón umbilical y en sangre periférica materna. *Biología Medica del Hospital Infantil Mexicano*. 50: 27-30.
- Lesk, A. 2014. Introduction to Bioinformatics, cuarta edición. Oxford University Press. U.S.A.
- Levitt M. 1978. Conformational preferences of amino acids in globular proteins. *Biochemistry*. 17(20):4277-4285.
- Li, E., Zhou, P. y Singer, S.M. 2006. Neuronal nitric oxide synthase is necessary for elimination of *Giardia lamblia* infections in mice. *J Immunol*. 176: 516–521.
- Li, E., Zhou, P., Petrin, Z. y Singer, S.M. 2004. Mast cell-dependent control of *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect Immun*. 72: 6642–6649.
- López-Romero, G., Quintero, J., Astiazarán-García, H., Velázquez, C. 2015. Host defences against *Giardia lamblia*. *Parasite Immunology*. 37 (8): 394-406.
- López Romero, G. C. 2016. Caracterización Inmunoquímica de Antígenos Inmunodominantes de *G. lamblia* en un Modelo Murino de Giardiasis. Tesis de doctorado. Coordinación de Nutrición, Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo A.C. Hermosillo, Sonora, México.
- Luján H.D. 2006. *Giardia* y giardiasis, primera edición. Medicina Buenos Aires. 66 (1): 70-74.
- Lujan, H.D. y Svärd S. 2011. Antigenic Variation in *Giardia*. SpringerWeinNewYork (Ed.). P. 245-247. Wien, Austria.

- Maloney, J., Keselman, A., Li, E. y Singer, S.M. 2015. Macrophages expressing arginase 1 and nitric oxide synthase 2 accumulate in the small intestine during *Giardia lamblia* infection. *Microbes Infect.* 6: 462–467.
- Matthias, G. 2016. Introduction to Molecular Vaccinology, primera edición. Springer. U.S.A.
- Morrison, H.G., McArthur, A.G., Gillin, F.D., Aley, S.B., Adam, R.D., Olsen, G.J., Best, A.A., Cande, W.Z., Chen, F., Cipriano, M.J., Davids, B.J., Dawson, S.C., Elmendorf, H.G., Hehl, A.B., Holder, M.E., Huse, S.M., Kim, U.U., Lasek-Nesselquist, E. G., Manning, A., Nigam, J.E., Nixon, D., Palm, N.E., Passamaneck, A., Prabhu, C.I., Reich, D.S., Reiner, J., Samuelson, S.G., Svard, M.L. 2007. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science.* 317:1921-1926.
- Mowatt, M.R., Aggarwal, A. y Nash, T.E. 1991. Carboxyterminal sequence conservation among variant-specific surface proteins of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol.* 49: 215–228.
- Müller, N., Sterk, M. y Hemphill, A. 2007. Characterization of *Giardia lamblia* WB C6 clones resistant to nitazoxanide and to metronidazole. *J Antimicrob Chemother.* 60, 280-287.
- Nash, T.E., Herrington, D.A., Levine, M.M., Conrad, J.T. y Merritt, J.W. Jr. 1990. Antigenic variation of *Giardia lamblia* in experimental human infections. *J. Immunol.* 144, 4362–4369.
- Nash, T.E., Herrington, D.A., Losonsky, G.A. y Levine, M.M. 1987. Experimental human infections with *Giardia lamblia*. *J. Infect. Dis.* 156, 974–984.
- Owen R.L., Allen C.L., Stevens D.P. 1981. Phagocytosis of *Giardia muris* by macrophages in Peyer's patch epithelium. *Infect Immun.* 33:591 601.

- Palm, D., Weiland, M., Griffiths, J., Ljungstrom, I. y Svard, S., 2003. Identification of immunoreactive proteins during acute human giardiasis. *The journal of infectious diseases*. 187: 1849-59.
- Papanastasiou P., Bruderer T., Li Y., Bommeli C. y Köhler P. 1997. Primary structure and biochemical properties of a variant-specific surface protein of *Giardia*. *Mol Biochem Parasitol*. 86: 13–27.
- Parker J.M, Guo D. y Hodges R.S. 1986. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry*. 25: 5425–5432.
- Pavanelli W., Salazar F., Nogueira J., Conchon I., Noronha M., Abreu F, Nakagawa E., Ehara M. 2010. The effects of nitric oxide on the immune response during giardiasis. *Braz J Infect Dis*. 14(6):606-612.
- Pellequer J.L., Westhof E. y Vanregenmortel M.H. 1993. Correlation between the Location of Antigenic Sites and the Prediction of Turns in Proteins. *Immunology Letters*. 36: 83–100.
- Quintero J., Valdez A., Samaniego B., Lopez-Romero G., Astiazaran-Garcia H., Rascon L., Brecci L., Garibay-Escobar A., Robles-Zepeda R y Velazquez C. 2016. Isolation and partial characterization of an immunogenic antigen of *Giardia lamblia*. *Parasitology International*. (No publicado).
- Quintero, J., Figueroa, D., Barcelo, R., Brecci, L., Astiazaran-Garcia, H. Rascon, L. Robles-Zepeda, R., Garibay-Escobar, A., Velazquez-Contreras, E., Leon, A., Hernandez-Hernandez, J. y Velazquez, C. 2013. Identification of an immunogenic protein of *Giardia lamblia* using monoclonal antibodies generated from infected mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 108:1-7.

- Rammensee, Friede and Stevanovic. 1997. MHC ligands and peptide motifs. *Landes Bioscience*.
- Rammensee, H.G., Bachmann, J., Emmerich, N., Bachor, O. y Stevanovic, S. 1999. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *J Immunogenetics*. 50: 213-219 (www.syfpeithi.de).
- Rivero F.D., Saura A., Prucca C.G., Carranza P.G., Torri A. y Lujan H.D. 2010. Disruption of antigenic variation is crucial for effective parasite vaccine. *Nat Med*. 16: 714 551-557.
- Romero Cabello, R. 2007. Microbiología y parasitología humana : bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. Editorial Médica Panamericana. México, D.F.
- Ropolo A., Saura A., Carranza P. y Lujan H. 2005. Identification of Variant-Specific Surface Proteins in *Giardia muris* Trophozoites. *Infection and Immunity*. 73: 5208-5211.
- Savioli, L., Smith, H. y Thompson, A. 2006. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “Neglected Diseases Initiative”. *Trends in Parasitology*. 22 (5): 203-8.
- Scott, K.G. 2004. Role of CD8 and CD4 lymphocytes in jejunalosal injury during murine giardiasis. *Infection and Immunity*. 72, 3536-3542.
- Scott, K.G., Meddings, J.B., Kirk, D.R., Lees-Miller, S.P. t Buret, A.G. 2002. Intestinal infection with *Giardia spp.* reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinasedependent fashion. *Gastroenterology*. 123: 1179–1190.
- Secretaría de Salud. (2013). Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información. Dirección General de Epidemiología.

- Secretaría de Salud. (2016). Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información. Dirección General de Epidemiología.
- Singer, S. 2011. Immunology of giardiasis. 319-328 p. En: Luján Hugo D. y Svärd Staffan. *Giardia A Model Organism*. Springer-Verlag/Wien. New York, EEUU.
- Singer, S.M. y Nash, T.E. 2000. T-Cell dependent control of acute *Giardia lamblia* infection in mice. *Infect Immun*. 68(1): 170-175.
- Solaymani-Mohammadi, S. y Singer, S.M. 2010. *Giardia duodenalis*: the double-edged sword of immune responses in giardiasis. *Exp Parasitol*. 126: 292–297.
- Sotelo, C.N., 1998. Giardiasis en niños. Aspectos Clínicos y Terapéuticos. *Biología Medica del Hospital Infantil Mexicano*. 55: 47-53.
- Sprong H., Caccio S. y van der Giessen, J. 2009. Identification of Zoonotic Genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 3(12): 558.
- Syed, A.A. y Hill, D.R., 2003. *Giardia intestinalis*. *Current Opinion in infectious Diseases*. 16: 453-460.
- Tellez, A., Winiecka-Krusnell, J., Paniagua, M. y Linder, E. 2003. Antibodies in mother's milk protect children against Giardiasis. *Scand J Infect Dis*. 35:322-325.
- Valdez López, M. A. 2015. Caracterización Inmunoquímica de la Proteína Inmunogénica 5G8 de *Giardia lamblia* y Evaluación de su Posible Papel Protector en un Modelo Gerbil. Tesis de maestría. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias Químico-Biológicas. Hermosillo, Sonora, México.
- Valenzuela Antelo O. 2006. Bioestadística aplicada. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora.

- Vázquez, O. y Campos, T. 2009. Giardiasis, la parasitosis más frecuente a nivel mundial. *Rev del Centro de Inv.* 8, 31.
- Velazquez, C., Beltran, M., Ontiveros, N., Rascon, L., Figueroa, D. C., Granados, A. J., Hernandez-Martinez, J., Hernandez, J. y Astiazaran- Garcia, H., 2005. *Giardia lamblia* infection induces different secretory and systemic antibody responses in mice. *Parasite immunology.* 27: 351-356.
- Villadangos, J.A. y Ploegh, H.L. 2000. Proteolysis in MHC class II antigen presentation: who's in charge?. *Immunity.* 12: 233-239.
- Wade W.F., Chen Z.Z., Maki R., McKercher S., Palmer E., Cambier J.C. y Freed, J.H. 1989. Altered I-A protein mediated transmembrane signaling in B cells that express truncated I-A^k protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 86:6297.
- Wallace, J.L. y Miller, M.J. 2000. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. *Gastroenterology.* 119: 512-520.
- WHO. 1996. The world health report. Geneva: World Health Organization.
- Wielinga, C., Thompson, R.C., Monis., Ryan, P. U. 2015. Identification of polymorphic genes for use in assemblage B genotyping assays through comparative genomics of multiple assemblage B *Giardia duodenalis* isolates. *Mol Biochem Parasitol.* 201:1-4.
- Wu, Z.Q., Shen, Y., Khan, A.Q., Chu, C.L., Riese, R., Chapman, H.A., Kanagawa, O. y Snapper, C.M. 2002. The mechanism underlying T cell help for induction of an antigen-specific in vivo humoral immune response to intact *Streptococcus pneumoniae* is dependent on the type of antigen. *J Immunol.* 168: 5551-5557.
- Young, D.C. 2009. Computational drug design: A guide for computational and medicinal chemists. John Wiley and sons. 133-160.

Zhou, P., Li, E., Shea-Donohue, T. y Singer, S.M. 2007. Tumour necrosis factor α contributes to protection against *Giardia lamblia* infection in mice. *Parasite Immunology*. 29, 367-374.

ANEXO 1

Cultivo de *G. lamblia*

Materiales:

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

Reactivos:

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

Tripticasa.....20 g

(*BBL Triticase Petone Pacnreatic Digest of Casein*) BD 211921 445 g.

