

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 humoral protectora
inducida por la proteína 5G8 de *Giardia lamblia*



TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta

Thania María Garzón Lizárraga

Hermosillo, Sonora

Enero de 2019

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

“ “ Science means constantly walking a tightrope between blind faith and curiosity; between expertise and creativity; between bias and openness; between experience and epiphany; between ambition and passion; and between arrogance and conviction - in short, between an old today and a new tomorrow ” ”

“ “ Ciencia significa caminar constantemente por la cuerda floja entre la fe ciega y la curiosidad; entre la experiencia y la creatividad; entre el sesgo y la apertura; entre la experiencia y la epifanía; entre la ambición y la pasión; y entre la arrogancia y la convicción, en resumen, entre un viejo hoy y un nuevo mañana ” ”

Heinrich Rohrer

(1933-2013 Suiza)

Físico y ganador del Premio Nobel de Física

DEDICATORIAS

El presente trabajo se lo dedico primeramente a Dios, gracias por brindarme amor, salud y bondad durante todos los caminos que he tenido que vivir, y darme la entereza para poder crecer de diversas maneras.

A mi madre, que siempre ha estado conmigo, lado a lado. A pesar de las circunstancias siempre me has alentado a ser una mejor persona, a seguir adelante y nunca darme por vencida. Me has enseñado a ser una mujer de bien, como lo eres tú, la mujer más fuerte y dedicada que conozco, te amo muchísimo. En esta parte también le agradezco a Dios, por que mejor madre no pudo haberme dado, sin ella, no sería la mujer que soy. Gracias por cada consejo brindado. Espero que Dios te de salud para que me sigas guiando en el camino de la vida.

A mi novio, Daniel, haz formado parte de mi vida mucho tiempo, hemos pasado por demasiadas cosas, tal vez muchos no superan los cambios y cosas nuevas que te va poniendo la vida, sin embargo tu y yo hemos aprendido a continuar cada etapa de la vida siempre juntos. Gracias por el amor y apoyo brindado, por alentarme a seguir mis sueños y estar ahí cada momento de mi vida, te amo.

AGRADECIMIENTOS

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

Primeramente a mi director de tesis, Dr. Carlos Velázquez. Gracias por permitirme formar parte de su equipo de investigación, desde ese momento me ha guiado siempre ayudándome a crecer profesionalmente y a tener pasión por la ciencia, un campo que sabemos que no es fácil. Gracias por su entera paciencia ante cada error cometido, por que cada regaño iba acompañado también de palabras de aliento para poder continuar. Siempre lo he dicho usted es uno de los directores más exigentes que conozco, pero el mejor, y el claro ejemplo es cada uno de los estudiantes que ha formado.

M.C Lucila Rascón, usted es una persona que se dedica cien por ciento a su trabajo, y eso lo tomamos como ejemplo. Es usted un eslabón muy importante en el equipo, que mantiene todo en balance y en orden, pero por lo principal que le agradezco es por su constante compañía, porque nunca nos deja solos y por sus consejos no solo en lo profesional si no también en lo personal.

A la gran Dra. Jael Quintero, aunque no compartimos mucho tiempo en el laboratorio, la respeto por todo el legado y trabajo que hizo posible este trabajo. Ha aportado enormemente en mi formación academica y aparte de ser un ejemplo ha seguir, también es usted un increíble ser humano, siempre tan positiva y alegre. Gracias por ser mi asesora y amiga en esta etapa.

A la Dra. Adriana Garibay por ser un apoyo en este proyecto y una excelente docente, me brindo grandes conocimientos, enseñanzas y consejos durante mi camino por el posgrado, los cuales me alentaron para ser una mejor estudiante.

M.C Boris Calderon gracias por ser parte de este comité de tesis, apoyando con su tiempo y experiencia, haciendo que este trabajo fuera posible de lograr.

Al Dr. Aldo Arvizú, le agradezco siempre su disponibilidad y tiempo que me brindó para asesorarme. Muchas gracias por aportar en mi formación académica.

M.C Judith Ortega le agradezco por su apoyo en el asesoramiento técnico y disponibilidad en el desarrollo experimental de este trabajo.

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 para tener una formación profesional y por brindarme el apoyo para realizar mi trabajo.

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

Al laboratorio de inmunología del Dr. Jesús Hernández y al laboratorio de patología experimental del Dr. Humberto Astiazáran en el Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo (CIAD) por el préstamo de equipos.

A mis queridos amigos del laboratorio, la familia que escogí: Victor, Raúl, Lulú, Isaac, Alex, David, Efraín, Gloria, Paola, Alejandra, Ramsés, María José, Melissa, Luis, Ana Patricia, Mónica, Paty, Pablo y muchos otros compañeros. Gracias por inoivables momentos alegres y de risas, así como aquellos momentos de estrés y tristeza en donde siempre hubo palabras de apoyo y de motivación para seguir.

ÍNDICE

| | Página |
|---|--------|
| LISTA DE TABLAS | x |
| LISTA DE FIGURAS | xi |
| OBJETIVOS | xiii |
| RESUMEN | Xiv |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| ANTECEDENTES | 3 |
| <i>Giardia lamblia</i> | 3 |
| Estudio Evolutivo y Clasificación de <i>Giardia lamblia</i> | 3 |
| Giardiasis: Aspectos Clínicos | 4 |
| Proteínas Inmunogénicas de <i>Giardia lamblia</i> | 6 |
| Mecanismos Inmunológicos Efectores Contra <i>G. lamblia</i> | 8 |
| Respuesta inmune innata | 9 |
| Respuesta inmune adaptativa | 10 |
| Inmunidad Activa y su Aplicación en Vacunas | 13 |
| Herramientas Bioinformáticas | 14 |
| Predicción de epítopes de células B | 14 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 16 |
| Animales de Experimentación | 16 |
| Cultivo Axénico de <i>G. lamblia</i> | 16 |
| Evaluación de la Expresión Superficial de la Proteína 5G8 en Trofozoítos de <i>G. lamblia</i> por Citometría de Flujo | 17 |
| Obtención del Extracto Proteico de <i>G. lamblia</i> | 17 |
| Separación de Proteínas de Membrana de la Cepa GS-5G8 (+) | 18 |
| Aislamiento de la Proteína 5G8 de <i>G. lamblia</i> | 19 |

| | |
|---|----|
| Eluciones de la Banda de 70 Kda de Proteínas de Membrana de la Ceba GS-5G8 (+) | 19 |
| Cromatografía de Afinidad de Las Proteínas de Membrana de la Ceba GS-5G8 (+) | 20 |
| Perfil Electroforético del Aislamiento de la Proteína 5G8 | 20 |
| ELISA Competitivo de la Banda de 70 kDa de las Proteínas de Membrana y la Proteína 5G8 de <i>G. lamblia</i> | 20 |
| Generación de Anticuerpos Policlonales Contra los Extractos Proteicos de <i>G. lamblia</i> | 21 |
| Generación de Anticuerpos Policlonales Específicos Para la Proteína 5G8 | 22 |
| Evaluación del Reconocimiento de los Anticuerpos Policlonales Contra los Lisados Totales de <i>G. lamblia</i> y la Proteína 5G8 | 22 |
| Reconocimiento De Los Anticuerpos Policlonales Evaluado Por Citometría De Flujo | 22 |
| Reconocimiento De Los Anticuerpos Policlonales Evaluado Por Western Blotting | 23 |
| Evaluación de la Capacidad Aglutinante <i>in vitro</i> de los Anticuerpos Contra la Proteína 5G8 | 24 |
| Evaluación de la Capacidad Inhibitoria <i>in vitro</i> de Anticuerpos Contra la Proteína 5G8 | 24 |
| Evaluación de la Capacidad Inmunoprotectora de la Proteína 5G8 | 25 |
| Ensayo De Protección En Ratones De La Ceba C3H/HeJ | 25 |
| Ensayo De Protección En Gerbos | 26 |
| Ensayo de Proliferación de Esplenocitos de Ratones (Ensayo de Protección) Mediante el Método de Reducción de Azul de Tetrazolio (MTT) | 26 |
| Predicción y Análisis de Homología de Epítopes Lineales de Células B | 27 |
| Análisis Estadístico | 28 |
| RESULTADOS | 29 |

| | |
|--|----|
| Aislamiento de la Proteína 5G8 Mediante el Enriquecimiento de Proteínas de Membrana de la Cepa GS-5G8 (+) | 29 |
| Análisis Comparativo del Reconocimiento del AcMo 5G8.B5 Hacia la Proteína 5G8 en la Banda-5G8 y la Proteína 5G8 | 32 |
| La Respuesta Inmune Humoral es Dirigida Principalmente Hacia la Proteína 5G8 en Ratones C3H/HeJ Inmunizados | 34 |
| Los Anticuerpos Específicos Para la Proteína 5G8 Aglutinan e Inhiben el Crecimiento de Trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i> <i>in vitro</i> | 37 |
| La Proteína 5G8 es Capaz de Inducir una Respuesta Inmune Humoral Sistémica y Local Mediante Inmunización Oral en un Modelo Murino | 37 |
| La Proteína 5G8 Fue Capaz de Estimular Esplenocitos de Ratones Infectados Con <i>G. lamblia</i> | 43 |
| Evaluación de la Carga Parasitaria de Trofozoítos de <i>G. lamblia</i> en Ratones Inmunizados Vía Oral con la Proteína 5G8 | 45 |
| La Proteína 5G8 es Capaz de Inducir una Respuesta Inmune Humoral Sistémica Vía Oral sin la Presencia de Adyuvante en un Modelo Gerbil | 45 |
| Evaluación de la Carga Parasitaria de Trofozoítos y Quistes de <i>G. lamblia</i> en Gerbos Inmunizados Vía Oral con la Proteína 5G8 | 49 |
| Los Epítopes de Células B de la Proteína 5G8 se Conservan Entre la Familia de VSPs | 51 |
| DISCUSIÓN | 56 |
| CONCLUSIONES | 63 |
| BIBLIOGRAFÍA | 64 |
| ANEXOS | 72 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | | Página |
|-------|--|--------|
| I. | Ensamblados de <i>Giardia lamblia</i> y hospederos correspondientes. | 5 |
| II. | Secuencias de los epítodos lineales de células B de la proteína 5G8 de <i>G. lamblia</i> . | 52 |
| III. | Análisis de homología de la proteína 5G8 con otras proteínas de la familia de VSPs | 54 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------|--|--------|
| 1. | Respuesta inmune implicada en la infección por <i>G. lamblia</i> . | 12 |
| 2. | El 80 % de los trofozoítos de la cepa GS-5G8 (+) expresan la proteína 5G8. | 30 |
| 3. | Aislamiento de la proteína 5G8 mediante el enriquecimiento de proteínas de membrana de la cepa GS-5G8 (+). | 31 |
| 4. | La banda-5G8 de 70 kDa está conformada en su mayoría por la proteína 5G8. | 33 |
| 5. | Los lisados de las cepas GS/M-83-H7 y GS-5G8 (+) inducen una respuesta inmune humoral diferente. | 35 |
| 6. | La proteína 5G8 es una de las proteínas principalmente reconocidas por la respuesta inmune humoral. | 36 |
| 7. | Los anticuerpos específicos para 5G8 aglutinan trofozoítos de <i>Giardia lamblia in vitro</i> . | 38 |
| 8. | Los anticuerpos específicos para 5G8 inhiben el crecimiento <i>in vitro</i> de trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i> . | 39 |
| 9. | Esquema experimental del ensayo de protección con la proteína 5G8. | 41 |
| 10. | La proteína 5G8 es capaz de inducir una respuesta inmune humoral sistémica y local mediante inmunización oral en un modelo murino. | 42 |
| 11. | La proteína 5G8 estimula la proliferación de esplenocitos de ratones infectados con <i>G. lamblia</i> a las 96 horas. | 44 |
| 12. | Recuperación de trofozoítos de <i>G. lamblia</i> en ratones inmunizados vía oral con la proteína 5G8. | 47 |

| | | |
|-----|--|----|
| 13. | La proteína 5G8 es capaz de inducir una respuesta inmune humoral sistémica mediante inmunización oral en un modelo gerbil. | 48 |
| 14. | Evaluación de la carga parasitaria de trofozoítos y quistes de <i>G. lamblia</i> en gerbos inmunizados vía oral con la proteína 5G8. | 50 |
| 15. | Ubicación de epítopes para células B en la secuencia de aminoácidos de la proteína 5G8. | 53 |
| 16. | Los epítopes de células B de la proteína 5G8 se encuentran conservados en otras VSPs. | 55 |

OBJETIVOS

General

Caracterizar la respuesta inmune humoral protectora inducida por la proteína 5G8 de *Giardia lamblia*

Objetivos Específicos

- Evaluar la respuesta inmune humoral hacia la proteína 5G8 en ratones inmunizados con lisados celulares de *Giardia lamblia*.
- Evaluar el papel protector de la proteína 5G8 de *Giardia lamblia* mediante inmunización activa en ratones de la cepa C3H/HeJ y gerbos (*Meriones unguiculatus*) infectados con *Giardia*.
- Identificar y caracterizar epítopes de linfocitos B de la proteína 5G8 mediante análisis *in silico*.

RESUMEN

Giardia es un parásito protozoario que coloniza la parte superior del intestino delgado, el cual ocasiona giardiasis alrededor del mundo. A pesar de ser un padecimiento con altas tasas de morbilidad y que alrededor del 75 % de los infectados no presentan síntomas, ocasionando que sea una parasitosis subdiagnosticada por el sector de salud, la infección no tiene una profilaxis ideal. Los tratamientos empleados contra la giardiasis presentan algunas limitantes entre ellas, efectos secundarios en los pacientes y la generación de cepas de *Giardia* resistentes. El desarrollo de nuevas alternativas en el tratamiento contra infecciones requiere comprender la interacción hospedero-parásito, tener amplio entendimiento de los mecanismos inmunológicos durante la parasitosis y caracterizar las moléculas del parásito involucradas en la activación del sistema inmune. Es por esto que el presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar la respuesta inmune humoral contra la proteína VSP 5G8 de *G. lamblia* y su posible papel protector durante la infección.

Primeramente, se aisló la proteína 5G8 mediante eluciones pasivas de la banda de 70 kDa de proteínas de membrana de la cepa GS-5G8 (+), así como también mediante cromatografía de afinidad con el anticuerpo monoclonal específico para la proteína. Un análisis comparativo demostró que la banda de 70 kDa aislada estaba conformada mayoritariamente (30-40 %) por la proteína 5G8 y que no había diferencias en el reconocimiento por el anticuerpo monoclonal en comparación con la proteína aislada mediante cromatografía de afinidad. Por lo tanto, la muestra aislada por eluciones pasivas pudo utilizarse en diversos ensayos subsecuentes.

Adicionalmente se realizaron análisis de caracterización de la respuesta inmune humoral generada por la proteína 5G8, mediante la inmunización intraperitoneal en ratones C3H/HeJ con lisados totales de cepas con diferente grado de expresión de la proteína 5G8 (GS, GS 5G8 (+) y WB), demostrando que las cepas GS y GS-5G8 (+) generan una respuesta inmune diferente, y que los anticuerpos anti-GS-5G8 (+) reconocen principalmente la proteína 5G8. También se determinó que los cultivos de trofozoítos de la cepa GS-5G8 (+) mostraron procesos de agregación celular e inhibición de su

crecimiento *in vitro* en presencia de anticuerpos monoclonal y policlonales específicos para la proteína 5G8.

Posteriormente se evaluó si la respuesta inmune inducida por la proteína 5G8 pudiera tener un papel protector durante la infección por *Giardia*. Se utilizaron dos modelos de infección, el murino y el gerbil, los cuales fueron sometidos a inmunizaciones activas con la proteína 5G8 vía oral y posteriormente infectados con trofozoítos GS-5G8 (+). En ambos modelos se generó una respuesta inmune humoral sistémica (IgG) y local (IgA) contra la proteína 5G8, en los gerbos la proteína 5G8 fue administrada sin la presencia de adyuvante, estos resultados sugieren el potencial de la VSP para poder romper los mecanismos de tolerancia oral. Los gerbos tratados con la proteína 5G8 tuvieron una disminución en la excreción de quistes, lo cual puede indicar un control de la infección. A pesar de tener una recuperación de trofozoítos mayor en el modelo gerbil, no existió diferencias estadísticamente significativas en la carga parasitaria entre los gerbos tratados con la proteína y los que recibieron tratamientos control.

Complementando el trabajo se aplicaron herramientas bioinformáticas para la identificación de epítopes lineales de células B de la proteína 5G8, se identificaron 7 secuencias a ser reconocidas por la respuesta inmune humoral, las cuales se encuentran conservadas en otras VSPs de ensamblajes (genotipos) de *G. lamblia* diferentes al B, como el A y E.

En conclusión, los datos generados en el presente trabajo sugieren que la proteína 5G8 es capaz de activar una respuesta inmune humoral tanto sistémica como local, siendo esta última un indicador de que es capaz de romper tolerancia oral, un acontecimiento que no se ha abordado en el estudio de las VSPs de *G. lamblia*. Así como el papel importante que tienen los anticuerpos anti-5G8 en los mecanismos efectores implicados en el control de la infección por *Giardia*.

INTRODUCCIÓN

Giardia lamblia es un protozoo flagelado que coloniza la parte superior del intestino delgado afectando al ser humano y a muchos otros vertebrados, causando giardiasis (Heyworth, 2016). La infección puede progresar sin presencia de algún síntoma, sin embargo, también se puede tener diversa sintomatología como dolor epigástrico, diarrea, náuseas, vómito y mala absorción de nutrientes (Adam, 2001), la severidad de los síntomas puede conducir a una rápida pérdida de líquidos y deshidratación, así como desnutrición a largo plazo.

La giardiasis es una enfermedad global, siendo una de las causas más comunes de diarrea en países industrializados, principalmente en vías de desarrollo como México. Factores socioeconómicos como la pobreza, la falta de sistemas adecuados de tratamiento de agua, y de buenas prácticas higiénicas se han identificado como factores de riesgo significativos para la parasitosis (Anuar y col., 2012).

En la mayoría de los casos, el uso de albendazol, tinidazol y metronidazol como tratamiento para la giardiasis puede ser eficaz, sin embargo, se han reportado resistencia a fármacos, dosis insuficientes y efectos secundarios (Leitsch, 2015). Los avances en las técnicas moleculares han permitido que el diseño de vacunas haya evolucionado en los últimos años. Las estrategias para la generación de vacunas requieren el entendimiento biológico y estructural del agente infeccioso, así como la relación con el hospedero.

En *Giardia* se han descrito y caracterizado diversas moléculas que están involucradas en la patogenicidad del parásito y que son capaces de activar el sistema inmunológico, tales como proteínas de la pared del quiste, giardinas, proteínas de choque térmico y proteínas variables de superficie, siendo estas últimas las que le otorgan al parásito variación antigénica. En *G. lamblia* existe un repertorio aproximado de 200 genes para VSPs (Gargantini y col., 2016) y es por esto que es probable que la variación antigénica participe en la evasión del sistema inmune determinando el espectro clínico de la giardiasis y la capacidad del parásito para reinfectar al hospedero.

Debido a que el epitelio intestinal es el sitio de infección de *Giardia*, los mecanismos inmunitarios efectores presentes a nivel de la mucosa intestinal juegan un papel importante para la eliminación del parásito. También se ha descrito como indispensable para el aclaramiento de la infección la participación de la inmunidad adaptativa humoral y celular con la producción de inmunoglobulinas del tipo IgA, IgG e IgM y células T CD4+ y liberación de citocinas IL-6, TNF- α , IFN- γ e IL-4 (Jimenez y col., 2014). Los conocimientos generados con el estudio del parásito *Giardia* y de las respuestas inmunes efectoras del sistema inmune innato y adaptativo, en combinación con la implementación de nuevas herramientas bioinformáticas pueden impulsar la investigación de medidas profilácticas eficaces.

ANTECEDENTES

Giardia lamblia

Giardia lamblia es un parásito protozoario flagelado que presenta dos estadios en su ciclo de vida. El quiste es la forma de transmisión de la infección vía fecal-oral, tiene una forma ovalada, con un diámetro de 7 a 10 μm , posee 4 núcleos y está cubierto por una pared compuesta de dos capas, una membranosa interna y una filamentosa externa, las cuales proporcionan resistencia a circunstancias ambientalmente hostiles (Adam, 2001). El otro estadio es el trofozoíto, coloniza el intestino delgado, tiene una forma piriforme con una longitud aproximada de 12 a 15 μm y una anchura de 5 a 9 μm , posee 4 pares de flagelos y un disco ventral que le confiere adherencia, lo cual es esencial para la supervivencia y patogénesis del parásito (Luján & Svärd, 2011).

El ciclo de vida comienza con la ingestión de quistes de *G. lamblia*, inicia su proceso de desenquistación al pasar por el ambiente ácido del estómago y posteriormente por el contenido del intestino delgado proximal, dando como resultado a dos trofozoítos, los cuales se adhieren al epitelio intestinal y se dividen mediante fisión binaria, pero factores como altos niveles de bilis, bajos niveles de colesterol y pH básico, propician que los trofozoítos inicien el enquistamiento en la parte inferior del intestino delgado, comenzando así un nuevo ciclo de vida. Los quistes son eliminados en la materia fecal y son transmitidos a otro hospedero a través de agua y alimentos contaminados (Ankarklev y col., 2010).

Estudio Evolutivo y Clasificación de *Giardia lamblia*

El protozoario *G. lamblia* pertenece al orden Diplomonadida y familia Hexamitidae, y es un organismo unicelular eucariótico que comparte características de procariotas anaeróbicos, debido a esto y varios análisis genómicos realizados, posicionan a *G. lamblia* como los eucariotas más primitivos existentes (Sun y col., 2010). *Giardia* carece de varios compartimientos eucariotas comunes, como mitocondrias, peroxisomas y un aparato de

Golgi (Plutzer y col., 2010), estas características hacen al parásito un modelo de estudio no solo a nivel patológico, sino también como fuente de información para explicar líneas de evolución temprana de diversos microorganismos.

Los aislados de *Giardia* se pueden agrupar bajo criterios morfológicos discernibles por microscopía, las cuales han permitido la descripción de especies adicionales del género de *Giardia*, sin embargo, estudios de genómica comparativa ayuda a tener una clasificación más específica.

En la naturaleza existen diferentes especies del género *Giardia* que se encuentran clasificadas en 8 grupos genéticos o ensamblajes de la A hasta la H, basados en características en el genotipado de diferentes loci, entre ellos β -giardina, triosa fosfato isomerasa y glutamato dihidrogenasa (Faria y col., 2017). Los hospederos de *Giardia* son muy diversos (Tabla I modificada) (Heyworth, 2016), los ensamblajes de importancia clínica para el ser humano son los A y B (Xiao & Fayer, 2008) y las cepas representativas de estos ensamblajes genéticos son las cepas WB-clona 6 (WB-C6) y GS/M-83-H7, respectivamente. Los factores que determinan la virulencia de algún brote de giardiasis no se encuentran esclarecidos por completo, sin embargo, existen diferencias de patogenicidad y virulencia entre los diferentes grupos genéticos (Haque y col., 2005).

Giardiasis: Aspectos Clínicos

La giardiasis es la parasitosis causada por *Giardia lamblia* y es una de las enfermedades gastrointestinales más comunes alrededor del mundo. La giardiasis ejerce un impacto significativo en salud pública principalmente en países en desarrollo, se han reportado tasas de infección entre 8 % y 30 %, en países como Asia, África y América del Norte (Feng & Xiao, 2011). En México, de acuerdo con la información proporcionada por el SINAVE (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica), se estima que del año 2017 al 2018 existen alrededor de 20 000 casos. Sin embargo, la giardiasis puede ser una parasitosis subdiagnosticada por el poco seguimiento epidemiológico que existe y el cuadro asintomático que se puede presentar en esta parasitosis.

Tabla I. Ensamblajes de *Giardia lamblia* y hospederos correspondientes.

| Ensamblajes | Hospederos |
|-------------|---|
| A | Humano, perro, gato, ganado, alpaca, ciervo, hurón, cerdo, castor, chinchilla, jaguar, caballo, marsupiales, oveja, cabra, buey, primates, cetáceos, focas, león marino australiano, alce, reno, pollo, gaviota. |
| B | Humano, ganado, perro, gacela, venado, caballo, castor, rata almizclera, chinchilla, hurón, conejo, marsupiales, cobaya, roca hyrax, primates, pollo, oveja, focas, cerdo, león marino australiano, avestruz, delfín, marsopa, gaviota. |
| C | Perro, canguro, ganado, cerdo, cetáceos. |
| D | Perro, chinchilla, canguro, ganado, cetáceos, zorro. |
| E | Ganado, oveja, cerdo, alpaca, cabra, caballo, yak, zorro, ciervo, gato. |
| F | Gato, cetáceos, cerdo. |
| G | Rata, ratón. |
| H | Foca gris, gaviota. |

Alrededor del 75 % de la población infectada no presenta síntomas, siendo portadores del parásito sin un diagnóstico, sin embargo, también se puede presentar cuadros clínicos agudos y crónicos con síntomas como diarrea, náuseas, dolor epigástrico, vómito, pérdida de peso y mala absorción de nutrientes (Eckmann, 2003).

Aunque los síntomas durante la giardiasis pueden aparecer en ausencia de una alteración intestinal, los trofozoítos de *Giardia* al adherirse a la parte superior del intestino delgado pueden comprometer la composición y el funcionamiento del epitelio intestinal. Se ha comprobado que *G. lamblia* puede inducir la apoptosis enterocítica, aumentando la permeabilidad epitelial (Troeger y col., 2007). Estudios en la patogénesis de la giardiasis han establecido que se puede presentar una mala absorción de nutrientes como glucosa, lípidos, sodio, y vitamina B12, debido a un acortamiento difuso de las microvellosidades del epitelio intestinal (Buret, 2008).

Existen diferentes medicamentos utilizados para el tratamiento contra *Giardia*, entre ellos albendazol, tinidazol y metronidazol (Lemée y col., 2000), aunque estas drogas son efectivas debido a que sus moléculas blanco son indispensables para el parásito como el ADN y proteínas del citoesqueleto, se han reportado cepas de *Giardia* resistentes (Leitsch, 2015), aunado a esto, algunos medicamentos producen diversos efectos secundarios tales como cefalea, náuseas, vértigo entre otros (Gardner & Hill, 2001).

Proteínas Inmunogénicas de *Giardia lamblia*

El estudio y caracterización de las moléculas capaces de estimular la respuesta inmune del hospedero nos ayuda a comprender la patogénesis y los factores de virulencia del microorganismo, así como proporcionar información para el desarrollo de nuevas medidas profilácticas para la infección.

En *Giardia* se han caracterizado diferentes proteínas inmunogénicas. Las proteínas de la pared del quiste (CWPs) son indispensables para la supervivencia del parásito fuera del hospedero, brindando resistencia, y están implicadas en las vesículas específicas de la enquistación encargadas en el transporte de proteínas (Reiner y col., 1989).

Las giardinas son otras proteínas estudiadas, se expresan constantemente en el parásito, tienen un peso molecular aproximadamente de 30 kDa, las principalmente caracterizadas son α 1-giardina, α 2-giardina y β -giardinas, se encuentran en el citoesqueleto del parásito asociadas a los microtúbulos del disco ventral y axóstilo del trofozoíto (Faubert, 2000).

Las α y β tubulinas son proteínas que se han localizado en los flagelos, disco ventral, funis y cuerpo medio del parásito, la alta abundancia de estas moléculas en *Giardia* las sitúan como un objetivo para el sistema inmunológico (Torian, y col., 1984).

Otras proteínas constitutivas en las células y que son expresadas también en *Giardia* son las proteínas de choque térmico (HSPs), las HSP están implicadas en la maquinaria del plegamiento de proteínas y ayudan a la célula a sobrevivir a situaciones de estrés como aumentos de temperatura en el ambiente y cambios de pH. Los estudios realizados han situado a las HSPs de *Giardia* como inductoras de la respuesta inmune celular y humoral (Lee y col., 2014; Lopez-Romero y col., 2017).

Existe una familia de proteínas que son expresadas en la superficie del trofozoíto denominadas proteínas variables de superficie (VSPs), las VSPs han sido ampliamente estudiadas debido a que están involucradas en la variación antigénica del parásito. Aunque se ha determinado que existe aproximadamente 200 genes para VSPs, sólo se puede expresar una VSP por vez en el trofozoíto. Son proteínas escasamente glicosiladas, ricas en cisteína, con pesos moleculares documentados de 22,3 kDa hasta 200 kDa (Papanastasiou y col., 1997a). El contenido de cisteína es generalmente cerca del 11 al 12 % comúnmente encontrado en los motivos CXXC, la secuencia del N- terminal es variable, pero los 27 aminoácidos del C-terminal (que consiste en una cola hidrofóbica) incluyendo la región que atraviesa la membrana citoplasmática son altamente conservados, finalizados por una cadena invariable de cinco aminoácidos hidrofílicos CRGKA (Nash, 2002). Se ha cuestionado el estudio de proteínas involucradas con la variabilidad antigénica de protozoarios como moléculas diana para el desarrollo de medidas profilácticas, pero se ha proporcionado evidencia del desarrollo de mecanismos

inmunológicos contra las VSPs (Quintero y col., 2013; Serradell y col., 2018), también se han involucrado a estas moléculas con la capacidad de infección del trofozoíto en diferentes entornos intestinales del hospedero (Adam, 2001).

El laboratorio de Inmunología y Biología Celular del Departamento de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad de Sonora se ha dedicado en la caracterización de proteínas inmunogénicas de *G. lamblia*. Se ha determinado que la respuesta inmune humoral de tipo IgA e IgG de ratones C3H/HeJ infectados con la cepa GS/M-83-H7 reconocen a proteínas de aproximadamente 71 kDa (Velazquez y col., 2005), adicionalmente, estas proteínas tienen la capacidad de activar linfocitos T *in vitro* (Astiazaran-Garcia y col., 2009). Al generar hibridomas de células B a partir de un modelo de infección murino con la cepa GS/M-83-H7, se generó un anticuerpo monoclonal, que reconoce a una proteína de 71 kDa. Debido a estos hallazgos se realizaron análisis por espectrometría de masas en donde se identificó a la proteína reconocida por el anticuerpo monoclonal generado, a la cual se le denominó proteína 5G8.

Es importante tener un panorama global de las moléculas del parásito que tienen un papel importante durante el proceso de infección, esto nos ayuda a comprender los mecanismos de patogenicidad del parásito y defensa del hospedero. Aunado a esto, *Giardia* puede ser un modelo de infección que incrementará el conocimiento en los estudios de inmunidad en mucosas.

Mecanismos Inmunológicos Efectores Contra *G. lamblia*

La función del sistema inmune es proteger al organismo de aquello que detecta como no propio, para esto se requiere que varios mecanismos trabajen de manera conjunta, cada uno de los cuales desempeña una importante función en las defensas del hospedero. Si bien el protozooario *G. lamblia* tiene mecanismos de evasión del sistema inmune, la giardiasis se considera una infección autolimitada, lo cual indica que existen mecanismos de defensa efectivos en el hospedero contra este parásito (Figura 1, modificada) (Velazquez y col., 2018).

Respuesta Inmune Innata

Debido a que el sitio de colonización del trofozoíto es el epitelio intestinal, las células que lo conforman son la primera línea de defensa. Las células intestinales se producen y eliminan constantemente, así que el parásito debe volver a adherirse para evitar ser eliminado por la peristalsis (Roxström y col., 2006). Existen mecanismos químicos efectores a nivel de mucosas que intervienen en la giardiasis, las especies reactivas de oxígeno (ROS) y el óxido nítrico (NO) tienen actividades citotóxicas e inmunomoduladoras durante las infecciones intestinales. Se ha observado que los pacientes con giardiasis exhiben niveles elevados de NO (Matowicka y col., 2011) y en condiciones *in vitro* se ha relacionado con efectos inhibitorios sobre el crecimiento y proceso de diferenciación de *Giardia* (Eckmann y col., 2000). El complemento es otro mecanismo innato de defensa que tiene un papel importante contra el parásito, una de las vías por la que es activado es la vía de las lectinas que se inicia a través de la unión de la lectina de unión a manosa (MBL), la cual es capaz de unirse a los trofozoítos causando la lisis celular por la acción del complemento (Evans y col., 2010).

En los procesos innatos también se ven involucrados diferentes estirpes celulares que tienen funciones efectoras en esta etapa. Los macrófagos desempeñan un papel fundamental en la detección de microorganismos patógenos, por medio del reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), facilitando el proceso fagocítico. En *Giardia* se ha reportado que los macrófagos de la mucosa son capaces de ingerir *in vivo* trofozoítos (Owen y col., 1981), también se han identificado un aumento en la población de macrófagos intestinales, que expresan NOS₂ y arginasa-1, marcadores para M1 y M2, respectivamente (Maloney y col., 2015). Los mastocitos se encuentran en los tejidos mucosos y epiteliales de todo el cuerpo, liberan citocinas que regulan las funciones de muchos tipos de células inmunes como, células dendríticas, macrófagos, linfocitos T y B, en ratones deficientes en mastocitos infectados con *G. lamblia* no pudieron eliminar la infección, en comparación con los ratones de tipo salvaje (Li y col., 2004).

Las células del sistema inmune innato como lo son células M, macrófagos y células dendríticas pueden movilizar antígenos de *Giardia*, proporcionando elementos para activar la respuesta inmune adaptativa, sin la necesidad de que el parásito se infiltre en el epitelio intestinal.

Respuesta Inmune Adaptativa

El sistema inmunitario adaptativo está conformado por un grupo de células altamente especializadas en generar una respuesta específica contra el patógeno. En la infección por *Giardia*, tanto la respuesta inmune humoral y celular juegan un papel importante en la eliminación del parásito. Aunque se ha descrito que una respuesta inmune humoral no es estrictamente necesaria en el modelo de infección con *Giardia* (Singer & Nash, 2000), también se ha demostrado que los linfocitos B proporcionan mecanismos efectores contra el parásito.

En personas que presentan inmunodeficiencia variable común, la cual se caracterizan por niveles bajos de anticuerpos, muestran una susceptibilidad a desarrollar una giardiasis crónica (Paranjpe y col., 2016). Los anticuerpos anti-*Giardia* de humanos infectados tienen la capacidad de lisar a trofozoítos *in vitro*, posiblemente mediante la activación de la vía clásica del complemento (Deguchi y col., 1987; Hill y col., 1984), también se ha estudiado el posible papel protector que pudiera tener la respuesta humoral durante la infección, se han detectado anticuerpos en la leche materna que pueden proteger a los niños contra la giardiasis en una edad temprana (Tellez y col., 2003).

En nuestro grupo de investigación se han realizados estudios de la capacidad protectora que tiene el anticuerpo monoclonal 5G8.B5 (AcMo 5G8.B5) en la infección por *Giardia*. Este anticuerpo fue generado durante la infección con la cepa GS/M-83-H7 en ratones C3H/HeJ y es dirigido contra la proteína VSP-5G8. En un modelo de infección gerbil, los animales se sometieron a un tratamiento oral con el AcMo 5G8.B5 previo y posterior a una infección con trofozoítos, los gerbos sometidos al tratamiento con el anticuerpo específico para la proteína 5G8 lograron tener una carga parasitaria menor, en comparación a los tratados con un anticuerpo control (Valdez, 2015).

Otro tipo de células que están involucradas en la respuesta adaptativa, son los linfocitos T, estas células a diferencia de los linfocitos B, necesitan de una célula presentadora de antígeno, como las células dendríticas, que presentan fragmentos de antígenos en el complejo principal de histocompatibilidad (MHC), de esta manera la célula T es capaz de activarse y efectuar una respuesta rápida y eficiente cuando se encuentre con el antígeno específico. Los linfocitos CD8 + y CD4 + participan en el proceso de giardiasis, siendo esta última esencial para establecer los mecanismos de erradicación del parásito, debido a que ratones deficientes en CD4 + no pueden controlar la infección por *Giardia* (Heyworth y col., 1987). Sin embargo, los linfocitos citotóxicos CD8 + se han asociado más con el daño patológico durante la infección, causando cambios histológicos después de la infección por *Giardia*, estudios revelaron que las alteraciones de las membranas de enterocitos como pérdida de la superficie del borde del cepillo intestinal, y el aumento de la proporción de criptas/vellosidades en la giardiasis están mediadas por CD8 + (Scott y col., 2004). Estos hallazgos demuestran que la respuesta inmune adaptativa presenta un papel dual en la infección.

