Centro de Investigación en Ali1nentación y Desarrollo, A. C.

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE ANTÍGENOS QUE ESTIMULAN UNA RESPUESTA INMUNE CELULAR EN UN MODELO MURINO DE Giardia lamblia

POR

María del Rosario Vega Fernández

Tesis aprobada por la

Coordinación de Nutrición

Como requisito parcial pam obtener· el grado de:

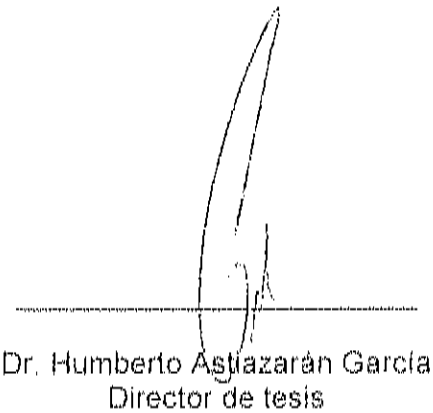
Maestrla en Ciencias

HERMOSILLO, SONORA. **DICIEMBRE DEL 2004**

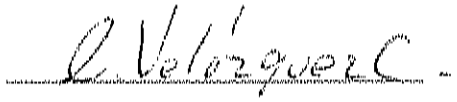
El presente trabajo se realizó en la coordinación de Nutrición del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., bajo la dirección de los Doctores: Humberto Astiazarán García y Carlos Arturo Velásquez Contreras, con el apoyo del CONACyT mediante el proyecto I39133-N.

APROBACIÓN

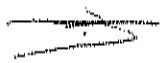
Los miembros del comité designado para revisar la tesis de María del Rosario Vega Fernández, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



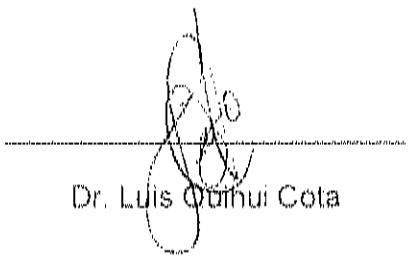
Dr. Humberto Astiazarán García
Director de tesis



Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras
Secretario



Dr. Jesús Hernández López
Vocal



Dr. Luis Ochoa Cota

DECLARACION INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar créditos al CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director o directora de la tesis.

Dr. Alfonso Gardea Béjar
Director General

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a Dios, por darme la vida y las fuerzas para empezar cada dia.

A mi familia, que siempre espera lo mejor de mi y me dan lo mejor de ellos, en especial a mis padres.

A todas las personas que están junto a mí y comparten cada logro conmigo.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico brindado durante la realización de este trabajo.

Al proyecto CONACYT I39133-N otorgado al Doctor Carlos Velásquez.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, A.C.) por la oportunidad de ser parte de él.

A la Universidad de Sonora por permitirme realizar la mayor parte de mi trabajo en sus instalaciones, en especial a la maestra Lucila Rascón por su amabilidad, disposición y su amistad, a Jael, Anita, Angélica, Carolina, Marco, Mario y Noé.

Al Bioterio del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA) en especial al M.C. Rafael Canett Romero por su amabilidad.

A la Coordinación de Nutrición, particularmente al Dr. Humberto Astiazarán por la oportunidad de trabajar en uno de sus proyectos, por su amabilidad, su confianza y gentileza. ¡Gracias!

Un especial agradecimiento al Dr. Carlos Velázquez Contreras, un gran asesor y amigo, que siempre confío en mí y me enseño que con esfuerzo y dedicación las cosas siempre pueden ser mejor. ¡Muchas gracias Doc!

Al Dr. Jesús Hernández López, por su tiempo, ayuda y sus buenos consejos. ¡Muchas gracias!

Al Dr. Luis Quihui por sus consejos, apoyo y amabilidad otorgados y sobre todo gracias a mi comité por sus consejos para el mejoramiento de mi tesis.

Un especial agradecimiento a todas las personas que de alguna manera me apoyaron en mi trabajo: al laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos por facilitarnos su equipo y material de laboratorio, en especial a Karina García por su ayuda y buenos consejos, al laboratorio de proteínas: Dra. Ana María Calderón de la Barca por su disposición, a Renè Valenzuela por su apoyo y paciencia, Adriana, Vicky, Maricela, Berthita, Francisco Vázquez, Diana. ¡Muchas gracias!

Al personal de docencia por su amabilidad, atención y gentileza: Ana Isabel, Héctor Galindo.

A Luis Leyva, Felipe Isac, Alberto Murrieta, Martín Peralta, José Luis Aguilar, Aurora Vidal, Alejandrina Coronado y Alfonso Aguilar por su apoyo técnico.

Al personal de la Biblioteca del CIAD, A.C., a Magda, Gerardo, Luis Conde y Fernando.

A mi familia, principalmente a mis Padres, por su apoyo incondicional y por siempre estar ahí. Los Amo.

A mis hermanos: Mayra y César, por su ejemplo y por estar siempre conmigo. A mi cuñado Fernando y a mi sobrinita Andrea, que es el sol de nuestras vidas. A mis tíos por creer en mí, a mis primos que tanto quiero.

A la familia De la Re, a Bertha María, Don Enrique, Sandra, Guillermo, Armando e Ibeth, por siempre estar pendientes de mí y abrirme las puertas de su casa.

A mis amigos que siempre están, en las buenas y las malas, gracias a Juan Pedro, Alberto, Gracia, Regina, María José, Marco Antonio y por supuesto a mis VIP: Begonia, Bárbara, Raquel, Claudia, Lily, Nidia. Un agradecimiento especial a todos mis compañeros de generación, porque gracias a ellos todo fue más fácil y llevadero: ¡Nunca los olvidaré!

A Enrique, por siempre estar a mi lado, por su paciencia y cariño. Eres lo mejor de mi vida.

Y a todos los que de alguna manera participaron y ayudaron para llevar a cabo este trabajo.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....iii

RESUMEN..... iv

INTRODUCCIÓN..... 1

Patología y su efecto en el estado nutricio..... 2

ANTECEDENTES..... 4

Características antigénicas de *G. lamblia*..... 4

Respuesta inmune contra *G. lamblia*..... 4

Inmunidad celular..... 5

Hibridomas de células T..... 7

HIPÓTESIS..... 10

OBJETIVO.....10

Objetivos particulares.....10

MATERIALES Y MÉTODOS.....11

Cultivo de *Giardia lamblia*.....11

Animales de experimentación.....11

Líneas celulares.....12

Infección de ratones.....12

Obtención de antígenos solubles de *G. lamblia*.....13

Fraccionamiento del antígeno soluble de *G. lamblia*..... 14

Ensayos de proliferación de células T *in vitro* de bazo y placas de Peyer de ratones infectados..... 15

Generación de hibridomas de células T..... 16

Tamizaje de células T específicos para *G. lamblia*..... 17

Ensayo con IL-2..... 18

Evaluación de proliferación celular por el método de MTT..... 19

RESULTADOS.....20

El extracto antigénico soluble de *G. lamblia* es una mezcla heterogénea de proteínas..... 20

Las proteínas de masas moleculares relativa de 10-500 kDa estimulan la proliferación *in vitro* de células T de bazo de ratones infectados con *G. lamblia*..... 20

Proteínas inmunodominantes de *G. lamblia* inducen la activación de los híbridomas de células T 10G5.E3 y 4D5.E10..... 26

DISCUSIÓN..... 34

CONCLUSIONES..... 36

BIBLIOGRAFIA..... 37

ANEXO..... 42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Patrón electroforético del extracto antigénico soluble de *G. lamblia* cepa GS/M-83-H7.....22

Figura 2. Separación de la mezcla antigénica soluble de *G. lamblia* cepa GS/M-83-H7 por Cromatografía de filtración en gel.....24

Figura 3. Ensayo de linfoproliferación de células de bazo de ratones infectados utilizando las fracciones antigénicas separadas por filtración en gel.....25

Figura 4. Selección inicial de hibridomas de células T específicos para *G. lamblia*.....30

Figura 5. Presentación de fracciones proteicas de la mezcla antigénica al hibridoma de células T 10G5.....31

Figura 6. Presentación de la fracción proteica que estimula a las subclonas del hibridoma de células T 10G5 en una gráfica dosis-respuesta.....32

Figura 7. Presentación de la fracción proteica que estimula a las subclonas del hibridoma 4D5.....33

RESUMEN

Giardia lamblia (G. lamblia) es uno de los parásitos intestinales más comunes en el mundo. Se sabe que el sistema inmunológico juega un papel irnportante para la eliminación de la infección. El objetivo de este trabajo fue identificar antígenos de G. lamblia, que inducen una respuesta inmune celular en un modelo de giardiasis murina. Los antígenos solubles de G. lamblia se obtuvieron a partir de cultivos axénicos de trofozoitos de G. lamblia. El extracto antigénico se separó en base a pesos moleculares por cromatografía de filtración en gel en 4 fracciones (I, II, III y IV). Estas fracciones fueron estudiadas en ensayos de células T provenientes de placas de Peyer y bazo de ratones infectados, para conocer su actividad linfoproliferativa. Se observó que las tracciones II (500-75 kDa) y III (75-10 kDa) estimularon a los linfocitos T de ratones infectados. Adicionalmente se generaron 7 hibridomas de células T específicos para G. lamblia, con células provenientes de ratones inmunizados, de los cuales se caracterizaron inmunológicamente, 2 de ellos (4D5.E10 y 10G5.E3). El hibridoma 10G5:E3 reconoció a proteínas inmunoreactivas con una masa molecular de entre 100 y 109 kDa, en tanto que el hibridoma 4D5.E10 a proteínas de entre 70 y 92 kDa. La identificación y caracterización de estas proteínas incrementará nuestro conocimiento acerca de la respuesta inmune en giardiasis.

INTRODUCCIÓN

G. lamblia es el protozoario enteropatógeno más común a nivel mundial, puede provocar diarrea crónica y malabsorción intestinal. Se le reconoce también como factor de retraso en el desarrollo y crecimiento de infantes y niños (Farthing, 2003). Durante algunos años fue considerado un comensal inocuo (Farthing, 2003), pero la asociación con diarrea sintomática y la malabsorción de nutrientes principalmente en niños, ayudaron al reconocimiento de su patogenicidad.

La capacidad infectiva de *G. lamblia* depende de varios factores: el tipo de cepa y el número de quistes ingeridos, el estado nutricio y el sistema inmunológico del hospedero (Faubert, 2000). La infección sintomática está caracterizada por dolor abdominal, diarrea, naúsea, vomito, malabsorción, fatiga y pérdida de peso (Flanagan, 1992; Eckmann, 2003). Aunque los síntomas pueden ser severos y prolongados, una proporción elevada de personas infectadas son totalmente asintomáticas (Langford *et al.*, 2002). Los síntomas tipicamente se presentan entre los días 6-15 después de la infección. Las infecciones con *Giardia* son eliminadas por el propio organismo (Eckmann and Gillin, 2001) en más del 85% de los casos, indicando que existe una efectiva defensa del hospedero, aunque ocasionalmente existen casos crónicos en ausencia aparente de inmunodeficiencias en el hospedero (Faubert, 2000; Flanagan, 1992).