Extracto de Levadura10 g

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

Dextrosa.....,....10 g

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

NaCl.....2 g

Sigma 5-5886 65

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

Antibióticos:

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

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

Procedimiento:

1. Adicionar aproximadamente 7.5 mL de medio TYI-S-33 suplementado al 10 % con NBCS en un tubo de ensayo 13 x 100 estéril.

2. Adicionar 0.5 mL de cultivo de *G. lamblia* en confluencia (1×10^6 trofozoítos/mL).

El pase se realiza en condiciones completamente estériles, en un gabinete de bioseguridad II.

ANEXO 2

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

Reactivos:

Solución reguladora de fosfatos-salina (PBS) pH 7.2

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

Procedimiento:

1. Colocar en agua hielo (10 min) los tubos que contengan los cultivos axénicos de trofozoítos de *G. lamblia* [trofozoítos 5G8 (+)].
2. Centrifugar a 800 g por 10 minutos a 4 °C (Fisher Scientific, MARATON 3000 R) y lavar 3 veces con PBS estéril pH 7.2.
3. Resuspender en 1.4 mL de PBS pH 7.2.
4. Obtener la concentración celular por un hematocitómetro (5 µL de la suspensión celular + 995 µL de PBS, dilución 1:200). Tomar 20 µL de la suspensión + 20 µL de con azul de tripano (dilución 1:2) (Sigma, T-8154).
5. Adicionar 5 µL de inhibidor de proteasas (Sigma, St. Louis, MO, USA) y lisar las células sometiendo el microtubo a 3 ciclos de congelación y descongelación (congelador -80 °C. Thermo Fisher Scientific modelo 703) hasta que la suspensión esté completamente congelada (aproximadamente 45 minutos).

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

ANEXO 3

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

Reactivos:

*Acilamida/Bisacrilamida 30%

Acrilamida.....30 g

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

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

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

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

Trizma-base.....6.05 g

Agua ultrapura.....40 mL

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

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

Trizma-base.....91 g
Agua ultrapura.....100 mL

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

*Persulfato de amonio (APS) al 10%

(NH₄)₂S₂O₈.....10 μ g
Agua ultrapura100 μ L

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

*Buffer de corrida 1X, pH 8.3

Glicina.....72 g
Trizma-base.....15.1 g
SDS.....5 g

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

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

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

Buffer Tris 4X con SDS pH 8.8.....3.75 mL
Agua des-ionizada.....5.25 mL
de amonio (PSA).....0.08 mL
TEMED.....0.018 mL

*Gel concentrador (2 minigeles de 6 X 8 cm y separador de 0.75 mm)
Acrilamida/Bisacrilamida 30 %/ 0.8 %..... 0.65 mL
Buffer Tris-SDS pH 6.8.....1.25 mL
Agua ultrapura.....3.05 mL
Persulfato de amonio.....0.07 mL
TEMED.....0.01 mL

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

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

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

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

*Alcohol etílico al 70 % (1 L)

Alcohol etílico absoluto (96 %).....729.17 mL

Agua ultrapura270.83 mL

*Solución Azul de Coomassie

Metanol.....50 % (v/v)

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

Ácido acético.....10 % (v/v)

Agua ultrapura40 % (v/v)

*Solución Desteñidora I

Metanol.....50 % (v/v)

Ácido acético.....10 % (v/v)

Agua ultrapura40 % (v/v)

*Solución Desteñidora II

Metanol.....5 % (v/v)

Ácido acético.....7 % (v/v)

Agua ultrapura88 % (v/v)

Procedimiento:

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

Preparar el gel de separación al 12 %:

Acrilamida/Bisacrilamida 30 % / 8 %.....6 mL
Buffer Tris 4X/SDS pH 8.8.....3.75 mL
Agua ultrapura5.25 mL
Persulfato de amonio.....0.08 mL
TEMED.....0.018 mL

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

Preparar el gel concentrador al 12 %:

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

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

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

ANEXO 4

Determinación de Proteína por el Micrométodo de Bradford

Reactivos:

Reactivo de Bradford (Sigma, B-6916)

Material:

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

Procedimiento:

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

3. Adicionar por pozo 250 μL del reactivo de Bradford, incubar por 15 min a temperatura ambiente y medir la densidad óptica en un lector de microplacas a 570 nm.
4. Graficar la curva estándar de ABS y obtener la ecuación, así como su coeficiente de correlación para confirmar la confiabilidad de los datos.
5. Obtener la concentración de proteína de la muestra problema.

ANEXO 5

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

Reactivos:

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

Tris base.....30.3 g

Glicina.....144.0 g

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

- Buffer de transferencia 1X Tris-Glicina pH 8.3

Tris glicina 10X.....100 mL

Metanol200 mL

SDS.....1 g

Agua deionizada.....800 mL

Ajustar pH antes de aforar con NaOH o HCl

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

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

Leche svelty ®.....2 g

Mezclar en vortex. Usar esta solución recién preparada.

PBS-ABS 1 %

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

ABS.....0.1 g

Reactivos para el sistema de revelado:

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

Solución reveladora Kodak. Para preparar 400 mL:

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

Solución Fijadora Kodak. Para preparar 400 mL:

1. Agregar 200 mL de agua destilada.
2. Adicionar 87 mL de solución fijadora GBX y mezclar bien.
3. Llevar a un volumen final de 400 mL con agua destilada y mezclar perfectamente (113 mL de agua).

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

Materiales:

Tubos de ensaye 13X100

Micropuntas de 100 μ L

Micropipetas de 10-100 μ L

Pinzas

Recipientes de plástico

Papel adherente transparente

Equipo:

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

Fuente de poder (Ec-Apparatus Corporation, EC500)

Método:

1. Correr una SDS-PAGE 12 % con una solución de extracto proteico de *G. lamblia* en geles preparativos.

2. Electrotransferirlo a membranas de nitrocelulosa (NC) en condiciones semisecas.

3. Colocar el gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulosa y dos pads (BIORAD) en solución de transferencia 1X, pH 8.3 por 5 a 15 minutos.
4. Organizar de la siguiente manera los pads: pad, membrana de NC, gel de poliacrilamida y pad. Eliminar en cada paso las burbujas que se forman por la solución reguladora pasando un tubo limpio sobre la capa.
5. Electrotransferir en un sistema semi seco (Modelo No. Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell, No. de serie 221BR 51543, 50W, 25 VDC) por 1 hora 15 minutos a 15 V, y amperaje recomendable no más de 0.1 A. (para geles de 1.5 mm).
6. Almacenar la membrana de NC a -20 °C hasta su uso.
7. Teñir el gel transferido con azul de Comassie para confirmar la adecuada transferencia del antígeno.

Inmunodetección:

1. Bloquear las membranas de NC electrotransferidas con PBS 1X-ABS 1 %-leche 5 % por 1 hora a temperatura ambiente.
2. Enjuagar la membrana con PBS 1X para quitar el exceso de solución bloqueadora.
3. Adicionar el primer anticuerpo a una concentración de 1 µg/mL (AcMo 5G8.B5 y Ac Control de Isotipo aBDC.2, IgG2b) con PBS-ABS 0.1 %.
4. Incubar en agitación por 1 hora a temperatura ambiente.
5. Realizar 5 lavados de 5 minutos con PBS 1X, pH 7.2
6. Adicionar el segundo anticuerpo (cabra anti-ratón α -IgG peroxidasa conjugada, SIGMA) 1:7500 con PBS-ABS 0.1 %.
7. Incubar en agitación por 1 hora a temperatura ambiente.
8. Realizar 5 lavados de 5 minutos con PBS 1X, pH 7.2

9. Colocar las tiras de membrana en papel transparente y adicionar 100 μL de la solución quimioluminiscente: una parte de luminol más una parte de H_2O_2 . Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.

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

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

- Exponer la película 10 segundos en la solución reveladora.

-Enjuagar en agua por 10 segundos.

-Exponer la película 10 segundos en la solución fijadora.

-Enjuagar en agua por 10 segundos y deje secar.

ANEXO 6

Tinción Superficial de Trofozoítos de *G. lamblia*

Soluciones:

PBS 1X, pH 7.2 frío.

DMEM-NaN3 0.05 %

Paraformaldehído

Procedimiento:

1. Lavar (2 veces) con PBS frío.
2. Incubar a 4 °C por 1 hora con el AcMo 5G8.B5 (1 µg/mL) o con el control de isotipo aBDC.2 (IgG2b, 1 µg/mL).
3. Lavar 2 veces con PBS frío.
4. Incubar los trofozoítos por 1 hora a 4 °C con el anticuerpo anti-ratón IgG de cabra conjugado con FITC (diluido a 1:200 con 0.05 % de NaN3-DMEM).
5. Lavar 2 veces con PBS frío.
6. Analizar la expresión de la proteína 5G8 por medio de un citómetro de flujo Becton Dickinson (Canto II FACS, CA, USA), o analizar la expresión de la proteína 5G8 por microscopía confocal.

ANEXO 7

Inducción de Giardiasis en el Modelo Murino

Reactivos

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

NaH₂PO₄.....1.9 g

Na₂HPO₄.... 12 g

NaCl..... 85 g

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

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

Método

1. Someter a los ratones a infectar a 6 o 9 horas de ayuno, con el fin de favorecer la infección.
2. Mantener el cultivo de trofozoítos de *G. lamblia* por 20 minutos en agua-hielo para liberar los trofozoítos adheridos a la pared del tubo.
3. Lavar los trofozoítos 3 veces en solución PBS 1X, pH 7.2, usando centrífuga (Thermo IEC Marathon 3000R, Fisher Scientific) a 800 g por 5 minutos a 4 °C.

4. Para su cuantificación en el hemacitómetro (cámara Neubauer) se toma una alícuota de estos trofozoítos y se hace una dilución 1:20 con PBS 1X y una posterior dilución 1:2 con azul de tripano.
5. Después del último lavado resuspender la pastilla de trofozoítos en PBS 1X y ajustar a 1×10^6 trofozoítos en 200 μL de PBS 1X.
6. Con ayuda de una jeringa para alimentación forzada, se inoculan por vía oral 200 μL de la suspensión de trofozoítos a temperatura ambiente.

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

ANEXO 8

Aislamiento y Purificación de Anticuerpos Monoclonales

Material:

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

Procedimiento:

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

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

ANEXO 9

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

Método:

1. Preparar 500 mL de solución reguladora de acoplamiento.

0.1 M NaHCO₃.....4.2 g

0.5 M NaCl.....14.61 g

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

NOTA: El tubo debe estar sellado con parafilm.