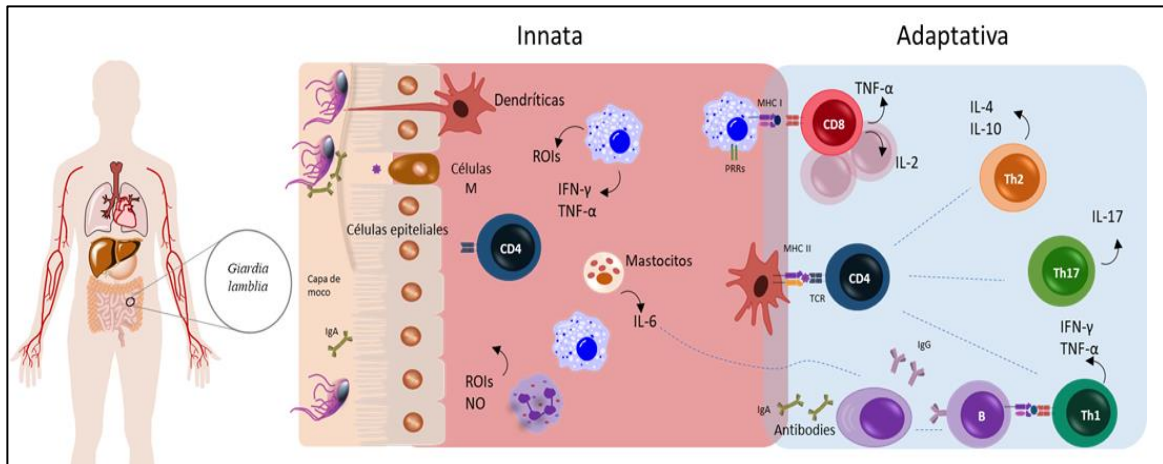


Figura 1 (Modificada de Velazquez y col., 2018). Respuesta inmune implicada en la infección por *G. lamblia*. El sistema inmune innato desempeña un papel clave en la infección. Las barreras físicas, como la mucosa intestinal, el pH del estómago y la peristalsis biológica pueden controlar la infección. El reconocimiento de antígenos de *Giardia* está dado por las células dendríticas, los macrófagos y las células M que pueden movilizar los antígenos de *Giardia* a la lámina propia. Los macrófagos activados liberan TNF- α , estimulando a los neutrófilos y macrófagos para liberar intermedios reactivos de oxígeno (ROIs) y óxido nítrico (NO), que pueden eliminar al parásito. El complejo de histocompatibilidad principal clase II (MHC II) está implicado en la presentación de antígenos de protozoarios extracelulares. Las células de los linfocitos activos median la respuesta inmune a través de los anticuerpos IgA e IgG y las citoquinas de respuesta Th1, Th2 y Th17.

Inmunidad Activa y su Aplicación en Vacunas

A lo largo de los años, las enfermedades ocasionadas por microorganismos patógenos han ido en aumento, ocasionando una tasa de mortalidad elevada. En el 2010, el número de muertes fue de 15 millones (Dye, 2014). Por este motivo la investigación en el área de la salud se ha centrado en entender la patogénesis de las infecciones por microorganismos y aportar conocimiento para el desarrollo de medidas profilácticas.

La vacunación ayuda a la prevención, control y erradicación de enfermedades humanas y de animales al inducir respuestas inmunológicas. Existen dos tipos de proporcionar inmunidad a un organismo. La primera es de manera pasiva, la cual consiste en transferir a un organismo componentes del sistema inmune, como anticuerpos y células inmunológicas, que ayudarán a controlar la infección, esta estrategia ha sido utilizada como tratamientos contra la difteria, infección respiratorias y virales (Keller & Stiehm, 2000). La inmunidad activa es la segunda manera de transferir inmunidad y la más utilizada en los esquemas de vacunación, se refiere al proceso de exponer al organismo con antígenos para generar una respuesta inmune adaptativa, con la ventaja de desarrollar una protección a largo plazo.

La generación de vacunas contra infecciones parasitarias todavía se encuentra en desarrollo, esto debido a la complejidad de los patógenos eucariotas como dianas inmunológicas. Para el parásito *Giardia* se han evaluado diferentes antígenos que generan protección para la infección; ratones Balb/c tratados vía oral con la proteína de pared del quiste CWP2 tuvieron una disminución en la excreción de quistes de *Giardia lamblia* (Larocque y col., 2003). Otros candidatos descritos se encuentran en la familia de las VSPs, en un modelo gerbil tratado con una vacuna basada en VSPs no indujo signos de giardiasis, y fue capaz de inducir altos niveles de IL-17, IL-6, IL-4 e IL-5, estimulando la producción de IgA intestinal e IgG específicas (Serradell y col., 2018). Los estudios existentes de la inducción de una respuesta inmune protectora contra *G. lamblia* son escasos, esta línea de investigación ofrece perspectivas a futuro en la prevención de la giardiasis.

Herramientas Bioinformáticas

La bioinformática se desarrolló entre la década de 1970 y 1980, debido a la introducción de tecnologías automatizadas, desde entonces ha ayudado en la mejora de nuestro entendimiento de diversos aspectos involucrados en la biología, genética y epidemiología. Lo que hacen las herramientas bioinformáticas es ofrecer soluciones inmediatas en el almacenamiento, procesamiento, integración, análisis e interpretación de la información biológica.

Las herramientas bioinformáticas disponibles se pueden dividir en 5 grupos de acuerdo a sus aplicaciones: 1) genómica computacional, que consiste en el almacenamiento y análisis de ADN, 2) proteómica, 3) perfiles transcripcionales, análisis de ARNm, 4) genómica funcional, las cuales ayudan al análisis de la función biológica del gen y 5) modelado molecular, que ayudan a relacionar estructura y funcionalidad de una molécula (Zagursky & Russell, 2001). En conjunto estas herramientas han contribuido a la economía global ya que impulsan nuevas tecnologías, por ejemplo, el diseño de fármacos, generación de medicamentos y vacunas, aumentando el potencial de curar enfermedades.

Predicción de Epítopes de Células B

La bioinformática aplicada en inmunología tiene como objetivo principal obtener explicaciones de procesos inmunológicos en un modelo de estudio, utilizando enfoques computacionales y matemáticos, esto con la finalidad de brindar una mejor comprensión de los mecanismos inmunológicos, como lo es el reconocimiento y activación del sistema inmune hacia un inmunógeno.

La respuesta inmune humoral está mediada por moléculas de anticuerpos que son secretadas una vez que los linfocitos B son diferenciados a células plasmáticas. El antígeno que se une al receptor de antígeno de células B señala a la célula y, al mismo tiempo, se internaliza y procesa en péptidos que pueden activar a las células T cooperadoras (Janeway, 2004). Los anticuerpos son moléculas que tienen la capacidad de

reconocer directamente al inmunógeno en los segmentos llamados epítopes. Los epítopes de linfocitos B se dividen en dos categorías, epítopes lineales que son secuencias continuas de aminoácidos y los epítopes conformacionales o discontinuos, que su presencia depende de la integridad conformacional del antígeno. Los linfocitos B son células puente entre la respuesta inmune humoral y celular, y los anticuerpos secretados por estas células poseen funciones efectoras, como neutralización, opsonización y activación del complemento mediante la vía clásica, conocer las pequeñas secuencias capaces de activar células B da bases moleculares y celulares para una mejor caracterización del inmunógeno y la respuesta inmune humoral que puede activar.

Para la predicción de epítopes de células B se cuenta con diferentes algoritmos, entre ellos BepiPred, FBCPred, AAPPred, ABCPred, SVMTrip y LEPS, las bases de datos se enfocan en comparar una variedad de propiedades fisicoquímicas de los epítopes, tales como antigenicidad, accesibilidad, flexibilidad, hidrofiliidad y exposición a la superficie, que se han demostrado que son indispensables para un reconocimiento adecuado por inmunoglobulinas (Soria y col., 2015).

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de Experimentación

Se utilizaron ratones de la cepa singénica C3H/HeJ de 6 a 8 semanas de edad proporcionados por el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Para el ensayo de protección se utilizaron gerbos (*Meriones unguiculatus*) de 14 semanas de edad los cuales fueron adquiridos a través del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV). Los animales fueron mantenidos en el Bioterio del Departamento de Investigaciones de Posgrado en Alimentación de la Universidad de Sonora (DIPA), con fotoperíodos de 12 horas a 25 °C, acceso a agua y alimentación *ad libitum*, con una dieta comercial para roedores (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.

Cultivo Axénico de *G. lamblia*

Se utilizaron cultivos axénicos de trofozoítos de la cepa de *G. lamblia*, WB-clona 6 (WB-C6) y GS/M-83-H7 del ensamble A y B respectivamente, obtenidos de American Type Culture Collection (ATCC), los cuales fueron cultivados en medio TYI-S-33, suplementado con 10 % de suero de ternera recién nacida (MICROLAB, LOT. M-8397) y 100 µg/mL de ceftriaxona (AMSA, Laboratorios, solución inyectable, 1G/1M/3.5mL) e incubados a 37 °C (L-C Incubator, Barnstead, Lab-Line) en condiciones microaerofílicas. Adicionalmente, bajo las mismas condiciones, se utilizó la cepa enriquecida en la expresión de la proteína 5G8, por la técnica de inmunoadsorción a partir de la clona GS/M-83-H7, denominada GS-5G8 (+) (Quintero y col., 2013).

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

Para confirmar la expresión de la proteína 5G8 en la superficie de los trofozoítos, se utilizaron cultivos confluentes de *G. lamblia* de la cepa GS-5G8 (+), 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 solución reguladora de fosfatos salinos (PBS) a centrifugaciones de 600 g, 4 °C por 7 minutos. Después, se incubaron los trofozoítos con AcMo 5G8.B5 (1 µg/mL) por 1 hora a 4 °C, y en las mismas condiciones con el anticuerpo aBDC.2 como control negativo, diluidos en PBS-BSA (álbumina de suero bovino) 0.1 %. Al terminar la incubación, se realizaron 2 lavados con PBS manteniendo las mismas condiciones de centrifugación mencionadas anteriormente. Los trofozoítos se incubaron con el anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a isocianato de fluoresceína (FITC) diluido 1:200 con PBS-BSA 0.1 % por 1 hora a 4 °C, en oscuridad. Finalmente, las células fueron lavadas 2 veces con PBS y resuspendidas en 200 µL de PBS-BSA 0.1% al 0.05 % de NaN₃. 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 del Extracto Proteico de *G. lamblia*

Se obtuvieron extractos proteicos solubles de las cepas WB-clona 6 (WB-C6), GS/M-83-H7 y GS-5G8 (+) de *G. lamblia*, a partir de cultivos confluentes y axénicos cultivados e incubados a 37 °C (L-C Incubator, Barnstead, Lab-Line) en tubos 13 x 100 mm, los cuales fueron desprendidos en agua-hielo por 10 minutos. Después, los trofozoítos fueron lavados por 2 ocasiones con PBS, pH 7.2, bajo las condiciones de 600 g, 4 °C, por 7 minutos. Una vez contenidos los trofozoítos en una pastilla, se resuspendieron en 1 mL 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, las muestras se sonicaron (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 proceso, debido a que 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).

Separación de Proteínas de Membrana de la Cepa GS-5G8 (+)

Se separaron proteínas de membrana de la cepa GS-5G8 (+) (PM-5G8) con la finalidad de aislar la proteína 5G8. Primeramente, se realizó una expansión del cultivo de trofozoítos en un frasco de 500 mL con tubos de ensaye en su interior, con la finalidad de aumentar la superficie de adherencia y tener una mayor cantidad de trofozoítos, cultivados con TYI-S-33, suplementado con 10 % de suero de ternera recién nacida (MICROLAB, LOT. M-8397) y 100 µg/mL de ceftriaxona (AMSA, Laboratorios, solución inyectable, 1G/1M/3.5mL) e incubados a 37 °C (L-C Incubator, Barnstead, Lab-Line) en condiciones microaerofílicas. Después de 3 días se recuperaron los trofozoítos con ciclos de desprendimiento en agua-hielo y centrifugaciones de 600 g, 4 °C, 7 minutos, una vez obtenido el botón celular, se realizó el protocolo de separación de proteínas de membrana (Papanastasiou y col., 1997b), el cual consistió en resuspender los trofozoítos en la solución de lisis de 20 mM Tris-HCl/150 mM NaCl, pH 7.5 (TBS) con 2 % de Tritón X-114 e inhibidor de proteasas (Sigma, St. Louis, MO, USA) en un periodo de incubación de 20 minutos en hielo. Para remover los componentes del citoesqueleto se centrifugó a 4000 g, 4 °C durante 5 minutos. El sobrenadante fue recuperado y se le adicionó azul de bromofenol 0.001 % para distinguir la fase de detergente en el proceso. Posteriormente se sometió a un ciclo de incubación de 10 minutos en hielo y 10 minutos a 37 °C, se centrifugó a 2500 g, 25 °C durante 5 minutos. La fase acuosa (incolora) se separó y siguió

en el proceso de extracción de proteínas. Una vez obtenida la fase de detergente (azul), se realizaron 2 lavados con TBS-Tritón X-114 al 0.05 %, la muestra se almacenó a -20 °C hasta su uso. La concentración de proteína se determinó mediante el método Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, EE. UU.). Con la finalidad de confirmar la presencia de la proteína 5G8 en la muestra aislada, se realizó un inmunorreconocimiento mediante Western Blotting con el AcMo 5G8.B5 (Anexo 1).

Aislamiento de la Proteína 5G8 de *G. lamblia*

Con la finalidad de obtener aislada la proteína 5G8, y realizar los análisis pertinentes para la evaluación de la respuesta inmune contra la proteína, se realizaron dos métodos para su aislamiento, el primero generando eluciones pasivas a partir de electroforesis SDS-PAGE y el segundo mediante cromatografía de afinidad.

Eluciones de la Banda de 70 Kda de Proteínas de Membrana de la Cepa GS-5G8 (+)

Para el aislamiento de la banda de 70 kDa, peso molecular de la proteína 5G8, se sometieron las PM-5G8 a electroforesis SDS-PAGE al 12 % bajo condiciones reductoras y desnaturizantes (0.2 % SDS y 0.2 % β -mercaptoetanol) utilizando una cámara de electroforesis para minigeles (Mini-PROTEAN® 3 Electrophoresis Cell., Bio-Rad Laboratories Inc.). Posteriormente el carril con el marcador de peso molecular y parte del carril con muestra (Broad Range, Bio-Rad Laboratories Inc.) se tiñó con azul de Coomassie, una vez identificadas el perfil de bandas se seleccionó la banda de 70 kDa, se cortó con un bisturí y se trituró colocándola en 1 mL de PBS diluido 1:20. Las eluciones se recolectaron durante 4 días centrifugando a 1000 g, 4 °C por 7 minutos. Posteriormente se seleccionaron las eluciones positivas, después de ser reconocidas por el AcMo 5G8.B5 mediante Dot Blotting.

Cromatografía de Afinidad de las Proteínas de Membrana de la Cepa GS-5G8 (+)

El aislamiento de la proteína 5G8 fue llevado a cabo por medio de una columna cromatográfica de afinidad, en la cual se acopló el AcMo 5G8.B5 a esferas de sefarosa 4B (Sigma, Cyanogen Bromide Activated Sepharose 4B) (Anexo 2) y partiendo de las PM-5G8 se colocaron en un tubo cónico de 15 mL las esferas acopladas junto con 7 mg de proteínas de membrana y se incubaron en agitación durante 2 horas a 4 °C. Después fueron recuperadas las esferas y se colocaron en la columna cromatográfica. Posteriormente, se realizó un lavado con 60 mL de PBS y se procedió a recolectar las fracciones eluidas por cambios de pH, utilizando 520 µL de glicina 0.1 M (pH 2.5) y en microtubos conteniendo 130 µL de Trizma 1 M (pH 8.0) lo cual generó un total de 20 fracciones que fueron evaluadas por Dot Blotting (Anexo 3) con la finalidad de conocer aquellas que contenían la proteína 5G8.

Perfil Electroforético del Aislamiento de la Proteína 5G8

Con el objetivo de evaluar el aislamiento de la proteína 5G8, se realizó una electroforesis SDS-PAGE al 12 % bajo condiciones reductoras y desnaturalizantes (0.2 % SDS y 0.2 % β-mercaptoetanol) utilizando una cámara de electroforesis para minigeles (Mini-PROTEAN® 3 Electrophoresis Cell., Bio-Rad Laboratories Inc.). Se colocó 4 µg del lisado total de la cepa GS-5G8 (+), proteína de membranas PM-5G8, banda de 70 kDa y la proteína 5G8 purificada por cromatografía, colocando un marcador de peso molecular en el carril subsecuente. El patrón electroforético se visualizó mediante una tinción con nitrato de plata.

ELISA Competitivo de la Banda de 70 kDa de las Proteínas de Membrana y la Proteína 5G8 de *G. lamblia*

Para conocer si el AcMo 5G8.B5 reconocía de igual manera la proteína 5G8 en los dos aislamientos de la proteína, se realizó un ELISA competitivo que consistió en colocar en una placa de 96 pozos para absorción de proteínas (Corning™ 96 Well EIA/RIA Easy

Wash, NY, USA) 0.20 µg de la banda de 70 kDa (banda-5G8) en cada pozo y se incubó toda la noche a 4 °C. Se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20 0.05 % y los sitios libres se bloquearon con PBS-BSA 1 % durante una hora. A la par, se colocó en una placa de 96 pozos para cultivo celular (Corning™, NY) 0.025 µg del anticuerpo monoclonal con diferentes cantidades de muestras que contenían la proteína 5G8, un lisado total de la cepa GS-5G8 (+) y un lisado total de la cepa WB-clona C6 como control negativo de la expresión de la proteína (2.5, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05 y 0 µg/50 µL), la banda-5G8 de proteínas de membrana y la proteína 5G8 aislada mediante cromatografía de afinidad (1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.1, 0.075, 0.05, 0.025, 0.01 y 0 µg/50 µL). La placa para EIA/RIA se lavó 5 veces con PBS-Tween 20 0.05 %, y posteriormente se colocó el anticuerpo monoclonal incubado con los diferentes antígenos, durante una hora en agitación. Se utilizó un segundo anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón acoplado a HRP (1:1000 con PBS-BSA 0.1 %) y su sustrato ABTS + H₂O₂. Después de la incubación de cada anticuerpo se realizaron 5 lavados con PBS 1X-Tween 20 0.05 %. Finalmente se midió la densidad óptica a los 15 minutos de haberle añadido el sustrato en un lector de microplacas a una longitud de onda de 415nm.

Generación de Anticuerpos Policlonales Contra los Extractos Proteicos de *G. lamblia*

Para generar anticuerpos policlonales específicos contra los lisados totales de las cepas WB-C6, GS/M-83-H7 y GS-5G8 (+) de *G. lamblia*, se inmunizaron ratones de la cepa C3H/HeJ vía intraperitoneal con 200 µg de cada lisado total de manera independiente en una emulsión con 200 µL de PBS y Adyuvante Completo de Freund (ACF) para la primera inmunización. Se realizaron 6 refuerzos con intervalos de una semana con la misma cantidad de lisado total, pero con Adyuvante Incompleto de Freund (AIF). Antes de cada procedimiento de inmunización se recolectaron muestras de suero, mismos que se mantuvieron en congelación a -80 °C, hasta su uso posterior.

Generación de Anticuerpos Policlonales Específicos Para la Proteína 5G8

Para tener una muestra representativa de la respuesta humoral contra la proteína 5G8 de *G. lamblia*, se generaron anticuerpos policlonales inmunizando ratones de la cepa C3H/HeJ con 25 µg de la banda correspondiente en el perfil electroforético a 70 kDa de las proteínas de membrana, se procesó, cortándola del gel de poliacrilamida (Anexo 4) y formando una emulsión con 200 µL de PBS y Adyuvante Completo de Freund. Se realizaron 6 refuerzos con intervalos de una semana entre cada refuerzo, con la banda proteica conteniendo 5G8 y Adyuvante Incompleto de Freund (AIF). Antes de cada procedimiento de inmunización se recolectaron muestras de suero, mismos que se mantuvieron en congelación a -80 °C, hasta su posterior uso.

Evaluación del Reconocimiento de los Anticuerpos Policlonales Contra los Lisados Totales de *G. lamblia* y la Proteína 5G8

El patrón de reconocimiento de los anticuerpos policlonales generados se evaluó mediante dos técnicas. Primero, mediante citometría de flujo con la finalidad de ver el reconocimiento de los anticuerpos policlonales hacia la superficie de los trofozoítos de las diferentes cepas. Segundo, se realizó un inmunorreconocimiento mediante Western Blotting para conocer el perfil de bandas reconocidas por los anticuerpos.

Reconocimiento de los Anticuerpos Policlonales Evaluado por Citometría de Flujo

Se realizó una tinción superficial de trofozoítos de *G. lamblia*, donde se colocaron 5×10^5 células de las cepas WB-C6, GS/M-83-H7 y GS-5G8 (+) por pozo en una placa de fondo cónico. Se llevaron a cabo 2 lavados con PBS centrifugando a 800 g, 4 °C por 5 minutos. Después, se incubaron los trofozoítos con los anticuerpos policlonales anti-WB-C6, anti-GS, anti-GS-5G8 (+) y anti-5G8 a una dilución 1:500 PBS-BSA 0.1 %, por 1 hora a 4 °C. Los trofozoítos se incubaron con el anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a isocianato de fluoresceína (FITC) diluido 1:200 con PBS-BSA 0.1 % por 1 hora a 4 °C, en oscuridad. Finalmente, las células fueron lavadas 2 veces con PBS y resuspendidas en 200 µL de PBS-BSA 0.1% al 0.05 % de NaN₃. 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).

Reconocimiento de los Anticuerpos Policlonales Evaluado por Western Blotting

Las proteínas de los lisados totales de WB-C6, GS/M-83-H7, GS-5G8 (+) y PM-5G8, sometieron a una SDS-PAGE al 12 % en condiciones modificadas (0.2 % SDS y 0.2 % β -mercaptoetanol), donde se colocaron 15 μ g de cada muestra en los geles y fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa en un sistema semiseco de electrotransferencia a corriente constante (Semi-Dry Transfer Cell, Trans-Blot SD Cell, BIORAD). La membrana fue bloqueada con una solución de PBS-Leche Svelty 5 % por 1 hora. Enseguida, se realizaron lavados con PBS y la membrana de nitrocelulosa se incubó por una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal 5G8.B5 a 1 μ g / mL, anticuerpos policlonales anti-WB-C6, anti-GS, anti-GS-5G8 (+) y anti-5G8 a una dilución 1:500, el anticuerpo aBDC.2 a 1 μ g / mL y sueros de ratones preinmunes como muestras controles negativos. A continuación, se realizaron 5 lavados con PBS-Tween 20 0.05 %, y la membrana fue incubada con anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano a una dilución 1:7500 con PBS-BSA 0.01 % (Sigma, St. Louis MO, USA) por una hora. Después de 5 lavados con PBS-Tween 20 0.05 %, la membrana se colocó 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 (Carestream Health, NY, USA).

Evaluación de la Capacidad Aglutinante *in vitro* de los Anticuerpos Contra la Proteína 5G8

Para evaluar la actividad de aglutinación de los anticuerpos específicos para 5G8, se incubaron 1×10^6 trofozoítos de la cepa GS-5G8 (+) en una placa de 6 pozos de fondo plano (Corning™, NY) con el AcMo 5G8.B5 a 5 µg/mL y los anticuerpos policlonales anti-5G8 a diluciones de 1:20 hasta 1:2500 con PBS, el anticuerpo aBDC.2 y el suero preinmune se utilizaron como controles negativos, a las mismas condiciones. Los sueros de los ratones anti-5G8 y preinmune fueron decplementados previamente, durante 40 minutos a 56 °C en baño maría. Después de 30 minutos de incubación a 4 °C en agitación suave, los trofozoítos se observaron en un microscopio óptico para visualizar la presencia de aglutinación.

Evaluación de la Capacidad Inhibitoria *in vitro* de Anticuerpos Contra la Proteína 5G8

Para evaluar si los anticuerpos contra la proteína 5G8 tienen capacidad de inhibir el crecimiento *in vitro* de trofozoítos, se cultivaron 1×10^5 /mL trofozoítos de la cepa GS-5G8 (+) en medio TYI-S-33, suplementado con 10 % de suero de ternera recién nacida (MICROLAB, LOT. M-8397) y 100 µg/mL de ceftriaxona (AMSA, Laboratorios, solución inyectable, 1G/1M/3.5 mL) en tubos 13 x 100 mm con el AcMo 5G8.B5 a 1 µg/mL y los anticuerpos policlonales anti-5G8 diluido 1:2500, se utilizaron como controles trofozoítos cultivados solo en medio TYI-S-33, con anticuerpo aBDC.2 y con suero preinmune, a las mismas condiciones. Se colocaron tres tubos por cada condición. Se realizó conteo celular por microscopía óptica utilizando cámara de Neubauer a las 48, 72 y 96 horas.

Evaluación de la Capacidad Inmunoprotectora de la Proteína 5G8

Para analizar si la proteína 5G8 tiene un papel protector en la infección por *G. lamblia*, se realizaron ensayos de inmunización activa utilizando dos modelos de roedores, ratones de la cepa C3H/HeJ y gerbos (*Meriones unguiculatus*).

Ensayo de Protección en Ratones de la Cepa C3H/HeJ

Se generaron 4 grupos compuestos por 5 ratones cada uno, a los cuales se le administraron diferentes tratamientos por vía oral, 4 inoculaciones cada 7 días. El grupo 1 fue tratado con PBS. El grupo 2 fue administrado con 5 µg de la subunidad B de la toxina colérica por ratón (CTB) (Sigma, St. Louis, MO, USA). Al grupo 3 se le suministraron 5 µg de CTB más 50 µg de BSA por cada ratón. Al grupo 4 se trató con 5 µg de CTB más 50 µg de la proteína 5G8 por ratón. Antes del uso *in vivo* de la proteína 5G8, se sometió a un procedimiento de limpieza utilizando Ready Prep™ 2-D Cleanup Kit (Anexo 5). Todos los volúmenes se ajustaron a 200 µL por ratón. Antes de cada inmunización se recolectaban sueros y heces (Anexo 6, Anexo 7) para el posterior análisis de la respuesta de IgG e IgA respectivamente mediante ELISA indirecto (Anexo 8) y Western Blotting. 7 días posteriores a la última inmunización cada ratón fue infectado con 5×10^6 trofozoítos de la cepa GS-5G8 (+), después de 7 días de la infección los ratones fueron sacrificados y se evaluó la carga parasitaria en la sección del duodeno, diseccionando 15 cm del intestino delgado, realizando cortes longitudinales, posteriormente se adicionó 2 mL de medio de PBS frío para lavar suavemente los cortes de intestino, después, se incubó por 1 hora a 4 °C en rotación. Por último, el contenido se centrifugó a 600 g, 4 °C por 7 minutos, se descartó el sobrenadante y se contaron los trofozoítos encontrados en el precipitado utilizando cámara de Neubauer.

Ensayo de Protección en Gerbos

Se generaron 3 grupos compuestos por 5 gerbos cada uno, a los cuales se le administraron diferentes tratamientos por vía oral, 4 inoculaciones cada 7 días. El grupo 1 fue tratado con PBS. El grupo 2 fue administrado con 50 µg de BSA por cada gerbo. El grupo 3 se trató con 50 µg de la proteína 5G8 por gerbo, con la previa limpieza para el uso *in vivo* como se mencionó anteriormente. Todos los volúmenes se ajustaron a 200 µL por gerbo. 7 días posteriores a la última inmunización cada gerbo fue infectado con 1×10^6 trofozoítos de la cepa GS-5G8 (+), después de 10 días de la infección los gerbos fueron sacrificados y se evaluó la carga parasitaria en la sección del duodeno, diseccionando 15 cm del intestino delgado, realizando cortes longitudinales, posteriormente se adicionó 2 mL de medio de PBS frío para lavar suavemente los cortes de intestino, después, se incubó por 1 hora a 4 °C en rotación. Por último, el contenido se centrifugó a 600 g, 4 °C por 7 minutos, se descartó el sobrenadante y se contaron los trofozoítos encontrados en el precipitado utilizando cámara de Neubauer. También a partir del reto de infección y hasta el día del sacrificio se recolectaron heces para la recuperación de quistes de *G. lamblia*. El día del sacrificio se realizó punción cardíaca (Anexo 9) para la obtención del suero y evaluación de anticuerpos IgG contra la proteína 5G8.

Ensayo de Proliferación de Esplenocitos de Ratones (Ensayo de Protección) Mediante el Método de Reducción de Azul de Tetrazolio (MTT)

Los esplenocitos se obtuvieron a partir de la disección del bazo (Anexo 10) de los ratones utilizados en el ensayo de protección. Se incubaron 5×10^5 células con diferentes estímulos *in vitro* por triplicado en placas de 96 pozos para cultivo celular de fondo plano (CorningTM, NY), lisado total de WB-C6, y GS-5G8 (+) en concentraciones de 20, 10, 5, y 1 µg/mL; proteína 5G8 y como control BSA en concentraciones de 200, 100, 10 y 1 nM. Como control positivo se usó fitohemaglutinina-M (PHA) (L8902 Sigma, St. Louis, MO, USA). Las células se incubaron a 37 °C con una atmósfera de 5 % de CO₂. Después de 96 horas de cultivo, se agregó a cada pozo 15 µL de la solución de 5 mg/mL de MTT (Sigma, St. Louis, MO, USA) (10 µL por cada 100 µL de cultivo) y se incubaron a 37 °C

por 4 horas. Posterior a la incubación, los cristales formados se disolvieron en 150 μ L de isopropanol ácido y agitación vigorosa. Una vez disueltos los cristales, se midió la densidad óptica en un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 570 nm y 630 nm como referencia, esto en menos de una hora después de agregar el isopropanol ácido (Mosmann, 1983).

Predicción y Análisis de Homología de Epítopes Lineales de Células B

Se analizó la secuencia de la proteína 5G8 de *G. lamblia* (Quintero y col., 2017) para predecir epítomos lineales de células B. Para la identificación de epítomos de células B, se utilizaron diferentes bases de datos como BepiPred, FBCPred, AAPPred, ABCPred, SVMTrip y LEPS (Larsen y col., 2006; Saha y col., 2004; Wang y col., 2011; Yao y col., 2012). Estas bases de datos tienen algoritmos que consideran una variedad de propiedades fisicoquímicas como la antigenicidad, accesibilidad, flexibilidad, hidrofiliidad y exposición a la superficie. El valor de puntuación indica una medida de estas características. Los valores de puntuación más altos indican que un epítome determinado tiene características que aumentan la probabilidad de ser reconocidos por los anticuerpos. Las tres secuencias con mayor probabilidad fueron sintetizadas en GenScript (www.genscript.com) con una pureza mayor al 90 %. Para el análisis de homología, primeramente, se realizó un BLAST para proteínas (blastp) y un alineamiento múltiple en el servidor T-Coffee e identificando los aminoácidos similares e idénticos mediante BoxShade entre la proteína 5G8 y otras VSPs informadas en las bases de datos the *Giardia* protein and genomic data base (*GiardiaDB*). Se seleccionaron las VSPs con un porcentaje de identidad mayor al 40 % y se analizó el grado de conservación de los epítomos lineales predichos de la proteína 5G8 en las otras VSPs.

Análisis Estadístico

El análisis de los resultados obtenidos se llevó a cabo, según la naturaleza de los datos. Para el ensayo de la capacidad inhibitoria de los anticuerpos con la proteína 5G8, se aplicó la prueba de ANOVA de dos vías, la cual determina cómo una respuesta se ve afectada simultáneamente por dos factores de interés. Para la proliferación por MTT se llevó a cabo la ANOVA de Dunnet, la cual consiste en una comparación múltiple de cada media de muestras problemas con la media del control. En el caso de evaluar diferencias entre la respuesta inmune humoral sistémica generada en los ratones y gerbos del ensayo de protección, se aplicó la prueba U de Mann-Whitney. El análisis fue realizado por el programa GraphPad Software versión 5.0.

RESULTADOS

Aislamiento de la Proteína 5G8 Mediante el Enriquecimiento de Proteínas de Membrana de la Cepa GS-5G8 (+)

Estudios previos de nuestro grupo de investigación, han reportado la expresión de la proteína 5G8 en la superficie de trofozoítos de *G. lamblia* de la cepa GS/M-83-H7 (Quintero y col., 2013), se analizó por citometría de flujo el nivel de expresión de la proteína 5G8 en cultivos de trofozoítos de *G. lamblia* 5G8 (+) antes de cada experimento realizado con esta cepa. El anticuerpo monoclonal 5G8.B5 reconoció al ~ 80 % de la población analizada (Figura 2C). El anticuerpo control de isotipo aBDC.2 no reconoció a esta población celular (Figura 2B). Con la finalidad de aislar la proteína 5G8, se realizó un cultivo axénico de la cepa GS-5G8 (+), partiendo de 700×10^6 trofozoítos, se siguió un protocolo de aislamiento de proteínas de membrana con Tritón X-114 (Papanastasiou y col., 1997b). Se obtuvieron ~ 7 mg de proteínas de membrana las cuales fueron utilizadas para el proceso de aislamiento de la proteína 5G8 mediante eluciones pasivas y cromatografía de afinidad. Con la finalidad de comprobar el correcto aislamiento de la proteína 5G8 se realizó primeramente un gel SDS-PAGE teñido con nitrato de plata (Figura 3A) el cual muestra un enriquecimiento de la banda de 70 kDa en las proteínas de membrana (Figura 3A, carril 2). La banda que corresponde a la proteína 5G8 representó el 30-40 % de las proteínas de membrana aisladas. Asimismo, en la banda-5G8 (elución pasiva) y proteína 5G8 (cromatografía de afinidad) (Figura 3A, carril 3 y 4) se puede ver solo una banda. Después se comprobó la presencia de la proteína mediante inmunorreconocimiento con el anticuerpo 5G8.B5, el cual reconoció la proteína 5G8 en todas las muestras (Figura 3B).

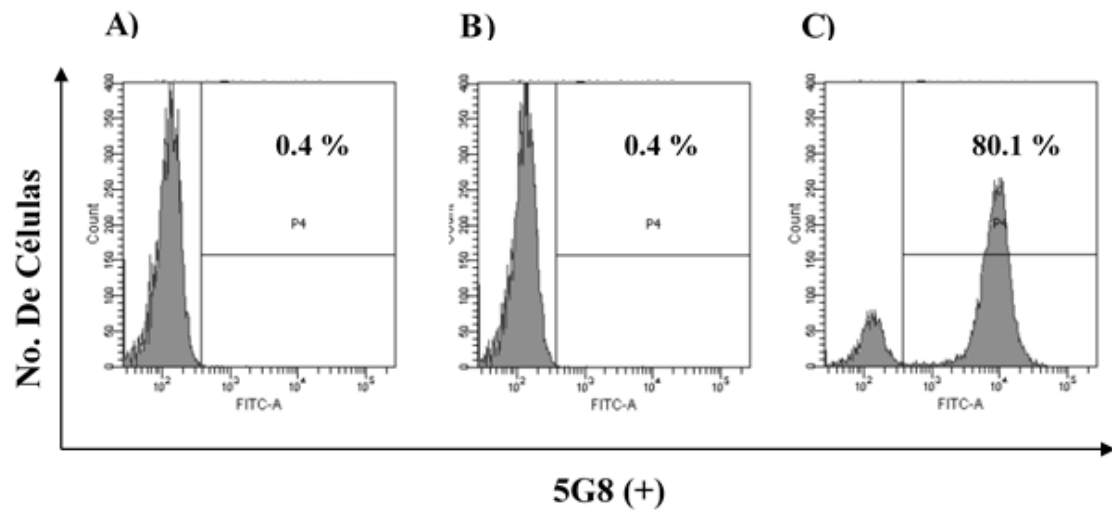


Figura 2. El 80 % de los trofozoítos de la cepa GS-5G8 (+) expresan la proteína 5G8. Análisis de la expresión de la proteína 5G8 en trofozoítos mediante citometría de flujo. **A)** Control sin teñir, **B)** Anticuerpo monoclonal aBDC.2 (IgG2b) como control de isotipo, **C)** Anticuerpo monoclonal 5G8.B5 (IgG2b).

