

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Estudio Sobre Alteraciones Histopatológicas, Caracterización Parcial
de Células Infiltradas en Mucosa Intestinal y Evaluación de la
Respuesta Inmune Humoral en Ratones Infectados con *Giardia*
lamblia (Genotipos A y B)

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta

1942

Víctor Hugo Domínguez Corrales

Hermosillo, Sonora

Diciembre de 2018

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

DEDICATORIA

A Dios por haberme permitido llegar hasta este momento, rodeado de personas que sin duda yo no sería nadie sin ellos.

Dedico este trabajo a mi familia. Por haberme formado como soy, con mis virtudes y defectos. Siempre estaré eternamente agradecido por tenerlos en mi vida. Gracias por todo el apoyo. Mamá, Papá, Luis, Brenda y Sebastián.

La célula fue la primera invención del reino animal, y todos los animales superiores son y deben ser de estructura celular. Nuestros tejidos se formaron hace siglos; todos ellos han persistido La mayoría de nuestros órganos son tan viejos como gusanos. Todos estos son muy viejos, más viejos que las montañas.

- John Mason Tyler (1851-1917)

AGRADECIMIENTOS

A CONACyt, por el apoyo con la beca proporcionada.

A la Universidad de Sonora, al Departamento de Ciencias Químico-Biológicas y al Programa de Posgrado en Ciencias de la Salud, por estos años de educación y formación.

Al Dr. Carlos Velázquez, por haberme recibido como su estudiante; por hacerme entender que no siempre en la vida las cosas salen como uno quisiera, que todo es perfectible. Le agradezco por haberme hecho crecer no solo académica sino personalmente también.

A mis sinodales, al Dr. López Cervantes por su ayuda en la interpretación de laminillas y todo el apoyo dado para que este trabajo saliera adelante; al M. en C. Boris Calderón, por la revisión de este trabajo; y a la M. en C. Lucila. Maestra, muchas gracias por todo. Siempre me ayudaba cuando lo necesitaba, por enseñarme a hacer a un lado la frustración y negatividad para salir adelante; gracias por pensar siempre en nosotros.

Al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, especialmente al M. en C. Rafael Canett y a Jesús, por su apoyo en el bioterio.

Al equipo de trabajo en el área de Patología del Hospital General, especialmente a Omar, por su ayuda en la formación de bloques de parafina, así como en el corte de estos; eso y todos los tips que me dieron, fueron muy útiles.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Inmunología y Biología Celular: Efraín, Paola, Raúl, Thania, Lulú, Isaac, David, Ale, Brenda, Gloria, María José, Luis, Melissa, Paty, Mónica, Pablo (si no menciono a alguien, no se sientan, no estoy pensando mucho). Gracias por hacer del trabajo de laboratorio un lugar agradable, que podemos divertirnos al mismo tiempo. Les agradezco por todo el

apoyo brindado. De igual forma, a Ale López, en el Laboratorio de Cáncer, gracias por todo el apoyo.

A mis amigos y compañeros de generación, Gilberto, Edgar, Héctor, Ramsés, Giovani, Jordan. Gracias por los buenos momentos.

A Denia, por todo su ayuda durante el posgrado.

A la Doctora Miriam Domínguez, no solo por escuchar y ayudarme, por esto y más, la estimo y quiero mucho. La verdad no tengo palabras para agradecer todo lo que hizo por mí.

A todas las personas que me apoyaron ya sea directa o indirectamente, a todos mis amigos (aquí se pueden incluir todos aquellos que consideran que deben estar en estos agradecimientos, lo siento, no tengo cabeza para pensar en estos momentos), en especial a Viri y Obed, por estar ahí para mí, les estaré infinitamente agradecido, los quiero mucho.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMEN	xiii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
Características Generales de <i>Giardia lamblia</i>	4
Epidemiología de la Giardiasis	6
Epidemiología Molecular	7
Histología de Intestino Delgado: Duodeno	7
• Mucosa	8
Inmunidad Hacia <i>G. lamblia</i> : Respuesta Inmune en Mucosa Intestinal	8
• Inmunidad Innata	9
• Respuesta Humoral	9
• Respuesta Celular	10
Proteínas Antigénicas de <i>G. lamblia</i>	11
Fisiopatología de la Giardiasis	12
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Cultivo de <i>G. lamblia</i>	14
Evaluación de la Expresión Superficial de la proteína 5G8 de Trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	14
Animales de Experimentación	15
Obtención y Cuantificación de Proteínas Solubles de Trofozoítos de <i>G. lamblia</i> en Cultivo	15
Inmunización de Animales de Experimentación	16
Título de Anticuerpos Séricos de Isotipo IgG Mediante ELISA Indirecto	17
Inducción de Giardiasis en el Modelo Murino C3H/HeJ	17

Diseción de Ratones y Determinación de Carga Parasitaria	18
Procesamiento de Tejido Intestinal	18
Detección Inmunohistoquímica de Trofozoítos de <i>G. lamblia</i> en Intestino de Ratones Infeccionados	19
Determinación de Alteraciones Histopatológicas de Intestino de Ratones Infeccionados con <i>G. lamblia</i> Mediante Tinciones Hematoxilina-Eosina (HE), Ácido peryódico-Schiff (PAS) y Azul de Toluidina	19
Determinación de Población Celular Infiltrada en Intestino Delgado de Ratones Infeccionados con <i>G. lamblia</i> Mediante Inmunohistoquímica (Linfocitos B, CD4+, CD8+ y macrófagos F4/80 +)	20
Evaluación de la Respuesta Inmune Humoral de Ratones Infeccionados con <i>Giardia lamblia</i> Mediante ELISA Indirecto	21
Análisis Estadístico	22
RESULTADOS	23
80.1 % de la Cepa GS-5G8 + Expresa a la Proteína 5G8 de Manera Superficial	23
Los Sueros Provenientes de Animales Inmunizados con Lisados de Trofozoítos de <i>G. lamblia</i> de Inmunización Reconocen Antígenos del Parásito	23
<i>G. lamblia</i> Coloniza el Duodeno de Ratones Infeccionados a los 7 días Post-infección	29
No se Detectaron Trofozoítos de <i>G. lamblia</i> en Cortes Histológicos de Duodeno de Ratones Infeccionados Mediante Inmunohistoquímica	29
La Infección por <i>G. lamblia</i> Genera Inflamación Aguda en Mucosa Intestinal de Ratones	31
Células CD19+ y CD4+ se Infiltran en Lámina Propia de Mucosa Intestinal en Ratones Infeccionados con <i>G. lamblia</i>	40
<i>G. lamblia</i> (Genotipos A y B) Induce una Respuesta Inmune Humoral (Local y Sistémica) en Ratones Infeccionados	46

DISCUSIONES	51
CONCLUSIONES	58
BIBLIOGRAFÍA	59
ANEXOS	69

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Análisis histopatológico de intestino delgado de ratones infectados con <i>Giardia lamblia</i>	38
II	Alteraciones histopatológicas en mucosa intestinal de ratones infectados con <i>G. lamblia</i> (genotipos A y B)	39

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ciclo biológico de <i>G. lamblia</i>	5
2	80.1 % de la proteína 5G8 se expresa en la cepa GS-5G8+ de <i>G. lamblia</i> de manera superficial	24
3	Anticuerpos Policlonales Específicos Reconocen Proteínas de <i>G. lamblia</i> WB	26
4	Anticuerpos Policlonales Específicos Reconocen Proteínas de <i>G. lamblia</i> GS	27
5	Anticuerpos Policlonales Específicos Reconocen Proteínas de <i>G. lamblia</i> GS-5G8 +	28
6	<i>G. lamblia</i> coloniza y establece infección en duodeno de ratones infectados a los 7 días post-infección	30
7	No se detectaron trofozoítos de <i>Giardia</i> en mucosa intestinal de ratones infectados mediante inmunohistoquímica.	32
8	La infección por <i>G. lamblia</i> induce una respuesta inflamatoria en lámina propia en duodeno de ratones a los 7 d.p.i	33
9	La infección por <i>G. lamblia</i> induce una respuesta inflamatoria en lámina propia en duodeno de ratones a los 14 d.p.i	34
10	La infección por <i>G. lamblia</i> no genera hiperplasia de células caliciformes a los 7 d.p.i	35
11	La infección por <i>G. lamblia</i> no genera hiperplasia de células caliciformes a los 14 d.p.i	36
12	Análisis cuantitativo de células caliciformes en mucosa intestinal de ratones infectados con <i>G. lamblia</i>	37

13	Linfocitos B y T CD4+ se infiltran en lámina propia durante la infección por <i>G. lamblia</i>	41
14	Análisis cuantitativo de células CD19 en lámina propia de mucosa intestinal de ratones infectados con <i>G. lamblia</i>	42
15	Análisis cuantitativo de células CD4 en lámina propia de mucosa intestinal de ratones infectados con <i>G. lamblia</i>	43
16	Macrófagos no se infiltran en lámina propia durante la infección por <i>Giardia</i>	44
17	Células cebadas y Linfocitos CD8+ no se infiltran en lámina propia durante la infección por <i>G. lamblia</i>	45
18	La infección por <i>G. lamblia</i> induce una respuesta inmune humoral secretora	47
19	La infección por <i>G. lamblia</i> induce una respuesta inmune humoral sistémica	48
20	La proteína 5G8 es reconocida por la respuesta inmune humoral local	49
21	La proteína 5G8 es reconocida por la respuesta inmune humoral sistémica	50

OBJETIVOS

General

Analizar la patología en intestino delgado, la población celular infiltrada en mucosa intestinal y la respuesta inmune humoral en ratones infectados con *Giardia lamblia* (Genotipos A y B)

Objetivos Específicos

- Analizar los cambios histopatológicos en intestino delgado de ratones C3H/HeJ infectados con las cepas WB, GS y GS-5G8 (+) de *Giardia lamblia*.
- Caracterizar parcialmente a la población celular infiltrada en lámina propia de la mucosa intestinal de ratones infectados con *Giardia lamblia* WB, GS y GS-5G8 (+).
- Evaluar la respuesta inmune humoral local y sistémica de ratones infectados con *Giardia lamblia* WB, GS y GS-5G8 +.

RESUMEN

Giardia lamblia es un organismo unicelular flagelado causante de giardiasis. La infección se produce por la contaminación fecal-oral, siendo ésta una de las parasitosis gastrointestinales más frecuentes en todo el mundo. Existen 8 genotipos de *G. lamblia*. Las cepas pertenecientes a los genotipos A y B son los principales responsables en las infecciones en humanos y otros mamíferos. En la actualidad, los mecanismos por los cuales *G. lamblia* ocasiona daño al hospedero no son del todo comprendidos, así como el efecto que tienen las proteínas inmunogénicas sobre el intestino delgado. Para poder entender estos mecanismos, una herramienta que nos es de utilidad es por medio de análisis histopatológicos. Para ello, en el presente trabajo, se obtuvieron muestras de intestino delgado, suero y heces de ratones C3H/HeJ infectados con las cepas WB y GS, pertenecientes los genotipos A y B de *G. lamblia* respectivamente, así como la cepa GS-5G8 +, la cual expresa altos niveles de la proteína inmunogénica 5G8. La patología de la infección fue analizada en cortes histológicos empleando las tinciones hematoxilina-eosina; para la caracterización de las células en tejido intestinal, se utilizaron ensayos de inmunohistoquímica; finalmente se evaluó la respuesta inmune humoral mediante ELISA. Los resultados muestran que, durante la giardiasis, células mononucleares se infiltran en lámina propia de los ratones infectados con los genotipos A y B de *Giardia*. El aumento de este infiltrado se debe a linfocitos B y T CD4 en la zona efectora de la respuesta inmune en tejido intestinal de ratones infectados con las cepas WB, GS y GS-5G8 + a los 14 días post-infección. No se encontraron diferencias en alteraciones histopatológicas ocasionadas por los genotipos A y B de *Giardia* bajo las condiciones con las cuales se llevó a cabo este estudio. Además, se observó un aumento de anticuerpos específicos de isotipo IgA local en todos los grupos evaluados, mientras que IgG sistémica

específica contra *Giardia* solo fue encontrada en las muestras de ratones infectados con la cepa GS-5G8 +. Finalmente, estos anticuerpos tuvieron la capacidad de reconocer a la proteína 5G8 de *Giardia*. En conclusión, la infección por los genotipos A y B de *Giardia* induce un proceso inflamatorio agudo, caracterizado por un infiltrado celular en mucosa intestinal. Por otra parte, la respuesta inmune humoral de los ratones infectados con la cepa GS-5G8 +, perteneciente al genotipo B, va dirigida en parte a la proteína 5G8.

INTRODUCCIÓN

Giardia lamblia (que también se le conoce como *Giardia duodenalis* y *Giardia intestinalis*) es un protozoo unicelular multiflagelado. Es un parásito binucleado que coloniza principalmente la sección proximal del intestino delgado (duodeno) (Adam, 2001). *G. lamblia* presenta un ciclo de vida directo, destacándose dos estadios: el quiste, que es la forma en la que un hospedero entra en contacto con el parásito, el cual es capaz de sobrevivir a condiciones desfavorables en el medio ambiente tales como la falta de nutrientes o el pH ácido del estómago; y el trofozoíto, que es la forma infectiva del parásito y responsable de desencadenar la patología. El trofozoíto se caracteriza por tener una forma piriforme, convexa, con una superficie ventral cóncava. Posee un disco ventral, el cual tiene por función la adhesión al lumen intestinal. Mide de 12 a 15 micrómetros de largo y de 5 a 9 micrómetros de ancho, consta de dos núcleos, cuerpo medio y cuatro pares de flagelos. Los quistes son de forma elipsoidal y miden de 7 a 12 micrómetros de largo (Becerril, 2011; Luján, 2011).

La Organización Mundial de la Salud estima que más de 250 millones de personas están infectadas con el parásito (Jerlström-Hultqvist, 2010), por lo que se considera un problema de salud en diversos países, en especial los que se encuentran en vías de desarrollo, por ejemplo, México (AMSE, 2012). El Estado de Sonora se encuentra dentro de los primeros lugares en los reportes de giardiasis, ya sea que se presente sintomatología o no (SUIVE, 2013). A pesar de la alta incidencia e importancia clínica de infección por *G. lamblia*, el conocimiento que se tiene acerca de los mecanismos de patogenicidad y respuesta inmunológica no son entendidos en su totalidad (Velázquez y col., 2005).

Las manifestaciones clínicas de la infección pueden llegar a ser muy variadas, desde total ausencia hasta presentación de sintomatología (Chacón y

Jiménez, 2010), donde múltiples factores se encuentran involucrados tanto del hospedero como del parásito (Chacón y Jiménez, 2010). Los síntomas más comunes que se pueden presentar incluyen diarrea, dolor abdominal, náuseas, vómito y pérdida de peso. La presencia o ausencia de éstos probablemente se encuentre dada por la virulencia del parásito, el estado nutricional, el sistema inmune y la microbiota del hospedero (Feng, Y., y Xiao, L, 2011).

A pesar de todo esto, el desarrollo de la inmunidad y daño a la mucosa intestinal no se conocen por completo. Se ha propuesto que el daño tisular podría ser debido a la adherencia del parásito en las células intestinales, lo cual es posible debido a su disco ventral (Céu Sousa y col., 2001). Por otro lado, se ha observado atrofia en vellosidades (Oberhuber y col., 2016), así como acortamiento de microvellosidades, infiltración celular y aumento de células cebadas (Eckmann, 2003) y caliciformes (Ventura y col., 2013). Es por ello, que en este trabajo se realizó un estudio a nivel histológico en intestino delgado de ratones C3H/HeJ infectados con diferentes cepas pertenecientes a los genotipos de *G. lamblia* que causan infección en el humano, para sentar bases y esclarecer los mecanismos y consecuencias de la enfermedad.

Una de las herramientas disponibles para lograr esto, es el modelo de ratón; nos permite estudiar los mecanismos involucrados durante la infección ya que presenta ventajas sobre otros modelos: el sistema inmune del ratón está caracterizado y existe una variedad de tecnología para estudiarlo, así como cepas específicas que están disponibles para cada tipo de estudio. Generalmente, en estudios de infección *in vivo* se utilizan las cepas WBC6 y GS/M-83-H7, pertenecientes a los genotipos A y B. Se han reportado algunas cepas de ratón susceptibles a la infección por *Giardia* GS/M-83-H7, tales como C3H-HeJ, Balb/c y SCID (Byrd y col., 1994). Al ser un parásito patógeno para el humano de alta relevancia clínica y que además coloniza la mucosa intestinal, es importante comprender lo que está pasando en el intestino durante la infección, esto debido a la limitada información reportada.

El análisis a nivel histológico en intestino delgado, específicamente en duodeno, que es el sitio de colonización principal, brindará información sobre los mecanismos fisiopatológicos involucrados durante la infección por *G. lamblia*, esto con el fin de generar conocimiento acerca de la relación hospedero-parásito. De manera similar, este estudio nos permitirá conocer más sobre los eventos que son desencadenados en un hospedero con los genotipos A y B de *Giardia*, causantes de infección en humanos.

ANTECEDENTES

Características Generales de *Giardia lamblia*

G. lamblia es un protozoo intestinal flagelado que habita en la sección proximal del intestino delgado de su hospedero (Adam, 2001). Es uno de los principales responsables en infecciones parasitarias gastrointestinales en el humano. Tiene un ciclo de vida directo (Figura 1), en el cual destacan dos estadios: el trofozoíto, que es el estadio infeccioso, y el quiste, que es la forma en la cual un hospedero entra en contacto con el parásito, mediante contaminación fecal-oral. La infección se lleva a cabo cuando el hospedero ingiere quistes contenidos en agua y / o alimentos (Faubert, 2000). Una vez que el parásito llega al estómago, inicia el proceso de desenquistación (mediante el estímulo del pH ácido, el cual reblandece la pared del quiste) y concluye en la parte alta del intestino delgado con la ayuda de enzimas pancreáticas como tripsina, para que finalmente se liberen dos trofozoítos binucleados, los cuales se adhieren en las vellosidades intestinales, estableciendo la infección. Algunos trofozoítos son arrastrados a lo largo del intestino, y debido a las condiciones desfavorables para ellos (falta de colesterol y sales biliares principalmente) inician su proceso de enquistación, siendo así expulsados en las heces, pudiendo contaminar fuentes de agua y alimentos, cerrando así el ciclo de vida (Faubert, 2000; Syed y Hill, 2003).

El trofozoíto se caracteriza por tener una forma piriforme, convexa y con una superficie ventral cóncava. Posee un disco ventral, el cual le sirve para la adhesión al lumen intestinal en el duodeno. Mide de 12 a 15 micrómetros de largo y de 5 a 9 de ancho, consta de dos núcleos, cuerpo medio y 4 pares de flagelos (dos antero-laterales, 2 postero-laterales, 2 ventrales y un par caudal) (Vázquez,

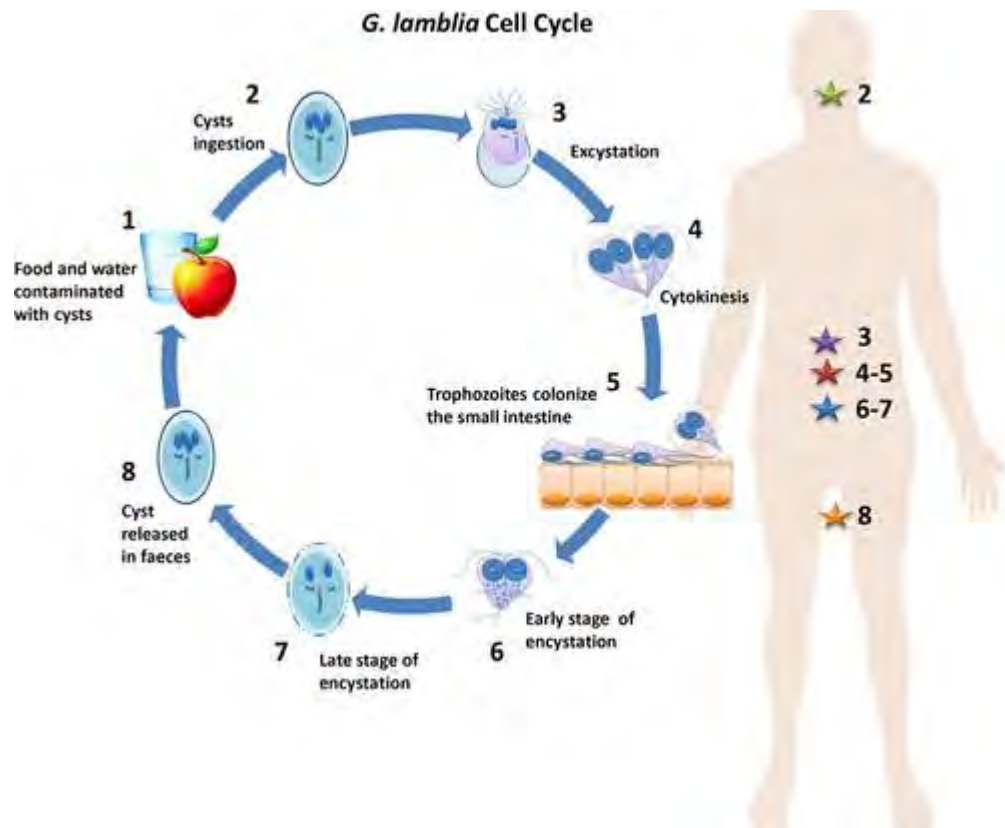


Figura 1. Ciclo biológico de *G. lamblia*. El contacto inicial con el hospedero se da mediante la ingestión de quistes presentes en agua y alimentos contaminados (1 y 2). Después, por la exposición al pH ácido del estómago, se favorece el desenquistamiento (3). El trofozoíto se reproduce por fisión binaria longitudinal (4), y coloniza el intestino delgado (5). Al presentarse condiciones adversas, como falta de nutrientes, o movimientos peristálticos, se produce el enquistamiento (6 y 7), para finalmente, los quistes ser expulsados a través de las heces y cerrar así el ciclo de vida (8) (López y col., 2015).

2009). Los quistes son de forma elipsoidal y miden de 7 a 12 micrómetros de largo. Las formas infectivas jóvenes contienen 2 núcleos, mientras que las maduras tienen 4. Debido a la importancia clínica y evolutiva de *G. lamblia* (considerado el microorganismo de más temprana división en línea eucariótica) se ha secuenciado su genoma, lo cual lo convierte en un modelo de estudio para múltiples líneas de investigación (Adam, 2000; Staffan y col., 2003).

Epidemiología de la Giardiasis

G. lamblia es un protozooario común en el humano, siendo cosmopolita. A nivel mundial se ha estimado que más de 200 millones de personas se encontraban infectadas con el parásito, de los cuales, 500,000 tenían sintomatología (Vázquez y Campos, 2009). La Organización Mundial de la Salud reportó en un boletín de salud una morbilidad de más de 28 millones de casos durante un periodo comprendido entre 2007 y 2015.