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

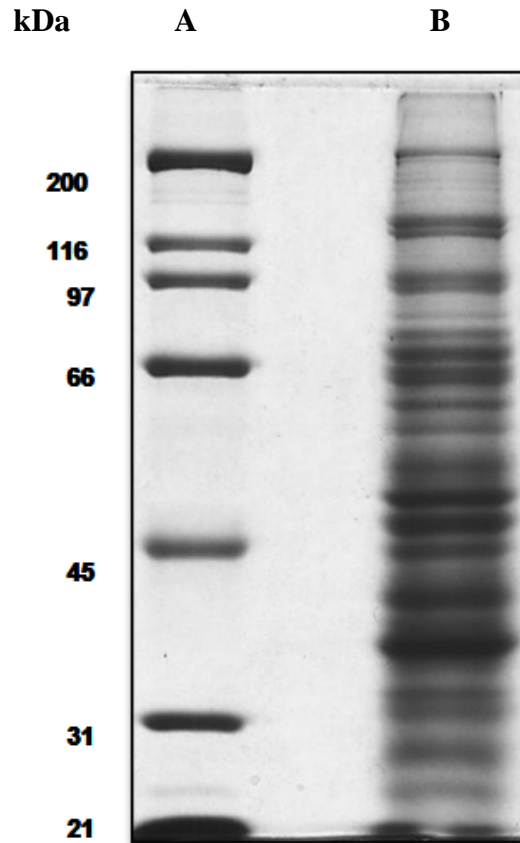
ANEXO 10

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

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

ANEXO 11

Obtención de proteínas solubles de trofozoítos de *G. lamblia*



Patrón electroforético del extracto de proteínas de *G. lamblia* GS/M-83-H7 5G8 (+). El carril A corresponde al marcador de peso molecular y el carril B al extracto soluble de proteínas de *G. lamblia*.

ANEXO 12

Aminoácidos

11.1.- 28 kDa

MLNKFALVAVILQIARAACPTGTTNCKDGACNVQIGGETYCSQCYTTSEAPVDGVCTA
STDSKCTKQDTQNGTCKSCAANYFLFKGGCYQIGQSPGLICQTASNTDGICQTCKDGYF
TVSDATATQDSCVACGDENCATCTVGAEQQKCSKCKADGKMYLKKNTGSETGTCVTADEC
TAAKDYYTDDTSSEPNGKTCKACSAKVENCASCSSEGACQKCASGFVLEGSNCVKSDCST
ENCKTCTNPKAANEACTACVTGMFLTPPASA

Sequence Length: 271 aa

11.2.- 38 kDa

EGSNVCVKSDCSTENCKTCTNPKAANEACTACVTGMFLTPTGQCIDECVTISGYGTADGK
CKKCEVANCVCVCGATGACDLCADGFYGSCKCYESCKNCKGATASDCTACPAGRALIYG
DDPTKGTGEGCTTGTGKGACKACDLTIDGTYCSACDTATEYPQNGVCATPTARASSCQ
SQNVASGACNTCENGFFKMNGGCYSTSQLPGSTVCVTAPTGGTCTKSEPGYNVNSGLVT
CGVGAECTNSDSCTTCASGYVKL TSAATCTKCDAGCATCTTAASTCSTCADGYLSNSK
CIACDKSDGSIAGVKDCLSCAAPSGSTGPVLCYLVRDSASVKNKGLSSGAIAGISVAVIV
VVGGLVGFLCWWFICRGKA

Sequence Length: 379 aa

11.3.- Constructo 71 kDa (5G8)

MLNKFALVAVILQIARAACPTGTTNCKDGACNVQIGGETYCSQCYTTSEAPVDGVCT
ASTDSKCTKQDTQNGTCKSCAANYFLFKGGCYQIGQSPGLICQTASNTDGICQTCKDG
YFTVSDATATQDSCVACGDENCATCTVGAEQQKCSKCKADGKMYLKKNTGSETGTCV
TADECTAAKDYYTDDTSSEPNGKTCKACSAKVENCASCSSEGACQKCASGFVLEGSNC
VKSDCSTENCKTCTNPKAANEACTACVTGMFLTPTGQCIDECVTISGYGTADGKCKK
CEVANCVCVCGATGACDLCADGFYGSCKCYESCKNCKGATASDCTACPAGRALIYG
DDPTKGTGEGCTTGTGKGACKACDLTIDGTYCSACDTATEYPQNGVCATPTARASS
CQSQNVASGACNTCENGFFKMNGGCYSTSQLPGSTVCVTAPTGGTCTKSEPGYNVNSG
TLVTCGVGAECTNSDSCTTCASGYVKL TSAATCTKCDAGCATCTTAASTCSTCADGY
YLSNSKCIACDKSDGSIAGVKDCLSCAAPSGSTGPVLCYLVRDSASVKNKGLSSGAIAGI
SVAVIVVVGGLVGFLCWWFICRGKA

Sequence Length: 607 aa

Nucleótidos

11.4.- 28 kDa

ATGTTGAATAAATTTGCCCTTGTAGCCGTAATTCTCCAGATCGCCCGGGCCGCCTGCACG
CCAGGCACTGAAACTACTAACTGCAAGGATGGCGCATGCAACGTCCAGATTGGCGGTGAG
ACATACTGCTCGCAGTGCTACACAACAAGCGAAGCACCAGTTGATGGGGTATGCACAGCA
AGTACTGATTCTAAATGCACAAAACAGGATACCCAAAATGGCACTTGTAATCCTGCGCA
GCGAACTACTTCCTCTTTAAGGGAGGGTGCTATCAAATCGGACAATCTCCCGGTAGTTTG
ATTTGTCAAAGCAACACCGATGGAATCTGTCAAAGTTGTAAGGATGGCTACTTC
ACGGTTTTAGACGCTACTGCTACTCAGGACTCCTGTGTTGCCTGCGGGGACGAGAACTGC
GCAACGTGCACAGTAGGAGCAGAACAGCAGAAGTGCAGCAAGTGAAGGCCGACGGCAAG
ATGTACCTGAAGAAGAATACTGGTAGTGAGACAGGCACCTGCGTCACTGCCGACGAGTGC
ACAGCAGCCAAGGATTATTACACAGACGATACCAGCAGTGAACCAAATGGTAAGACGTGC
AAGGCGTGCAGCGCAAAGGTGGAGAACTGTGCTTCTGCAGCAGTGAAGGAGCCTGCCAG
AAGTGCGCCTCTGGCTTTGTATTGGAGGGATCGAACTGCGTCAAGAGCGATTGCAGTACC
GAGAACTGCAAGACGTGCACCAACCCGAAGGCAGCCAACGAGGCCTGCACAGCGTGTGTT
ACTGGCATGTTTCTCACCCACCGGCCAGTGCATAG

Sequence Length: 816 bp

11.5.- 38 kDa

GAGGGATCGAACTGCGTCAAGAGCGATTGCAGTACCGAGAACTGCAAGACGTGCACCAAC
CCGAAGGCAGCCAACGAGGCCTGCACAGCGTGTGTTACTGGCATGTTTCTCACCCGACC
GGCCAGTGCATAGACGAGTGCCTAACTATCTCCGGCTACTACGGAACAGCTGATGGCAAG
TGCAAGAAATGCGAAGTTGCTAACTGCGTCGTCTGCGGGGCAACTGGAGCGTGCATCTT
TGCGCTGACGGCTTCTACGGTTTCGAGCTGCTCTAAGTGTACGAGAGCTGCAAGAATTGC
AAAGGAGCTACTGCCAGCGACTGCACAGCGTGCCCTGCTGGGAGGGCGCTCATCTACGGA
GATGATCCCACCAAGGGCACGTGCGGAGAGGGTTGCACGACAGGCACAGGGAAAGGTGCA
TGTAAGGCATGCGATTTAACGATCGACGGGACGAAGTACTGCTCTGCCTGTGACACGGCT
ACTGAATATCCGCAGAACGGCGTGTGTGCGACGCCGACTGCACGTGCCTCCTCGTGTGAG
AGCCAAAATGTTGCTAGTGGTGCCTGCAATACTTGTGAAAATGGCTTCTTCAAGATGAAC
GGGGGCTGCTACTCCACCAGCCAGCTCCCGGGGTCGACGGTGTGCGTCACTGCGCCGACC

GGAGGAACATGCACCAAATCAGAGCCGGGCTACAATGTGAATAGCGGCACCCTTGTAACC
TGTGGTGTGGCTGCGCTGAGTGTACCAACTCTGATTCATGTACTACATGTGCATCTGGA
TATGTCAAGCTCACTAGTGCTGCCACTTGACAAAAGTGCACGCTGGGTGTGCCACGTGT
ACAACCTGCTGCCTCAACCTGCAGCACCTGCGCCGACGGGTACTACCTCTCTAACAGCAAG
TGCATCGCTGCGACAAAAGCGATGGCAGCATCGCCGGCGTCAAAGACTGCCTGAGCTGC
GCGGCTCCATCTGGCAGCACTGGCCCTGTCTCTGCTACCTCGTGAGGGACAGCGCCTCG
GTCAACAAGGGCGGCCTCAGCAGCGGGGCGATCGCGGGGATCTCCGTGCGAGTAATAGTC
GTTGTGCGGGGCTCGTTCGGCTTCTCTGCTGGTGGTTCATCTGCAGGGCAAGGCGTGA

Sequence Length: 1140 bp

11.6.- Constructo 71 kDa (5G8)

ATGTTGAATAAATTTGCCCTTGTAGCCGTAATTCTCCAGATCGCCCGGGCCGCCTGCACG
CCAGGCACTGAACTACTAAGTGAAGGATGGCGCATGCAACGTCCAGATTGGCGGTGAG
ACATACTGCTCGCAGTGCTACACAACAAGCGAAGCACCAGTTGATGGGGTATGCACAGCA
AGTACTGATTCTAAATGCACAAAACAGGATACCCAAAATGGCACTTGTAAATCCTGCGCA
GCGAACTACTTCTCTTTAAGGGAGGGTGTATCAAATCGGACAATCTCCCAGTAGTTTG
ATTTGTCAAAGCAACACCGATGGAATCTGTCAAACCTGTAAGGATGGCTACTTC
ACGGTTTTAGACGCTACTGCTACTCAGGACTCCTGTGTTGCCTGCGGGGACGAGAAGTGC
GCAACGTGCACAGTAGGAGCAGAACAGCAGAAGTGCAGCAAGTGAAGGCCGACGGCAAG
ATGTACCTGAAGAAGAATACTGGTAGTGAGACAGGCACCTGCGTCACTGCCGACGAGTGC
ACAGCAGCCAAGGATTATTACACAGACGATACCAGCAGTGAACCAAATGGTAAGACGTGC
AAGGCGTGCAGCGCAAAGGTGGAGAAGTGTGCTTCTGCAGCAGTGAAGGAGCCTGCCAG
AAGTGCGCCTCTGGCTTTGTATTGGAGGGATCGAACTGCGTCAAGAGCGATTGCAGTACC
GAGAAGTGAAGACGTGCACCAACCCGAAGGCAGCCAACGAGGCCTGCACAGCGTGTGTT
ACTGGCATGTTTCTCACCCCGACCGCCAGTGCATAGACGAGTGCCTAACTATCTCCGGC
TACTACGGAACAGCTGATGGCAAGTGAAGAAATGCGAAGTTGCTAACTGCGTCGTCTGC
GGGGCAACTGGAGCGTGCATCTTTGCGCTGACGGCTTCTACGGTTCGAGCTGCTCTAAG
TGCTACGAGAGCTGCAAGAATTGCAAAGGAGCTACTGCCAGCGACTGCACAGCGTGCCT
GCTGGGAGGGCGCTCATCTACGGAGATGATCCCACCAAGGGCACGTGCGGAGAGGGTTGC
ACGACAGGCACAGGGAAAGGTGCATGTAAGGCATGCGATTTAACGATCGACGGGACGAAG
TACTGCTCTGCCTGTGACACGGCTACTGAATATCCGCAGAACGGCGTGTGTGCGACGCCG
ACTGCACGTGCCTCCTCGTGTGAGAGCCAAAATGTTGCTAGTGGTGCCTGCAATACTTGT
GAAAATGGCTTCTTCAAGATGAACGGGGGCTGCTACTCCACCAGCCAGCTCCCAGGGTTCG