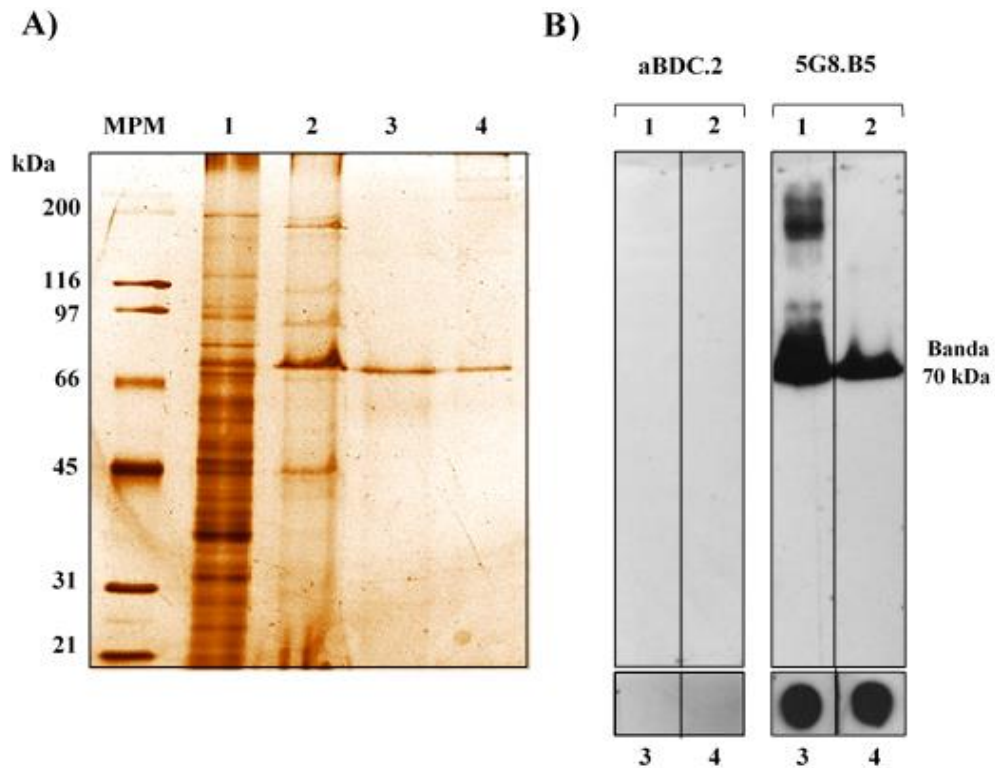


Figura 3. Aislamiento de la proteína 5G8 mediante el enriquecimiento de proteínas de membrana de la cepa GS-5G8 (+). **A)** Perfil electroforético del aislamiento de la proteína 5G8. Se realizó un gel de poliacrilamida SDS-PAGE teñido con nitrato de plata. Lisado total de GS-5G8 (+) (1), PM-5G8 (2), banda-5G8 (3) y proteína 5G8 (4). MPM: marcador de peso molecular. **B)** Inmunorreconocimiento de la proteína 5G8. Se realizó un Western y Dot Blotting para las muestras presentadas en **A)**, se utilizó el AcMo 5G8.B5 para el reconocimiento de la proteína 5G8, el anticuerpo aBDC.2 como control negativo.

Análisis Comparativo del Reconocimiento del AcMo 5G8.B5 Hacia la Proteína 5G8 en la Banda-5G8 y la Proteína 5G8

Como se mencionó anteriormente, la proteína 5G8 se aisló mediante diferentes procesos. Aunque el reconocimiento del AcMo 5G8.B5 hacia la proteína no se vió afectado en los procesos de aislamientos con Tritón X-114 y SDS-PAGE (Figura 3B), condiciones que pueden llegar a ser desnaturizantes, se realizó un ELISA competitivo para evaluar dos situaciones, la primera para comprobar que el reconocimiento por el AcMo 5G8.B5 hacia la proteína era similar independientemente del método de aislamiento utilizado, eluciones pasivas y cromatografía de afinidad. La segunda, debido a que la banda-5G8 proviene de un aislamiento de la banda de 70 kDa de las proteínas de membrana de la cepa GS-5G8 (+), puede contener proteínas de este peso molecular en mayor proporción que 5G8. Es por eso que se comparó esta muestra con la proteína 5G8 aislada por cromatografía de afinidad, un proceso más selectivo y específico. Se adsorbió en la placa de ELISA banda-5G8, y en una placa independiente, se colocó a interactuar el AcMo 5G8.B5 con diferentes cantidades de muestras que contenían la proteína 5G8. La banda-5G8 y la proteína 5G8 tuvieron un comportamiento similar, ambas inhibieron el 50 % del reconocimiento del anticuerpo con 0.08 μg y 0.09 μg , respectivamente (Figura 4), lo que sugiere que la banda-5G8 está conformada en su mayoría por la proteína 5G8. El lisado total de GS-5G8 (+) inhibió el 50 % del reconocimiento del anticuerpo con 0.8 μg , 10 veces más la cantidad que las muestras anteriores, esta diferencia se puede deber al enriquecimiento de la proteína con los procesos de aislamiento, o una diferencia en la interacción del anticuerpo con la proteína nativa. Debido al resultado obtenido, se utilizó la banda-5G8 en los ensayos de inmunización vía oral.

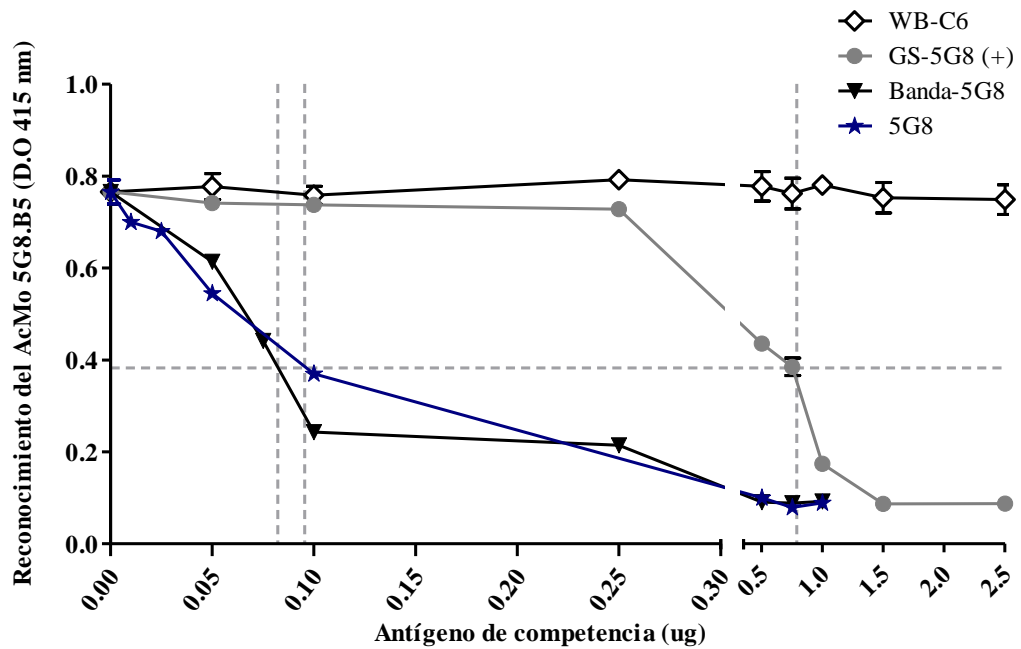


Figura 4. La banda-5G8 de 70 kDa está conformada en su mayoría por la proteína 5G8. ELISA competitivo de muestras con proteína 5G8, lisado total de GS-5G8 (+), banda-5G8, y proteína 5G8. El lisado total de WB-C6 se utilizó como control negativo.

La Respuesta Inmune Humoral es Dirigida Principalmente Hacia la Proteína 5G8 en Ratones C3H/HeJ Inmunizados

Para evaluar la respuesta inmune humoral hacia la proteína 5G8, se generaron anticuerpos policlonales (anti-WB, anti-GS, anti-GS-5G8 (+) y anti-5G8) a través de la inmunización intraperitoneal de ratones de la cepa C3H/HeJ con antígenos con diferencias en la expresión de la proteína 5G8. Se realizó un análisis del reconocimiento de la proteína 5G8 mediante citometría de flujo (Figura 5) e inmunorreconocimiento (Figura 6). Primeramente se evaluó la especificidad de los anticuerpos policlonales anti-5G8 generados, la cual fue comprobada, debido a que los anticuerpos solo reconocieron los trofozoítos de la cepa GS-5G8 (+) con un 90.4 % (Figura 5) y reconocieron la banda de 70 kDa en los carriles 2 y 3 correspondientes al lisado total de GS-5G8 (+) y a las PM-5G8 (Figura 6, anti-5G8). Posteriormente se evaluó como es la respuesta inmune humoral de los anticuerpos policlonales generados anti-GS, anti-GS-5G8 (+) y anti-WB. Los anti-GS y anti-GS-5G8 (+) reconocen los trofozoítos de la cepa GS y GS-5G8 (+), respectivamente (Figura 5), sin embargo, no existe un reconocimiento cruzados entre cepas, lo cual sugiere que la respuesta inmune humoral generadas entre estas dos cepas es diferente, a pesar de que la cepa GS-5G8 (+) proviene de la cepa GS. Al analizar el ensayo de Western Blotting, se observó que el reconocimiento de los anticuerpos anti-GS-5G8 (+) va dirigido principalmente hacia la proteína 5G8, debido al reconocimiento de la banda de 70 kDa en los carriles 2 y 3 (Figura 6, anti-GS-5G8 (+)). Los trofozoítos de la cepa WB-C6 los cuales no expresan 5G8, no fueron reconocidos por estos anticuerpos, sin embargo, existe un reconocimiento cruzado entre los anti-GS y anti-WB para las cepas WB-C6 y GS/M-83-H7.

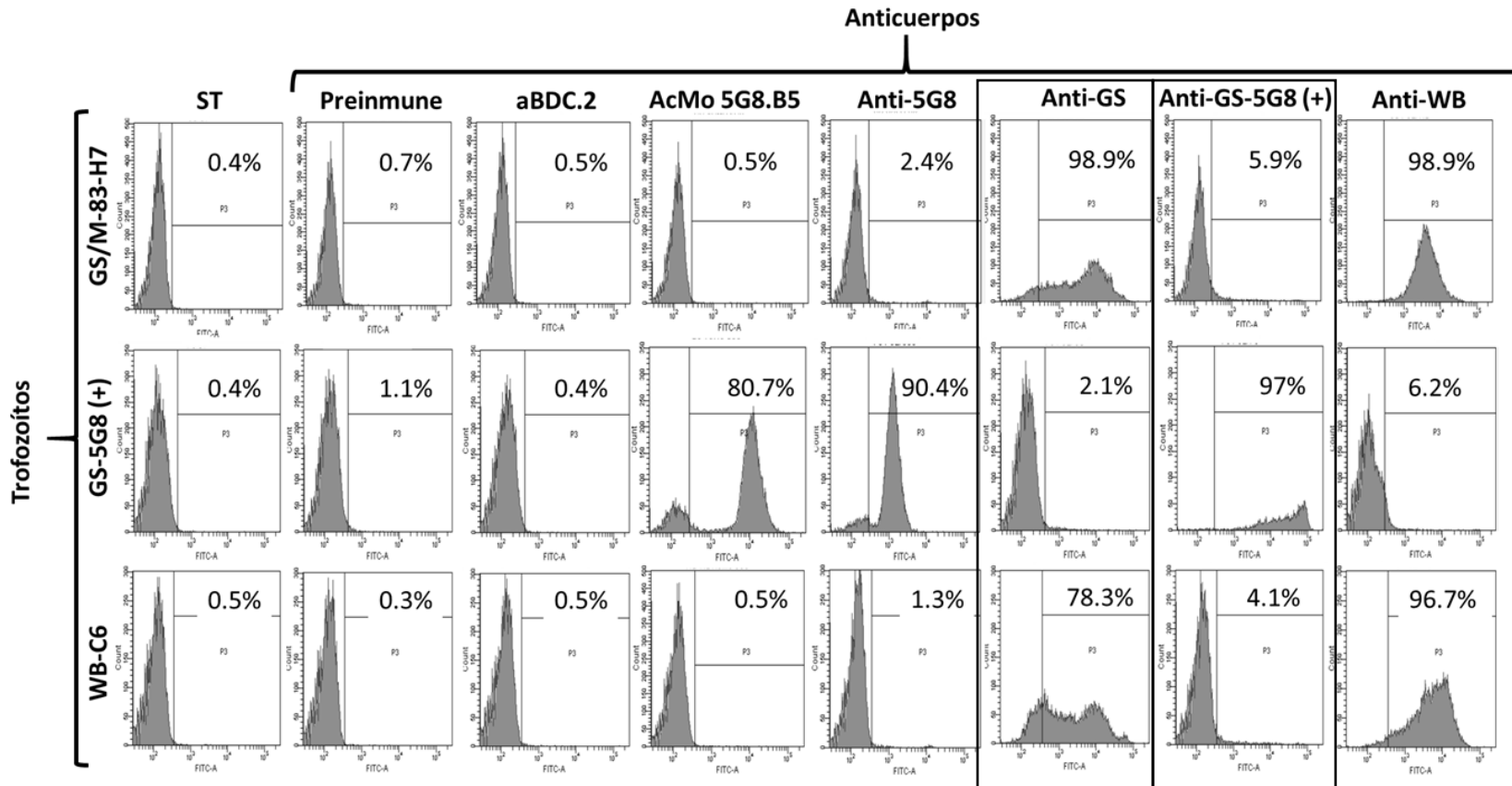


Figura 5. Los lisados de las cepas GS/M-83-H7 y GS-5G8 (+) inducen una respuesta inmune humoral diferente. Inmunorreconocimiento de los anticuerpos policlonales evaluado mediante citometría de flujo. **ST:** sin teñir.

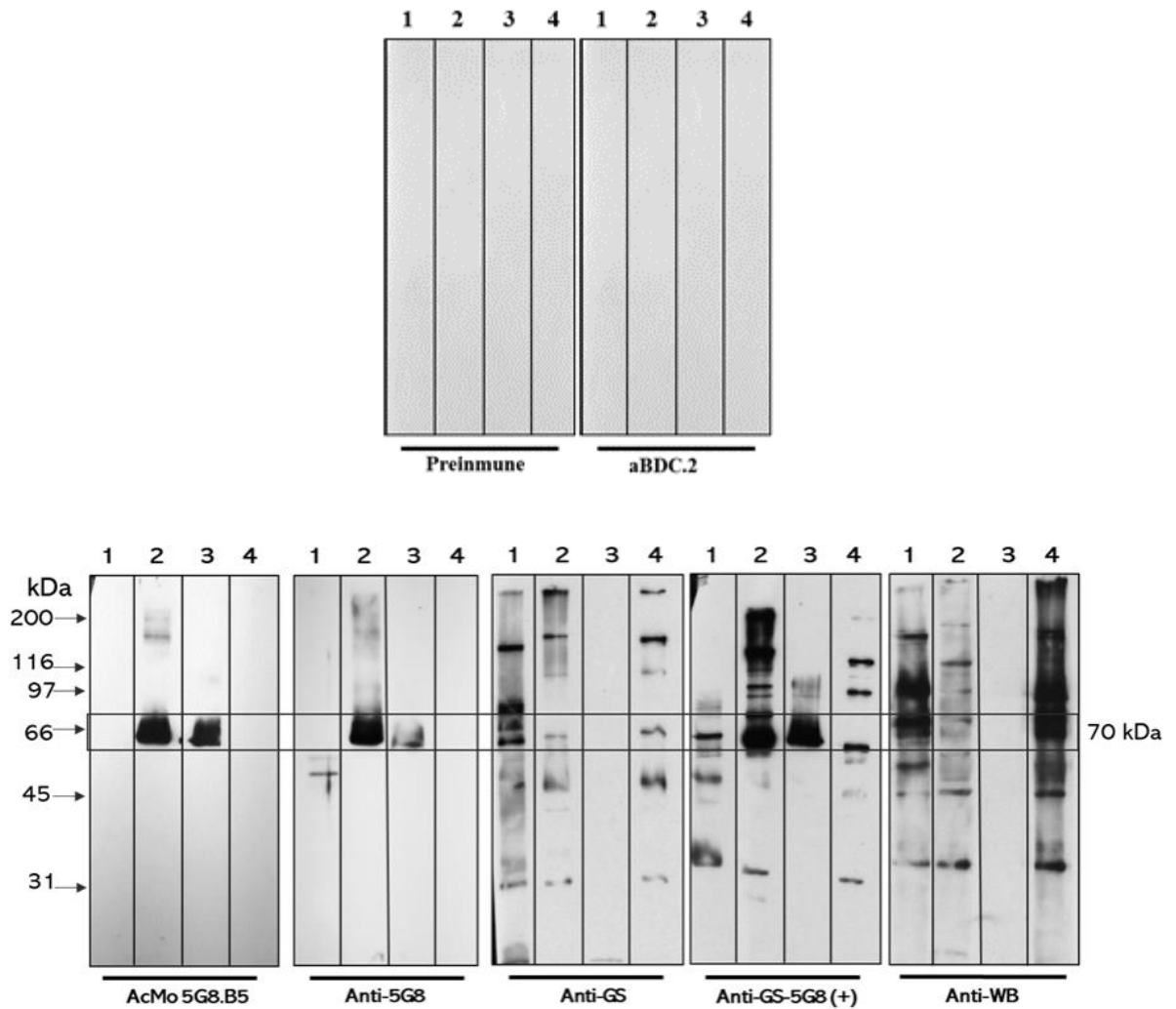


Figura 6. La proteína 5G8 es una de las proteínas principalmente reconocidas por la respuesta inmune humoral. Inmunorreconocimiento de los anticuerpos policlonales evaluado mediante Western Blotting. Lisado total de GS (1), lisado total de GS-5G8 (+) (2), PM-5G8 (3), lisado total de WB-C6 (4).

Los Anticuerpos Específicos Para la Proteína 5G8 Aglutinan e Inhiben el Crecimiento de Trofozoítos de *Giardia lamblia* *in vitro*

Por antecedentes del grupo de investigación y resultados obtenidos en esta tesis, sabemos que la proteína 5G8 es capaz de inducir una respuesta inmune humoral, sin embargo no se conoce cuales son los posibles mecanismos efectores contra los trofozoítos de *G. lamblia*. Para evaluar este aspecto se realizaron ensayos *in vitro*. Primeramente se evaluó si los anticuerpos tenían capacidad de aglutinar los trofozoítos, se incubaron 1×10^6 trofozoítos de la cepa GS-5G8 (+) con los anticuerpos policlonales anti-5G8 y el anticuerpo monoclonal AcMo 5G8.B5 en agitación a 4 °C. Después de 30 minutos se observaron agregados en los trofozoítos tratados con 5 µg/mL de AcMo 5G8.B5 (Figura 7D) y hasta la dilución 1:2500 de los anti-5G8 (Figura 7E). Posteriormente se realizaron ensayos de crecimiento *in vitro*, donde se colocaron 1×10^5 /mL trofozoítos de GS-5G8 (+) en incubación con los anticuerpos específicos hacia la proteína 5G8, y se realizó cuenta celular a las 48, 72 y 96 horas posteriores. El cultivo celular de los trofozoítos de GS-5G8 (+) tratados con 1 µg/mL de AcMo 5G8.B5 y una dilución 1:2500 de anti-5G8 tuvo una disminución en su crecimiento a las 72 horas y 96 horas, comparado con los controles, y (Figura 8). Los trofozoítos no se agregaron y crecieron en cultivo en los tratamientos control, PBS, anticuerpo aBDC.2 y suero preinmune.

La Proteína 5G8 es Capaz de Inducir una Respuesta Inmune Humoral Sistémica y Local Mediante Inmunización Oral en un Modelo Murino

Con el objetivo de determinar si la proteína 5G8 de *G. lamblia* tiene un papel protector en la infección por el parásito, se utilizó el modelo murino, debido a que se ha reportado la susceptibilidad a la infección por *Giardia* (Byrd y col.,1994) y por la facilidad en la manipulación del modelo. Se generaron 4 grupos conformados por 5 ratones de la cepa C3H/HeJ a los cuales se les administró tratamientos vía oral, con 3 refuerzos.

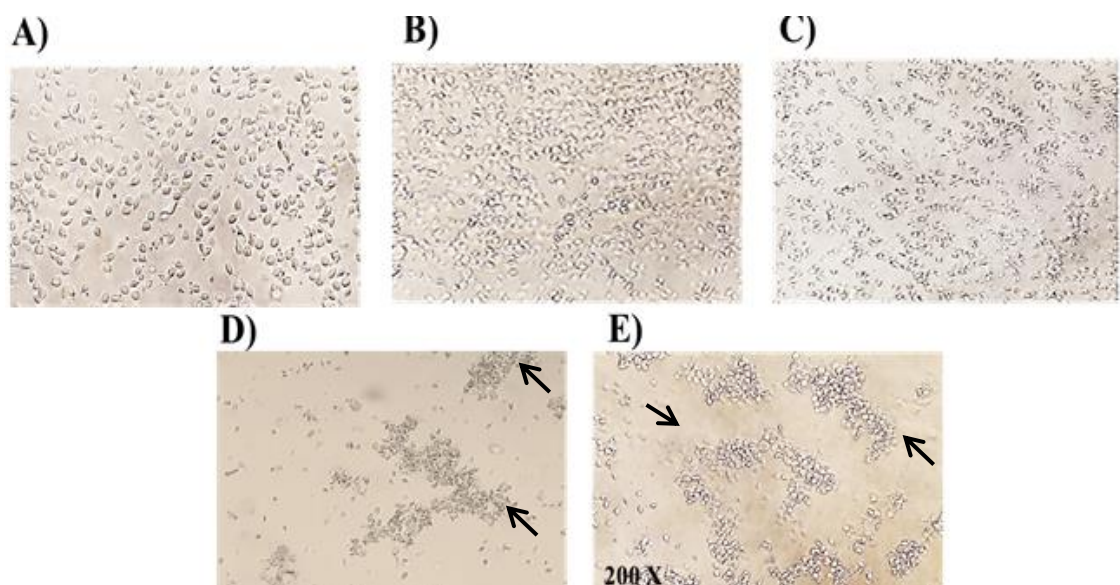


Figura 7. Los anticuerpos específicos para 5G8 aglutinan trofozoítos de *Giardia lamblia* *in vitro*. Microscopía de trofozoítos GS-5G8 (+) incubados con diferentes tratamientos. **A)** Tratamiento sin anticuerpos (PBS). **B)** Anticuerpo monoclonal aBDC.2 (control de isotipo). **C)** Suero preinmune. **D)** AcMo 5G8.B5. **E)** Anticuerpos policlonales anti-5G8.

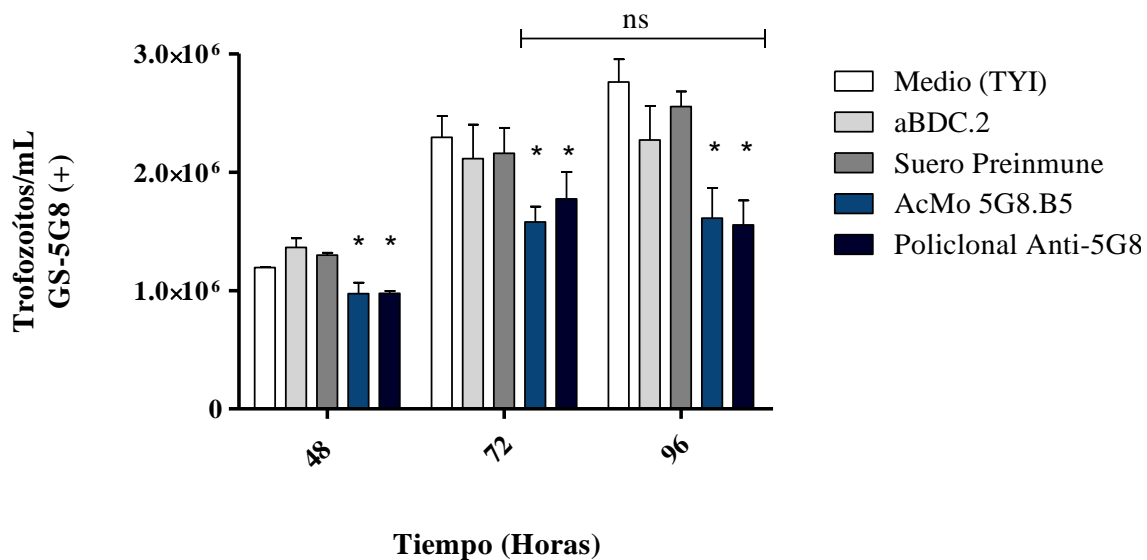


Figura 8. Los anticuerpos específicos para 5G8 inhiben el crecimiento *in vitro* de trofozoítos de *Giardia lamblia*. Conteo de trofozoítos de GS-5G8 (+) incubados con diferentes tratamientos a las 48, 72 y 96 horas. * Diferencia estadísticamente significativa con respecto a los controles. **ns**: No diferencia estadísticamente significativa.

El grupo 1 fue tratado con PBS, como control. Los tratamientos de los grupos restantes incluyeron el adyuvante de mucosas CTB. El grupo 2 fue tratado sólo con CTB. El grupo 3 fue tratado con la proteína BSA, como control de proteína irrelevante a *Giardia* y por la similitud en peso molecular con la proteína 5G8. El grupo 4 fue tratado con la proteína 5G8. Todos los grupos se sometieron a un reto de infección con 5×10^6 de trofozoítos de la cepa GS-5G8 (+) y fueron sacrificados a los 7 días posteriores a la infección (Figura 9). Primeramente con los sueros y heces recolectados se evaluó la activación de la respuesta inmune humoral de tipo IgG e IgA respectivamente mediante Western Blotting. Los anticuerpos IgG séricos de los ratones estimulados con la proteína 5G8 reconocieron a la banda de 70 kDa (Figura 10 A, carril 2 y 3), evidenciando que la proteína 5G8 tiene la capacidad de estimular una respuesta inmune humoral sistémica mediante la administración vía oral. Sin embargo también se observa el reconocimiento por la banda de 120 y 140 kDa, esto nos habla de la posibilidad de que existan interacciones de la proteína 5G8 con otras proteínas o consigo misma. Al evaluar el reconocimiento de los anticuerpos IgA, también se reconoció la banda de 70 kDa en el lisado GS-5G8 (+) (Figura 10 A, carril 2), pero no fue así con la proteína 5G8 (Figura 10 A, carril 3), posiblemente por el previo proceso de electroforesis de esta proteína, el cual puede ser desnaturizante (Velazquez y col., 2005). Los ratones de los grupos 1, 2 y 3 no generaron anticuerpos IgG e IgA hacia la proteína 5G8 (Anexo 11).

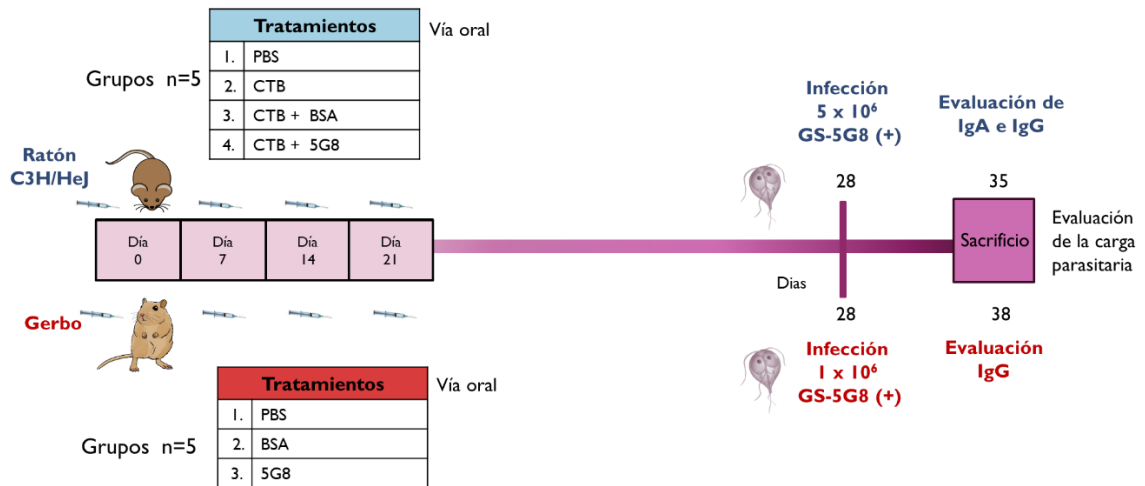


Figura 9. Esquema experimental del ensayo de protección con la proteína 5G8. Se utilizaron dos modelos de experimentación, ratones de la cepa C3H/HeJ y gerbos. Cada grupo conformado por 5 animales. Tratamiento con la proteína 5G8, y tratamientos control: PBS, CTB, CTB + BSA en ratones, y PBS, BSA en gerbos.

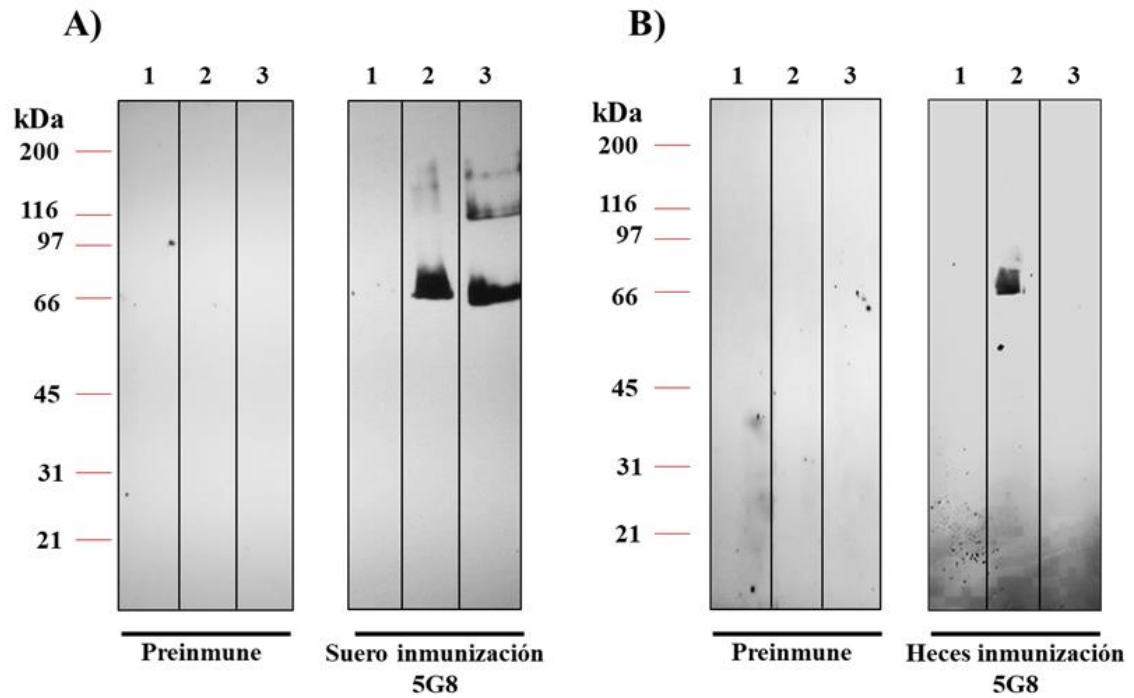


Figura 10. La proteína 5G8 es capaz de inducir una respuesta inmune humoral sistémica y local mediante inmunización oral en un modelo murino. Se evaluó la activación de la respuesta inmunes humoral hacia la proteína 5G8 mediante Western Blotting. **A)** Detección de anticuerpos IgG séricos. **B)** Detección de anticuerpos IgA fecales. Lisado total de WB-C6 (1), lisado total de GS-5G8 (+) (2), proteína 5G8 (3).

La Proteína 5G8 Fue Capaz De Estimular Esplenocitos De Ratones Infeccionados Con *G. Lambli*

Cuando un antígeno es capaz de despertar una respuesta inmune, las células implicadas en esta respuesta se activan y se induce una proliferación debido al proceso de expansión clonal, se basó en este principio para evaluar si los esplenocitos de los ratones del ensayo de protección podían ser estimulados *in vitro* con la proteína 5G8. Una vez llegado el día 35 de sacrificio, se aislaron esplenocitos de los ratones y fueron incubados *in vitro* durante 96 horas en presencia de diferentes concentraciones de lisado total de WB-C6, GS-5G8 (+), proteína BSA, proteína 5G8 y como control de estimulación se utilizó el mitógeno PHA. La proliferación celular se evaluó cuantitativamente mediante el procedimiento descrito por Mosmann, en el cual se mide la reducción del compuesto MTT a sales de tetrazolio por las células viables (Mosmann, 1983). Los esplenocitos de los grupos de ratones bajo los tratamientos de PBS, CTB y CTB + 5G8 tuvieron una estimulación estadísticamente significativa con antígenos de *G. lambli*, entre ellos la proteína 5G8, esto puede ser explicado debido a que todos los ratones estuvieron bajo condiciones de infección con trofozoítos GS-5G8 (+) el día 28 (Figura 11). Ensayos previos en nuestro equipo de investigación, los esplenocitos de ratones no infectados bajo diferentes estímulos *in vitro* no mostraron proliferación estadísticamente significativa, descartando un efecto mitogénico por parte de la proteína 5G8 (Samaniego, 2016).

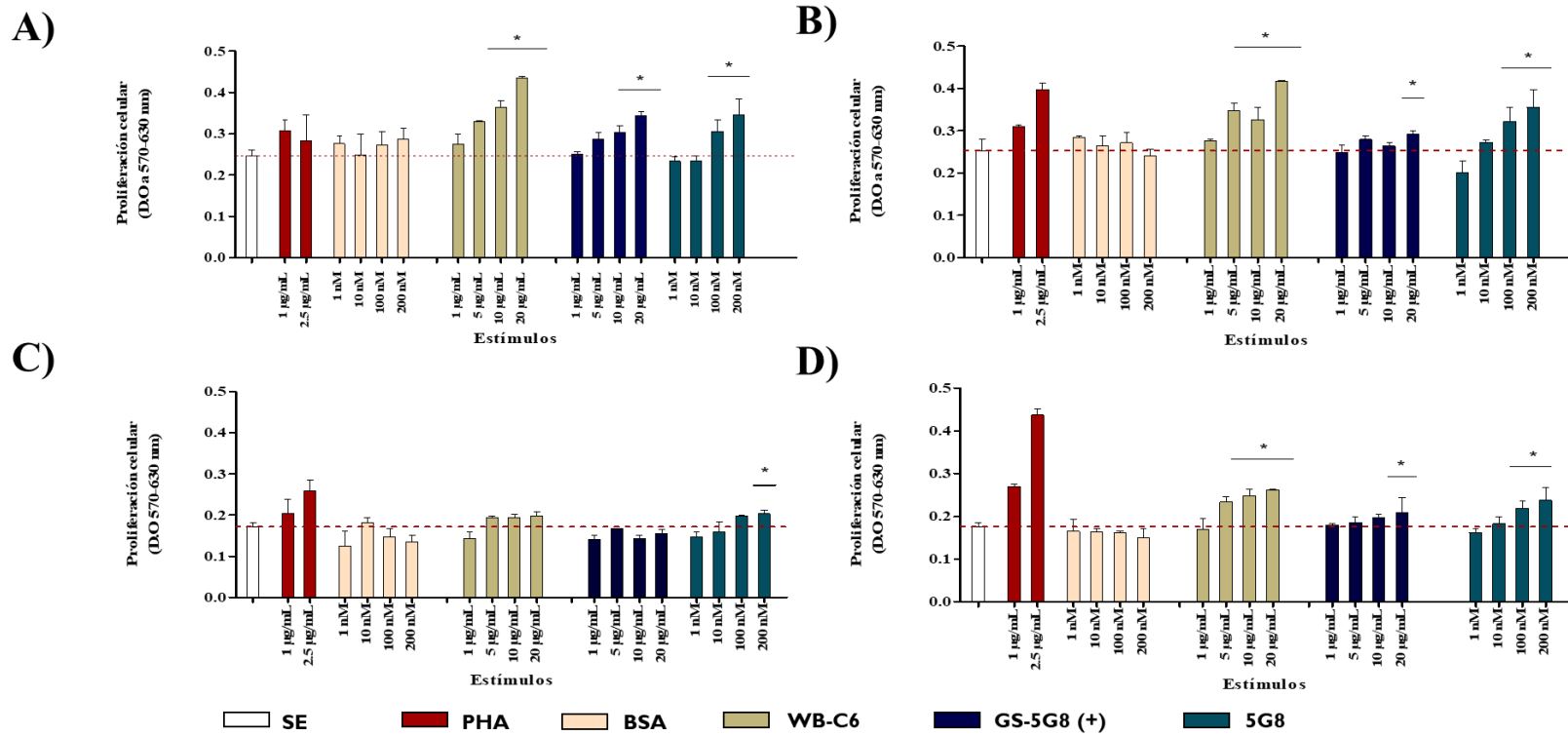


Figura 11. La proteína 5G8 estimula la proliferación de esplenocitos de ratones infectados con *G. lamblia* a las 96 horas. Evaluación cuantitativa de la proliferación de esplenocitos con diferentes estímulos a las 96 horas mediante MTT. SE: sin estímulo. * Diferencia estadísticamente significativa con respecto al SE.

