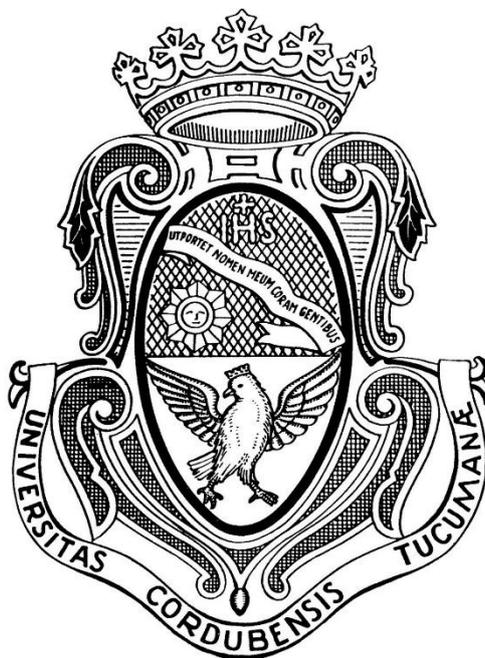


UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA
SEÑALIZACIÓN Y RECAMBIO DE LAS PROTEÍNAS
VARIABLES DE SUPERFICIE DURANTE EL PROCESO DE
VARIACIÓN ANTIGÉNICA EN EL PARÁSITO
INTESTINAL *GIARDIA LAMBLIA*.**

Autor: Lic. Albano H. Tenaglia

Centro de Investigación y Desarrollo en Inmunología y Enfermedades
Infecciosas (CIDIE - UCC/CONICET).

2021

DIRECTOR DE TESIS

DR. PABLO RUBEN GARGANTINI. Centro de Investigación y Desarrollo en Inmunología y Enfermedades Infecciosas (CIDIE – UCC/CONICET). Universidad Católica de Córdoba.

COMISIÓN EVALUADORA

DR. JOSÉ LUIS BARRA. Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC – UNC/CONICET). Universidad Nacional de Córdoba.

DRA. LAURA SILVINA CHIAPELLO. Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI – UNC/CONICET). Universidad Nacional de Córdoba.

DR. JUAN PABLO NICOLA. Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI – UNC/CONICET). Universidad Nacional de Córdoba.

DR. ANTONIO UTTARO. Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR – UNR/CONICET). Centro Científico Tecnológico CONICET Rosario.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar al Dr. Hugo D. Luján, por abrirme las puertas de su laboratorio y haberme dado la posibilidad de trabajar en un proyecto tan interesante como desafiante. Gracias además por creer en mí, dándome la libertad de transitar este camino a mi manera, estando abierto para discutir nuevas ideas que siempre se han visto enriquecidas con su visión y su experiencia.

Al Dr. Pablo R. Gargantini, agradezco su compromiso y apoyo constante. Gracias por haber estado siempre disponible para darme una mano cuando lo necesité y por haberme dado la libertad y confianza de llevar a cabo este proyecto de investigación con independencia.

Esta tesis se debe también a la colaboración de muchas personas, y me ha dejado muchos amigos. Agradezco a mis compañeros del CIDIE con quienes he compartido tantos momentos a lo largo de estos años y sin dudas han hecho más llevadero el camino. En particular a Diego, con quién codo a codo nos pusimos al frente de este proyecto, gracias por facilitar este camino y hacerlo más ameno. A Sergio, por su ayuda con los experimentos en modelos animales, por su compromiso y predisposición tanto profesional como personal. A Alicia, por su ayuda con el desarrollo de los anticuerpos monoclonales y sueros policlonales que han sido una herramienta esencial. A Marianela y Lucía por aportar su experiencia y colaboración en los experimentos de citometría de flujo. A Florencia, por su predisposición constante y su invaluable ayuda en temas administrativos; y por supuesto también a Ceci, Damián, Guille, Julia, Lucas, Luciana, Mati y Román con quienes hemos compartido largas horas de trabajo y charlas.

Las imágenes de microscopías electrónicas de alta resolución no habrían sido posibles sin la colaboración de los doctores Wanderley de Souza y Victor do Valle Midlej, con quienes tuve el placer de trabajar y aprender durante mi estancia en la Universidad Federal de Río de Janeiro. También quiero agradecer al Dr. Juan Pablo Petitti (INICSA-UNC/CONICET), por su colaboración en la obtención de imágenes de microscopía electrónica de transmisión con tinción negativa para la caracterización de microvesículas.

Agradezco también a las doctoras Vanina E. Álvarez, Paula Irribarren y Agustina Berazategui (IIBio-UNSaM/CONICET), con quienes tuve la posibilidad de trabajar en otro parásito modelo de variación antigénica (*Trypanosoma brucei*) en el marco de una colaboración que si bien excede el presente trabajo de tesis, el mismo se ha visto enriquecido con el intercambio de conocimientos e ideas realizado en estos años, que me brindó una perspectiva mucho más amplia del fenómeno de variación antigénica en protozoarios.

A la Comisión Asesora de tesis, integrada por el Dr. José Luis Barra (CIQUIBIC-UNC/CONICET), la Dra. Laura Chiapello (CIBICI-UNC/CONICET) y el Dr. Juan Pablo Nicola (CIBICI-UNC/CONICET), les agradezco por el seguimiento de este trabajo desde sus inicios y por la corrección del manuscrito y los aportes realizados.

También quiero agradecer a la Universidad Católica de Córdoba (UCC) y al CONICET por su apoyo en materia de becas e incentivos de investigación que me permitieron dedicarme de manera exclusiva a la concreción de este proyecto.

Finalmente, y fundamentalmente, agradezco a mi familia, amigos y a mi compañera de vida, Julia, por ser mi sostén emocional y por su apoyo incondicional a lo largo de todos estos años.

“Plasticity, then, in the wide sense of the word, means the possession of a structure weak enough to yield to an influence, but strong enough not to yield all at once”.

William James (1890). The Principles of Psychology.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
ABREVIATURAS	3
CAPÍTULO 1: Introducción general y objetivos	6
1.1. <i>Giardia</i> : contexto histórico.	6
1.2. Clasificación filogenética.....	6
1.3. Ciclo de vida.	8
1.4. Características morfológicas del trofozoíto.....	9
1.5. La variación antigénica.	10
1.5.1. Contexto histórico y generalidades.	10
1.5.2. Variación antigénica en <i>Giardia</i>	12
1.6. Efecto de los anticuerpos anti-VSP en trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	15
1.7. Objetivo de estudio	16
CAPÍTULO 2: Materiales y métodos	18
2.1. Cultivo de trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	18
2.2. Anticuerpos monoclonales (mAbs).....	18
2.2.1. Anticuerpos anti-VSP de <i>Giardia</i>	18
2.2.2. Anticuerpos comerciales.....	19
2.3. Generación de suero policlonal anti-TSA417(-).	19
2.4. Generación de fragmentos Fab a partir de anticuerpos monoclonales.....	19
2.5. Marcación de anticuerpos con FITC.	19
2.6. Medición de concentración de proteínas.	20
2.7. Ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI).	20
2.7.1. IFI para cuantificación de clones de VSPs en <i>Giardia</i>	20
2.7.2. IFI para análisis de localización subcelular de determinados componentes en <i>Giardia</i>	20
2.7.2.1. Localización de complejos VSP-mAb en el tiempo.	20
2.7.2.2. Colocalización de las VSPs original y nuevas durante el <i>switching</i> .21	
2.7.2.3. Localización de PI(4,5)P ₂	21
2.8. Infección de Jervos con <i>G. lamblia</i> y extracción de trofozoítos de intestino para su análisis.....	21
2.9. Cuantificación de la clonalidad de cultivos de <i>Giardia</i> por citometría de flujo. .22	
2.10. Electroforesis en gel de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE) y Western Blot.	22
2.11. Modelado <i>in silico</i> del TMD de la VSP1267.....	23
2.12. Ensayo de TOXCAT	23
2.12.1. Construcciones.....	23

2.12.2.	Cuantificación de la expresión del gen reportero.	24
2.12.2.1.	Ensayo de difusión en agar.....	24
2.12.2.2.	ELISA CAT.....	24
2.12.3.	Ensayo de complementación de malE.	24
2.13.	Purificación de membranas resistentes a detergente (DRM).	24
2.14.	Extracción de lípidos ácidos y ensayo de dot-blot para la cuantificación de fosfoinosítidos.....	25
2.15.	Inmunomarcación con oro para estudios de localización subcelular por microscopía electrónica.	25
2.16.	Microscopía electrónica de transmisión (TEM).	25
2.17.	Microscopía electrónica de barrido (SEM).	25
2.18.	Purificación de microvesículas y validación.....	26
2.19.	Proteómica de microvesículas.	26
2.20.	Análisis estadístico.	27
CAPÍTULO 3: Efecto de los anticuerpos anti-VSP sobre la VA en <i>Giardia</i>		29
3.1.	Efecto de los anticuerpos anti-VSP sobre trofozoítos de <i>Giardia</i> desde un enfoque de célula individual (<i>single cell</i>).....	30
3.1.1.	Análisis de la expresión de nuevas VSPs luego de la variación antigénica inducida por anticuerpos.....	30
3.1.2.	Dependencia de la VA con la concentración de anticuerpo y la duración del estímulo.....	31
3.2.	Efecto de los anticuerpos anti-VSP en la cinética de la VA <i>in vitro</i>	33
3.3.	Estudio del mecanismo de VA poblacional (selección vs. inducción) durante infecciones experimentales.	39
3.4.	Conclusiones parciales.	41
CAPÍTULO 4: Detección de la señal y fenómenos de transducción inducidos a nivel de la membrana plasmática durante el proceso de variación antigénica disparada por anticuerpos.		44
4.1.	Las VSPs como receptores de la señal: análisis bioinformático de estructuras potencialmente involucradas en el proceso de señalización.	44
4.2.	Estudio del rol del TMD de las VSPs en la señalización celular.	47
4.2.1.	Estudio <i>in silico</i> de los potenciales modelos de homodimerización de los TMD de las VSPs.....	47
4.2.2.	Determinación cuantitativa de la fuerza de interacción homotípica ente los TMD de las VSPs: ensayo de TOXCAT	50
4.2.3.	Estudio del rol de la capacidad dimerizante de los anticuerpos en la inducción de la VA.	54
4.3.	Estudio del rol de los <i>lipid rafts</i> como plataformas de señalización en la variación antigénica.	56