En algunos países se han reportado brotes epidemiológicos de diarrea causados por quistes de *G. lamblia* presentes en agua potable (Adam, 2001; Kucheria *et al.*, 2002). En Estados Unidos, *G. lamblia* es el patógeno intestinal más comúnmente diagnosticado en laboratorios de salud pública y se reportan alrededor de 2.5 millones de infecciones al año en ese país (Furness *et al.*, 2000). La Organización Mundial de la Salud reporta 500,000 casos nuevos de giardiasis en humanos, aunque su índice de mortalidad es bajo, *G. lamblia* se considera uno de los principales agentes patógenos en el mundo. (WHO, 1995). La giardiasis es considerada un problema de salud pública en diversos países, sobre todo en aquéllos en vías de desarrollo entre los cuales se encuentra México y según datos de la Secretaría de Salud, Sonora se encuentra en el primer lugar de prevalencia a nivel nacional, afectando principalmente a la niñez. (SSA, 2003)
(http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/en/S01.pdf).

Patología y su efecto en el estado nutricio

Las principales evidencias indican que los trofozoítos de *G. lamblia* colonizan estrictamente el lumen del intestino delgado (Eckmann and Gillin, 2001), aunque también se han reportado casos aislados de pacientes en donde *Giardia* se encuentra en íleon, colon o estómago (Oberhuber *et al.*, 1997). La invasión de trofozoítos sobre la mucosa intestinal ocasiona efectos adversos

afectando su función. Entre estos se encuentran el crecimiento acelerado de los enterocitos y células caliciformes que provoca una atrofia en las vellosidades y producción excesiva de moco (Buret *et al.*, 1990). Estos cambios patofisiológicos ocasionan malabsorción de grasas, vitamina B_{12} (Ali and Hill, 2003), Na^+ y glucosa así como disminución de disacaridasas (Goto *et al.*, 2002) que pueden o no estar asociadas con atrofia en las vellosidades. Estas anormalidades llevan a una mala digestión, malabsorción y diarrea (Scott *et al.*, 2004).

Estos afectan el estado nutricio del organismo hospedero. Adicionalmente en humanos se ha demostrado que la infección con *G. lamblia* se relaciona con disminución de peso en períodos cortos y en el crecimiento (Northrop-Clewes *et al.*, 2001; Shubair *et al.*, 2000; Astiazarán *et al.*, 2000), así como una baja relación peso/edad (Sackey *et al.*, 2003). Lo anterior hace que *G. lamblia* sea un parásito de gran importancia clínica y nutricional, por lo cual es importante conocer y entender los mecanismos tanto de infección como de defensa del hospedero.

ANTECEDENTES

Caracteristicas antigénicas de *G. lamblia*

A pesar de la alta morbilidad de *G. lamblia*, se conoce muy poco acerca de su complexión antigénica, especialmente su naturaleza bioquímica y su participación en la respuesta inmune en el hospedero (Chaudhuri *et al.*, 1997). El conocimiento y el papel que esos antígenos tienen en la respuesta inmune durante la infección son importantes para el entendimiento de la enfermedad (Rosales *et al.*, 1998). Se han identificado proteínas tanto internas como de superficie de *G. lamblia*, que se cree tienen funciones específicas, sin embargo no se han caracterizado antígenos del parásito que puedan servir para su diagnóstico o que induzcan inmunidad protectiva (Faubert, 1996).

Respuesta inmune contra *G. lamblia*

La respuesta inmune de un hospedero inmunocompetente contra parásitos es un mecanismo complejo, en donde intervienen las respuestas humoral y celular (Romagnani, 1995). *G. lamblia* coloniza la porción superior del intestino delgado, en donde el Tejido Linfoide Asociado a Mucosas (MALT) juega un papel importante en la eliminación de la infección (Fagarasan and Honjo, 2003). Sin embargo, el mecanismo específico de la respuesta inmune

para *G. lamblia* es pobremente entendido. Para ello, es necesario contar con herramientas que nos permitan su evaluación como son: modelos animales, estudios *in vitro* (Faubert, 2000), así como la generación de herramientas biológicas como hibridomas, tanto productores de anticuerpos monoclonales (inmunidad humoral), como hibridomas de células T (inmunidad celular).

Diversos estudios sugieren que la respuesta inmune humoral y celular coordinadas son necesarias para controlar las infecciones por *G. lamblia* (Singer y Nash, 2000). Por su localización en el hospedero, la mayoría de los trabajos realizados indican que las células B son indispensables en la eliminación de la infección, al observarse un incremento en la producción de anticuerpos de la clase IgA, IgM, e IgG tanto en secreciones mucosas, como en suero en humanos (Faubert, 2000; Eckmann, 2003). Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados se han enfocado principalmente al estudio de la inmunidad humoral y relativamente existe poca información del mecanismo de respuesta de tipo celular que produce *G. lamblia*.

Inmunidad celular

Independientemente de la importancia del Tejido Linfoide Asociado a Mucosas (MALT) en la eliminación de la infección y que anticuerpos de la clase IgA son necesarios, se ha visto que la inmunidad mediada por células también tiene un papel importante en la infección (Faubert, 2000). Para el estudio de

esta respuesta se han utilizado modelos experimentales, principalmente murinos (Faubert, 1996).

Se han reportado diversos estudios, los cuales demuestran que los linfocitos T desempeñan un papel importante en la eliminación de la infección. Singer y Nash (2000), al infectar con *G. lamblia* y *G. muris* a grupos de ratones tanto normales, deficientes de linfocitos B y deficientes de linfocitos T, observaron que aquéllos sin células T eran incapaces de eliminar la infección y ratones deficientes de células B eliminaron la enfermedad a la primera o segunda semana post-infección, por lo cual ellos proponen que los linfocitos B no son requeridos para el control de la fase aguda de la infección, mientras que los linfocitos T son necesarios para el control de este parásito.

Por otro lado, en ratones adultos infectados con *G. lamblia* en fase latente y aguda de la infección se observa un incremento de linfocitos T CD8+ en poblaciones intraepiteliales y lámina propria; mientras que en fase de eliminación, la población de células CD8+ disminuye, y las células CD4+ aumentan significativamente (Faubert, 1996). Sin embargo, se ha visto que aunque el papel de las células T es de protección durante la infección, posiblemente puedan estar implicadas en el daño observado en la mucosa epitelial cuando existe una giardiasis crónica. Estudios previos en ratones, han demostrado que la infección provoca atrofia en las microvellosidades e hiperplasia en células de las criptas y suponen que son mediadas por células T activadas, en especial $CD8^+$ (Scott *et al.*, 2004).

Para la realización de estudios que involucran a la inmunidad celular, es necesaria la generación de herramientas biológicas, para una fácil manipulación de estas con el fin de conocer y comprender como se lleva a cabo el mecanismo de la respuesta inmune, con la utilización de modelos animales en este caso ratones susceptibles a la infección, permitiéndonos la caracterización de aquellos antígenos inmunodominantes capaces de inducir una respuesta inmunológica en el hospedero.

Hibridomas de Células T

Se ha demostrado que el procesamiento y presentación del antígeno son necesarios para la activación de las células T, así como la presencia de células presentadoras de antígenos (CPA) que presenten en su molécula de Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) al péptido antigénico capaz de inducir esta respuesta (Boyer *et al.*, 1988; Allen, *et al.*, 1984; Vidovic *et al.*, 2003). Las células T reconocen determinantes desnaturalizadas o secuencias lineares de aminoácidos, más que determinantes antigénicas nativas a diferencia de los linfocitos B (Allen *et al.*, 1984).

Gran parte del conocimiento actual sobre los eventos celulares en la activación de las células T se basan en experimentos *in vitro* (Abbas, 1998), utilizando una fuente estandarizada e ilimitada de células T específicas (Chou *et al.*, 2004) conocidos como hibridomas de células T, en las cuales estas células

pueden ser estimuladas en forma controlada y especifica por su antígeno específico, permitiendo medir su respuesta en una manera precisa (Abbas, 1998).

Un hibridoma es una célula híbrida que se produce al inmunizar con un antígeno específico a un ratón, se extraen los ganglios linfáticos que drenan el lugar de la inmunización y se purifican las células T. Estas células son fusionadas con una linea celular tumoral que crece de forma autónoma aplicándose una selección metabólica, de tal forma que sólo crecen las células fusionadas (Abbas, 1998). Estas células híbridas poseerán las características de los linfocitos T específicos para el antígeno deseado, así como la inmortalidad proporcionada pos las células tumorales. A partir de estos hibridomas resultantes, se realiza una selección y clonación de aquéllas células que sean específicas para el antígeno (Abbas, 1998), en nuestro caso antígenos inmunodominantes de *G. lamblia*.

Los hibridomas de células T tienen una aplicación general en biología, medicina y biotecnología, sobre todo en la producción de diferentes productos biológicos y farmacéuticos. Principalmente son usados para investigación de la actividad de células T cooperadoras: especificidad de receptores de células T (TCR) hacia péptidos, seguimiento de procesos infecciosos o inmunizaciones, establecimiento de mecanismos de selección epítope/procesamiento de antígeno (Abbas, 1998; Dzhambazov *et al.*, 2003).

El propósito de este trabajo fue establecer una fuente estandarizada e ilimitada de células T específicas contra antígenos inmunodominantes de *G. lamblia* para realizar estudios *in vitro* y establecer bases para el entendimiento de la infección por este parásito, así como un posible mecanismo de respuesta inmunológica del hospedero.

HIPÓTESIS

La generación de hibridomas específicos contra antígenos inmunodominantes de *Giardia lamblia*, favorecerá su identificación y caracterización bioquímica e inmunológica, así como la respuesta de estos antígenos durante la infección en un modelo murino.

OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar inmunológicamente los antígenos que estimulan la respuesta inmune celular en un modelo murino de giardiasis.

Objetivos particulares

- Establecer las condiciones de separación por electroforesis del antígeno obtenido de *G. lamblia*.
- Evaluar la respuesta proliferativa hacia antígenos de *G. lamblia* en células T obtenidas a partir de órganos linfoides (bazo y placas de Peyer) de ratones infectados.
- Generar hibridomas de células T específicos contra *G. lamblia*.
- Caracterizar los hibridomas de células T específicos contra *G. lamblia*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de *Giardia lamblia*

Se utilizaron cultivos axénicos de trofozoitos de la cepa de *G. lamblia* GS/M-83-H7 adquirida de la American Type Culture Collection (ATCC) y conservados en medio de cultivo TYI-S-33, suplementado con suero bovino al 10% (Keister, 1983). Se incubaron a 37°C en condiciones microaerofílicas.