Evaluación de la Carga Parasitaria de Trofozoítos de *G. lamblia* en Ratones Inmunizados Vía Oral con la Proteína 5G8

Como se explicó en los resultados anteriores, la proteína 5G8 fue capaz de activar una respuesta inmune humoral de tipo sistémica y secretora mediante inmunización vía oral, sin embargo para determinar un papel protector, faltaba confirmar si esa respuesta inmune activada por la proteína tenía la capacidad de proteger de la infección por *G. lamblia*. Para eso se evaluó la carga parasitaria de los ratones del ensayo de protección en el día 35, los ratones de cada grupo fueron sacrificados y se diseccionó la parte superior del intestino delgado, realizando cortes longitudinales y realizando lavados con PBS para posteriormente recuperar y cuantificar la carga parasitaria. En promedio los trofozoítos recuperados en el grupo tratado con la proteína 5G8 al igual que aquellos ratones de los grupos controles fue entre 1×10^4 y 2×10^4 (Figura 12), lo cual representa menos del 1% con respecto al inóculo inicial que fue de 5×10^6 trofozoítos, estas condiciones experimentales nos ofrecen limitaciones para determinar nuestro objetivo del papel protector.

La Proteína 5G8 es Capaz de Inducir una Respuesta Inmune Humoral Sistémica Vía Oral sin la Presencia de Adyuvante en un Modelo Gerbil

Debido al resultado mencionado anteriormente en el modelo murino, se optó por utilizar otro modelo experimental, el gerbo, que también es un roedor susceptible a la infección por *Giardia* (Belosevic y col., 1983). Existen estudios que demuestran que el modelo gerbil permite recuperaciones superiores al 1×10^6 de trofozoítos (Serradell y col., 2018; Valdez, 2015), esta característica podría brindar experimentalmente condiciones para observar diferencias entre tratamientos y poder evaluar un potencial papel protector de la proteína 5G8. Se realizó un experimento similar al modelo murino, con ciertas modificaciones (Figura 9). Se formaron 3 grupos conformados con 5 gerbos cada uno, los cuales recibieron tratamientos vía oral, sin la presencia de algún adyuvante, el grupo 1 fue tratado con PBS, como control. El grupo 2 tratado con BSA y el grupo 3 tratado con la proteína 5G8 (a cada ratón se le administró 50 μ g y se realizaron 4 inmunizaciones).

Después de 7 días posterior al último refuerzo, todos los gerbos fueron infectados con 1×10^6 trofozoítos de la cepa GS-5G8 (+), y 10 días posteriores a la infección fueron sacrificados, para recuperar carga parasitaria y suero mediante punción cardíaca. Primeramente, se evaluó si los gerbos desarrollaron una respuesta inmune humoral sistémica contra la proteína 5G8, los gerbos que fueron tratados con la proteína reconocieron la banda de 70 kDa (Figura 13, carril 2 y 3) y al igual que en el caso de los ratones inmunizados con la proteína 5G8, se reconocieron otras bandas con diferentes pesos moleculares. Cabe mencionar que los 3 grupos experimentales estuvieron expuestos a trofozoítos de *G. lamblia* durante el proceso de infección, a pesar de esto, los gerbos que recibieron tratamientos control (PBS y BSA) no desarrollaron anticuerpos contra la proteína 5G8 (Figura 13).

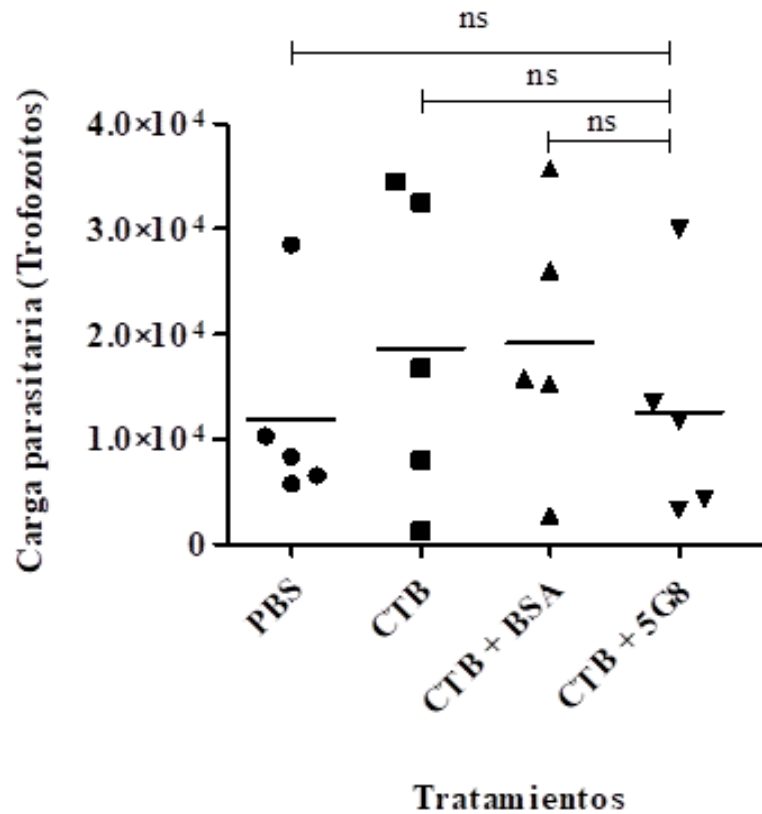


Figura 12. Recuperación de trofozoítos de *G. lamblia* en ratones inmunizados vía oral con la proteína 5G8. Al día 35 del ensayo de protección se realizó conteo de los trofozoítos recuperados de la parte superior del intestino delgado de los ratones que estuvieron bajo diferentes tratamientos oral, PBS, CTB, CTB + BSA y CTB + 5G8. **ns:** No diferencia estadísticamente significativa. Cada viñeta representa un ratón.

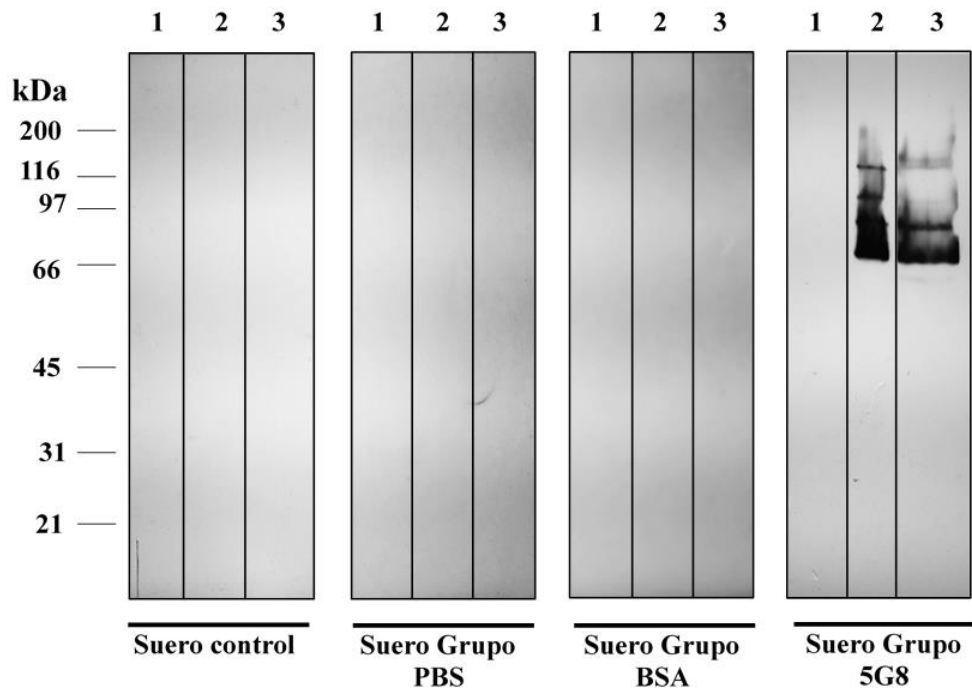


Figura 13. La proteína 5G8 es capaz de inducir una respuesta inmune humoral sistémica mediante inmunización oral en un modelo gerbil. Se evaluó la activación de la respuesta inmunes humoral hacia la proteína 5G8 mediante Western Blotting. Se utilizaron los sueros obtenidos mediante punción cardíaca de los gerbos del ensayo de protección. Lisado total de WB-C6 (1), lisado total de GS-5G8 (+) (2), proteína 5G8 (3).

Evaluación de la Carga Parasitaria de Trofozoítos y Quistes de *G. lamblia* en Gerbos Inmunizados Vía Oral con la Proteína 5G8

Observando que en el modelo gerbil, la proteína también fue capaz de inducir una respuesta inmune humoral, pero esta vez sin presencia de un adyuvante. Se prosiguió a evaluar el papel protector de dicha respuesta inmune mediante el conteo de trofozoítos y evaluación de la excreción de quistes. Al igual que con los ratones, los gerbos de cada grupo fueron sacrificados y se diseccionó la parte superior del intestino delgado, realizando cortes longitudinales y lavados con PBS para posteriormente recuperar y cuantificar la carga parasitaria. Durante la fase experimental de infección, se presentaron algunos decesos en cada uno de los grupos, quedando una n final en los grupos como se mencionan a continuación: 3 en el grupo PBS, 1 en el grupo BSA y 4 en el grupo 5G8 . Se realizó la evaluación de la excreción de quistes y se recolectaron heces de cada uno de los grupos desde siete días posterior a la infección hasta el día del sacrificio, se observaron las heces en fresco y se realizó la técnica de Faust para el aislamiento de quistes. En los gerbos del grupo tratado solo con PBS excretaron un mayor número de quistes de *G. lamblia*, 1.18×10^5 , en comparación del grupo tratado con la proteína 5G8, en donde se recuperaron 0.26×10^5 (Figura 14 A), lo cual sugiere un posible control de la giardiasis en este grupo. En el grupo BSA no se encontraron quistes en heces, sin embargo se puede deber a la n reducida en este grupo. Otro aspecto evaluado fue la carga parasitaria intestinal, en los gerbos se recuperó una mayor cantidad de trofozoítos en comparación al ensayo con los ratones, sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y el grupo tratado con la proteína 5G8 (Figura 14 B).

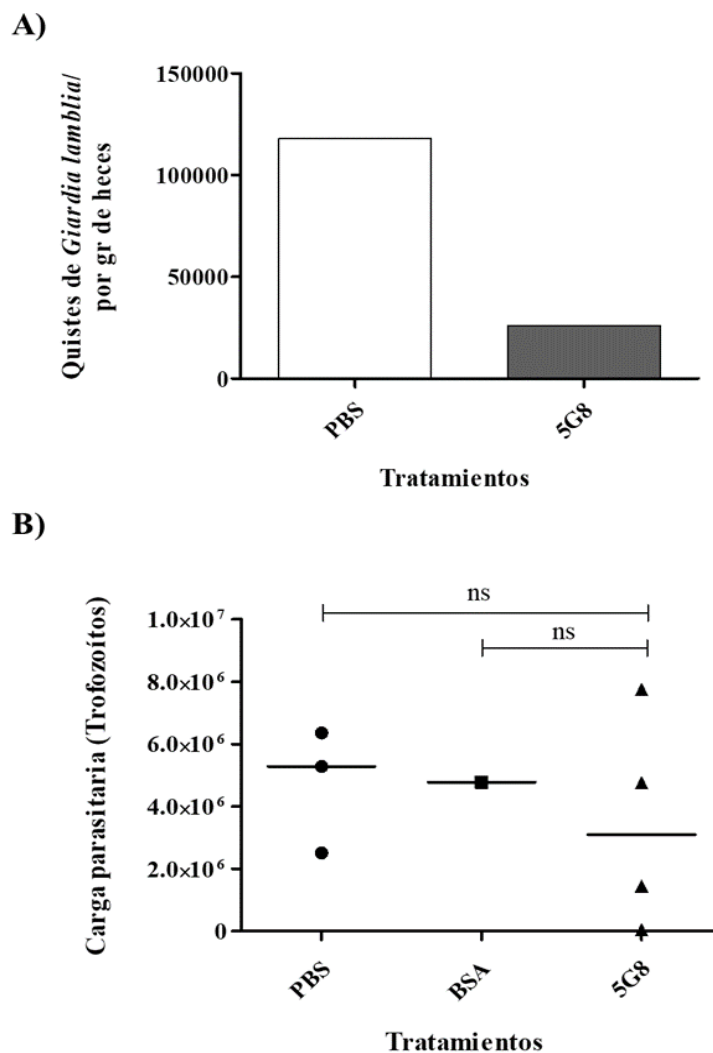


Figura 14. Evaluación de la carga parasitaria de trofozoítos y quistes de *G. lamblia* en gerbos inmunizados vía oral con la proteína 5G8. **A)** Recuperación de quistes en heces de gerbos. Se analizaron heces desde 7 días posteriores a la infección hasta el día del sacrificio. **B)** Recuperación de trofozoítos en intestinos de gerbos. Al día 38 del ensayo de protección se realizó conteo de los trofozoítos recuperados de la parte superior del intestino delgado de los gerbos que estuvieron bajo diferentes tratamientos oral, PBS, BSA y 5G8. **ns:** No diferencia estadísticamente significativa. Cada viñeta representa a un gerbo.

Los Epítopes de Células B de la Proteína 5G8 se Conservan Entre la Familia de VSPs

Conocer los epítopes de una proteína nos ayuda a entender mejor la respuesta inmune específica que pueden activar. Con la finalidad de conocer las secuencias que pueden ser reconocidas por los receptores B y las inmunoglobulinas, se realizó una predicción *in silico* de epítopes para células B utilizando los siguientes servidores: BepiPred, FBCPred, AAPPred, ABCPred, SVMTrip y LEPS con la finalidad de obtener resultados con reproducibilidad independientemente de los algoritmos utilizados en cada servidor. Se seleccionaron las 7 primeras secuencias con una mayor probabilidad a ser reconocidas por la respuesta inmune humoral (Tabla II), el epítopo del aminoácido 184 al 201 es también seleccionado por el programa SYFPEITHI como epítopo de células T (Quintero y col., 2017). Adicionalmente, los epítopes de células B fueron ubicados en la secuencia de aminoácidos de la proteína 5G8 (Figura 15). Posteriormente se quiso conocer si las secuencias de los epítopes predichos se encontraban conservados en otras VSPs, dado que es una familia de proteínas con dominios conservados se realizó un análisis de homología (blastp) donde se seleccionaron 18 VSP con un porcentaje de identidad con la proteína 5G8 mayor al 40 % (Tabla III y Anexo 12), dentro de las secuencias de estas VSPs se ubicaron los epítopes predichos y se estableció un grado de conservación. Los 7 epítopes de células B seleccionados se encuentran conservados en otras VSPs, incluyendo proteínas variables de superficie de los ensamblajes A, B y E (Figura 16).

Tabla II. Secuencias de los epítomos lineales de células B de la proteína 5G8 de *G. lamblia*.

| | Secuencia | Posición | | Longitud (No. de aminoácidos) | Puntaje |
|---|----------------------|----------|-------|-------------------------------|---------|
| | | Comienzo | Final | | |
| 1 | FVLEGSNCVKSDCSTENCKT | 226 | 245 | 20 | 0.919 |
| 2 | YGDDPTKGTCGEGCTTGTGK | 347 | 366 | 20 | 0.919 |
| 3 | KDYITDDTSSEPNGKTCK* | 184 | 201 | 18 | 0.911 |
| 4 | DSCVACGDENCATCTVGA | 130 | 145 | 18 | 0.911 |
| 5 | TGPVLCYLVRDSASVNKGGL | 555 | 574 | 20 | 0.870 |
| 6 | GCAECTNSDSC TTCASGY | 472 | 489 | 18 | 0.867 |
| 7 | CSQCYTTSEAPVDGVCTAST | 43 | 62 | 20 | 0.736 |

El puntaje que se muestra es un promedio de los puntajes obtenidos en los servidores utilizados.

*Secuencia conservada en la predicción de epítomos de células T por el programa SYFPEITHI.



Figura 15. Ubicación de epítopes para células B en la secuencia de aminoácidos de la proteína 5G8. Número de los epítopes basados en la Tabla III. Epítotope No.1 (color morado) epítotope No. 2 (color azul), epítotope No. 3 (color amarillo), epítotope No.4 (color anaranjado), epítotope No.5 (color rojo), epítotope No.6 (color gris) y epítotope No.7 (color verde).

Tabla III. Análisis de homología de la proteína 5G8 con otras proteínas de la familia de VSPs.

| | Nombre | Ensamble | Aminoácidos | Identidad (%) | Cobertura (%) |
|----|----------------|-----------------|--------------------|----------------------|----------------------|
| 1 | QR46_3107 | B | 607 | 97 | 100 |
| 2 | GSB_155403 | B | 379 | 99 | 97 |
| 3 | QR46_2660 | B | 352 | 76 | 94 |
| 4 | GSB_153033 | B | 732 | 70 | 87 |
| 5 | GSB_154953 | B | 679 | 63 | 100 |
| 6 | GSB_152640 | B | 683 | 60 | 94 |
| 7 | GSB_153115 | B | 646 | 55 | 100 |
| 8 | GSB_153790 | B | 646 | 54 | 100 |
| 9 | TSA4 | A | 713 | 51 | 97 |
| 10 | GLP15_2640 | E | 745 | 48 | 100 |
| 11 | QR46_4433 | B | 860 | 47 | 92 |
| 12 | DHA2_150893 | A | 702 | 46 | 100 |
| 13 | DHA2_153020 | A | 608 | 45 | 100 |
| 14 | WB/9B10-B | A | 667 | 43 | 100 |
| 15 | GLP15_2 | E | 654 | 43 | 100 |
| 16 | DHA2_151647 | A | 741 | 42 | 100 |
| 17 | GL50803_113439 | A | 727 | 42 | 100 |
| 18 | GLP15_625 | E | 682 | 42 | 99 |

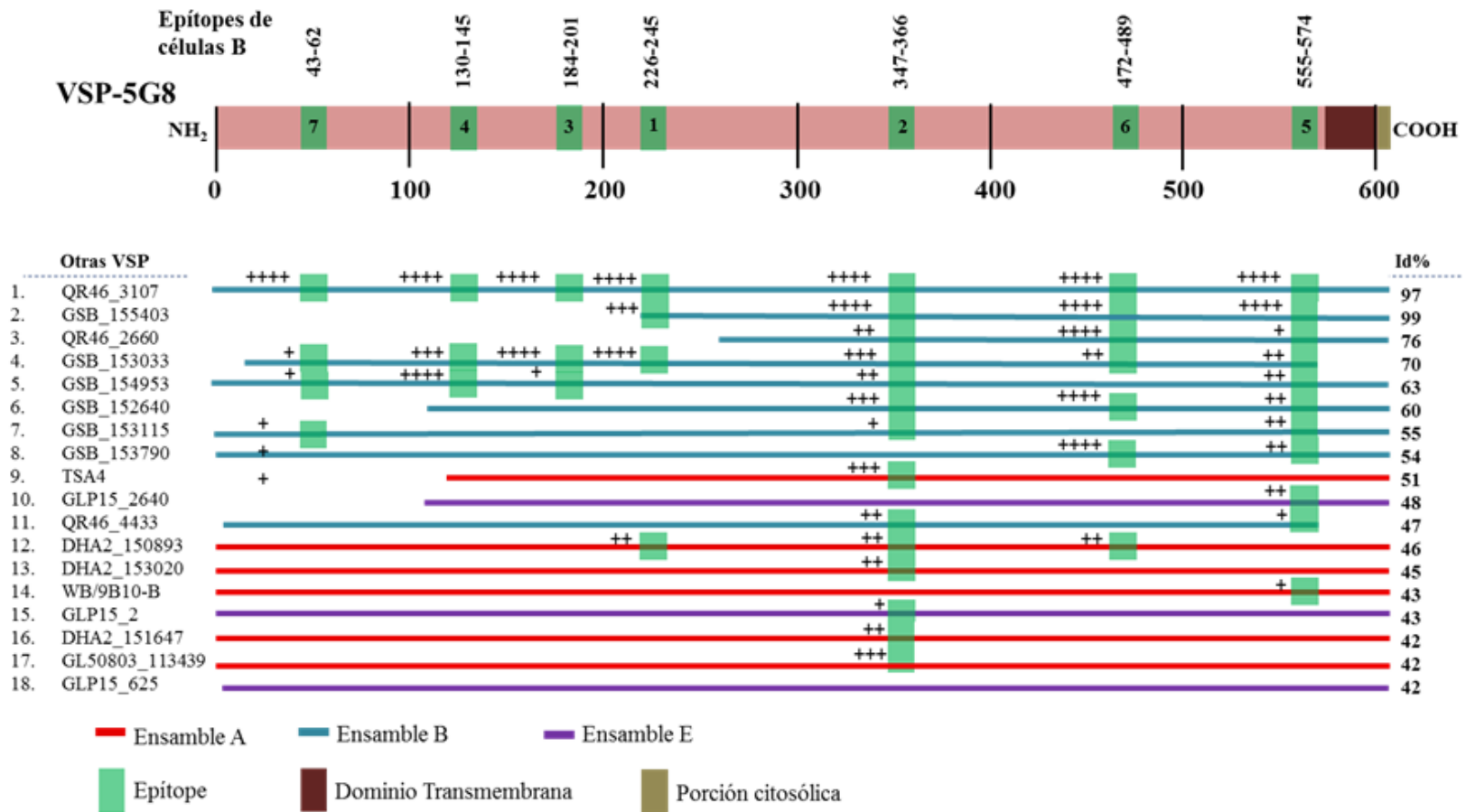


Figura 16. Los epítopes de células B de la proteína 5G8 se encuentran conservados en otras VSPs. BLAST de proteínas VSPs con respecto a la proteína 5G8. El grado de conservación se estableció por sistema de cruces, > 90 % (++++), 75-90 % (+++), 50-75 % (++) y < 50 % (+). Id %: porcentaje de identidad.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se realizaron diversos análisis, entre ellos ensayos *in vitro*, *in vivo* y la aplicación de herramientas bioinformáticas con la finalidad de caracterizar la respuesta inmune humoral contra la proteína 5G8, así como el posible papel protector que pudiera presentar en la infección por *G. lamblia*.

Como se mencionó anteriormente, nuestro grupo de investigación caracterizó a la proteína 5G8 como un miembro de la familia de proteínas variable de superficie de *G. lamblia* (Quintero y col., 2017). Estas proteínas presentan diferentes características que las hacen un objeto de estudio para comprender ciertos mecanismos patogénicos del parásito. Primeramente son expresadas altamente en la superficie del trofozoíto de *Giarda*, como familia de proteínas conservan dominios, encontrados principalmente en el extremo carboxi-terminal (Mowatt y col., 1991), pero también presentan secciones diversas principalmente en el término amino, que es la parte que se interconecta más directamente con el intestino y con las respuestas inmunitarias locales del hospedero (Nash, 2002). Los análisis moleculares reportan que se han encontrado aproximadamente 200 genes para estas proteínas, y que su expresión esta regulada por un sistema que comprende la maquinaria de interferencia de ARN (Prucca y col., 2008), lo cual genera que sola una VSP sea expresada en la membrana del trofozoíto por vez, aunque no se conocen los mecanismos por los cuales es activado, se ha propuesto que la respuesta inmune, principalmente anticuerpos anti-VSP juegan un papel importante en el inicio del recambio de una VSP por otra (Gargantini y col., 2016).

En este trabajo se obtuvieron resultados que demuestran que la respuesta inmune humoral reconoce a la proteína 5G8, los ratones inmunizados con un lisado total de trofozoítos de la cepa GS-5G8 (+) reconocieron a la banda de 70 kDa del lisado de la misma cepa, como también en sus proteínas de membrana. En estudios previos, se ha observado un reconocimiento hacia esta banda de 70 kDa por anticuerpos IgG e IgA de ratones infectados y reinfectados con la cepa GS/M-83-H7 (Velazquez y col., 2005), pero sin tener conocimiento previo de que la proteína 5G8 tenía el mismo peso molecular. El

emplear el modelo de inmunización con un lisado total de trofozoítos nos permitió evaluar la posible activación ante proteínas tanto extracelulares como intracelulares, teniendo una mayor exposición de proteínas para el sistema inmunológico, sin embargo, los anticuerpos generados reconocieron predominantemente a la proteína 5G8. Al comparar la respuesta humoral generada por los lisados de las cepas GS y GS-5G8 (+), pudimos encontrar diferencias en el patrón de reconocimiento entre cepas, aunque la cepa GS-5G8 (+) es sólo un enriquecimiento de trofozoítos que expresan altamente la proteína 5G8, provenientes de la cepa GS, la diferencia en la expresión de esta proteína entre las cepas pudiera generar respuestas inmunológicas diferentes. La cepa GS, también pudiera estar expresando otra VSP, debido a que se ha reportado que este aislado, prototípico para el ensamble B, puede realizar el recambio de VSPs una vez cada 6.5 generaciones más rápido que el ensamble A (Nash y col., 1990), sin embargo, se necesita realizar experimentos adicionales para confirmar lo mencionado anteriormente.

El control de la giardiasis por el hospedero requiere mecanismos inmunológicos humorales y celulares de la mucosa, como parte de una respuesta equilibrada. Conocemos que la proteína 5G8 es una proteína inmunogénica capaz de activar una respuesta inmune humoral, sin embargo, se ha cuestionado la relevancia de los anticuerpos en los mecanismos efectores para la eliminación de *G. lamblia*. Ratones deficientes en células B infectados con *G. lamblia* y *G. muris* pueden eliminar ambas especies (Singer & Nash, 2000), en contraste se ha demostrado que ratones deficientes en la producción de anticuerpos, principalmente de tipo IgA, no logran eliminar *G. lamblia* y *G. muris* (Langford y col., 2002). Adicionalmente se han realizado estudios *in vitro* para evaluar el papel de anticuerpos monoclonales anti-VSP contra *Giardia*. Los anticuerpos agregaron trofozoítos y fueron citotóxicos independientes del complemento (Nash & Aggarwal, 1986). Por lo tanto, la respuesta inmune humoral es importante en los mecanismos efectores contra el parásito. Por este motivo se realizaron ensayos enfocados en determinar posibles efectos que pudieran tener los anticuerpos anti-5G8. Se adicionó a cultivos de *Giardia* de la cepa GS-5G8 (+) el anticuerpo monoclonal 5G8.B5 y los anticuerpos policlonales contra la VSP, se observó que ambos anticuerpos agregaron los trofozoítos y

que inhibieron su crecimiento después de 48 horas en cultivo. Se ha reportado que anticuerpos dirigidos al término amino son citotóxicos en cultivos *in vitro* (Luján & Svärd, 2011). Trabajos adicionales serían necesarios para determinar las secciones que son reconocidas por estos anticuerpos y así poder correlacionar los efectos de la respuesta inmune humoral con aspectos estructurales de la VSP-5G8.

Siendo *Giardia* un parásito intestinal, se esperaría que sólo la inmunidad humoral en mucosas interviniera en el control de la infección, como los anticuerpos IgA, sin embargo, los anticuerpos anti-5G8 pudieran estar implicados en el control de la giardiasis. Aunque los anticuerpos evaluados son de isotipo IgG, se ha identificado que el receptor de Fc neonatal (FcRn), es un receptor expresado en muchas especies y es específico para que anticuerpos IgG sean transportados activamente a la luz intestinal (Baker y col., 2010), este mecanismo es capaz de estimular respuestas específicas de antígeno (Qiao y col., 2008; Yoshida y col., 2004). Los anticuerpos tienen diversos mecanismos efectores tales como neutralizar, opsonizar y activar la vía clásica del complemento. Específicamente el AcMo 5G8.B5 es de subclase IgG2b, los anticuerpos IgG2 al igual que otros isotipos tienen la capacidad de unirse a la molécula C1q y comenzar la cascada de señalización para la activación del complemento, también es uno de los isotipos que se une más fuertemente al FcRn (Vidarsson y col., 2014).

Caracterizar los mecanismos inmunológicos hacia un antígeno de *Giardia* y la evaluación del papel protector que pudiera tener esa respuesta inmune en la infección, nos ayuda no solo a comprender la interacción hospedero-parásito, sino también a generar una línea de investigación enfocada en el desarrollo de medidas profilácticas contra parásitos. Por este motivo se aplicó el fundamento de inmunización activa en un modelo de infección murino, una de las estrategias ampliamente utilizadas en el desarrollo de vacunas. A ciertos ratones C3H/HeJ se les suministró vía oral la proteína 5G8 y a otros la proteína BSA, en conjunto con el adyuvante de mucosas CTB en ambos casos, esta molécula ha sido utilizada como potenciadora de la respuesta inmune en mucosas en múltiples estudios (Kuipers y col., 2016; Larocque y col., 2003; Wu & Russell, 1993), esta subunidad pentamérica B de la toxina colérica se une al monosialotetrahexosil gangliósido (GM1)

encontrado en una variedad de células entre ellas células epiteliales del intestino y en células presentadoras de antígenos como macrófagos, células dendríticas y células B, permitiendo un acceso óptimo al sistema inmunológico (Stratmann, 2015). Sólo los ratones inmunizados con la proteína 5G8 desarrollaron una respuesta inmune antígeno específica tanto secretora (IgA) como sistémica (IgG). Otro aspecto a mencionar es que los esplenocitos aislados de ratones infectados con trofozoítos GS-5G8 (+) mostraron una estimulación *in vitro* a las 96 horas de haber estado en cultivo con antígenos de *Giardia* y la proteína 5G8, evidenciando la capacidad de activación y proliferación de células con capacidad de reconocimiento específico hacia antígenos de *Giardia*. Sin embargo, el modelo murino no nos proporcionó las condiciones experimentales adecuadas en la carga parasitaria, esto con la finalidad de evaluar si la respuesta inmune anti-5G8 tenía la capacidad de proteger de la infección por *Giardia*, debido a que en todos los grupos de ratones incluyendo los que estuvieron bajo tratamiento control, se recuperó menos del 1 % del inóculo inicial de infección. Aunque se ha demostrado que los ratones C3H/HeJ son una cepa susceptible a *Giardia* (Byrd y col., 1994), también se ha evidenciado que ratones libres de gérmenes infectados con *Giardia* no desarrollan patologías intestinales en comparación con ratones gnotobióticos con microbiota duodenal de pacientes con giardiasis y ratones convencionales, lo que sugiere la necesidad de microorganismos intestinales para estimular la patología en este modelo (Torres y col., 2000).

Otro modelo importante para la giardiasis es el gerbo (*Meriones unguiculatus*). Los gerbos adultos pueden infectarse con diferentes cepas de *G. lamblia* (Aggarwal & Nash, 1987; Belosevic y col., 1983), así como también es un roedor muy susceptible a la infección, observando cambios histológicos como inflamación del intestino delgado superior, acortamiento de las vellosidades en el duodeno, aumento significativo en el tamaño de placas de Peyer e infiltración mononuclear en la mucosa durante la infección (Buret y col., 1992; Rivero y col., 2010). Los gerbos utilizados para replicar el ensayo de protección fueron estimulados con la proteína 5G8 y también con tratamientos control como PBS y proteína BSA, al igual que en los ratones, sólo los gerbos inmunizados oralmente con la VSP-5G8 generaron anticuerpos IgG antígeno-específicos. Una variante

al ensayo realizado con el modelo murino, fue que en los gerbos las proteínas fueron empleadas sin la presencia de un adyuvante, esto nos habla de la capacidad que tiene la proteína 5G8 para poder generar una respuesta inmune suministrada vía oral. Sabemos que existen mecanismos inmunológicos involucrados en no activar una respuesta inmune contra antígeno administrados por vía oral, este proceso se llama tolerancia oral. La tolerancia oral es un proceso activo de respuestas inmunes locales y sistémicas (Commins, 2015) que se encuentra en un constante balance para poder discriminar entre las respuestas hacia bacterias comensales, antígenos inocuos y patógenos. Aquí se demuestra la capacidad de la proteína 5G8 de romper mecanismos inmunológicos que delimitan si se desarrolla tolerancia oral o se da una activación del sistema inmune hacia el antígeno. Esto abre un nuevo campo de investigación para el parásito, ningún estudio ha abordado la capacidad de las VSPs para romper la tolerancia oral, sólo en una patente se proponen a las proteínas VSP como moléculas transporte para el suministro oral de drogas (Klatzmann y col., 2016), sin embargo, las VSPs pudieran ser empleadas como adyuvantes de mucosa en el estudio de otros patógenos intestinales.

El modelo gerbil fue más útil al evaluar carga parasitaria, debido a que las tasas de recuperación de trofozoítos estuvieron por arriba del millón, esto concuerda con ciertas tasas de recuperación en estos roedores (Serradell y col., 2018; Valdez, 2015). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los trofozoítos recuperados entre el grupo 5G8 y los del tratamiento control. Esto puede deberse a que la n final de los grupos fueron menor al inicial, por lo que dicho experimento deberá repetirse aumentando la n de cada uno de los grupos, para poder distinguir una posible tendencia en el comportamiento de cada uno de los tratamientos empleados. Esto contribuirá y apoyará también al resultado de recuperación de quistes en las heces de los gerbos infectados, donde se observó una disminución en la excreción de quistes en los gerbos tratados con 5G8, lo cual sugiere un posible control de la giardiasis en este grupo. Otro aspecto a considerar es que puede que la respuesta inmune generada por el proceso de inmunización activa con la proteína 5G8 no sea suficiente para generar protección. Sin embargo, nuestra hipótesis de que la respuesta inmune anti-5G8 es capaz de proteger de

la infección, se basa en varios antecedentes, que refuerzan el importante papel de la proteína 5G8 en los procesos inmunológicos contra *Giardia*, tales como la inmunogenicidad de la proteína, los análisis de la potencial unión de ciertos epítopes de células T con el MHC II, y principalmente del papel protector del AcMo 5G8.B5 (Quintero y col., 2013; Quintero y col., 2017; Valdez, 2015; Velazquez y col., 2005).

Parte de la caracterización de un inmunógeno es conocer cuáles son las secuencias responsables de activar el sistema inmune. En este trabajo se emplearon herramientas bioinformáticas con la finalidad de identificar principalmente epítopes continuos de células B. Utilizamos varias bases de datos que han sido desarrolladas con la finalidad de identificar epítopes lineales, las cuales presentan una sensibilidad próxima al 80 % y una precisión en la predicción entre el 50 y 65 % (Soria y col., 2015; Yao y col., 2012). Se seleccionaron 7 epítopes más probables a ser reconocidos por anticuerpos, los cuales tienen una alta cobertura en la secuencia aminoácidica de la proteína 5G8 desde el término carboxilo al amino. Las VSPs tienen un alto contenido del aminoácido cisteína alrededor del 12 % (Nash, 2002), las cisteínas en estas proteínas no son reactivas, probablemente debido a la formación de enlaces disulfuro, a lo cual se le puede atribuir la resistencia a proteasas, por lo que los epítopes conformacionales juegan un papel importante en estas proteínas, sin embargo, los epítopes lineales son igual de importantes. En el momento de que un antígeno es reconocido por una célula presentadora de antígeno, como los linfocitos B, este es endocitado y se inicia el procesamiento de la proteína, fragmentándola y generando péptidos los cuales pueden unirse al MHC, y sólo algunos complejos MHC-péptidos son capaces de activar una respuesta inmune celular, por lo tanto, la identificación de epítopes lineales de células B, nos brinda información del puente que existe entre la respuesta inmune humoral y celular. Un ejemplo de lo mencionado anteriormente es que el aminoácido KDYYTDDTSSEPNGKTCK ubicado en la posición 184-201 es también identificado como un epítope de células T (Quintero y col., 2017).

Las VSPs son proteínas que poseen dominios conservados, por lo que fue de nuestro interés conocer si las secuencias de la proteína 5G8 identificadas como epítopes lineales se encuentran conservadas en otras VSPs. Primeramente se seleccionaron las

VSPs que en el análisis de homología dieron un porcentaje de identidad y cobertura mayor al 40 % y 80 % respectivamente. Como se ha descrito en la literatura un alineamiento múltiple de estas proteínas demostró que los dominios más conservados se encuentran en el carboxi-terminal, identificando también los motivos 1 y 2 (Anexo 12) descritos como determinantes para que las VSPs sean expresadas en la superficie del trofozoíto (Li y col., 2013). Cuando se ubicaron las secuencias de epítopes de células B para la proteína 5G8 en las secuencias de la otras VSPs, se encontró que todos los epítopes tenían un grado de conservación, no sólo en VSPs del ensamble B, del cual pertenece la cepa GS-5G8 (+) sino también en VSPs de otros ensambles como el A y el E. La conservación de estas secuencias nos brinda información de la biología de las VSPs ante el sistema inmune, así como en la generación de medidas profilácticas, ya que los epítopes tienen un gran potencial para el diseño de vacunas, prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades.

Los resultados generados en este trabajo contribuyen en el amplio campo de investigación del parásito *Giardia*, no sólo en aspectos inmunológicos y en la caracterización de la respuesta inmune generada contra la proteína 5G8 y su posible papel protector, sino también sitúa a *Giardia* como un modelo de estudio de la inmunidad en mucosas. Si bien, se necesitan concretar ciertos estudios y generar otros, en un panorama global, se demostró que la respuesta inmune humoral específicamente contra la proteína 5G8 se ve involucrada en los mecanismos efectores anti-*Giardia*.