4.3.1. Determinantes estructurales de raftofilicidad en el extremo C-terminal conservado de las VSPs.....	56
4.3.2. Efecto de la dimerización por anticuerpos en la raftofilicidad de las VSPs.....	57
4.4. Estudio del rol de los fosfoinosítidos (PIs) en la señalización durante la variación antigénica.....	61
4.5. Evaluación de estímulos alternativos capaces de inducir VA.....	63
4.5.1. Lectinas como inductoras de la variación antigénica.....	63
4.5.2. Estrés redox como inductor de la variación antigénica.....	65
4.6. Conclusiones parciales.....	69
CAPÍTULO 5: Mecanismos involucrados en el recambio de las VSPs durante el proceso de VA disparada por anticuerpos.....	72
5.1. Estudio de los cambios en la localización subcelular de los complejos VSP-anticuerpo luego de la inducción del <i>switching</i>	72
5.2. Estudio del rol de la capacidad aglutinante de los anticuerpos en el recambio de las VSPs.....	73
5.3. Estudio a nivel ultraestructural de los microdominios de membrana formados durante el recambio de los complejos VSP-anticuerpo.....	73
5.4. Estudio a nivel ultraestructural de los efectos del estrés redox en trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	85
5.5. Estudio del perfil proteómico de microvesículas liberadas por inducción con anticuerpos.....	85
5.6. Estudio del rol del calcio intracelular en el recambio de las VSPs unidas a anticuerpo.....	89
5.7. Conclusiones parciales.....	91
CAPÍTULO 6: Discusión.....	93
6.1. La variación antigénica en relación con el microambiente: <i>Bet-hedging</i> vs Plasticidad Adaptativa.....	93
6.2. Mecanismos moleculares de sensado de la señal y recambio de las VSPs durante el <i>switching</i> adaptativo en <i>Giardia</i>	94
6.3. La inducción del <i>switching</i> como resultado del estrés celular causado por anticuerpos.....	100
6.4. Comentarios finales.....	101
6.5. Perspectivas futuras.....	102
ANEXOS.....	104
Anexo I.....	104
Anexo II.....	107
Anexo III.....	113
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1.1: Primer dibujo microscópico de características morfológicas que identifican al parásito <i>Giardia</i>	7
Figura 1.2: Clasificación filogenética de <i>Giardia</i>	8
Figura 1.3: Estructura de los trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	10
Figura 1.4: Estructura y localización de las Proteínas Variables de Superficie (VSPs) de <i>Giardia lamblia</i>	13
Figura 1.5: Esquema del mecanismo que controla la expresión de una única VSP en <i>Giardia lamblia</i>	15

CAPÍTULO 3

Figura 3.1: Efecto de los anticuerpos anti-VSP sobre trofozoítos de <i>Giardia</i> desde un enfoque de célula individual	30
Figura 3.2: Dependencia de la VA a nivel poblacional con la concentración de mAb en pulsos de estímulo discretos.....	32
Figura 3.3: Dependencia de la VA con la concentración de anticuerpo y la duración del estímulo	33
Figura 3.4: Patrón de marcación del suero policlonal anti-TSA417(-) y el mAb 7C2 en una población de trofozoítos de <i>Giardia</i>	34
Figura 3.5: Cinética de crecimiento de trofozoítos de <i>Giardia</i> en presencia de mAb anti-VSP.	35
Figura 3.6: Efecto de los anticuerpos anti-VSP en la cinética de la variación antigénica en <i>Giardia</i>	36
Figura 3.7: Dependencia de la cinética de VA con la concentración de anticuerpo inductor .	37
Figura 3.8: Coexpresión de la VSP original y la nueva VSP durante el <i>switching</i>	38
Figura 3.9: Dinámica de la VA de <i>Giardia</i> durante la infección en jerbos	40
Figura 3.10: Perfil de expresión de distintas VSPs durante la infección en jerbos con <i>G. lamblia</i> clon TSA417	41

CAPÍTULO 4

Figura 4.1: Características conservadas del extremo C-terminal de las VSPs.....	46
Figura 4.2: Características del TMD de las VSPs y modelos de interacción	48
Figura 4.3: Ubicación del motivo extendido GAS _{right} en la interfase de interacción del TMD de la VSP1267	49
Figura 4.4: Modelo 3 de interacción entre los TMDs de la VSP1267	50
Figura 4.5: Representación esquemática del ensayo TOXCAT.....	51
Figura 4.6: Determinación semicuantitativa de la fuerza de interacción homotípica entre los TMD de las VSP1267 mediante ensayo de TOXCAT	53

Figura 4.7: Rol de la capacidad dimerizadora de los anticuerpos en la inducción de la variación antigénica	55
Figura 4.8: Determinantes estructurales de raftofilicidad en el extremo C-terminal conservado de las VSPs.....	57
Figura 4.9: Ensayo de resistencia diferencial a detergente por citometría de flujo	58
Figura 4.10: Efecto de los anticuerpos en el equilibrio de partición de las VSPs en membranas resistentes a detergentes (DRMs)	60
Figura 4.11: Rol de los fosfoinosítidos en la señalización durante la VA	62
Figura 4.12: Análisis de lectinas como inductoras de la VA en <i>Giardia</i>	64
Figura 4.13: Cambios conformacionales en VSPs inducidos por estrés oxidativo	66
Figura 4.14: Efecto del estrés oxidativo en la VA de <i>G. lamblia</i>	69

CAPÍTULO 5

Figura 5.1: Cambios en la localización subcelular de los complejos VSP-anticuerpo en el tiempo.....	74
Figura 5.2: Microdominios observados durante el recambio de las VSPs unidas a anticuerpo	75
Figura 5.3: Microscopía electrónica de barrido (SEM) de trofozoítos no tratados con anticuerpos	77
Figura 5.4: Microscopía electrónica de barrido (SEM) de trofozoítos tratados con anticuerpos anti-VSP.....	78
Figura 5.5: Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de trofozoítos TSA417 tratados con mAb 7C2.....	79
Figura 5.6: Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de trofozoítos de diferentes clones tratados con anticuerpos anti-VSP	80
Figura 5.7: Distribución de tamaños de las microvesículas liberadas por <i>Giardia</i> en respuesta a anticuerpos	81
Figura 5.8: Microscopía electrónica de barrido de alta resolución (HR-SEM) de trofozoítos que expresan la VSP TSA417 tratados con mAb 7C2.....	82
Figura 5.9: Microscopía electrónica de barrido de alta resolución (HR-SEM) de trofozoítos que expresan la VSP TSA417 sometidos a estrés oxidativo.....	83
Figura 5.10: Microscopía electrónica de barrido de alta resolución (HR-SEM) de trofozoítos que expresan la VSP 1267 sometidos a estrés oxidativo.....	84
Figura 5.11: Validación de microvesículas purificadas a partir de trofozoítos que expresan la VSP TSA417	86
Figura 5.12: Perfil proteómico de microvesículas derivadas de trofozoítos de <i>Giardia</i> que expresan la VSP TSA417.....	88
Figura 5.13: Rol del calcio intracelular en el recambio de las VSPs unidas a anticuerpo	90

CAPÍTULO 6

Figura 6.1: Modelo de dimerización de los TMD de las VSPs y su partición en <i>lipid rafts</i>	96
Figura 6.2: Modelo de sensado de señales multimodal	98
Figura 6.3: Modelo de <i>switching</i> inducido por anticuerpos en <i>Giardia</i>	99

LISTA DE TABLAS

CAPÍTULO 1

Tabla 1.1: Ejemplos de patógenos microbianos con variación antigénica	11
---	----

CAPÍTULO 2

Tabla 2.1: Lista de anticuerpos monoclonales (mAbs) contra diferentes VSPs de <i>G. lamblia</i> .	18
---	----

CAPÍTULO 3

Tabla 3.1: Análisis de la expresión de nuevas VSPs luego del <i>switching</i>	31
---	----

CAPÍTULO 4

Tabla 4.1: Dominios transmembrana ensayados por TOXCAT	52
--	----

CAPÍTULO 5

Tabla 5.1: Proteínas más abundantes en las microvesículas generadas a partir de trofozoítos TSA417 tratados con mAb 7C2	87
---	----

Tabla 5.2: VSPs presentes en las muestras de microvesículas generadas a partir de trofozoítos TSA417 tratados con mAb 7C2.....	87
--	----

RESUMEN

El protozooario parásito *Giardia lamblia* habita el intestino delgado de una gran variedad de mamíferos y es el agente causal de la giardiasis. Para sobrevivir dentro del intestino *Giardia* manifiesta variación antigénica. Por medio de este proceso, este protozooario cambia continuamente sus principales moléculas de superficie, lo que le permite evadir la respuesta inmune del hospedador. Estos antígenos de superficie pertenecen a una familia denominada proteínas variables de superficie (VSPs). De un repertorio de ~150 genes codificantes de VSPs presentes en el genoma del parásito, todos son transcritos simultáneamente pero sólo una VSP se expresa en la superficie del parásito en un momento dado. Hasta la fecha, existe un consenso en la comunidad de especialistas acerca de la “espontaneidad” de la variación antigénica en *G. lamblia* y de los efectos citotóxicos de anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra las VSPs. Sin embargo, mediante un nuevo enfoque hemos demostrado que los mismos no solo no son citotóxicos, sino que además son capaces de disparar el proceso de variación antigénica. Este hecho nos llevó a postular la hipótesis de que la variación antigénica es un proceso más complejo de lo previamente sugerido y se encuentra regulado por estímulos del microambiente. En el presente trabajo de tesis nos propusimos estudiar los mecanismos moleculares responsables de la detección de la señal de anticuerpos que lleva a la inducción de la variación antigénica en el parásito, como así también los mecanismos de recambio de una VSP por otra luego de iniciado este proceso. Nuestros resultados muestran que los anticuerpos son capaces de inducir la dimerización de las VSPs a través de sus dominios transmembrana, lo que incrementa la partición de las mismas en *lipid rafts*. La estabilización de las VSPs unidas a anticuerpos en estas plataformas lipídicas activa la maquinaria de formación de microvesículas, las cuales se generan por procesos de evaginación de la membrana y constituyen la vía de eliminación de la VSP original permitiendo su recambio por la nueva VSP durante la variación antigénica. Este novedoso mecanismo de eliminación del antígeno de superficie a través de una liberación rápida y masiva de microvesículas acopladas a la inducción de variantes antigénicas no solo cambia el paradigma actual de la variación antigénica como proceso espontáneo, sino que también proporciona un nuevo marco para comprender la dinámica de las infecciones por protozoarios.

ABSTRACT

The protozoan parasite *Giardia lamblia* inhabits the small intestine of a wide variety of mammals and is the causative agent of giardiasis. In order to survive within the intestine, *Giardia* manifests antigenic variation. Through this process, the protozoan continually changes its main surface molecules, allowing it to evade the host's immune response. These surface antigens belong to a family called variant-specific surface proteins (VSPs). Out of a repertoire of ~150 *vsp* genes present in the parasite genome, all are transcribed simultaneously but only one VSP is expressed on the parasite surface at any time. To date, there is a consensus in the specialist community about the "spontaneity" of antigenic variation in *G. lamblia* and the cytotoxic effects of specific monoclonal antibodies directed against VSPs. However, through a new approach we have shown that antibodies to VSPs are not only not cytotoxic, but are also capable of triggering antigenic variation. This fact led us to postulate the hypothesis that antigenic variation is a more complex process than previously suggested and is regulated by stimuli from the microenvironment. In this thesis work we set out to study the molecular mechanisms responsible for the detection of the antibody signal that leads to the induction of antigenic variation in the parasite, as well as the mechanisms of VSP switching after initiating this process. Our results show that antibodies are capable of inducing the dimerization of VSPs through their transmembrane domains, which increases their partition into lipid rafts. The stabilization of the VSPs bound to antibodies in these lipid platforms activates the machinery for the formation of microvesicles, which are generated by processes of budding from the membrane and constitute the route of elimination of the original VSP allowing its replacement by the new VSP during antigenic variation. This novel mechanism of surface antigen removal through rapid and massive release of microvesicles coupled to the induction of antigenic variants not only changes the current paradigm of antigenic variation as a spontaneous process, but also provides a new framework for understanding the dynamics of protozoan infections.

ABREVIATURAS

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfato (5-**b**romo-4-**cl**oro-3-**ind**o^{yl} **p**hosphate).

BSA: albúmina sérica bovina (**b**ovine **s**erum **a**lbumin).

CAT: **cl**oranfenicol **a**cetil-transferasa.