Animales de Experimentación

Para el modelo murino, se utilizó la cepa singénica C3H/HeJ de 8 a 14 semanas de edad, adquiridos en The Jackson Laboratories (Maine, USA). Los animales fueron mantenidos en el Bioterio del Departamento de Investigación y Postgrado en Alimentos de la Universidad de Sonora (DIPA), con fotoperiodos de 12 horas a 25°C y alimentados con una dieta comercial para ratones. Se eligió este modelo de ratón, ya que es susceptible a la infección por la cepa de *G. lamblia* mencionada anteriormente (Byrd *et al.*, 1994).

Líneas Celulares

Para los ensayos con células se utilizaron las líneas M12.A^k proveniente de linfoma de células B de ratón, células T BW5147$\alpha^-\beta^-$ (ATCC) provenientes de timoma de ratón, CTLL-2 linfocitos T CD8$^+$ para bioensayos con Interleucina 2 (IL-2). Todos los cultivos se mantuvieron en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), suplementado al 5% con suero fetal bovino (SFB) (Hyclone, USA), inactivado por calentamiento. Las líneas celulares fueron mantenidas a 37°C en una atmósfera de CO_2, con una humedad relativa del 80-90% en una incubadora Isoterm (Fisher Scientific, USA). Los cultivos celulares se expandieron cada 72 horas.

Infección de Ratones

En ensayos anteriores se estableció la dosis óptima infectiva de *G. lamblia* en el modelo murino C3H/HeJ (Figueroa y Granados, 2003). La infección de ratones se llevó a cabo por inoculación intragástrica con $5x10^6$ trofozoitos resuspendidos en solución reguladora de fosfatos (PBS) (Gibco, USA) fría, utilizando una jeringa para insulina con aguja de alimentación forzada

Obtención de Antígenos Solubles de *Giardia lamblia*

Los extractos antigénicos solubles de *G. lamblia* se obtuvieron por el método de Gottstein *et al.* (1990), con ligeras modificaciones (ver anexo). A partir de un cultivo confluente de trofozoitos de *G. lamblia*, se colocaron los tubos en hielo por 15 minutos para que los trofozoitos adheridos al vidrio se despegaran, después fueron lavados 3 veces con solución PBS, pH 7.2 a 4°C (Gibco, USA). Los trofozoitos se resuspendieron en 800 µl de PBS y para su lisis se sometieron a ciclos de congelación-descongelación en Nitrógeno líquido y temperatura ambiente respectivamente. Para evitar la degradación de las proteínas se adicionaron inhibidores de proteasas (4-(2-aminoetil) bencenosulfonilfluoruro (AEBSF), bestatina, leupeptina, pepstatina A, E-64 y 1,10-fenantrolina) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Para una lisis total, se ultrasonicó 2 veces por 2 minutos a 30 ciclos (Brandson sonifier 250, Shelton, CT, USA). Finalmente el extracto sonicado se centrifugó a 14,000xg por 15 minutos a 4°C (Chaudhuri *et al.*, 1997). El sobrenadante con antigeno soluble de *G. lamblia* se mantuvo en congelación a -30°C hasta su uso. La estimación de proteína se realizó por el método de Bradford (1976).

Fraccionamiento del Antigeno de *Giardia lamblia*

Filtración en Gel (FPLC). La separación de las proteínas solubles de la mezcla antigénica se hizo por cromatografía de filtración en gel, utilizando una matriz Superdex 200 de Agarosa y Dextran (Amersham biosciences) con un volumen de cama de 20 mL, a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min utilizando una concentración de proteína de 1.5 mg de proteínas en 500 µL por corrida cromatográfica.

Elución pasiva de proteínas de geles en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE). Se realizaron geles preparativos de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) al 12% de 1.5 mm de grosor, aplicando una concentración de 500 µg de la mezcla antigénica. Los geles se dividieron en 6 fracciones de aproximadamente 1cm. Estas a su vez se cortaron en 3 fracciones de aprox. 0.33 cm y se colocaron en tubos de vidrio para macerarlos, utilizando émbolos de jeringas de acuerdo al método de Scheer *et al.*, (2001) con ligeras modificaciones (ver anexo). Se disolvieron en PBS diluido 1:10 y se agitaron en vortex incubándose a 4°C toda la noche. 24 horas después, se agitaron y centrifugaron a 1000xg por 10 minutos, obteniéndose el sobrenadante. Posteriormente las muestras se secaron totalmente en un evaporador speed-vac (Savant, DNA110). Se resuspendió con

agua deionizada a un volumen de 100 µl y se determinó proteína por el método del Ácido Bicinconínico (Micro BCA, PIERCE, Rockford, IL).

Ensayos de proliferación de Células T *in vitro* de bazo y placas de Peyer de ratones infectados

Células de bazo y placas de Peyer provenientes de ratones infectados fueron obtenidas a los 7 y 14 días post-infección. Estas células se homogenizaron y lavaron, eliminándose los glóbulos rojos de las células provenientes de bazo con solución de lisis (ACK). Se resuspendieron en medio DMEM suplementado al 10% con SFB (D10F) y se contaron utilizando la tinción de azul de Tripano (Sigma-Aldrich). Al final se ajustaron a una concentración de $1x10^6$/mL y se colocaron en microplacas con fondo redondo (Corning, USA) adicionándose 100 µL por pozo. La estimulación de las células con el antígeno de *G. lamblia* se realizo con diferentes concentraciones, para obtener las concentraciones óptimas que no fueran tóxicas para las células. Como control positivo se utilizó mitógeno PHA (Fitohemaglutinina). Para estimar proliferación se midió la incorporación de Timidina tritiada ([^{3}H] timidina) (Amersham, biosciences) a una concentración de 50 µCi/mL por pozo. Las placas se mantuvieron a -70°C hasta su cosecha. Se estimó la timidina incorporada en un lector de centelleo (Beckman, LS5000 TD). Para un protocolo experimental detallado ver anexo.

Generación de Hibridomas de Células T

Un grupo de 3 ratones fueron inmunizados en el cojinete plantar con 100 µg (por cada cojinete) de la mezcla de antigenos solubles de *G. lamblia* (antigeno) y adyuvante completo de Freund (Gibco, USA)., obteniéndose los ganglios linfáticos popliteos al día 8 post-inmunización. Se obtuvieron las células T y se estimularon con el antigeno a una concentración de 1 µM. Se incubaron por 3 días a 37°C. Para evitar posible contaminación el antigeno se esterilizó por membrana de 0.20 µm

Las células T del cultivo se transfirieron a tubos cónicos (Falcon) y se centrifugaron 3 veces por 10 minutos para su lavado. La fusión se realizó de la siguiente manera: se contaron células T provenientes de ratones inmunizados y células de fusión (células T BW5147$\alpha^-\beta^-$), la cantidad de estas células debe ser 3 veces mayor que células T de ratón, se hace una relación 1:3 de las células (1 célula T proveniente de ratón por cada 3 células BW5147$\alpha^-\beta^-$). Se mezclan ambas células y se realizan 3 lavados. El medio se decanta y las células se colocan en baño de agua a 37°C y se procede a realizar la fusión (ver sección de anexos). Todos estos pasos deben hacerse controlados, en tiempo, volumen y temperatura. Al final las células obtenidas se colocan en placas de 96 pozos utilizando diferentes concentraciones de células: 5 placas con 25,000 cél/pozo en 100 µL (cajas 1-5) y 5 placas con 50,000 cél/pozo en 100 µL (cajas 6-10). En

nuestro caso en total se obtuvieron 10 placas de 96 pozos con células fusionadas.

Para su crecimiento se utilizó medio selectivo HAT (Hipoxantina-Aminopterina-Timidina), este medio permite el crecimiento solo de las células que se fusionaron y se preparó de la siguiente manera: Un vial de medio HAT (SIGMA) se resuspendió en 10 mL de DMEM, posteriormente fue llevado a un volumen de 200 mL. Se adicionó 25 mL de Suero Fetal Bovino (decomplementado) y se ajustó a un volumen de 250 mL con DMEM. Se filtró por membrana de 0.20 µm y se adicionó 100 µl/pozo de las placas obtenidas con células. Se incubó entre 8 y 16 días a 37°C en atmósfera de CO_2, hasta observar crecimiento.

Se considera que las placas son clonales cuando menos del 50% de los pozos son positivos (30% aproximadamente). Las células que proliferaron se transfieren a placas de 48 pozos. Una semana después el medio selectivo HAT se cambia por medio HT 1X (Hipoxantina-Timidina) (SIGMA) utilizando D10F para su resuspensión.

Tamizaje de Hibridomas de Células T específicos para *Giardia lamblia*. Para el tamizaje o selección de hibridomas específicos de *G. lamblia* se utilizó un bioensayo de hibridomas de células T. Hibridomas de células T obtenidos en la fusión y Células Presentadoras de Antígeno (CPA: $M12.A^{k}$) se utilizan en el bioensayo y se cuentan. Se estima el número de células necesarias y se

ajustan a 100,000 células de hibridomas por 100 µL, 50,000 CPA ($M12.A^k$) en 50 µL. El antígeno se ajusta a la concentración deseada para 50 µl. Es recomendable probar diferentes concentraciones, ya que concentraciones muy altas pueden ser tóxicas para las células.

Se colocan en placas de 96 pozos en fondo plano y se incuban por 20 horas a 37°C en condiciones de CO_2. A las 20 horas se recuperan 100 µL de sobrenadante por pozo y se transfieren a otra placa idéntica. Las placas con el sobrenadante obtenido se congelan y se colocan a -40°C por lo menos 1 hora.

Ensayo con IL-2. Las células CTLL (dependientes de IL-2) se lavaron 5 veces a 700xg con DMEM. Las células se ajustan a 40,000 cél por 50 µl/pozo con medio D5F y se colocan en la placa que contiene el sobrenadante, se incuba por 20 horas a 37°C en atmósfera de CO_2. Se utilizaron como controles internos a células CTLL más IL-2, como control positivo (40,000 células/50 µl de CTLL con 10 µl de IL-2) y como control negativo: CTLL con D5F. Aquéllos hibridomas de células T que fueron específicos de *G. lamblia* se activaron, produciendo IL-2. Posterior al tiempo de incubación, se realiza una evaluación de la proliferación celular por el método de MTT.

Nota: Este paso es muy importante, ya que si las células fueron recientemente cambiadas de medio, posiblemente los resultados obtenidos no sean los esperados, ya que al momento de medir proliferación las células se verían iguales tanto en control positivo como negativo, lo cual no sería significativo en

el ensayo. Por lo cual se recomienda que las células CTLL-2 estén por lo menos 3 días en medio DMEM suplementado al 5% con SFB (D5F), así como con IL-2 necesaria para su crecimiento.