ACGGTGTGCGTCACTGCGCCGACCGGAGGAACATGCACCAAATCAGAGCCGGGCTACAAT
GTGAATAGCGGCACCCTTGTAACCTGTGGTGTGGCTGCGCTGAGTGTACCAACTCTGAT
TCATGTACTACATGTGCATCTGGATATGTCAAGCTCACTAGTGCTGCCACTTGACAAAAG
TGGCAGCTGGGTGTGCCACGTGTACAACCTGCCTCAACCTGCAGCACCTGCGCCGAC
GGTACTACCTCTCTAACAGCAAGTGCATCGCGTGCGACAAAAGCGATGGCAGCATCGCC
GGCGTCAAAGACTGCCTGAGCTGCGCGGCTCCATCTGGCAGCACTGGCCCTGTCCTCTGC
TACCTCGTGAGGGACAGCGCCTCGGTCAACAAGGGCGGCCTCAGCAGCGGGGCGATCGCG
GGGATCTCCGTCGCAGTAATAGTCGTTGTCGGGGGCCTCGTCGGCTTCCTCTGCTGGTGG
TTCATCTGCAGGGGCAAGGCGTGA

Sequence Length: 1824 bp

ANEXO 13

Alineamientos

Blastp

12.1.- 28 kDa vs 38 kDa

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

Blastn

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

28 kDa

AHHH01000109 | organism=Giardia_Assemblage_B_isolate_GS_B | version=2013-1125
| length=40569 | SO=contig
Length=40569

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

Strand = Plus/Plus

Query 1 ATGTTGAATAAAATTTGCCCTTGTAGCCGTAATTCTCCAGATCGCCCGGGCCGCTGCACG 60

|||||

Sbjct 38377 ATGTTGAATAAAATTTGCCCTTGTAGCCGTAATTCTCCAGATCGCCCGGGCCGCTGCACG 38436

Query 61 CCAGGCACTGAAACTACTAACTGCAAGGATGGCGCATGCAACGTCCAGATTGGCGGTGAG 120

|||||

Sbjct 38437 CCAGGCACTGAAACTACTAACTGCAAGGATGGCGCATGCAACGTCCAGATTGGCGGTGAG 38496

Query 121 ACATACTGCTCGCAGTGCTACACAACAAGCGAAGCACCAGTTGATGGGGTATGCACAGCA 180

```

|||||
Sbjct 38497 ACATACTGCTCGCAGTGCTACACAACAAGCGAAGCACCAGTTGATGGGGTATGCACAGCA 38556
Query 181 AGTACTGATTCTAAATGCACAAAACAGGATACCCAAAATGGCACTTGTAATCCTGCGCA 240
|||||
Sbjct 38557 AGTACTGATTCTAAATGCACAAAACAGGATACCCAAAATGGCACTTGTAATCCTGCGCA 38616
Query 241 GCGAACTACTTCCTCTTTAAGGGAGGGTGTATCAAATCGGACAATCTCCCGGTAGTTTG 300
|||||
Sbjct 38617 GCGAACTACTTCCTCTTTAAGGGAGGGTGTATCAAATCGGACAATCTCCCGGTAGTTTG 38676
Query 301 ATTTGTCAAACCTGCAAGCAACACCGATGGAATCTGTCAAACCTGTAAGGATGGCTACTTC 360
|||||
Sbjct 38677 ATTTGTCAAACCTGCAAGCAACACCGATGGAATCTGTCAAACCTGTAAGGATGGCTACTTC 38736
Query 361 ACGGTTTCAGACGCTACTGCTACTCAGGACTCCTGTGTTGCCTGCGGGGACGAGAACTGC 420
|||||
Sbjct 38737 ACGGTTTCAGACGCTACTGCTACTCAGGACTCCTGTGTTGCCTGCGGGGACGAGAACTGC 38796
Query 421 GCAACGTGCACAGTAGGAGCAGAACAGCAGAAGTGCAGCAAGTGAAGGCCGACGGCAAG 480
|||||
Sbjct 38797 GCAACGTGCACAGTAGGAGCAGAACAGCAGAAGTGCAGCAAGTGAAGGCCGACGGCAAG 38856
Query 481 ATGTACCTGAAGAAGAATACTGGTAGTGAGACAGGCACCTGCGTCACTGCCGACGAGTGC 540
|||||
Sbjct 38857 ATGTACCTGAAGAAGAATACTGGTAGTGAGACAGGCACCTGCGTCACTGCCGACGAGTGC 38916
Query 541 ACAGCAGCCAAGGATTATTACACAGACGATACCAGCAGTGAACCAAATGGTAAGACGTGC 600
|||||
Sbjct 38917 ACAGCAGCCAAGGATTATTACACAGACGATACCAGCAGTGAACCAAATGGTAAGACGTGC 38976
Query 601 AAGGCGTGCAGCGCAAAGGTGGAGAAGTGTGCTTCTGCAGCAGTGAAGGAGCCTGCCAG 660
|||||
Sbjct 38977 AAGGCGTGCAGCGCAAAGGTGGAGAAGTGTGCTTCTGCAGCAGTGAAGGAGCCTGCCAG 39036
Query 661 AAGTGCGCCTCTGGCTTTGTATTGGAGGGATCGAACTGCGTCAAGAGCGATTGCAGTACC 720
|||||
Sbjct 39037 AAGTGCGCCTCTGGCTTTGTATTGGAGGGATCGAACTGCGTCAAGAGCGATTGCAGTACC 39096
Query 721 GAGAACTGCAAGACGTGCACCAACCCGAAGGCAGCCAACGAGGCCTGCACAGCGTGTGTT 780
|||||
Sbjct 39097 GAGAACTGCAAGACGTGCACCAACCCGAAGGCAGCCAACGAGGCCTGCACAGCGTGTGTT 39156
Query 781 ACTGGCATGTTTCTCACCCACCGCCAGTGCATAG 816
|||||
Sbjct 39157 ACTGGCATGTTTCTCACCCACCGCCAGTGCATAG 39192

```

38 kDa

> AHHH01000398 | organism=Giardia_Assemblage_B_isolate_GS_B | version=2013-1125

| length=3083 | SO=contig
Length=3083

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

Strand = Plus/Plus

```
Query 1  GAGGGATCGAACTGCGTCAAGAGCGATTGCAGTACCGAGAAGTCAAGACGTGCACCAAC 60
|||||
Sbjct 2  GAGGGATCGAACTGCGTCAAGAGCGATTGCAGTACCGAGAAGTCAAGACGTGCACCAAC 61
Query 61  CCGAAGGCAGCCAACGAGGCCTGCACAGCGTGTGTTACTGGCATGTTTCTCACCCCGACC 120
|||||
Sbjct 62  CCGAAGGCAGCCAACGAGGCCTGCACAGCGTGTGTTACTGGCATGTTTCTCACCCCGACC 121
Query 121 GGCCAGTGCATAGACGAGTGCCTAACTATCTCCGGCTACTACGGAACAGCTGATGGCAAG 180
|||||
Sbjct 122 GGCCAGTGCATAGACGAGTGCCTAACTATCTCCGGCTACTACGGAACAGCTGATGGCAAG 181
Query 181 TGCAAGAAATGCGAAGTTGCTAACTGCGTTCGTCTGCGGGGCAACTGGAGCGTGCATCTT 240
|||||
Sbjct 182 TGCAAGAAATGCGAAGTTGCTAACTGCGTTCGTCTGCGGGGCAACTGGAGCGTGCATCTT 241
Query 241 TGCCTGACGGCTTCTACGGTTCGAGCTGCTCTAAGTGTACGAGAGCTGCAAGAATTGC 300
|||||
Sbjct 242 TGCCTGACGGCTTCTACGGTTCGAGCTGCTCTAAGTGTACGAGAGCTGCAAGAATTGC 301
Query 301 AAAGGAGCTACTGCCAGCGACTGCACAGCGTCCCTGCTGGGAGGGCGCTCATCTACGGA 360
|||||
Sbjct 302 AAAGGAGCTACTGCCAGCGACTGCACAGCGTCCCTGCTGGGAGGGCGCTCATCTACGGA 361
Query 361 GATGATCCCACCAAGGGCACGTGCGGAGAGGGTTGCACGACAGGCACAGGAAAGGTGCA 420
|||||
Sbjct 362 GATGATCCCACCAAGGGCACGTGCGGAGAGGGTTGCACGACAGGCACAGGAAAGGTGCA 421
Query 421 TGTAAGGCATGCGATTTAACGATCGACGGGACGAAGTACTGCTCTGCCTGTGACACGGCT 480
|||||
Sbjct 422 TGTAAGGCATGCGATTTAACGATCGACGGGACGAAGTACTGCTCTGCCTGTGACACGGCT 481
Query 481 ACTGAATATCCGCAGAACGGCGTGTGTGCGACGCCGACTGCACGTGCCTCCTCGTGTGAG 540
|||||
Sbjct 482 ACTGAATATCCGCAGAACGGCGTGTGTGCGACGCCGACTGCACGTGCCTCCTCGTGTGAG 541
Query 541 AGCCAAAATGTTGCTAGTGGTGCCTGCAATACTTGTGAAAATGGCTTCTTCAAGATGAAC 600
|||||
Sbjct 542 AGCCAAAATGTTGCTAGTGGTGCCTGCAATACTTGTGAAAATGGCTTCTTCAAGATGAAC 601
Query 601 GGGGGCTGCTACTCCACCAGCCAGCTCCCGGGTTCGACGGTGTGCGTCACTGCGCCGACC 660
|||||
```

```

Sbjct 602 GGGGGCTGCTACTCCACCAGCCAGCTCCCGGGGTCGACGGTGTGCGTCACTGCGCCGACC 661
Query 661 GGAGGAACATGCACCAAATCAGAGCCGGGCTACAATGTGAATAGCGGCACCCTTGTAACC 720
|||||
Sbjct 662 GGAGGAACATGCACCAAATCAGAGCCGGGCTACAATGTGAATAGCGGCACCCTTGTAACC 721
Query 721 TGTGGTGTGGCTGCGCTGAGTGTACCAACTCTGATTCATGTACTACATGTGCATCTGGA 780
|||||
Sbjct 722 TGTGGTGTGGCTGCGCTGAGTGTACCAACTCTGATTCATGTACTACATGTGCATCTGGA 781
Query 781 TATGTCAAGCTCACTAGTGTGCCACTTGACAAAAGTGCACGCTGGGTGTGCCACGTGT 840
|||||
Sbjct 782 TATGTCAAGCTCACTAGTGTGCCACTTGACAAAAGTGCACGCTGGGTGTGCCACGTGT 841
Query 841 ACAACTGCTGCCTCAACCTGCAGCACCTGCGCCGACGGGTACTACCTCTCTAACAGCAAG 900
|||||
Sbjct 842 ACAACTGCTGCCTCAACCTGCAGCACCTGCGCCGACGGGTACTACCTCTCTAACAGCAAG 901
Query 901 TGCATCGCGTGCACAAAAGCGATGGCAGCATCGCCGGCGTCAAAGACTGCCTGAGCTGC 960
|||||
Sbjct 902 TGCATCGCGTGCACAAAAGCGATGGCAGCATCGCCGGCGTCAAAGACTGCCTGAGCTGC 961
Query 961 GCGGCTCCATCTGGCAGCACTGGCCCTGTCTCTGCTACCTCGTGAGGGACAGCGCCTCG 1020
|||||
Sbjct 962 GCGGCTCCATCTGGCAGCACTGGCCCTGTCTCTGCTACCTCGTGAGGGACAGCGCCTCG 1021
Query 1021 GTCAACAAGGGCGGCCTCAGCAGCGGGGCGATCGCGGGGATCTCCGTCGCAGTAATAGTC 1080
|||||
Sbjct 1022 GTCAACAAGGGCGGCCTCAGCAGCGGGGCGATCGCGGGGATCTCCGTCGCAGTAATAGTC 1081
Query 1081 GTTGTGCGGGGCTCGTCGGCTTCCTCTGCTGGTGGTTCATCTGCAGGGGCAAGGCGTGA 1140
|||||
Sbjct 1082 GTTGTGCGGGGCTCGTCGGCTTCCTCTGCTGGTGGTTCATCTGCAGGGGCAAGGCGTGA 1141