CEACAM1: Molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 1 (**C**arcino**e**mbr**y**onic **a**ntigen-related **c**ell **a**dhesion **m**olecule 1).

ConA: **con**canavalina **A**.

CRAC: secuencia de aminoácidos consenso de reconocimiento/interacción de colesterol (**c**holesterol **r**ecognition/interaction **a**mino acid **c**onsensus).

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol (4',6-**d**iamidino-2-**p**henylindole).

dpi: **d**ías **p**ost-infección.

DRM: membranas resistentes a detergente (**d**etergent-resistant **m**embranes).

DSM: membranas solubles en detergente (**d**etergent-soluble **m**embranes).

EDTA: ácido **e**tilediaminotetraacético.

ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (**e**nzyme-linked **i**mmunosorbent **a**ssay).

FCDR: ensayo de resistencia diferencial a detergente por citometría de flujo (**f**low **c**ytometric assay of **d**ifferential detergent resistance).

FITC: isotiocianato de fluoresceína (**f**luorescein isotiocyanate).

GlcNAc: N-acetil glucosamine.

GpA: glicoforina A (**g**lycophorin **A**).

GPI: glicosilfosfatidilinositol (**g**lycosyl**p**hosphatidy**i**nositol).

h: horas.

HA: epitope hemaglutinina del virus influenza.

HR-SEM: microscopía electrónica de barrido de alta resolución (**h**i-resolution **s**canning **e**lectron **m**icroscopy).

IFI: inmunofluorescencia indirecta.

Ig: inmunoglobulina.

kDa: **k**ilodaltons.

LC-MS/MS: cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem.

Ld: fase líquida **d**esordenada.

Lo: fase líquida **o**rdenada.

LPS: lipopolisacárido.

mAb: anticuerpo monoclonal (**m**onoclonal **a**ntibody).

MBCD: **m**etil-**β**-**c**iclodextrina.

MBP: proteína de unión a maltosa (**maltose-binding protein**)

NBT: nitroazul de tetrazolio (**nitroblue tetrazolium**).

ORF: marco abierto de lectura (**open reading frame**).

RPE: Ficoeritrina R (**R Phycoerytrin**)

pAb: anticuerpo policlonal (**polyclonal antibody**).

PBS: buffer fosfato salino (**phosphate buffer saline**).

PE: ficoeritrina (**phycoerythrin**).

PFA: **paraformaldehído**.

PI3P: fosfatidilinositol-3-fosfato (**phosphatidylinositol-3-phosphate**).

PI(3,4)P₂: fosfatidilinositol-3,4-bifosfato (**phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate**).

PI(3,4,5)P₃: fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (**phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate**).

PI(3,5)P₂: fosfatidilinositol-3,5-bifosfato (**phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate**).

PI4P: fosfatidilinositol-4-fosfato (**phosphatidylinositol-4-phosphate**).

PI(4,5)P₂: fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (**phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate**).

PI5P: fosfatidilinositol-5-fosfato (**phosphatidylinositol-5-phosphate**).

PIs: fosfoinosítidos (**phosphoinositides**).

SEM: microscopía electrónica de barrido (**scanning electron microscopy**).

SIM: microscopía de iluminación estructurada (**structured illumination microscopy**).

SpC: recuento espectral (**spectral count**).

TBS: buffer tris salino (**tris buffer saline**).

TEM: microscopía electrónica de transmisión (**transmission electron microscopy**).

TMD: dominio transmembrana (**transmembrane domain**).

VA: **variación antigénica**.

VSG: glicoproteína variable de superficie (**variable surface glycoprotein**)

VSP: proteína variable de superficie (**variant-specific surface protein**)

WGA: aglutinina de germen de trigo (**wheat germ agglutinin**).

CAPÍTULO 1

Introducción general y objetivos

1. CAPÍTULO 1: Introducción general y objetivos

1.1. *Giardia*: contexto histórico.

En 1681, Anton van Leeuwenhoek (1632-1723), el padre de la microscopía, describió por primera vez a *Giardia* mientras observaba sus propias heces bajo un microscopio primitivo. Sus observaciones fueron publicadas en una carta a la *Royal Society* de Londres el 9 de noviembre de ese año donde describe por primera vez a este microorganismo de la siguiente forma^{1,2}:

"A veces también he visto pequeñas criaturas moviéndose muy bonito; algunas de ellas un poco más grandes, otras un poco menos que un glóbulo de sangre, pero todas del mismo aspecto. Sus cuerpos eran algo más largos que anchos, y su barriga, que era plana, estaba provista de varias patas pequeñas, con las que causaban tanto revuelo en el medio transparente y entre los glóbulos, que incluso podrías imaginarlas como bichos bolita chocando contra una pared; y aunque hacían un movimiento rápido con sus patas, sin embargo, a pesar de todo lo que hacían, su avance era lento".
Carta n° 66 dirigida a Robert Hooke, del 4 de noviembre de 1681, en el libro L1 del archivo Leeuwenhoek de la Royal Society de Londres.

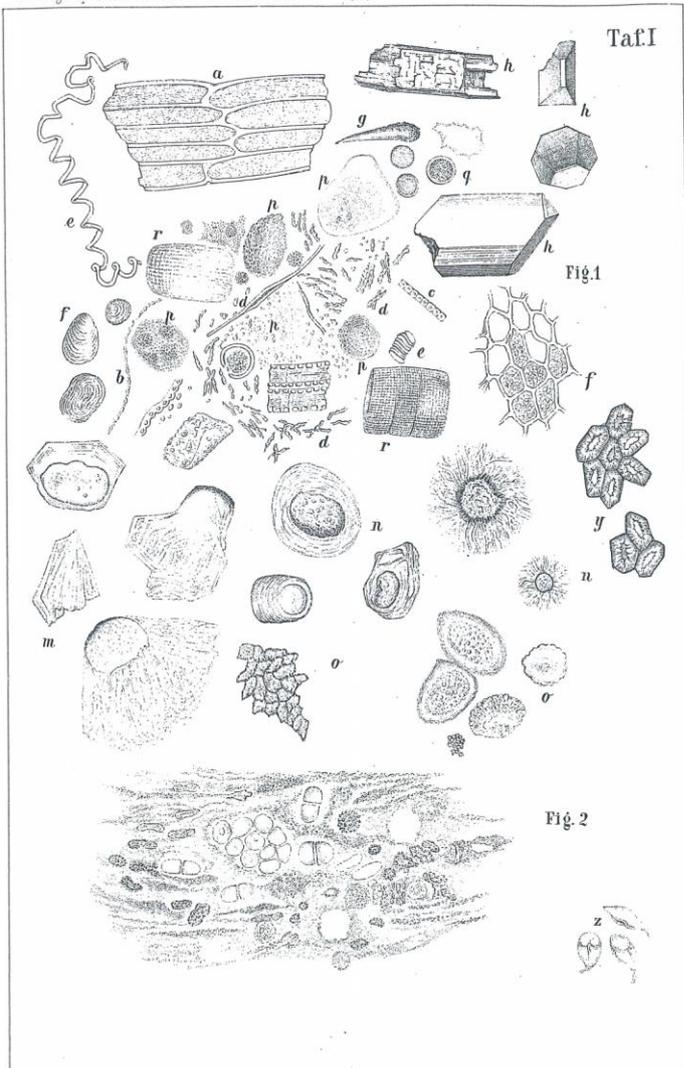
Desde entonces, no se han encontrado descripciones de este parásito hasta 180 años más tarde, cuando en 1859 el médico checo Vilém Dušan Lambl (1824–1895) publicó el primer dibujo microscópico con características morfológicas que identifican a *Giardia* (Figura 1.1) al analizar las heces de un niño. La similitud con las fotografías modernas de *Giardia* es obvia. Lambl, quien pensó que este parásito pertenecía al género *Cercomonas*, nombró al mismo como *Cercomonas intestinalis*. Posteriormente, algunos investigadores nombraron al género como *Lambl* en su honor. En 1879, Battista Grassi (1854–1925) descubrió un parásito de roedor, ahora conocido como una especie de *Giardia*, y lo llamó *Dimorphus muris*, aparentemente inconsciente de la descripción anterior de Lambl. En 1882 y 1883, Johann Künstler describió un organismo en renacuajos (posiblemente *G. agilis*) que llamó *Giardia*. Era la primera vez que *Giardia* se usaba como nombre de género. Este nombre fue elegido para honrar al profesor Alfred Giard (1846-1908), un eminente zoólogo francés. Raphaël Blanchard (1857–1919), en 1888, sugirió *Lamblia intestinalis* en honor a Lambl. Charles W. Stiles (1867–1941) lo cambió a *Giardia duodenalis* en 1902 y a *Giardia lamblia* en 1915 para conmemorar al Profesor Giard y al Dr. Lambl. El mismo año (1915), Charles A. Kofoid (1865-1947) y Elizabeth B. Christiansen propusieron *Giardia lamblia* en lugar de la sugerencia de Blanchard de *Lamblia intestinalis*³. En 1952, Francis Filice (1922-2015) publicó una descripción morfológica detallada de *Giardia* y propuso que se usaran tres nombres de especies sobre la base de la morfología del cuerpo mediano: *G. duodenalis*, *G. muris* y *G. agilis*³. Los nombres para el parásito humano *Giardia duodenalis*, *Giardia lamblia* y *Giardia intestinalis* se usan indistintamente en la actualidad a pesar del potencial de confusión que esto tiene.

1.2. Clasificación filogenética.

Como se describió anteriormente, durante muchos años, la clasificación de *Giardia* se basó únicamente en la morfología, lo que condujo a la descripción de un gran número de especies y a una historia de confusión y controversia taxonómica^{4,5}. Hoy en día, con el desarrollo de las técnicas moleculares, las clasificaciones genotípicas se basan en el análisis de secuencias de marcadores genéticos integrados con correlaciones estructurales, bioquímicas y con patología; lo que permite una clasificación más robusta de *Giardia* y otros protistas^{6,7}.

A

Viertelj. f. prakt. Heilk. LXI. (1859. I).



Gec. v. Df. Lambl.

Verlag v. K. Audek in Prag.

Steinbr. v. J. Habel, Prag.

Figura 1.1: Primer dibujo microscópico de características morfológicas que identifican al parásito *Giardia*. (A) Tabla completa I. (B) Detalle: *Giardia* (*Cercomonas intestinalis*). Reproducido de la siguiente publicación: Lambl V (1859) Mikroskopische Untersuchungen der Darm-Excrete. Beitrag zur Pathologie des Darms zur Diagnostik am Krankenbette. Vierteljahrsschrift für die praktische Heilkunde. Herausgegeben von der medicinischen Facultät in Prag 61: 1–58 (Tabla I)⁸.

B**Fig. 2**

Según la nueva clasificación sistemática basada en datos genéticos, estructurales y bioquímicos, *Giardia* pertenecería al Dominio Eucariota, Supergrupo Excavata (eucariotas unicelulares que contienen formas simbióticas y de vida libre y también algunos parásitos importantes de humanos), Phylum Metamonada (gran grupo de protozoarios flagelados), Clase Diplomonadida, Orden Giardiida, Familia Giardiidae y Género *Giardia* (Figura 1.2). Los Excavata son un grupo diverso de protistas, muchos de los cuales son anaeróbicos y/o parásitos; los más conocidos son *Trypanosoma*, *Giardia* y *Trichomonas*.