En México, se reportan prevalencias variables, con cifras en un intervalo de 2 a 39 %. Un estudio que reunió diferentes trabajos en 14 estados del país mostró una prevalencia de 19 %, donde la mayoría de las personas eran infantes. Se calcula que en México hay nueve millones de personas parasitadas con *G. lamblia* según datos reportados por la SINAVE en el 2009. De acuerdo a estos mismos datos, la incidencia en el estado de Sonora fue de 33.4 por cada 100,000 habitantes, sumando un total de 849 casos nuevos de infección.

En junio del 2015, la Secretaría de Salud, por medio del Sistema de Notificación Semanal de Casos Nuevos de Enfermedades, reportó una incidencia de 4.74, equivalente a 5,730 casos nuevos, siendo los infantes de 1 a 9 años los más susceptibles, donde las cifras son mayores. De acuerdo a la misma notificación, en Sonora se registraron 192 casos en diferentes instituciones

públicas, ocupando el décimo tercer lugar de giardiasis a nivel nacional. Según datos preliminares recabados hasta el 2018, Sonora reporta 460 casos de giardiasis según la Vigilancia Epidemiológica Semana 42.

Epidemiología Molecular

Basándose en análisis genético, podemos distinguir 8 ensamblajes o genotipos moleculares de *Giardia* (que van desde el genotipo A hasta el H) (Rivero y col., 2010). Solamente los genotipos A y B son los que se han relacionado con infecciones en humanos, sin embargo, tienen la capacidad de infectar a más mamíferos. Tomando esto en cuenta, se han utilizado como modelos representativos a las cepas WB y GS, hacia los genotipos A y B, respectivamente (Adam, 2001).

La prevalencia de estos genotipos varía entre regiones. Parece ser que el genotipo B es más común (Caccio y Ryan, 2007), sin embargo, con los datos que se cuentan actualmente, no es posible establecer conclusiones. En México, en un estudio de genotipificación se logró identificar muestras de *Giardia* pertenecientes al genotipo A (Lalle y col., 2005) según estudios genéticos de las β Giardinas (bg).

Histología de Intestino Delgado: Duodeno

El intestino delgado es el órgano que conecta el estómago con el intestino grueso; forma parte del aparato gastrointestinal, responsable de la absorción de nutrientes (Geneser, 2001). Tiene una longitud aproximada de 7 metros y se divide en 3 secciones: duodeno, yeyuno e íleon.

En cualquier nivel del intestino delgado, podemos ver que está conformado, desde la capa más externa hasta la luz intestinal, por mucosa, submucosa, muscular y serosa (Tortora y Reynolds, 2009).

Mucosa

Esta sección está conformada por epitelio, lámina propia y *muscularis mucosae*. Aquí predominan los llamados pliegues circulares, responsables de la disminución del tránsito intestinal, provocando que la absorción sea más eficiente.

El epitelio se encuentra conformado por proyecciones hacia la luz intestinal denominadas vellosidades intestinales, repleta de diferentes tipos de células epiteliales; las células de absorción son las células más abundantes que se encuentran en el epitelio de la vellosidad, mientras que el epitelio de las criptas de Lieberkuhn (glándulas situadas entre vellosidades), además de predominar las células de absorción, podemos encontrar células de Paneth, caliciformes y células endocrinas (Ferrufino y col., 1996). Por otro lado, dentro de la lámina propia, podemos encontrar una variedad amplia de células inmunológicas, linfocitos (células plasmáticas y linfocitos T), macrófagos, eosinófilos y células cebadas.

Inmunidad Hacia *G. lamblia*: Respuesta Inmune en Mucosa Intestinal

El sistema inmunitario en mucosa intestinal constituye la parte más extensa y compleja del sistema inmunitario (Abbas, 2012). Recibe diariamente una enorme carga antigénica y es capaz de discernir entre patógenos invasivos, antígenos ino cuos de los alimentos y de bacterias comensales (Ramiro y col., 2008).

Inmunidad Innata

El sistema inmune innato representa la primera barrera de defensa contra diferentes patógenos. Uno de los primeros retos a los cuales *Giardia lamblia* se enfrenta al colonizar el intestino delgado, es a la barrera que forma el moco producida por un grupo de células epiteliales especializadas, denominadas caliciformes, el cual se ha asociado con protección contra patógenos intestinales (Turner, 2009). Ventura y col (2013) observaron que en gerbos infectados con *Giardia*, hay incremento en células caliciformes, resultando en un aumento de moco, sugiriendo un papel defensivo contra el parásito.

Otra de las formas en las que el hospedero trata de controlar la giardiasis, es por medio de péptidos antimicrobianos. Éstos son sintetizados principalmente por otro tipo de células epiteliales especializadas, denominadas células de Paneth (localizadas en criptas intestinales o de Lieberkuhn, en la base de la mucosa intestinal). Estos péptidos, tales como defensinas, criptidinas y cathelicidinas, pueden inhibir el crecimiento *in vitro de* trofozoítos, pero se ha observado que no son esenciales para el control de la infección (Faubert, 2000; Ouellette, 2005).

También las células epiteliales intestinales absortivas (o enterocitos) pueden generar óxido nítrico, al cual se le han demostrado actividades microbicidas y microbiostáticas durante la giardiasis (Pavanelli y col., 2010).

Respuesta Humoral

Uno de los mecanismos inmunológicos capaces de aclarar la giardiasis es la respuesta humoral (dependiente de anticuerpos). El parásito coloniza la sección proximal del intestino delgado, correspondiente al duodeno, y es ahí donde el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT, por sus siglas en inglés), específicamente el tejido linfoide asociado al intestino (GALT, por sus siglas en inglés) juega un papel importante (Faubert, 2000).

Anatómicamente, el tejido linfoide en el intestino se divide en GALT organizado y difuso; el primero lo constituye los inductores de la respuesta inmunológica tales como las placas de Peyer (agregados o cúmulo de células linfoides) y ganglios linfáticos mesentéricos; el segundo incluye a los efectores de la respuesta inmunológica como los linfocitos intraepiteliales o las demás células de la lámina propia (Linfocitos B y T, macrófagos, eosinófilos, células cebadas) (Ramiro y col., 2008). Es aquí donde se ha demostrado que los anticuerpos diméricos del tipo IgA son los predominantes y más importantes inmunoglobulinas para controlar la infección en el intestino (Eckmann, 2003).

Diferentes trabajos se han enfocado en la evaluación de la respuesta humoral y se ha visto que los niveles de anticuerpos secretorios y sistémicos se incrementan (IgA e IgG respectivamente), los cuales están relacionados con la eliminación de la giardiasis (Velázquez y col., 2005).

Respuesta Celular

La respuesta inmune celular es otra de las formas en las que el hospedero trata de defenderse cuando entra en contacto con un patógeno. Los linfocitos T juegan un papel importante en la erradicación de la giardiasis. Se ha visto que una disminución en los linfocitos T CD4+ en humanos contribuirá al desarrollo de la enfermedad (Singer y Nash, 2000).

Se ha observado que ratones deficientes de células B pueden combatir la giardiasis, mientras que los deficientes de células T no son capaces de controlar la infección; lo que sugiere que los linfocitos B no son tan necesarios para eliminar la infección (Singer y Nash, 2000).

Por otra parte, los linfocitos T, especialmente los CD8+ se les han atribuido, aparte de su papel protector, daño patológico en el intestino delgado. En hospederos inmunocompetentes, en contraste con los que son deficientes en

células T, se ha correlacionado pérdida del borde de cepillo de las células epiteliales, así como una disminución de actividades enzimáticas, tales como maltasa y sacarasa (Scott y col., 2000; Buret, 2005).

Proteínas Antigénicas de *G. lamblia*

A pesar de la importancia de la giardiasis se conoce poco acerca de la complejidad antigénica del parásito. El conocimiento del papel que esos antígenos de *Giardia* tienen en la respuesta inmune es importante para el entendimiento de la infección. Se han identificado proteínas citoplasmáticas y superficiales, que se cree que tienen funciones específicas, pero no se han caracterizado ni bioquímicamente ni inmunológicamente (Velázquez y col., 2005; López Romero y col., 2015; Oviedo y Briceño, 2007).

En pacientes inmunocompetentes, la infección es autolimitada, lo que indica que la presencia de los mecanismos de defensa del hospedero es efectiva contra el parásito. La respuesta inmune humoral y celular juega un rol importante. Sin embargo, nuestro conocimiento de antígenos inmunogénicos es limitado.

Las proteínas variables de superficie, VSP por sus siglas en inglés, son una serie de antígenos de que se encuentran en la superficie del parásito, que tienen por función evadir al sistema inmune del hospedero, así como garantizar su supervivencia en el intestino (Von Allmen y col., 2004), al sufrir variación antigénica. El fenómeno de variación antigénica es importante para comprender la respuesta inmune. Se ha reportado que, durante la infección en roedores inmunológicamente comprometidos, no se encontró variación antigénica; por otro lado, en roedores inmunocompetentes, los trofozoítos recuperados en el intestino si presentaron cambios en sus VSPs (Gottstein y Nash, 1991). Una de las VSP más estudiadas a nivel bioquímico e inmunológico es la VSPH7, característica de la clona GS/M-83-H7 de *G. lamblia*, perteneciente al genotipo B (Adam, 2001;

Faubert, 2000; Singer y Nash, 2000). Por otro lado, la VSPA6 fue de las primeras VSP caracterizadas y encontradas en la cepa WB de *Giardia* (genotipo A) (Adam y col., 2010).

En nuestro grupo de investigación se está trabajando con la caracterización de la proteína 5G8 (un antígeno inmunogénico de *Giardia*). Mediante análisis de espectrometría de masas, se determinó que la proteína 5G8 pertenece a la familia de las VSP (Quintero y col., 2017), y que el 5 % de la cepa GS del genotipo B, expresa la proteína de manera superficial. Tomando esto en cuenta, se enriqueció esta población de trofozoítos mediante inmunoadsorción con un anticuerpo monoclonal específico hasta llegar a una expresión del 80 %, a esta cepa se le denominó GS-5G8 + (Quintero y col., 2013). A partir de aquí se ha estudiado y caracterizado a la proteína 5G8, así como la respuesta inmune que desencadena en el hospedero durante una infección.

Fisiopatología de la Giardiasis

El mecanismo patológico por el cual *Giardia* causa daño a su hospedero aún no es del todo claro. Diversos estudios se han enfocado en el estudio de patogenia de la giardiasis.

Existen algunas teorías acerca de cómo el parásito interactúa con su hospedero. Una de ellas es el daño mecánico que causa debido a la gran cantidad de trofozoítos que se adhieren a la mucosa, propiciando una disminución en el contacto entre las zonas de absorción con los alimentos, trayendo como consecuencia malabsorción de nutrientes (Vega y col., 1982; Faubert, 2000). Aunado a la malabsorción, se han reportado anomalías en el transporte de electrolitos durante la infección crónica por *Giardia*, generando hipersecreción de cloruros (Troeger y col., 2007). La combinación de estos dos

eventos parece explicar la acumulación de agua en el lumen intestinal que se observa durante la infección (Buret, 2007).

Imágenes tomadas con microscopía electrónica han demostrado que la adherencia de los trofozoítos al epitelio intestinal es tan fuerte que llega a dañar a las microvellosidades, encargadas de una absorción de nutrientes con mayor eficiencia, resultando en irritación a la mucosa (Scott, 2000). Por otra parte, se ha visto que las lesiones en el borde de cepillo de la mucosa intestinal pueden deberse a la presencia de linfocitos T CD8, mientras que la activación de linfocitos T CD4 contribuye a la eliminación del parásito. Consistentemente a estos hallazgos, hospederos deficientes en linfocitos T funcionales no muestran anomalías en el epitelio intestinal (Eckmann, 2003; Faubert, 2000).

Debido a estas lesiones, el parásito produce descamación en las células epiteliales. Para intentar una compensación, el hospedero sufre un aumento de índice mitótico a nivel de criptas de Lieberkuhn. Todo esto resulta en inmadurez celular, haciendo que las células superficiales no sean fisiológicamente eficientes, provocando actividad decreciente de enzimas tales como las disacaridasas, lo que quizás explicaría el por qué algunas personas desarrollan intolerancia a la lactosa (Buret y col., 1991).

Por otro lado, uno de los eventos mayormente descritos es la hiperplasia de células caliciformes. Estas células son las responsables de sintetizar el moco que recubre el epitelio intestinal. Se ha visto que las células caliciformes producen este moco con la finalidad de evitar la adherencia del parásito en la mucosa intestinal (Lengerich y col., 1994; Ventura y col., 2013). Además de funcionar como una barrera física, el moco contiene elementos del sistema inmune, tales como inmunoglobulinas, lisozimas y péptidos antimicrobianos (Johansson y col., 2011).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de *G. lamblia*

Se utilizaron cultivos axénicos de trofozoítos de las cepas de *G. lamblia* WBC6 (genotipo A), GS/M-83/H7, (genotipo B) y la cepa GS que expresa altos niveles de la proteína inmunogénica 5G8 (GS-5G8 +, genotipo B). Los cultivos se mantuvieron en medio TYI-S-33 con antibiótico ceftriaxona, suplementado con suero (inactivado a 56 °C por 40 minutos) de ternera recién nacida (NBCS. MICROLABSU540). Los trofozoítos fueron incubados a una temperatura de 37 °C en condiciones microaerofílicas (Vargas y col., 2014; Iñigo y col., 2013; Keister, 1983).

Evaluación de la Expresión Superficial de la proteína 5G8 de Trofozoítos de *G. lamblia*

Para determinar la expresión de la proteína 5G8 en trofozoítos de *G. lamblia*, se utilizaron cultivos confluentes, los cuales fueron sometidos a un baño de agua-hielo por 10 minutos, con el fin de despegar los trofozoítos adheridos a la superficie del tubo, después se realizó el conteo de los trofozoítos ajustando a una cantidad de 5×10^5 células por pozo en una placa de fondo "v". Posteriormente, se llevaron a cabo 2 lavados con solución reguladora de fosfatos (PBS por sus siglas en inglés, phosphate buffered saline) a centrifugaciones de 800 g, 4 °C por 7 minutos. Los trofozoítos se incubaron con el AcMo 5G8.B5 (1 µg/mL en PBS-Albúmina sérica bovina 0.1 %, BSA, bovine serum albumin, por sus siglas en inglés, IgG2b), específico para la proteína 5G8, o con el anticuerpo control de isotipo aBDC.2 (IgG2b) por 1 hora a 4 °C. Al terminar la incubación, se realizaron 2 lavados con PBS (800 g, 4 °C por 5 minutos) y se incubaron con el anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a isocianato de fluoresceína (FITC) diluido 1:200 (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 μ L de PBS-BSA 0.1 %. Posteriormente se fijaron con 200 μ L de paraformaldehído al 2 % filtrado. El análisis fue realizado por citometría de flujo (Canto II FACS, Becton Dickinson, CA, USA).

Animales de Experimentación

Para el modelo murino de infección, se utilizaron ratones de la cepa C3H/HeJ de 7 a 9 semanas de edad. Los animales se mantuvieron en el Bioterio del Departamento de Investigaciones de Posgrado en Alimentos (DIPA) de la Universidad de Sonora, con fotoperiodos de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad a 25°C y alimentados con una dieta comercial para ratones (2018S de Teklad global diets 18% *protein Rodent diet sterilizable*). La administración de agua fue *ad libitum*.

Obtención y Cuantificación de Proteínas Solubles de Trofozoítos de *G. lamblia* en Cultivo

Los extractos antigénicos solubles de trofozoítos del parásito se obtuvieron por el método descrito por Gottstein y col., (1990). Los tubos de un cultivo de crecimiento en fase logarítmica de trofozoítos de *G. lamblia* (cepas WB, GS y GS-5G8 +) se colocaron en agua-hielo por 10 minutos para promover la liberación de los trofozoítos adheridos al tubo. Se realizaron tres lavados con PBS 1X (pH 7.2) a 4 °C y a continuación los trofozoítos se resuspendieron en 1800 μ L de PBS 1X (pH 7.2). Éstos fueron lisados mediante tres ciclos de congelación-descongelación (a -80 °C y a temperatura ambiente, respectivamente). Con la finalidad de prevenir la degradación de proteínas, se adicionaron 10 μ L a cada microtubo inhibidores de proteasas antes de la lisis (4-(2-aminoetil)

bencenosulfonilfluoruro (AEBSF), bestatina, leupetina, pepstatina A, E-64 y 1,10-fenantrolina) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Para asegurar la lisis completa, el contenido celular fue sonicado (Brandson sonifier 250, Shelton, CT, USA) por tres ciclos de dos minutos a 30 ciclos/s. Por último, el extracto sonicado se centrifugó a 10,000 xg por 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante con el antígeno soluble se mantuvo en congelación a -80 °C hasta su uso (Velázquez y col., 2005).

La cuantificación de proteínas en la muestra se llevó a cabo mediante el micrométodo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La concentración de proteína por mililitro se estimó a partir de curvas de calibración utilizando albúmina sérica bovina como estándar; cinco µL de muestra se hicieron reaccionar con 250 µL del reactivo de Bradford; posteriormente se determinó la densidad óptica a 595 nm en un lector de microplaca, de acuerdo con el método descrito por Bio-Rad.

Inmunización de Animales de Experimentación

Para la obtención de suero preinmune, se realizó extracción de sangre de la cola de ratones C3H/HeJ. Las muestras fueron mantenidas por 30 minutos a 37 °C hasta la retracción del coágulo y centrifugadas a 1000 xg por 10 minutos. La inmunización se llevó a cabo con 230 µg de antígeno total de las cepas WB, GS y GS-5G8 + en 200 µL de PBS (Rascón, 2002) en presencia de Adyuvante completo de Freund de DIFCO (B.D. Franklin, Lakes, NJ, USA), mediante administración intraperitoneal. Posteriormente se dieron refuerzos del antígeno con Adyuvante Incompleto de Freund de DIFCO a intervalos de una semana por seis semanas (Astiazarán y col., 2009; Lee HY y col., 2014). Antes de cada refuerzo se obtuvo suero de la manera ya descrita. El suero se mantuvo en congelación a -80 °C.

Título de Anticuerpos Séricos de Isotipo IgG Mediante ELISA Indirecto

Para determinar el título de anticuerpos en los sueros obtenidos, se procedió a realizar un ELISA indirecto. Se adsorbieron 2.5 µg de antígeno total (Antígeno de la cepa WB, GS Y GS-5G8 +) en 50 µL de solución reguladora de carbonatos pH 9.6 en una placa de ELISA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e incubados toda la noche a 4 °C. Se lavaron en 5 ocasiones con PBS-tween 0.05 %. Se bloquearon los sitios libres de antígeno con albúmina sérica bovina al 1 % en PBS. Posterior a los lavados se adicionaron diluciones desde 1:1,000 hasta 1:20,000 del suero de los ratones inmunizados y se incubaron por una hora a temperatura ambiente. Después de los lavados correspondientes, se adicionó anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa, diluído 1:1000 en PBS por una hora a temperatura ambiente. Se utilizó ABTS como cromógeno para el desarrollo de la reacción y la densidad óptica fue medida a 415 nm en un lector de ELISA (Microplate reader Bio-Rad, Hercules, CA, USA) (Rascón, 2002; Valencia, 2013).

Inducción de Giardiasis en el Modelo Murino C3H/HeJ

En el presente estudio se utilizaron 35 ratones de entre 7 y 9 semanas de edad. Se formaron 6 grupos de infección formados por 5 ratones cada uno (machos y hembras), a los cuales se les administró por vía oral 5×10^6 trofozoítos (2 grupos fueron infectados con la cepa WBC6; otros 2 grupos con la cepa GSH7; y los 2 restantes con la cepa GS-5G8 +) en 200 µL de PBS estéril. Al grupo 0, (5 ratones, machos y hembras) denominado sin infección, se le administró solamente la solución reguladora de fosfatos.

Dissección de Ratones y Determinación de Carga Parasitaria

El cuidado, alimentación, reproducción y sacrificio de los animales de experimentación se realizó con base en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Se diseccionaron 35 cm de intestino delgado (los 5 cm proximal, perteneciente al duodeno; los siguientes 10 cm, al yeyuno; los 20 cm restantes, al íleon) (Piper y col., 2012). Se tomó una porción de cada sección para ser procesada y finalmente formar bloques de parafina. El resto de intestino de cada sección fue utilizado para la recuperación de trofozoítos. Esta parte se abrió longitudinalmente y se realizó un lavado con 3 mL de PBS, se recolectó e incubó en tubos de vidrio ámbar con tapón de rosca en agitación constante por una hora a 4°C. Posteriormente, el tejido fue retirado, el medio centrifugado a 1800 rpm por 7 minutos a 4 °C. Se contó el número de trofozoítos presentes mediante microscopía óptica, utilizando una cámara de Neubauer.

Procesamiento de Tejido Intestinal

Las muestras de intestino obtenidas por disección fueron procesadas de la siguiente manera: fijación en formol 10 % máximo por dos días, esto con el fin de evitar la degradación del tejido; deshidratación en alcoholes (etanol) en concentración creciente (80, 96 y 100 %) para eliminar el exceso de agua debido a que la parafina no es hidrosoluble; aclaración en xilol (solubiliza moléculas lipofílicas y el tejido adquiere la dureza necesaria para realizar cortes finos); e inclusión en parafina (Ver Anexo 9). La formación de bloques se llevó a cabo en un embebedor de parafina (Estay y col., 2008).

Detección Inmunohistoquímica de Trofozoítos de *G. lamblia* en Intestino de Ratones Infectados

Para el análisis inmunohistoquímico en las muestras, se obtuvieron cortes histológicos de 4 µm usando un micrótopo a partir de muestras de ratones infectados. Se desparafinaron las laminillas a 60 °C por una hora y posteriormente con xilol por 6 minutos. Las muestras se rehidrataron en baños de etanol con concentración descendente (100, 96 y 80 %). La peroxidasa endógena se inhibió con una solución de H₂O₂ 3% (Blocking peroxidasa kit Hercep Test). Los sitios libres de unión inespecíficos fueron bloqueados con una solución de leche descremada 5%-BSA 1% en PBS (o suero preinmune de cabra 10 % (Ventura y col., 2013)). Para eliminar el exceso de proteína, las muestras se lavaron 2 veces con PBS, la muestra se incubó por una hora en atmósfera húmeda con solución de anticuerpos policlonales diluido 1:100. Se realizaron tres lavados con PBS para eliminar los anticuerpos no unidos. La muestra se incubó con un segundo anticuerpo (cabra anti-IgG de ratón (1:1000) conjugado con peroxidasa) durante una hora en atmósfera húmeda. La detección de color se realizó empleando una solución de cromógeno DAB-peróxido, la incubación fue de 10 minutos. Posteriormente al último lavado, el tejido se contratiñó con hematoxilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por cinco minutos. Por último, la muestra fue deshidratada en baños de etanol con concentración creciente (80, 96 y 100 %), aclarada con xilol para finalmente agregársele medio de montaje (Ventura y col., 2013). Los controles negativos fueron preparados de igual manera, pero tratados con suero preinmune.