CONCLUSIONES

- La respuesta inmune humoral desarrollada contra la cepa GS y GS-5G8 (+) es diferente, a pesar de que existe una similitud antigénica.
- La proteína 5G8 es capaz de inducir una respuesta inmune humoral local y sistémica mediante un proceso de inmunización vía oral, rompiendo tolerancia oral.
- Los anticuerpos anti-5G8 presentan capacidad de aglutinar e inhibir el crecimiento *in vitro* de trofozoítos.
- Se identificaron epítopes de células B de la proteína 5G8, los cuales se encuentran conservados en otras VSP de los ensamblados A, B y E.

BIBLIOGRAFÍA

- Adam, R. D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev*, 14(3), 447-475.
- Aggarwal, A., & Nash, T. E. 1987. Comparison of two Antigenically Distinct *Giardia lamblia* Isolates in Gerbils. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 36(2), 325-332.
- Ankarklev, J., Jerlström-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K., & Svärd, S. G. 2010. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat Rev Microbiol*, 8(6), 413-422.
- Anuar, T. S., Al-Mekhlafi, H. M., Ghani, M. K. A., Osman, E., Yasin, A. M., Nordin, A., Moktar, N. 2012. Giardiasis among different tribes of Orang Asli in Malaysia: Highlighting the presence of other family members infected with *Giardia intestinalis* as a main risk factor. *International Journal for Parasitology*, 42(9), 871-880.
- Astiazaran-Garcia, H., Quintero, J., Vega, R., BriceÑO, P., Oviedo, C., Rascon, L., Velazquez, C. 2009. Identification of T-cell stimulating antigens from *Giardia lamblia* by using *Giardia*-specific T-cell hybridomas. *Parasite Immunology*, 31(3), 132-139.
- Baker, K., Lencer, W. I., & Blumberg, R. S. 2010. Beyond IgA: the mucosal immunoglobulin alphabet. *Mucosal Immunology*, 3, 324.
- Belosevic, M., Faubert, G. M., MacLean, J. D., Law, C., & Croll, N. A. 1983. *Giardia lamblia* infections in Mongolian gerbils: an animal model. *J Infect Dis*, 147(2), 222-226.
- Buret, A., Hardin, J. A., Olson, M. E., & Gall, D. G. 1992. Pathophysiology of small intestinal malabsorption in gerbils infected with *Giardia lamblia*. *Gastroenterology*, 103(2), 506-513.
- Buret, A. G. 2008. Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalis*. *Parasite*, 15(3), 261-265.
- Byrd, L. G., Conrad, J. T., & Nash, T. E. 1994. *Giardia lamblia* infections in adult mice. *Infection and immunity*, 62(8), 3583-3585.

- Commins, S. P. 2015. Mechanisms of Oral Tolerance. *Pediatric clinics of North America*, 62(6), 1523-1529.
- Deguchi, M., Gillin, F. D., & Gigli, I. 1987. Mechanism of killing of *Giardia lamblia* trophozoites by complement. *The Journal of Clinical Investigation*, 79(5), 1296-1302.
- Dye, C. 2014. After 2015: infectious diseases in a new era of health and development. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 369(1645).
- Eckmann, L. 2003. Mucosal defences against Giardia. *Parasite Immunology*, 25(5), 259-270.
- Eckmann, L., Laurent, F., Langford, T. D., Hetsko, M. L., Smith, J. R., Kagnoff, M. F., & 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*. *The Journal of Immunology*, 164(3), 1478.
- Evans-Osses, I., Ansa-Addo, E. A., Inal, J. M., & Ramirez, M. I. 2010. Involvement of lectin pathway activation in the complement killing of *Giardia intestinalis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 395(3), 382-386.
- Faria, C. P., Zanini, G. M., Dias, G. S., da Silva, S., & Sousa, M. d. C. 2017. New multilocus genotypes of *Giardia lamblia* human isolates. *Infection, Genetics and Evolution*, 54, 128-137.
- Faubert, G. 2000. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clinical microbiology reviews*, 13(1), 35-54.
- Feng, Y., & Xiao, L. 2011. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clinical microbiology reviews*, 24(1), 110-140.
- Gardner, T. B., & Hill, D. R. 2001. Treatment of Giardiasis. *Clinical microbiology reviews*, 14(1), 114.
- Gargantini, P. R., Serradell, M. d. C., Ríos, D. N., Tenaglia, A. H., & Luján, H. D. 2016. Antigenic variation in the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Current Opinion in Microbiology*, 32, 52-58.

- Gottstein, B., Harriman, G. R., Conrad, J. T., & Nashf, T. E. 1990. Antigenic variation in *Giardia lamblia*: cellular and humoral immune response in a mouse model. *Parasite Immunology*, 12(6), 659-673.
- Haque, R., Roy, S., Kabir, M., Stroup, S. E., Mondal, D., & Houpt, E. R. 2005. *Giardia* Assemblage A Infection and Diarrhea in Bangladesh. *The Journal of Infectious Diseases*, 192(12), 2171-2173.
- Heyworth, M. F. 2016. *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. *Parasite (Paris, France)*, 23, 13-13.
- Heyworth, M. F., Carlson, J. R., & Ermak, T. H. 1987. Clearance of *Giardia muris* infection requires helper/inducer T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*, 165(6), 1743-1748.
- Hill, D. R., Burge, J. J., & Pearson, R. D. 1984. Susceptibility of *Giardia lamblia* trophozoites to the lethal effect of human serum. *The Journal of Immunology*, 132(4), 2046.
- Janeway, C. 2004. *Immunobiology : the immune system in health and disease*. London: Harcourt Brace & Company.
- Jimenez, J. C., Dei-Cas, E., Fontaine, J., Grzych, J. M., Capron, M., Creusy, C., Dei-Cas, E. 2014. Antibody and cytokine responses to *Giardia* excretory/secretory proteins in *Giardia intestinalis*-infected BALB/c mice. *Parasitology Research*, 113(7), 2709-2718.
- Keller, M. A., & Stiehm, E. R. 2000. Passive immunity in prevention and treatment of infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, 13(4), 602-614.
- Klatzmann, D., Piaggio, E. & Hugo Lujan. (2016). Protozoan variant-specific surface proteins (VSP) as carriers for oral drug delivery. US 9.457,096 B2.
- Kuipers, K., Diavatopoulos, D. A., van Opzeeland, F., Simonetti, E., van den Kieboom, C. H., Kerstholt, M., de Jonge, M. I. 2016. Antigen-Independent Restriction of Pneumococcal Density by Mucosal Adjuvant Cholera Toxin Subunit B. *The Journal of Infectious Diseases*, 214(10), 1588-1596.

- Langford, T. D., Housley, M. P., Boes, M., Chen, J., Kagnoff, M. F., Gillin, F. D., & Eckmann, L. 2002. Central Importance of Immunoglobulin A in Host Defense against *Giardia* spp. *Infection and immunity*, 70(1), 11.
- Larocque, R., Nakagaki, K., Lee, P., Abdul-Wahid, A., & Faubert, G. M. 2003. Oral immunization of BALB/c mice with *Giardia duodenalis* recombinant cyst wall protein inhibits shedding of cysts. *Infection and immunity*, 71(10), 5662-5669.
- Larsen, J. E., Lund, O., & Nielsen, M. 2006. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res*, 2, 2.
- Lee, H. Y., Kim, J., Noh, H. J., Kim, H. P., & Park, S. J. 2014. *Giardia lamblia* binding immunoglobulin protein triggers maturation of dendritic cells via activation of TLR4-MyD88-p38 and ERK1/2 MAPKs. *Parasite Immunology*, 36(12), 627-646.
- Leitsch, D. 2015. Drug Resistance in the Microaerophilic Parasite *Giardia lamblia*. *Current tropical medicine reports*, 2(3), 128-135.
- Lemée, V., Zaharia, I., Nevez, G., Rabodonirina, M., Brasseur, P., Ballet, J. J., & Favennec, L. 2000. Metronidazole and albendazole susceptibility of 11 clinical isolates of *Giardia duodenalis* from France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46(5), 819-821.
- Li, E., Zhou, P., Petrin, Z., & Singer, S. M. 2004. Mast Cell-Dependent Control of *Giardia lamblia* Infections in Mice. *Infection and immunity*, 72(11), 6642.
- Li, W., Saraiya, A. A., & Wang, C. C. 2013. Experimental verification of the identity of variant-specific surface proteins in *Giardia lamblia* trophozoites. *mBio*, 4(3), e00321.
- Lopez-Romero, G., Garzon, T., Rascon, R., Valdez, A., Quintero, J., Arvizu-Flores, A. A., Velazquez, C. (2017). Characterization of BIP protein of *G. lamblia* as a potential immunogen in a mouse infection model. *Immunobiology*, 222(8), 884-891.
- Luján, H. D., & Svärd, S. 2011. *Giardia a model organism*. Wien; New York: Springer.
- Maloney, J., Keselman, A., Li, E., & Singer, S. M. 2015. Macrophages expressing arginase 1 and nitric oxide synthase 2 accumulate in the small intestine during *Giardia lamblia* infection. *Microbes and Infection*, 17(6), 462-467.

- Matowicka-Karna, J., Kralisz, M., & Kemon, H. 2011. Assessment of the levels of nitric oxide (NO) and cytokines (IL-5, IL-6, IL-13, TNF, IFN-gamma) in giardiasis. *Folia histochemica et cytobiologica*, 49(2), 280-284.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65(1-2), 55-63.
- Mowatt, M. R., Aggarwal, A., & Nash, T. E. 1991. Carboxy-terminal sequence conservation among variant-specific surface proteins of *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 49(2), 215-227.
- Nash, T. E. 2002. Surface antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Molecular Microbiology*, 45(3), 585-590.
- Nash, T. E., & Aggarwal, A. 1986. Cytotoxicity of monoclonal antibodies to a subset of *Giardia* isolates. *The Journal of Immunology*, 136(7), 2628.
- Nash, T. E., Banks, S. M., Alling, D. W., Merritt, J. W., & Conrad, J. T. 1990. Frequency of variant antigens in *Giardia lamblia*. *Experimental Parasitology*, 71(4), 415-421.
- Owen, R. L., Allen, C. L., & Stevens, D. P. 1981. Phagocytosis of *Giardia muris* by macrophages in Peyer's patch epithelium in mice. *Infection and immunity*, 33(2), 591.
- Papanastasiou, P., Bruderer, T., Li, Y., Bommeli, C., & Köhler, P. 1997a. Primary structure and biochemical properties of a variant-specific surface protein of *Giardia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 86(1), 13-27.
- Papanastasiou, P., McConville, M. J., Ralton, J., & Köhler, P. 1997b. The variant-specific surface protein of *Giardia*, VSP4A1, is a glycosylated and palmitoylated protein. *Biochem. J. Biochemical Journal*, 322(1), 49-56.
- Paranjpe, S. M., Koticha, A., & Mehta, P. R. 2016. Chronic Giardiasis in a Case of Common Variable Immunodeficiency (CVID): A Case Report. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 10(7).
- Plutzer, J., Ongerth, J., & Karanis, P. 2010. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213(5), 321-333.

- Prucca, C. G., Slavin, I., Quiroga, R., Elías, E. V., Rivero, F. D., Saura, A., Luján, H. D. 2008, Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. *Nature*, 456, 750.
- Qiao, S.-W., Kobayashi, K., Johansen, F.-E., Sollid, L. M., Andersen, J. T., Milford, E., Blumberg, R. S. 2008. Dependence of antibody-mediated presentation of antigen on FcRn. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(27), 9337.
- Quintero, J., Figueroa, D. C., Barcelo, R., Breci, L., Astiazaran-Garcia, H., Rascon, L., Velazquez, C. 2013. Identification of an immunogenic protein of *Giardia lamblia* using monoclonal antibodies generated from infected mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 108(5), 616-622.
- Quintero, J., Valdez, A., Samaniego, B., Lopez-Romero, G., Astiazaran-Garcia, H., Rascon, L., Velazquez, C. 2017. Isolation and partial characterization of an immunogenic antigen of *Giardia lamblia*. *Parasitol Int.* 66(3), 324-330.
- Reiner, D. S., Douglas, H., & Gillin, F. D. 1989. Identification and localization of cyst-specific antigens of *Giardia lamblia*. *Infection and immunity*, 57(3), 963-968.
- Rivero, F. D., Saura, A., Prucca, C. G., Carranza, P. G., Torri, A., & Lujan, H. D. 2010. Disruption of antigenic variation is crucial for effective parasite vaccine. *Nature Medicine*, 16, 551.
- Roxström-Lindquist, K., Palm, D., Reiner, D., Ringqvist, E., & Svärd, S. G. 2006. *Giardia* immunity – an update. *Trends in Parasitology*, 22(1), 26-31.
- Saha, S., Raghava, G. P. S., & rd International Conference on Artificial Immune Systems, I. 2004. Bcepred : Prediction of continuous B-cell epitopes in antigenic sequences using physico-chemical properties. *Lect. Notes Comput. Sci. Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*, 3239, 197-204.
- Samaniego, B. 2016. Caracterización Parcial de la Respuesta Inmune Celular Contra la Proteína Inmunogénica 5G8 de *Giardia lamblia*. (Mestría en Ciencias de la Salud), Universidad de Sonora.

- Scott, K. G. E., Yu, L. C. H., & Buret, A. G. 2004. Role of CD8 and CD4 T Lymphocytes in Jejunal Mucosal Injury during Murine Giardiasis. *Infection and immunity*, 72(6), 3536.
- Serradell, M. C., Gargantini, P. R., Saura, A., Oms, S. R., Rupil, L. L., Berod, L., Luján, H. D. 2018. Cytokines, Antibodies, and Histopathological Profiles during *Giardia* Infection and Variant-Specific Surface Protein-Based Vaccination. *Infection and immunity*, 86(6).
- Singer, S. M., & Nash, T. E. 2000. T-Cell-Dependent Control of Acute *Giardia lamblia* Infections in Mice. *Infection and immunity*, 68(1), 170.
- Soria-Guerra, R. E., Nieto-Gomez, R., Govea-Alonso, D. O., & Rosales-Mendoza, S. 2015. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: Implications on vaccine development. *Journal of Biomedical Informatics*, 53, 405-414.
- Stratmann, T. 2015. Cholera Toxin Subunit B as Adjuvant An Accelerator in Protective Immunity and a Break in Autoimmunity. *Vaccines*, 3(3).
- Sun, J., Jiang, H., Flores, R., & Wen, J. 2010. Gene duplication in the genome of parasitic *Giardia lamblia*. *BMC evolutionary biology*, 10, 49-49.
- Tellez, A., Winiecka-krusnell, J., Paniagua, M., & Linder, E. 2003. Antibodies in Mother's Milk Protect Children Against Giardiasis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 35(5), 322-325.
- Torian, B. E., Barnes, R. C., Stephens, R. S., & Stibbs, H. H. 1984. Tubulin and high-molecular-weight polypeptides as *Giardia lamblia* antigens. *Infection and immunity*, 46(1), 152-158.
- Torres, M. F., Uetanabaro, A. P. T., Costa, A. F., Alves, C. A., Farias, L. M., Bambirra, E. A., Nicoli, J. R. 2000. Influence of bacteria from the duodenal microbiota of patients with symptomatic giardiasis on the pathogenicity of *Giardia duodenalis* in gnotoxenic mice. *Journal of Medical Microbiology*, 49(3), 209-215.
- Troeger, H., Epple, H.-J., Schneider, T., Wahnschaffe, U., Ullrich, R., Burchard, G.-D., Schulzke, J.-D. 2007. Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut*, 56(3), 328.

- Valdez, A. (2015). Caracterización Inmunoquímica de la Proteína Inmunogénica 5G8 de *Giardia lamblia* y Evaluación de su Posible Papel Protector en un Modelo Gerbil. (Maestría en Ciencias de la Salud), Universidad de Sonora.
- Velazquez, C., Beltran, M., Ontiveros, N., Rascon, L., Figueroa, D. C., Granados, A. J., Astiazaran-Garcia, H. 2005. *Giardia lamblia* infection induces different secretory and systemic antibody responses in mice. *Parasite Immunology*, 27(9), 351-356.
- Velazquez, C., Dominguez, Victor, Garzon, Thania, and Rascon, Raul. 2018. Immunity to Protozoa. *eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester*.
- Vidarsson, G., Dekkers, G., & Rispen, T. 2014. IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Frontiers in Immunology*, 5(520).
- Wang, H.-W., Lin, Y.-C., Pai, T.-W., & Chang, H.-T. 2011. Prediction of B-cell linear epitopes with a combination of support vector machine classification and amino acid propensity identification. *BioMed Research International*, 2011.
- Wu, H. Y., & Russell, M. W. 1993. Induction of mucosal immunity by intranasal application of a streptococcal surface protein antigen with the cholera toxin B subunit. *Infection and immunity*, 61(1), 314-322.
- Xiao, L., & Fayer, R. 2008. Molecular characterisation of species and genotypes of Cryptosporidium and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal for Parasitology*, 38(11), 1239-1255.
- Yao, B., Zhang, L., Liang, S., & Zhang, C. 2012. SVMTriP: A Method to Predict Antigenic Epitopes Using Support Vector Machine to Integrate Tri-Peptide Similarity and Propensity. *PLOS ONE*, 7(9), e45152.
- Yoshida, M., Claypool, S. M., Wagner, J. S., Mizoguchi, E., Mizoguchi, A., Roopenian, D. C., Blumberg, R. S. 2004. Human Neonatal Fc Receptor Mediates Transport of IgG into Luminal Secretions for Delivery of Antigens to Mucosal Dendritic Cells. *Immunity*, 20(6), 769-783.
- Zagursky, R. J., & Russell, D. 2001. Bioinformatics: Use in Bacterial Vaccine Discovery. *BioTechniques*, 31(3), 636-659.

ANEXOS

Anexo 1

Inmunorreconocimiento del AcMo 5G8.B5 Hacia Proteínas de Membrana de la Cepa GS-5G8 (+)

1.1 Electroforésis en gel de poliacrilamida en condiciones ligeramente desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE)

Reactivos:

- Acilamida/Bisacrilamida 30%

Acrilamida.....30 g

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

Disolver en 60 mL de agua ultra pura y aforar a 100 mL. 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

Disolver en 40 mL de agua ultra pura y 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

Disolver en 300 mL de agua ultra pura y ajustar el pH a 8.8 con HCl 1N, aforar a 500 mL. Filtrar con un filtro de 0.45 μm de diámetro de poro y adicionar 2 g de SDS. Almacenar a 4°C.

- Persulfato de amonio (APS) al 10%
(NH₄)₂S₂O₈.....10 µg
Agua ultrapura100 µL

- 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 al 12 % (1 minigel de 6 X 8 cm y separador de 0.75 mm)
Acrilamida/Bisacrilamida 30 %/ 8 %.....2.0 mL
Buffer Tris-SDS pH 8.8.....1.25 mL
Agua ultrapura.....1.75 mL
Persulfato de amonio (PSA).....17 µL
TEMED.....3.3 µL

- Gel concentrador (1 minigel de 6 X 8 cm y separador de 0.75 mm)
Acrilamida/Bisacrilamida 30 %/ 0.8 %..... 325 µL
Buffer Tris-SDS pH 6.8.....625 µL
Agua ultrapura.....1.52 mL
Persulfato de amonio.....12.5 µL
TEMED.....2.5 µL

- Solución reguladora muestra (buffer|| muestra) 2X. Tris-Cl 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.

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 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Adicionar el gel concentrador 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 unos 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Realizar la dilución correspondiente para colocar 15 μ L de la muestra a analizar con solución de buffer muestra en un microtubo. Mezclar muy bien la solución en el vórtex.
5. Tomar 10 μ L de Marcador Peso Molecular (MPM) y colocar en un pozo
6. Cargar la muestra y MPM en los pozos respectivos y correr a 100 Voltios constantes por aproximadamente una hora y media, evitando liberar el frente del gel.

1.2 Electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa

Reactivos:

- Buffer de transferencia: Bjerrum y Schafer-Nielsen

Trizma base.....0.58 g

Glicina.....0.29 g

SDS.....0.04 g

Disolver en 70 mL de agua ultrapura, agregar 20 mL de metanol y aforar a 100 mL con agua ultrapura.

NOTA: por cada gel a transferir se recomienda usar 100 mL de buffer de transferencia

- Rojo de Ponceau

Ácido acético..... 200 µL

Rojo de Ponceau..... 0.1 g

Aforar a 20 mL de agua ultrapura

1. Colocar 2 papel filtro secante extra grueso (BIORAD), membrana de nitrocelulosa 0.45 µm y gel electroforético durante 10 minutos en el buffer de transferencia.
2. Colocar los componentes mencionados anteriormente en la cámara de transferencia Trans-blot SD semi-dry transfer cell (BIORAD) en el siguiente orden: papel filtro, membrana de nitrocelulosa, gel y papel filtro. Cada vez que se coloque un componente quitar la posible presencia de burbujas con un tubo de vidrio.
3. Transferir a 15 Voltios durante 40 minutos
4. Colocar la membrana de nitrocelulosa en rojo de Ponceau hasta que se logró ver lo transferido.
5. Desteñir la membrana con agua, el carril del marcador de peso molecular desteñir con ácido acético al 5 % y guardar a -80 °C.
6. Bloquear la membrana de nitrocelulosa con PBS-Leche 0 % de grasa al 5 % durante 1 hora, para que esté lista para el ensayo de inmunorreconocimiento.

1.3 Western Blotting

Reactivos:

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

PBS 1X pH 7.2..... 40 mL

Leche Svelty ®..... .2 g

Mezclar en vortex. Usar esta solución recién preparada.

- PBS-BSA 0.1 %
PBS 1X pH 7.2.....10 mL
BSA.....0.1 g

- Solución luminol-H₂O₂.

Mezclar un volumen de luminol con un volumen igual de H₂O₂.

- Solución reveladora Carestream. Para preparar 400 mL:

Agregar 200 mL de agua destilada y adicionar 87 mL de la solución reveladora GBX, mezclar bien. Aforar a 400 mL con agua destilada.

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

- Solución Fijadora Carestream. Para preparar 400 mL:

Agregar 200 mL de agua destilada y adicionar 87 mL de la solución reveladora GBX, mezclar bien. Aforar a 400 mL con agua destilada.

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

1. Adicionar el primer anticuerpo a una concentración de 1 µg/mL (AcMo 5G8.B5 y Ac Control de Isotipo aBDC.2, IgG2b) con PBS-BSA 0.1 %.
2. Incubar en agitación por 1 hora a temperatura ambiente.
3. Realizar 5 lavados de 5 minutos con PBS 1X-Tween 20 0.05 %.
6. Adicionar el segundo anticuerpo (cabra anti-ratón α-IgG peroxidasa conjugada, Sigma) 1:7500 con PBS-BSA 0.1 %.
7. Incubar en agitación por 1 hora a temperatura ambiente.
8. Realizar 5 lavados de 5 minutos con PBS 1X-Tween 20 0.05 %.

9. Colocar las tiras de membrana en papel transparente y adicionar 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 lo suficiente (1-2 minutos) 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 con agua.
- Exponer la película 10 segundo en la solución fijadora.
- Enjuagar con agua.

Anexo 2

Acoplamiento del AcMo 5G8.B5 a Esferas de Sefarosa

Reactivos:

NOTA: utilizar todo nuevo

- Anticuerpo AcMo 5G8.B5 purificado y dializado en PBS
- Buffer de acoplamiento

NaHCO₃.....0.1M

NaCl..... 0.5 M

Disolver en 3000 mL de agua ultra pura 33.6 gramos de NaHCO₃ y 116.88 gramos de NaCl, ajustar el pH a 8.30 con NaOH y aforar a 4000 mL. Almacenar a 4°C.

- HCl 1 mM

Diluir el reactivo stock que normalmente esta a una concentración 12 N

- Glicina

Glicina 0.2 M

Disolver 1.501 gramos em 80 mL de agua ultrapura, ajustar el pH a 8.0 y aforar a 100 mL.

- Acetato de Na-NaCl

Acetato de sodio 0.1 M

NaCl 0.5 M

Disolver 8.203 gramos de acetato de sodio y 29.55 gramos de NaCl en 800 mL de agua ultrapura, ajustar el pH a 4.2 con ácido acético y aforar a 1000 mL.

- Esferas de sefarosa activadas con bromuro de cianógeno

Cyanogen bromide-activated-Sepharose® 4B Sigma C9142

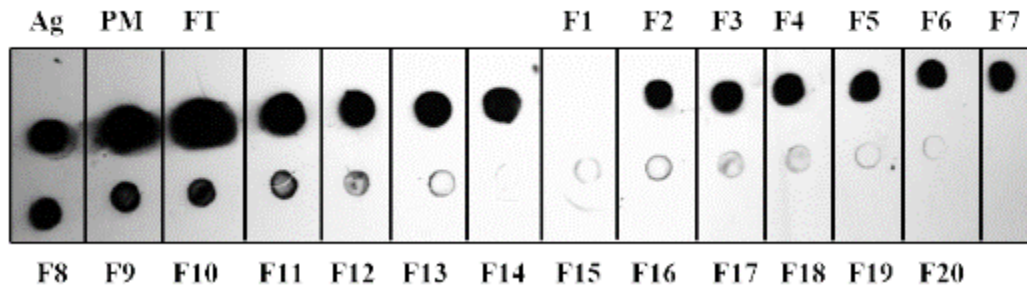
1. Descongelar el AcMo 5G8.B5.

2. Preparar 4.5 L de buffer de acoplamiento (4 L para el dializado y 0.5 L para el acoplamiento).
3. Dializar el AcMo en Buffer de acoplamiento con membrana Spectra/Por® durante toda la noche a 4 °C.
4. Remover el AcMo y medir Densidad óptica y estimar pérdidas generadas por el proceso de diálisis.
5. Pesar 1 gr se esferas de sefarosa por cada 10 mg de AcMo.
6. Hidratar las esferas con 1.5 mL de HCl 1 mM en un microtubo durante 30 minutos y lavar en sistema de embudo de vidrio con disco de vidrio sintetizado y matraz Kitasato con 200 mL de HCl mM.
7. Lavar las esferas con 200 mL de buffer de acoplamiento para eliminar residuos y checar el pH con una tira reactiva.
8. Transferir las esferas al tubo cónico con el AcMo.
9. Incubar el tubo en rotación durante 2 horas a temperatura ambiente.
10. Recuperar las esferas en el embudo y medir densidad óptica del sobrenadante, para determinar el anticuerpo unido y liberado.
11. Transferir las esferas a un tubo cónico con una espátula y adicionar 45 mL de glicina 0.2 M con pH de 8, rotando a temperatura ambiente durante 2 horas.
12. Lavar las esferas con buffer de acoplamiento y acetato de Na-NaCl. Al menos 5 lavados con cada uno, alternando los lavados.
13. Almacenar las esferas con PBS 1X y ázida de sodio 0.02 %.

Anexo 3

Dot Blotting de las Fracciones de Purificación de la Proteína 5G8

Se utilizan los mismos reactivos que en el anexo 1.3 y se sigue el mismo procedimiento, solamente que se colocan 2 μ L de cada fracción en la membrana de nitrocelulosa, y se bloquea con PBS-Leche 0 % de grasa al 5 % durante 1 hora.



Anexo 4

Procesamiento de la Banda de 70 kDa de Proteínas de Membrana de la Cepa GS-5G8 (+)

Reactivos:

Los mismos utilizados para realizar electroforesis 1.1

- PBS 10 X

Na₂HPO₄.....

NaH₂PO₄.....

NaCl..... 85 gr

Disolver en 800 mL de agua ultra pura, ajustar el pH entre 7.2 y 7.4 y aforar a 1000 mL.

Para preparar PBS 1X se debe hacer una dilución 1:10 y se utilizará un PBS 1X diluido 1:20.

1. Realizar una electroforesis de proteínas de membrana de la cepa GS-5G8 (+) en geles preparativos.
2. Una vez terminada la electroforesis, se recogerá el gel de poliacrilamida y se cortará solamente el área donde corrió el Marcador de peso molecular, así como un poco del carril de la muestra. La sección cortada se teñirá en azul de Coomassie, el resto se dejará hidratando con un poco de agua ultrapura.
3. Una vez identificado el patrón de bandas del marcador de peso molecular someterlo a las soluciones desteñidoras.
4. Alinear la sección cortada y teñida con el resto del gel, identificar la banda de 70 kDa y cortar en el gel (NO TEÑIDO).
5. Colocar la sección seleccionada en una jeringa de 3 mL, triturar y colocar en microtubos. Por cada gel se generan 2 microtubos con aproximadamente 500 µL de volumen de gel.
6. Adicionar 500 µL de PBS 1X diluido 1:20 al gel triturado, procurando que cubra el gel.

7. Homogenizar en vortex unos 5 minutos e incubar todo un día a 4 °C.
8. Homogenizar nuevamente por unos 5 minutos y centrifugar a 1000 g durante 10 minutos.
9. Recoger el sobrenadante y etiquetar como Elución 1. Repetir pasos 6, 7 y 8 nuevamente, así unas 4 veces.
10. Concentrar las fracciones 20 veces en el concentrador Vacufuge™ Eppendorf™.
11. Almacenar a -80 °C, o cuantificar proteína previamente a almacenar mediante el método BCA.

Protocolo BCA: Procedimiento de microplaca (rango de trabajo lineal de 2-40 µg/mL)

1. Colocar 150 µL de cada muestra estándar o desconocida que se replique en un pocillo de microplaca de 96 pozos.
2. Agregar 150 µl de WR a cada pocillo y mezcle bien la placa en un agitador de placas durante 30 segundos (WR= 50 % de reactivo A, 48 % de reactivo B y 2 % de reactivo C).
3. Incubar a 37 ° C durante 2 horas.

Nota: Limite las incubaciones de la microplaca a menos de o igual a 37 ° C, de lo contrario un fondo alto y un color aberrante desarrollo puede resultar. La mayoría de las placas de ensayo de poliestireno se deforman, se filtran y se vuelven turbias a 60 ° C.

4. Enfriar la placa a temperatura ambiente.
5. Medir la absorbancia en o cerca de 562 nm en un lector de placas.
6. Restar la lectura de absorbancia promedio de 562 nm de las repeticiones del estándar en blanco de la lectura de 562 nm de todas las demás réplicas de muestras individuales estándar y desconocidas.
7. Preparar una curva estándar trazando la lectura promedio de 562 nm corregida en blanco para cada estándar BSA en comparación con su concentración en µg/mL. Usar la curva estándar para determinar la concentración de proteína de cada muestra desconocida.

Anexo 5
Limpieza de la Proteína 5G8 con Ready Prep™ 2-D Cleanup Kit

Reactivos:

ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit for IEF, 50 preps 1632130 BIORAD

1. Transferir 1–500 µg de proteína en un volumen final de 100 µl en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.

Nota: Las cantidades de muestra > 500 µg de proteína pueden reducir la eficiencia de la limpieza, lo que lleva a una IEF de baja calidad.

2. Agregar 300 µl de agente precipitante 1 a la muestra de proteína y mezclar bien mediante agitación con vórtex. Incubar en hielo durante 15 min.

Nota: Al agregar una solución, no toque la muestra de proteínas con la punta de la pipeta. La proteína puede precipitarse en la punta causando la pérdida de la muestra.

3. Agregar 300 µl de agente precipitante 2 a la mezcla de proteína y agente precipitante 1. Mezclar bien mediante agitación en vórtex.

Nota: Al agregar una solución, no toque la muestra de proteínas con la punta de la pipeta. La proteína puede precipitarse en la punta causando la pérdida de la muestra.

4. Centrifugar el (los) tubo (s) a la velocidad máxima (> 12,000 x g) durante 5 minutos para formar un pellet apretado. Retirar el tubo rápidamente una vez que la centrífuga se detenga para que el pellet no se disperse.

5. Sin alterar el sedimento, retirar y desechar el sobrenadante con una pipeta.

6. Colocar el tubo en la centrífuga como antes (es decir, colocar la bisagra y el sedimento de proteínas mirando hacia afuera) y centrifugar durante 15–30 segundos para recoger cualquier líquido residual en la parte inferior del tubo. Utilizar una pipeta para eliminar cuidadosamente el sobrenadante restante.

7. Agregar 40 µl de reactivo de lavado 1 encima del pellet. Coloque el tubo en la centrífuga como antes y centrifugue a la velocidad máxima (> 12,000 x g) durante 5 min.

Nota: Puede formarse un precipitado a lo largo de la pared del tubo. En estos casos, vértice y/o solución de lavado de pipeta sobre el pellet varias veces para asegurar que todo el pellet esté bien lavado.

8. Con una pipeta, retire y deseche el lavado.

9. Agregar 25 μ l de agua de grado proteómico ReadyPrep u otra agua ultrapura sobre el pellet. Agitar en vértice el tubo 10–20 seg. Los gránulos de proteínas pueden dispersarse, pero no se disuelven en el agua.

10. Agregar 1 ml de reactivo de lavado 2 (previamente cocinado a -20° C durante al menos 1 h) y 5 μ l de aditivo de lavado 2. Agitar en vértice el tubo durante 1 min.

Notas: Los gránulos de proteína no se disuelven en el reactivo de lavado 2. Si el reactivo de lavado 2 no está completamente frío, la recuperación cuantitativa puede verse afectada.

11. Incubar el tubo a -20° C durante 30 min. Agitar en vértice el tubo durante 30 segundos cada 10 minutos durante el período de incubación.

12. Después del período de incubación, centrifugar el tubo a la velocidad máxima durante 5 minutos para formar un pellet apretado. Retirar y desechar el sobrenadante. Centrifugue brevemente el tubo (15–30 seg.) Y retire y deseche cualquier lavado restante. El pellet aparecerá blanco en esta etapa. Secar al aire libre el sedimento a temperatura ambiente durante no más de 5 minutos (el sedimento lucirá translúcido una vez que esté lo suficientemente seco).

Nota: No secar los pellets. Los gránulos demasiado secos serán difíciles de resuspender. Resuspender en PBS y cuantificar.

Anexo 6

Protocolo Para la Recolección de Sueros en Ratones Para la Obtención de IgG

1. A los ratones que estén bajo un experimento determinado, se colocaran en tubos cónicos de 50 mL previamente cortados en la tapadera y en la parte final proporcionando cavidades para que el ratón pueda respirar y tener la cola en el exterior.
 2. La persona que realizará el procedimiento deberá usar guantes únicamente en la mano donde sostendrá al ratón, no utilizar guantes en la mano con la que se estimulará la salida de sangre.
 3. Una vez en ratón dentro, se frotrará la cola para estimular la circulación con movimientos suaves, se limpiará la parte inferior de la cola con etanol al 70 %.
 4. Apoyándose en un portaobjetos, cortar unos 5 mm de cola con un bisturí.
 5. Una vez que se observe la gota de sangre se frotrará la cola desde la parte superior hasta la parte final para estimular el flujo sanguíneo. Recoger la sangre en microtubos.
- Nota: Los movimientos de frotación deben ser suaves para no provocar la hemólisis de la muestra.
6. Por cada ratón se recomienda obtener no más de 300 μ L de sangre. Esperar a que la muestra coagule y centrifugar a 2500 rpm durante 10 minutos.
 7. Separar la muestra de suero del coágulo y almacenar el suero a -80°C .

Anexo 7

Protocolo Para la Recolección de Heces en Ratones Para la Obtención de IgA

Reactivos:

- PBS 1X-BSA 1 %
 - PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) 100 mM disuelto en PBS 1X
1. De acuerdo al esquema de recolección de heces, el día de recolección los ratones se colocarán en una caja limpia con aserrín estéril, para que no se confundan las heces anteriores, debido a que se necesitan heces frescas para la obtención de IgA.
 2. Previamente se colocarán 495 μ L de PBS 1X y 5 μ L de PMSF 100 mM en un microtubo.
 3. Recolectar las heces frescas e inmediatamente deben caer en el microtubo mencionado anteriormente.
 4. Incubar las heces durante 1 día a 4 °C para que se disuelva.
 5. Homogenizar en vortex y centrifugar a 10 000 g durante 20 minutos a 4 °C.
 6. Separar el sobrenadante y almacenarlo a -80 °C.
 7. Inactivar el precipitado con hipoclorito para su posterior desecho.

Anexo 8
ELISA IgG e IgA en Suero y Heces Respectivamente

Reactivos:

- Solución bloqueadora

PBS 1X-BSA 1%

- Solución de carbonatos

Na₂CO₃ 0.795 g

NaHCO₃.....1.465 g

Adicionar agua ultrapura hasta un volumen de 400 mL, ajustar pH a 9.6. Aforar a 500 mL con agua desionizada.

- Solución de citratos

Ácido cítrico 3.2 g

KH₂PO₄ 3.2 g

Adicionar 200 mL de agua desionizada, ajustar pH a 4.2 con NaOH y aforar a 250 mL con agua desionizada.