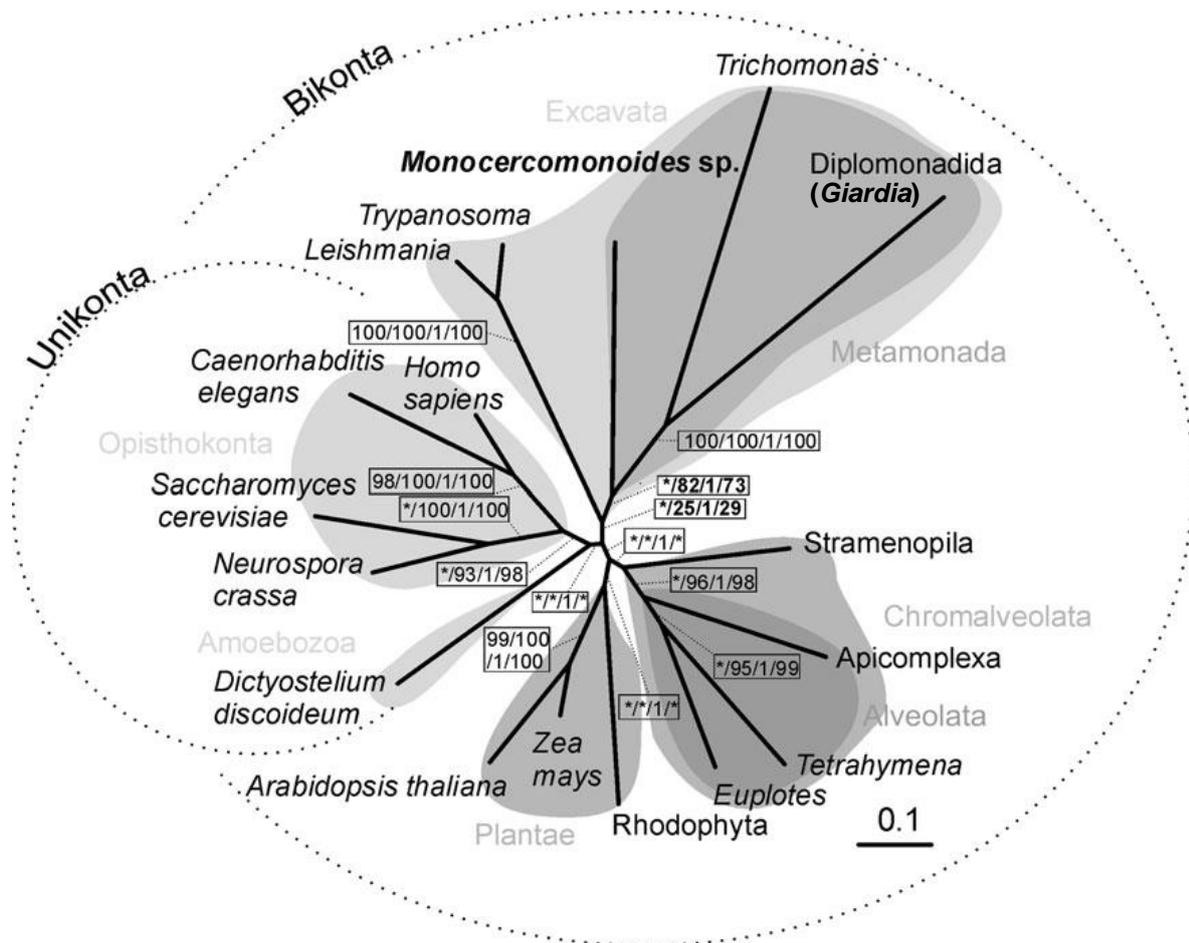


Figura 1.2: Clasificación filogenética de *Giardia*. Árbol bayesiano construido utilizando la concatenación de α -tubulina, β -tubulina, γ -tubulina, EF-1a, EF-2, cytHSP70, HSP90, ubiquitina y 18S rRNA. Se puede observar la ubicación de *Giardia* en el árbol filogenético de la vida⁹.

Los organismos pertenecientes a este supergrupo están relacionados por una combinación de evidencia molecular y morfológica. Sin embargo, hasta la fecha no existe un único tipo de evidencia que respalde a todo el grupo, aunque existen similitudes morfológicas en la ultraestructura citoesquelética que une un subconjunto de Excavatas y datos filogenéticos moleculares para respaldar las relaciones de subconjuntos superpuestos¹⁰.

En términos evolutivos, *Giardia* posee por un lado características indiscutiblemente primitivas, pero también elementos que reflejan funciones celulares universales de eucariotas y que han sido conservados desde *Giardia* hasta el hombre. Por ello, *Giardia* es considerada la célula eucariota más divergente y es el modelo por excelencia para abordar estudios básicos de procesos celulares e identificar mecanismos moleculares claves de patógenos unicelulares y organismos eucariotas superiores.

1.3. Ciclo de vida.

El ciclo de vida de *Giardia* se caracteriza por ser simple y no necesitar hospedadores intermediarios entre los diferentes estadios. El mismo está constituido por dos formas que presentan diferencias tanto morfológicas como bioquímicas^{3,11}.

El ciclo de vida comienza con la ingestión de estructuras de resistencia denominadas quistes, las cuales se encuentran en agua o alimentos contaminados. Al llegar al estómago y encontrarse con un medio ácido, estas estructuras comienzan a diferenciarse a la segunda

forma presente durante el ciclo de vida, que constituye la forma vegetativa del parásito y la cual se encuentra asociada a los síntomas. A este proceso se lo denomina “desenquistamiento”. El estadio morfológico resultante se denomina trofozoíto³. Una vez en el intestino del hospedador, estos trofozoítos se dividen por fisión binaria colonizando el epitelio intestinal y bloqueando de esta manera la absorción de los nutrientes por parte del hospedador. Cuando estos trofozoítos continúan descendiendo por el tracto intestinal se encuentran con un ambiente carente en lípidos y en donde el pH es más alto, lo que dispara el proceso por el cual se vuelven a generar estructuras infectivas de resistencia, denominándose “enquistamiento” a este proceso de diferenciación. Los quistes son luego liberados con las heces y los mismos cierran el ciclo de vida cuando son ingeridos nuevamente por hospedadores susceptibles^{3,11}.

Estos cambios bioquímicos y morfológicos permiten al parásito sobrevivir a condiciones ambientales no favorables y de esta manera propagarse entre individuos susceptibles. Estudios moleculares han permitido determinar las condiciones bajo las cuales este ciclo de vida puede ser completamente reproducido *in vitro*¹², por lo que los cambios que se encuentran involucrados pueden ser estudiados.

1.4. Características morfológicas del trofozoíto.

Las formas causantes de la enfermedad, los trofozoítos, se caracterizan por medir aproximadamente entre 9 y 15 μm de largo, 5 a 9 μm de ancho y presentar forma de pera (piriforme). El mismo presenta una cara posterior convexa y una cara anterior cóncava. Es un organismo celular binucleado con simetría bilateral. El citoesqueleto (Figura 1.3) está constituido por complejas estructuras microtubulares y está involucrado en la virulencia del parásito ya que está asociado a procesos de locomoción y adhesión celular, entre otros. El citoesqueleto incluye cuatro pares de flagelos, un disco ventral, un cuerpo medio y una estructura denominada funis¹³.

Los flagelos, encargados de la motilidad celular, se extienden desde los gránulos basales presentes en el polo anterior entre ambos núcleos. Los pares se encuentran en posiciones anterior, posterior lateral, caudal y ventral³. Cuando se evalúa el disco ventral, el cual se encuentra en la parte ventral del parásito, se observa que el mismo está constituido por estructuras fibrosas y microtubulares complejas, siendo esta estructura celular la encargada de la mantención de la adhesión del parásito al epitelio intestinal permitiendo de esta forma que éste tome los nutrientes y evitando que el hospedador pueda absorberlos.

La superficie del trofozoíto está cubierta por un representante de una familia de proteínas homólogas denominadas proteínas variables de superficie (VSPs, por sus siglas en inglés Variant-specific Surface Proteins). Estas proteínas son reconocidas por el sistema inmune del hospedador y constituyen una interfaz entre éste y el parásito^{3,14}.

Giardia manifiesta variación antigénica. Solo una VSP, de un repertorio de aproximadamente 150 genes que codifican a esta familia de proteínas presente en el genoma del parásito, se expresa en cada trofozoíto en un momento dado, cambiando por otra VSP antigénicamente diferente por mecanismos parcialmente caracterizados. Este proceso de adaptación de *Giardia* para evadir la respuesta inmune del hospedador es el foco principal del presente trabajo de tesis.

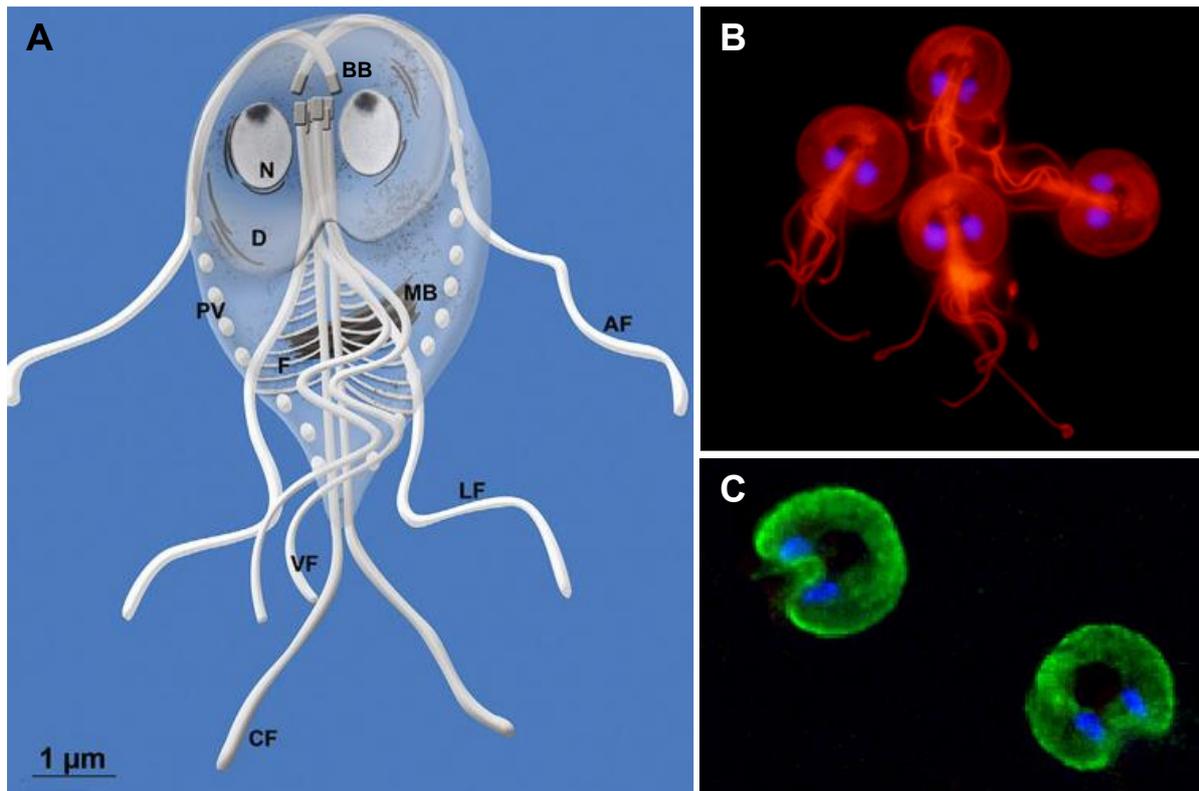


Figura 1.3: Estructura de los trofozoítos de *Giardia lamblia*. (A) Diagrama esquemático que muestra la disposición de las estructuras celulares en *Giardia*. Obsérvese el disco (D) situado en la región ventral, los dos núcleos (N), los pares flagelares y los cuerpos basales (BB). El cuerpo mediano (MB) se ve transversalmente a los axonemas, y el funis (F) está formado por microtúbulos que conectan los axonemas centrales a los axonemas de los flagelos posterolaterales. AF flagelos anteriores; LF flagelos posterior-laterales; VF flagelos ventrales; CF flagelos caudales; PV vesículas periféricas (Tomado del libro *Giardia*, a model organism¹⁵). (B) Inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos monoclonales anti-tubulina (flagelos y disco ventral, rojo). Núcleos teñidos con DAPI (azul). (C) Inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos monoclonales anti-delta-giardina (disco ventral, verde). Núcleos teñidos con DAPI (azul).