Determinación de Alteraciones Histopatológicas de Intestino de Ratones Infectados con *G. lamblia* Mediante Tinciones Hematoxilina-Eosina (HE), Ácido peryódico-Schiff (PAS) y Azul de Toluidina

Para el análisis general por tinción HE, las muestras fueron desparafinadas y rehidratadas mediante la técnica descrita anteriormente. A continuación, se

depositaron en un baño con hematoxilina por cinco minutos. Para contrateñir se utilizó un baño de eosina. La deshidratación y el montaje se realizaron de la manera ya descrita.

Para la determinación de células caliciformes, se utilizó la tinción PAS. Las muestras fueron desparafinadas y rehidratadas. Inmediatamente se hicieron reaccionar con ácido peryódico por cinco minutos y posteriormente con el reactivo de Schiff por 15 minutos. Se utilizó hematoxilina como contratinción. Las muestras fueron deshidratadas y montadas de la manera previamente descrita.

Finalmente, para la determinación de células cebadas, las muestras fueron desparafinadas y rehidratadas. Posteriormente, fueron sumergidas por inmersión en azul de toluidina por 20 minutos. Se lavó el exceso de colorantes y después se deshidrataron y montaron de la manera descrita anteriormente.

Determinación de Población Celular Infiltrada en Intestino Delgado de Ratones Infectados con *G. lamblia* Mediante Inmunohistoquímica (Linfocitos B, CD4+, CD8+ y macrófagos F4/80 +)

Para determinar la presencia de un tipo de célula en lámina propia de intestino en ratones infectados, se generaron cortes histológicos de la manera descrita anteriormente. Las muestras fueron desparafinadas y rehidratadas. Posteriormente, se llevó a cabo la recuperación antigénica en una olla de presión (Pascal DakoCytomation) por 5 minutos. Después las laminillas se enfriaron por 15 minutos a temperatura ambiente. La peroxidasa endógena fue inhibida con de solución de peróxido de hidrógeno al 3 % (en metanol). Los sitios inespecíficos de unión fueron bloqueados con solución de PBS-BSA 1 %. Las muestras fueron lavadas con PBS. Posteriormente, se incubaron por una hora en cámara húmeda, con los anticuerpos específicos para poblaciones celulares (anticuerpos de rata anti-CD4 (IgG2b), CD8a (IgG2b), CD19 (IgG2a) para linfocitos CD4+, CD8+ y linfocitos B de ratón, respectivamente) (Biolegend, San Diego, California, USA) a 10 µg/mL en PBS-BSA 0.1 %. Para determinar macrófagos, se utilizó el

sobrenadante del hibridoma que contiene el anticuerpo monoclonal F4/80 (anticuerpo de rata IgG2b, anti-F4/80 de ratón) (Austyn y Gordon, 1981). Como control negativo se utilizó suero de rata y sobrenadante del hibridoma aBDC.2 (IgG2b). Las muestras fueron lavadas con PBS. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo anti-IgG de rata (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1:100 acoplado a peroxidasa de rábano, por una hora en cámara húmeda. Se lavó el exceso de anticuerpo. La detección de color se realizó empleando una solución de cromógeno DAB-peróxido, la incubación fue de 10 minutos. Posteriormente al último lavado, el tejido se contratiñó con hematoxilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por cinco minutos. Por último, la muestra fue deshidratada en baños de etanol con concentración creciente (80, 96 y 100 %), aclarada con xilol para finalmente agregársele medio de montaje (Ventura y col., 2013).

Evaluación de la Respuesta Inmune Humoral de Ratones Infectados con *Giardia lamblia* Mediante ELISA Indirecto

Para evaluar la respuesta inmune humoral (mediada por anticuerpos) de los ratones infectados con las diferentes cepas de *G. lamblia*, se realizó un ELISA específico indirecto. Para esto, se recolectaron muestras de heces (IgA intestinal) y suero (IgG sistémica) de cada uno de los grupos (Sin infección e infectados con *Giardia* WB, GS, GS-5G8+ a 7 y 14 días post-infección). Para la cuantificación de IgA total de las muestras de heces se utilizó una curva con IgA comercial de ratón (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Velazquez y col., 2005) (Ver Anexo 22).

Se adsorbieron 2.5 µg de antígeno total de cada una de las cepas o 0.5 µg de elución de banda de 70 kDa donde se encuentra la proteína 5G8 (Ver Anexos 23, 24 y 25), en 50 µL de solución reguladora de carbonatos pH 9.6, a una placa de ELISA. Después de una incubación a 4 °C toda la noche, la placa se lavó con PBS-Tween 0.05 %. Posteriormente se procedió a bloquear los sitios

inespecíficos de unión con solución bloqueadora (PBS-BSA 1 %) por una hora a temperatura ambiente. La placa fue lavada después de este paso. Se añadió por triplicado, muestras de suero 1:10, 100 ng y 200 ng de IgA total de las muestras de heces de ratones infectados y no infectados. Se incubó la placa por una hora a temperatura ambiente. Después del lavado correspondiente, se añadió anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano, anti-IgG (Sigma A9037) 1:1000 y anti-IgA (Abcam 97235) 1:7500 de ratón; esto se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Para la detección de la reacción antígeno anticuerpo, las placas fueron lavadas e incubadas con 1 mM ABTS en solución reguladora de citratos con 0.03% H₂O₂, por 15 minutos a temperatura ambiente. La densidad óptica fue leída a 415 nm en un lector de microplaca. El análisis estadístico fue llevado a cabo empleando la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney.

Análisis Estadístico

El análisis de los resultados de carga parasitaria y título de anticuerpos de ratones inmunizados e infectados se llevó a cabo, de acuerdo a la naturaleza de los datos, mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para grupos independientes, la cual consiste en un diseño donde se encuentran dos variables independientes, de tipo cuantitativo, con variables continuas y discretas, cuya distribución no se asemeja a la curva normal. (Valenzuela, 2006). El análisis fue realizado por el programa estadístico IBM ® SPSS ® Statistics Versión 20 y GraphPad Prism 5.01.

RESULTADOS

80.1 % de la Cepa GS-5G8 + Expresa a la Proteína 5G8 de Manera Superficial

Estudios anteriores han reportado que la proteína 5G8 se expresa en la superficie de trofozoítos de *G. lamblia* (Quintero y col., 2013). Con el objetivo de realizar el análisis histopatológico y la evaluación de la respuesta inmune, primeramente, teníamos que confirmar que trofozoítos de *Giardia* expresaran a la proteína 5G8 de manera superficial. Con base en esto, se llevó a cabo una tinción superficial empleando al anticuerpo monoclonal específico para la proteína 5G8.B5, evaluando la expresión mediante citometría de flujo.

El análisis demuestra que el 80.1 % de los trofozoítos de la cepa GS-5G8 + expresa la proteína 5G8; El anticuerpo control de isotipo aBDC.2 (IgG2b) no muestran un reconocimiento hacia la superficie de los trofozoítos (Figura 2). Cabe recalcar que, en estudios previos, el anticuerpo monoclonal no reconoció a la proteína 5G8 en la cepa WB de *Giardia* (datos no mostrados); mientras que en la cepa GS, solamente reconoció aproximada mente el 5 % de la población (Quintero y col., 2013).

Los Sueros Provenientes de Animales Inmunizados con Lisados de Trofozoítos de *G. lamblia* de Inmunización Reconocen Antígenos del Parásito

Con el fin de generar anticuerpos policlonales específicos contra antígenos de *G. lamblia* en ratones, se obtuvo un extracto antigénico del parásito, el cual fue utilizado para inmunizar a los animales de experimentación de semanalmente en

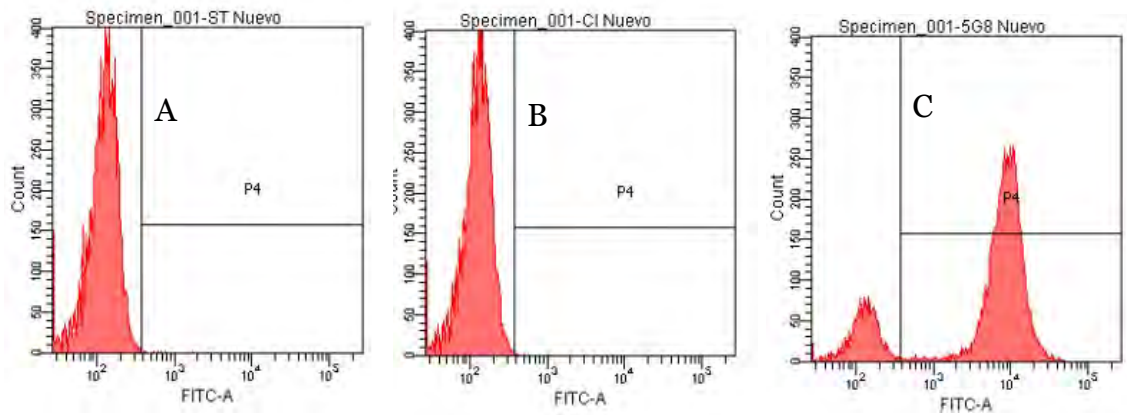


Figura 2. 80.1 % de la Ceba GS-5G8 + Expresa a la Proteína 5G8 de Manera Superficial. Análisis de expresión de la proteína 5G8 en la superficie de *G. lamblia*. Análisis de citometría de flujo utilizando trofozoítos de la cepa GS-5G8 + y el anticuerpo monoclonal 5G8.B5. A) Control sin teñir, B) Anticuerpo monoclonal control de isotipo (IgG2b) y C) Anticuerpo monoclonal 5G8.B5 (IgG2b) purificado.

un periodo de 6 semanas. Se recolectó suero preinmune antes de realizar la primera inmunización. De igual forma se obtuvo suero de ratones antes de cada refuerzo de inmunización. Para determinación del título de anticuerpos se utilizó el ensayo de inmunoadsorción ELISA indirecto.

De los sueros recolectados, se observó que el título de anticuerpos anti *G. lamblia* tuvo un aumento significativo a partir de la segunda semana post-inmunización (Figura 3, 4 y 5). Por otra parte, se encontró que el título máximo de anticuerpos fue en los sueros de la semana 4, 6 y 5 post-inmunización (para suero hiperinmune anti WB, GS y GS-5G8, respectivamente). Como se esperaba, el suero preinmune no mostró anticuerpos específicos anti-*G. lamblia*.

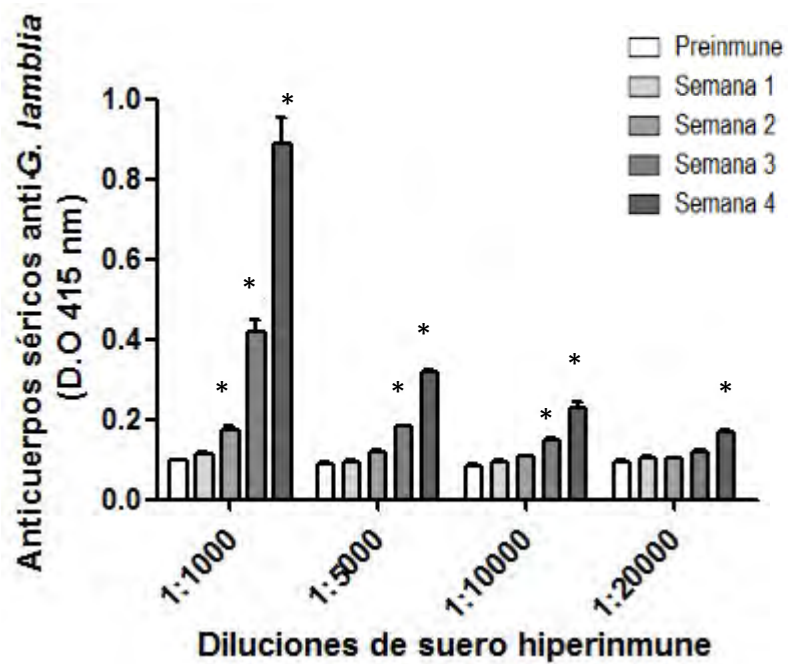


Figura 3. Anticuerpos Policlonales Específicos Reconocen Proteínas de *G. lamblia* WB. Anticuerpos IgG séricos de ratones C3H/HeJ inmunizados con proteínas de *G. lamblia* WB. * $p \leq 0.05$ de acuerdo a la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, con respecto al suero preimmune.

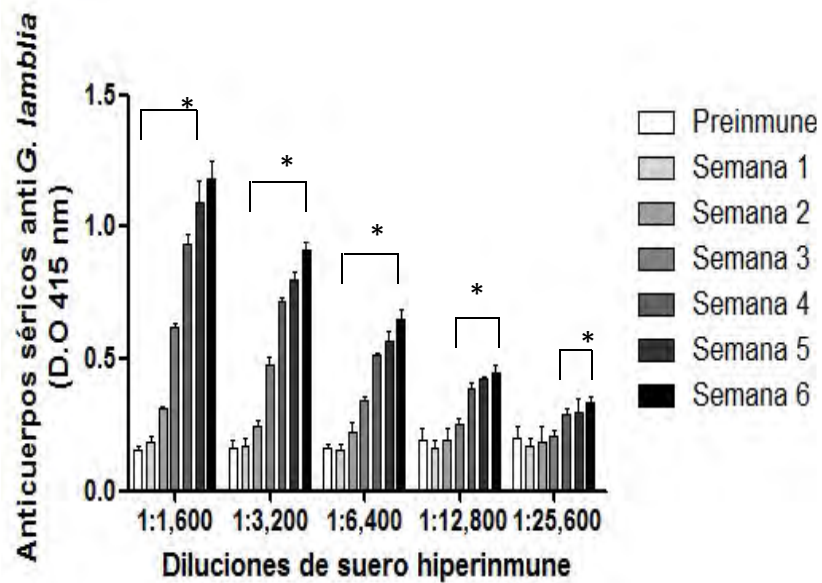


Figura 4. Anticuerpos Policlonales Específicos Reconocen Proteínas de *G. lamblia* GS. Anticuerpos IgG séricos de ratones C3H/HeJ inmunizados con proteínas de *Giardia lamblia* GS. * $p \leq 0.05$ de acuerdo a la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, con respecto al suero preinmune.

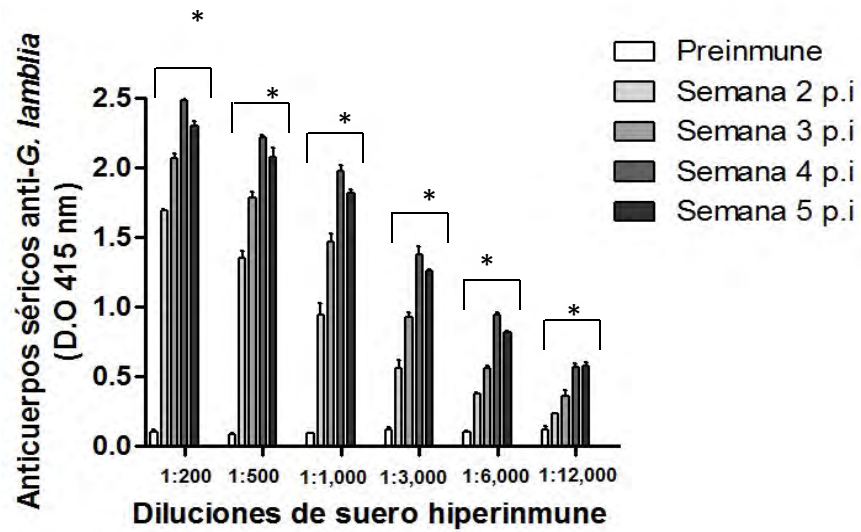


Figura 5. Anticuerpos Policlonales Específicos Reconocen Proteínas de *G. lamblia* GS-5G8 +. Anticuerpos IgG séricos de ratones C3H/HeJ inmunizados con proteínas de *G. lamblia* GS-5G8 +. * $p \leq 0.05$ de acuerdo a la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, con respecto al suero preimmune.

***G. lamblia* Coloniza el Duodeno de Ratones Infeccionados a los 7 días Post-infección**

Con el objetivo de evaluar el establecimiento de la infección con *G. lamblia*, en cada uno de los ratones de cada grupo de estudio, se realizó el conteo de la carga parasitaria en cada sección de intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon).

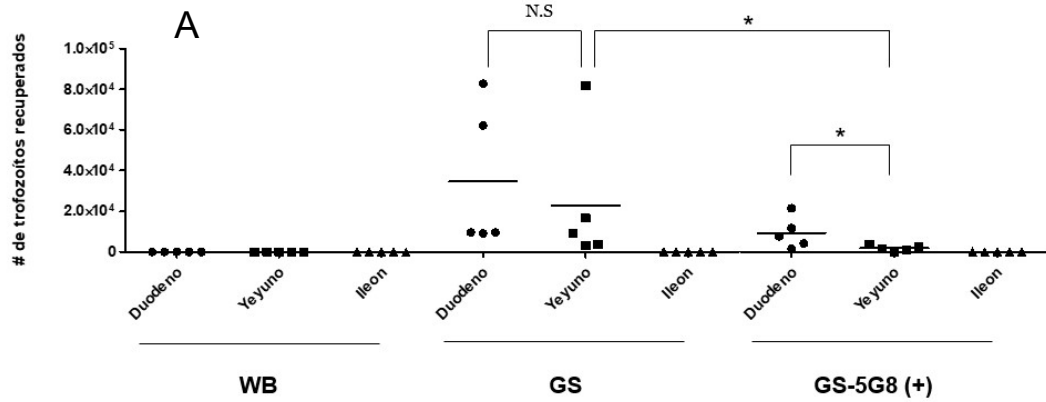
Se encontró que a los 7 días post-infección, *Giardia* es capaz de colonizar el intestino delgado en el hospedero de una manera estable, específicamente en el duodeno, con menor capacidad de hacerlo en el yeyuno, mientras que en íleon no se encontraron trofozoítos. Por otra parte, se encontró que la carga parasitaria encontrada en los ratones infectados con la cepa GS-5G8 + fue menor comparada con la cepa que no expresa la proteína 5G8. *Giardia* WB no fue capaz de generar una infección estable bajo condiciones similares a GS y GS-5G8+ (Figura 6A).

Finalmente, a los 14 días post-infección se observó que hay una disminución en la carga parasitaria (Figura 6B).

No se Detectaron Trofozoítos de *G. lamblia* en Cortes Histológicos de Duodeno de Ratones Infeccionados Mediante Inmunohistoquímica

Con el objetivo de abundar más en el proceso patológico inducido por *Giardia*, se realizaron tinciones inmunohistoquímicas a partir de cortes histológicos de duodeno de ratones infectados y sacrificados a los 7 días post-infección (Infección por *Giardia* GS, ya que en este grupo se encontró una mayor carga parasitaria). Se utilizaron los anticuerpos policlonales generados previamente mediante inmunización, su capacidad para reconocer trofozoítos de *Giardia* fue evaluada en inmunohistoquímica a partir de cortes histológicos de intestino de gerbo infectado (Ver anexo 26).

Carga parasitaria de intestino delgado de ratones infectados con *Giardia lamblia* 7 días post-infección



Carga parasitaria de intestino delgado de ratones infectados con *Giardia lamblia* 14 días post-infección

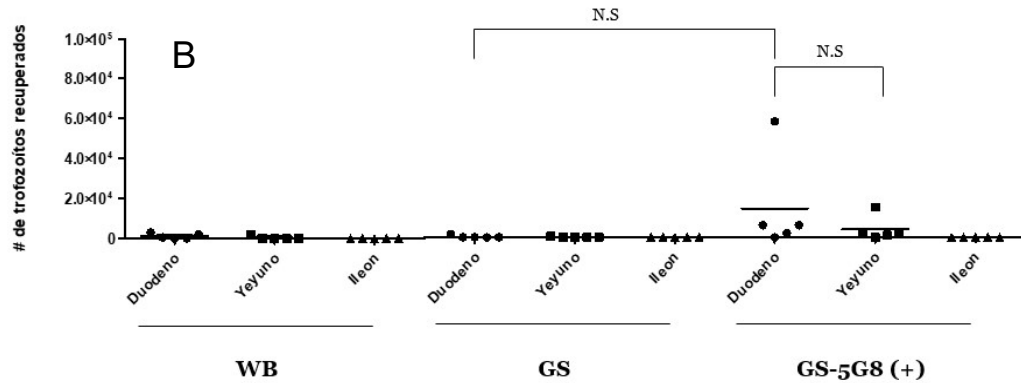


Figura 6. *G. lamblia* coloniza y establece infección en duodeno de ratones a los 7 días post-infección. Ratones C3H/HeJ fueron infectados con 5×10^6 de trofozoítos de Giardia WB, GS y GS-5G8 + y sacrificados a 7 (A) y 14 (B) días post-infección. Se diseccionaron duodeno, yeyuno e íleon. El análisis estadístico consistió en la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para grupos independientes. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p \leq 0.05$ (*).

La tinción no mostró trofozoítos adheridos en el epitelio o en luz intestinal. Como control positivo se utilizaron cortes histológicos de gerbos donde se había demostrados previamente la presencia de trofozoítos. El suero preinmune no mostró reconocimiento de trofozoítos (Figura 7).

La Infección por *G. lamblia* Genera Inflamación Aguda en Mucosa Intestinal de Ratones

Con el fin de analizar la mucosa intestinal de ratones infectados con diferentes genotipos de *Giardia*, se realizaron cortes histológicos de los ratones infectados.

La evaluación del daño patológico consistió en la tinción general hematoxilina-eosina. La primera de ellas mostró que los cambios histopatológicos más sobresalientes fueron infiltración celular en lámina propia de mínimo a leve y acumulación de líquido (edema) en duodeno de los ratones infectados tanto con WB, GS y GS-5G8 +, a los 7 (Figura 8) y 14 (Figura 9) días post-infección. En yeyuno e íleon no se observaron cambios histopatológicos comparado con el grupo control sin infección.

Por otra parte, con el objetivo de determinar si existe o no hiperplasia de células caliciformes, se llevó a cabo la tinción ácido peryódico-Schiff a partir de cortes histológicos de los ratones infectados a los 7 y 14 d.p.i (Figura 10 y 11). La tinción muestra que no existe aumento en el número de células caliciformes en mucosa intestinal en ninguna región anatómica evaluado en ninguno de los grupos comparados con el grupo sin infección (Figura 12).

En las tablas I y II se resumen los hallazgos histopatológicos más relevantes encontrados.