```

```

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

```

```

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

```

```

Strand = Plus/Plus

```

```

Query 1 GAGGGATCGAACTGCGTCAAGAGCGATTGCAGTACCGAGAACTGCAAGACGTGCACCAAC 60
|||||

```


Sbjct 39061 GAGGGATCGAACTGCGTCAAGAGCGATTGCAGTACCGAGAAGTCAAGACGTGCACCAAC 39120
 Query 61 CCGAAGGCAGCCAACGAGGCCTGCACAGCGTGTGTACTGGCATGTTTCTCACCCCGACC 120
 |||
 Sbjct 39121 CCGAAGGCAGCCAACGAGGCCTGCACAGCGTGTGTACTGGCATGTTTCTCACCCC-ACC 39179
 Query 121 GGCCAGTGCATAGACGAGTGCCTAACTATCTCCGGCTACTACGGAACAGCTGATGGCAAG 180
 |||
 Sbjct 39180 GGCCAGTGCATAGACGAGTGCCTAACTATCTCCGGCTACTACGGAACAGCTGATGGCAAG 39239
 Query 181 TGCAAGAAATGCGAAGTTGCTAACTGCGTCGTCTGCGGGGCAACTGGAGCGTGCGATCTT 240
 |||
 Sbjct 39240 TGCAAGAAATGCGAAGTTGCTAACTGCGTCGTCTGCGGGGCAACTGGAGCGTGCGACCTT 39299
 Query 241 TGCCTGACGGCTTCTACGGTTCGAGCTGCTCTAAGTGTCTACGAGAGCTGCAAGAATTGC 300
 |||
 Sbjct 39300 TGCCTGACGGTTCCTCGGTGAGAACTGCTCTAAGTCCACGAGAGCTGCAAGAGTTGT 39359
 Query 301 AAAGGAGCTACTGCCAGCGACTGCACAGCGTGCCCTGCTGGGAGGGCGCTCATCTACGGA 360
 |||
 Sbjct 39360 AGCGGGGCCACTGCAGAGGACTGCACAGCGTGCCCGCCGGGAGGGCGCTCATCTACGGA 39419
 Query 361 GATGATCCCACCAAGGGCACGTGCGGAGAGGGTTGCACGACAGGCACAGGAAAGGTGCA 420
 |||
 Sbjct 39420 GATGATCCCACCAAGGGCACGTGCGGAGAGGGCTGCACGACAGGCACAGGAAAGGTGCA 39479
 Query 421 TGTAAGGCATGCGATTTAACGATCGACGGGACGAAGTACTGCTCTGCCTGTGACACGGCT 480
 |||
 Sbjct 39480 TGTAAGGCATGCGATTTAACGATCGACGGGACGAAGTACTGCTCTGCCTGTGACACGGCT 39539
 Query 481 ACTGAATATCCGCAGAACGGCGTGTGTGCGACGCCGACTGCACGTGCCTCCTCGTGTGAC 540
 |||
 Sbjct 39540 ACTGAATATCCGCAGAACGGCGTGTGTGCGACGCCGACTGCACGTGCCTCCTCGTGTGAC 39599
 Query 541 AGCCAAAATGTTGCTAGTGGTGCCTGCAATACTTGTGAAAACGGCTTCTTCAAGATGAAC 600
 |||
 Sbjct 39600 AGCCAAAATGTTGCTAGTGGTGCCTGCAATACTTGTGAAAACGGCTTCTTCAAGATGAAC 39659
 Query 601 GGGGGCTGCTACTCCACCAGCCAGCTCCCGGGGTCGACGGTGTGCGTCACTGCGCCGACC 660
 |||
 Sbjct 39660 GGGGGCTGCTACTCCACCAGCCAGCTCCCGGGGTCGACGGTGTGCGTCACTGCGCCGACC 39719
 Query 661 GGAGGAACATGCACCAAATCAGAGCCGGGCTACAATGTGAATAGCGGCACCCCTTGTAAAC 720
 |||
 Sbjct 39720 GGAGGAACATGCACCAAATCAGAGCCGGGCTACAATGTGAATAGCGGCACCCCTTGTAAAC 39779
 Query 721 TGTGGTGTGGCTGCGCTGAGTGTACCAACTCTGATTCATGTACTACATGTGCATCTGGA 780
 |||
 Sbjct 39780 TGTGGTGTGGCTGCGCTGAGTGTACCAACTCTGATTCATGTACTACATGTGCATCTGGA 39839
 Query 781 TATGTCAAGCTCACTAGTGTGCCACTTGACAAAAGTGCACGCTGGGTGTGCCACGTGT 840
 |||
 Sbjct 39840 TATGTCAAGCTCACTAGTGTGCCACTTGACAAAAGTGCACGCTGGGTGTGCCACGTGT 39899

```

Query 841   ACAACTGCTGCCTCAACCTGCAGCACCTGCGCCGACGGGTACTACCTCTCTAACAGCAAG 900
|||||
Sbjct 39900 ACAACTGCTGCCTCAACCTGCAGCACCTGCGCCGACGGGTACTACCTCTCTAACAGCAAG 39959
Query 901   TGCATCGCGTGCACAAAAGCGATGGCAGCATCGCCGGCGTCAAAGACTGCCTGAGCTGC 960
|||||
Sbjct 39960 TGCATCGCGTGCACAAAAGCGATGGCAGCATCGCCGGCGTCAAAGACTGCCTGAGCTGC 40019
Query 961   GCGGCTCCATCTGGCAGCACTGGCCCTGTCTCTGCTACCTCGTGAGGGACAGCGCCTCG 1020
|||||
Sbjct 40020 GCGGCTCCATCTGGCAGCACTGGCCCTGTCTCTGCTACCTCGTGAGGGACAGCGCCTCG 40079
Query 1021  GTCAACAAGGGCGGCTCAGCAGCGGGGCGATCGCGGGGATCTCCGTGCGCAGTAATAGTC 1080
|||||
Sbjct 40080 GTCAACAAGGGCGGCTCAGCAGCGGGGCGATCGCGGGGATCTCCGTTGCCGCGGTTGTG 40139
Query 1081  GTTGTGCGGGGCGCTCGTCGGCTTCCTCTGCTGGTGGTTCATCTGCAGGGGCAAGGCGTGA 1140
|||
Sbjct 40140 GTAGTTGGAGGACTAGTTGGATTCCCTCTGCTGGTGGTTCGCTGCGCGGAAAGGCGTGA 40199

```

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

```

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

```

```

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

```

```

Strand = Plus/Plus

```

```

Query 1     ATGTTGAATAAAATTTGCCCTTGTTAGCCGTAATTCTCCAGATCGCCCGGGCCGCTGCACG 60
|||||
Sbjct 38377 ATGTTGAATAAAATTTGCCCTTGTTAGCCGTAATTCTCCAGATCGCCCGGGCCGCTGCACG 38436
Query 61    CCAGGCACTGAAACTACTAACTGCAAGGATGGCGCATGCAACGTCCAGATTGGCGGTGAG 120
|||||
Sbjct 38437 CCAGGCACTGAAACTACTAACTGCAAGGATGGCGCATGCAACGTCCAGATTGGCGGTGAG 38496
Query 121   ACATACTGCTCGCAGTGCTACACAACAAGCGAAGCACCAGTTGATGGGGTATGCACAGCA 180
|||||
Sbjct 38497 ACATACTGCTCGCAGTGCTACACAACAAGCGAAGCACCAGTTGATGGGGTATGCACAGCA 38556
Query 181   AGTACTGATTCTAAATGCACAAAACAGGATACCCAAAATGGCACTTGTAATCCTGCGCA 240
|||||
Sbjct 38557 AGTACTGATTCTAAATGCACAAAACAGGATACCCAAAATGGCACTTGTAATCCTGCGCA 38616