1.5. La variación antigénica.

1.5.1. Contexto histórico y generalidades.

Las complejas relaciones entre los organismos infecciosos y sus hospedadores a menudo reflejan la lucha continua del patógeno para proliferar y propagarse a nuevos hospedadores, y la necesidad del individuo infectado de controlar y potencialmente erradicar a la población infectante. En el caso de los mamíferos y los patógenos que los infectan, se ha producido una verdadera "carrera armamentista". Un sistema inmunitario altamente adaptado ha evolucionado para controlar la proliferación de organismos infecciosos y los patógenos han desarrollado sistemas genéticos complejos correspondientes para evadir esta respuesta inmune¹⁶.

El concepto de evasión inmune por parásitos ha existido durante mucho tiempo. Fue Paul Ehrlich (honrado como el "Padre de la Inmunología" en el Primer Congreso Internacional de Inmunología en 1971), quien descubrió el primer y aún uno de los mejores ejemplos de evasión inmune por un parásito: el fenómeno de la variación antigénica en los tripanosomas africanos. En su Conferencia Nobel, pronunciada en Estocolmo en diciembre de 1908, Ehrlich resumió los experimentos realizados por él y sus colegas, Franke, Röhl y Gulbrandsen sobre la "desaparición de receptores", demostrando claramente la capacidad de estos organismos para cambiar su antigenicidad *in vivo*¹⁷.

Sin embargo el crédito por el descubrimiento de la Variación Antigénica (VA) es reconocido a Ross y Thomson, quienes publicaron en 1910 un informe sobre los picos periódicos de la parasitemia por *Trypanosoma gambiense*¹⁸. Esto fue fundamental para comprender cómo persisten los patógenos y condujo a estudios posteriores que definieron cómo los tripanosomas y otros patógenos usan la variación antigénica para evadir la inmunidad y su eliminación del hospedador.

La VA puede definirse como la capacidad de un organismo infeccioso para alterar sistemáticamente las proteínas que se muestran al sistema inmune del hospedador, confrontándolo así con una población en constante cambio que es difícil o imposible de eliminar¹⁶. Este mecanismo es utilizado por una amplia diversidad de patógenos microbianos, desde pequeños virus de ARN, en particular el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y el virus de la influenza, hasta eucariotas con múltiples cromosomas, ilustrados por parásitos tripanosómicos y palúdicos (Tabla 1.1), para persistir dentro de hospedadores. Usando una variedad de mecanismos genéticos para producir variantes antigénicas, la evasión inmune da como resultado que el hospedador infectado sirva como un depósito microbiano para la posterior transmisión¹⁹.

Tabla 1.1: Ejemplos de patógenos microbianos con variación antigénica (Tomada de Deitsch, 2009¹⁶ y adaptada)

Especie	Gen	Número de copias	Antígeno de superficie codificado
Bacterias			
<i>Borrelia hermsii</i>	<i>vsp, vlp</i>	~30, ~30	Proteínas Variables Cortas (VSP), Proteínas Variables Largas (VLP)
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>pil, opa</i>	~19, 4-5	Pili tipo IV, Proteínas de opacidad
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>pil, opa</i>	~19, 11	Pili tipo IV, Proteínas de opacidad
<i>Treponema pallidum</i>	<i>tpr</i>	12	Proteínas repetitivas A-L, se predice que algunas están expuestas a la superficie
Protozoarios			
<i>Trypanosoma brucei</i>	<i>vsg</i>	~1000	Glicoproteínas Variables de Superficie (VSG)
<i>Babesia bovis</i>	<i>vesa, vesβ</i>	~130-160	Antígenos de superficie de expression variable (VESA)
<i>Giardia lamblia</i>	<i>vsp</i>	~150	Proteínas Variables de Superficie (VSP)
<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>var</i>	~60	Proteínas de membrana de enterocito de <i>P. falciparum</i> 1 (PfEMP1)
Hongos			
<i>Pneumocystis carinii</i>	<i>msg, msr, prt</i>	~85 de cada una	Glicoproteína mayoritaria de superficie (MSG), proteínas relacionadas a MSG (MSR), proteasa 1 (PRT1)
<i>Candida albicans</i>	<i>als</i>	9	Secuencias tipo aglutinina (ALS)
<i>Candida glabrata</i>	<i>epa</i>	17-23	Adhesinas epiteliales (EPA)

Resulta interesante en este punto hacer una distinción clara entre los dos sentidos del término "variación antigénica" cuando se aplica a patógenos. La VA "**sensu lato**", también conocida como "variación aleatoria" o "variación no programada", incluye los mecanismos genéticos clásicos de mutación y recombinación para generar diversidad sobre la cual actúan los procesos de selección. Los virus emplean este tipo de variación para escapar de las defensas inmunes del hospedador, permitiendo que establezcan infecciones crónicas o eviten la inmunidad permanente debido a anticuerpos neutralizantes. Por otra parte, la VA "**sensu stricto**", también conocida como "verdadera variación antigénica" o "variación programada", se debe al control diferencial de una familia de genes homólogos de antígenos de superficie^{19,20}. En el presente trabajo de tesis, con el término "variación antigénica" se hará referencia a la VA *sensu stricto*, más común en protozoarios.

Por otra parte, dado que en el presente trabajo de tesis se hará referencia a la VA como una propiedad de una población de células (sentido poblacional), para referirnos al

proceso de cambio de antígeno de superficie a nivel de una célula individual se utilizará el término “switching”, y las células cuyos antígenos han cambiado por este proceso se denominarán “switchers”.

1.5.2. Variación antigénica en *Giardia*.

G. lamblia, al igual que otros organismos parásitos, presenta VA asociada al recambio continuo de las proteínas que recubren la totalidad de su superficie¹⁴. Este mecanismo fue descubierto como un fenómeno *in vitro* ya que se observaron diferencias en los patrones de marcado superficial, en los productos de secreción/excreción obtenidos de cultivos del parásito^{21,22} y debido a la generación de anticuerpos monoclonales que reconocen epitopes superficiales de sólo algunos trofozoítos en una población determinada²³. Años más tarde, se demostró que este proceso de variación antigénica también ocurría durante el transcurso de la infección de humanos y animales de laboratorio^{24,25}.

Si bien los mecanismos de VA poseen diferencias particulares en los diferentes organismos donde tiene lugar, existen tres características comunes y esenciales para la VA en microorganismos unicelulares^{16,26}:

1. La presencia de una familia de genes homólogos que codifican para antígenos de superficie sumamente inmunogénicos y con reducida reacción inmunológica cruzada.
2. Un mecanismo que garantiza la expresión mutuamente excluyente de sólo uno de estos genes en cada célula individual.
3. Un mecanismo de expresión reversible de estos antígenos determinando el cambio en la expresión de un antígeno por otro diferente dentro de la misma familia.

En cuanto a la característica 1, en *Giardia* la satisface un repertorio de ~150 genes que codifican VSPs. Las VSPs constituyen una familia de proteínas integrales de membrana tipo I²⁷. Estas proteínas de superficie muestran gran variabilidad en su peso molecular (entre 40 y 160 kDa) y todas poseen un punto isoeléctrico de ~5. Cada VSP contiene un dominio N-terminal altamente variable, el cual presenta múltiple motivos CXXC (dónde C es cisteína y X cualquier otro aminoácido)³. El extremo C-terminal de las VSPs, por otra parte, presenta un alto grado de homología, con 38 aminoácidos compartiendo casi un 90% de identidad. Esta porción incluye un único dominio transmembrana (TMD) de 23 a 25 residuos de aminoácidos y un tallo citoplasmático conservado de secuencia CRGKA²⁸ (Figura 1.4). El dominio extracelular de las VSPs constituye la interfase hospedador-parásito: varios anticuerpos monoclonales (mAbs) que reconocen la superficie del parásito también reconocen un epítipo en la porción N-terminal de la VSP^{23,28,29}, y VSPs marcadas con el epítipo HA en el extremo N-terminal son detectadas en la superficie del parásito usando mAbs anti-HA en células no permeabilizadas³⁰.

El grado de homología que existe entre los diferentes genes que codifican para proteínas variables de superficie varía desde la completa duplicación hasta la presencia de regiones de conservación total seguida por regiones de completa divergencia. Estas observaciones sugieren que el amplio repertorio de VSPs se originó por una combinación de eventos de duplicación seguidos por mecanismos de divergencia y recombinación³¹.

La familia de proteínas variables de superficie presenta las siguientes características:

- Poseen un péptido señal: Contienen en su extremo N-terminal una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido señal que facilita la translocación de estas proteínas al retículo endoplasmático y su posterior transporte hacia la membrana plasmática³².
- Se encontrarían potencialmente palmitoiladas: se ha reportado que la unión de palmitato se da mediante un enlace tioéster con el residuo de cisteína del tallo conservado C-terminal³³⁻³⁵.

- Poseen un tetrapéptido GGCY altamente conservado: Habitualmente, esta secuencia forma parte de un motivo más extenso (GXCX₂X₈GGCYX₄₋₅PGX₃C) que se localiza corriente arriba de la zona C-terminal conservada, aunque también se han encontrado secuencias GGCY adicionales ubicadas en la porción N-terminal³⁶. La presencia de estos motivos conservados en diversas regiones de las VSPs refleja su importancia funcional o estructural, aunque la misma no ha podido ser dilucidada hasta el momento.
- Incluyen motivos de unión a Zinc y otros metales: Las VSPs poseen motivos de unión a metales, análogos a los dominios LIM y RING hallados en eucariotas superiores^{37,38}. Los dominios LIM se caracterizan por su capacidad de unir metales pesados, primordialmente átomos de zinc. Además, estas proteínas poseen a lo largo de su secuencia motivos adicionales (CXXCX_nCXXC) que, conjuntamente con los dominios “CXXC”, intervienen en la unión de átomos de zinc^{36,39,40}. En células eucariotas superiores, estos motivos se encuentran formando parte de proteínas intracelulares de unión a ADN o que actúan en el control de la transcripción o en la reparación del ADN³⁷. *Giardia* es el único organismo conocido que posee un motivo de unión a zinc en proteínas de superficie³⁹. Cuando los trofozoítos se encuentran adheridos a la pared intestinal del hospedador, el secuestro de átomos de zinc por las VSPs podría ayudar a la inhibición de enzimas dependientes de zinc como las carboxipeptidasas³⁹ o competir con el hospedador por este metal causando la deficiencia de zinc previamente observada en pacientes con giardiasis⁴¹.
- Contienen un número variable de dominios CXXC: La característica distintiva en las proteínas de esta familia es la presencia de dominios de tetrapéptidos “CXXC” en su región N-terminal. Estos dominios se encuentran formando unidades repetitivas cuyo número de copias varía de una proteína a otra, resultando en diferencias en su peso molecular y posiblemente también en la antigenicidad entre los miembros de esta familia de proteínas⁴². Esta región extracelular de las VSP, constituye la interfaz entre el parásito y su ambiente extracelular.