Evaluación de la proliferación celular por el método de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazoliumbromuro]. La sal de tetrazolium se ha utilizado para desarrollar un ensayo colorimétrico cuantitativo para la proliferación y supervivencia de células (Anexo 6). Después de incubar a las células CTLL-2 con el sobrenadante, donde se encuentra la IL-2 proveniente de las células T estimuladas por la mezcla antigénica de *G. lamblia*, se adicionan 15 µl de MTT y se incuban por 4 horas a 37°C en condiciones de CO_2. Después de este tiempo, se adicionan 150 µl de isopropanol acídico y se obtiene la proliferación de células CTLL-2 midiendo absorbancia a 570-655 nm en un lector de ELISA.

RESULTADOS

El extracto antigénico soluble de *Giardia lamblia* es una mezcla heterogénea de proteínas

Con el fin de separar e identificar las moléculas inmunodominantes de *G. lamblia* que estimulan una respuesta inmune celular, se obtuvo un extracto de proteínas solubles a partir de cultivos axénicos de trofozoitos de *G. lamblia*, a los cuales se les denominó antígeno de *G. lamblia*. Se recuperaron 4.5 mg de proteína total por cada 150 x 10^6 trofozoitos. El perfil electroforético por SDS-PAGE al 12% del extracto de proteínas mostró una mezcla heterogénea de bandas con masas moleculares de entre 20-200 kDa (Figura 1). El antígeno de *G. lamblia* se utilizó en ensayos de proliferación de células T, así como en la generación de hibridomas de células T específicos de *G. lamblia*.

Las proteínas de masas moleculares relativas de 10-500 kDa estimulan la proliferación *in vitro* de células T de bazo de ratones infectados con *G. lamblia*

Las proteínas solubles de la mezcla antigénica fueron separadas por cromatografía de filtración en gel y se dividieron en 4 fracciones, basándose en

sus pesos moleculares y se nombraron: fracción I, proteínas de 950-500 kDa, fracción II de 500-75 kDa, fracción III de 75-10 kDa y fracción IV a

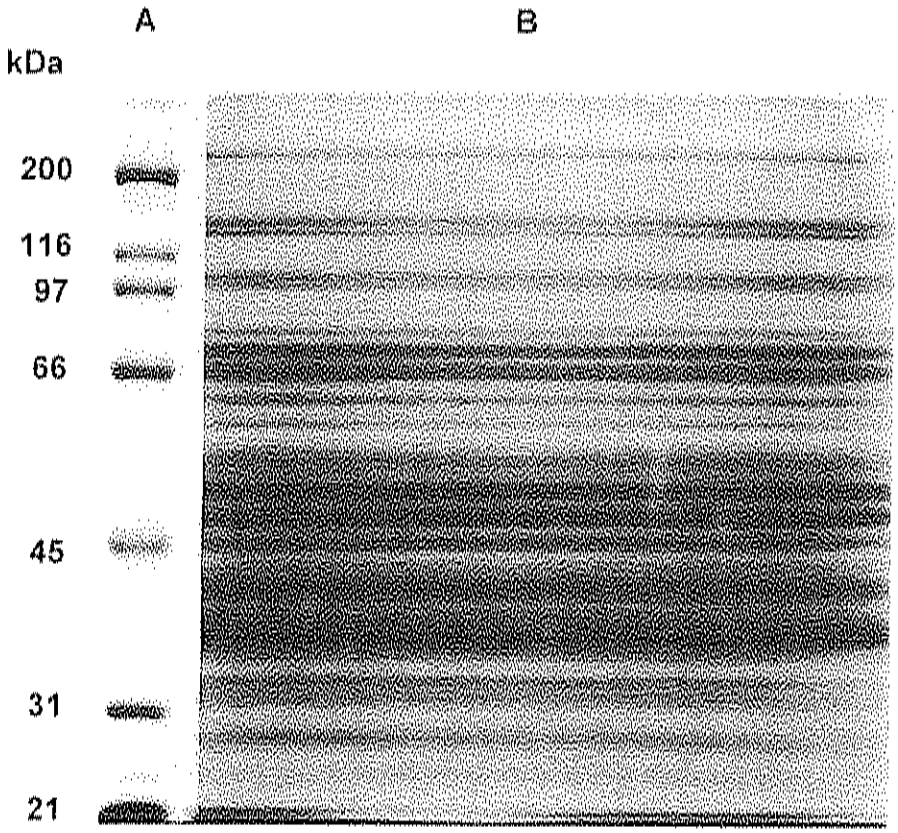


Figura 1. Patrón electroforético del extracto antigénico soluble de *G. lamblia* cepa GS/M-83-H7. Carril A: Marcadores de Peso molecular. Carril B: 500 µg de la mezcla soluble de proteínas de *G. lamblia* GS/M-83-H7. Es una mezcla heterogénea de proteínas.

polipéptidos menores de 10 kDa (Figura 2). Se estimó proteína por el método de Bradford (1976) obteniéndose un rendimiento de aproximadamente el 40%. Con las fracciones obtenidas se realizaron ensayos de proliferación con células T de bazo y placas de Peyer de ratones infectados, observándose que las fracciones II y III (500-10 kDa) fueron capaces de activar a los linfocitos T (Figura 3). Esto nos indica que en las fracciones existen antígenos inmunodominantes de *G. lamblia*, los cuales son procesados y presentados por CPA y que estimulan una respuesta de tipo celular.

Como el objetivo era identificar proteínas específicas que estimulen una respuesta inmune celular y teniendo en cuenta que estas se encuentran en un rango de 10-500 kDa, además que para la estimulación de células T son necesarios epítopes lineares de 15-30 residuos de aminoácidos se procedió a tratar de fraccionar la mezcla antigénica (Otvos *et al*, 2000). Para un fraccionamiento posterior de las proteínas inmunodominantes de *G. lamblia*, se separaron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) con elución pasiva (Scheer JM y Ryan CA, 2001) y fueron utilizadas en los ensayos celulares con hibridomas de células T. Este método nos dio un buen rendimiento al tener un 80% de recuperación aproximadamente.

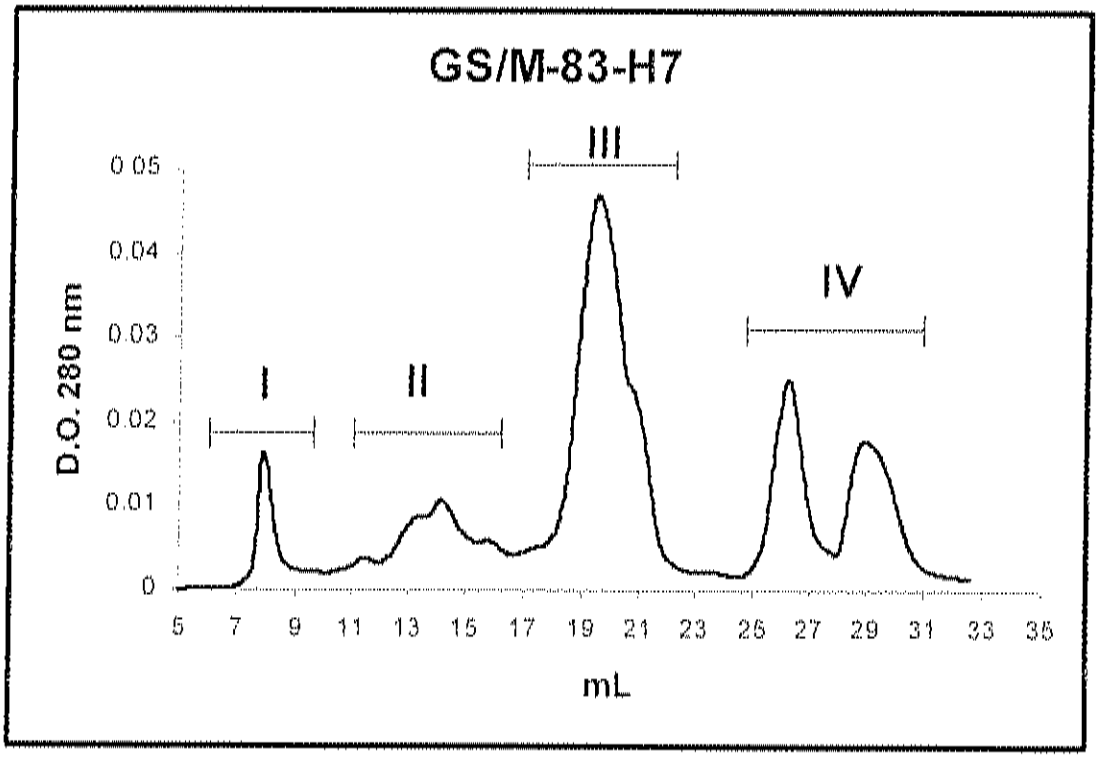


Figura 2. Separación de la mezcla antigénica soluble de *G. lamblia* cepa GS/M-83-H7 por Cromatografía de filtración en gel. Se obtuvieron 4 fracciones separadas en base a su peso molecular: Fracción I con proteínas de 950-500 kDa, fracción II con proteínas de 500-75 kDa, fracción III con péptidos de 75-10 kDa y la fracción IV con péptidos menores a 10 kDa

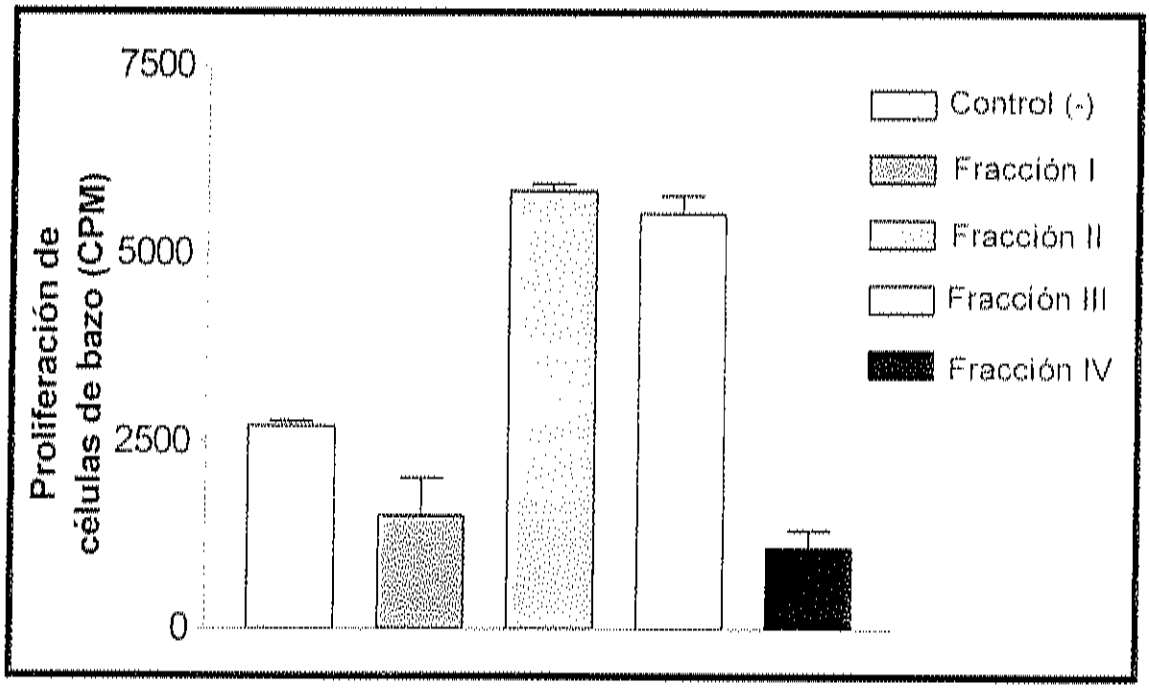


Figura 3. Ensayo de linfoproliferación de células de bazo de ratones infectados utilizando las fracciones antigénicas separadas por filtración en gel. Células de bazo fueron obtenidas de ratones re-infectados al día 14 post-infección y estimuladas con las fracciones obtenidas por cromatografía de filtración en gel.