```

```

Query 241   GCGAACTACTTCCTCTTTAAGGGAGGGTGCTATCAAATCGGACAATCTCCCGGTAGTTTG 300
|||||
Sbjct 38617 GCGAACTACTTCCTCTTTAAGGGAGGGTGCTATCAAATCGGACAATCTCCCGGTAGTTTG 38676
Query 301   ATTTGTCAAACGCAAGCAACACCGATGGAATCTGTCAAACCTGTAAGGATGGCTACTTC 360
|||||
Sbjct 38677 ATTTGTCAAACGCAAGCAACACCGATGGAATCTGTCAAACCTGTAAGGATGGCTACTTC 38736
Query 361   ACGGTTTCAGACGCTACTGCTACTCAGGACTCCTGTGTTGCCTGCGGGGACGAGAACTGC 420
|||||
Sbjct 38737 ACGGTTTCAGACGCTACTGCTACTCAGGACTCCTGTGTTGCCTGCGGGGACGAGAACTGC 38796
Query 421   GCAACGTGCACAGTAGGAGCAGAACAGCAGAAGTGCAGCAAGTGAAGGCCGACGGCAAG 480
|||||
Sbjct 38797 GCAACGTGCACAGTAGGAGCAGAACAGCAGAAGTGCAGCAAGTGAAGGCCGACGGCAAG 38856
Query 481   ATGTACCTGAAGAAGAATACTGGTAGTGAGACAGGCACCTGCGTCACTGCCGACGAGTGC 540
|||||
Sbjct 38857 ATGTACCTGAAGAAGAATACTGGTAGTGAGACAGGCACCTGCGTCACTGCCGACGAGTGC 38916
Query 541   ACAGCAGCCAAGGATTATTACACAGACGATACCAGCAGTGAACCAAATGGTAAGACGTGC 600
|||||
Sbjct 38917 ACAGCAGCCAAGGATTATTACACAGACGATACCAGCAGTGAACCAAATGGTAAGACGTGC 38976
Query 601   AAGGCGTGCAGCGCAAAGGTGGAGAACTGTGCTTCCTGCAGCAGTGAAGGAGCCTGCCAG 660
|||||
Sbjct 38977 AAGGCGTGCAGCGCAAAGGTGGAGAACTGTGCTTCCTGCAGCAGTGAAGGAGCCTGCCAG 39036
Query 661   AAGTGCGCCTCTGGCTTTGTATTGGAGGGATCGAACTGCGTCAAGAGCGATTGCAGTACC 720
|||||
Sbjct 39037 AAGTGCGCCTCTGGCTTTGTATTGGAGGGATCGAACTGCGTCAAGAGCGATTGCAGTACC 39096
Query 721   GAGAACTGCAAGACGTGCACCAACCCGAAGGCAGCCAACGAGGCCTGCACAGCGTGTGTT 780
|||||
Sbjct 39097 GAGAACTGCAAGACGTGCACCAACCCGAAGGCAGCCAACGAGGCCTGCACAGCGTGTGTT 39156
Query 781   ACTGGCATGTTTCTCACCCACCGGCCAGTGCATAG 816
|||||
Sbjct 39157 ACTGGCATGTTTCTCACCCACCGGCCAGTGCATAG 39192

```

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

```

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

```

```

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

```

Strand = Plus/Plus

```
Query 1      GAGGGATCGAACTGCGTCAAGAGCGATTGCAGTACCGAGAAGTGAAGACGTGCACCAAC 60
|||||
Sbjct 39061  GAGGGATCGAACTGCGTCAAGAGCGATTGCAGTACCGAGAAGTGAAGACGTGCACCAAC 39120
Query 61     CCGAAGGCAGCCAACGAGGCCTGCACAGCGTGTGTACTGGCATGTTTCTCACCCCGACC 120
|||||
Sbjct 39121  CCGAAGGCAGCCAACGAGGCCTGCACAGCGTGTGTACTGGCATGTTTCTCACCCC-ACC 39179
Query 121    GGCCAGTGCATAGACGAGTGCGTAACTATCTCCGGCTACTACGGAACAGCTGATGGCAAG 180
|||||
Sbjct 39180  GGCCAGTGCATAGACGAGTGCGTAACTATCTCCGGCTACTACGGAACAGCTGATGGCAAG 39239
Query 181    TGCAAGAAATGCGAAGTTGCTAACTGCGTCGTCTGCGGGGCAACTGGAGCGTGCATCTT 240
|||||
Sbjct 39240  TGCAAGAAATGCGAAGTTGCTAACTGCGTCGTCTGCGGGGCAACTGGAGCGTGCACCTT 39299
Query 241    TCGCGTGACGGCTTCTACGGTTCGAGCTGCTCTAAGTGCTACGAGAGCTGCAAGAATTGC 300
||| ||||| ||| ||| || ||||| ||| ||||| |||
Sbjct 39300  TGCCTGACGGTTTCTTCGGTGAGAACTGCTCTAAGTGCCACGAGAGCTGCAAGAGTTGT 39359
Query 301    AAAGGAGCTACTGCCAGCGACTGCACAGCGTGCCCTGCTGGGAGGGCGCTCATCTACGGA 360
| || || ||||| ||||| ||| ||| ||||| |||
Sbjct 39360  AGCGGGGCCACTGCAGAGGACTGCACAGCGTGCCCGCCGGGAGGGCGCTCATCTACGGA 39419
Query 361    GATGATCCCACCAAGGGCACGTGCGGAGAGGGTTGCACGACAGGCACAGGAAAGGTGCA 420
|||||
Sbjct 39420  GATGATCCCACCAAGGGCACGTGCGGAGAGGGCTGCACGACAGGCACAGGAAAGGTGCA 39479
Query 421    TGTAAGGCATGCGATTTAACGATCGACGGGACGAAGTACTGCTCTGCCTGTGACACGGCT 480
|||||
Sbjct 39480  TGTAAGGCATGCGATTTAACGATCGACGGGACGAAGTACTGCTCTGCCTGTGACACGGCT 39539
Query 481    ACTGAATATCCGCAGAACGGCGTGTGTGCGACGCCGACTGCACGTGCCTCCTCGTGTCAG 540
|||||
Sbjct 39540  ACTGAATATCCGCAGAACGGCGTGTGTGCGACGCCGACTGCACGTGCCTCCTCGTGCCAG 39599
Query 541    AGCCAAAATGTTGCTAGTGGTGCCTGCAACTTGTGAAAATGGCTTCTTCAAGATGAAC 600
|||||
Sbjct 39600  AGCCAAAATGTTGCTAGTGGTGCCTGCAACTTGTGAAAACGGCTTCTTCAAGATGAAC 39659
Query 601    GGGGGCTGCTACTCCACCAGCCAGCTCCCGGGGTCGACGGTGTGCGTCACTGCGCCGACC 660
|||||
Sbjct 39660  GGGGGCTGCTACTCCACCAGCCAGCTCCCGGGGTCGACGGTGTGCGTCACTGCGCCGACC 39719
Query 661    GGAGGAACATGCACCAAATCAGAGCCGGGCTACAATGTGAATAGCGGCACCCTTGTAAAC 720
|||||
Sbjct 39720  GGAGGAACATGCACCAAATCAGAGCCGGGCTACAATGTGAATAGCGGCACCCTTGTAAAC 39779
Query 721    TGTGGTGTGGCTGCGCTGAGTGTACCAACTCTGATTCATGTACTACATGTGCATCTGGA 780
```


Sbjct 38497 ACATACTGCTCGCAGTGCTACACAACAAGCGAAGCACCAGTTGATGGGGTATGCACAGCA 38556
Query 181 AGTACTGATTCTAAATGCACAAAACAGGATACCCAAAATGGCACTGTAAATCCTGCGCA 240
|||||

Sbjct 38557 AGTACTGATTCTAAATGCACAAAACAGGATACCCAAAATGGCACTGTAAATCCTGCGCA 38616
Query 241 GCGAACTACTTCCTCTTTAAGGGAGGGTGCTATCAAATCGGACAATCTCCCGGTAGTTTG 300
|||||

Sbjct 38617 GCGAACTACTTCCTCTTTAAGGGAGGGTGCTATCAAATCGGACAATCTCCCGGTAGTTTG 38676
Query 301 ATTTGTCAAAGCAACACCGATGGAATCTGTCAAAGTGTAAAGGATGGCTACTTC 360
|||||

Sbjct 38677 ATTTGTCAAAGCAACACCGATGGAATCTGTCAAAGTGTAAAGGATGGCTACTTC 38736
Query 361 ACGGTTTCAGACGCTACTGCTACTCAGGACTCCTGTGTTGCCTGCGGGGACGAGAACTGC 420
|||||

Sbjct 38737 ACGGTTTCAGACGCTACTGCTACTCAGGACTCCTGTGTTGCCTGCGGGGACGAGAACTGC 38796
Query 421 GCAACGTGCACAGTAGGAGCAGAACAGCAGAAGTGCAGCAAGTGAAGGCCGACGGCAAG 480
|||||

Sbjct 38797 GCAACGTGCACAGTAGGAGCAGAACAGCAGAAGTGCAGCAAGTGAAGGCCGACGGCAAG 38856
Query 481 ATGTACCTGAAGAAGAATACTGGTAGTGAGACAGGCACCTGCGTCACTGCCGACGAGTGC 540
|||||

Sbjct 38857 ATGTACCTGAAGAAGAATACTGGTAGTGAGACAGGCACCTGCGTCACTGCCGACGAGTGC 38916
Query 541 ACAGCAGCCAAGGATTATTACACAGACGATACCAGCAGTGAACCAAATGGTAAGACGTGC 600
|||||

Sbjct 38917 ACAGCAGCCAAGGATTATTACACAGACGATACCAGCAGTGAACCAAATGGTAAGACGTGC 38976
Query 601 AAGGCGTGCAGCGCAAAGGTGGAGAACTGTGCTTCCTGCAGCAGTGAAGGAGCCTGCCAG 660
|||||

Sbjct 38977 AAGGCGTGCAGCGCAAAGGTGGAGAACTGTGCTTCCTGCAGCAGTGAAGGAGCCTGCCAG 39036
Query 661 AAGTGCCTCTGGCTTTGTATTGGAGGGATCGAACTGCGTCAAGAGCGATTGCAGTACC 720
|||||

Sbjct 39037 AAGTGCCTCTGGCTTTGTATTGGAGGGATCGAACTGCGTCAAGAGCGATTGCAGTACC 39096
Query 721 GAGAACTGCAAGACGTGCACCAACCCGAAGGCAGCCAACGAGGCCTGCACAGCGTGTGTT 780
|||||

Sbjct 39097 GAGAACTGCAAGACGTGCACCAACCCGAAGGCAGCCAACGAGGCCTGCACAGCGTGTGTT 39156
Query 781 ACTGGCATGTTTCTACCCCGACCGCCAGTGCATAGACGAGTGCCTAACTATCTCCGGC 840
|||||

Sbjct 39157 ACTGGCATGTTTCTACCCCGACCGCCAGTGCATAGACGAGTGCCTAACTATCTCCGGC 39215
Query 841 TACTACGGAACAGCTGATGGCAAGTGAAGAAATGCGAAGTTGCTAACTGCGTCTGCTGC 900
|||||

Sbjct 39216 TACTACGGAACAGCTGATGGCAAGTGAAGAAATGCGAAGTTGCTAACTGCGTCTGCTGC 39275
Query 901 GGGGCAACTGGAGCGTGCATCTTTGCGCTGACGGCTTCTACGGTTCGAGCTGCTCTAAG 960
|||||

Sbjct 39276 GGGGCAACTGGAGCGTGCATCTTTGCGCTGACGGCTTCTACGGTTCGAGCTGCTCTAAG 39335

Sbjct 39097 GAGAACTGCAAGACGTGCACCAACCCGAAGGCAGCCAACGAGGCCTGCACAGCGTGTGTT 39156
 Query 781 ACTGGCATGTTTCTCACCCCGACCGGCCAGTGCATAGACGAGTGCCTAACTATCTCCGGC 840
 |||