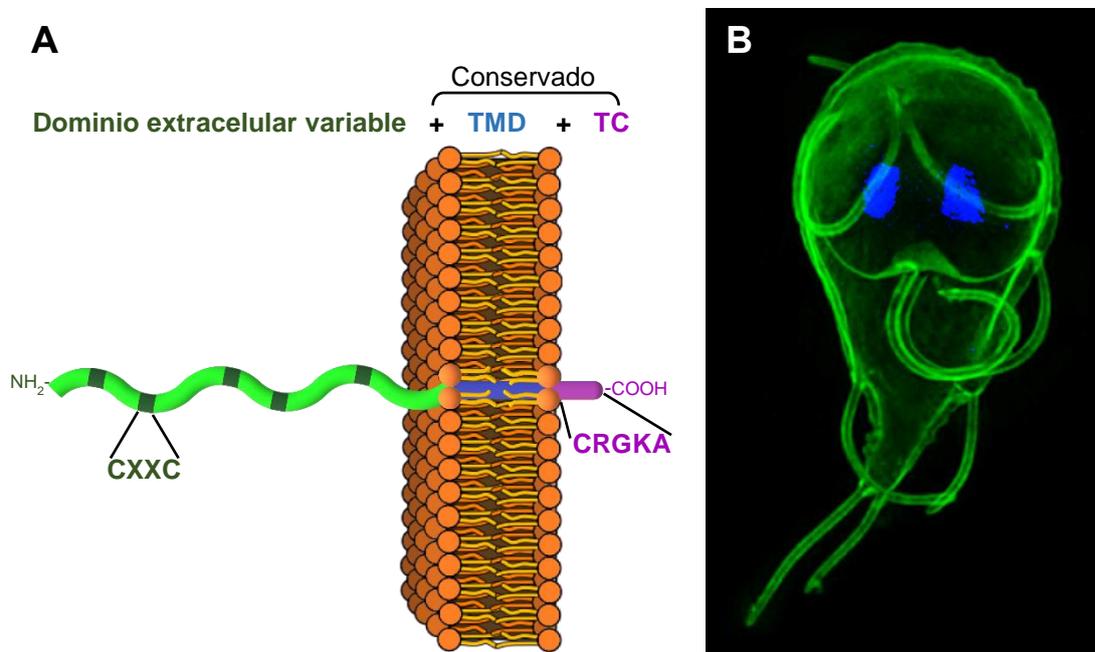


Figura 1.4: Estructura y localización de las Proteínas Variables de Superficie (VSPs) de *G. lamblia*. (A) Diagrama de la estructura proteica de una VSP. Se esquematiza el dominio extracelular variable (verde) con múltiples motivos CXXC (C, cisteína; X, cualquier aminoácido) y el extremo C-terminal conservado constituido por el dominio transmembrana (TMD, azul) y el tallo citoplasmático (TC, violeta) de secuencia CRGKA. (B) Localización de las VSPs en trofozoítos de *G. lamblia*. Imagen de microscopía de iluminación estructurada (SIM) de ensayo de inmunofluorescencia mostrando la localización de la VSP TSA417 sobre la superficie de un trofozoíto mediante la utilización del anticuerpo monoclonal específico 7C2 (verde). Los núcleos están teñidos con DAPI (azul).

El mecanismo por el cual solo uno de los genes codificantes de VSPs es expresado en cada célula individual (característica 2), fue estudiado previamente por nuestro grupo de investigación y por otros^{26,43,44}, determinándose que está regulado a nivel post-transcripcional. Ya que *Giardia* es un organismo binucleado, con sus dos núcleos activos y funcionales, cualquier mecanismo molecular a cargo del control de la VA debe coordinar la expresión de los genes que codifican VSPs entre ambos núcleos. En este escenario, un control post-transcripcional de la expresión génica resulta ventajoso. En el último tiempo, dos mecanismos citoplasmáticos que involucran ARN pequeños han sido propuestos^{26,43,44}. Los ARN pequeños son parte de una familia de ARN regulatorios no codificantes, de entre 19-28 nucleótidos de longitud, los cuales derivan de ARN de doble hebra (ARNdh) a través de un proceso mediado por enzimas del tipo ARNasa III⁴⁵. Las dos principales clases de ARN pequeños involucradas en el silenciamiento de ARN son los microARNs (miRNA) y los ARNs pequeños interferentes (siRNA), ambos descritos como importantes reguladores de procesos biológicos en eucariotas por medio de silenciamiento génico transcripcional o post-transcripcional.

Según estudios realizados previamente por nuestro grupo de investigación, la expresión de una única VSP está regulada por un mecanismo de ARN interferente. Este sistema involucraría una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP) que identifica transcritos homólogos y genera a partir de ellos ARN anti-sentido. Al formarse complejos de ARN de doble hebra (transcripto endógeno + ARN anti-sentido), éstos no podrían ser traducidos y serían blanco de la acción de ARNasas tipo III (Dicer) que cortarían el ARN de doble hebra en fragmentos cortos de 21-23 nucleótidos. Estos ARN cortos podrían ser reutilizados por la RdRP para amplificar el proceso de silenciamiento sintetizando un mayor número de ARN anti-sentidos que podrían dispersar la información a otras células⁴³ (Figura 1.5). El hallazgo de que el control de la expresión de las VSPs involucra a componentes de la maquinaria de ARN interferente y de que la disrupción de esta vía genera trofozoítos que expresan de manera simultánea muchas VSPs diferentes, nos permitió determinar que la variación antigénica es esencial para la supervivencia de los trofozoítos dentro de sus hospedadores y que la disrupción de dicho mecanismo es una herramienta útil para la generación de vacunas contra patógenos que muestran un comportamiento similar⁴⁶.

Si bien el mecanismo que permite la expresión de una única VSP en la superficie del parásito ha sido descrito por nuestro equipo, quedan aún varios interrogantes en lo que respecta a los mecanismos moleculares que permiten el cambio en la expresión de una VSP por otra durante el proceso de variación antigénica (característica 3). Se ha reportado al respecto, que en el proceso de *switching* ocurre espontáneamente²¹. Esta observación podría reflejar un mecanismo ancestral por el cual un reloj interno dispararía el cambio de una VSP por otra luego de un número dado de generaciones²⁶. Generalmente, sólo una VSP es expresada en la superficie del parásito en un momento determinado. Durante el *switching*, los trofozoítos expresan simultáneamente dos VSPs antigénicamente diferentes⁴⁷. La frecuencia de recambio de una VSP por otra es dependiente de la VSP que se expresa y es diferente entre los ensamblajes A y B de *G. lamblia*. Se ha reportado que la frecuencia de *switching* se encuentra entre 6.5 y 13.5 generaciones⁴⁸.

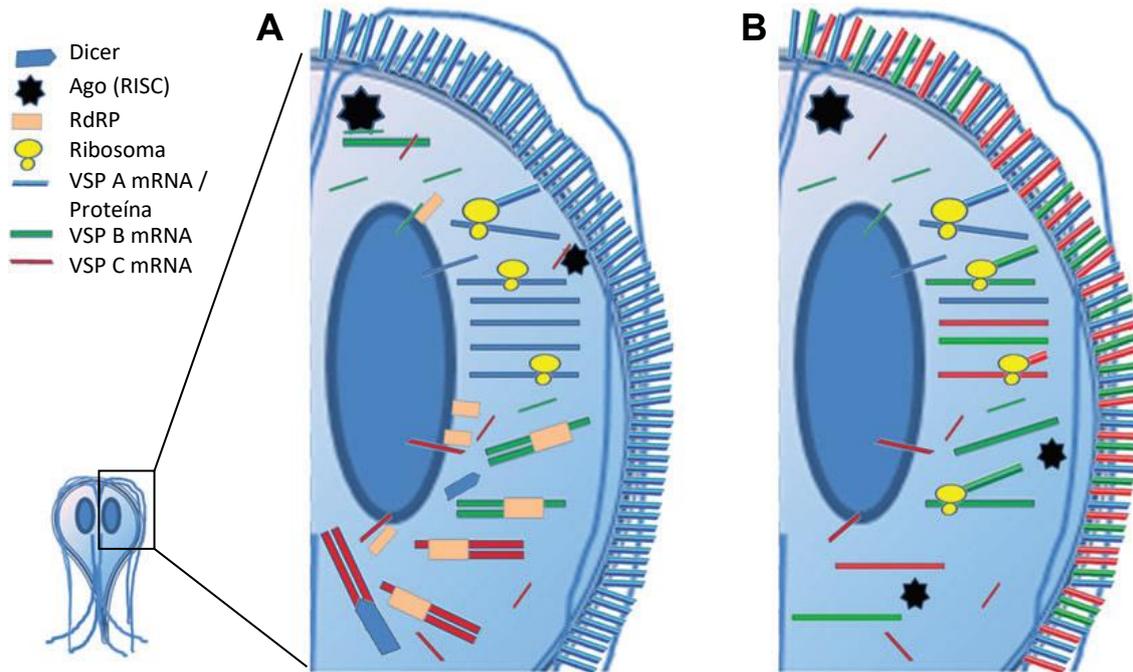


Figura 1.5: Esquema del mecanismo que controla la expresión de una única VSP en *Giardia*. (A) En las células de tipo salvaje, muchos ARNm de VSP se generan en los núcleos del parásito y se transportan al citoplasma. Allí, RdRP genera mRNA de VSP antisentido, produciendo complejos de ARNdhs de VSP. Dicer (y posiblemente Ago) detecta estos ARNdhs, cortándolos en pequeños ARNs de 25 a 27 nucleótidos de longitud. Solo el transcripto de una única VSP evita el proceso de silenciamiento por un mecanismo aún desconocido, se acumula en el citoplasma y luego se traduce en la VSP que se expresará en la superficie del trofozoíto. **(B)** En las células en las que la vía del RNAi se ha interrumpido (por ejemplo, por inhibición de la expresión de Dicer), los transcritos de muchas VSPs diferentes alcanzan un nivel de estado estacionario que permite la expresión simultánea de muchas VSPs en la superficie de trofozoítos individuales. Abreviaturas: Ago, proteína argonauta; ARNdhs, ARN bicatenario; ARNm, ARN mensajero; RdRP, ARN polimerasa dependiente de ARN; ARNi, ARN de interferencia; RISC, complejo silenciador inducido por ARN; VSP, proteína variable de superficie. Tomado y adaptado de Prucca, 2011⁴⁹.