Nota: esta solución es para disolver el ABTS a 0.5 mg/mL, preparar los stocks y almacenar inmediatamente a -20 °C.

- Solución reveladora

ABTS 0.5 mg/mL más H₂O₂ al 30 %, relación 1:1

- Solución de lavado

PBS 1X-Tween 20 0.05 %

8.1 ELISA IgG séricos.

1. Adsorber a los pozos de la placa de ELISA, 2 µg de antígeno total y 0.2 µg de la proteína 5G8 en 50 µL de solución reguladora de carbonatos pH 9.6 por pozo.
2. Incubar toda la noche a 4°C.
3. Lavar cada pozo de la placa con PBS 1X-Tween 20 (0.05 %), 5 veces.
4. Llenar cada pozo con 50 µL de solución bloqueadora (PBS 1X-BSA 1 %), incubar una hora a temperatura ambiente y en constante rotación.
5. Lavar cada pozo de la placa con PBS 1X pH 7.2-Tween 20 (0.05 %), 5 veces.
6. Adicionar 50 µL del primer anticuerpo (suero de inmunización) 1:50 con PBS-BSA 0.1 % e incubar una hora a temperatura ambiente y en constante rotación.
7. Lavar cada pozo de la placa con PBS 1X pH 7.2-Tween 20 (0.05 %), 5 veces.
8. Adicionar 50 µL del segundo anticuerpo (cabra anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa) diluido 1:1000 en PBS-BSA 0.1 %, incubar una hora a temperatura ambiente y en constante rotación.
9. Lavar cada pozo de la placa con PBS 1X pH 7.2-Tween 20 (0.05 %), 5 veces.
10. Adicionar 50 µL de solución reveladora (ABTS + H₂O₂ al 30 %).
11. Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente.
12. Medir la densidad óptica a 415 nm en el lector de microplaca.

8.2 ELISA IgA fecales

1. Primeramente se deben cuantificar la IgA total de las muestras de heces, se realizará un ELISA sándwich, siguiendo los mismos pasos mencionados anteriormente en 8.1 con variantes.
2. Colocar en la placa de ELISA 50 ng de anti-IgA de ratón (Biolegend 407001) en cada pozo en solución de carbonatos.
3. Realizar los pasos 2, 3, 4 y 5 del 8.1.

4. Unos pozos serán para la curva de IgA, colocar cantidades de IgA (Sigma M1421) de 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.156 y 0 ng. En otros pozos colocar las muestras de heces. Se recomienda colocar las muestras fecales en diluciones superiores a 1:500.
5. Incubar una hora a temperatura ambiente y en constante rotación.
6. Realizar 5 lavados.
7. Colocar el anticuerpo secundario (cabra anti-IgA de ratón conjugado a peroxidasa) (abcam ab97235) a una dilución 1:7500 diluido con PBS-BSA 0.1 %.
8. Repetir el resto de los pasos mostrados en 8.1.
9. Una vez cuantificada la IgA total, ajustar de acuerdo a cada muestra y realizar un ELISA indirecto como se menciona en 8.1 pero en el paso 6 colocar 200 ng de IgA fecales y utilizando el anticuerpo secundario anti-IgA 1:7500.

Anexo 9

Protocolo Para la Obtención de Suero Mediante Punción Cardíaca en Gerbos

Reactivos:

- Pentobarbital sódico (anestésico).
1. Pesar al gerbo, e inocular vía intraperitoneal la dosis del anestésico de acuerdo a su peso (70 μ L por cada 100 gr de peso).
 2. Esperar hasta que el roedor no tenga signos de reflejos y dolor. Pero que continúe con vida.
 3. Proceder a abrir al gerbo, hasta llegar a la cavidad torácica, romper con cuidado la membrana pleuralpericárdica, y situar el corazón.

Nota: Una vez comprometida la cavidad, se tiene no más de 1 minutos para realizar la punción.

4. Puncionar el corazón con una jeringa de 3 mL con aguja 21 G, con una inclinación de 45 ° grados de manera horizontal de abajo hacia arriba.
5. Recoger la sangre desplazando el émbolo de la jeringa.
6. Colocar la sangre recolectada en microtubos antes de que comience el proceso de coagulación. Separar el suero como se menciona en el anexo 6.

Anexo 10

Aislamiento de Esplenocitos de Ratonés

Reactivos

- ACK
- NH₄Cl 4.02 g
- KHCO₃0.50 g
- Na₂EDTA..... 18.6 mg

Adicionar agua ultrapura hasta un volumen de 400 mL, ajustar pH entre 7.2 y 7.4. Aforar a 500 mL con agua desionizada.

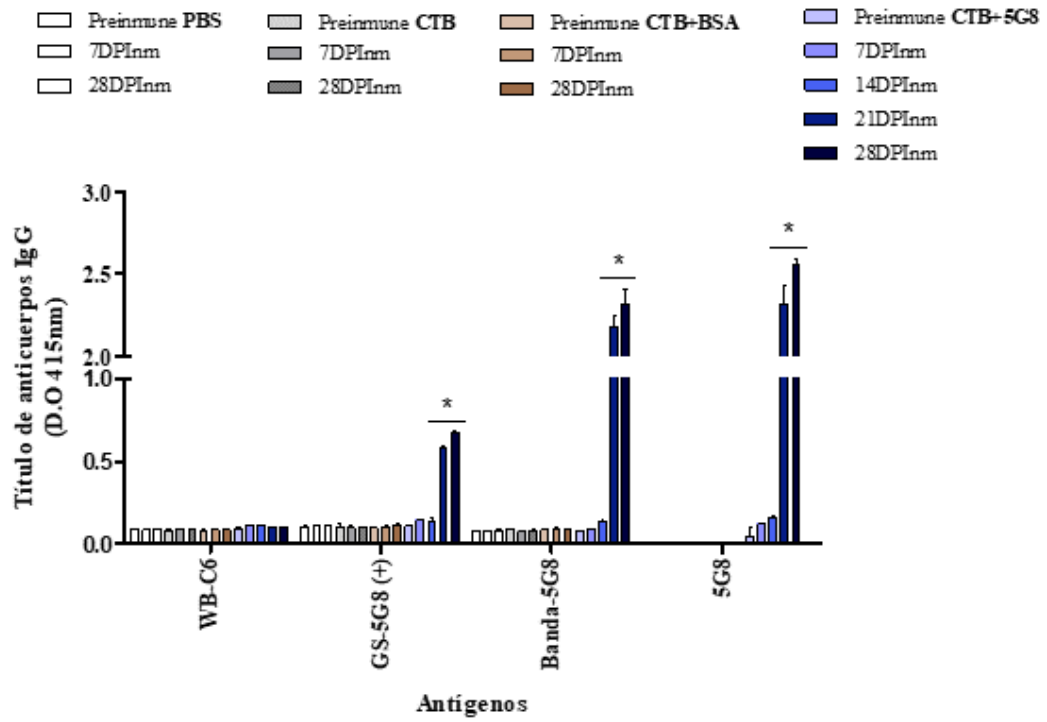
NOTA: previamente realizar una prueba de lisis con sangre humana para comprobar el funcionamiento correcto del buffer.

- DMEM-10 % de suero fetal bovino (D10F)
 - PBS
1. Los ratones infectados y el grupo control se sacrifican mediante dislocación cervical,
 2. Se realiza una incisión longitudinal en el área peritoneal para exponer los órganos y se remover el bazo, el cual se coloca en una placa de Petri estéril con medio D10F frío.
 3. Con la base de una jeringa se disgrega el tejido y se filtra por medio de una malla de nailon
 4. Se centrifuga a 650 x g durante 7 minutos a 4 °C
 5. Posteriormente el sobrenadante se descarta y el botón celular se resuspende en 500 µL de D10F.
 6. Se adiciona 5 mL por bazo de solución de lisis de eritrocitos (ACK) y se deja reaccionar por 2 minutos agitando suavemente, una vez terminado el tiempo se adiciona 25 mL de DMEM frío y se realiza dos lavados a las mismas condiciones. de centrifugaciones y filtrado.
 7. Contar esplenocitos en cámara de Neubauer utilizando azul de tripano.

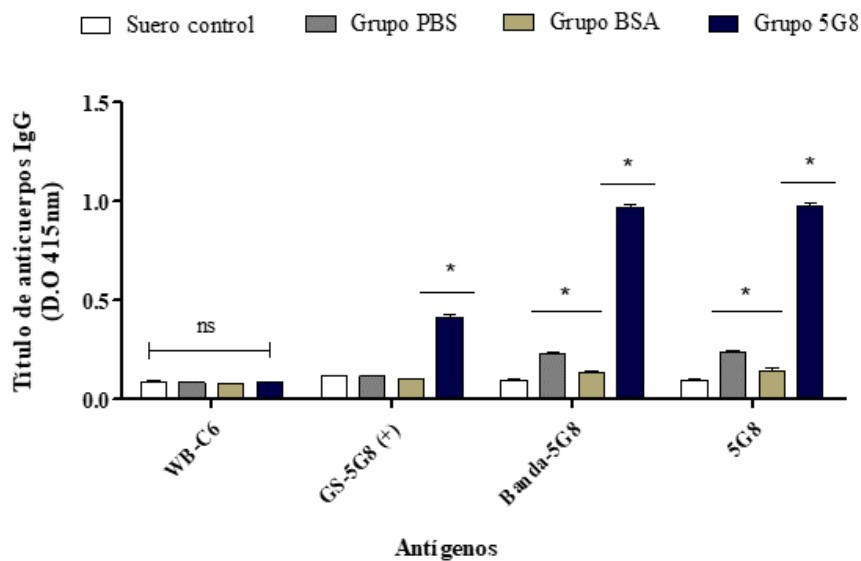
Anexo 11

ELISA IgG Séricos de los Ratones y Gerbos del Ensayo de Inmunización Activa

Ratones



Gerbos



Anexo 12

Análisis de Homología de VSPs

```

VSP-5G8      1 -----MLN-----
QR46_3107    1 -----MLN-----
GSB_155403   1 -----MLN-----
QR46_2660    1 -----MLN-----
GSB_153033   1 -----MLN-----
GSB_154953   1 VIGGLYRPLRFLERHAAGALALRKQIQRPVQVQGMCFQTSPLGRVGTSGLVLLADCTRRTVFI-----
GSB_152640   1 -----MLL-----
GSB_153115   1 -----MLN-----
GSB_153790   1 -----MLN-----
TSA4         1 -----MFG-----
GLP15_2640   1 -----MFS-----
QR46_4433    1 -----MFR-----
DHA2_150893  1 -----MLEITKKILTRISELR-----
DHA2_153020  1 -----MFD-----
WB/9B10-B    1 -----MFG-----
GLP15_2      1 -----MFE-----
DHA2_151647  1 MSAR-----RTA-LLGGAGLFW-----KRWAATQQVG-----GPMFSG-----
GL50803_113439 1 MSAH-----QTTPL-----PG-----KAGATQQVG-----GPMFSG-----
GLP15_625    1 -----M-----
  
```

```

VSP-5G8      5 -----FA-----L-----AVLQQA
QR46_3107    5 -----FA-----L-----AVLQQA
GSB_155403   1 -----FA-----L-----AVLQQA
QR46_2660    1 -----FA-----L-----AVLQQA
GSB_153033   5 -----SARWTLTLLLPVLRHCSAGHFLF-----GGCYDHS
GSB_154953   69 -----I-----GCALQQA
GSB_152640   5 -----IC-----F-----RAGAL-----
GSB_153115   5 -----F-----L-----AVLQQA
GSB_153790   5 -----FA-----L-----AVLQQA
TSA4         5 -----F-----L-----AVLQQA
GLP15_2640   5 -----F-----L-----AVLQQA
QR46_4433    34 LLLPTRRSCDRCTSRGADNQRPVVAHSSFPGLADPCARHSRSDASRMHWQRLSATAVRTGAAGVHTDGAQLYVDSWWTSLTLLAASLHRCAGPFLF-----DGCYDHS
DHA2_150893  18 -----I-----MLLAIFYFVSAL
DHA2_153020  5 -----L-----F-----SVALQQA
WB/9B10-B    4 -----SFV-----L-----AGVLQQA
GLP15_2      4 -----KVI-----F-----ASLQQA
DHA2_151647  33 -----F-----L-----AVLQQA
GL50803_113439 28 -----F-----L-----AVLQQA
GLP15_625    2 -----L-----LITWFITF
  
```

```

VSP-5G8      16 -----R-----A-----A-----C-----PGT-----E-----CRDGAENVVIGG-----ETVCSQCY
QR46_3107    16 -----R-----A-----A-----C-----PGE-----A-----CRSASENVVIGG-----ETVCSQCY
GSB_155403   1 -----R-----A-----A-----C-----PGE-----A-----CRSASENVVIGG-----ETVCSQCY
QR46_2660    1 -----R-----A-----A-----C-----PGE-----A-----CRSASENVVIGG-----ETVCSQCY
GSB_153033   37 VAGGGVCREARDGACVGHAEENSVDGGRHGSQGSRRARDKAKRAT--AA--A--T-----C-----EDK--S-----OTTG-----CNTC-----VPLGCD-----GELYCAHCS
GSB_154953   80 -----R-----A-----A-----C-----EQTEAQQ-----TKS-----TGKENV-----LGGTEAANKVCSQCS
GSB_152640   13 -----A-----A-----A-----C-----D-----SQ-----T-----AEGQCD-----T-----EG-----TEI-----QCK
GSB_153115   16 -----R-----A-----A-----C-----PGT-----E-----T-----CRDGAENVVIGG-----ETVCSQCY
GSB_153790   16 -----R-----A-----A-----C-----PGE-----A-----T-----CRVGVKCDVWVSG-----AQVCSQCA
TSA4         16 -----R-----T-----A-----C-----QEA-----DD-----GKCR-----T-----CVHIGQ-----DTVCSQCN
GLP15_2640   16 -----WTEQV-----T-----C-----VET-----E-----G-----CRNMC-----A-----LGA-----DNVCSQCG
QR46_4433    140 VAGSGVCREARGGACVVRHAEVSV-----RQRKSLRAIDRQTS-----T-----CV-----EAE-----TAT-----G-----CRKTKCDVWVSG-----SNVCSQCS
DHA2_150893  33 -----T-----A-----K-----C-----P-----Q-----QT-----EAEK-----B-----T-----IG-----TEI-----QCO
DHA2_153020  16 -----W-----A-----S-----QTESRAKTDPA-----S-----PQN-----P-----NQ-----AS-----DTGKCDVWVSG-----KTVCSQCT
WB/9B10-B    16 -----W-----R-----A-----K-----ATERAAQCA-----DN-----T-----CAEEAENVVIGG-----KLVCSQCN
GLP15_2      16 -----Q-----R-----VAKT-----C-----EASDSSQ-----G-----CRKGC-----S-----IGE-----DSV-----DCA
DHA2_151647  44 -----R-----A-----A-----C-----ADG-----SGSA-----G-----S-----CR-----T-----CVHIGQ-----EQVCSQCN
GL50803_113439 39 -----R-----A-----A-----C-----ADG-----SGSD-----G-----S-----CR-----T-----CVHIGQ-----EQVCSQCN
GLP15_625    14 -----A-----A-----D-----C-----A-----QKS-----N-----Q-----CVQK-----B-----V-----IG-----TEI-----QACN
  
```

VSP-568 48 TTSEAVPFCVCTAST----DSKCTKQ----DTQNSTCKSCS--A--VFFPKGGCVQIG-QSPGSLICQIA--S--NTGICQCTCK--DGYVTVSS--T--A--RQIS

VSP-568 132 LAAGG-----ENATCTVGA-----EQQKSRKAD-----
QR46_3107 132 LAAGG-----DNATCTVGA-----EQQKSRKAD-----

VSP-568 159 -----G-KMYLKNNGTSETGCTVADENAAKDYITD-DTSSPNRKLKASAA-----K-
QR46_3107 159 -----G-KMYLKNNGTSETGCTVADENAAKDYITD-DTSSPNRKLKASAA-----K-

VSP-568 208 -----ENCNSCSSEFAEO-----KASCEVL--R--GNR--V-----K-SDSEFENCCKCNPKAANEACTACVGMGLTPPGQCIDR
QR46_3107 208 -----ENCNSCSSEFAEO-----KASCEVL--R--GNR--V-----K-SDSEFENCCKCNPKAANEACTACVGMGLTPPGQCIDR

VSP-5G8 275 VITISGVY-ETA-C---KCKICGVANGVVGATGADLDLDGDF--SSCSKCHESCKNCKG-TAS-DCTAFAC-ATLYGDFPKGTGCGECLT--STGKGAACHADL
QR46_3107 275 VITISGVY-ETA-C---KCKICGVANGVVGEGGTDLDLDGDF--EENCSKCHESCKNCKG-TAS-DCTAFAC-ATLYGDFPKGTGCGECLT--STGKGAACHADL
GSB_155403 47 VITISGVY-ETA-C---KCKICGVANGVVGATGADLDLDGDF--SSCSKCHESCKNCKG-TAS-DCTAFAC-ATLYGDFPKGTGCGECLT--STGKGAACHADL
QR46_2660 13 VITISGVY-ETA-C---KCKICGVANGVVGATGADLDLDGDF--SSCSKCHESCKNCKG-TAS-DCTAFAC-ATLYGDFPKGTGCGECLT--STGKGAACHADL
GSB_153033 347 VITISGVY-ETA-C---KCKICGVANGVVGEDLDLDLDGDF--SSCSKCHESCKNCKG-TAS-DCTAFAC-ATLYGDFPKGTGCGECLT--STGKGAACHADL
GSB_154953 350 CAALISGVY-ETA-C---KCKICGVANGVVGEDLDLDLDGDF--SSCSKCHESCKNCKG-TAS-DCTAFAC-ATLYGDFPKGTGCGECLT--STGKGAACHADL
GSB_152640 333 CAALISGVY-ETA-C---KCKICGVANGVVGEDLDLDLDGDF--SSCSKCHESCKNCKG-TAS-DCTAFAC-ATLYGDFPKGTGCGECLT--STGKGAACHADL
GSB_153115 304 CAALISGVY-ETA-C---KCKICGVANGVVGATGADLDLDGDF--SSCSKCHESCKNCKG-TAS-DCTAFAC-ATLYGDFPKGTGCGECLT--STGKGAACHADL
GSB_153790 303 CAALISGVY-ETA-C---KCKICGVANGVVGEDLDLDLDGDF--SSCSKCHESCKNCKG-TAS-DCTAFAC-ATLYGDFPKGTGCGECLT--STGKGAACHADL
TSA4 374 CAALISGVY-ETA-C---KCKICGVANGVVGEDLDLDLDGDF--SSCSKCHESCKNCKG-TAS-DCTAFAC-ATLYGDFPKGTGCGECLT--STGKGAACHADL
GLP15_2640 405 CAALISGVY-ETA-C---KCKICGVANGVVGEDLDLDLDGDF--SSCSKCHESCKNCKG-TAS-DCTAFAC-ATLYGDFPKGTGCGECLT--STGKGAACHADL
QR46_4433 469 CAALISGVY-ETA-C---KCKICGVANGVVGEDLDLDLDGDF--SSCSKCHESCKNCKG-TAS-DCTAFAC-ATLYGDFPKGTGCGECLT--STGKGAACHADL
DHA2_150893 355 CAALISGVY-ETA-C---KCKICGVANGVVGEDLDLDLDGDF--SSCSKCHESCKNCKG-TAS-DCTAFAC-ATLYGDFPKGTGCGECLT--STGKGAACHADL
DHA2_153020 269 CAALISGVY-ETA-C---KCKICGVANGVVGEDLDLDLDGDF--SSCSKCHESCKNCKG-TAS-DCTAFAC-ATLYGDFPKGTGCGECLT--STGKGAACHADL
WB/9B10-B 328 CAALISGVY-ETA-C---KCKICGVANGVVGEDLDLDLDGDF--SSCSKCHESCKNCKG-TAS-DCTAFAC-ATLYGDFPKGTGCGECLT--STGKGAACHADL
GLP15_2 315 CAALISGVY-ETA-C---KCKICGVANGVVGEDLDLDLDGDF--SSCSKCHESCKNCKG-TAS-DCTAFAC-ATLYGDFPKGTGCGECLT--STGKGAACHADL
DHA2_152647 398 CAALISGVY-ETA-C---KCKICGVANGVVGEDLDLDLDGDF--SSCSKCHESCKNCKG-TAS-DCTAFAC-ATLYGDFPKGTGCGECLT--STGKGAACHADL
GL50803_113439 391 CAALISGVY-ETA-C---KCKICGVANGVVGEDLDLDLDGDF--SSCSKCHESCKNCKG-TAS-DCTAFAC-ATLYGDFPKGTGCGECLT--STGKGAACHADL
GLP15_625 343 CAALISGVY-ETA-C---KCKICGVANGVVGEDLDLDLDGDF--SSCSKCHESCKNCKG-TAS-DCTAFAC-ATLYGDFPKGTGCGECLT--STGKGAACHADL

VSP-5G8 375 TIDGTYVCSA-ETI-TEYFQNGVCA-P-TARA--G-SONSSA-NTG-ENFF-MNGGCYS-SQLPQS-VCV-AP--GGTCFKSEFVYIN-N-S-FTLVTCGAGGACET
QR46_3107 375 TIDGTYVCSA-ETI-TEYFQNGVCA-P-TARA--G-SONSSA-NTG-ENFF-MNGGCYS-SQLPQS-VCV-AP--GGTCFKSEFVYIN-N-S-FTLVTCGAGGACET
GSB_155403 147 TIDGTYVCSA-ETI-TEYFQNGVCA-P-TARA--G-SONSSA-NTG-ENFF-MNGGCYS-SQLPQS-VCV-AP--GGTCFKSEFVYIN-N-S-FTLVTCGAGGACET
QR46_2660 118 TIDGTYVCSA-ETI-TEYFQNGVCA-P-TARA--G-SONSSA-NTG-ENFF-MNGGCYS-SQLPQS-VCV-AP--GGTCFKSEFVYIN-N-S-FTLVTCGAGGACET
GSB_153033 447 TIDGTYVCSA-ETI-TEYFQNGVCA-P-TARA--G-SONSSA-NTG-ENFF-MNGGCYS-SQLPQS-VCV-AP--GGTCFKSEFVYIN-N-S-FTLVTCGAGGACET
GSB_154953 448 TIDGTYVCSA-ETI-TEYFQNGVCA-P-TARA--G-SONSSA-NTG-ENFF-MNGGCYS-SQLPQS-VCV-AP--GGTCFKSEFVYIN-N-S-FTLVTCGAGGACET
GSB_152640 433 TIDGTYVCSA-ETI-TEYFQNGVCA-P-TARA--G-SONSSA-NTG-ENFF-MNGGCYS-SQLPQS-VCV-AP--GGTCFKSEFVYIN-N-S-FTLVTCGAGGACET
GSB_153115 410 TIDGTYVCSA-ETI-TEYFQNGVCA-P-TARA--G-SONSSA-NTG-ENFF-MNGGCYS-SQLPQS-VCV-AP--GGTCFKSEFVYIN-N-S-FTLVTCGAGGACET
GSB_153790 410 TIDGTYVCSA-ETI-TEYFQNGVCA-P-TARA--G-SONSSA-NTG-ENFF-MNGGCYS-SQLPQS-VCV-AP--GGTCFKSEFVYIN-N-S-FTLVTCGAGGACET
TSA4 479 TIDGTYVCSA-ETI-TEYFQNGVCA-P-TARA--G-SONSSA-NTG-ENFF-MNGGCYS-SQLPQS-VCV-AP--GGTCFKSEFVYIN-N-S-FTLVTCGAGGACET
GLP15_2640 509 TIDGTYVCSA-ETI-TEYFQNGVCA-P-TARA--G-SONSSA-NTG-ENFF-MNGGCYS-SQLPQS-VCV-AP--GGTCFKSEFVYIN-N-S-FTLVTCGAGGACET
QR46_4433 574 TIDGTYVCSA-ETI-TEYFQNGVCA-P-TARA--G-SONSSA-NTG-ENFF-MNGGCYS-SQLPQS-VCV-AP--GGTCFKSEFVYIN-N-S-FTLVTCGAGGACET
DHA2_150893 461 TIDGTYVCSA-ETI-TEYFQNGVCA-P-TARA--G-SONSSA-NTG-ENFF-MNGGCYS-SQLPQS-VCV-AP--GGTCFKSEFVYIN-N-S-FTLVTCGAGGACET
DHA2_153020 374 TIDGTYVCSA-ETI-TEYFQNGVCA-P-TARA--G-SONSSA-NTG-ENFF-MNGGCYS-SQLPQS-VCV-AP--GGTCFKSEFVYIN-N-S-FTLVTCGAGGACET
WB/9B10-B 435 TIDGTYVCSA-ETI-TEYFQNGVCA-P-TARA--G-SONSSA-NTG-ENFF-MNGGCYS-SQLPQS-VCV-AP--GGTCFKSEFVYIN-N-S-FTLVTCGAGGACET
GLP15_2 421 TIDGTYVCSA-ETI-TEYFQNGVCA-P-TARA--G-SONSSA-NTG-ENFF-MNGGCYS-SQLPQS-VCV-AP--GGTCFKSEFVYIN-N-S-FTLVTCGAGGACET
DHA2_152647 503 TIDGTYVCSA-ETI-TEYFQNGVCA-P-TARA--G-SONSSA-NTG-ENFF-MNGGCYS-SQLPQS-VCV-AP--GGTCFKSEFVYIN-N-S-FTLVTCGAGGACET
GL50803_113439 496 TIDGTYVCSA-ETI-TEYFQNGVCA-P-TARA--G-SONSSA-NTG-ENFF-MNGGCYS-SQLPQS-VCV-AP--GGTCFKSEFVYIN-N-S-FTLVTCGAGGACET
GLP15_625 449 TIDGTYVCSA-ETI-TEYFQNGVCA-P-TARA--G-SONSSA-NTG-ENFF-MNGGCYS-SQLPQS-VCV-AP--GGTCFKSEFVYIN-N-S-FTLVTCGAGGACET

VSP-5G8 478 NSDSCITGAGVYK-S-AA-CTKCDAGCATCTT-AA-PC-TCA-GYLLN---SK-AC--SD-ETIAGV-DLISCA-PPSS-IGFVLY-L-NDAS---V-N--GG
QR46_3107 478 NSDSCITGAGVYK-S-AA-CTKCDAGCATCTT-AA-PC-TCA-GYLLN---SK-AC--SD-ETIAGV-DLISCA-PPSS-IGFVLY-L-NDAS---V-N--GG
GSB_155403 250 NSDSCITGAGVYK-S-AA-CTKCDAGCATCTT-AA-PC-TCA-GYLLN---SK-AC--SD-ETIAGV-DLISCA-PPSS-IGFVLY-L-NDAS---V-N--GG
QR46_2660 222 NSDSCITGAGVYK-S-AA-CTKCDAGCATCTT-AA-PC-TCA-GYLLN---SK-AC--SD-ETIAGV-DLISCA-PPSS-IGFVLY-L-NDAS---V-N--GG
GSB_153033 551 AADACTGKGGVYK-S-AA-CTKCDAGCATCTT-AA-PC-TCA-GYLLN---SK-AC--SD-ETIAGV-DLISCA-PPSS-IGFVLY-L-NDAS---V-N--GG
GSB_154953 550 SDACTTCKGGVYK-S-AA-CTKCDAGCATCTT-AA-PC-TCA-GYLLN---SK-AC--SD-ETIAGV-DLISCA-PPSS-IGFVLY-L-NDAS---V-N--GG
GSB_152640 537 NSDSCITGAGVYK-S-AA-CTKCDAGCATCTT-AA-PC-TCA-GYLLN---SK-AC--SD-ETIAGV-DLISCA-PPSS-IGFVLY-L-NDAS---V-N--GG
GSB_153115 516 SANACTGKGGVYK-S-AA-CTKCDAGCATCTT-AA-PC-TCA-GYLLN---SK-AC--SD-ETIAGV-DLISCA-PPSS-IGFVLY-L-NDAS---V-N--GG
GSB_153790 514 NSDSCITGAGVYK-S-AA-CTKCDAGCATCTT-AA-PC-TCA-GYLLN---SK-AC--SD-ETIAGV-DLISCA-PPSS-IGFVLY-L-NDAS---V-N--GG
TSA4 583 SSTDTCTLDGVYK-S-AA-CTKCDAGCATCTT-AA-PC-TCA-GYLLN---SK-AC--SD-ETIAGV-DLISCA-PPSS-IGFVLY-L-NDAS---V-N--GG
GLP15_2640 613 NGSADVCKGGVYK-S-AA-CTKCDAGCATCTT-AA-PC-TCA-GYLLN---SK-AC--SD-ETIAGV-DLISCA-PPSS-IGFVLY-L-NDAS---V-N--GG
QR46_4433 679 DASTCTLDGVYK-S-AA-CTKCDAGCATCTT-AA-PC-TCA-GYLLN---SK-AC--SD-ETIAGV-DLISCA-PPSS-IGFVLY-L-NDAS---V-N--GG
DHA2_150893 566 SDACTTCKGGVYK-S-AA-CTKCDAGCATCTT-AA-PC-TCA-GYLLN---SK-AC--SD-ETIAGV-DLISCA-PPSS-IGFVLY-L-NDAS---V-N--GG
DHA2_153020 479 SNTVCTCKGGVYK-S-AA-CTKCDAGCATCTT-AA-PC-TCA-GYLLN---SK-AC--SD-ETIAGV-DLISCA-PPSS-IGFVLY-L-NDAS---V-N--GG
WB/9B10-B 538 SQDCTCKGGVYK-S-AA-CTKCDAGCATCTT-AA-PC-TCA-GYLLN---SK-AC--SD-ETIAGV-DLISCA-PPSS-IGFVLY-L-NDAS---V-N--GG
GLP15_2 524 DANCTCKGGVYK-S-AA-CTKCDAGCATCTT-AA-PC-TCA-GYLLN---SK-AC--SD-ETIAGV-DLISCA-PPSS-IGFVLY-L-NDAS---V-N--GG
DHA2_152647 607 SSTDTCTLDGVYK-S-AA-CTKCDAGCATCTT-AA-PC-TCA-GYLLN---SK-AC--SD-ETIAGV-DLISCA-PPSS-IGFVLY-L-NDAS---V-N--GG
GL50803_113439 600 SSTDTCTLDGVYK-S-AA-CTKCDAGCATCTT-AA-PC-TCA-GYLLN---SK-AC--SD-ETIAGV-DLISCA-PPSS-IGFVLY-L-NDAS---V-N--GG
GLP15_625 552 SDSICTCKGGVYK-S-AA-CTKCDAGCATCTT-AA-PC-TCA-GYLLN---SK-AC--SD-ETIAGV-DLISCA-PPSS-IGFVLY-L-NDAS---V-N--GG

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|-----|---|------|-----|----------|-----|----|-----|----|-------------------------------|-----|------|-------|----|-----|---------------|-------|---|
| VSP-5G8 | 574 | L | SG | --- | AIAGISV | --- | AV | --- | I | VVVGGLVGLCWF | --- | CRGK | --- | | | | | |
| QR46_3107 | 574 | L | SG | --- | AIAGISV | --- | AV | --- | I | VVVGGLVGLCWF | --- | CRGK | --- | | | | | |
| GSB_155403 | 346 | L | SG | --- | AIAGISV | --- | AV | --- | I | VVVGGLVGLCWF | --- | CRGK | --- | | | | | |
| QR46_2660 | 319 | L | SG | --- | AIAGISV | --- | AV | --- | I | VVVGGLVGLCWF | --- | CRGK | --- | | | | | |
| GSB_153033 | 648 | V | MSAV | DR | TF | I | S | --- | S | IQ | --- | ASH | GRAPP | Q | IV | GH | --- | PCTPSPVARLQHTVHVVICPHLESSCCRHAMEFLTA-RPRM |
| GSB_154953 | 646 | L | TC | --- | AIAGISV | --- | AV | --- | I | VVVGGLVGLCWF | --- | CRGK | --- | | | | | |
| GSB_152640 | 634 | L | TC | --- | AIAGISV | --- | AV | --- | I | VVVGGLVGLCWF | --- | CRGK | --- | | | | | |
| GSB_153115 | 613 | L | TC | --- | AIAGISVA | --- | A | --- | I | VVVGGLVGLCWF | --- | CRGK | --- | | | | | |
| GSB_153790 | 613 | L | SG | --- | AIAGISV | --- | AV | --- | I | VVVGGLVGLCWF | --- | CRGK | --- | | | | | |
| TSA4 | 680 | L | TC | --- | AIAGISV | --- | AV | --- | I | VVVGGLVGLCWF | --- | CRGK | --- | | | | | |
| GLP15_2640 | 712 | L | TC | --- | AIAGISVA | --- | A | --- | I | VVVGGLVGLCWF | --- | CRGK | --- | | | | | |
| QR46_4433 | 776 | V | MS | --- | XS | DL | LV | XXV | XP | PCXGASHGGRAPPRQXVGRPPARRALSFR | QHT | HL | CWL | HS | --- | CSCCRHAMEFLTA | CLRMA | |
| DHA2_150893 | 669 | L | TC | --- | AIAGISV | --- | AV | --- | I | VVVGGLVGLCWF | --- | CRGK | --- | | | | | |
| DHA2_153020 | 575 | L | TC | --- | AIAGISV | --- | AV | --- | I | VVVGGLVGLCWF | --- | CRGK | --- | | | | | |
| WB/9B10-B | 634 | L | TC | --- | AIAGISV | --- | AV | --- | I | VVVGGLVGLCWF | --- | CRGK | --- | | | | | |
| GLP15_2 | 621 | L | TC | --- | AIAGISVA | --- | A | --- | I | VVVGGLVGLCWF | --- | CRGK | --- | | | | | |
| DHA2_151647 | 708 | L | TC | --- | AIAGISV | --- | AV | --- | I | VVVGGLVGLCWF | --- | CRGK | --- | | | | | |
| GL50803_113439 | 694 | L | TC | --- | AIAGISV | --- | AV | --- | I | VVVGGLVGLCWF | --- | CRGK | --- | | | | | |
| GLP15_625 | 649 | L | TC | --- | AIAGISV | --- | AV | --- | I | VVVGGLVGLCWF | --- | CRGK | --- | | | | | |

| | | | | | | | | | | |
|----------------|-----|-----|-----|-------|---|-----|---|---|---|-----|
| VSP-5G8 | 607 | --- | --- | --- | A | --- | | | | |
| QR46_3107 | 607 | --- | --- | --- | A | --- | | | | |
| GSB_155403 | 379 | --- | --- | --- | A | --- | | | | |
| QR46_2660 | 352 | --- | --- | --- | A | --- | | | | |
| GSB_153033 | 727 | --- | --- | AGLRD | A | --- | | | | |
| GSB_154953 | 679 | --- | --- | --- | A | --- | | | | |
| GSB_152640 | 672 | S | TT | L | H | S | K | S | A | --- |
| GSB_153115 | 646 | --- | --- | --- | A | --- | | | | |
| GSB_153790 | 646 | --- | --- | --- | A | --- | | | | |
| TSA4 | 713 | --- | --- | --- | A | --- | | | | |
| GLP15_2640 | 745 | --- | --- | --- | A | --- | | | | |
| QR46_4433 | 856 | --- | --- | GLRDV | A | --- | | | | |
| DHA2_150893 | 702 | --- | --- | --- | A | --- | | | | |
| DHA2_153020 | 608 | --- | --- | --- | A | --- | | | | |
| WB/9B10-B | --- | --- | --- | --- | A | --- | | | | |
| GLP15_2 | --- | --- | --- | --- | A | --- | | | | |
| DHA2_151647 | 741 | --- | --- | --- | A | --- | | | | |
| GL50803_113439 | 727 | --- | --- | --- | A | --- | | | | |
| GLP15_625 | 682 | --- | --- | --- | A | --- | | | | |