Sbjct 39157 ACTGGCATGTTTCTCACCCCGACCGGCCAGTGCATAGACGAGTGCCTAACTATCTCCGGC 39215
 Query 841 TACTACGGAACAGCTGATGGCAAGTGAAGAAATGCGAAGTTGCTAACTGCGTCGTCTGC 900
 |||

Sbjct 39216 TACTACGGAACAGCTGATGGCAAGTGAAGAAATGCGAAGTTGCTAACTGCGTCGTCTGC 39275
 Query 901 GGGGCAACTGGAGCGTGCATCTTTGCGCTGACGGCTTCTACGGTTCGAGCTGCTCTAAG 960
 |||

Sbjct 39276 GGGGCAACTGGAGCGTGCATCTTTGCGCTGACGGCTTCTACGGTTCGAGCTGCTCTAAG 39335
 Query 961 TGCTACGAGAGCTGCAAGAATTGCAAAGGAGCTACTGCCAGCGACTGCACAGCGTGCCCT 1020
 |||

Sbjct 39336 TGCCACGAGAGCTGCAAGAGTTGTAGCGGGGCCACTGCAGAGGACTGCACAGCGTGCCCC 39395
 Query 1021 GCTGGGAGGGCGCTCATCTACGGAGATGATCCACCAAGGGCACGTGCGGAGAGGGTTGC 1080

Anexo 14

Cultivo de Líneas Celulares e Hibridomas

Material:

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

Reactivos:

D-MEM (GIBCO CAS. 12100-061)

L-arginina-HCl (SIGMA A-5131)

L-asparagina anhidro (SIGMA A-4159)

NaHCO₃ (SIGMA S-5761)

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

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

HEPES (SIGMA H-3784)

Penicilina/estreptomicina (SIGMA P-4333).

2-mercaptoetanol (Merck. 4213005)

Equipo:

Báscula digital

Sistema de filtración (sterile aseptic system, Millipore corporation).

Bomba de vacío.

Pipetas serológicas.

Micropipetas.

Puntas para micropipetas.

Procedimiento:

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

Para preparar 1 litro de DMEM:

DMEM.....13.37 g

L-arginina HCl.....0.116 g

L-asparagina anhidra.....0.036 g

NaHCO₃.....2.0 g

(a) Piruvato de sodio.....10.0 mL

(b) L-glutamina.....7.5 mL

(c)Penicilina/estreptomicina (1000x).....1.0 mL

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

3.- Una vez añadidos todos los reactivos; el medio se debe esterilizar por medio de filtración empleando un filtro Millipore de 0.45 μm .

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

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

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

ANEXO 15

Aislamiento de Esplenocitos Con Solución de Lisis

Solución de lisis

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

Procedimiento

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

10. Detener reacción de lisis a los 2 minutos después de agregar ACK con DMEM frío llevando a un volumen de 25 mL
11. Centrifugar a 1500 rpm (500 xg) por 7 minutos a 4 °C
12. Descartar el sobrenadante, no decantar. Utilizar una pipeta
13. Resuspender el botón celular en DMEM frío. Utilizar un volumen pequeño (1 mL aproximadamente) para desprender el botón celular y después llevar a un volumen de 25 mL
14. Filtrar por organza
15. Centrifugar a 1500 rpm (500 xg) por 7 minutos a 4 °C
16. Descartar el sobrenadante, no decantar. Utilizar una pipeta
17. Resuspender en 5 mL de D10F frío y contar células en cámara de Neubauer
18. Ajustar células a la concentración deseada para el experimento en D10F.

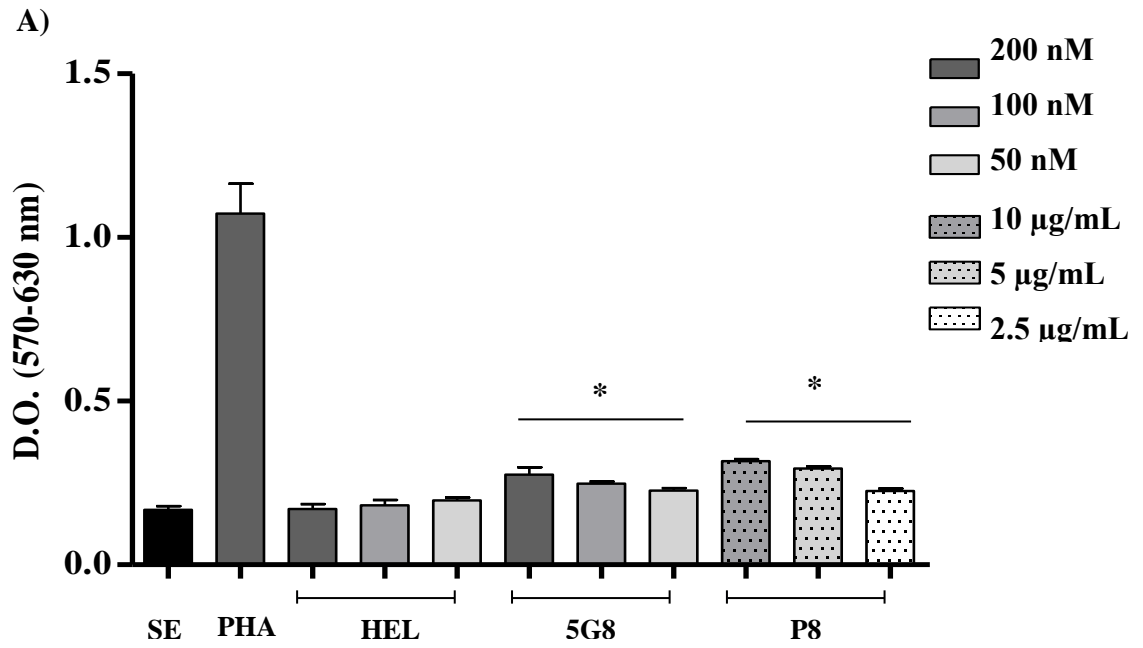
ANEXO 16

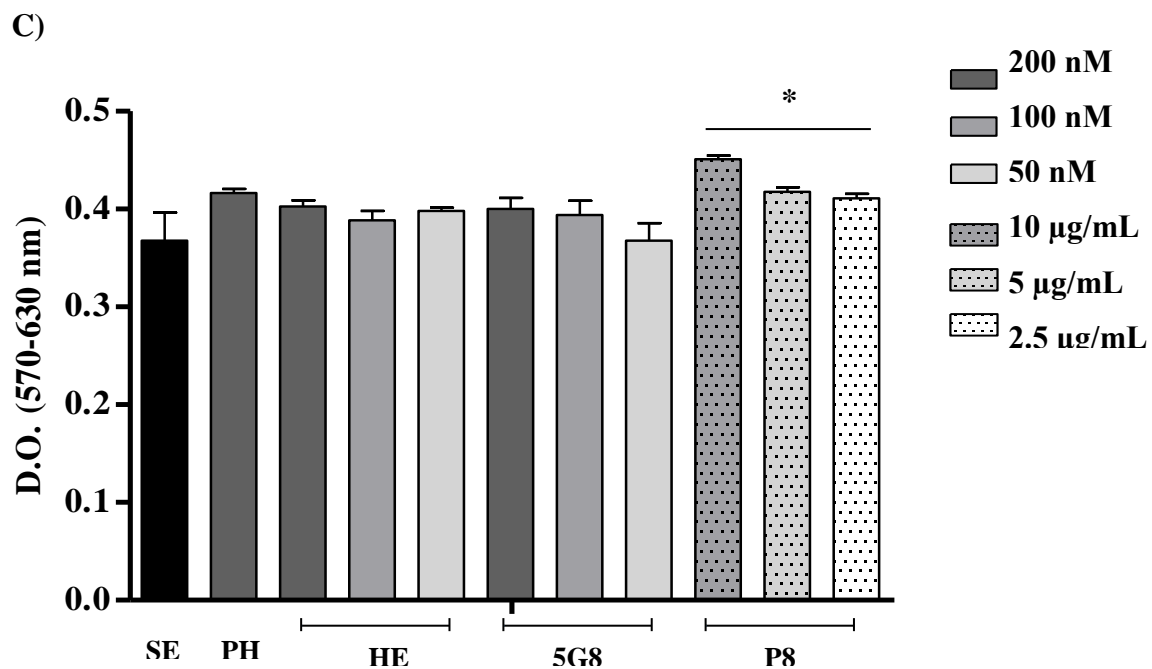
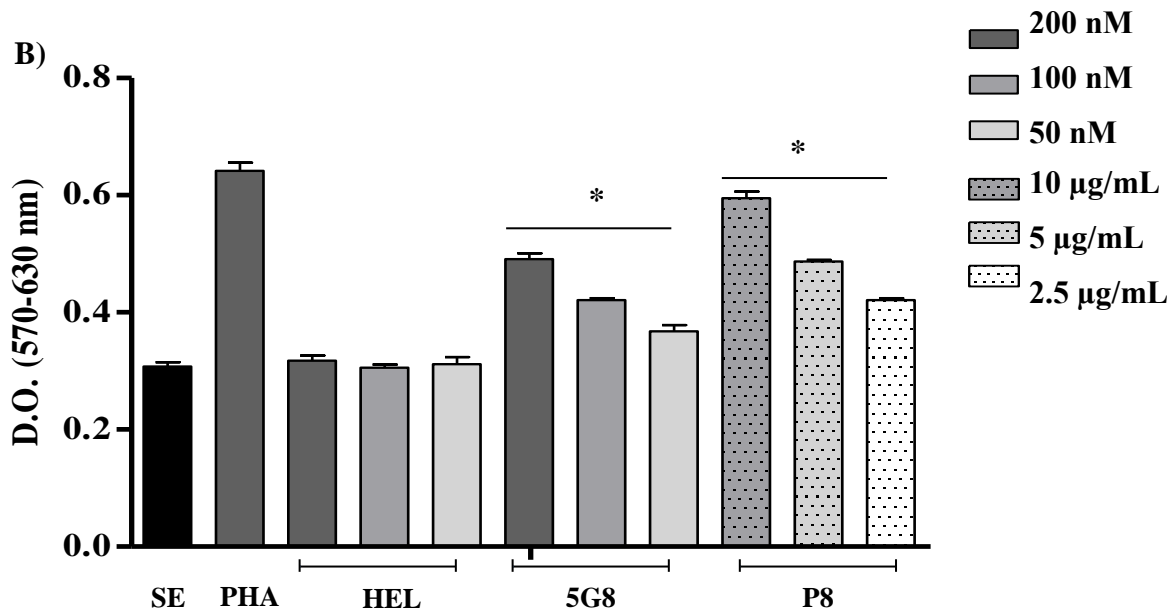
Ensayo de Reducción del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)

1. Agregar 15 μL de MTT (5 mg/mL) a cada pozo (10 μL MTT por cada 100 μL de cultivo celular en el pozo).
2. Incubar a 37 °C por 4 horas.
3. Agregar 150 μL de Isopropanol-HCl.
4. Disolver completamente los cristales de formazán.
5. Leer en lector de microplaca a 570 nm y 630 de referencia.