Proteínas inmunodominantes de *G. lamblia* inducen la activación de los hibridomas de células T 10G5.E3 y 4D5.E10

Hibridomas de células T contra cierto antígeno, en este caso de *G. lamblia* son una herramienta que nos permite el estudio del procesamiento y presentación de antígenos y una gran ventaja al tener una fuente ilimitada de estas células, para pruebas de su función biológica *in vitro* (Chou *et al*, 2004). El primer paso en la producción de hibridomas de células T fue la generación de líneas celulares específicas contra la mezcla antigénica de *G. lamblia*. Se observó el crecimiento de las células fusionadas y se hizo una selección a los días 8, 10 y 16, obteniéndose 248 pozos en total.

La IL-2 es un factor de crecimiento y es responsable de la expansión de aquéllas células T, que son específicas hacia determinado antígeno, en nuestro caso *G. lamblia*. Se determinaron los niveles de IL-2 en bioensayos con células CTLL-2 dependientes de IL-2. El MTT es un método colorimétrico no radioactivo que nos indica la actividad mitocondrial y mide la proliferación de CTLL-2. Esto fue un indicador de proliferación y al probarse los 248 pozos que presentaron crecimiento después de la fusión, se seleccionaron únicamente aquéllos específicos para *G. lamblia*.

Se generaron 7 hibridomas de células T específicos contra antígeno de *G. lamblia*: 2F9, 4D5, 6D10, 8B9, 9B10, 10G5 y 10F7 (Figura 4). La selección inicial de clonas candidatos de estos hibridomas se realizó con la mezcla

antigénica de *G. lamblia* y como célula presentadora se utilizó M12.A^k. Para su caracterización inmunológica se seleccionaron en base a su alta sensibilidad al antígeno, los hibridomas 4D5 y 10G5. La selección de estos hibridomas se hizo en base a estudios subsecuentes, observándose un mejor patrón de estimulación por la mezcla antigénica hacia estos hibridomas de células T. En la Figura 5 se muestra un experimento de dosis-respuesta del hibridoma 10G5 hacia el antígeno.

Posteriormente se realizó una subclonación de los hibridomas 4D5 y 10G5. En este punto las bandas proteicas en donde se encontraban las secuencias peptídicas que estimularon la proliferación de esos hibridomas fueron bandas de masas moleculares relativas entre 70 y 109 kDa. Se realizó una subclonación, en donde se obtuvieron 4 subclonas del hibridoma 4D5 (Figura 6), de la cual se eligió el hibridoma 4D5.E10 por su capacidad de proliferación al ser estimulados por péptidos provenientes de alguna proteína que se encuentra en un rango de 70 y 92 kDa en su masa molecular. Del hibridoma 10G5 también se obtuvieron 4 subclonas, de la cual se eligió para su caracterización el hibridoma 10G5.E3, debido a que fue el que mostró un mejor reconocimiento hacia alguna proteína que se encontraba entre dos bandas de masas moleculares de entre 100 y 109 kDa (Figura 7).

Las proteínas de reconocimiento de estos hibridomas de células T, tanto 4D5.E10 y 10G5.E3 se encuentran en bandas con pesos moleculares de entre 70 y 109 kDa, esto es importante ya que nos indica que estos hibridomas de

células T son capaces de reconocer a secuencias peptídicas presentadas por el CMH de la CPA, y que son capaces de ser estimulados *in vitro* por antígenos solubles específicos de *G. lamblia*. Estos hibridomas de células T mantuvieron una buena sensibilidad para reconocer antígenos presentados por CPA. Además que tienen la ventaja de ser líneas celulares inmortales que no requieren estimulación por células "feeders" y los experimentos que requieran de grandes cantidades de células T específicas contra *G. lamblia*, serán realizados con mayor facilidad. Otra ventaja es que estos hibridomas pueden crecer en cultivos celulares utilizados rutinariamente en el laboratorio (Canaday *et al*, 2003).

Estos hibridomas de células T específicos para *G. lamblia*, son altamente sensibles, ya que pueden ser estimulados por una concentración de aproximadamente 2.5 nM del antígeno. Por otra parte todos los hibridomas se mantuvieron criopreservados y se observó que funcionaron bien inmediatamente después de ser descongelados. Esto nos permitió tener un banco de hibridomas, específicos de G. lamblia criopreservados listos para ser utilizados.

Los hibridomas de células T han sido utilizados extensamente para el entendimiento del procesamiento y presentación de antígenos, sobre todo en ratones. Específicamente, se han utilizado como herramientas para evaluar la interacción de organismos patógenos con CPA. (Canaday *et al*, 2003). Estos hibridomas son herramientas que nos pueden ayudar a entender los

mecanismos tanto de presentación y evasión del microorganismo a una respuesta inmune del huésped. Debido a su facilidad de manejo, el ilimitado número de células, su consistencia, flexibilidad y la sensibilidad de estos reactivos nos pueden facilitar el estudio de áreas que no habían sido exploradas en cuanto a *G. lamblia* se refiere y que podrán ser posibles al tener las herramientas generadas en nuestro estudio.

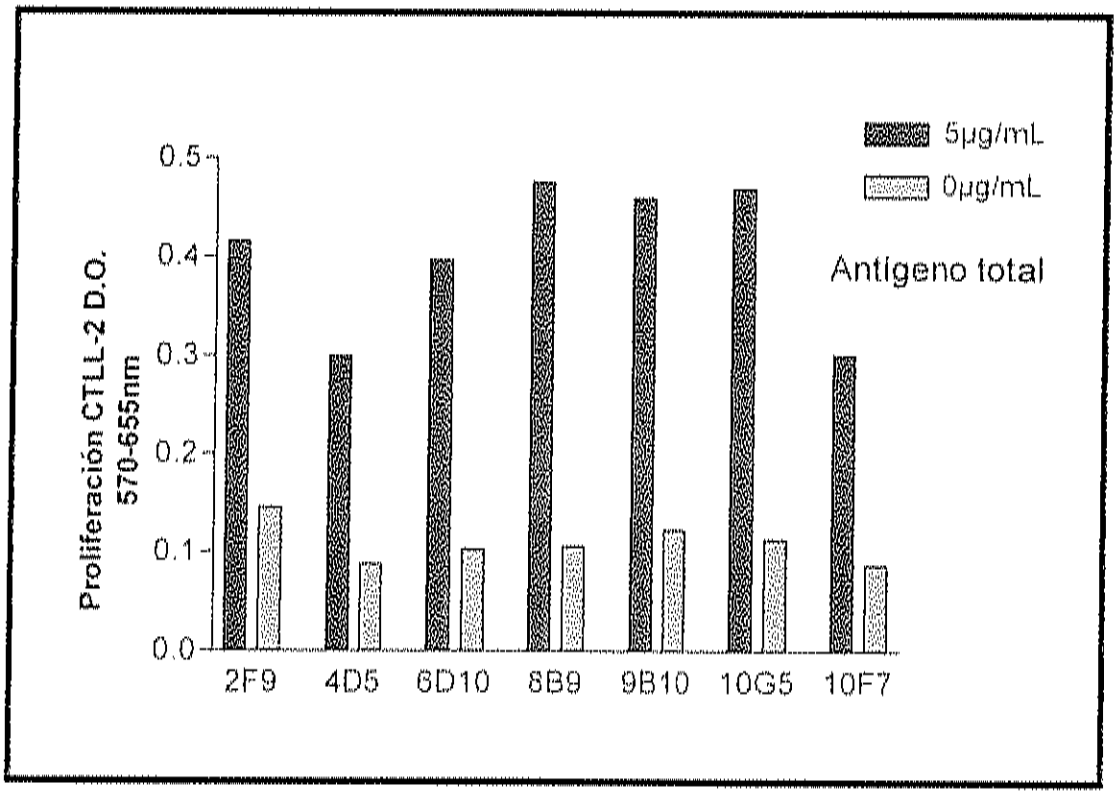


Figura 4. Selección inicial de hibridomas de células T específicos para *G. lamblia*. Para la primera selección de los hibridomas, se incubaron toda la noche con CPA ($M12.A^k$) en presencia de 5 µg/mL de la mezcla antigénica soluble de *G. lamblia* y como control negativo D5F. La presentación de antígeno fue medida como se describe en materiales y métodos. La respuesta de los hibridomas fue determinada por bioensayos de CTLL-2. Se obtuvieron 7 hibridomas de células T, de los cuales se seleccionó para su caracterización inmunológica a 4D5 y 10G5.