1.6. Efecto de los anticuerpos anti-VSP en trofozoítos de *Giardia lamblia*.

El rol de los anticuerpos contra los trofozoítos de *Giardia* durante las infecciones ha sido ampliamente estudiado. En el lumen intestinal de los organismos infectados se activan los principales mecanismos efectores de producción de anticuerpos que juegan un papel central en el control y la erradicación de la infección⁵⁰. Se ha demostrado que el isotipo A de inmunoglobulinas (IgA) es requerido para la eliminación efectiva del parásito⁵¹, lo cual es importante considerando que la IgA es la más abundante en las secreciones de las mucosas intestinales y se ve especialmente inducida en la infección por *Giardia*⁵². Además, se cree que la IgA inhibe la motilidad y adhesión de *Giardia* al intestino⁵¹. Estudios de infecciones experimentales en ratones y jerbos con trofozoítos de *G. lamblia* ensamblaje B, aislamiento GS-M/H7, que expresan la VSP H7; indican que luego de 1-2 semanas de llevada a cabo la infección, solo se pueden aislar trofozoítos que no son reconocidos por el anticuerpo monoclonal específico para esta VSP. Por otra parte, en infecciones realizadas con la misma cepa en ratones deficientes en linfocitos B (por lo que no generan anticuerpos), se reportó que los trofozoítos aislados luego de 30 días de infección mantenían la expresión de la VSP original, indicando la importancia de la generación de anticuerpos en el control de la enfermedad y la VA^{29,53,54}.

El efecto de los anticuerpos anti-VSP sobre trofozoítos de *Giardia* también ha sido ampliamente estudiado *in vitro*. En las últimas décadas han sido publicados numerosos

reportes donde se describe el efecto citotóxico independiente de complemento de los anticuerpos anti-VSPs sobre trofozoítos de *Giardia*^{23,33,50,55-58}. Cambios fisiológicos como la inmovilización de los trofozoítos, aglutinación, desprendimiento del sustrato de cultivo y la disrupción de la integridad de la membrana plasmática se han tomado como parámetros para determinar la muerte celular y la viabilidad después del tratamiento con anticuerpos *in vitro*. En base a estos resultados, se postuló que el sistema inmunitario humoral actuaría seleccionando las células que cambiaron previamente sus antígenos de superficie (*switchers*).

Estos conceptos han sido revisados y reinterpretados por nuestro grupo de investigación²⁶. El motivo principal que nos llevó a poner en duda el paradigma existente y ampliamente aceptado de que la VA en *Giardia* es un proceso espontáneo sobre el cual los anticuerpos actuarían seleccionando los *switchers*, fue la observación de que el tratamiento de poblaciones clonales de trofozoítos expresando una VSP con bajas concentraciones de anticuerpos monoclonales contra la misma no afecta la tasa de crecimiento de la población respecto de controles no tratados, pero generan una población prácticamente negativa para la VSP original luego de un tiempo de tratamiento, de manera similar a lo que ocurre *in vivo*. Como no se observan diferencias entre la proliferación de las poblaciones control y tratadas con anticuerpos a las concentraciones ensayadas, estos resultados constituyen el primer indicio de que los anticuerpos específicos para VSPs de *Giardia* serían capaces de estimular la VA⁵⁹. Esta observación es remarcable, ya que se trata de la primera descripción de un estímulo específico capaz de inducir la VA *in vitro* en este parásito. De esta manera, la VA disparada por mAbs anti-VSPs se constituye en una herramienta fundamental para el estudio de este fenómeno, al proveer un mecanismo mediante el cual puede reproducirse de manera controlada en *G. lamblia*.

1.7. Objetivo de estudio

Las observaciones descriptas anteriormente nos llevan a plantear la **hipótesis** de que la VA en *Giardia* es un proceso más complejo de lo previamente sugerido y se encuentra regulado por señales externas. Las VSPs expresadas en un dado momento, podrían actuar como receptores de estas señales mediante cambios conformacionales inducidos por la unión de un anticuerpo o por rearrreglos inducidos por cambios del microambiente, disparando una cascada de transducción de señales aún no determinada que llevaría al cambio en la expresión de la VSP original por otra antigénicamente diferente.

En este contexto, el **Objetivo general** del presente trabajo de tesis doctoral es estudiar los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el proceso de VA disparada por anticuerpos anti-VSP en el parásito intestinal *G. lamblia*.

Como **objetivos particulares** se propone:

- Estudiar el mecanismo de transducción de la señal en el proceso de VA disparada por anticuerpos anti-VSP.
- Determinar el mecanismo por el cual un tipo de VSP es reemplazado a nivel de la membrana plasmática por otro antigénicamente diferente durante el proceso de *switching*.

CAPÍTULO 2

Materiales y Métodos

2. CAPÍTULO 2: Materiales y métodos

2.1. Cultivo de trofozoítos de *Giardia lamblia*.

En el presente trabajo se utilizaron trofozoítos de *G. lamblia* perteneciente al ensamblaje A1 aislamiento WB y ensamblaje B aislamiento GS. Los trofozoítos se cultivaron en medio TYI-S-33 (pH=7) suplementado con suero adulto bovino 10% y bilis bovina 0,5 mg/ml (medio completo)⁶⁰ a 37°C en anaerobiosis.

El clonado de los trofozoítos de *Giardia* se realizó rutinariamente por dilución límite. Aproximadamente 50 trofozoítos obtenidos por diluciones seriadas a partir de un cultivo inicial en fase de crecimiento exponencial se dispersaron en 20 ml de medio de cultivo el cual se distribuyó en placas de cultivo de 96 pocillos de manera de obtener una relación de 0,5 parásitos por pocillo. Las placas se cultivaron en bolsas de anaerobiosis AnaeroGen® Compact (Thermo Scientific® Oxoid®, CAT. # AN0010C) a 37°C durante 5 a 6 días. La homogeneidad de los clones obtenidos fue verificada mediante IFI con anticuerpos anti-VSP específicos. Los clones obtenidos fueron crecidos durante 48 h en tubos de cultivo de vidrio de 8 ml y posteriormente las células fueron criopreservadas en nitrógeno líquido o freezer a -70°C hasta su utilización.

2.2. Anticuerpos monoclonales (mAbs).

2.2.1. Anticuerpos anti-VSP de *Giardia*.

Los mAbs anti-VSP utilizados en este trabajo se enumeran en la Tabla 2.1 junto con sus características. Los mAbs G10/4⁶¹, 9B10⁴⁷ y 6E7⁶¹ fueron proporcionados por el Dr. Theodore E. Nash, del Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas (NIAID, NHI, Estados Unidos). Los mAbs 7F5, 7C2, 2B10 y 7C9 fueron generados en nuestro laboratorio según protocolos descritos previamente⁶².

Tabla 2.1: Lista de anticuerpos monoclonales (mAbs) contra diferentes VSPs de *G. lamblia*

mAb	Especie / isotipo	Antígeno reconocido	<i>Giardia lamblia</i>	
		VSP / ORF	Ensamblaje	Aislamiento
7F5	Ratón / IgG 1	VSP1267 / GL50803_112208	A1	WB
7C2	Ratón / IgG 1	TSA417 / GL50803_113797	A1	WB
9B10	Ratón / IgG	VSP9B10 / GL50803_101074	A1	WB
2B10	Ratón / IgM	VSP2B10 / No determinado	A1	WB
7C9	Ratón / IgM	VSP7C9 / No determinado	A1	WB
6E7	Ratón / IgG	VSPA6 / GL50803_221693	A1	WB
G10/4	Ratón / IgG	VSPH7 / GSB_150963	B	GS

El isotipo y la composición de la cadena liviana de esos anticuerpos fue determinada usando un kit comercial (mouse monoclonal antibody isotyping kit, dipstick format- Hycult biotechnology). La purificación de los mismos a partir de sobrenadante de cultivos de hibridomas o fluidos ascíticos generados en ratones se realizó mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) utilizando el equipo ÄKTA® Pure 25 (Cytiva, anteriormente GE Healthcare Life Sciences) acoplado a una columna de afinidad HiTrap® Protein G HP (GE Healthcare, CAT. # 29-0485-81) según el protocolo del fabricante. Luego de su purificación, se realizó un cambio de buffer a PBS utilizando el mismo equipo acoplado a la columna HiPrep® 26/10 Desalting (GE Healthcare, CAT. # 17-5087-01). Posteriormente se midió la concentración de proteína en los mismos. Las concentraciones expresadas en molaridad

derivan de la concentración de proteína presente en los purificados de anticuerpo, considerando un peso molecular de los mismos de 150 kDa (para IgG). Los anticuerpos purificados se almacenaron a concentraciones superiores a 2 mg/ml en alícuotas de 50 μ l a -20°C .

2.2.2. Anticuerpos comerciales.

Para la detección de PI(4,5) P_2 y PI(3,4,5) P_3 se utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón isotipo IgM (Echelon Biosciences Inc., CAT. # Z-P045 y # Z-P345). Para la detección de los niveles de expresión de las proteínas quimeras en el ensayo de TOXCAT se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón anti-MBP (Sigma, CAT. # AMAB91063).

2.3. Generación de suero policlonal anti-TSA417(-).

Para la producción de un suero policlonal capaz de reconocer varias VSPs excepto TSA417 se utilizaron ratas Wistar de ocho semanas de edad, las cuales se inmunizaron por vía intraperitoneal los días 0, 7, 14, 21 y 28 con suspensión en PBS (equivalente a 50 μ g de proteína) de trofozoítos derivados de clones TSA417 cultivados en presencia de 1 μ M de mAb 7C2 durante una semana para garantizar la completa variación antigénica de la población. Las células muertas por congelamiento/descongelamiento se emulsionaron en el Sistema Adyuvante Sigma (Sigma, CAT. # S6322) antes de la inmunización. Las ratas fueron desafiadas a día 35 mediante inyección intravenosa de suspensión de trofozoítos equivalente a 25 μ g de proteína. Tres días después, los animales fueron sacrificados y se extrajo sangre total por punción cardíaca. El suero obtenido fue verificado como no reactivo a los trofozoítos TSA417 y reactivo a la mayoría de los no TSA417 por inmunofluorescencia indirecta (IFI).

2.4. Generación de fragmentos Fab a partir de anticuerpos monoclonales.

La generación de fragmentos Fab a partir de los mAbs 7C2 y 7F5 (ambos IgG tipo 1 de ratón) se realizó por digestión con papaína inmovilizada de Pierce® (Thermo Scientific®, CAT. # 20341) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La purificación de los fragmentos Fab se realizó mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) utilizando el equipo ÄKTA® Pure 25 (Cytiva, anteriormente GE Healthcare Life Sciences) acoplado a una columna de afinidad HiScreen® MabSelect® SuRe® (GE Healthcare, CAT. # 28-9269-77) según el protocolo del fabricante. La integridad de los sitios de unión de los fragmentos Fab obtenidos se verificó por IFI sobre trofozoítos de *Giardia* expresando los antígenos correspondientes. La ausencia de mAb sin digerir se verificó por SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras. Las concentraciones de Fab expresadas en molaridad derivan de la concentración de proteína presente en los purificados, considerando un peso molecular de los mismos de 50 kDa.

2.5. Marcación de anticuerpos con FITC.

Soluciones de mAbs purificados en PBS altamente concentradas (mayor a 12 mg/ml) fueron diluidas a 3 mg/ml en buffer Na_2CO_3 0,1 M pH 9. Posteriormente, por cada mg de proteína a marcar, se agregaron 17 μ l de solución de FITC (Sigma, CAT. # F7250) 1 mg/ml en DMSO (Sigma, CAT. # 276855) en alícuotas de aproximadamente 5 μ l con suave y continua agitación. La mezcla fue incubada toda la noche a 4°C en oscuridad, y posteriormente se agregó NH_4Cl a una concentración final de 50 mM y se incubó durante 2 h a 4°C . Posteriormente, los anticuerpos fueron dializados tres veces utilizando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer® de 10K MWCO (Thermo Scientific®, CAT. # 66382) contra PBS por tiempos no inferiores a 4 h a 4°C . Los anticuerpos marcados fueron almacenados en alícuotas de 50 μ l a -20°C .