ANEXO 17

Análisis de Proliferación Celular



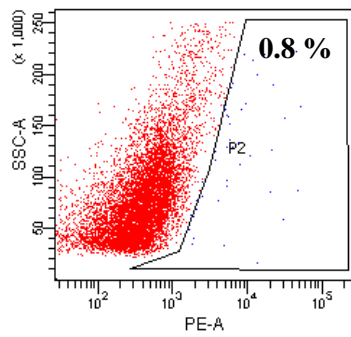


Evaluación cuantitativa por MTT de la proliferación celular a diferentes tiempos. A) 72 horas, B) 120 horas y C) 144 horas. *El asterisco indica la diferencia significativa entre el grupo tratado con la proteína 5G8 y/o el extracto proteico P8 con respecto a los grupos control (SE y HEL).

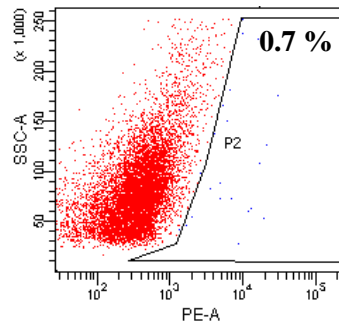
ANEXO 18

Expresión de CD69⁺ en Esplenocitos Estimulados Con la Proteína 5G8 y Extracto Antigénico de *G. lamblia* (P8)

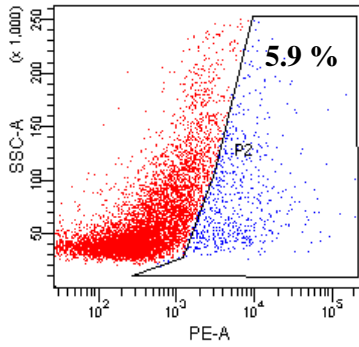
Sin Teñir



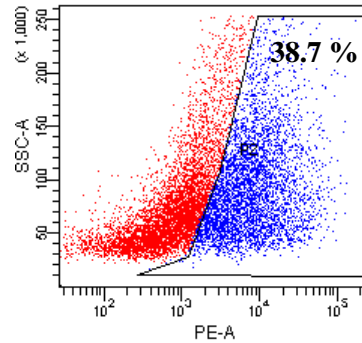
Control de Isotipo



Sin Estímulo



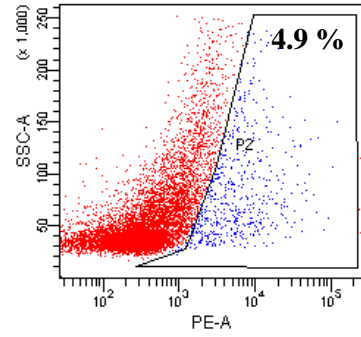
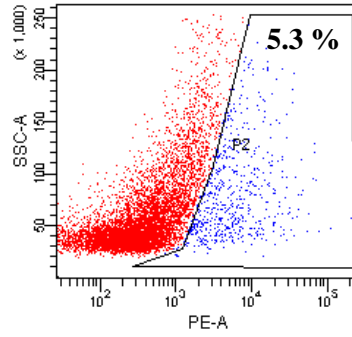
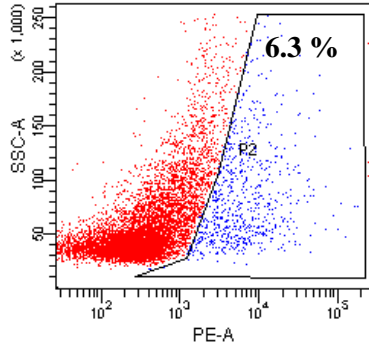
PHA (200 nM)



HEL (200 nM)

HEL (100 nM)

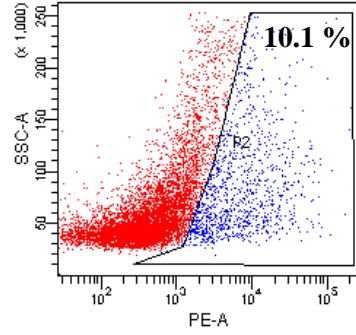
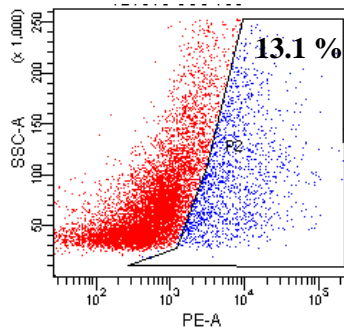
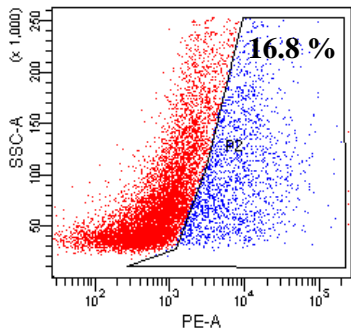
HEL (50 nM)



5G8 (200 nM)

5G8 (100 nM)

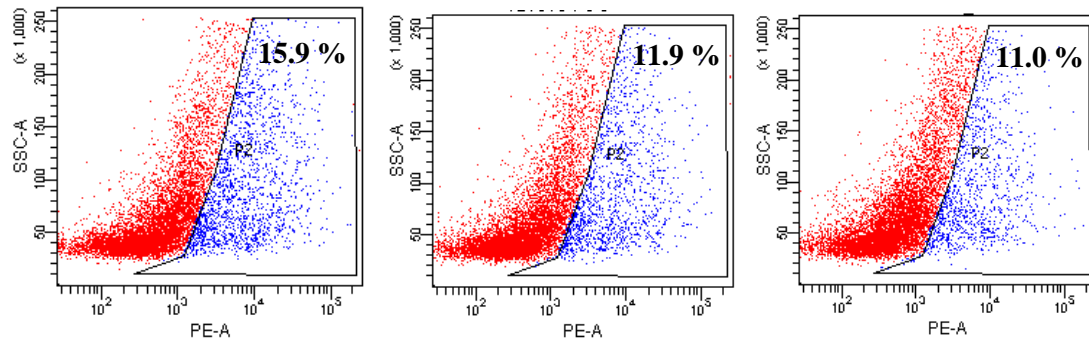
5G8 (50 nM)



P8 (10 µg/mL)

P8 (5 µg/mL)

P8 (2.5 µg/mL)



La proteína 5G8 induce la activación de esplenocitos provenientes de ratones infectados con *G. lamblia*. Evaluación de la expresión de CD69⁺ a las 72 horas.

ANEXO 19

Predicción de Epítopes Para Células T

Pos	Péptido	score
67	TKQDTQNGTCKSCAA	26
95	QSPGSLICQTASNTD	22
186	YYTDDTSSEPNGKTC	20
114	TCKDGYFTVSDATAT	18
121	TVSDATATQDSCVAC	18
182	AAKDYYTDDTSSEPN	18
308	LCADGFYGSSECSKCY	18
370	KACDLTIDGTKYCSA	18
533	DKSDGSIAGVKDCLS	18
541	GVKDCLSCAAPSGST	18
28	CKDGACNVQIGGETY	16
87	KGGCYQIGQSPGSLI	16
127	ATQDSCVACGDENCA	16
130	DSCVACGDENCATCT	16
136	GDENCATCTVGAEQQ	16
142	TCTVGAEQQKCSKCK	16
171	TGTCVTADECTAAKD	16
200	CKACSAKVENCASCS	16
212	SCSSEGACQKCASGF	16
266	TPTGQCIDECVTISG	16
270	QCIDECVTISGYGT	16
293	EVANCVVCGATGACD	16

391	YPQNGVCATPTARAS	16
402	ARASSCQSQNVASGA	16
422	NGFFKMNGGCYSTSQ	16
475	ECTNSDSCTTCASGY	16
564	RDSASVKNKGGLSSGA	16
4	KFALVAVILQIARAA	14
5	FALVAVILQIARAAC	14
6	ALVAVILQIARA ACT	14
21	PGTETTCKDGACNV	14
31	GACNVQIGGETYCSQ	14
70	DTQNGTCKSCAANYF	14
94	GQSPGSLICQTASNT	14
105	ASNTDGICQTCKDGY	14
116	KDGYFTVSDATATQD	14
193	SEPNGKTCKACSAKV	14
201	KACSAKVENCASCSS	14
203	CSAKVENCASCSEGG	14
221	KCASGFVLEGSNCVK	14
228	LEGSNCVKSDCSTEN	14
247	TNPKAANEACTACVT	14
304	GACDLCADGFYGS SC	14
346	IYGDDPTKGTCEGEC	14
405	SSCQSQNVASGACNT	14
484	TCASGYVKL TSAATC	14
499	TKCDAGCATCTTAAS	14
520	DGY YLSNSKCIACDK	14
524	LSNSKCIACDKSDGS	14

536	DGSIAGVKDCLSCAA	14
556	GPVLCYLVRDSASVN	14
557	PVLCYLVRDSASVNK	14
567	ASVNKGGLSSGAIAG	14

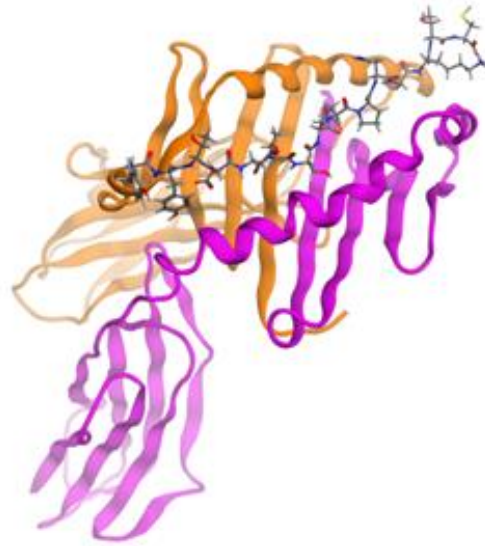
ANEXO 20

Modelado Molecular de la Interacción Entre Los Epítopes Immunodominantes de Células T Con Moléculas Del MHC-II

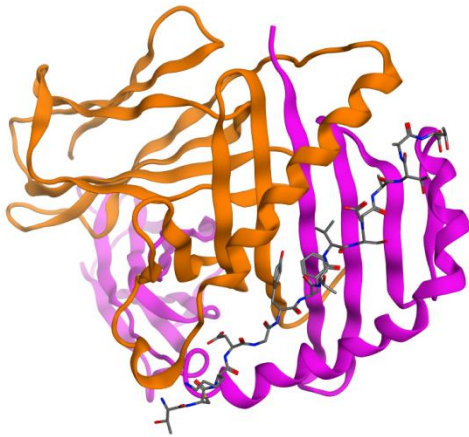
Péptido 67



Péptido 186



Péptido 114



**ARTÍCULO ENVIADO PARA PUBLICACIÓN A LA REVISTA
*PARASITOLOGY INTERNATIONAL***

**“Isolation and partial characterization of an immunogenic antigen of *Giardia
lamblia*”**