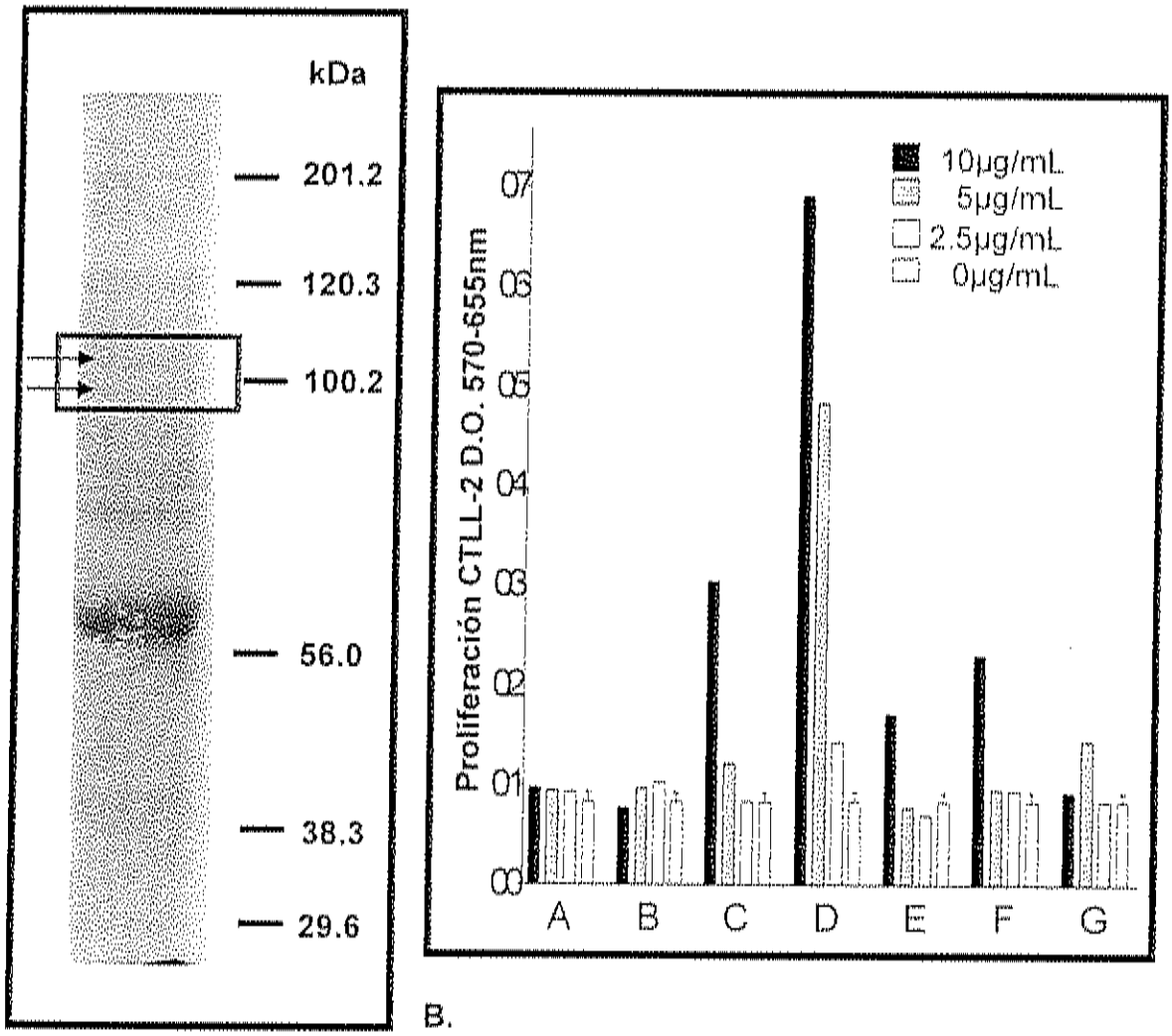
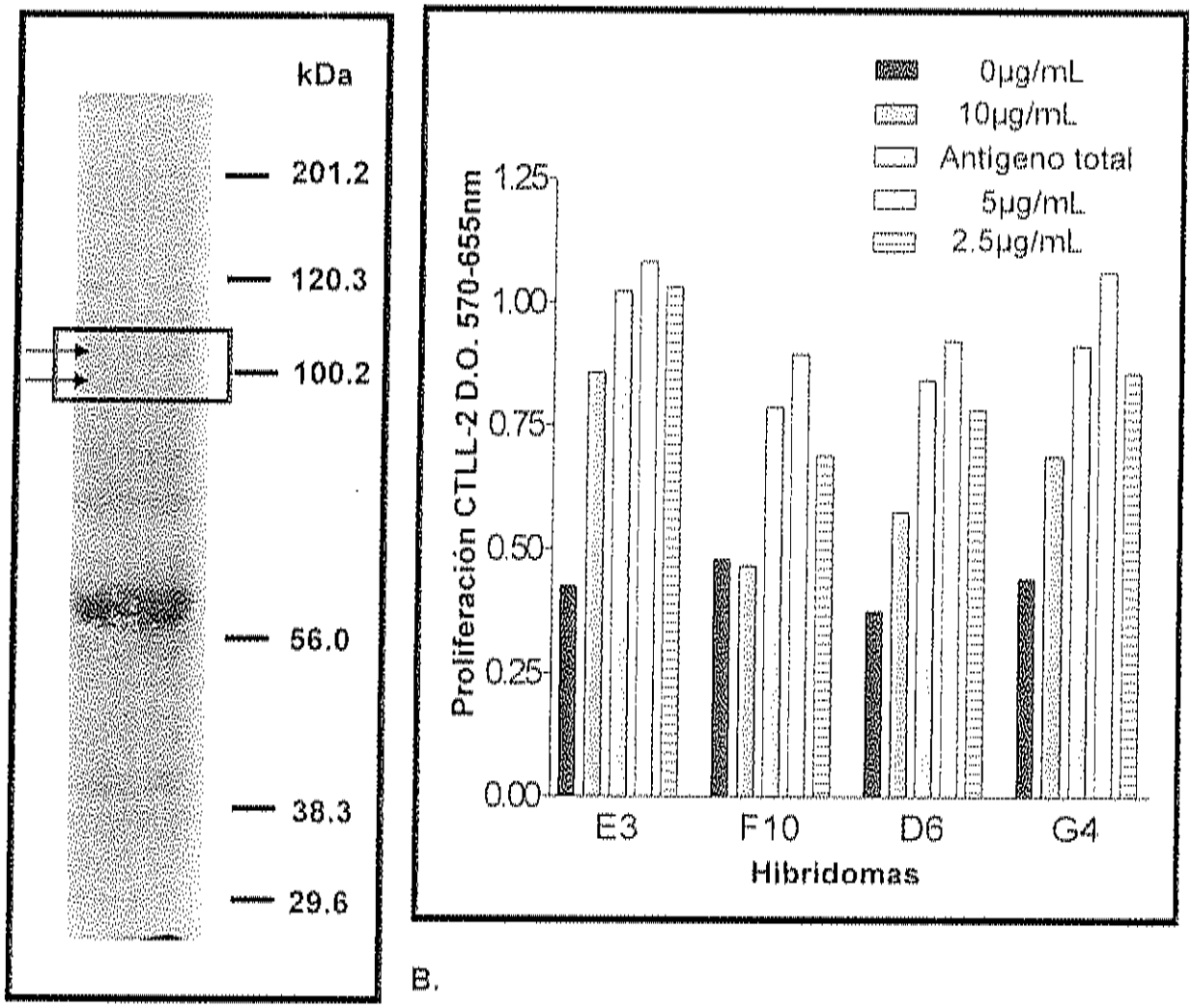


Figura 5. Presentación de fracciones proteicas de la mezcla antigénica al hibridoma de células T 10G5. El hibridoma 10G5 reconoce a proteínas que tienen masas moleculares relativas de 100 a 109 kDa (A). Las flechas nos indican las bandas proteicas (A) donde se encuentra la fracción D (B). La respuesta del hibridoma fue determinada por bioensayos con CTLL-2.



A.

B.

Figura 6. Presentación de la fracción proteica que estimula a las subclonas del hibridoma de células T 10G5 en una gráfica dosis-respuesta. De las subclonas del hibridoma 10G5 (10G5.E3, 10G5.F10, 10G5.D6, 10G5.G4) se seleccionó al hibridoma 10G5.E3 por su capacidad de reconocimiento (B). Este hibridoma es estimulado por proteínas que tienen masas moleculares relativas en un rango de 100 A 109 kDa (A).

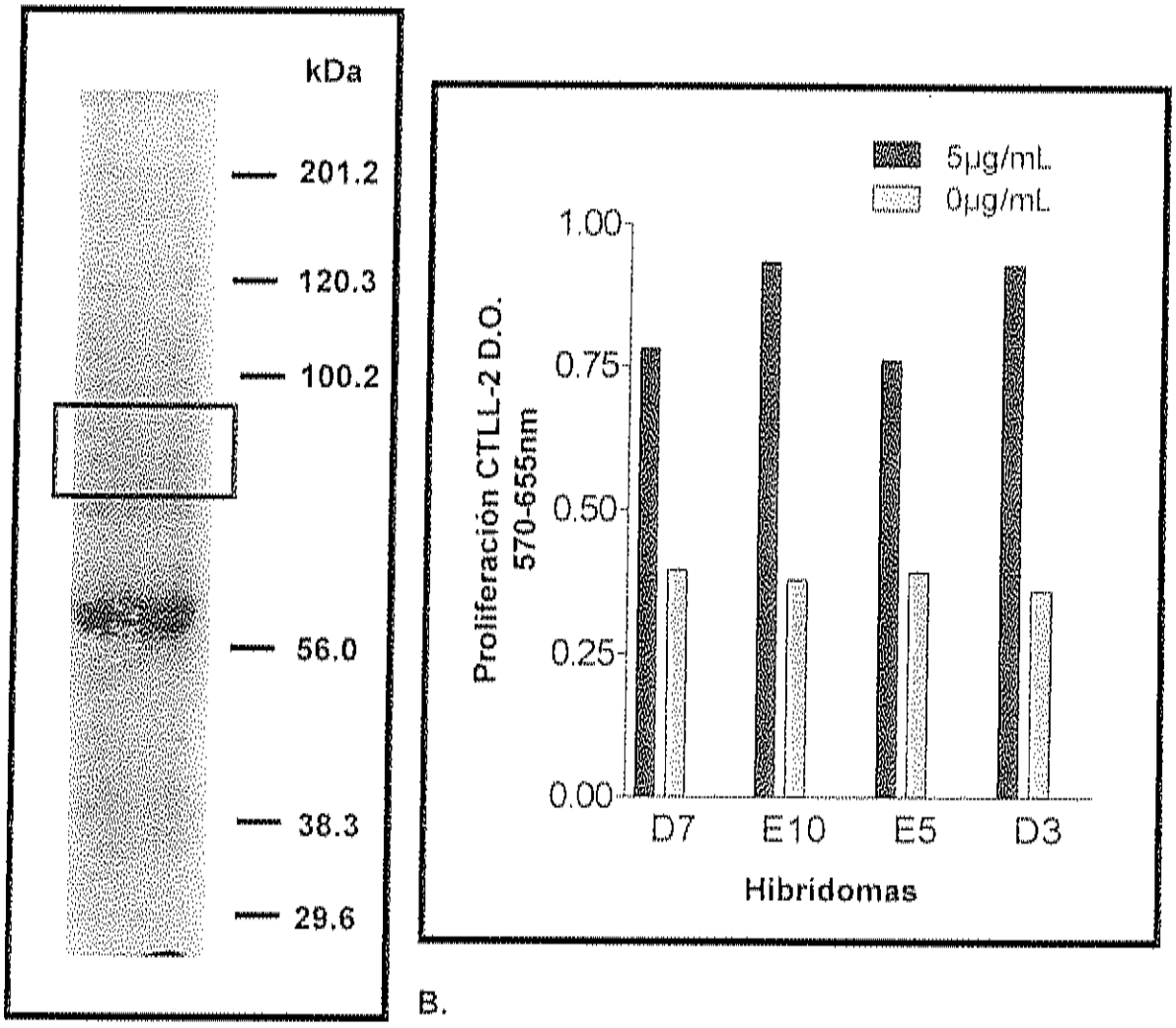


Figura 7. Presentación de la fracción proteica que estimula a las subclonas del hibridoma 4D5. De las subclonas del hibridoma 4D5 (4D5.D7, 4D5.E10, 4D5.E5, 4D5.D3) se seleccionó al hibridoma 4D5.10 por su capacidad de reconocimiento (B). Este hibridoma es estimulado por proteínas que tienen masas moleculares relativas en un rango de 70 a 92 kDa señaladas en el recuadro(A). La respuesta del hibridoma fue determinada por bioensayos con CTLL-2.