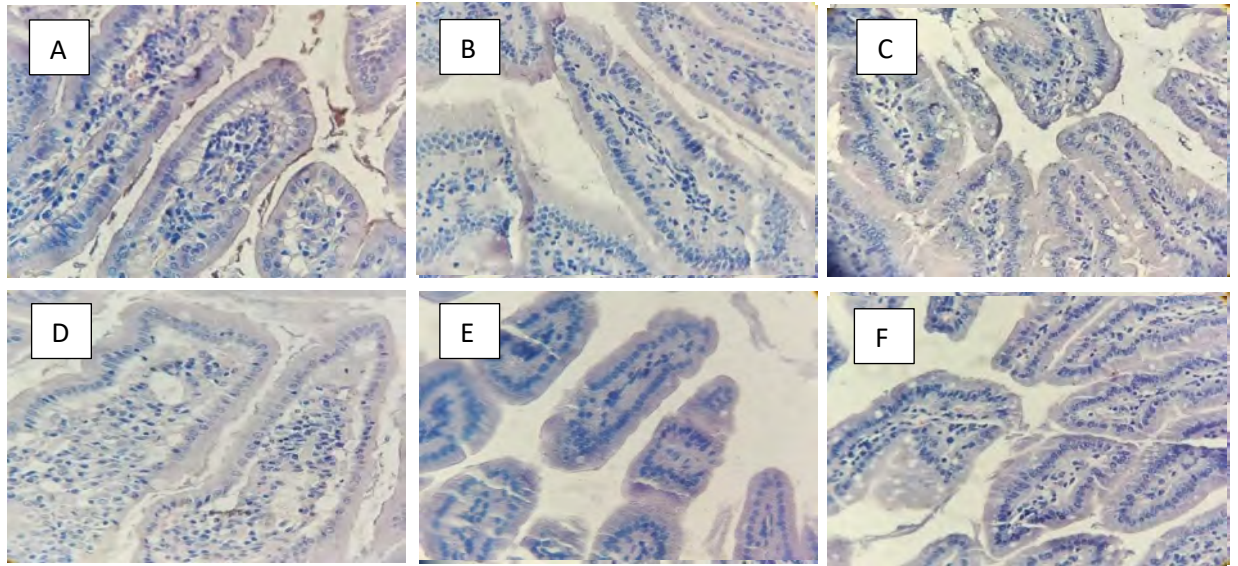


Figura 7. No se detectaron trofozoítos de *Giardia* en mucosa intestinal de ratones infectados mediante inmunohistoquímica. Tinción inmunohistoquímica de *Giardia lamblia* GS en intestino delgado de ratones infectados. Ratones fueron sacrificados a 7 días post-infección. A) y D) Yeyuno de gerbo infectado con *Giardia*. Células positivas teñidas de color café. B), C), E) y F) Duodeno de ratones infectados. Contratinción con hematoxilina. 400 X.

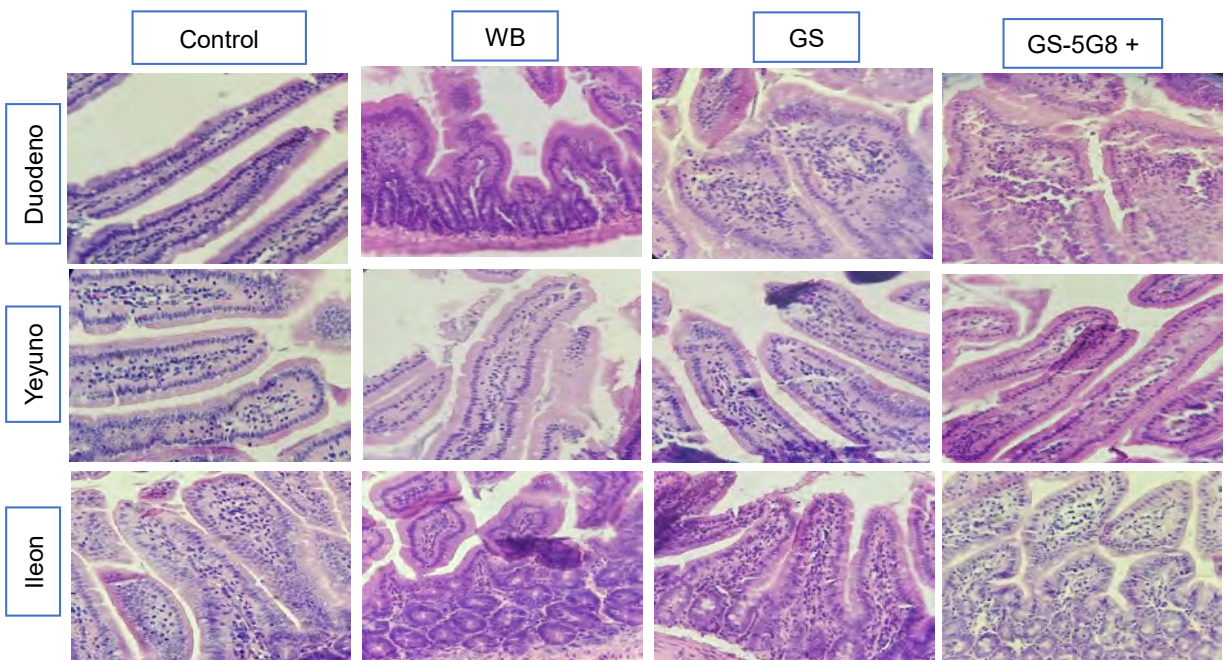


Figura 8. La infección por *G. lamblia* genera respuesta inflamatoria en lámina propia en duodeno de ratones a los 7 d.p.i. Análisis patológico por cortes histológicos de duodeno, yeyuno e íleon de ratones infectados con *Giardia* WB, GS y GS-5G8 + 7 d.p.i. Tinción H.E. 400 X

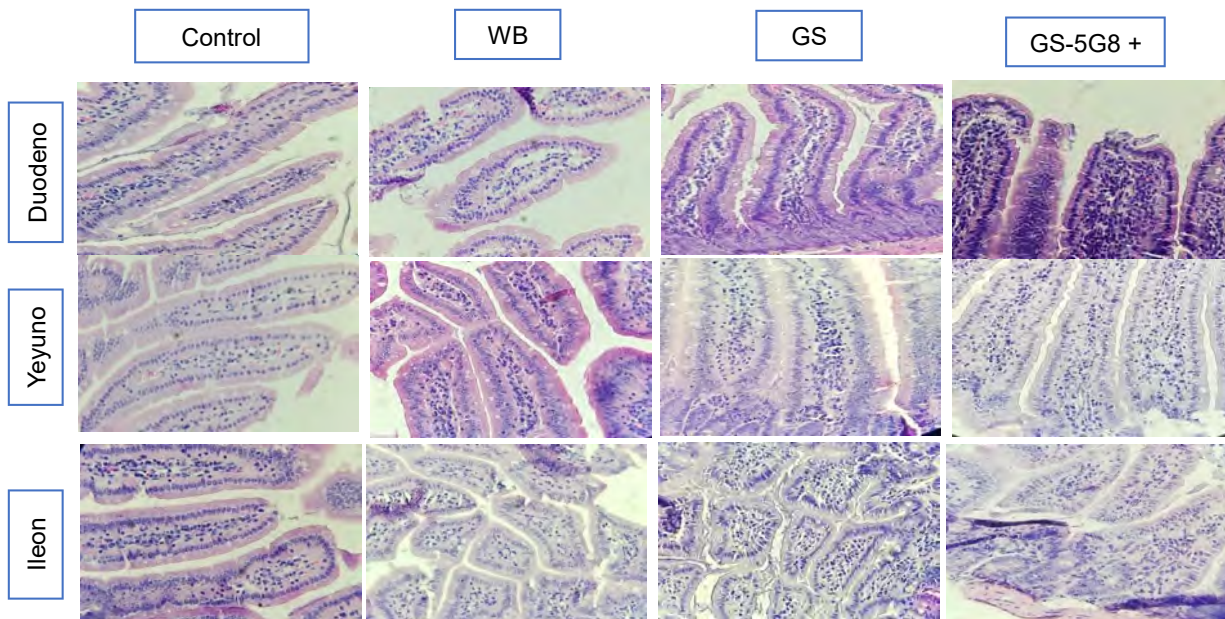


Figura 9. La infección por *G. lamblia* genera respuesta inflamatoria en lámina propia en duodeno de ratones a los 14 d.p.i. Análisis patológico por cortes histológicos de duodeno, yeyuno e íleon de ratones infectados con *Giardia* WB, GS y GS-5G8 + 14 d.p.i. Tinción H.E. 400 X

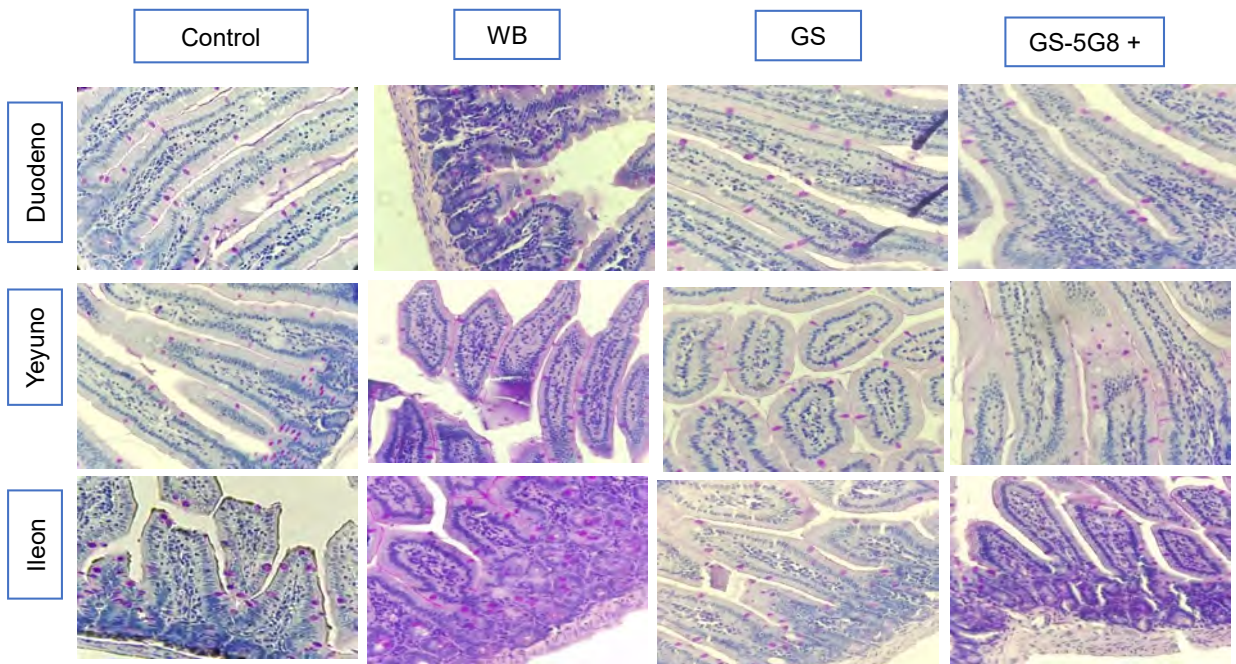


Figura 10. La infección por *G. lamblia* no genera hiperplasia de células caliciformes a los 7 d.p.i. Análisis patológico por cortes histológicos de duodeno, yeyuno e íleon de ratones infectados con *Giardia* 7 d.p.i. Tinción PAS. 400 X.

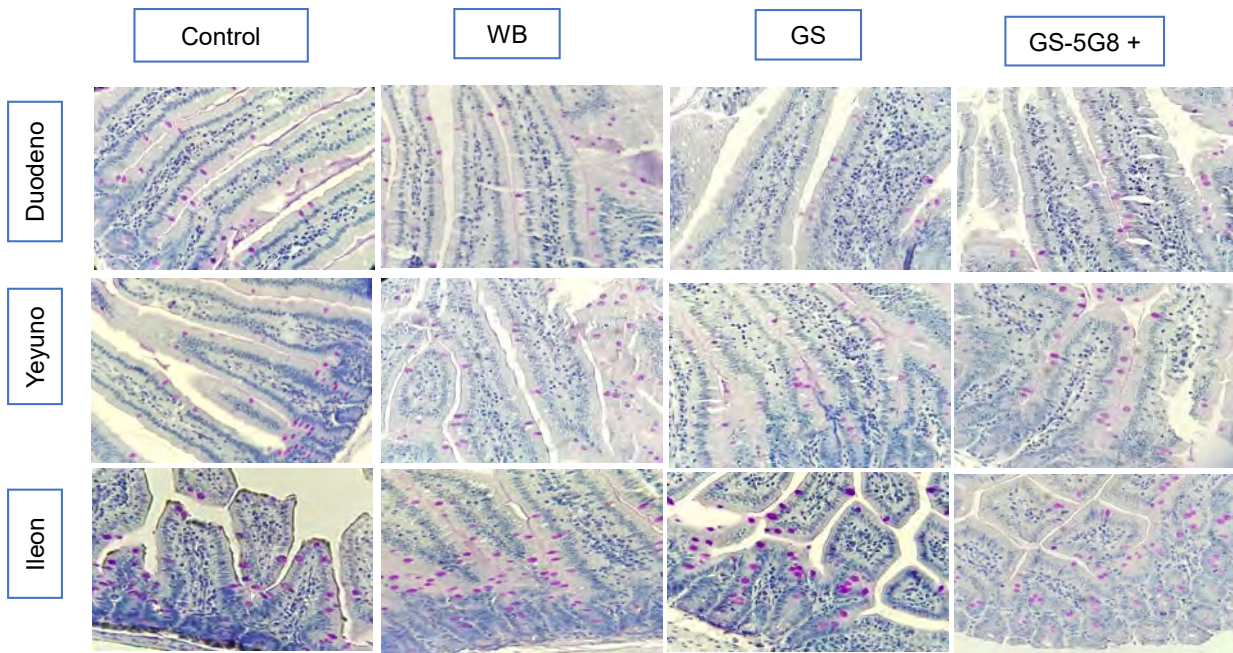


Figura 11. La infección por *G. lamblia* no genera hiperplasia de células caliciformes a los 14 d.p.i. Análisis patológico por cortes histológicos de duodeno, yeyuno e íleon de ratones infectados con *Giardia* 14 d.p.i. Tinción PAS. 400 X.

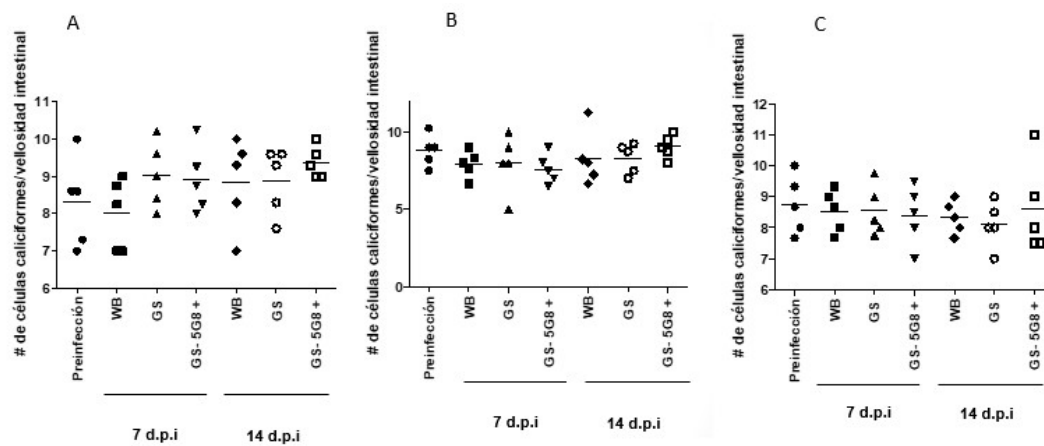


Figura 12. Análisis cuantitativo de células caliciformes en mucosa intestinal de ratones infectados con *G. lamblia*. A partir de cortes histológicos, se cuantificaron el número de células caliciformes por vellosidad intestinal. Cada símbolo representa la sección evaluada de un ratón (n=5 por grupo). A) Duodeno, B) Yeyuno y C) Íleon de ratones infectados con las cepas WB, GS y GS-5G8 + de *G. lamblia* 7 y 14 d.p.i. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p \leq 0.05$ según la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

Tabla I. Análisis histopatológico de intestino delgado de ratones infectados con *G. lamblia*

Grupo de ratones	Daño patológico								
	Infiltración celular en lámina propia			Presencia de Edema			Número de células caliciformes por vellosidad intestinal		
	Duodeno	Yeyuno	Ileon	Duodeno	Yeyuno	Ileon	Duodeno	Yeyuno	Ileon
Sin infección	+	+	+/**	No	No	Si	7-10	7-10	7-10
WB 7 d.p.i	+/**	+	+/**	Si	Si	Si	7-9	7-9	7-9
GS 7 d.p.i	+/**	+	+/**	Si	Si	Si	8-10	5-10	7-10
GS- 5G8 + 7 d.p.i	+/**	+	+/**	Si	Si	Si	8-10	6-9	7-9
WB 14 d.p.i	+/**	+	+	Si	Si	No	7-10	6-11	7-9
GS 14 d.p.i	++	+	+	Si	No	No	7-10	7-9	7-9
GS- 5G8 + 14 d.p.i	++	+	+	Si	No	No	9-10	8-10	7-11

+ = infiltrado mínimo; <50 células en lámina propia, <25 % de espacio total; ++ = infiltrado leve; <75 células en lámina propia, <50 % de espacio total. El análisis fue llevado a cabo mediante doble ciego. Se analizaron 10 vellosidades de cada ratón de cada grupo de experimentación

Tabla II. Alteraciones histopatológicas en mucosa intestinal de ratones infectados con *G. lamblia* (genotipos A y B)

Grupo	Infiltración en lámina propia*	Presencia de edema*	Número de células caliciformes por vellosidad intestinal*	Número de linfocitos B por vellosidad intestinal**	Número de linfocitos T CD4 por vellosidad intestinal**	Número de macrófagos por vellosidad intestinal**
Sin infección	+	No	7-10	0-1	3-5	10-16
Genotipo A (WB)	+ / ++	Si	6-11	1-2	6-12	9-15
Genotipo B (GS)	+ / ++	Si	5-10	1-2	10-12	11-20
Genotipo B (GS-5G8 +)	+ / ++	Si	6-11	5-6	11-12	11-16

+ = infiltrado mínimo; <50 células en lámina propia, <25 % de espacio total; ++ = infiltrado leve; <75 células en lámina propia, <50 % de espacio total. El análisis fue llevado a cabo mediante doble ciego. *Se analizaron 10 vellosidades de cada ratón de cada grupo de experimentación. **Se analizaron 5 vellosidades de 2 ratones pertenecientes a los grupos de 14 días post-infección.

Células CD19+ y CD4+ se Infiltran en Lámina Propia de Mucosa Intestinal en Ratones Infectados con *G. lamblia*

Con la finalidad de caracterizar el infiltrado mononuclear observado en lámina propia de ratones infectados, se procedió a la identificación células CD19+, CD4+, CD8 + y F4/80+ mediante técnicas inmunohistoquímicas; así como células cebadas mediante tinción azul de toluidina, en los grupos de 14 días post-infección, al ser éstos los que presentaron un mayor infiltrado celular.

El análisis inmunohistoquímico demostró que las células CD19 participan en el infiltrado de lámina propia de ratones infectados con *Giardia* (Figura 13). Los grupos de ratones infectados presentaron un mayor número de este tipo de células por vellosidad comparado con el grupo sin infección; además el grupo infectado con la cepa GS-5G8+ presentó un mayor número de células, comparado con el infiltrado presente en los ratones infectados con WB y GS (Figura 14).

De manera similar, se demostró la presencia de células CD4 en lámina propia (Figura 13). El número de células presentes por vellosidad intestinal en las muestras de ratones infectados fue mayor al comparar con el grupo sin infección. No se observaron diferencias entre los grupos de infección (Figura 15).

Además, se identificaron células F4/80 en lámina propia intestinal, sin embargo, el número presente no fue diferente al momento de comparar con el grupo control (Figura 16). Por otra parte, no se identificaron células CD8 ni células cebadas como parte del infiltrado celular (Figura 17).