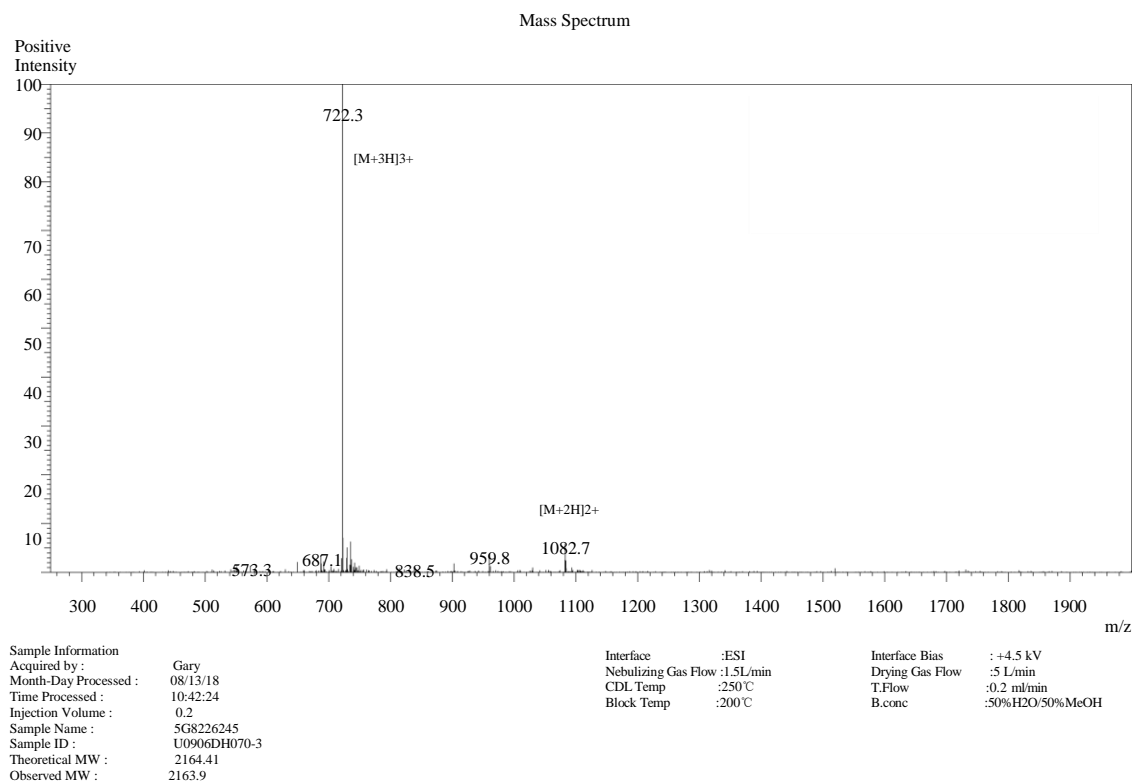
Anexo 13

Características de los Péptidos Sintetizados de la Proteína 5G8

Los péptidos se sintetizaron en GenScript (www.genscript.com)

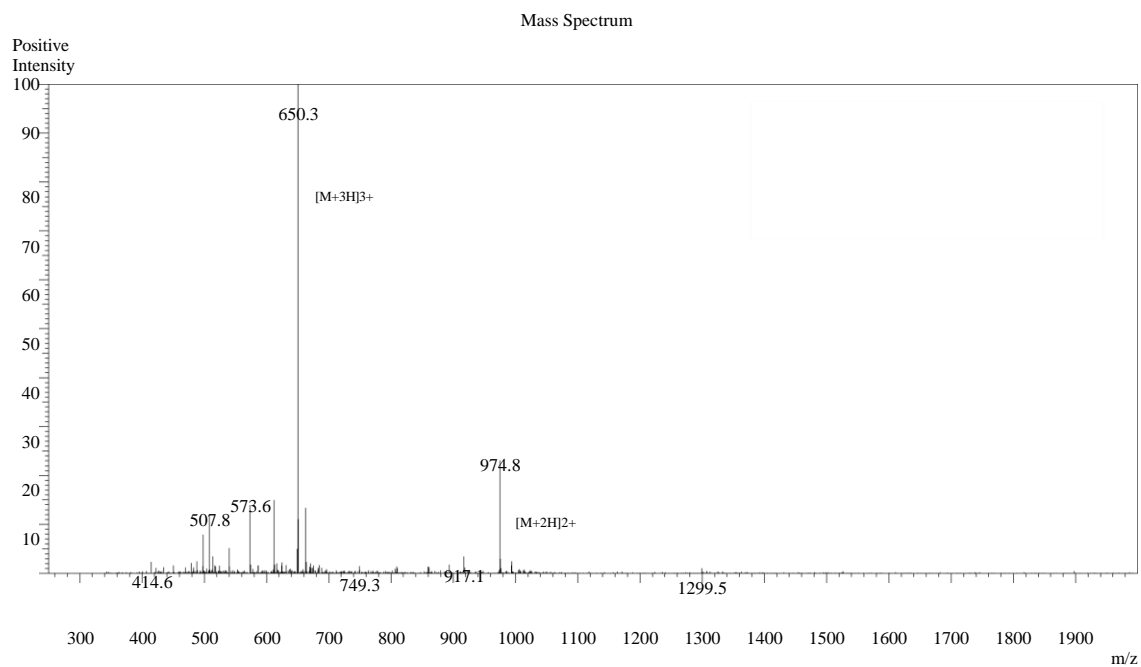
Péptido 1. 226-245 aminoácidos: FVLEGSNCVKSDCSTENCKT

96.3 % de pureza



Péptido 2. 347-366 aminoácidos: YGDDPTKGTCGEGCTTGTGK

90.2 % de pureza



Sample Information

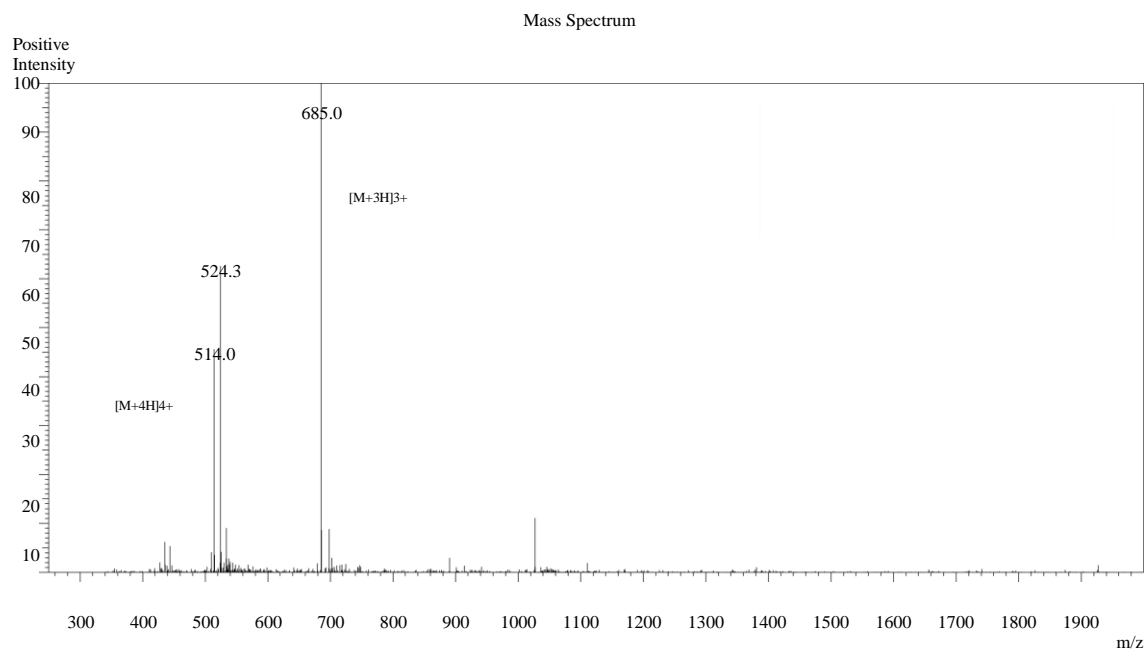
Acquired by : Gary
Month-Day Processed : 08/13/18
Time Processed : 12:43:02
Injection Volume : 0.2
Sample Name : 5G8347366
Sample ID : U0906DH070-5
Theoretical MW : 1948.06
Observed MW : 1947.9

Interface : ESI
Nebulizing Gas Flow : 1.5L/min
CDL Temp : 250°C
Block Temp : 200°C

Interface Bias : +4.5 kV
Drying Gas Flow : 5 L/min
T.Flow : 0.2 ml/min
B.conc : 50% H₂O/50% MeOH

Péptido 3. 184-201 aminoácidos: KDYYTDDTSSEPNGKTCK

92.7 % de pureza



Sample Information

Acquired by : Gary
Month-Day Processed : 08/13/18
Time Processed : 12:37:58
Injection Volume : 0.2
Sample Name : 5G8184201
Sample ID : U0906DH070-1
Theoretical MW : 2052.14
Observed MW : 2052.0

Interface :ESI
Nebulizing Gas Flow :1.5L/min
CDL Temp :250°C
Block Temp :200°C

Interface Bias : +4.5 kV
Drying Gas Flow :5 L/min
T.Flow :0.2 ml/min
B.conc :50%H2O/50%MeOH

Anexo 14

Artículo publicado

Immunity to Protozoa

Carlos Velazquez, *Department of Chemistry–Biology, University of Sonora, Hermosillo, Sonora, Mexico*

Victor Dominguez, *Department of Chemistry–Biology, University of Sonora, Hermosillo, Sonora, Mexico*

Thania Garzon, *Department of Chemistry–Biology, University of Sonora, Hermosillo, Sonora, Mexico*

Raul Rascon, *Department of Chemistry–Biology, University of Sonora, Hermosillo, Sonora, Mexico*

Advanced article

Article Contents

- Introduction
- Immune Response Induced by *Plasmodium* spp.
- Immune Response Induced by *Leishmania* spp.
- Immune Response Induced by *Trypanosoma cruzi*
- Immune Response Induced by *Toxoplasma gondii*
- Immune Response Induced by *Entamoeba histolytica*
- Immune Response Induced by *Giardia lamblia*
- Summary

Online posting date: 16th February 2018

Protozoan parasites are microorganisms that live and feed at the expense of a host. Parasites can cause diseases in humans and are worldwide distributed, causing high morbidity and mortality. This article describes the most important defence mechanisms against protozoan parasites of clinical relevance (*Plasmodium* spp., *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*). Protozoans exhibit a high heterogeneity in morphologies and antigenic expression, which is reflected in the different immune responses induced during the infection process. The first line of defence is the mechanisms of the innate immune response as physical and chemical barriers. However, in most cases, the adaptive humoral and cellular responses are implicated in controlling the infection. On the other hand, parasites have developed mechanisms to evade the immune response, hindering the development of vaccines, which offers a broad spectrum of protection among species.

Introduction

Parasitosis comprises a set of very diverse diseases, caused by different types of parasitic microorganisms, among which the protozoa stand out (Table 1). Protozoan infections can be acquired either through direct contact (water or contaminated food such as toxoplasmosis, amoebiasis and giardiasis) or through a vector

insect (malaria, Chagas disease and leishmaniasis) (Roitt *et al.*, 2001). Parasitic infections cause damage in tropical and subtropical areas, where malaria causes the highest number of deaths per year. These parasites present life cycles both simple (*Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*) and complex (*Plasmodium*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*), with different stages that may involve a transmission vector (mosquitoes, sandflies and triatomine for malaria, leishmaniasis and Chagas disease, respectively). The presence of these parasites in the host constitutes a stimulus for the immunological response to control and eliminate the infection (Figures 1 and 2). The immune response is divided into two branches: innate and adaptive immunity (Abbas *et al.*, 2012). Innate immunity is the first line of defence of humans against infectious agents and comprises those elements that are nonspecific to any microorganism, such as physical (mucous membranes), chemical (stomach pH and intestinal mucus) and biological (microbiota) barriers, complement systems, peristalsis, mediators of inflammation and cells such as macrophages, neutrophils and eosinophils. Adaptive immunity is a more complex response. The key role of the adaptive immunity in infections is to produce a specific immune response against the microorganism to be able to control the infection. These specific immune responses include the production of specific antibodies by B cells, meanwhile T cells release cytotoxic proteins and cytokines for the activation of other immune cells (Table 2). All of the parasites mentioned earlier have developed strategies to avoid these mechanisms to protect themselves. In this context, the generation of new prophylactic measures such as vaccines against the clinically relevant parasitosis is of great importance.

Immune Response Induced by *Plasmodium* spp.

Malaria is a blood disease caused by distinct species of *Plasmodium*. The most common species that can infect humans are *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* and *Plasmodium knowlesi*. *Plasmodium vivax* is the most distributed around the world, but *P. falciparum* causes almost all the fatalities (Sherling and van Ooij, 2016). According to the World Health Organisation (WHO),

eLS subject area: Immunology

How to cite:

Velazquez, Carlos; Dominguez, Victor; Garzon, Thania; and Rascon, Raul (February 2018) Immunity to Protozoa. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
DOI: 10.1002/9780470015902.a0000483.pub2

Table 1 General features of protozoan parasite infections with clinical significance worldwide

| Parasitosis/causative agent | Pathological stage | Definitive host ^a /vector | Transmission route | Mortality (annual deceased) | Morbidity (million cases annually) | Vaccine |
|--|-----------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|----------------|
| Malaria/ <i>Plasmodium</i> spp. | Merozoites | Mosquito/mosquito | Infected mosquito bite | 400 000 ^b | 212 ^b | RTS,S |
| Toxoplasmosis/ <i>Toxoplasma gondii</i> | Tachyzoites and bradyzoites | Cats/none | Congenitally and via faecal matter | 680 ^c | 10 ^c | None |
| Leishmaniasis/ <i>Leishmania</i> spp. | Amastigotes | Sandfly/sandfly | Infected sandfly bite | 20 000–30 000 | 0.7–1 | In development |
| Chagas disease/ <i>Trypanosoma cruzi</i> | Amastigotes | Triatomine/triatomine | Faecal/mucosal membrane | 12 000 ^d | 8 ^d | None |
| Amoebiasis/ <i>Entamoeba histolytica</i> | Trophozoites | Humans/none | Faecal-oral | 1400 ^c | 28 ^c | None |
| Giardiasis/ <i>Giardia lamblia</i> | Trophozoites | Humans/none | Faecal-oral | Not reported | 28 ^c | None |

^aDifferent species can be accidental hosts.

^bWHO (2016).

^cWHO (2015).

^dWHO (2017).

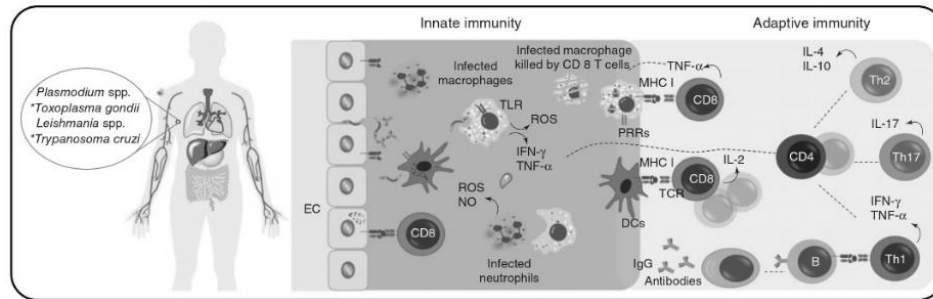


Figure 1 Intracellular protozoans activating different pathways of the immune response. Cells such as neutrophils, macrophages and epithelial cells (EC) participate in the innate immunity. These cells can produce reactive oxygen species (ROS, nitric oxide (NO) and cytokines such as IFN- γ (gamma interferon) and TNF- α (tumour necrosis factor alpha) to control the infection). Adaptive immunity is mediated by specific lymphocytes (T and B cells). T cells release cytotoxic proteins and cytokines for the activation of immune cells and B cells produce specific antibodies. Dendritic cells (DCs) and infected cells can present protozoan antigens to CD8-positive T cells by the major histocompatibility complex class I (MHC I). The activated CD8-positive T cells secrete cytokines such as TNF- α to mediate the killing of infected cells. The humoral immunity provided by antibodies can be an effector in the extracellular stage of the protozoan, and B cells can intervene in the maturation of different Th cell subsets that are implicated in most intracellular parasite infections. *Some protozoans such as *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* can invade different organs, depending on infection site different mechanisms of the immune response may be involved.

in 2016, 212 million cases were presented all over the world, with an estimation of 400 000 deaths (WHO, 2016). Infection occurs when an infected female mosquito of the genus *Anopheles* bites a human, resulting in the injection of the sporozoite stage. The sporozoites enter hepatocytes where asexual reproduction (schizogony) takes place. Rupture of the infected cells releases thousands of merozoites to the blood stream, which penetrate red blood cells to initiate repeated erythrocytic cycles. Inside cells, some of these ring-staged trophozoites might differentiate into gametocytes, and these are taken by the mosquitoes, where the parasite differentiates into sporozoites, closing the life cycle

(Figure 3). The initial symptoms may be difficult to recognise. Variable clinical signs include fever, chills, headaches, muscle aches, weakness, vomiting, cough, diarrhoea, abdominal pain and anaemia owing to iron deficiency. There may be other symptoms associated with altered organ function, such as kidney failure, pulmonary oedema, generalised seizures, coma and death. Clinical diagnosis of malaria includes antigen detection (commercial kits), microscopic observation of the parasite (blood smear examination, Gold Standard) and molecular diagnosis (polymerase chain reaction (PCR)) (White *et al.*, 2014). **See also: Malaria**

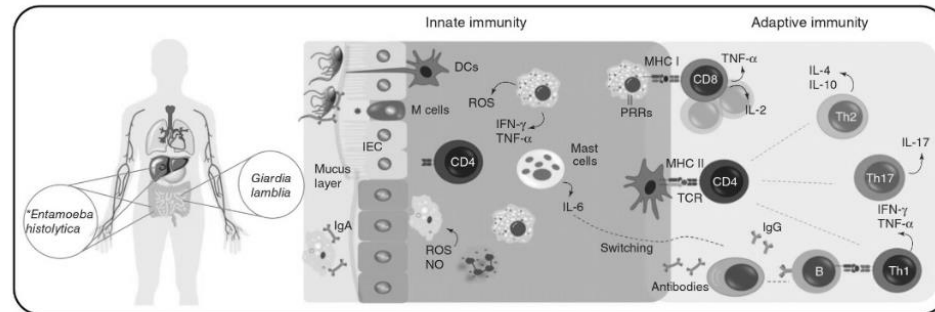


Figure 2 The extracellular protozoans activating different pathways of the immune response. The infection sites of *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* are in small and large gut, respectively. The physical barriers such as mucous membranes, stomach pH and biological peristalsis can control the infection. Owing to that *Giardia* is a noninfiltrative parasite, the DCs, macrophages and M cells may be able to mobilise *Giardia* antigens to lamina propria and activate the adaptive immune response. Also, the intestinal epithelial cells (IEC) release potent chemokines to recruit immune cells to the invasion site. Activated macrophages release TNF- α , stimulating neutrophils and macrophages to release ROS and NO, which can kill the parasite. ROS and NO may also contribute to tissue destruction. Major histocompatibility complex class II (MHC II) is implicated in antigen presentation of extracellular protozoans. T and B cells mediate the immune response against parasites through the antibodies IgA/IgG and cytokines of different T-cell subsets, respectively. *E. histolytica* can invade intestinal and other tissues as the liver.

Table 2 Effector mechanisms that control protozoan infections with clinical significance worldwide

| Parasitosis | Protective innate immunity | Protective adaptive immunity |
|----------------|---|---|
| Malaria | Macrophages, nitric oxide, IL-1, IL-6, IFN- γ , TNF- α , TLR2, TLR4, TLR9 | Th1, Th2 responses and IgG antibodies |
| Toxoplasmosis | IL-12-mediated activation of monocytes and macrophages | CD8-positive T cells and antibodies |
| Leishmaniasis | IFN- γ | CD4- and CD8-positive T cells |
| Chagas disease | Macrophages, natural killer cells | CD4- and CD8-positive responses and B cells |
| Amoebiasis | INF- γ -activated phagocytes | IgA mucosal antibodies |
| Giardiasis | Peristaltic movements, nitric oxide, antimicrobial peptides, mast cells, microbiota | CD4-positive (Th1, Th17) |

Innate immunity

Immunity against *Plasmodium* is complex, as it involves intracellular stages of the parasite. Nevertheless, there are different elements from innate immunity, which have a role against the parasite. Macrophages can phagocyte and kill blood-stage parasites by the production of nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS). In addition, cytokines such as Interleukin-1 (IL-1), IL-6, tumour necrosis factor alpha (TNF- α) and gamma interferon (IFN- γ) are secreted for controlling malaria infections (Plebanski and Hill, 2000; Walther *et al.*, 2006). Besides, TNF- α , secreted by monocytes, leads to an inhibition of the intracellular stages of the parasite. In humans, it has been described that toll-like receptors (TLRs), such as TLR-2, TLR-4 and TLR-9, recognise and begin a signalling cascade for the release of cytokines (TNF- α and IL-1 β), which can regulate the killing of *Plasmodium* (Gazzinelli *et al.*, 2014).

Adaptive immunity

The main goal of adaptive immunity is to produce a specific response against a determined pathogen. During malaria,

humoural immune response might have a key role. In experimental murine models and humans, antibodies lead to a decrease in the number of parasites (Helegbe *et al.*, 2009), and parasite elimination is impaired in B-cell deficient mice (Arnold *et al.*, 2010). Selective agglutination of infected erythrocytes with antibodies is associated with a reduced density of parasites. Opsonising and agglutinating antibodies recognise proteins of merozoites in the blood stream (Bull *et al.*, 2000), moreover, antibodies can opsonise infected red blood cells to be eliminated by phagocytes (Zhou *et al.*, 2015). On the other hand, sporozoites and merozoites, which infect hepatocytes and red blood cells, respectively, are intracellular parasite stages and cannot be recognised by antibodies. Cellular immune response plays an important role against *Plasmodium*; it has been seen that vaccination with RTS,S, a phase III malaria candidate vaccine (RTS,S is a recombinant protein-based vaccine using genes from central repeat region of *P. falciparum* circumsporozoite protein (R), T-cell epitopes of CSP (T) and viral envelope of hepatitis B surface antigen (S)), offers protection associated with CD4-positive T-cell response (Ansong *et al.*, 2011; Kester *et al.*, 2009). CD8-positive T cells mediate killing of the sporozoites, possibly by producing

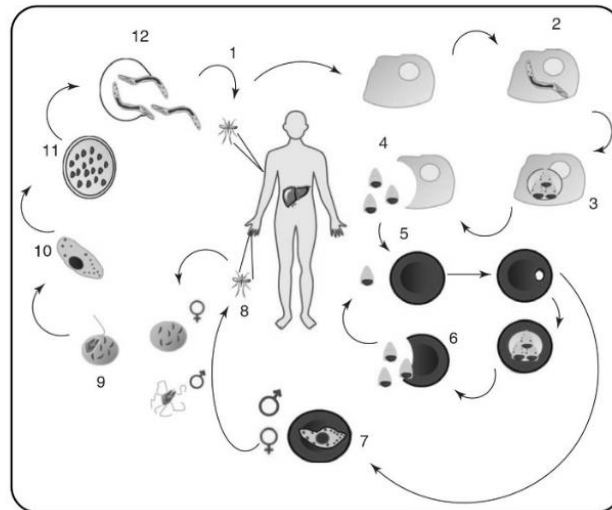


Figure 3 Life cycle of *Plasmodium*. Malaria parasite life cycle involves two hosts. During a blood meal, a malaria-infected female mosquito (*Anopheles*) inoculates sporozoites (1). Sporozoites infect liver cells (2) and mature into liver schizonts (3), which rupture and release merozoites (4). Merozoites infect red blood cells (5) and differentiate into trophozoites. Ring stage trophozoites mature into erythrocytic schizont, and its rupture releases merozoites (6). Some trophozoites mature into sexual gametocytes (7). Blood-stage merozoites and trophozoites are responsible for clinical manifestations. Gametocytes, male and female, are ingested by mosquitoes during a blood meal (8). In mosquito's stomach, male gametocytes penetrate female gametocytes generating zygotes (9). These become ookinetes (10) which invade the midgut wall of mosquito and differentiate into oocysts (11). Oocysts grow, rupture and release sporozoites (12), which make their own way to salivary glands. The life cycle ends with the inoculation of sporozoites (1) into a new human host.

cytokines, perforins and granzymes (Claser *et al.*, 2017; Villarino and Schmidt, 2013). Both T-helper responses (Th), Th1 and Th2, are effective against *Plasmodium*, where Th1 is more common in the acute phase of the disease, meanwhile Th2 predominates in chronic stages (Perez-Mazliah and Langhorne, 2014).

Immune Response Induced by *Leishmania* spp.

Leishmaniasis is a disease caused by a protozoan parasite of the genus *Leishmania*. There are more than 30 species of the *Leishmania* genus, which can infect mammals, from which, approximately 20 species cause different manifestations of the diseases in humans, such as visceral, cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis (Borghi *et al.*, 2017). In an epidemiological compilation of leishmaniasis carried out during 2007–2011, it was estimated that this disease is distributed in 98 countries around the world covering five continents. The estimated incidence of cutaneous leishmaniasis is 0.7–1.2 million cases compared to visceral leishmaniasis that is 0.2–0.4 cases (Alvar *et al.*, 2012). *Leishmania* is transmitted through the bites of infected female phlebotomine sandfly vector to humans, the infective form is the flagellated motile extracellular procyclic promastigote. The promastigotes establish an intracellular residence in neutrophils

and macrophages transforming to amastigotes; the cycle continues when the sandflies become infected by ingesting the infected cells, and finally, amastigotes become promastigotes in the intestine of the sandflies (Borghi *et al.*, 2017). **See also:** *Leishmania*

Innate immunity

The first cells that participate in the interaction with promastigotes of *Leishmania* are the neutrophils, these cells control the parasite reproduction and the accelerated presence of lesions in the early stages of infection (Sousa *et al.*, 2014). In an *Leishmania major* infection, chemokine IL-8 and TNF- α increase the number of neutrophils at the site of infection (Allenbach *et al.*, 2008; van Zandbergen *et al.*, 2002). However, promastigotes can inhibit the spontaneous apoptosis of neutrophils and these cells serve as a temporary reservoir for promastigotes (Aga *et al.*, 2002). Although *Leishmania* is found in neutrophils during the first stages of infection, promastigotes differentiate into amastigotes inside macrophages. Macrophages can become infected by engulfing promastigotes by the recognition of gp63 and lipophosphoglycan (LPG), two main molecules involved in the virulence of the parasite. Parasite antigens can modulate the host immune response by activating TLRs. In the parasite recognition process TLR-1, TLR-11, TLR-12, TLR-4, TLR-9 and the heterodimer TLR-2-TLR-6 are implicated. The last three TLRs play a role in

the protection against *Leishmania* infection (Kropf *et al.*, 2004; Liese *et al.*, 2007).

Adaptive immunity

In general terms, leishmaniasis is an infection regulated by different subpopulations of T lymphocytes. CD8-positive T cells play an important protective role in the host defence against *Leishmania*. It was found that IFN- γ , CD8- and CD4-positive T cells from cured patients of cutaneous leishmaniasis were increased, suggesting a contribution of those factors to controlling the infection (Nateghi Rostami *et al.*, 2010). A similar pattern was observed in CD4-positive T-cell-depleted mice, which showed resistance to infection with *L. major* in an environment enriched with CD8-positive T cells and a high production of IFN- γ (Scott *et al.*, 2004). IFN- γ induced the production of NO, which can mediate resistance against reinfection owing to cytotoxicity caused to parasite-infected macrophages (Müller *et al.*, 1994). It has also been associated that the concomitant production of CD8-positive cells and IFN- γ downregulates the Th2 response to a transient level, and promotes the development of cytokines such as IFN- γ , TNF- α and IL-2, developing a protective Th1 response (Uzonna *et al.*, 2004). *Leishmania* is not found in the cytoplasm, because of this, the direct activation of cytotoxic CD8-positive cells through the presentation of major histocompatibility complex I (MHC I) has been studied with contradictory results. There are studies that report differences in the antigen presentation pathways during *Leishmania* infections. *Leishmania amazonensis* antigens are processed by the classic pathway in proteasome, while the processing of *L. major* antigens can be proteasome independent (Bertholet *et al.*, 2006; Kima *et al.*, 1997). These differences have been associated with an aggravating pathology in cutaneous leishmaniasis, and with an exacerbated activation of CD8-positive T cells (Faria *et al.*, 2009).

Immune Response Induced by *Trypanosoma cruzi*

American trypanosomiasis, or Chagas disease, is a neglected disease, caused by the parasite *T. cruzi*, a well-distributed parasite all over Latin America, nevertheless, owing to migration, *T. cruzi*-infected individuals have been found in the United States and Europe (Bern, 2015). It has been estimated that around 8 million people in the world are currently infected according to the WHO, and it is believed that these numbers will increase owing to a lack of an effective vaccine (De Souza *et al.*, 2010). *T. cruzi* presents a life cycle involving both vertebrate (mammals) and invertebrate (*Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus*) hosts. Once in the mammalian host, trypomastigotes can infect nucleated cells, such as macrophages. Intracellular amastigotes multiply by binary fission and they are responsible of the symptomatology, which include fever, hepatosplenomegaly and inflammatory reactions as an acute phase of infection; a chronic form can develop 10–20 years after the initial infection, causing irreversible damage to the heart, oesophagus and colon (Barrias *et al.*, 2013). The life cycle of *Trypanosoma* ends when

the insect vector consumes trypomastigotes from the host, at this point they become epimastigotes (De Souza *et al.*, 2010). Currently, the methods used to detect Chagas disease include microscopy, xenodiagnosis (insect vectors fed with blood of the possible infected subject, followed by evaluation of the presence of the parasite), molecular techniques (such as quantitative PCR) and serological methods that detect specific antibodies. Some of these methods for diagnosis of either acute or chronic phase lack specificity or sensitivity, therefore, there is a need to develop new techniques that allow the recognition of the parasite (Tanowitz and Weiss, 2017). Experimental data show that extracellular vesicles released by infected cells, which contain antigens of the parasite, might be candidates for a vaccine. To date, there has not been an efficient vaccine against this parasitosis (Bautista-López *et al.*, 2017). **See also: *Trypanosoma***

Immune response in Chagas disease

In immunocompetent hosts, the immune system can easily control the infection (Moreira *et al.*, 2013). Both innate immunity and adaptive immunity play an important role in controlling the infection. Protective immunity is mediated mainly by macrophages, natural killer (NK) cells, T cells (CD4- and CD8-positive) and B cells (Lauccella *et al.*, 2004; Miyahira *et al.*, 2005).

Innate immunity

Different elements of innate immunity are involved in the control of the infection. The importance of molecules such as NO has been demonstrated, which has the potential of offering protection against this parasite, resulting in one of the most important mediators of the innate immunity (Koo *et al.*, 2016). NO produces free radicals in cells and upregulates inflammatory responses against the protozoan (Silva *et al.*, 2003). Other pathways involve metabolism of *T. cruzi*, in which NO might reduce growth factors, such as iron, which is important for the parasite (Ciccarelli *et al.*, 2007). On the other hand, another element implicated in innate immunity against *T. cruzi* is the complement system (Lidani *et al.*, 2017). It has been demonstrated that the complement can be activated by either amastigote, epimastigote or trypomastigote, the noninfective form (epimastigote) being even more susceptible to complement-mediated cell lysis.

Adaptive immunity

During *T. cruzi* infection, cellular immune response exhibits an important role because one of the parasite infection phases includes an intracellular stage. Cellular responses are driven by CD4-positive T cells through cytokines. Proinflammatory cytokines such as IL-12, TNF- α and IFN- γ induce a strongly protective Th1 response; meanwhile anti-inflammatory cytokines such as IL-4 and IL-10 mediate susceptibility to acquire infection (Arce-Fonseca *et al.*, 2013). On the other hand, CD8-positive T cells also seem to be important to control the infection; depletion of these cells results in parasitemia and fatal outcome in mice (Rottenberg *et al.*, 1995). Vaccination experiments with a single CD8-positive T-cell epitope of the trans-sialidase surface antigen (TSSA) demonstrated the effectiveness in protecting mice from lethal infection with *T. cruzi* (Miyahira *et al.*, 2005).

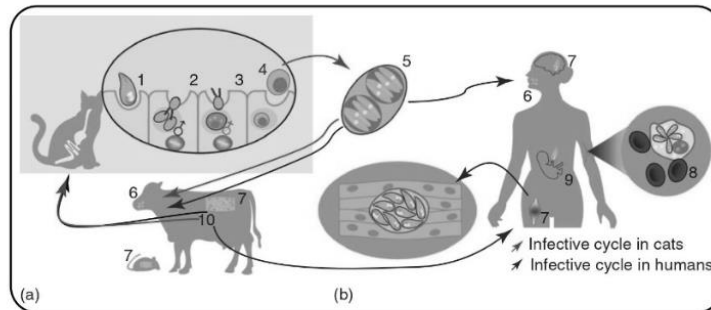


Figure 4 The life cycle of *T. gondii*. (a) Enteric reproduction of *T. gondii* in cats. (1) Tachyzoites in the lumen of the intestine invade EC, here, male and female gamonts are developed. (2) Male gamonts produce microgamonts that can swim to fertilise (3) female macrogamonts and form zygotes. (4) Zygotes mature and expel unsporulated oocysts that are shed in cats faeces. (5) Unsporulated oocysts mature and give rise to sporulated oocysts containing two sporocysts with four sporozoites. (b) Schizogony of *T. gondii*. (6) Sporulated oocysts are ingested by humans, rodents and livestock (cats can also get infected), bradyzoites are released and rapidly disseminate in the host body and transform into tachyzoites (the same morphology as bradyzoites but with a higher rate of division). (7) Tachyzoites invade muscle or neural tissues and transform into cyst bradyzoites. (8) As well, tachyzoites can invade immune cells to form schizonts and divide until the cell explodes and more tachyzoites are released to the blood stream (9) Tachyzoites can break the placental barrier and infect foetus in pregnant women. (10) Cyst bradyzoites can infect humans and other animals if eaten (infected raw/undercooked meat) completing the life cycle.

Immune Response Induced by *Toxoplasma gondii*

T. gondii is an obligate intracellular parasite with a complex life cycle (Figure 4). Members of the domestic cat family are the definitive host and represent the major source of transmission. The environmental resistant form of the parasite is the oocyst, after being ingested, the oocysts in the intestines of cats duplicate and are shed into the faeces in a 1- to 21-day period, where they sporulate and become infective. Here, birds, rats, mice and other rodents serve as intermediate hosts, becoming infected by the ingestion of food or water contaminated with sporulated oocysts. Oocysts briefly after being ingested transform into tachyzoites that penetrate nucleated cells and start to replicate until the cell explodes; tachyzoites travel through the blood stream and invade neural or muscle tissues to become cyst bradyzoites, a tachyzoite form with a slower rate of division. Humans can get infected by ingesting sporulated oocysts either by food contamination or direct contact with cat faeces, eating undercooked meat with cysts or congenital transmission (pregnancy) (Montoya and Liesenfeld, 2004). Toxoplasmosis is present in every country, and the seropositivity rates range from less than 10% to over 90% (Pappas *et al.*, 2009). Under normal circumstances, *Toxoplasma* infection is controlled by the immune response of the host. Difficulties arise when the immune system is compromised usually by HIV (human immunodeficiency virus) and when the cyst forms in brain, eyes or is passed to the foetus leading to stillborn children (Montoya and Liesenfeld, 2004). **See also:** Toxoplasmosis

Innate immunity

TLR activation is essential in controlling *T. gondii* infection at the initial stages, profilin is an actin binding protein that serves as a

motility mechanism in the parasite, and it has been reported as a pathogen-associated molecular pattern (PAMP) of *Toxoplasma* being recognised by murine TLR-11 and TLR-12 (Koblansky *et al.*, 2013; Plattner *et al.*, 2008) and by human TLR-7, TLR-8 and TLR-9. In both models, the activation of TLRs leads to the production of proinflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-12, TNF- α and IFN- γ (Andrade *et al.*, 2013). Neutrophils and NK cells can aid in the protection against *Toxoplasma*, however, they are susceptible to the parasite. In neutrophil-depleted mice, the infection was contained mainly by the action of inflammatory monocytes recruited by MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) and CCR-2 (chemokine receptor type 2) chemokines, exhibiting the ability to control the infection by the production of NO and activation of macrophages (Dunay *et al.*, 2010).

Adaptive immunity

Although *T. gondii* is an obligate intracellular pathogen, humoral response contributes to a large extent to clear the infection, specific IgM, IgA, IgE and IgG2 antibodies are present in the serum of infected patients, can neutralise and opsonise tachyzoites (Correa *et al.*, 2007). IL-12 also contributes to specific cell-mediated immunity, promoting the stimulation of CD4- and CD8-positive T cells creating a Th1 response mediated by IFN- γ (Dziadek *et al.*, 2009). Cytotoxic CD8-positive cells as expected mediate the infection by recognising infected cells and destroy them using the perforin-mediated cytotoxicity. CD4-positive T cells seem to primarily assume regulatory (helper) functions, essential for the generation of CD8-positive effectors (Araujo, 1992; Denkers *et al.*, 1997). *T. gondii* has been described as an opportunistic parasite as the mechanisms described earlier are merely cytostatic, and the infection is contained in a latent form. Only when a suppression of the immune response, as the one seen in HIV patients owing to the impairment of T cells, or

diverse types of cancers, can enhance the pathogenic features of the parasite and become a life-threatening infection (Araujo, 1992; Montoya and Liesenfeld, 2004).