DISCUSIÓN

El requerimiento de una Célula Presentadora de Antígeno (CPA) en la inducción de una respuesta inmune está bien establecido (Allen *et al.*, 1984). Las células T reconocen a péptidos antigénicos específicos, unidos a moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH) de las CPA. La señal generada del complejo CPH/péptido/Célula T por medio de su receptor (TCR) permite la activación de linfocitos T. Este complejo es un elemento clave para inducir una respuesta inmune.

Las células T sólo reconocen determinantes lineales de fragmentos de proteínas compuestas de 15-30 residuos de aminoácidos (Otvos *et al.*, 2000). La inmunidad a giardiasis basada en células T ha sido escasamente estudiada. Una herramienta biológica que nos permita el entendimiento de la respuesta de tipo celular son los hibridomas de células T. Estos, son usados principalmente para investigación de actividad de las células T cooperadoras, tanto para el establecimiento de la especificidad de péptidos que desencadenan una respuesta inmune, así como el entendimiento de mecanismos del procesamiento de antígeno/selección de epítopes (Dzhambazov *et al.*, 2003).

En este trabajo nosotros separamos una mezcla antigénica proveniente de una cepa de *G. lamblia* por electroforesis (SDS-PAGE), con una posterior elución de proteínas y la generación de hibridomas de células T nos reveló que existen antígenos inmunodominantes de *G. lamblia* que inducen una respuesta

de tipo celular estimulando fuertemente a los hibridomas 4D5 y 10G5 produciendo IL-2 cuando son procesados y presentados por una línea de células B. Se caracterizaron inmunológicamente dos hibridomas de células T: 10G5.E3 y 4D5.E10, que son estimulados por aminoácidos que se encuentran en un rango de 70 y 92kDa para el hibridoma 4D5.E10 y 100-109 kDa para el hibridoma de célula T 10G5.E3.

Estos hibridomas de células T mantienen una buena sensibilidad para reconocer antígenos presentados por CPA. Para futuros estudios esta herramienta ilimitada nos va a permitir de elucidar el mecanismo por el cual *G. lamblia* provoca una respuesta inmune de tipo celular, así como la caracterización bioquímica y molecular de epítopes antigénicos que estimulan una respuesta de tipo celular.

CONCLUSIONES

- Se obtuvo una mezcla heterogénea de proteínas a partir de extractos antigénicos de *G. lamblia* y se establecieron las condiciones óptimas para el ensayo de proliferación de células T *in vitro* para bazo y placas de Peyer.
- Se generaron hibridomas de células T de ratones infectados específicos para antígenos inmunodominantes de *G.lamblia*. Los hibridomas de células T 10G5.E3 y 4D5.E10 fueron seleccionados por su capacidad de reconocimiento a proteínas específicas de *G. lamblia*. El hibridoma de célula T 10G5.E3 fue estimulado por alguna proteína que se encuentra en un rango de 100-109 kDa, mientras que el hibridoma de célula T 4D5.E10 fue estimulado por alguna proteína que se encuentra en un rango de 70-92 kDa.
- Estos hibridomas de células T son células inmortales y son herramientas biológicas que nos permitirán el conocimiento del mecanismo de procesamiento y presentación de antígenos de *Giardia* a CPA (en un modelo "in vitro").

BIBLIOGRAFÍA

Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:447-75.

Ali SA, Hill DR. *Giardia intestinalis*. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16:453-60.

Allen PM, Strydom DJ, Unanue ER. Processing of lysozyme by macrophages: Identification of the determinant recognized by two T-cell Hybridomas. *Proc Natl Acad Sci* 1984; 81: 2489-2493

Astiazarán-García Humberto, Espinosa-Cantellano Martha, Castañón Guadalupe, Chávez-Mungula Bibiana and Martínez-Palomo Adolfo. *Giardia lamblia*: Effect of Infection with Symptomatic and Asymptomatic Isolates on the Growth of Gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Experimental Parasitolog* 2000; 95:128-135.

Boyer M, Novak Z, Fotedar A, Singh B. Contribution of antigenic processing to the recognition of a synthetic peptide antigen by specific T cell hybridomas. *J of Mol Recognition* 1988; 1: 99-106.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.

Buret A, Gall DG, Nation PN, Olson ME. Intestinal protozoa and epithelial cell kinetics, structure and function. *Parasitol Today* 1990; 6:375-80.

Byrd LG, Conrad JT, Nash TE. *Giardia lamblia* infections in adult mice. *Infect Immun* 1994; 62:3583-5.

Canaday DH, Gehring A, Leonard EG, Eilertson B, Schreiber JR, Harding CV, Boom WH. T-cell hybridomas from HLA-transgenic mice as tools for analysis of human antigen processing. *J Immunol Methods* 2003; 281:129-42.

Chaudhuri PP, Das D, Sarkar S, Munoz ML, Das P. Biochemical and immunological characterization of soluble antigens of *Giardia lamblia*. *Parasitol Res* 1997; 83 :604-10

Chou YK, Culbertson N, Rich C, LaTocha D, Buenafe AC, Huan J, Link J, Wands JM, Born WK, Offner H, Bourdette DN, Burrows GG, Vandenbark AA. T-cell hybridoma specific for myelin oligodendrocyte glycoprotein-35-55 peptide produced from HLA-DRB1*1501-transgenic mice. *J Neurosci Res* 2004; 77:670-80.

Dzhambazov B, Teneva I, Koleva L, Asparuhova D, Popov N. Morphological, genetic and functional variability of a T-cell hybridoma line. *Folia biologica (Praha)* 2003; 49: 87-94.

Eckmann L. Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite Immunol* 2003; 25:259-70.

Eckmann L, Gillin FD. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions I. Pathophysiological aspects of enteric infections with the lumen-dwelling protozoan pathogen *Giardia lamblia*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280:G1-6.

Fagarasan S, Honjo T. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:63-72.

Farthing MJ. Immune response-mediated pathology in human intestinal parasitic infection. *Parasite Immunol* 2003; 25:247-57.

Faubert G. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:35-54.

Faubert GM. The immune response to Giardia. *Parasitol Today* 1996; 12:140-5.

Flanagan, P. A. *Giardia*–diagnosis, clinical course and epidemiology: a review. *Epidemiol. Infect* 1992; 109:1–22.

Furness BW, Beach MJ, Roberts JM. Giardiasis surveillance-United States, 1992-199. *MMWR CDC Surveill Summ* 2000; 49:1-13.

Goto R, Panter-Brick C, Northrop-Clewes CA, Manahdhar R, Tuladhar NR. Poor intestinal permeability in mildly stunted Nepali children: associations with weaning practices and *Giardia lamblia* infection. *Br J Nutr* 2002; 88:141-9.

Gottstein B., Harriman G.R., Conrad J.T., Nash T.E. Antigenic variation in *Giardia lamblia*: cellular and humoral immune response in a mouse model. *Parasite Immunol* 1990; 12:659-73.

Gottstein B, Stocks NI, Shearer GM, Nash TE. Human cellular immune response to *Giardia lamblia*. *Infection* 1991; 19:421-6.

Keister, D.B. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983; 77:487-8.

Kucheria TV, Polushkina MG, Anishchenko NV, Gorban' Lla, Avdiukhina TI. Outbreak of giardiasis at a preschool children establishment in the town of Perm. *Med Parazitol (Mosk)* 2002; 2:51-3.

Langford TD, Housley MP, Boes M, Chen J, Kagnoff MF, Gillin FD, Eckmann L. Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia* spp. *Infect Immu* 2002; 70:11-8.

Northrop-Clewes CA, Rousham EK, Mascie-Taylor CN, Lunn PG. Anthelmintic treatment of rural Bangladeshi children: effect on host physiology, growth, and biochemical status. *Am J Clin Nutr* 2001; 73:53-60.

Oberhuber G, Kastner N, Stolte M. Giardiasis: a histologic analysis of 567 cases. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32:48-51.

Otvos L, Pease AM, Bokonyi K, Giles-Davis W, Rogers ME, Hintz PA, Hoffman R, Ertl HCJ. In situ stimulation of a T helper cell hybridoma with a cellulose-bound peptide antigen. *J Immunol Methods* 2000; 233:95-105.

Romagnani, S. - Biology of human TH1 and TH2 cells. *J. clin. Immunol* 1995; 15: 121-129.

Rosales-Borjas DM, Diaz-Rivadeneyra J, Dona-Leyva A, Zambrano-Villa SA, Mascaro C, Osuna A, Ortiz-Ortiz L. Secretory immune response to membrane antigens during *Giardia lamblia* infection in humans. *Infect Immun* 1998; 66:756-9.

Sackey ME, Weigel MM, Armijos RX. Predictors and nutritional consequences of intestinal parasitic infections in rural Ecuadorian children. *J Trop Pediatr* 2003; 49:17-23.

Scheer JM, Ryan CA. A method for the quantitative recovery of proteins from polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 2001; 298:130-2.

Scott KG, Yu LC, Buret AG. Role of CD8+ and CD4+ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. *Infect Immun* 2004; 72:3536-42.

Shubair ME, Yassin MM, al-Hindi AI, al-Wahaidi AA, Jadallah SY, Abu Shaban N. Intestinal parasites in relation to haemoglobin level and nutritional status of school children in Gaza. *J Egypt Soc Parasitol* 2000; 30: 365-75

Singer SM, Nash TE. T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect Immun* 2000; 68:170-5.

Vidovic D, Graddis TJ, Stepan LP, Zaller DM, Laus R. Specific stimulation of MHC-Transgenic mouse T-Cell hybridomas with xenogeneic APC. *Human Immunology* 2003; 64: 238- 244.

WHO, 2005 (http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/en/S01.pdf).

ANEXO

En esta sección se incluye información detallada acerca de la metodología utilizada en este trabajo, para la obtención de hibridomas de células T especificos de *Giardia lamblia*. Se describe desde la manera de cultivar a *G. lamblia*, hasta los ensayos de células utilizados. Esta metodología se puede adaptar al tipo de muestra que se desee estudiar.