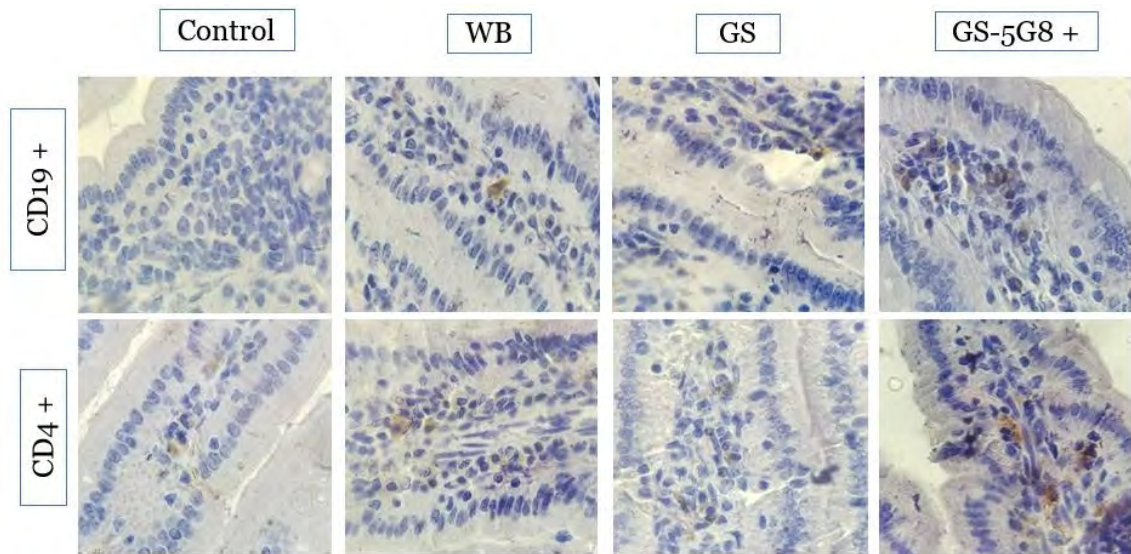


Figura 13. Linfocitos B y T CD4+ se infiltran en lámina propia durante la infección por *G. lamblia*. Análisis patológico por cortes histológicos de duodeno de ratones infectados con *Giardia* 14 d.p.i. Células positivas teñidas de color café. Inmunohistoquímica CD19 y CD4. 1000 X

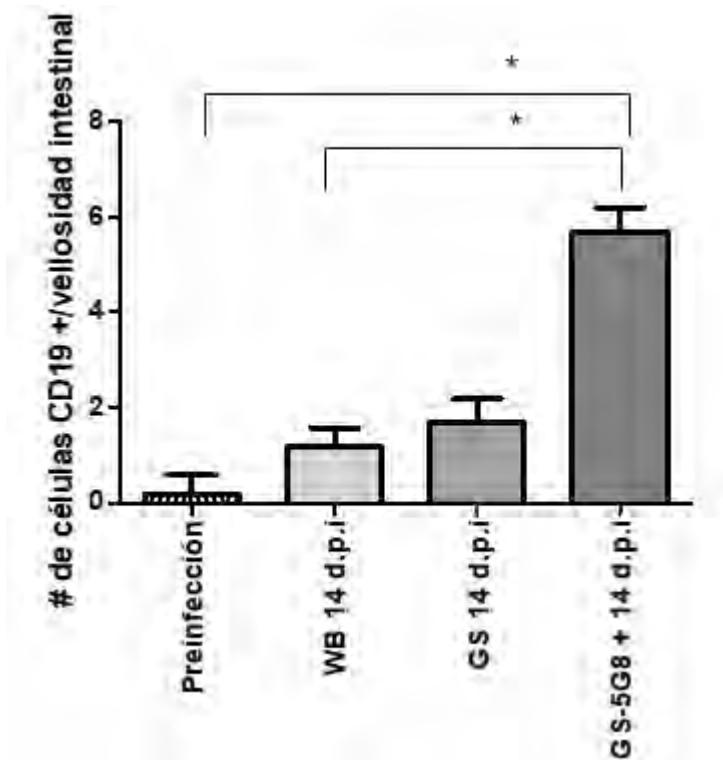


Figura 14. Análisis cuantitativo de células CD19 en lámina propia de mucosa intestinal de ratones infectados con *G. lamblia*. Se analizó la presencia de células positivas a CD19 por vellosidad intestinal mediante inmunohistoquímica en cortes histológicos de ratones infectados con *Giardia*. Se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando $p \leq 0.05$ mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

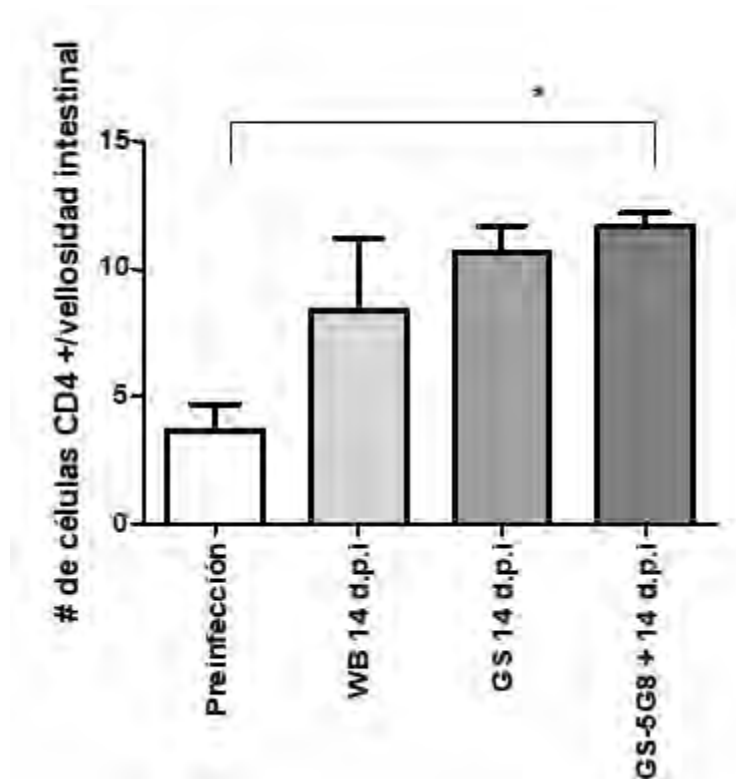


Figura 15. Análisis cuantitativo de células CD4 en lámina propia de mucosa intestinal de ratones infectados con *G. lamblia*. Se analizó la presencia de células positivas a CD4 por vellosidad intestinal mediante inmunohistoquímica en cortes histológicos de ratones infectados con *Giardia*. Se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando $p \leq 0.05$ mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

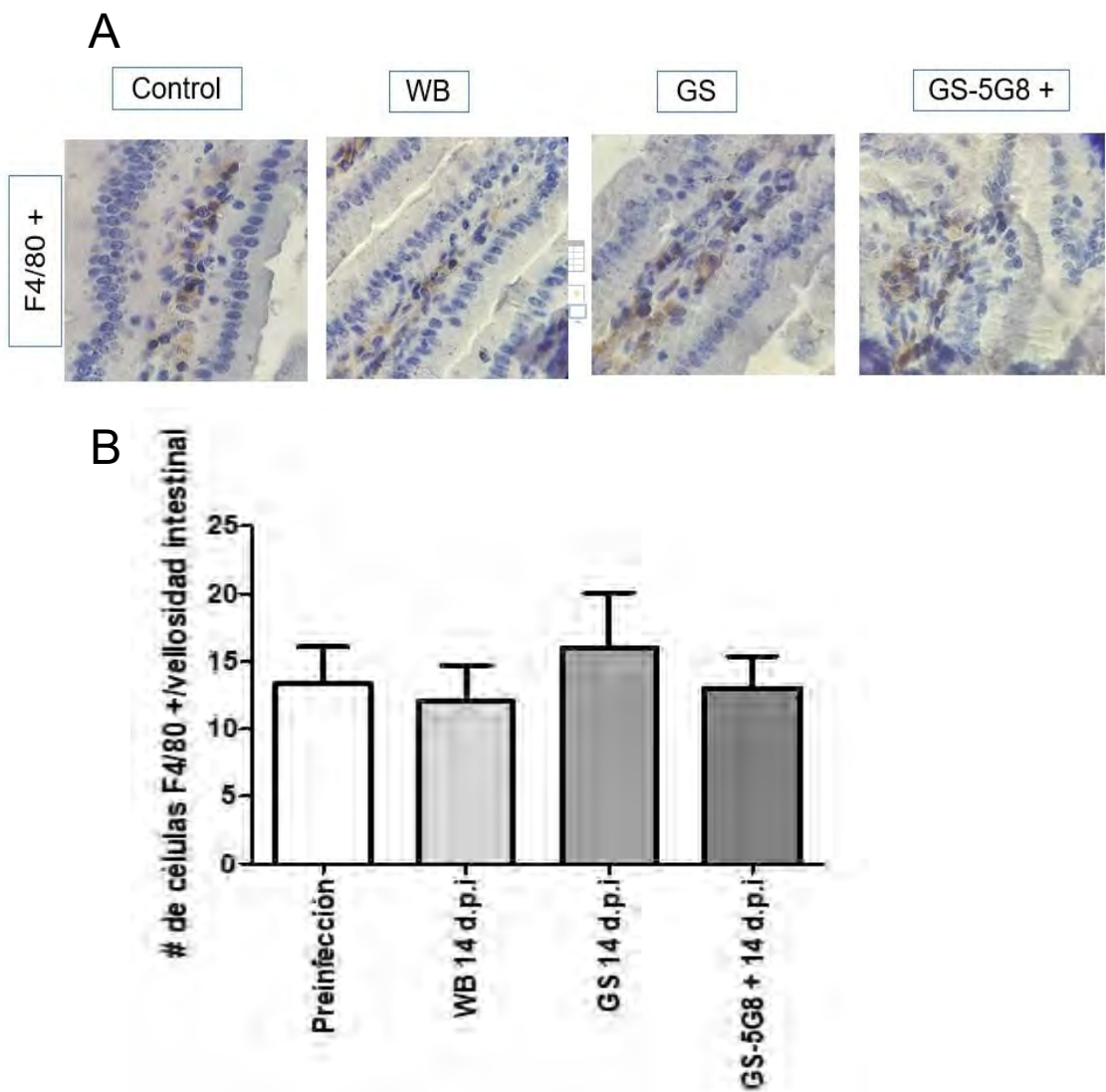


Figura 16. Macrófagos no se infiltran en lámina propia durante la infección por *Giardia*. A) Análisis patológico por cortes histológicos de duodeno de ratones infectados con *Giardia* 14 d.p.i. Células positivas teñidas de color café. Inmunohistoquímica F4/80. 1000 X. B) Se analizó la presencia de células positivas a F4/80 por vellosidad intestinal mediante inmunohistoquímica en cortes histológicos de ratones infectados con *Giardia*. Se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando $p \leq 0.05$ mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

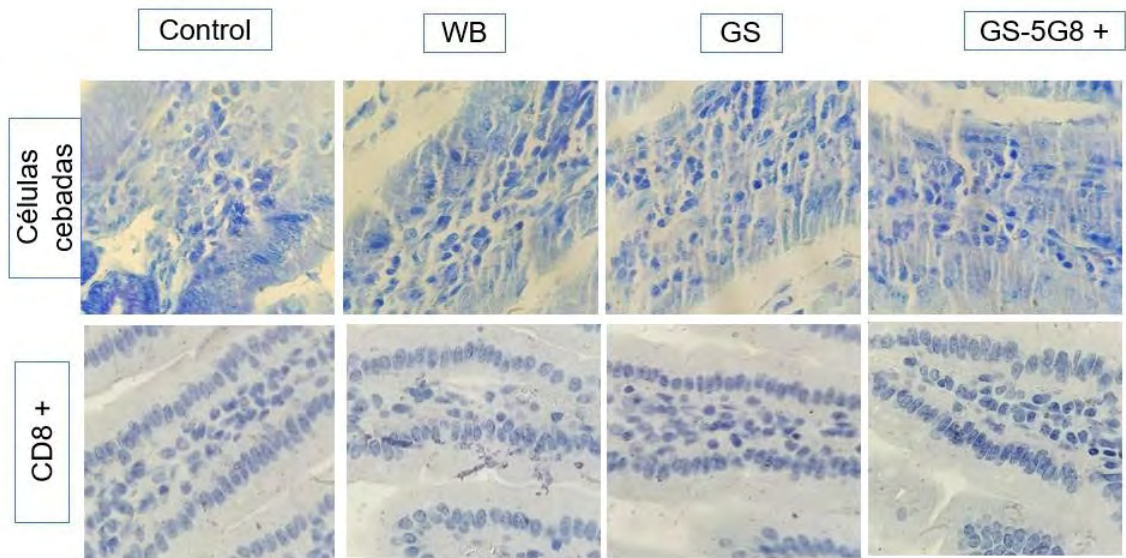


Figura 17. Células cebadas y Linfocitos CD8 + no se infiltran en lámina propia durante la infección por *G. lamblia*. Análisis patológico por cortes histológicos de duodeno de ratones infectados con *Giardia* 14 d.p.i. Tinción azul de toluidina Células cebadas. Inmunohistoquímica CD8 +. 1000 X

***G. lamblia* (Genotipos A y B) Induce una Respuesta Inmune Humoral (Local y Sistémica) en Ratones Infectados**

Con el objetivo de evaluar la respuesta inmune humoral local y sistémica de ratones infectados con *Giardia*, se realizaron ensayos de ELISA indirecto, a partir de muestras de heces y suero.

Los resultados mostraron que existe un aumento estadísticamente significativo en el nivel de IgA local específica contra antígenos de *Giardia*, en las muestras de heces de ratones infectados, de todos los grupos, comparados con el grupo control sin infección. No se observaron diferencias entre IgA local entre los grupos de infección (Figura 18). Además, se observó que hubo un aumento en el nivel de IgG sérica en las muestras de ratones infectados con la cepa GS-5G8+ a los 7 y 14 d.p.i con respecto al grupo control. No se observó un aumento de IgG en los demás grupos de infección (Figura 19).

Por otra parte, con la finalidad de caracterizar si esta respuesta inmune humoral observada tenía la capacidad de reconocer específicamente a la proteína 5G8, se llevó a cabo un ensayo de ELISA específico contra la proteína en cuestión. Se observó que tanto para IgA (Figura 20) e IgG (Figura 21), en las muestras de heces y suero existe un reconocimiento específico hacia la proteína 5G8 en las muestras de los ratones infectados con GS-5G8+ a los 14 d.p.i. No se observaron diferencias entre los otros grupos de infección.

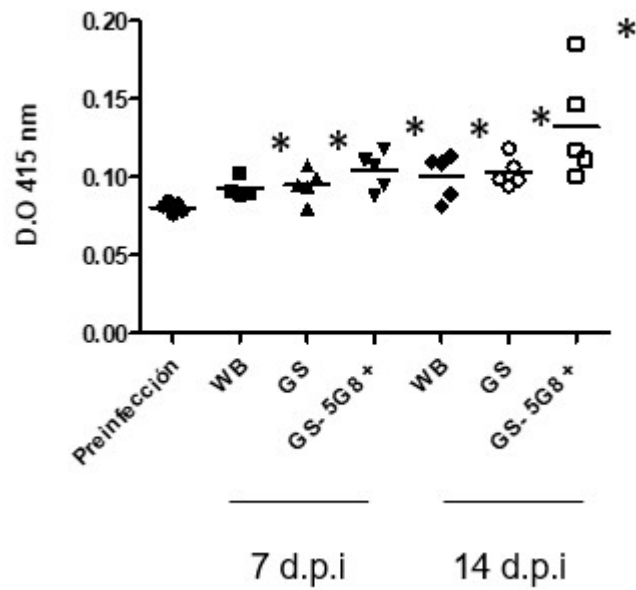


Figura 18. La infección por *G. lamblia* induce una respuesta inmune humoral secretora. Título de anticuerpos IgA específicos contra antígeno total de *Giardia lamblia*. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control, cuando $p \leq 0.05$ de acuerdo a la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

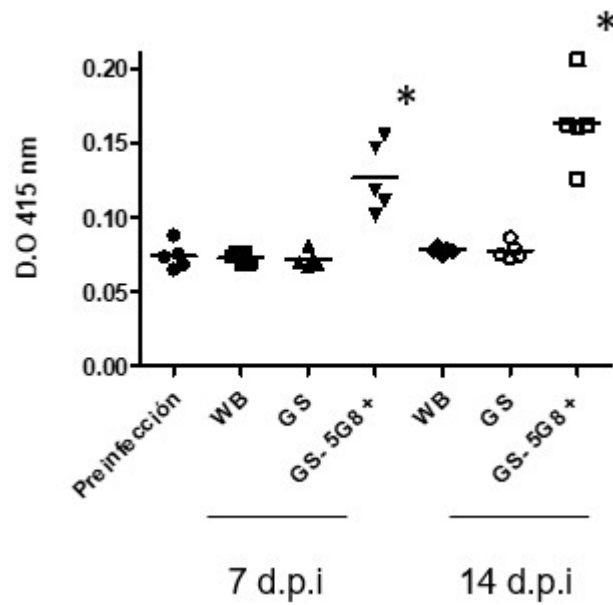


Figura 19. La infección por *G. lamblia* induce una respuesta inmune humoral sistémica. Título de anticuerpos IgG específicos contra un lisado de trofozoítos de *Giardia lamblia*. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control, cuando $p \leq 0.05$ de acuerdo a la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

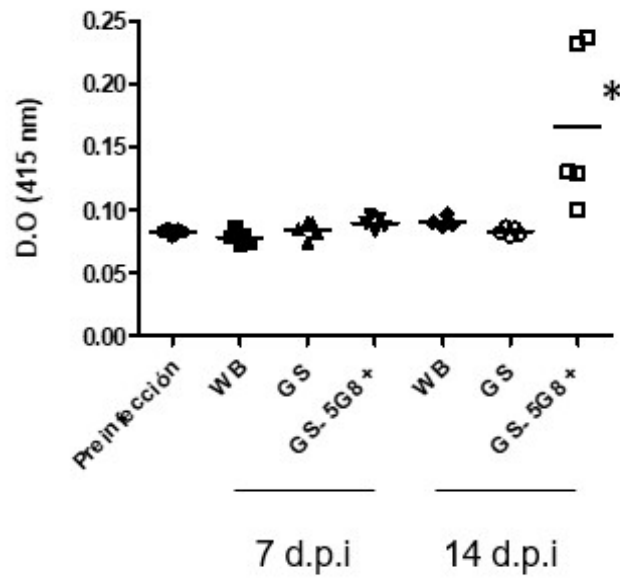


Figura 20. La proteína 5G8 es reconocida por la respuesta inmune humoral local. Evaluación de anticuerpos IgA específicos contra 5G8 de *G. lamblia*. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control, cuando $p \leq 0.05$ de acuerdo a la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

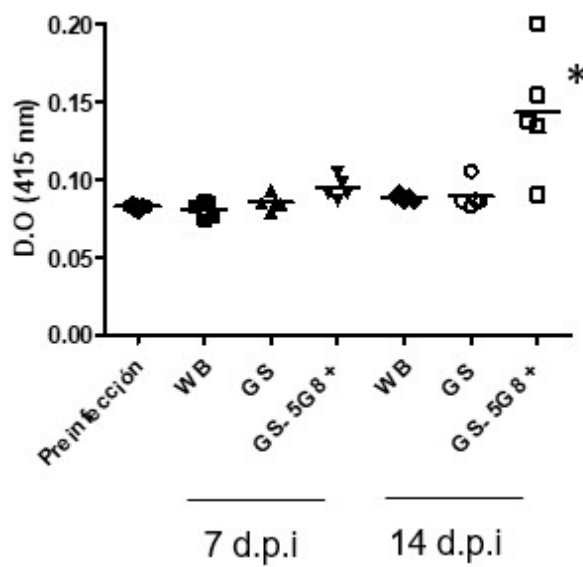


Figura 21. La proteína 5G8 es reconocida por la respuesta inmune humoral sistémica. Evaluación de anticuerpos IgG específicos contra 5G8 de *Giardia lamblia*. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control, cuando $p \leq 0.05$ de acuerdo a la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

DISCUSIONES

El presente trabajo describe el análisis histopatológico y respuesta inmune humoral en mucosa intestinal durante el proceso infeccioso generado por dos genotipos diferentes de *Giardia lamblia* en el modelo murino C3H/HeJ. En nuestro grupo de investigación, este es el primer trabajo que describe en parte la histopatología de los genotipos que pueden causar infección en humanos.

Toda la información que se tiene sobre histología y fisiología nos permiten entender cómo funcionan las células en un ambiente considerado normal y el efecto que recae sobre ellas al recibir ciertos estímulos durante procesos patológicos. Las lesiones características de las enfermedades comienzan con alteraciones moleculares, que al final serán traducidas a cambios estructurales, con la aparición de sintomatología característica de la patología en cuestión.

Para llevar a cabo el análisis histopatológico en el presente estudio, se utilizaron ratones C3H/HeJ, los cuales fueron infectados con cepas representativas de *G. lamblia* de los genotipos A y B, capaces de infectar una gran variedad de mamíferos, incluidos a humanos y ratones; éstas fueron las cepas WB (genotipo A), GS (genotipo B). Por otra parte, el objetivo del estudio fue caracterizar la respuesta que el hospedero genera frente a la proteína inmunogénica 5G8 de *Giardia* (presente en la cepa GS-5G8 +). Primeramente, se lograron recuperar trofozoítos en intestino delgado de los ratones infectados. El primer resultado nos muestra que las cepas pertenecientes al genotipo B logran establecer infección a los 7 días. Esto concuerda con lo reportado por Byrd, 1994, en donde se utilizaron diferentes cepas de ratones, y éstos fueron infectados con diferentes dosis del parásito, observándose que aquellos que tienen deficiencias en el sistema inmune son más propensos a adquirir infección. Por otra parte, bajo condiciones similares, no se lograron recuperar trofozoítos en ratones infectados con el genotipo A. Se ha reportado que la cepa GS es más

patogénica y que WB tiene menor capacidad de establecer un proceso infeccioso (Adam, 2001), probablemente se deba a que la cepa GS cambia más rápidamente sus antígenos de superficie que la cepa WB (variación antigénica), evitando de esta manera, en parte, a la respuesta inmunológica del hospedero (Nash, 1990). Además, se observó una mayor carga parasitaria en duodeno de los ratones infectados, seguido del yeyuno, y finalmente, en íleon no se recuperaron trofozoítos. Esto se debe principalmente si tomamos en cuenta la anatomía y fisiología del intestino delgado, es en duodeno donde se lleva a cabo principalmente la absorción de nutrientes, comparándolo con yeyuno e íleon (Treuting y col., 2012; Tortora y Reynolds, 2009). Además, algunos conductos, tales como el colédoco o el conducto de Wirsung, secretan sustancias que son importantes para el crecimiento y proliferación de trofozoítos de *Giardia*. El colédoco desemboca en el duodeno y secreta bilis, un componente esencial para el crecimiento in vitro del parásito (Keister, 1983); mientras que el conducto pancreático libera enzimas que ayudan a digerir los alimentos, facilitando de esta manera, que los trofozoítos tengan acceso más disponible a los nutrientes.

Adicionalmente, se encontró una menor recuperación de carga parasitaria en el grupo de ratones infectados con la cepa GS-5G8+, comparada con la cepa GS (ambas pertenecientes al genotipo B). Esta diferencia pudiera deberse a que la presencia de la proteína esté jugando un papel importante durante el desarrollo del proceso infeccioso. Se ha reportado en estudios previos que la proteína 5G8 es altamente inmunogénica (Quintero y col., 2013; Quintero y col., 2017). Al tener capacidad de estimular el sistema inmunológico del hospedero, se esperaría que se desarrollen mecanismos efectores que tengan acción sobre los trofozoítos, provocando una disminución en la carga parasitaria, a tal grado que a los 14 días post-infección, prácticamente la infección fue aclarada, hecho que ha sido reportado en algunos estudios que afirman que la giardiasis es una enfermedad autolimitada y que se resuelve por si misma por en individuos inmunocompetentes. Por otra parte, en modelos animales se ha visto que tanto

las cargas parasitarias en intestino delgado, así como la expulsión de quistes tienden a tener un patrón intermitente a partir de las dos semanas después de haber sido expuestos al parásito, desapareciendo rastros del parásito hasta el día 30 (Belosevic y col., 1983; Amorim y col., 2010).

Para complementar esta parte del trabajo, se analizó la presencia del parásito mediante técnicas inmunohistoquímicas. Es por esto que se generaron anticuerpos policlonales específicos contra *G. lamblia* por medio de inoculación intraperitoneal de extracto proteico del parásito (de las cepas WB, GS y GS-5G8 +). Se encontró que a partir de la segunda semana post-inmunización, el suero de los ratones contenía anticuerpos en cantidad suficiente como para ser detectado por medio de un ELISA. Sin embargo, mediante microscopía óptica, no se detectaron trofozoítos de *G. lamblia* en cortes histológicos de mucosa intestinal de los ratones infectados con los dos genotipos. La baja carga parasitaria encontrada puede que no sea lo suficiente como para que logren detectar. Hay muchos factores que pueden influir para que un hospedero sea susceptible a adquirir la infección, tal como la virulencia del parásito, el estadio nutricional del individuo y su respuesta inmune en general (Faubert, 2000; Cotton y col., 2011; DuPont, 2013). Se ha visto que los ratones cuentan con mecanismos efectores para eliminar la infección (Jiménez y col., 2004), a diferencia de otros, tales como el modelo gerbil, que son altamente susceptibles a infectarse y presentan cargas parasitarias más elevadas (Ventura y col., 2013).

Posteriormente se evaluó el estado histopatológico de intestino delgado en ratones infectados con las diferentes cepas de *G. lamblia*. Debido a la discrepancia que existen en la manera de reportar cuantitativamente el daño patológico, se utilizó el sistema propuesto por el Grupo de Estandarización de la Asociación Veterinaria de Animales Pequeños del Mundo (WSAVA, por sus siglas en inglés) (Day y col., 2008). Se observó que las cepas de *G. lamblia* representativas de los genotipos A y B, así como la cepa que expresa a la proteína inmunogénica 5G8, fueron capaces de inducir inflamación aguda,

caracterizada por infiltración de tipo mononuclear en la lámina propia de la mucosa intestinal en los ratones infectados. Los ratones sin estímulo solamente presentaron un infiltrado basal considerado basal. Esto pone de manifiesto que, a pesar de la baja carga parasitaria, la respuesta inmune es activada. Además, en duodeno se observó acumulación de líquido intersticial en forma de edema. Fisiológicamente, esto es característico de un proceso inflamatorio de tipo agudo. Este mecanismo del hospedero es de los primeros eventos observados cuando existen patógenos que pudieran alterar la homeostasis. La principal función de esta acumulación de agua es la de llevar una mayor cantidad de células al sitio de infección.