Immune Response Induced by *Entamoeba histolytica*

E. histolytica is a protozoan parasite with a simple life cycle, the infection begins with the ingestion of water or food contaminated with the resistant cyst. Inside the small intestine, the excystation takes place and the resulting trophozoite migrates to the large intestine where it starts to duplicate, here, the encystation process begins, and the cysts are shed in faeces, starting the life cycle again. The infection can be asymptomatic when the parasite stays in the lumen of the bowel, however, the trophozoite can break the epithelial barrier and cause ulcerative amoebiasis, dysentery and tissue destruction in approximately 20% of the infected hosts. To a lesser extent (1%), the trophozoite can roam through the portal vein to the liver causing amoebic liver abscesses. *E. histolytica* is responsible for estimated 40 000–100 000 deaths yearly (Haque *et al.*, 2009). **See also:** Amoebiasis

Innate immunity

The first line of defence against this parasite is the mucus layer that covers the epithelium of the intestine, preventing the direct interaction of the trophozoite with the enterocytes. However, *E. histolytica* is able to pass through the mucus allowing the trophozoite to adhere to the epithelial cells by the galactose/*N*-acetyl-D-galactosamine lectin (Gal/GalNAc). The adhesion to epithelial cells promotes the activation of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and the secretion of proinflammatory cytokines such as IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 (Bansal *et al.*, 2009; Hou *et al.*, 2010). This cytokine production promotes the recruitment of neutrophils. IFN- γ -activated neutrophils can kill *Entamoeba* trophozoites in an H₂O₂ dependent manner. Macrophages are also recruited to the site of the infection and become amoebicidal after being activated with TNF- α and IFN- γ , as well, the interaction of *E. histolytica* PAMPs with TLR-2, TLR-4 and TLR-9 (intracellular receptor DNA (deoxyribonucleic acid) binding receptor) leads to activation of phagocytes and secretion of proinflammatory cytokines (Ivory *et al.*, 2008; Ngobeni *et al.*, 2017). Yet, this inflammatory reaction is a double-edged sword, as the recruitment of cells softens the tight junctions between epithelial cells facilitating the parasite colonisation to lamina propria (Watanabe *et al.*, 2017). In amoebic liver abscesses, neutrophils play a key role in the mechanisms of resistance to amoebic infection in mice (Seydel *et al.*, 1997; Velazquez *et al.*, 1998). On the other hand, liver shows severe damage by TNF- α released by Kupffer cells (resident macrophages in liver) causing inflammation and cellular recruitment (Helk *et al.*, 2013).

Adaptive immunity

Several immunogenic molecules have been described for *E. histolytica* for example Gal/GalNAc lectin, peroxiredoxin, EhCP112

molecule, among others. Studies have revealed the importance of secretory IgA antibodies against Gal/GalNAc lectin, inhibiting the adherence of the trophozoite to epithelial cells in intestinal amoebiasis (Carrero *et al.*, 1994). IgG and IgM specific antibodies demonstrated the importance of complement activation (classic pathway) in liver amoebiasis (Ravdin *et al.*, 2003). Both CD4- and CD8-positive T cells have an active role in the elimination of the parasite. CD8-positive T cells overexpress IL-17 whereas CD4-positive T cells overexpress IFN- γ in vaccine-primed protective immunity using Gal/Nac lectin fragments. IL-17 is a proinflammatory cytokine that stimulates cell recruitment (neutrophils and macrophages) and together with IFN- γ and IL-2, the immune response is skewed towards a Th1 response promoting macrophage amoebicidal effects (Guo *et al.*, 2008). Cell-mediated immunity in amoebic liver abscesses shows a significant suppression of CD4-positive cells by IL-10. In contrast, in murine amoebic colitis, CD4-positive T-cell responses are related to tissue damage, possibly due to the production of IL-4 and IL-13 that can suppress the protective effects of Th1 IFN- γ (Guo *et al.*, 2008). In summary, humoral immunity provided by IgA antibodies and the activation of a Th1 response by the production of IL-17 and IFN- γ by CD8- and CD4-positive T cells seem to be the adaptive immune mechanisms involved in the control of amoebic infections (Guo *et al.*, 2009, 2011).

Immune Response Induced by *Giardia lamblia*

G. lamblia is a binucleated flagellated protozoan parasite that colonises the upper intestinal tract, and it is the causative agent of giardiasis, one of the most common intestinal parasites worldwide. The prevalence of this parasitosis is discrepant, in developing countries it is 4–43%, in contrast, developed countries have a 3–7% prevalence (Painter *et al.*, 2015; Roxström-Lindquist *et al.*, 2006). The genotypic classification of *Giardia* consists of eight assemblages (genotypes/subpopulations) from A to H. A and B have been associated with human infections (Cacciò and Ryan, 2008). *Giardia* can generate an asymptomatic infection or clinical manifestations such as diarrhoea, flatulence, weight loss, and nutrient malabsorption (Luján and Svård, 2011). *G. lamblia* has only two stages in its life cycle, cyst and trophozoite. The infection begins with the ingestion of food or water contaminated with cysts, the resistant form to environmental conditions. Acidic conditions of the stomach induce the excystation where each cyst generates two trophozoites, this is the stage that colonises the intestinal epithelium and causes the pathology of giardiasis. Factors, such as high levels of bile, low levels of cholesterol and basic pH, favour the encystation of trophozoites, thus initiating a new life cycle (Lauwaet *et al.*, 2007). **See also:** Giardiasis

Innate immunity

Mechanisms of innate immunity such as peristaltic movement of the intestine, antimicrobial peptides and NO are involved in controlling the infection with *G. lamblia*. Trophozoites colonise the small intestine by adhering to the microvilli of epithelial cells,

which express pattern recognition receptors (PRRs) to identify PAMPs of the parasite, this triggers mechanisms to direct the immune response to the site of the infection. Mast cells in connective tissues are important against *Giardia* as mast cell-deficient mice failed to control the infection. In contrast, wild-type mice eliminated the infection normally (Li *et al.*, 2004). In recent years, microbiota has been associated with the pathology of giardiasis (Fink and Singer, 2017). The absence of the microbiota in murine models increases the susceptibility to the parasite infection, however, the microbiota could also contribute to the symptoms presented during the infection. Because *Giardia* is a noninvasive parasite, how the systemic immune response is activated has not been fully understood yet, however, it is known that macrophages, M cells and dendritic cells may be able to mobilise *Giardia* antigens to lamina propria (Lopez-Romero *et al.*, 2015).

Adaptive immunity

During *Giardia* infection, antibodies mainly of isotype IgA and IgG help in the clearance of this parasitosis, but they are not strictly necessary. IgA-deficient mice could not eradicate the infection by *Giardia muris* or *G. lamblia* (Langford *et al.*, 2002). However, B-cell-deficient mice infected with *G. lamblia* and *G. muris* can eliminate both species (Singer and Nash, 2000). CD8- and CD4-positive T lymphocytes are involved in the giardiasis process, the latter being essential for establishing the parasite's eradication mechanisms (Singer and Nash, 2000). The Th1- and Th2-type responses are implicated in giardiasis, owing to the presence of IL-6, TNF- α , IFN- γ and IL-4 (Lopez-Romero *et al.*, 2015). The role of IL-17 has been evaluated in *Giardia* infection. IL-17 receptor (IL-17RA) knockout mice had deficiency in eliminating the parasite (Dreesen *et al.*, 2014). IL-17 also has been suggested as a link factor between the humoral and cellular immune responses, because IL-17 signalling is related to the transport of IgA to intestinal lumen (Dann *et al.*, 2015).

Immune evasion by protozoan parasites

The ability of parasites to evade the immune response is based on several molecular mechanisms of the parasite and host-parasite interactions, in both cases, there is a wide repertoire, and this is influenced by specific characteristics of each parasite, such as the life cycle, infection sites, and induced-immune responses (Table 3). During differentiation in the vector, *Trypanosoma* undergoes some changes such as the expression of complement binding molecules which confer the parasite the ability to evade the lytic effect of complement. These molecules interact with either C2 or C3 convertase proteins, which leads to an inhibition of complement and parasite survival in the host (Lidani *et al.*, 2017). Other species of *Trypanosoma* such as *T. brucei* use antigenic variation of the highly immunogenic variant surface glycoproteins (VSGs), which coat the parasite and are important virulence factors. Antigenic variation can trigger relapsing parasitemia as the immune system can no longer recognise the previous VSG of the parasite (Horn, 2014). In a similar way, the antigenic variation in *G. lamblia* has been attributed to variant-specific surface proteins (VSPs), proteins that cover the surface of trophozoites and are the main antigens recognised

Table 3 Some mechanisms of parasite immune evasion

| Parasite | Immune response evasion mechanism |
|------------------------------|--|
| <i>Plasmodium</i> spp. | Antigenic variation, cell traversal, inhibition of reactive oxygen species and intracellular replication |
| <i>Toxoplasma gondii</i> | Suppression of cytokine signalling |
| <i>Leishmania</i> spp. | Downregulation of toll-like receptors |
| <i>Trypanosoma</i> spp. | Inhibition of complement system and antigenic variation |
| <i>Entamoeba histolytica</i> | Proteolytic activity on antibodies and complement |
| <i>Giardia lamblia</i> | Antigenic variation |

by the host's immune system. There is a repertoire of approximately 200 VSP genes in the parasite genome, but only one VSP is expressed at a given time in each trophozoite and there is an antigenic replacement every 6–13 generation of the parasite, the genetic mechanism that regulates the expression of these proteins is given by RNA (ribonucleic acid) interference (Prucca *et al.*, 2008), this mechanism has been a target for the study of a vaccine, owing to the importance for the persistence of the parasite. Approximately, 50 cysteine protease genes are encoded in the *E. histolytica* genome for which different targets have been reported. Cysteine protease A5 (Cp-A5) is capable of degrading mucin-2 and proteins from the extracellular matrix allowing the trophozoite to overcome the mucus layer that covers the lumen of the bowel (Hou *et al.*, 2010). Likewise, Cp-A1 cleaves human and murine antimicrobial peptides from the cathelicidins family, important in innate protection against the parasite. Cleavage of antibodies (IgA and IgG) and complement fragments (C3a and C5a) by *E. histolytica* cysteine proteases blocks the classical complement activation pathway (Que and Reed, 1997). *Entamoeba* has also developed evasion mechanisms against respiratory burst by oxygen reactive species (H₂O₂, O₂⁻ and OH⁻) and NO produced by neutrophils and macrophages by several mechanisms as the expression of peroxiredoxin, a potent antioxidant enzyme (Davis *et al.*, 2006), NO synthase substrate L-arginine to L-ornithine (Elnekave *et al.*, 2003) and production of prostaglandin E2 (PGE2) that can suppress Th1-protective response (Wang and Chadee, 1995; Wang *et al.*, 1994). In *Leishmania* infection, amastigotes can modulate the expression of TLRs. In infected macrophages of BALB/c mice, a decrease in TLR4, TLR9 and TLR2-TLR6 expression has been observed (Kropf *et al.*, 2004; Liese *et al.*, 2007), this indicates that, from early stages of infection, *Leishmania* uses immune evasion strategies. Antigenic variation is a phenotypic variation; some microorganisms use this ability to adapt to the conditions of effector immune responses. *Plasmodium* spp. has evolved and developed strategies to evade the immune system; antigenic variation among stages is one of the most important. Also, *Plasmodium* has the ability to downregulate the formation of ROS in liver. Furthermore, proteins such as SPECT-1 (sporozoite microneme protein

essential for cell traversal), SPECT-2 (perforin-like protein 1) and TRAP (thrombospondin-related anonymous protein) are involved in the disruption of host membranes, migration through and out cells (cell traversal) and motility of the parasite (Gomes *et al.*, 2016). *T. gondii* has the ability to infect almost every nucleated cell, even cells from the immune system, dendritic cells and macrophages infected with the parasite secrete cytokines such as IL-12 and INF- γ which results in an inflammatory reaction and recruitment of NK cells and activated CD8-positive T cells that can recognise infected phagocytes and lyse them. However, this effort results in the dissemination of tachyzoites into the milieu and the infection of adjacent cells (Persson *et al.*, 2009). Also, *T. gondii* induces the expression of the endogenous suppressor of signalling 1 protein (SOCS-1) and cytokine inducible Src homology 2 domain-containing protein (CIS) in infected macrophages. These proteins reduce the expression of IFN- γ and NO, promoting the survival of the parasite inside the cell (Zimmermann *et al.*, 2006).

Vaccination against protozoan infection

There are different lines of research focused on new vaccine strategies against the parasites. Some of them are focused on the modulation of the immune response and on the expression of immunogenic proteins. Malaria is one of the most important parasitic diseases in the world. It affects millions of people per year. Vaccines against the disease have been developed, however, it is necessary to characterise the immune response that triggers these. The RTS,S malaria candidate vaccine, which has recently entered phase III testing, targets a protein of *P. falciparum* (Ansong *et al.*, 2011). IL-10 has been described as a key factor in *Leishmania* latency, and anti-IL-10 receptor antibodies have been proposed using a therapeutic approach (Belkaid *et al.*, 2001). Another strategy evaluated has been the use of multiple conserved proteins in *L. major*, among them are the molecules LeIF (leishmania eukaryotic initiation factor), LACK (leishmania homolog of receptors for activated C-kinase) and TSA (thiol-specific antioxidant antigen), which increase the Th1 response and can reduce cutaneous lesions in BALB/c mice (Maspi *et al.*, 2017). Although there are attempts to develop vaccines for leishmaniasis, the great challenge of providing protection to converging pathways among the distinct species of *Leishmania* must be overcome. Chagas disease is a life-threatening disease, considering this, there is an urgency to develop a vaccine against the disease. To date, there has been no one yet. CD8-positive T cells are important to control parasitosis. The induction of specific CD8-positive T cells has been described, where the plasmid vector and an adenovirus-Ad5, both containing ASP-2 gene, amastigote surface protein 2 gene from *T. cruzi*, were able to induce protection in A/Sn mice (highly susceptible to infection with *T. cruzi*) (Vasconcelos *et al.*, 2004). Vaccination against *Entamoeba* is a challenge in diverse ways, the most important is that the human is the only reservoir of *E. histolytica*, making difficult the correlation among animal models, however gerbils (*Meriones unguiculatus*) has served as a good model to study this type of immune response (Chadee and Meerovitch, 1984). Despite this, several candidates have been proposed, the most widely studied antigen in vaccine development is the Gal/GalNAc lectin with a Th1-mediated mechanism

(Guo *et al.*, 2009), metallosurface protease (EhMSP-1) is also a good candidate by producing a robust IgG antibody amount and conferring protection against amoebic liver abscesses (Roncolato *et al.*, 2015).

Summary

In this article, we summarise the main effector mechanisms of the immune system to eliminate six of the most relevant protozoan infections in humans. Malaria is caused by different species of the *Plasmodium* genus being the deadliest protozoan disease. Adaptive immune responses as Th1 and IgG specific antibodies are responsible for its clearance. Leishmaniasis and Chagas diseases are blood-borne infections also transmitted by vectors, and controlled by the cell-mediated adaptive response. Toxoplasmosis is an infection that can be localised almost everywhere in the host, but can be controlled by mechanisms of the innate immunity. Immunocompromised hosts are the most affected by the infection with *T. gondii*. Amoebiasis and giardiasis are gastrointestinal diseases transmitted by faecal-oral route. Amoebiasis is controlled by phagocytes and IgA antibodies in the large intestine. *E. histolytica* is susceptible to complement lysis and systemic antibodies when the parasite invades the mucosal layer and infects different tissues in the body specially the liver. On the other hand, *Giardia* does not have the ability to invade epithelial cells, but colonising the mucosal layer is sufficient to elicit Th1 and Th17 responses to clear the infection. Protozoan parasites have evolved along with humanity and have developed strategies to remain in the host almost undetectable, making difficult their detection and elimination by the immune system. Protozoan infections are a major health concern worldwide, understanding the effector mechanisms that control these parasitic diseases will contribute to the design and development of efficient prophylactic and therapeutic strategies against the parasitosis.

Glossary

- Antigen** A molecule that reacts with preformed antibody and specific receptors of T and B cells.
- Cyst** Nondividing rigid cells, resistant to environmental conditions, derived from the asexual reproduction of protozoan parasites.
- Immunogen** A molecule that has the ability to evoke B- and/or T-cell-mediated immune reactions.
- Oocyst** Resistant form of coccidian protozoan transmission, derived from sexual reproduction.
- RTS,S** 'R' stands for the central repeat region of *Plasmodium* (*P. falciparum*) circumsporozoite protein (CSP); 'T' for the T-cell epitopes of the CSP and 'S' for hepatitis B surface antigen (HBsAg). These are combined in a single fusion protein (RTS) and coexpressed in yeast cells with free HBsAg. The 'RTS' fusion protein and free 'S' protein spontaneously assemble in 'RTS,S' particles. RTS,S also contains the AS01 adjuvant system, and in scientific papers is usually referred to as 'RTS,S/AS01'.
- Schizogony** Asexual reproduction of protozoans.

T helper cell (Th) A type of T cell that provides help to other immunity cells by secreting cytokines. Several types of Th cells have been described, for example Th1, Th2 and Th17.

References

- Abbas AK, Lichtman AH and Pillai S (2012) *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier.
- Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, et al. (2002) Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *Journal of Immunology* **169**: 898–905.
- Allenbach C, Launois P, Mueller C and Tacchini-Cottier F (2008) An essential role for transmembrane TNF in the resolution of the inflammatory lesion induced by *Leishmania major* infection. *European Journal of Immunology* **38** (3): 720–731.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, et al. (2012) Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* **7** (5): e35671.
- Andrade WA, Souza MDC, Martinez ER, et al. (2013) Combined action of nucleic acid-sensing toll-like receptors (TLRs) and TLR11/TLR12 heterodimers imparts resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. *Cell Host & Microbe* **13** (1): 42–53.
- Ansong D, Asante KP, Vekemans J, et al. (2011) T cell responses to the RTS,S/AS01E and RTS,S/AS02D malaria candidate vaccines administered according to different schedules to Ghanaian children. *PLoS One* **6** (4): e18891.
- Araujo FG (1992) Depletion of CD4+ T cells but not inhibition of the protective activity of IFN-gamma prevents cure of toxoplasmosis mediated by drug therapy in mice. *Journal of Immunology* **149** (9): 3003–3007.
- Arce-Fonseca M, Ballinas-Verdugo MA, Zenteno ERA, et al. (2013) Specific humoral and cellular immunity induced by *Trypanosoma cruzi* DNA immunization in a canine model. *Veterinary Research* **44** (1): 15.
- Arnold L, Tyagi RK, Mejia P, et al. (2010) Analysis of innate defences against *Plasmodium falciparum* in immunodeficient mice. *Malaria Journal* **9**: 197.
- Bansal D, Ave P, Kermeis S, et al. (2009) An *ex-vivo* human intestinal model to study *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **3** (11): e551.
- Barrias ES, de Carvalho TMU and De Souza W (2013) *Trypanosoma cruzi*: entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation. *Frontiers in Immunology* **4**: 186.
- Bautista-López NL, Ndao M, Camargo FV, et al. (2017) Characterization and diagnostic application of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote excreted-secreted antigens shed in extracellular vesicles released from infected mammalian cells. *Journal of Clinical Microbiology* **55** (3): 744–758.
- Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S and Udey MC (2001) The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *Journal of Experimental Medicine* **194** (10): 1497–1506. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193677>.
- Bern C (2015) Chagas' disease. *New England Journal of Medicine* **373** (19): 1881–1882.
- Bertholet S, Goldszmid R, Morrot A, et al. (2006) Leishmania antigens are presented to CD8+ T cells by a transporter associated with antigen processing-independent pathway *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Immunology* **177** (6): 3525–3533.
- Borghì SM, Fattori V, Conchon-Costa I, et al. (2017) Leishmania infection: painful or painless? *Parasitology Research* **116** (2): 465–475.
- Bull PC, Kortok M, Kai O, et al. (2000) *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: agglutination by diverse Kenyan plasma is associated with severe disease and young host age. *Journal of Infectious Diseases* **182** (1): 252–259.
- Cacciò SM and Ryan U (2008) Molecular epidemiology of giardiasis. *Molecular and Biochemical Parasitology* **160** (2): 75–80.
- Carrero JC, Díaz MY, Viveros M, et al. (1994) Human secretory immunoglobulin A anti-*Entamoeba histolytica* antibodies inhibit adherence of amebae to MDCK cells. *Infection and Immunity* **62** (2): 764–767.
- Chadee K and Meerovitch E (1984) The pathogenesis of experimentally induced amebic liver abscess in the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *American Journal of Pathology* **117** (1): 71–80.
- Ciccarelli A, Araujo L, Batlle A and Lombardo E (2007) Effect of haemin on growth, protein content and the antioxidant defence system in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* **134** (7): 959–965.
- Claser C, De Souza JB, Thorburn SG, et al. (2017) Host resistance to plasmodium-induced acute immune pathology is regulated by interleukin-10 receptor signaling. *Infection and Immunity* **85** (6): e00941-00916.
- Correa D, CaÑedo-Solares I, Ortiz-Alegría LB, Caballero-Ortega H and Rico-Torres CP (2007) Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. *Parasite Immunology* **29** (12): 651–660.
- Dann SM, Manthey CF, Le C, et al. (2015) IL-17A promotes protective IgA responses and expression of other potential effectors against the lumen-dwelling enteric parasite Giardia. *Experimental Parasitology* **156** (Supplement C): 68–78.
- Davis PH, Zhang X, Guo J, Townsend RR and Stanley SL (2006) Comparative proteomic analysis of two *Entamoeba histolytica* strains with different virulence phenotypes identifies peroxiredoxin as an important component of amoebic virulence. *Molecular Microbiology* **61** (6): 1523–1532.
- De Souza W, De Carvalho TMU and Barrias ES (2010) Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. *International Journal of Cell Biology* **2010**: 295394.
- Denkers EY, Yap G, Scharton-Kersten T, et al. (1997) Perforin-mediated cytotoxicity plays a limited role in host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Journal of Immunology* **159** (4): 1903.
- Dreesen L, De Bosscher K, Grit G, et al. (2014) Giardia muris infection in mice is associated with a protective interleukin 17A response and induction of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Infection and Immunity* **82** (8): 3333–3340.
- Dunay IR, Fuchs A and Sibley LD (2010) Inflammatory monocytes but not neutrophils are necessary to control infection with *Toxoplasma gondii* in mice. *Infection and Immunity* **78** (4): 1564–1570.
- Dziadek B, Gatkowska J, Brzostek A, et al. (2009) *Toxoplasma gondii*: the immunogenic and protective efficacy of recombinant ROP2 and ROP4 rhopty proteins in murine experimental toxoplasmosis. *Experimental Parasitology* **123** (1): 81–89.
- Elnekave K, Siman-Tov R and Ankrí S (2003) Consumption of L-arginine mediated by *Entamoeba histolytica* L-arginase (EhArg) inhibits amoebicidal activity and nitric oxide production by activated macrophages. *Parasite Immunology* **25** (11–12): 597–608.
- Faria DR, Souza PE, Durães FV, et al. (2009) Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion

- progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology* **31** (8): 432–439.
- Fink MY and Singer SM (2017) The intersection of immune responses, microbiota, and pathogenesis in giardiasis. *Trends in Parasitology* **33** (11): 901–913.
- Gazzinelli R, Kalantari P, Fitzgerald KA and Golenbock DT (2014) Innate sensing of malaria parasites. *Nature Reviews Immunology* **14** (11): 744–757.
- Gomes PS, Bhardwaj J, Rivera-Correa J, Freire-De-Lima CG and Morrot A (2016) Immune escape strategies of malaria parasites. *Frontiers in Microbiology* **7**: 1617.
- Guo X, Stroup SE and Houpt ER (2008) Persistence of *Entamoeba histolytica* infection in CBA mice owes to intestinal IL-4 production and inhibition of protective IFN- γ . *Mucosal Immunology* **1** (2): 139–146.
- Guo X, Barroso L, Becker SM, et al. (2009) Protection against intestinal amebiasis by a recombinant vaccine is transferable by T cells and mediated by gamma interferon. *Infection and Immunity* **77** (9): 3909–3918.
- Guo X, Barroso L, Lyster DM, Petri WA and Houpt ER (2011) CD4+ and CD8+ T cell- and IL-17-mediated protection against *Entamoeba histolytica* Induced by a recombinant vaccine. *Vaccine* **29** (4): 772–777.
- Haque R, Mondal D, Karim A, et al. (2009) Prospective case–control study of the association between common enteric protozoal parasites and diarrhea in Bangladesh. *Clinical Infectious Diseases* **48** (9): 1191–1197.
- Helegbe GK, Huy NT, Yanagi T, et al. (2009) Rate of red blood cell destruction varies in different strains of mice infected with *Plasmodium berghei*-ANKA after chronic exposure. *Malaria Journal* **8** (1): 91.
- Helk E, Bernin H, Ernst T, et al. (2013) TNF α -mediated liver destruction by Kupffer cells and Ly6Chi monocytes during *Entamoeba histolytica* infection. *PLoS Pathogens* **9** (1): e1003096.
- Horn D (2014) Antigenic variation in African trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology* **195** (2): 123–129.
- Hou Y, Mortimer L and Chadee K (2010) *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase 5 binds integrin on colonic cells and stimulates NF κ B-mediated pro-inflammatory responses. *Journal of Biological Chemistry* **285** (46): 35497–35504.
- Ivory CPA, Prystajec M, Jobin C and Chadee K (2008) Toll-like receptor 9-dependent macrophage activation by *Entamoeba histolytica* DNA. *Infection and Immunity* **76** (1): 289–297.
- Kester KE, Cummings JF, Ofori-Anyinam O, et al. (2009) Randomized, double-blind, phase 2a trial of falciparum malaria vaccines RTS,S/AS01B and RTS,S/AS02A in malaria-naïve adults: safety, efficacy, and immunologic associates of protection. *Journal of Infectious Diseases* **200** (3): 337–346.
- Kima PE, Ruddle NH and McMahon-Pratt D (1997) Presentation via the class I pathway by *Leishmania amazonensis*-infected macrophages of an endogenous leishmanial antigen to CD8+ T Cells. *Journal of Immunology* **159** (4): 1828.
- Koblansky AA, Jankovic D, Oh H, et al. (2013) Recognition of profilin by toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunity* **38** (1): 119–130.
- Koo S-J, Chowdhury IH, Szczesny B, Wan X and Garg NJ (2016) Macrophages promote oxidative metabolism to drive nitric oxide generation in response to *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity* **84** (12): 3527–3541.
- Kropf P, Freudenberg MA, Modolc M, et al. (2004) Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infection and Immunity* **72** (4): 1920–1928.
- Langford TD, Housley MP, Boes M, et al. (2002) Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia* spp. *Infection and Immunity* **70** (1): 11–18.
- Laucella SA, Postan M, Martin D, et al. (2004) Frequency of interferon- γ -producing T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas Disease. *Journal of Infectious Diseases* **189** (5): 909–918.
- Lauwaet T, Davids BJ, Reiner DS and Gillin FD (2007) Encystation of *Giardia lamblia*: a model for other parasites. *Current Opinion in Microbiology* **10** (6): 554–559.
- Li E, Zhou P, Petrin Z and Singer SM (2004) Mast cell-dependent control of *Giardia lamblia* infections in mice. *Infection and Immunity* **72** (11): 6642–6649.
- Lidani KCF, Bavia L, Ambrosio AR and de Messias-Reason IJ (2017) The complement system: a prey of *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Microbiology* **8**: 607.
- Liese J, Schleicher U and Bogdan C (2007) TLR9 signaling is essential for the innate NK cell response in murine cutaneous leishmaniasis. *European Journal of Immunology* **37** (12): 3424–3434.
- Lopez-Romero G, Quintero J, Astiazarán-García H and Velázquez C (2015) Host defences against *Giardia lamblia*. *Parasite Immunology* **37** (8): 394–406.
- Luján HD and Svärd S (2011) *Giardia a Model Organism*. Wien/New York: Springer.
- Maspi N, Ghaffarifar F, Dalimi A, et al. (2017) Comparative assessment of induced immune responses following intramuscular immunization with fusion and cocktail of LeIF, LACK and TSA genes against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. <https://doi.org/10.1007/s00005-017-0484-4>
- Miyahira Y, Takashima Y, Kobayashi S, et al. (2005) Immune responses against a single CD8(+)-T-cell epitope induced by virus vector vaccination can successfully control *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and Immunity* **73** (11): 7356–7365.
- Montoya JG and Liesenfeld O (2004) Toxoplasmosis. *Lancet* **363** (9425): 1965–1976.
- Moreira OC, Ramírez JD, Velázquez E, et al. (2013) Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: a substudy from the BENEFIT trial. *Acta Tropica* **125** (1): 23–31.
- Müller I, Kropf P, Louis JA and Milon G (1994) Expansion of gamma interferon-producing CD8+ T cells following secondary infection of mice immune to *Leishmania major*. *Infection and Immunity* **62** (6): 2575–2581.
- Nateghi Rostami M, Keshavarz H, Edalat R, et al. (2010) CD8+ T cells as a source of IFN- γ production in human cutaneous leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **4** (10): e845.
- Ngobeni R, Abhyankar MM, Jiang NM, et al. (2017) *Entamoeba histolytica*-encoded homolog of macrophage migration inhibitory factor contributes to mucosal inflammation during amebic colitis. *Journal of Infectious Diseases* **215** (8): 1294–1302.
- Painter JE, Gargano JW, Collier SA, Yoder JS and Centers for Disease Control & Prevention (2015) Giardiasis surveillance – United States, 2011–2012. *MMWR Supplements* **64** (3): 15–25.
- Pappas G, Roussos N and Falagas ME (2009) Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology* **39** (12): 1385–1394.

- Perez-Mazliah D and Langhorne J (2014) CD4 T-cell subsets in malaria: TH1/TH2 revisited. *Frontiers in Immunology* **5**: 671.
- Persson CM, Lambert H, Vutova PP, *et al.* (2009) Transmission of *Toxoplasma gondii* from infected dendritic cells to natural killer cells. *Infection and Immunity* **77** (3): 970–976.
- Plattner F, Yarovinsky F, Romero S, *et al.* (2008) Toxoplasma profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. *Cell Host & Microbe* **3** (2): 77–87.
- Plebanski M and Hill AVS (2000) The immunology of malaria infection. *Current Opinion in Immunology* **12** (4): 437–441.
- Prucca CG, Slavina I, Quiroga R, *et al.* (2008) Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. *Nature* **456** (7223): 750–754.
- Que X and Reed SL (1997) The role of extracellular cysteine proteases in pathogenesis of *Entamoeba histolytica* invasion. *Parasitology Today* **13** (5): 190–194.
- Ravdin JI, Abd-Alla MD, Welles SL, Reddy S and Jackson TFHG (2003) Intestinal antileishmanin immunoglobulin A antibody response and immunity to *Entamoeba dispar* infection following cure of amebic liver abscess. *Infection and Immunity* **71** (12): 6899–6905.
- Roitt I, Brostoff J and Male D (2001) *Immunology*. St. Louis, MO: Mosby.
- Roncolato EC, Teixeira JE, Barbosa JE, Zambelli Ramalho LN and Huston CD (2015) Immunization with the *Entamoeba histolytica* surface metalloprotease EhMSP-1 protects hamsters from amebic liver abscess. *Infection and Immunity* **83** (2): 713–720.
- Rottenberg ME, Riarte A, Sporrang L, *et al.* (1995) Outcome of infection with different strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4 and/or CD8. *Immunology Letters* **45** (1–2): 53–60.
- Roxström-Lindquist K, Palm D, Reiner D, Ringqvist E and Svärd SG (2006) Giardia immunity: an update. *Trends in Parasitology* **22** (1): 26–31.
- Scott P, Artis D, Uzonna J and Zaph C (2004) The development of effector and memory T cells in cutaneous leishmaniasis: the implications for vaccine development. *Immunological Reviews* **201** (1): 318–338.
- Seydel KB, Zhang T and Stanley SL (1997) Neutrophils play a critical role in early resistance to amebic liver abscesses in severe combined immunodeficient mice. *Infection and Immunity* **65** (9): 3951–3953.
- Sherling ES and van Ooij C (2016) Host cell remodeling by pathogens: the exomembrane system in Plasmodium-infected erythrocytes. *FEMS Microbiology Reviews* **40** (5): 701–721.
- Silva JS, Machado FS and Martins GA (2003) The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. *Frontiers in Bioscience* **8**: s314–s325.
- Singer SM and Nash TE (2000) T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. *Infection and Immunity* **68** (1): 170–175.
- Sousa LM, Carneiro MB, Resende ME, *et al.* (2014) Neutrophils have a protective role during early stages of *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. *Parasite Immunology* **36** (1): 13–31.
- Tanowitz HB and Weiss LM (2017) A new development in *Trypanosoma cruzi* detection. *Journal of Clinical Microbiology* **55** (3): 690–692.
- Uzonna JE, Joyce KL and Scott P (2004) Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon gamma-producing CD8+ T cells. *Journal of Experimental Medicine* **199** (11): 1559–1566.
- Vasconcelos JR, Hiyane M, Marinho C, *et al.* (2004) Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after vaccination with genes encoding the amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Human Gene Therapy* **15** (9): 878–886.
- Velazquez C, Shibayama-Salas M, Aguirre-Garcia J, Tsutsumi V and Calderon J (1998) Role of neutrophils in innate resistance to *Entamoeba histolytica* liver infection in mice. *Parasite Immunology* **20** (6): 255–262.
- Villarino N and Schmidt NW (2013) CD8(+) T cell responses to plasmodium and intracellular parasites. *Current Immunology Reviews* **9** (3): 169–178.
- Walther M, Woodruff J, Edele F, *et al.* (2006) Innate immune responses to human malaria: heterogeneous cytokine responses to blood-stage *Plasmodium falciparum* correlate with parasitological and clinical outcomes. *Journal of Immunology* **177** (8): 5736–5745.
- Wang W, Keller K and Chadee K (1994) *Entamoeba histolytica* modulates the nitric oxide synthase gene and nitric oxide production by macrophages for cytotoxicity against amoebae and tumour cells. *Immunology* **83** (4): 601–610.
- Wang W and Chadee K (1995) *Entamoeba histolytica* suppresses gamma interferon-induced macrophage class II major histocompatibility complex Ia molecule and I-A beta mRNA expression by a prostaglandin E2-dependent mechanism. *Infection and Immunity* **63** (1089–3).
- Watanabe K, Gilchrist CA, Uddin MJ, *et al.* (2017) Microbiome-mediated neutrophil recruitment via CXCR2 and protection from amebic colitis. *PLoS Pathogens* **13** (8): e1006513.
- White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, *et al.* (2014) Malaria. *Lancet* **383** (9918): 723–735.
- WHO (2015) *WHO Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases: Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group 2007–2015*. Geneva: World Health Organization.
- WHO (2016) *World Malaria Report 2016*. Geneva: World Health Organization.
- WHO (2017) *Chagas Disease*. Geneva: World Health Organization.
- van Zandbergen G, Hermann N, Laufs H, Solbach W and Laskay T (2002) *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. *Infection and Immunity* **70** (8): 4177–4184.
- Zhou J, Feng G, Beeson J, *et al.* (2015) CD14(hi)CD16+ monocytes phagocytose antibody-opsonised *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes more efficiently than other monocyte subsets, and require CD16 and complement to do so. *BMC Medicine* **13**: 154.
- Zimmermann S, Murray PJ, Heeg K and Dalpke AH (2006) Induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii* contributes to immune evasion in macrophages by blocking IFN-gamma signaling. *Journal of Immunology* **176** (3): 1840–1847.

Further Reading

- Adam RD (2001) Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews* **14**(3): 447–475.
- Bethony JM, Cole RN, Guo X, *et al.* (2011) Vaccines to combat the neglected tropical diseases. *Immunological Reviews* **239** (1): 237–270.
- Dumonteil E, Bottazzi ME, Zhan B, *et al.* (2012) Accelerating the development of a therapeutic vaccine for human Chagas

- disease: rationale and prospects. *Expert Review of Vaccines* **11** (9): 10.1586/erv.12.85.
- Munoz M, Liesenfeld O, and Heimesaat MM (2011) Immunology of *Toxoplasma gondii*. *Immunological Reviews* **240** (1): 269–285.
- Murphy K, Weaver C (2016) *Janeway's Immunobiology*, 9th edn. New York: Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC.
- Quach J, St-Pierre J, and Chadee K (2014) The future for vaccine development against *Entamoeba histolytica*. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* **10** (6): 1514–1521.
- Scorza BM, Carvalho EM, and Wilson ME (2017) Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. *International Journal of Molecular Sciences* **18** (6): 1296.
- Silvie O, Amino R, and Hafalla JC (2017) Tissue-specific cellular immune responses to malaria pre-erythrocytic stages. *Curr Opin Microbiol* **40**: 160–167.