Cultivo de *Giardia lamblia*

Material

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

Medio de Cultivo TYI-S-33

Bilis	50 mg
Tripticasa	2.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
Dextrosa	1.0 g
Cloruro de Sodio	0.2 g
L-Cisteína	0.2 g
L-Ascórbico	0.01 g
Citrato Férrico Amoniacal	2.3 mg
Fosfato Monobásico	60 mg
Fosfato Dibásico	100 mg

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

Procedimiento

1. Colocar aprox. 7.5 mL de medio TYI-S-33 suplementado al 10% con suero bovino en un tubo de ensayo 13 x 100 estéril.

2. Adicionar 0.5 mL de cultivo de Giardia lamblia GS-H7 en confluencia ($1x10^6$ trofozoitos/mL).

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

Antígeno soluble de *Giardia lamblia*

Procedimiento

1. Se necesitan cultivos axénicos de trofozoitos de *Giardia lamblia* de la cepa GSH7 en tubos de ensayo con tapón de rosca.
2. Se mantienen en hielo por 15 min, para que las *Giardias* se despeguen del vidrio.
3. Se centrifugan a 800xg por 10 min a 4°C (Se resuspenden y se juntan en 2 tubos).
4. Lavar 3 veces con PBS estéril pH 7.2, centrifugando a 800xg 10 min a 4°C. Cada lavado se hace con 10 mL.
5. Resuspender en 1.4 mL de PBS pH 7.2.
6. Se realiza una cuenta celular en hemacitómetro con una dilución 1:200. Por otro lado se realiza la lisis celular (1.935 ml de suspensión en tubo eppendorf).

7. Congelar y descongelar 3 veces en Nitrógeno líquido a temperatura ambiente

8. Adicionar 5µL de inhibidores de proteasa.

9. Sonicar a 20 ciclos por 2 min (2 veces)

10. Centrifugar a 14,000 xg a 4°C por 15 min

11. Se obtiene el sobrenadante que es el antígeno soluble.

Elución pasiva de proteínas de geles en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE).

Procedimiento

1. Se utilizan geles preparativos de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) al 12% de 1.5 mm de ancho, con una concentración de 400 µg de la mezcla antigénica.

2. Dividir cuidadosamente en 6 fracciones de aproximadamente 1cm. Estas a su vez se cortan en 3 fracciones de aprox. 0.33 cm y colocar en tubos de vidrio.

3. Se maceran utilizando émbolos de jeringas.

4. Disolver en 1 mL de PBS diluido 1:10. Agitar vigorosamente en vortex.

5. Incubar a 4°C toda la noche. Al día siguiente agitar de nuevo.

6. Centrifugar a 1000xg por 10 minutos para sedimentar el gel.

7. Obtener el sobrenadante.

8. Secar las muestras totalmente en un evaporador speed-vac (Savant, DNA110).

9. Resuspender en agua deionizada en un volumen de 100 µL.

10. Determinar proteína por el método del Ácido Bicinconínico (Micro BCA, PIERCE, Rockford, IL).

Fraccionamiento por HPLC

Procedimiento

1. Obtención de la mezcla antigénica de *G. lamblia*.

2. Fraccionamiento en HPLC en fase reversa

   Columna Vydac 218TP54 C_{18} (tamaño de la partícula 5µm, 4.6 mm x 25 cm, 300ªA diámetro del poro).

   Se utiliza un gradiente de acetonitrilo.

   Solventes:

   A. 0.06% ácido trifluoroacético en agua

   B. 0.052% de ácido trifluoroacético en 80% de acetonitrilo.

Gradiente:

60 min: 2- 37.5% solvente B

25 min: 37.5- 75% solvente B

15 min: 75- 98%

Se colectan cada 0.5 min, Velocidad de flujo: 0.5 mL/min, absorbancia: 214 y 280 nm.

Ensayo de linfoproliferación

Procedimiento

1. Recolectar el bazo de ratones infectados con *Giardia lamblia*.
2. Homogenizar los órganos linfoides (bazo).
3. Lavar 1X las células con medio DMEM suplementado al 10% con suero fetal bovino (D10F) a 1500 rpm por 5 minutos a 4°C.
4. Eliminar los glóbulos rojos de las células de bazo utilizando la solución reguladora ACK (solución de lisis), utilizando un tubo de 50 mL. Adicionar 5 mL de la solución ACK al paquete celular de células de bazo. Incubar por 5 minutos a temp. Ambiente (a los 2.5 min dar una ligera agitación). CUIDADO: No exceder en tiempo porque se lisan las células de interés.

NOTA: Las células de Placa de Peyer y Nódulos linfáticos mesentéricos se dejan en hielo hasta su uso.

5. Adicionar 10 mL de D10F.

6. Centrifugar a 1500 rpm por 5 min a 4°C.

7. Lava las células 1X con 10 mL de D10F a 1500 rpm por 5 min a 4°C.

8. Resuspender las células en 5 mL de D10F y cuenta las células con azul de Tripano.

9. Ajustar las células a 200,000/ mL.

10. adicionar 100 µL por pozo.

11. Adicionar el antigeno a estudiar a diferentes concentraciones.

Generación de Hibridomas de Células T

Procedimiento

1. Inmunizar ratones con 100 µg de la mezcla de antigenos solubles de G. *lamblia* y adyuvante completo de Freund (Gibco) en cada cojinete plantar.

2. Obtener los ganglios linfáticos al dia 8 post-inmunización.

3. Resuspender las células en D10F.

4. Realizar una cuenta celular en una cámara de Neubauer.

5. Esterilizar la mezcla antigénica por filtro de membrana de 0.20µm para evitar contaminación.

6. Estimular las células con la mezcla antigénica a una concentración de 1µM

7. Incubar a 37°C por 3 dias hasta que se observar crecimiento celular.

8. Transferir las células T del cultivo a tubos cónicos (Falcon) y centrifugar a 700xg 3 veces por 10 min. Resuspender en D10F a temperatura ambiente.

9. Contar las células que crecieron(utilizando una dilución 1:4) y las células de fusión: células T BW5147$\alpha^-\beta^-$

Nota: La cantidad de células BW5147$\alpha^-\beta^-$ debe ser 3 veces mayor que la cantidad de las células T provenientes de ratón. Se hace una relación 1:3 de las células (1 célula T proveniente de ratón por cada 3 células BW5147$\alpha^-\beta^-$).

10. Mezclar ambas células

11 Realizar 3 lavados con D10F a 37°C.

12 Colectar todo el medio y centrifugar a 700xg 1X por 2 min.

13 Decantar el medio

14. Colocar las células en baño de agua previamente equilibrado a 37°C y realizar los siguientes pasos: adicionar 1 mL de Polietilenglicol al 50% (PEG 1500) gota a gota por 1 minuto, agitando las células. Adicionar 2 mL de DMEM gota a gota por 2 minutos. Después adicionar 7 mL de DMEM gota a gota por 3 minutos. Todos estos pasos deben hacerse controlados, en tiempo, volumen y temperatura.

15 Centrifugar a 700 xg durante 5 minutos y eliminar el medio con una pipeta.

16 Resuspender cuidadosamente en D10F y colocar en placas de 96 pozos.

Medio selectivo HAT (Hipoxantina-Aminopterina-Timidina)

Procedimiento

Este medio permite el crecimiento solo de las células que se fusionaron y se prepara de la siguiente manera:

1. Resuspender un vial de medio HAT (SIGMA) en 10 mL de DMEM.
2. Transferir a 200 mL de DMEM.
3. Adicionar 25 mL de Suero Fetal Bovino (decomplementado).
4. Ajustar a un volumen de 250 mL con DMEM.
5. Filtrar por 0.20 µm.

Tamizaje de Hibridomas de Células T específicos para *Giardia lamblia*

Procedimiento

Para el tamizaje o selección de hibridomas específicos de *G. lamblia* se utiliza el bioensayo de hibridomas de células T.

1. Contar las líneas celulares: hibridomas de células T obtenidos en la fusión y Células Presentadoras de Antígeno (CPA: $M12.A^k$).
2. Estimar las células necesarias y se ajustar a 100,000 células de hibridomas en 100 µL, 50,000 CPA ($M12.A^k$) en 50 µL.

3. Ajustar el antígenoa la concentración que se desea probar en 50 µL.

Es recomendable utilizar diferentes concentraciones, ya que concentraciones muy altas pueden ser tóxicas para las células.

4. Colocar en placas de 96 pozos en fondo plano e incubar por 20 horas a 37°C en condiciones de CO_2.

5. Recuperar 100 µL de sobrenadante por pozo y transferirlo a otra placa idéntica.

6. Congelar las placas con el sobrenadante obtenido a -40°C por lo menos 1 hora.

7. Las células CTLL se lavan 5 veces a 700xg. con DMEM.

Este paso es muy importante, ya que si las células fueron recientemente cambiadas de medio, posiblemente los resultados obtenidos no sean los esperados, ya que al momento de medir proliferación las células se verían iguales tanto en control positivo como negativo, lo cual no sería significativo en el ensayo. Por lo cual se recomienda que por lo menos las células CTLL-2 estén 3 días en medio DMEM suplementado al 5% con SFB (D5F), así como con IL-2 que se le agrega para su crecimiento.

8. Ajustar las células a 40,000 cél por 50 µl/pozo con medio D5F y colocarlas en la placa con el sobrenadante

9. Incubar por 20 horas a 37°C en atmósfera de CO_2.

Utilizar como controles internos a células CTLL más IL-2, como control positivo (40,000 células/50 µl de CTLL con 10 µl de IL-2) y como control

negativo: CTLL con D5F. Aquéllos hibridomas de células T que fueron específicos de *G. lamblia* fueron activados, produciendo IL-2. Después del tiempo de incubación se realizó una evaluación de la proliferación celular por el método de MTT.

Evaluación de la proliferación celular por el método de MTT

Este método se basa en la reducción del MTT (3-4,5-dimetilthiazol-2 y 1)-2,5-difeniltetrazolium bromuro) a formazan, ocasionando solamente por células biológicamente activas y la señal generada, depende del grado de activación de las mismas. Los cristales de formazan resultantes se solubilizan con isopropanol acídico y la absorbancia de la solución colorida generada se lee a 570-655nm en un lector de ELISA.

Procedimiento

1. Después de incubar a las células CTLL-2 con el sobrenadante en donde se encuentra la IL-2 proveniente de los hibridomas de células T activadas adicionar 15 µL de MTT.
2. incubar por 4 horas a 37°C en condiciones de CO_2.
3. Adicionar 150 µl de isopropanol acídico.

4. Obtener la proliferación de CTLL-2 por absorbancia a 570-655nm en un lector de ELISA.

REFERENCIAS

Byrd LG, Conrad JT, Nash TE. *Giardia lamblia* infections in adult mice. *Infect Immun* 1994; 62:3583-5.

Scheer JM, Ryan CA. A method for the quantitative recovery of proteins from polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 2001; 298:130-2.