Otro aspecto general evaluado en este estudio fue la determinación y cuantificación de células epiteliales especializadas en la producción de mucinógeno, que una vez excretada a la luz intestinal se convierte en mucina y al combinarse con agua forman al moco intestinal. Se ha propuesto que posiblemente uno de los mecanismos en los que el hospedero responde a la infección por *Giardia* es mediante la síntesis de moco, considerado uno de los primeros mecanismos de la respuesta innata que le hace frente a la infección. Contrario a lo esperado, las muestras de ratones infectados no presentaron diferencias con respecto al grupo control sin infección. Al encontrarnos en una etapa aguda de infección y aunado a esto, el bajo estímulo propiciado por la carga parasitaria no sea suficiente para lograr aún la hiperplasia de células caliciformes. En un estudio similar realizado en el grupo de trabajo, se observó que, a tiempos crónicos de infección a 28 días, existe una disminución en el número de células caliciformes en modelo murino (Domínguez, 2016). Se ha reportado que *Giardia* es capaz de evadir a este elemento de la inmunidad innata mediante la hidrólisis del moco intestinal (Kim y Khan, 2013; Amat y col., 2016). Así, de esta manera, el parásito puede asegurar más su supervivencia dentro del hospedero.

Una vez observado que existe acumulación de células durante la infección por *Giardia*, nos dimos a la tarea de caracterizar parcialmente a esta población

en lámina propia. Se hicieron ensayos de inmunohistoquímica para lograr esto. Estos análisis mostraron que principalmente la población infiltrada se debe a linfocitos B y linfocitos T CD4. En modelos animales, se ha visto que el infiltrado linfocitario es tanto, que incluso llega a alterar la forma de las vellosidades, principalmente afecta la anchura de éstas, en ratones infectados con el genotipo A de *Giardia* (Pavanelli y col., 2017). Estos datos son consistentes con lo que se ha encontrado en giardiasis crónica humana. Un estudio morfométrico que incluyó a individuos sintomáticos y no sintomáticos, infectados con el parásito, reportó diferentes grados de atrofia de las vellosidades, así como infiltrado linfocitario en la lámina propia, con la presencia de trofozoitos en la mucosa (Gra, 2011). Adicionalmente, Oberhuber y col., (2016) realizaron un estudio que incluyó a 11 pacientes de ambos sexos con diagnóstico de giardiasis crónica por medio de biopsias de íleon, se encontró principalmente un incremento de células plasmáticas y linfocitos en la mucosa.

Contrario a lo esperado, no se observó un aumento de macrófagos, células cebadas ni linfocitos T CD8 en las muestras de ratones infectados. A pesar de que se lograron identificar macrófagos en las muestras de ratones infectados, el número no difirió del grupo control. Por otro lado, no se logró la identificación de células cebadas. El bajo estímulo de trofozoitos y el hecho de que nos encontramos en una etapa aguda del proceso infeccioso pudiera ser una explicación de estos hechos, ya que se ha observado el papel que tienen los macrófagos durante la giardiasis, en donde se ha visto que éstos tienen participación tanto como en la inducción de la respuesta inmune (Fink y col., 2018), así como en la respuesta efectora (Li y col., 2018). Además, se ha observado que ratones deficientes en células cebadas presentan cargas parasitarias mayores, con respecto a aquellos que no lo son. Las células cebadas juegan un papel importante durante la infección por *Giardia*, al liberar citocinas como factor de necrosis tumoral alfa, que favorece a la fase aguda de la respuesta inflamatoria, al aumentar la permeabilidad vascular, el reclutamiento

celular y la activación de linfocitos (Li y col., 2004). Por otra parte, no se observaron linfocitos T CD8 en el estudio. La falta de daño patológico pudiera estar relacionado con este hecho. Se ha visto que los linfocitos T CD8 están implicados en la pérdida del área de superficie del borde del cepillo de la vellosidad intestinal, así como la reducción de actividad enzimática de la disacaridasa y el aumento de la relación cripta de Lieberkuhn y vellosidad (hiperplasia de glándulas intestinales) (Scott y col., 2004). La etapa aguda del proceso infeccioso puede estar relacionado con la falta de daño histopatológico.

Por último, una vez determinado que existen linfocitos B y T CD4 en el epitelio (cuya función favorece la respuesta humoral), nos dimos a la tarea de evaluar la respuesta inmune humoral tanto IgA local e IgG de manera sistémica. Se observó que existe un aumento en los niveles de IgA local en todos los grupos de infección. Esto es consistente con otros estudios, al ser *Giardia* un parásito intestinal, se estimula el epitelio lo suficiente como para obtener una respuesta inmune, en donde la IgA es la inmunoglobulina principal en intestino (Velazquez y col., 2005; Bartelt y Sartor, 2015).

En el presente trabajo encontramos que los ratones infectados con las cepas WB y GS no indujeron una respuesta IgG específica en suero con respecto al grupo control. Se ha observado que en infecciones por *Giardia*, la respuesta inmune sistémica no es estimulada (Faubert, 2000). Sin embargo, el grupo de ratones infectados con trofozoítos que expresaron altos niveles de la proteína 5G8 presentaron niveles elevados de anticuerpos sistémicos, comprobando así la inmunogenicidad de la proteína.

Aunado a esto, la respuesta inmune humoral presentada en los ratones infectados con la cepa GS-5G8 + se encuentra dirigida en parte a la proteína 5G8. Se observó que la IgG sistémica y la IgA local es capaz de reconocer a la proteína presente en la banda de 70 kDa, mientras que las otras muestras, control sin infección e infección con las cepas WB y GS que no expresan la proteína, no

reconocen a la proteína. Esto es consistente con lo reportado anteriormente en el grupo de trabajo, en donde la respuesta inmune de ratones infectados está dirigida hacia diferentes bandas de pesos moleculares, especialmente hacia la banda de 70 kDa (Velazquez y col., 2005; Quintero y col., 2013)

A pesar de que *Giardia* no provoca un daño a nivel histológico, es evidente que existe una respuesta inmune. Este es de los primeros trabajos en nuestro grupo de investigación que describe un análisis histopatológico y respuesta inmune de la infección por *Giardia* por diferentes genotipos, así como el efecto que tiene la proteína 5G8 en el en el modelo murino. Esto con el objetivo de conocer acerca de la relación hospedero-parásito.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, se llegaron a las siguientes conclusiones:

- La infección por *Giardia*, tanto por ensambles A como el B, no desencadenan diferentes alteraciones histopatológicas en mucosa intestinal, bajo las condiciones que se llevó a cabo el estudio.
- La infección por *G. lamblia* en el modelo murino C3H/HeJ induce un proceso inflamatorio agudo, caracterizado principalmente por la presencia de un infiltrado mononuclear en la zona efectora de la respuesta inmune de intestino delgado.
- El infiltrado mononuclear observado se debe a linfocitos B y T CD4+.
- La proteína 5G8 de *Giardia* es capaz de generar una respuesta inmune en el hospedero durante el proceso infeccioso.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, AK. Lichtman AH. (2012). Cellular and Molecular Immunology. 7a edición. Elsevier Science Editorial. pp 4.
- Adam, RD. (2000). The *Giardia lamblia* genome. International Journal of Parasitology; 30(4):475-84.
- Adam, RD. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. Clin. Microbiol Rev. Jul; 14(3):447-75.
- Adam, R. D., Nigam, A., Seshadri, V., Martens, C. A., Farneth, G. A., Morrison, H. G., Nash, T. E., Porcella, S. F., ... Patel, R. (2010). The *Giardia lamblia* vsp gene repertoire: characteristics, genomic organization, and evolution. *BMC genomics*, 11, 424. doi:10.1186/1471-2164-11-424.
- Amat, C. Jean-Paul Motta, Amol Bhargava, Kris Chadee, Andre Buret (2016). *Giardia duodenalis* Depletes Goblet Cell Mucins and Degrades MUC2, Facilitating Bacterial Translocation. The FASEB Journal vol. 29 no. 1 Supplement507.1.
- Amorim, D.A.O.Silva, E.A.Taketomi,, M.G.V.A.Morato, M.J.S.Mundim· D.P.Ribeiro· T.C.Oliveira, J.C.Viana, M.A.Gomes, M.C.Cury. (2010). *Giardia duodenalis*: Kinetics of cyst elimination and the systemic humoral and intestinal secretory immune responses in gerbils (*Meriones unguiculatus*) experimentally infected. Experimental Parasitology Volume 125, Issue 3, July 2010, Pages 297-303.
- Asociación de Médicos de Sanidad Exterior. (2012). Giardiasis. Epidemiología y situación mundial.
- Astiazarán-García, H., Quintero, J., Vega, R., Briceno, P., Oviedo, C., Rascon, L., y col. (2009). Identification of T-cell stimulating antigens from *Giardia lamblia* by using *Giardia*-specific T-cell hybridomas. [Article]. *Parasite Immunology*, 31(3), 132-139.

- Astiazarán, Humberto. (2000) Estudio experimental del efecto de la infección con *Giardia lamblia* sobre el estado nutricional del jerbo (*Meriones unguiculatus*). Tesis. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. Departamento de Patología Experimental.
- Austyn JM, Gordon S. (1981). F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol.* 11(10):805-15.
- Bartelt, L. A., & Sartor, R. B. (2015). Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. *F1000prime reports*, 7, 62. doi:10.12703/P7-62.
- Becerril, M. (2011) PARASITOLOGÍA MÉDICA. 3° ed. Mc Graw Hill. p. 58.
- Belosevic M, Faubert GM, MacLean JD, Law C, Croll NA. (1983). *Giardia lamblia* infections in Mongolian gerbils: an animal model. *J Infect Dis.* 147(2):222-6.
- Buret, AG. (2005). Immunopathology of giardiasis: the role of lymphocytes in intestinal epithelial injury and malfunction. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(Suppl. 1), 185-190.
- Buret, A. G. (2007). Mechanisms of epithelial dysfunction in giardiasis. *Gut*, 56(3), 316–317.
- Buret A, Gall DG, Olson ME. (1991) Buret, Growth, activities of enzymes in the small intestine, and ultrastructure of microvillous border in gerbils infected with *Giardia duodenalis*. *Parasitol Res.*;77(2):109-14.
- Byrd, L. G., Conrad, J. T., & Nash, T. E. (1994). *Giardia lamblia* infections in adult mice. *Infection and Immunity*, 62(8), 3583–3585.
- Cardona, N. Lora, F. Gómez, J. (2005). Estandarización del inmunoensayo ELISA para la detección de IgG anti-*Toxoplasma gondii* en ratón. *Parasitol Latinoam* 60: 97–101.
- Cebra JJ. (1999). Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am J Clin Nutr* 69:1046-51.

- Céu Sousa M., Goncalves C. A., Bairos V. A y col. (2001). Adherence of *Giardia lamblia* trophozoites to Int-407 human intestinal cells. Clin. Diag. Lab. Immunol. 8 (2): 258-265.
- Chacón, N y Jiménez, J. (2010). Giardiasis como causa de diarrea en el viajero. Ant e Inf; Vol 16, N° 1-4, pp. 15-24.
- Chaudhuri, P. P, Das, Sarkar, S. y Munoz, M. L. (1997). Biochemical and immunological characterization of soluble antigens of *Giardia lamblia*. Parasitology Res. 83: 604-10.
- Cotton James, Jennifer K.Beatty, Andre G.Buret. (2011). Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. International Journal for Parasitology. Volume 41, Issue 9, Pages 925-933.
- Eckman, L. (2003). Mucosal defences against *Giardia*. Parasite Immunology 25; 259-270.
- Estay, A. Parra, R. Benítez, H. (2008). Procesamientos histológicos. Convencional y en microondas: comparación histológica, histoquímica e inmunohistoquímica. Int. J. Morphol., 26 (2): 317-324.
- Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. (1998). Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. Microbiol Mol Biol Rev 62:1157-70.
- Faubert G. Immune response to *Giardia duodenalis*. Clinical Microbiology Reviews 2000; 13: 35-54.
- Ferrufino, J. Taxa, L. Gladis, A. (1996). Histología normal de intestino delgado. Rev Med Hered; 7:46-57
- Figuroa Ojeda, D. C y Granados López, A. J. (2003). Evaluación de la respuesta immune humoral sistémica durante la infección intestinal por *Giardia lamblia* en un modelo murino. Tesis de licenciatura. Universidad de Sonora.
- Finch, G. R., Black, E. K., Labatiuk, C. W., Gyürék, L., & Belosevic, M. (1993). Comparison of *Giardia lamblia* and *Giardia muris* cyst inactivation by ozone. Applied and Environmental Microbiology, 59(11), 3674–3680.

- Geneser, F. (2001). Histología. 3era edición. Editorial Médica panamericana. p. 498.
- Gottstein B, Harriman GR, Conrad JT, Nash TE. (1990). Antigenic variation in *Giardia lamblia*: cellular and humoral immune response in a mouse model. *Parasite Immunol* 12: 659-673.
- Gottstein, B y Nash, T.E. (1991). Antigenic variation in *Giardia lamblia*: infection of congeniality athymic nude and scid mice. *Parasite immunology*. 13: 649-59.
- Herbert L. DuPont (2013). *Giardia*: both a harmless commensal and a devastating pathogen. *J Clin Invest*. 123(6): 2352–2354.
- Hill DR. and Pearson RD. Ingestion of *Giardia lamblia* trophozoites by human mononuclear phagocytes. *Infection and Immunity* 1987; 55: 3155-3161.
- Hoshino, K. Takeuchi, O. Kawai, T. Sanjo, H. Ogawa, T. Takeda, Y. Takeda, K. Akira, S. (1999) Cutting Edge: Toll-Like Receptor 4 (TLR4)-Deficient Mice Are Hyporesponsive to Lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps Gene Product. *The Journal of Immunology* vol. 162 no. 7 3749-3752
- Iñigo, G., Méndez, R., Quihui, L., Velázquez, C., Garibay, A., Cannet, R., Astiazarán, H. (2013). Effects of dietary Zinc manipulation on growth performance, Zinc status and immune response during *Giardia lamblia* infection: a study in CD-1 mice. *Nutrients*. 5(9):3447-60.
- Jerlström-Hultqvist, J., Ankarklev, J., & Svärd, S. G. (2010). Is human giardiasis caused by two different *Giardia* species? *Gut Microbes*, 1(6), 379–382. doi:10.4161/gmic.1.6.13608.
- Jiménez, J. C., Fontaine, J., Grzych, J. M., Dei-Cas, E., & Capron, M. (2004). Systemic and mucosal responses to oral administration of excretory and secretory antigens from *Giardia intestinalis*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 11(1), 152-60.

- Kanagawa O, Militech A, Vaupel BA. Regulation of diabetes development by regulatory T cells in pancreatic islet antigen-specific TCR transgenic nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 2002; 168:6159–64.
- Keister, D. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. (1983). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 77:487-488.
- Kim, J. J., & Khan, W. I. (2013). Goblet Cells and Mucins: Role in Innate Defense in Enteric Infections. *Pathogens*, 2(1), 55–70.
- Labatiuk, C. W., Schaefer, F. W., Finch, G. R., & Belosevic, M. (1991). Comparison of animal infectivity, excystation, and fluorogenic dye as measures of *Giardia muris* cyst inactivation by ozone. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(11), 3187–3192.
- Langford, D. Housley, M. Boes, M. Chen, J. Kagnoff, M. Gillin, F. Eckmann. (2002). Central Importance of Immunoglobulin A in Host Defense against *Giardia spp.* *Infection and Immunity*. Vol. 70, 0019-9567.
- Lee, H. Kim, H. Noh, H. Park, S. (2014). *Giardia lamblia* binding immunoglobulin protein triggers maturation of dendritic cells via activation of TLR4-MyD88-p38 and ERK1/2 MAPKs. *Parasite Immunology* 36, 627–646.
- 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), 6642-9.
- Li L, Li X, Li G, Gong P, Zhang X, Yang Z, Yang J, Li J. Mouse macrophages capture and kill *Giardia lamblia* by means of releasing extracellular trap. *Dev Comp Immunol.* 88:206-212.
- López, G. Quintero, J. Astiazarán, H. Velázquez, C. (2015). Host defence against *Giardia lamblia*. *Parasite immunology.* 37, 8; 394-406.
- Luján. H. (2006). *Giardia y giardiasis*. *Medicina*, Buenos Aires, 66, 70-74.
- Luján HD & Svärd S. *Giardia A Model Organism*. Austria, Springer Wein NewYork, 2011: 1–417.

- Marc Y. Fink, Jenny G. Maloney and Steven M. Singer. (2018). Myeloid Cells in the Immune Response to *Giardia*. J Immunol 200 (1 Supplement) 52.12.
- Montagne, L., R. Toullec, and J. P. Lallès. (2000). Calf intestinal mucin: isolation, partial characterization, and measurement in ileal digesta with an enzyme-linked immunosorbent assay. J. Dairy Sci. 83:507-517.
- Murphy, K. Traver, P. Walport, M. Inmunobiología de Janeway. Séptima edición. Editorial Mc Graw Hill. p56.
- Nash, T.E., Herrington, D.A., Levine, M.M., Conrad, J.T. y Merritt, J.W. Jr. 1990. Antigenic variation of *Giardia lamblia* in experimental human infections. J. Immunol. 144, 4362–4369.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Oberhuber, G. Kastner, N. Stolte, M. (1997). Giardiasis: a histologic analysis of 567 cases. Scand J Gastroenterol; 32(1): 48-51
- Oberhuber, G. Mesteril, I. Kopf, W. Muller, H. Demonstration of trophozoites of *G. lamblia* in ileal mucosal biopsy specimens may reveal giardiasis in patients with significantly inflamed parasite-free duodenal mucosa. (2016) Am J Surg Pathol Vol 40- Issue 9: 1280-1285.
- Olson ME. (1991). Growth, activities of enzymes in the small intestine, and ultrastructure of microvillous border in gerbils infected with *Giardia duodenalis*. Parasitol Res. 77(2):109-14.
- Ouellette, AJ. (2005). Paneth cell alpha-defensins: peptide mediators of innate immunity in the small intestine. Springer Semin Immunopathol. 27(2):133-46.
- Oviedo Mora Carlos Alberto y Briceño Durán Jesús Pedro. (2007). Identificación de antígenos inmunodominantes de *Giardia lamblia* capaces de inducir la activación de hibridomas de células T. Tesis de licenciatura. Universidad de Sonora.

- Pavanelli MF, Colli CM, Gomes ML, Góis MB, de Alcântara Nogueira de Melo G, de Almeida Araújo EJ, de Mello Gonçalves Sant'Ana D. (2018). Comparative study of effects of assemblages All and BIV of *Giardia duodenalis* on mucosa and microbiota of the small intestine in mice. *Biomed Pharmacother.* 101:563-571.
- Pavanelli, Wander Rogério, Gutierrez, Fredy Roberto Salazar, Silva, Jean Jerley Nogueira da, Costa, Ivete Conchon, Menezes, Maria Claudia Noronha Dutra de, Oliveira, Francisco José de Abreu, Itano, Eiko Nakagawa, & Watanabe, Maria Angélica Ehara. (2010). The effects of nitric oxide on the immune response during giardiasis. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 14(6), 606-612.
- Piper M. Treuting, Suzanne Dintzis, Denny Liggitt and Charles W. Frevert (2012). *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas.*, Pages 155–175. ISBN: 978-0-12-381361-9.
- Quintero, J. Caracterización química e inmunológica de antígenos de *Giardia lamblia* que inducen una respuesta inmunológica de tipo celular. (2008). Tesis de Maestría. Universidad de Sonora.
- Quintero, J., Figueroa, D. C., Barcelo, R., Brecci, L., Astiazaran-Garcia, H., Rascón, L., y col. (2013). Identification of an immunogenic protein of *Giardia lamblia* using monoclonal antibodies generated from infected mice. [Article]. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(5), 616-622.
- Quintero, J. Valdez, A. Samaniego, B. Lopez-Romero, G. Astiazaran-Garcia, H. Rascon, L. Brecci, L. Garibay-Escobar, A. Robles-Zepeda, R. Velazquez, C. (2017). Isolation and partial characterization of an immunogenic antigen of *Giardia lamblia*. *Parasitology International*. Volume 66, Issue 3, Pages 324-330.
- Ramiro-Puig E., Pérez-Cano F. J., Castellote C., Franch A., Castell M. (2008). El intestino: pieza clave del sistema inmunitario. *Rev. esp. enferm. Dig.* 100(1): 29-34.

- Rascón Durán, M. L. (2008). Caracterización bioquímica parcial de antígenos inmunodominantes de *Giardia lamblia* capaces de inducir una respuesta inmune humoral en un modelo Murino. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias Químico-Biológicas. Hermosillo, Sonora, México.
- Rascón Durán, M. L. (2002). Estandarización de metodologías bioquímicas e inmunológicas para evaluar la respuesta inmune humoral durante la infección intestinal por *Giardia lamblia* en el ratón C3H/HeJ. Trabajo práctico de Especialidad en Inmunohematología diagnóstica. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias Químico-Biológicas. Hermosillo, Sonora, México.
- Rivero, F. Saura, A. Prucca, C. Carranza, P. Torri, A. Luján, H. (2010). Disruption of antigenic variation is crucial for effective parasite vaccine. *Nature medicine* 16(5): 551-557.
- Samaniego Soto, B. G. (2014). Evaluación de la capacidad protectora del anticuerpo monoclonal 5G8.B5 durante la infección intestinal por *Giardia lamblia* en un modelo gerbil. Tesis de licenciatura. Universidad de Sonora.
- Scott KGE, Logan MR, Klammer GM, Teoh DA, Buret AG 2000. Jejunal brush border microvillous alterations in *Giardia-muris*-infected mice: role of T lymphocytes and interleukin-6. *Infect Immun* 68: 3412-3418.
- Serradell MC, Gargantini PR, Saura A, Oms SR, Rupil LL, Berod L, Sparwasser T, Luján HD (2018). Cytokines, Antibodies, and Histopathological Profiles during *Giardia* Infection and Variant-Specific Surface Protein-Based Vaccination. *Infect Immun*. 22;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), 170–175.
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. (2009). Descripción y comportamiento de las enfermedades de notificación semanal.

- Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/Dirección General de Epidemiología/SSA. (2013). Incidencia de Giardiasis por grupos de edad. Estados Unidos Mexicanos. Población General.
- Staffan G. Svard, Per Hagblom and J.E. Daniel Palm. *Giardia lamblia* a model organism for eukaryotic cell differentiation. FEMS Microbiology Letters 2003; 218, 3-7.
- Syed, A. Hill, D. (2003). *Giardia intestinalis*. Current opinion in infectious diseases. 16: 453-460.
- J.R. Turner (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. Nat. Rev. Immunol.,9, pp. 799–809.
- Tortora, G. Reynolds, S. (2009). Principios de anatomía y fisiología. 11va edición. Editorial panamericana. p. 828.
- Troeger H, Eppler HJ, Schneider T, Wahnschaffe U, Ullrich R, Burchard GD, Jelinek T, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. (2007). Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. Gut ;56(3):328-35.
- Valencia Peña, M. L. (2013). Evaluación de la respuesta inmune humoral inducida por trofozoítos de *Giardia lamblia* de las cepas 5G8 (+) y GS/M-83-H7 en un modelo de infección murino. Tesis de licenciatura. Universidad de Sonora.
- Vargas, J. Mata, B. Hernández, M. Garza, J. De la Garza, L. González, F. (2014) "Modified PEHPS Medium as an Alternative for the In Vitro Culture of *Giardia lamblia*," BioMed Research International, vol. 2014, Article ID 714173, 4 pages, 2014. doi:10.1155/2014/714173.
- Vázquez Tsuji, Oscar; Campos Rivera, Teresita. (2009). Giardiasis. La parasitosis más frecuente a nivel mundial. *Revista del Centro de Investigación. Universidad La Salle*, Enero-Junio, 75-90.

- Vega, L., Alvarez, L., Ramo, G. y Bernal, R. M. (1982). Absorción de proteínas en niños con giardiasis. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. México: Medigraphic, no. 39, pp. 19-22.
- Ventura, L. Oliveira, D. Viana, J. Santos, J. Caliari, M. Gomes, M. (2013). Impact of protein malnutrition on histological parameters of experimentally infected animals with *Giardia lamblia*. *Experimental Parasitology* Volume 133, Issue 4, 369-486.
- Velázquez, C. Beltrán, M. Ontiveros, N. Rascón, L. Figueroa, C. (2005) *Giardia lamblia* induces different secretory and systemic antibody responses in mice. *Parasite Immunology*. 27, 351:356.
- Von Allmen, N., Bienz, M., Hemphill, A., & Müller, N. (2004). Experimental Infections of Neonatal Mice with Cysts of *Giardia lamblia* Clone GS/M-83-H7 Are Associated with an Antigenic Reset of the Parasite. *Infection and Immunity*, 72(8), 4763–4771. doi:10.1128/IAI.72.8.4763-4771.

ANEXOS

Anexo 1: Cultivo de *Giardia lamblia*

Materiales y Equipo

- Incubadora a 37 °C
- Tubos de ensayo 13x100 mm con tapón de rosca estériles
- Pipetas serológicas de 10, 5 y 1 mL
- Pipetor (Drummond Broomal, Scientific CO)
- Mechero de alcohol
- Sistema de filtración (Steril aseptic system, Millipore, Bradfore MA01730)
- Filtros de poro 0.45 µm
- Campana de flujo laminar (Purifier class II biosafety cabinet, Delta series, LABCONCO)

Reactivos

Medio de cultivo TYI-S-33

- Tripticasa..... 20 g
(BBL Trypticase Peptone Pancreatic Digest of Casein, BD 211921, 445 g, LOT 0097483)
- Extracto de levadura..... 10 g
(Bacto Yeast Extract Technical BD 288620, 500 g, LOT 0055682)
- Dextrosa..... 10 g
(D-(+)-Dextrose SigmaD 9434, 500 g, Batch #108K0014)
- NaCl..... 2 g
Sigma 5-5886
- L-Cisteína..... 2 g
(L-Cysteine Hydrochloride Monohydrate from non-animal Source)
Sigma C6852-1006 Batch #019K10362

- Fosfato de sodio dibásico..... 1 g
Sigma S0876-1Kg Batch #05K0040
- Fosfato de sodio monobásico..... 0.6 g
Sigma S0751-500 g Batch #067K0110
- Bilis..... 0.6 g
(Bile from Bovine and Ovine) Sigma B831-1006 Batch #098K0012
- Ácido ascórbico..... 0.1 g
(L-Ascorbic Acid) Sigma A5960-25 g, Batch #065K0181
- Citrato férrico amoniacal..... 0.023 g

Estas cantidades son para preparar 1 L de medio TYI-S-33, para ello se disuelven los reactivos en 900 mL de agua milli-Q, se ajusta el pH de la solución a 6.9 con hidróxido de sodio (3 N). En campana de flujo laminar, agregar 1 mL de antibiótico Ceftriaxona (100 µg/mL, IM, 1 g. Roche). Suplementar al 10% con suero de ternera recién nacida (NBCS. GIBCO. Invitrogen 16010, inactivado a 56 °C por 30 minutos). Filtrar en un sistema con motor al alto vacío con filtro de 0.45 µm.

Nota: pasar aproximadamente de 2 a 3 mL de medio recién filtrado a un tubo cónico de 15 mL para prueba de esterilidad. Incubar a 37 °C para prueba de esterilidad por dos días. El resto del medio guardar en refrigerador a 4 °C hasta su uso.

Método de cultivo

- Colocar 7.5 mL TYI-S-33 suplementado al 10 % con NBCS en un tubo de ensayo 13x100 mm.
- Adicionar 0.5 mL de cultivo confluyente de *G. lamblia* ($\approx 5 \times 10^5$ trofozoítos).
- Colocar tubo en incubadora a 37 °C.

Anexo 2: Tinción Superficial de Trofozoítos de *G. lamblia*

Soluciones:

PBS 1X, pH 7.2 frío.

PBS-BSA 0.1 % (BSA Sigma Aldrich A2153)

Paraformaldehído 2 % (Sigma P6148)

Procedimiento:

1. Lavar cultivo confluyente de *Giardia* (2 veces) con PBS frío (1800 rpm, 4 °C, 7 minutos en placa de fondo “v”)
2. Incubar a 4 °C por 1 hora con el AcMo 5G8.B5 (1 µg/mL) o con el control de isotipo aBDC.2 (IgG2b, 1 µg/mL).
3. Lavar 2 veces con PBS frío.
4. Incubar los trofozoítos por 1 hora a 4 °C con el anticuerpo anti-ratón IgG de cabra conjugado con FITC (diluido a 1:200 con PBS-BSA 0.1 %). (Sigma F9512)
5. Lavar 2 veces con PBS frío.
6. Analizar la expresión de la proteína 5G8 por medio de un citómetro de flujo Becton Dickinson (Canto II FACS, CA, USA).

Anexo 3: Obtención de Proteínas Solubles de *Giardia lamblia*

Reactivos

Solución reguladora de fosfatos 10X, pH 7.2

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

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

Inhibidores de proteasas (4-(2-aminoetil) bencenosulfonilfluoruro (AEBSF), bestatina, leupetina, pepstatina A, E-64 y 1,10-fenantrolina., Sigma P8340)

Método

- Colocar cultivo confluyente de *G. lamblia* en un baño de agua-hielo por 20 minutos, lo cual permitirá que los trofozoítos adheridos al vidrio del tubo se despeguen.
- Juntar los cultivos en tubos cónicos de 50 mL.
- Lavar por 3 ocasiones los tubos de cultivo con 1 mL de PBS 1X y juntar con los cultivos en los tubos cónicos. Centrifugar (Maraton 3000r, Fisher Scientific) a 1800 rpm por 10 minutos a 4 °C y descartar sobrenadante.
- Lavar los trofozoítos por 2 ocasiones con 10 mL de PBS 1X y resuspender en 1 mL de PBS 1X y colocar en microtubos de 1.5 mL, adicionar 5 µL de inhibidores de proteasas. (Se recomienda hacer conteo en cámara de Neubauer con azul de tripano para revisar viabilidad celular)
- Lisar las células sometiendo el microtubo a congelación (Thermo Fisher Scientific model 703) y descongelación a -80 °C temperatura ambiente respectivamente (repetir 4 veces).

- Sonicar 30 ciclos/s por 2 minutos. Repetir 2 veces más.
- Centrifugar a 10,000 xg por 15 minutos a 4 °C y coleccionar el sobrenadante (proteína soluble).
- Cuantificar proteína mediante el micrométodo de Bradford.
- Almacenar el extracto antigénico en congelación a -80 °C hasta su uso.

Anexo 4: Determinación de Proteína por el Micrométodo de Bradford

Reactivos

- Reactivo de Bradford (Sigma B-6916)

Material y Equipo

- Microtubos de 1.5 mL
- Micropuntas de 1 y 100 μ L
- Micropipetas
- Placa de 96 pozos de fondo plano
- Lector de microplacas con filtro de 570 nm (Multiskan EX, Thermolabsystem)

Método

- Preparar diluciones seriadas a partir de un estándar de albúmina (BSA, Biorad, Quick Start Bradford Protein Assay Kit 1 #500-0201) a una concentración de 2 mg/mL en PBS 1X. Obtener las siguientes concentraciones en mg/mL: 1, 0.5, 0.25 y 0.125.
- Adicionar 5 μ L de la solución de BSA, de la muestra problema y del control negativo de PBS en los pozos de la placa por triplicado.
- Adicionar por pozo, 250 μ L del reactivo de Bradford, incubar por 15 minutos a temperatura ambiente y medir la densidad óptica en un lector de microplacas a 570 nm.
- Graficar la curva de calibración de BSA y obtener la ecuación de la recta, así como su coeficiente de correlación lineal.
- Obtener la concentración de la muestra problema.

Anexo 5: Generación de Anticuerpos policlonales: Inmunización de Animales de Experimentación

Reactivos

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

Materiales y Equipo

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

Método

- Para la inmunización inicial, administrar 230 μg de proteína soluble por vía intraperitoneal con ayuda de una jeringa (200 μL). El antígeno está en presencia de Adyuvante completo de Freund (100 μL de antígeno + 100 μL de adyuvante, Mezclar con vortex antes de administrar el antígeno).
- Para las inmunizaciones siguientes (5 a 6 semanas), repetir el procedimiento del punto anterior. Sustituir por Adyuvante Incompleto de Freund.
- Antes de cada inmunización, obtener muestras de suero:
 1. Limpiar la punta de la cola de ratones con una torunda impregnada de etanol al 70 % y permitir secar.
 2. Con una navaja de un filo, cortar la punta de la cola y recoger las gotas de sangre en un microtubo de 1.5 mL.

3. Dejar reposar las muestras de sangre por 30 minutos y posteriormente centrifugarlas en una microcentrifuga (Labnet Spectrafuge 7M) a 1000 xg por 10 minutos.
4. Extraer el suero de las muestras y mantenerlos a -80 °C hasta su uso.

Anexo 6: Evaluación de Título de Anticuerpos Específicos: Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (ELISA) Indirecto

Reactivos

Soluciones reguladoras para ELISA

- Solución reguladora de citratos pH 4.2
 - Ácido cítrico: 3.2 g
 - KH_2PO_4 : 3.2 g
 - Adicionar 200 mL de agua desionizada, ajustar pH a 4.2 con NaOH.
 - Aforar a 250 mL con agua desionizada
- Solución reguladora de carbonatos pH 9.6
 - Na_2CO_3 : 0.795 g
 - NaHCO_3 : 1.465 g
 - Adicionar agua desionizada hasta un volume de 400 mL, ajustar pH a 9.6. Aforar a 500 mL con agua desionizada.
- Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 (PBS 10X)
 - Fosfato de sodio dibásico: 12 g
 - Fosfato de sodio monobásico: 1.9 g
 - NaCl: 85 g
 - Disolver en 800 mL de agua desionizada, ajustar pH a 7.2 con un potenciómetro (HANNA Instruments. pH 211) y aforar a 1000 mL con agua desionizada. Para preparar PBS 1X, diluir 1:10 con agua desionizada.
- Solución de lavado
 - PBS 1X/Tween-20 (0.05 %). A 1 L de PBS 1X, adicionar 0.5 mL de Tween-20
- Solución bloqueadora
 - PBS 1X/BSA 1 %. Disolver 0.1 g de BSA en 10 mL de PBS 1X.
- Solución ABTS
 - ABTS: 137 g

Solución reguladora de citratos: 250 mL

- Solución reveladora
A 10 mL de ABTS adicionar 10 μ L de H₂O₂ al 30 %

Material y Equipo

- Lector de microplacas con filtro de 415 nm
- Agitador horizontal con capacidad mínima de 50 rpm
- Micropipetas
- Vórtex

Método

- Adsorber a los pozos de la placa de ELISA, 2.5 μ g de extracto de proteínas antigénicas, o 0.5 μ g de proteína 5G8 en 50 μ L de solución reguladora de carbonatos pH 9.6 por pozo.
- Incubar por una hora a 37 °C o toda la noche a 4 °C.
- Lavar cada pozo de la placa con 250 μ L de PBS 1X-Tween 20 (0.05 %), 5 veces.
- Llenar cada pozo con 50 μ L de solución bloqueadora (PBS 1X-BSA 1 %), incubar una hora a temperatura ambiente y en constante rotación.
- Lavar cada pozo de la placa con 250 μ L PBS 1X pH 7.2-Tween 20 (0.05 %), 5 veces.
- Adicionar 50 μ L del primer anticuerpo. Para muestra de suero de ratones infectados, hacer dilución 1:10 con PBS-BSA 0.1 %; para muestras de heces, adicionar 200 ng de IgA total. Incubar una hora a temperatura ambiente y en constante rotación.
- Lavar cada pozo de la placa con 250 μ L PBS 1X pH 7.2-Tween 20 (0.05 %), 5 veces.
- Adicionar 50 μ L del segundo anticuerpo (anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa diluido 1:1000 para determinar IgG

específica; anticuerpo de cabra anti-IgA de ratón conjugado a peroxidasa 133 ng/mL para determinación de IgA específica). Incubar una hora a temperatura ambiente y en constante rotación.

- Lavar cada pozo de la placa con 250 μ L PBS 1X pH 7.2-Tween 20 (0.05 %), 5 veces.
- Adicionar 50 μ L de solución reveladora.
- Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Medir la densidad óptica a 415 nm en el lector de ELISA.

Anexo 7: Infección de Animales de Experimentación

Reactivos

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

Método

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

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

Anexo 8: Disección de Ratones y Recuperación de Trofozoítos de *G. lamblia* de Intestino Delgado

Material y Reactivos

- Formol 10 % pH 7.0 (Sigma F1635)
- Etanol 70 % (Fermont 06065)
- Equipo de disección estéril (pinzas y tijeras)
- Cama de hielo seco
- Alfileres
- Medio TYI o PBS
- Vaso de plástico de boca ancha con tapa

Método

- Someter a los ratones de 6 a 9 horas de ayuno, esto con el fin de evitar contaminación con restos de alimento en el intestino.
- Sacrificar a los ratones por medio de dislocación cervical, de acuerdo a la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Con ayuda de los alfileres, clavar al ratón en la cama de hielo seco y limpiarlo con etanol al 70 %.
- Utilizar el equipo de disección para obtener los 35 cm de intestino delgado.
- Diseccionar duodeno (5 cm), yeyuno (10 cm) e ileon (20 cm). Tomar un cm de cada sección y colocarlos en formol 10 %.

Los cm restantes de intestino serán utilizados para la recuperación de trofozoítos.

- En frascos pequeños de color ámbar con tapón de rosca estériles, adicionar 2 mL de medio TYI (se puede utilizar PBS 1X)

- A una caja Petri estéril, adicionar 1 mL de medio TYI y sumergir la muestra de intestino.
- Con ayuda de las pinzas y tijeras, realizar un corte longitudinal en el intestino.
- Colocar la muestra dentro del frasco ámbar.
- Con ayuda de una micropipeta, pasar el mL de la caja Petri al frasco.
- Mantener en un rotador por una hora a 4 °C.
- Transferir el medio a un tubo falcon estéril de 15 mL.
- Centrifugar a 1800 rpm a 4 °C por 7 minutos.
- Descartar sobrenadante y resuspender en 1 mL de PBS 1X y colocar en agua-hielo.
- Realizar conteo en cámara de Neubauer, realizando una dilución adecuada con PBS 1X y azul de tripano.

Anexo 9: Evaluación de la Proliferación y Viabilidad Celular Utilizando Cámara de Neubauer

Equipo

- Campana de flujo laminar (Purifier Class II Biosafety Cabinet, delta series, LABCONCO)
- Microscopio Invertido (Leica)
- Microscopio Óptico (Leica)

Equipo Auxiliar

- Puntas estériles para micropipeta Micropipeta de volumen variable de 100-1000 μ L.
- Micropipeta de volumen variable de 2-20 μ L.
- Cámara de Neubauer bright light hemacytomether (Hausser scientific)
- Tubos eppendorf de 1.5 mL.
- Azul de tripán (SIGMA. T8154)
- Gradilla para tubos eppendorf

Procedimiento

- Tomar un tubo de cultivo y observarlo al microscopio invertido: descartando si hay contaminación y verificando el estado del cultivo celular.
- Desprender las células adheridas a la superficie del tubo en agua con hielo por 10 minutos.
- Se transfiere el contenido del tubo de cultivo a un tubo cónico de 15 mL.
- Se centrifugan a 800 xg por 10 minutos a 4° C. Se decanta el sobrenadante.
- Se resuspende el pellet en 1 mL de medio TYI-S33 limpio.

- Con ayuda de una micropipeta, se toman 5 μL se y agregan a un microtubo al cual previamente se le agregaron 95 μL de colorante azul de tripán obteniendo así una dilución 1:20 (factor dilución).
- Se agita el contenido del tubo eppendorf con una micropipeta, y se toman 10 μL para ser analizados en el hematocitómetro dejando que la suspensión celular fluya por debajo del cubreobjetos hasta llenar el área de la cuadrícula, evitando que se derrame o entren burbujas en el área de conteo, si esto sucede, montar la cámara de nuevo.
- Una vez montada la cámara dejarla reposar por unos segundos permitiendo que las células se asienten y se observen en el mismo plano.
- Posteriormente se inicia el conteo de las células contenidas en los 4 cuadrantes. Para conocer la viabilidad celular se empleará el colorante azul de tripán. Este es un colorante que penetra a las células muertas es decir a las células no viables tiñéndolas de color azul; permitiendo distinguir entre las células viables que no son teñidas.
- El porcentaje de viabilidad se calcular de la siguiente manera:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{Número de células viables contadas} \times 100}{\text{Total de células contadas} / \text{Número de células totales}}$$
- La proliferación se evaluará con el uso de la siguiente fórmula:

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

Anexo 10: Procesamiento de Tejido Intestinal

Reactivos

- Formol 10 % pH 7.0
- Etanol 80, 96 y 100 %
- Parafina histológica Sigma 327212

Materiales y Equipo

- Cassetes y moldes
- Embebedor de parafina
- Horno a 65 °C

Método

- La muestra a ser procesada debe de permanecer como máximo 2 días en formol 10 % tamponado a pH 7.0 para fijar el tejido.
- Depositar la muestra en cassetes.
- Deshidratar las muestras en los siguientes baños de etanol por una hora: inmersión en etanol 80 %, 96 %, 3 de 100 %
- Sumergir en dos baños de etanol 100 %-xilol (1 + 1) por una hora cada uno.
- Aclarar la muestra en 3 baños de xilol por una hora cada uno.
- Incluir en dos baños de parafina de dos horas cada uno a 65 °C.
- Con ayuda de un embebedor de parafina, realizar los bloques con las muestras.
- Dejar solidificar y guardar los bloques en refrigeración a 4 °C hasta su uso

Anexo 11: Silanización de Laminillas

Reactivos

- 3-aminopropyltrimethoxysilano Sigma 440140
- Acetona Sigma 179124

Materiales y Equipo

- Laminillas
- Campana de extracción

Método

- Lavar portaobjetos con agua caliente y detergente.
- Enjuagar con agua destilada.
- Lavar con alcohol ácido (99 mL alcohol etílico 100% + 1 mL HCl 1 N).
- Secar porta por porta con papel o dejar que se sequen al aire.
- Lavar en acetona.
- Sumergir las laminillas en solución de silano (10 mL de silano + 490 mL de acetona) por 2 minutos.
- Secar por 12 horas a temperatura ambiente.
- Mantener las laminillas en un lugar seco y oscuro.

Esto es para preparar 500 laminillas.

Anexo 12: Microtomía Tipo Minot

Material y Equipo

- Microtomo
- Cuchillas
- Laminillas silanizadas
- Baño de flotación

Método

- Colocar el bloque de parafina en su sección correspondiente.
- Programar el baño de flotación a 45 °C. Usar agua destilada (Se puede sustituir con agua de la llave siempre y cuando se caliente a ebullición y se le agregue 5 mL de HCl 1 N, esto para 1 L).
- Realizar cortes con un grosor de 3 μm .
- Colocar la muestra cortada en una laminilla y aplicar etanol 50 % para extender el tejido.
- Depositar la muestra en baño de flotación hasta la extensión máxima del tejido, cuidando que el baño no tenga burbujas.
- Recolectar la muestra con una laminilla silanizada, teniendo cuidado de que no queden burbujas en la muestra.
- Escurrir el exceso de agua y dejar secar toda la noche a 40 °C.

Anexo 13: Prueba de Tinción Inmunohistoquímica de Trofozoitos de *G. lamblia* en Intestino Delgado de Animales Infeccionados

Reactivos

- Xilol
- Etanol
- Solución de H₂O₂ a 3% (en metanol) JT. Baker 2186-03
- PBS 1X
- Suero preinmune de cabra
- Anticuerpos policlonales anti-*G. lamblia*
- Anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa Sigma 07812
- DAB, diaminobencidina

Método

- Desparafinar laminillas silanizadas con secciones de intestino embebido en parafina. Éstas se colocaron en horno a 60 °C toda la noche anterior.
- Rehidratar el tejido en los siguientes baños:

Solución	Tiempo de incubación (min)
Xilol	6
Xilol	6
Alcohol 100%	5
Alcohol 95%	5
Alcohol 80%	5
Agua destilada o desionizada	3

- Incubar con solución de H₂O₂ 3% durante 5 min a temperatura ambiente, para inhibir la peroxidasa endógena del tejido (Blocking peroxidasa kit Hercep Test)
- Lavar las laminillas, sumergirlas en PBS durante 3 min
- Bloquear los sitios de unión inespecíficos del tejido con suero preinmune al 10 % de cabra (kit Invitrogen).
- Lavar con PBS (solo agitación para eliminar exceso de suero no inmune 10% cabra)
- Incubar de las secciones con 100 µL solución de suero (ratón) de anticuerpos policlonales de anti-*G. lamblia* en diferentes diluciones con PBS 1X durante 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- Lavar las laminillas con PBS 2 veces por 3 min.
- Incubar con 100 µL solución de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (1:1000 en PBS) conjugado con peroxidasa durante 1 hora.
- Lavar las laminillas con PBS 2 veces por 3 min.
- La detección del color se realiza empleando 0.05% de diaminobencidina y 0.2% de solución H₂O₂, agregar 100 µL de solución cromógeno DAB, incubar por 10 minutos. Kit Hercep Test
 - Preparación de DAB
 - Transferir 1 mL de DAB Buffered Substrate del Vial 5 a un criovial, agregar una gota (25-30 µL) de DAB cromógeno del vial 6.
 - Mezclar y aplicar al tejido con una pipeta.
- Lavar las laminillas con PBS 2 veces por 3 min (agitar laminilla en PBS antes de reposar).
- Contrateñir el tejido con Hematoxilina, incubar de 5 minutos. Posteriormente lavar con un baño de agua destilada o desionizada de 3 min.
- Deshidratar las laminillas en los siguientes baños:

Solución	Tiempo de incubación (min)
Agua desionizada	3
80%	3
96%	3
100%	3
Xilol	6

- Sacar laminillas de xilol, quitar exceso en zonas libres de tejido, agregar medio de montaje sobre tejido y cubrir con cubreobjetos, deslizará fácilmente con ayuda del xilol.

Anexo 14: Tinción Hematoxilina-Eosina

Reactivos

- Hematoxilina Sigma HHS16
- Eosina Sigma E4009
- Etanol
- Xilol
- Bicarbonato de sodio
- HCl

Método

- Desparafinar las laminillas por una hora a 60 °C
- Sumergir en dos baños de xilol de 3 minutos cada uno.
- Sumergir y agitar por unos segundos en baños de etanol 100 %, 96 % y 80 %.
- Eliminar exceso de etanol con un baño de agua destilada.
- Teñir con hematoxilina (Dako).
- Sumergir en baño de etanol 70 %- HCl 12 M, para remover exceso de colorante de estructuras que no se tiñeron (49.5 ml etanol 70 % + 0.5 mL HCl 12 M)
- Virar al color azul, utilizando agua de la llave o solución de bicarbonato de sodio 2 %.
- Sumergir en dos baños de agua destilada por un minuto cada uno.
- Contrateñir con eosina, sumergir una vez y retirar laminilla.

Para la preparación de eosina amarilla (eosina Y)

Stock: 1 g de eosina Y + 20 mL de agua destilada + 80 mL Etanol 96 %.

Dilución 1:4 con etanol 80 %. Antes de usar, agregar 0.5 mL de ácido acético glacial por cada 100 mL de colorante. Esta solución es estable aproximadamente por una semana.

- Deshidratar el tejido en baños de etanol, sumergir, agitar y sacar. (80, 96 y 100 %).
- Sumergir en baño de xilol por 6 minutos.
- Sacar laminillas de xilol, quitar exceso en zonas libres de tejido, agregar medio de montaje sobre tejido y cubrir con cubreobjetos, deslizará fácilmente con ayuda del xilol.

Anexo 15: Tinción PAS

Reactivos

- Ácido peryódico 2% Sigma P7875
- Hematoxilina
- Reactivo de Schiff Sigma 3952016
- Etanol
- Xilol

Método

- Desparafinar las laminillas por una hora a 60 °C
- Sumergir en dos baños de xilol de 3 minutos cada uno.
- Sumergir y agitar por unos segundos en baños de etanol 100 %, 96 % y 80 %.
- Eliminar exceso de etanol con un baño de agua destilada.
- Oxidar con ácido peryódico por 5 minutos.
- Sumergir en agua.
- Hacer reaccionar con el reactivo de Schiff por 15 minutos.
- Sumergir en baño de agua.
- Contrateñir con hematoxilina por 5 minutos.
- Sumergir en baño de etanol 70 %- HCl 12 M, para remover exceso de colorante de estructuras que no se tiñeron (49.5 ml etanol 70 % + 0.5 mL HCl 12 M)
- Virar al color azul, utilizando agua de la llave o solución de bicarbonato de sodio 2 %.
- Deshidratar el tejido en baños de etanol, sumergir, agitar y sacar. (80, 96 y 100 %).
- Sumergir en baño de xilol por 6 minutos.

- Sacar laminillas de xilol, quitar exceso en zonas libres de tejido, agregar medio de montaje sobre tejido y cubrir con cubreobjetos, deslizará fácilmente con ayuda del xilol.

Anexo 16: Tinción Azul de Toluidina

Reactivos

- Azul de toluidine Sigma 89640
- Hematoxilina
- Etanol
- Xilol
- Diaminobencidina
- Metanol

Método

- Desparafinar las laminillas por una hora a 60 °C
- Sumergir en dos baños de xilol de 3 minutos cada uno.
- Sumergir y agitar por unos segundos en baños de etanol 100 %, 96 % y 80 %.
- Eliminar exceso de etanol con un baño de agua destilada.
- Depositar laminillas por inmersión en azul de toluidina 0.1 % en metanol por 20 minutos.
- Sumergir en agua.
- Contrateñir con hematoxilina por 5 minutos.
- Sumergir en baño de etanol 70 %- HCl 12 M, para remover exceso de colorante de estructuras que no se tiñeron (49.5 ml etanol 70 % + 0.5 mL HCl 12 M)
- Virar al color azul, utilizando agua de la llave o solución de bicarbonato de sodio 2 %.
- Deshidratar el tejido en baños de etanol, sumergir, agitar y sacar. (80, 96 y 100 %).
- Sumergir en baño de xilol por 6 minutos.

- Sacar laminillas de xilol, quitar exceso en zonas libres de tejido, agregar medio de montaje sobre tejido y cubrir con cubreobjetos, deslizará fácilmente con ayuda del xilol.

Anexo 17: Cultivo de Líneas Celulares e Hibridomas

Material:

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

Reactivos:

D-MEM (GIBCO CAS. 12100-061)

L-arginina-HCl (SIGMA A-5131)

L-asparagina anhidro (SIGMA A-4159)

NaHCO₃ (SIGMA S-5761)

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

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

HEPES (SIGMA H-3784)

Penicilina/estreptomicina (SIGMA P-4333).

2-mercaptoetanol (Merck. 4213005)

Equipo:

Báscula digital

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

Bomba de vacío.

Pipetas serológicas.

Micropipetas.

Puntas para micropipetas.

Procedimiento:

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

Para preparar 1 litro de DMEM:

DMEM.....13.37 g

L-arginina HCl.....0.116 g

L-asparagina anhidra.....0.036 g

NaHCO₃.....2.0 g

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

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

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

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

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

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

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

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

Anexo 18: Aislamiento y Purificación de Anticuerpos Monoclonales

Material:

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

Procedimiento:

1. Cultivar los hibridomas (aBDC.2 o 5G8.B5) en condiciones normales, 37 °C en atmósfera de 5 % de CO₂.
2. Recolectar 3 litros del sobrenadante, almacenarlo en congelación hasta su uso.
3. Limpiar con HCl 1 mM una columna Bio-Rad y las mangueras, empacar en la columna la matriz de sefarosa la cual tiene proteína A.
4. Pasar los 3 litros de sobrenadante por la columna y una vez unidos los anticuerpos a la proteína A, eluir con 1.5 mL de glicina 0.1 M (pH 2.5) y recolectar en distintas fracciones en tubos de vidrio de 13 X 100 con 300 µL de trizma 1 M (pH 8).

5. Determinar la cantidad de proteína presente en las fracciones de interés, utilizando un espectrofotómetro de UV a 280 nm, en una cubeta de cuarzo. Almacenar las fracciones con mayor concentración de proteína a -80 °C, hasta su uso.

6. Realizar el pase del sobrenadante tres veces.

7. Mezclar, concentrar y dializar las fracciones seleccionadas. Realizar una SDS-PAGE para observar la pureza de la purificación.

Anexo 19: Detección Inmunoquímica de Población Celular en Intestino Delgado de Ratones

Procedimiento:

- Desparafinar laminillas silanizadas con secciones de intestino embebido en parafina. Colocarlas en horno a 60 °C toda la noche anterior.
- Rehidratar el tejido en los siguientes baños:

Solución	Tiempo de incubación (min)
Xilol	6
Xilol	6
Alcohol 100%	5
Alcohol 95%	5
Alcohol 80%	5
Agua destilada o desionizada	3

- Incubar con solución de H₂O₂ 3% durante 5 min a temperatura ambiente, para inhibir la peroxidasa endógena del tejido (Blocking peroxidasa kit Hercep Test)
- Lavar las laminillas, sumergirlas en PBS durante 3 min
- Bloquear los sitios de unión inespecíficos del tejido con suero preinmune al 10 % de cabra (kit Invitrogen).
- Lavar con PBS (solo agitación para eliminar exceso de suero no inmune 10% cabra)
- Incubar las secciones con 100 µL de anticuerpos policlonales (anticuerpos de rata anti-CD4, anti-CD8a, anti-CD19 y anti-F4/80 de ratón 1 µg/mL) durante 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda.

- Lavar las laminillas con PBS 2 veces por 3 min.
- Incubar con 100 μ L solución de anticuerpo anti-IgG de rata (1:200) conjugado con peroxidasa durante 1 hora.
- Lavar las laminillas con PBS 2 veces por 3 min.
- La detección del color se realiza empleando 0.05% de diaminobencidina y 0.2% de solución H₂O₂, agregar 100 μ L de solución cromógeno DAB, incubar por 10 minutos. Kit Hercep Test
 - Preparación de DAB

Transferir 1 mL de DAB Buffered Substrate del Vial 5 a un criovial, agregar una gota (25-30 μ L) de DAB cromógeno del vial 6. Mezclar y aplicar al tejido con una pipeta.
- Lavar las laminillas con PBS 2 veces por 3 min (agitar laminilla en PBS antes de reposar).
- Contrateñir el tejido con Hematoxilina, incubar de 5 minutos. Posteriormente lavar con un baño de agua destilada o desionizada de 3 min.
- Deshidratar las laminillas en los siguientes baños:

Solución	Tiempo de incubación (min)
Agua desionizada	3
80%	3
96%	3
100%	3
Xilol	6

- Sacar laminillas de xilol, quitar exceso en zonas libres de tejido, agregar medio de montaje sobre tejido y cubrir con cubreobjetos, deslizará fácilmente con ayuda del xilol.

Anexo 20: Electroforesis en Geles de Poliacrilamida en Condiciones Ligeramente Desnaturalizantes y Reductoras (SDS-PAGE)

Reactivos:

*Acilamida/Bisacrilamida 30%

Acrilamida.....30 g

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

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

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

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

Trizma-base.....6.05 g

Agua ultrapura.....40 mL

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

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

Trizma-base.....91 g

Agua ultrapura.....100 mL

Ajustar el pH a 8.8 con HCl 1N, aforar a 500 mL. Filtrar con un filtro de 0.45 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 (2 minigeles de 6 X 8 cm y separador de 0.75 mm)

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

Buffer Tris 4X con SDS pH 8.8.....3.75 mL

Agua des-ionizada.....5.25 mL
de amonio (PSA).....0.08 mL
TEMED.....0.018 mL

*Gel concentrador (2 minigeles de 6 X 8 cm y separador de 0.75 mm)
Acrilamida/Bisacrilamida 30 %/ 0.8 %..... 0.65 mL

Buffer Tris-SDS pH 6.8.....1.25 mL
Agua ultrapura.....3.05 mL
Persulfato de amonio.....0.07 mL
TEMED.....0.01 mL

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

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

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

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

*Alcohol etílico al 70 % (1 L)

Alcohol etílico absoluto (96 %). 729.17 mL

Agua ultrapura 270.83 mL

*Solución Azul de Coomassie

Metanol. 50 % (v/v)

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

Ácido acético. 10 % (v/v)

Agua ultrapura 40 % (v/v)

*Solución Desteñidora I

Metanol. 50 % (v/v)

Ácido acético. 10 % (v/v)

Agua ultrapura 40 % (v/v)

*Solución Desteñidora II

Metanol. 5 % (v/v)

Ácido acético. 7 % (v/v)

Agua ultrapura 88 % (v/v)

Procedimiento:

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

Preparar el gel de separación al 12 %:

Acrilamida/Bisacrilamida 30 % / 8 %.....6 mL

Buffer Tris 4X/SDS pH 8.8.....3.75 mL

Agua ultrapura5.25 mL

Persulfato de amonio.....0.08 mL

TEMED.....0.018 mL

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

Preparar el gel concentrador al 12 %:

Acrilamida/bisacrilamida 30 % / 8 %.....0.65 mL

Buffer tris 4X/SDS pH 8.8.....1.25 mL

Agua ultrapura.....3.05 mL

Persulfato de amonio.....0.07 mL

TEMED.....0.01 mL

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

1. Adicionar el gel de separación al 12 % de 0.75 mm de grosor. Mezclar muy bien y colocar el gel en los vidrios y adicionar unas gotitas de alcohol etílico al 70 % con una pipeta Pasteur, evitando la formación de burbujas.

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

Anexo 21: Inmunodetección de la Proteína 5G8 en Antígeno de *G. lamblia*

Reactivos:

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

Tris base.....30.3 g

Glicina.....144.0 g

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

- Buffer de transferencia 1X Tris-Glicina pH 8.3

Tris glicina 10X.....100 mL

Metanol200 mL

SDS.....1 g

Agua deionizada.....800 mL

Ajustar pH antes de aforar con NaOH o HCl

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

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

Leche svelty ®.....2 g

Mezclar en vortex. Usar esta solución recién preparada.

PBS-BSA 1 %

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

BSA.....0.1 g

Reactivos para el sistema de revelado

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

Solución reveladora Kodak. Para preparar 400 mL:

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

Solución Fijadora Kodak. Para preparar 400 mL:

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

Materiales:

Tubos de ensaye 13X100

Micropuntas de 100 µL

Micropipetas de 10-100 µL

Pinzas

Recipientes de plástico

Papel adherente transparente

Equipo:

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

Fuente de poder (Ec-Apparatus Corporation, EC500)

Método:

1. Correr una SDS-PAGE 12 % con una solución de extracto proteico de *G. lamblia* en geles preparativos.
2. Electrotransferirlo a membranas de nitrocelulosa (NC) en condiciones semisecas.
3. Colocar el gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulosa y dos pads (BIORAD) en solución de transferencia 1X, pH 8.3 por 5 a 15 minutos.
4. Organizar de la siguiente manera los pads: pad, membrana de NC, gel de poliacrilamida y pad. Eliminar en cada paso las burbujas que se forman por la solución reguladora pasando un tubo limpio sobre la capa.
5. Electrotransferir en un sistema semi seco (Modelo No. Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell, No. de serie 221BR 51543, 50W, 25 VDC) por 1 hora 15 minutos a 15 V, y amperaje recomendable no más de 0.1 A. (para geles de 1.5 mm).
6. Almacenar la membrana de NC a -20 °C hasta su uso.
7. Teñir el gel transferido con azul de Comassie para confirmar la adecuada transferencia del antígeno.

Inmunodetección:

1. Bloquear las membranas de NC electrotransferidas con PBS 1X-ABS 1 %-leche 5 % por 1 hora a temperatura ambiente.
2. Enjuagar la membrana con PBS 1X para quitar el exceso de solución bloqueadora.
3. Adicionar el primer anticuerpo a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (AcMo 5G8.B5 y Ac Control de Isotipo aBDC.2, IgG2b) con PBS-ABS 0.1 %.
4. Incubar en agitación por 1 hora a temperatura ambiente.
5. Realizar 5 lavados de 5 minutos con PBS 1X, pH 7.2
6. Adicionar el segundo anticuerpo (cabra anti-ratón α -IgG peroxidasa conjugada, SIGMA) 1:7500 con PBS-ABS 0.1 %.
7. Incubar en agitación por 1 hora a temperatura ambiente.
8. Realizar 5 lavados de 5 minutos con PBS 1X, pH 7.2
9. Colocar las tiras de membrana en papel transparente y adicionar 100 μL de la solución quimioluminiscente: una parte de luminol más una parte de H_2O_2 . Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
10. Exponer las tiras de 30-60 segundos a una película y revelar manualmente.

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

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

Anexo 22: Cuantificación de IgA Total

Reactivos:

Anti-IgA Biolegend 407001

IgA de ratón Sigma M8769

PBS

PBS-Tween 0.05 %

PBS-BSA 1%

Anti-IgA-HRP Abcam 97235

ABTS

Peróxido de hidrógeno

Procedimiento:

1. Adsorber a una placa de ELISA 50 ng de anti-IgA. Incubar la placa toda la noche a 4 °C.
2. Lavar la placa 5 veces con PBS-Tween 0.05 %.
3. Bloquear los sitios libres de unión de anticuerpo con 50 µL de PBS-BSA 1%. Incubar por una hora a temperatura ambiente.
4. Lavar la placa 5 veces con PBS-Tween 0.05 %.
5. Adicionar 50 µL del primer anticuerpo. Para la curva de calibración, adicionar 3, 1.5, 0.75, 0.375, 0.1875 y 0 ng de IgA de ratón (Estas cantidades en un volumen de 50 µL). Para la muestra problema, probar diferentes diluciones. Incubar la placa por una hora a temperatura ambiente.
6. Lavar la placa 5 veces con PBS-Tween 0.05 %.

7. Adicionar 50 μL de anticuerpo secundario anti-IgA de ratón acoplado a peroxidasa (133 ng/mL; 1:7500). Incubar por una hora a temperatura ambiente.
8. Lavar la placa 5 veces con PBS-Tween 0.05 %.
9. Adicionar 50 μL de solución reveladora (por cada mL de ABTS, adicionar 1 μL de peróxido de hidrógeno). Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente.
10. Leer absorbancia a 415 nm.

Anexo 23: Separación de Proteínas de Membrana de Trofozoítos de *Giardia lamblia*

Reactivos:

TBS (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7.5)

Tritón X-114

Inhibidor de proteasas

Azul de bromofenol

Procedimiento:

1. Recolectar todos los pellets de trofozoítos de *Giardia* proveniente de un cultivo confluyente de aproximadamente 500 mL de volumen.
2. Resuspender en 2 mL de TBS (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7.5)- Tritón X-114 2 % + 5 μ L de inhibidor de proteasas.
3. Incubar en hielo por 20 minutos, homogenizar constantemente.
4. Centrifugar 4000 xg, 5 minutos a 4 °C (Remover componentes del citoesqueleto).
5. Guardar pellet y tomar alícuota de sobrenadante. A éste, adicionar una pequeña cantidad de azul de bromofenol (0.001 %)
6. Mezclar e incubar en hielo por 10 minutos y después 10 minutos a 37 °C.
7. Centrifugar a 2500 xg, 5 minutos a temperatura ambiente (Se forman 2 fases, tomar alícuota)
8. Adicionar a la fase acuosa, TBS para que el tritón quede al 1 %. Repetir el paso 6 hasta la incubación en hielo y después adicionar la fase de detergente e incubar 10 minutos a 37 °C.
9. Repetir condiciones de centrifugación (Tomar alícuota)
10. Se forman 2 fases: a la fase de detergente realizar 2 lavados con 4 volúmenes de TBS-tritón 0.05 % (Respetando las condiciones de centrifugación e incubación).

Anexo 24: Cuantificación de Proteínas de Membrana por Ácido Bicinconínico (BCA)

Reactivos:

Stock BSA 2000 µg/mL

Micro BCA protein Assay Kit Thermo scientific

Procedimiento:

1. Colocar 150 µL de la muestra problema y del estándar de BSA (40, 20, 10, 5, 2.5, 1 y 0 µg/mL, para curva de calibración) a una placa de 96 pozos de fondo plano.
2. Adicionar 150 µL de solución de trabajo (Se prepara colocando 25 partes del reactivo MA, 24 partes del reactivo MB y 1 parte del reactivo MC).
3. Mezclar, cubrir con aluminio e incubar la placa a 37 °C por dos horas.
4. Leer la absorbancia a 570 nm (ideal es a 562 nm).

Anexo 25: Elución Pasiva de la Banda de 70 KDa

Reactivos

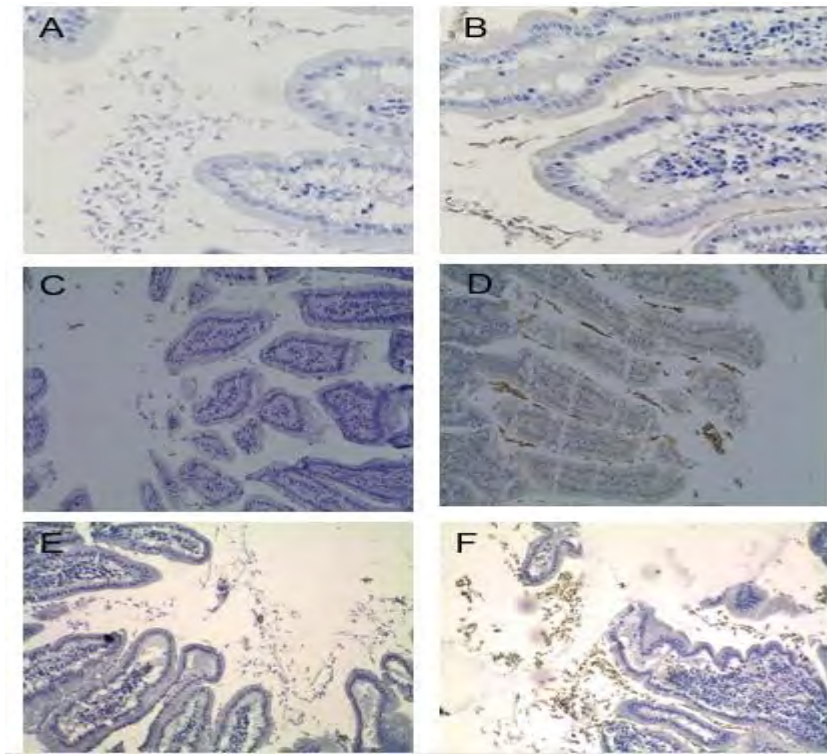
PBS 1:20

Equipo y material para electroforesis

Procedimiento:

1. Correr geles de electroforesis a 100 V(4 en total, con un grosor de 1.5).
2. Cortar la banda de 70 KDa en donde se encuentra la proteína 5G8.
3. Triturar la banda, la mitad de un gel en 500 μ L de PBS 1:20. En total, recolectar 8 fracciones por 4 geles.
4. Concentrar por speed vac, 20 veces.

Anexo 26: Detección Inmunohistoquímica de Trofozoítos de *Giardia lamblia* en Mucosa Intestinal Mediante Anticuerpos Específicos



Cortes histológicos de gerbos infectados con diferentes cepas de *Giardia* y Anticuerpos policlonales específicos contra antígenos de *Giardia lamblia*. A) Gerbo infectado con la cepa WB de *Giardia*, suero preinmune 1:100. B) Gerbo infectado la cepa WB de *Giardia*, suero hiperinmune anti-WB 1:100. C) Gerbo infectado con la cepa GS de *Giardia*, suero preinmune 1:100. D) Gerbo infectado la cepa GS de *Giardia*, suero hiperinmune anti-GS 1:100. E) Gerbo infectado con la cepa GS-5G8 + de *Giardia*, suero preinmune 1:100. F) Gerbo infectado la cepa GS-5G8 + de *Giardia*, suero hiperinmune anti-GS-5G8 + 1:100. Contratación con hematoxilina. A y B, 400 X. C, D, E, y F, 100 X.

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