2.6. Medición de concentración de proteínas.

La determinación total de proteínas fue realizada por el método basado en el ácido bicinconínico (BCA) utilizando el kit comercial BCA Pierce® protein assay kit (Thermo Scientific®, CAT. # 23227).

2.7. Ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI).

2.7.1. IFI para cuantificación de clones de VSPs en *Giardia*.

Para el análisis de rutina de la clonalidad de poblaciones de trofozoítos de *G. lamblia*, muestras de las mismas en medio de cultivo (25 µl aproximadamente) fueron depositadas en portaobjetos e incubados a 37°C en cámara húmeda durante 30 min para permitir su adhesión al vidrio. Luego las muestras fueron fijados y permeabilizados por inmersión en solución de acetona/metanol (1:1) durante 20 min a -20°C, lavadas con PBS y secadas a temperatura ambiente. La inmunomarcación se realizó incubando las muestras en primer lugar con mAbs anti-VSPs provenientes de fluidos ascíticos en dilución 1/1000 en PBS por 1 h a temperatura ambiente y luego de ser lavados con PBS se incubaron con el anticuerpo secundario anti-inmunoglobulinas de ratón unido a FITC (Sigma, CAT. # F0257) en una dilución de 1/1000 en PBS por 1 h. Los núcleos se tiñeron con DAPI a una concentración de 1 µg/ml en PBS durante 10 min. Las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio de epifluorescencia Leica IRBE con los objetivos 20X o 40X (aire), equipado con una cámara Hamamatsu ORCA CCD. Las imágenes fueron procesadas y el porcentaje de células expresando una dada VSP fue cuantificado utilizando el programa ImageJ.

2.7.2. IFI para análisis de localización subcelular de determinados componentes en *Giardia*.

2.7.2.1. Localización de complejos VSP-mAb en el tiempo.

Para los análisis de localización de VSPs unidas a anticuerpos, 1×10^6 trofozoítos expresando una dada VSP fueron incubados en 1ml de medio de cultivo conteniendo anticuerpo contra la respectiva VSP (mAb 7C2 2,5 nM; Fab 7C2 5 nM; mAb 9B10 ascítico dilución 1/100) durante 1 h en hielo. Posteriormente se realizó un lavado con PBS frío y las células se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo. Las mismas fueron incubadas a 37°C durante diferentes períodos de tiempo (0, 30, 60 y 120 min). Finalizado cada tiempo de incubación, las células fueron lavadas tres veces con PBS frío y fijadas en suspensión con paraformaldehído 4% p/v en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Los parásitos fueron posteriormente adheridos a vidrios cubreobjeto utilizando una solución de poli-L-lisina (Sigma, CAT. # P4707) según las instrucciones del fabricante. Se realizaron tres lavados con PBS y luego se realizó el bloqueo de los grupos aldehídos reactivos incubando las muestras con NH_4Cl 50 mM en PBS durante 10 min. Se realizó posteriormente un bloqueo con solución de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma CAT. # A2153) 3% p/v en PBS durante 1 h. Posteriormente se realizó la inmunomarcación mediante el tratamiento secuencial de las muestras con anti-mouse Alexa 488 (dilución 1/2000 en PBS BSA 1%), mAb anti-VSP correspondiente (dilución 1/1000 en PBS BSA 1%), anti-mouse Alexa 546 (dilución 1/2000 en PBS BSA 1%). Cada incubación con anticuerpo se realizó durante 1 h y se realizaron 3 lavados con PBS entre cada incubación. Los núcleos se tiñeron con DAPI a una concentración de 1 µg/ml en PBS durante 10 min. Finalmente las muestras fueron montadas sobre portaobjetos utilizando solución de montaje DABCO. Las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio de epifluorescencia Leica IRBE con los objetivos 20X o 40X (aire) equipado con una cámara Hamamatsu ORCA CCD, o utilizando un microscopio confocal Nikon Eclipse Ti (en este caso se tomaron imágenes en z-stack realizando secciones cada 0,13 µm).

2.7.2.2. Colocalización de las VSPs original y nuevas durante el *switching*.

Un número inicial de 4×10^5 trofozoítos de *Giardia lamblia* clon TSA417 fueron cultivados en tubos de vidrio con 7 ml de medio de cultivo conteniendo mAb 7C2 2 nM. A las 24 h de cultivo los tubos fueron enfriados en hielo, se agregó mAb 7C2 y pAb anti-TSA417(-) a una dilución final de 1/1000 y se incubaron durante 40 min en hielo. Posteriormente se hicieron tres lavados con PBS frío y los trofozoítos fueron fijados en suspensión con paraformaldehído 4% p/v en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Los parásitos fueron posteriormente adheridos a vidrios cubreobjeto utilizando una solución de poli-L-lisina (Sigma, CAT. # P4707) según las instrucciones del fabricante. Se realizaron tres lavados con PBS y posteriormente se realizó el bloqueo de los grupos aldehídos reactivos incubando las muestras con NH_4Cl 50 mM en PBS durante 10 min. Se realizó posteriormente un bloqueo con solución de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma CAT. # A2153) 3% p/v en PBS. Posteriormente se incubó con anticuerpos secundarios anti-mouse Alexa 488 y anti-rat Alexa 546 (dilución 1/200 en PBS BSA 1%) durante 1 h a temperatura ambiente. Los núcleos se tiñeron con DAPI a una concentración de $1 \mu\text{g/ml}$ en PBS durante 10 min. Las muestras fueron analizadas por microscopía de iluminación estructurada de alta resolución (HR-SIM) utilizando un microscopio Zeiss Elyra PS. Las imágenes fueron adquiridas con 5 rotaciones de rejilla y analizadas con el software ZEN.

2.7.2.3. Localización de PI(4,5)P₂.

Trofozoítos de *Giardia lamblia* clon VSP1267 en fase exponencial de crecimiento fueron fijados en suspensión con paraformaldehído 4% p/v en PBS durante 20 min a temperatura ambiente. Los parásitos fueron posteriormente adheridos a vidrios cubreobjeto utilizando una solución de poli-L-lisina (Sigma, CAT. # P4707) según las instrucciones del fabricante. Se realizaron 3 lavados con TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.6; 150 mM NaCl) y posteriormente se realizó una permeabilización de las células mediante tratamiento con saponina (Sigma CAT. # S7900) 0,5% en TBS durante 30 min a temperatura ambiente. Luego de tres lavados con TBS se realizó un bloqueo con TBS conteniendo 10% de suero de cabra durante 30 min a 37°C. Posteriormente las células fueron co-incubadas con anticuerpos anti-PI(4,5)P₂ (IgM) a una concentración de $10 \mu\text{g/ml}$ y mAb 7F5 a una dilución de 1/1000 en TBS con 1% de suero de cabra durante 1 h a 37°C. Se realizaron 3 lavados con TBS suplementado con 1% de suero de cabra y se realizó una incubación con anticuerpos secundarios anti-mouse IgG Alexa 488 y anti-mouse IgM Alexa 546 a dilución de 1/2000 en TBS con 1% de suero de cabra durante 1 h a 37°C. Luego se realizaron 3 lavados con TBS y los núcleos se tiñeron con DAPI a una concentración de $1 \mu\text{g/ml}$ en TBS durante 10 min. Finalmente, las muestras fueron montadas sobre portaobjetos utilizando solución de montaje DABCO. Las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio de epifluorescencia Leica IRBE con objetivo 100X (utilizando aceite de inmersión) equipado con una cámara Hamamatsu ORCA ER II CCD.

2.8. Infección de Jerbos con *G. lamblia* y extracción de trofozoítos de intestino para su análisis.

Se utilizaron jerbos (*Meriones unguiculatus*) libres de patógenos específicos (SPF) de 6 semanas de edad y criados en cajas con aire filtrado y aire acondicionado (18-22°C, 40-50% de humedad) con un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. A los animales se les suministró alimento esterilizado en autoclave y agua estéril complementada con una mezcla de solución de vitamina esterilizada por filtración *ad libitum*. Antes de la infección, los jerbos se analizaron para determinar la negatividad de los anticuerpos séricos contra los antígenos de *Giardia* mediante ELISA.

Las infecciones se realizaron por vía orogástrica con 2×10^5 trofozoítos suspendidos en 500 μl de PBS. La extracción de trofozoítos del intestino para su análisis se realizó a

diferentes días post-infección según se indica en cada experimento. Los jerbos fueron sacrificados en cámara de CO₂ e inmediatamente se tomaron muestras de sangre por punción cardíaca para la cuantificación de anticuerpos contra antígenos de *Giardia* por ELISA. Se extrajo una porción de 14 cm del intestino delgado superior (medido desde su unión al estómago), el mismo fue diseccionado longitudinalmente utilizando tijera quirúrgica, incubado en 7 ml de PBS en hielo durante 30 min y agitado utilizando vortex para despegar los parásitos. El número total de parásitos se contó a partir de esta suspensión de contenido intestinal utilizando cámara de Neubauer. Posteriormente se procedió a la separación de los parásitos del resto del contenido intestinal. Para ello se centrifugó la suspensión a 1000 g durante 5 min, se eliminó el PBS y se reemplazó por 15 ml de medio de cultivo a 37°C. Los parásitos fueron incubados durante 40 min a 37°C para permitir que se pegaran a las paredes del tubo de cultivo, y luego se agitaron suavemente y se eliminó el medio junto con los restos de contenido intestinal. Se agregó medio fresco y los tubos fueron incubados en hielo para despegar los parásitos, los cuales fueron analizados por IFI y citometría de flujo.

2.9. Cuantificación de la clonalidad de cultivos de *Giardia* por citometría de flujo.

Para la cuantificación de la clonalidad de cultivos de *Giardia* de rutina, los tubos de cultivo con células en crecimiento exponencial fueron incubados en hielo durante 20 min para despegar las mismas de las paredes de los tubos. Se realizaron dos lavados con PBS frío y se procedió a la fijación en suspensión con paraformaldehído 4% p/v en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS, se bloquearon las células con PBS BSA 3% 30 min y luego se incubaron con el mAb correspondiente unido a FITC a una dilución 1/500 en PBS BSA 1% durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron 3 lavados con PBS antes del análisis por citometría de flujo.

En los casos en que se analizó la co-expresión de la VSP TSA417 con otras VSPs utilizando el suero policlonal anti-TSA417(-); 1x10⁶ trofozoítos en crecimiento exponencial extraídos de intestinos de jerbos infectados fueron suspendidos en 1 ml de medio de cultivo conteniendo 3 µl de mAb 7C2 ascítico y 3 µl de suero policlonal anti-TSA417(-) e incubados en hielo durante 1 h. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS frío y se realizó la fijación como se describió anteriormente. Los parásitos fueron bloqueados con PBS 10% suero de cabra durante 30 min y luego incubados con anticuerpos anti-mouse Ficoeritrina-R (RPE) a dilución 1/6000 y anti-rat biotina (1/2000) en PBS 3% suero de cabra durante 45 min. Se realizaron 2 lavados con PBS 3% suero de cabra y se realizó una incubación posterior con estreptavidina Alexa 488 (dilución 1/6000) en PBS 3% suero de cabra durante 45 min. Finalmente se realizaron 3 lavados con PBS antes del análisis por citometría de flujo.

2.10. Electroforesis en gel de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE) y Western Blot.

La electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot se realizaron mediante el procedimiento descrito por Laemmli en 1970⁶³. Inicialmente, 50-100 µg del extracto proteico total preparados en una solución de buffer de siembra (Tris-HCl 0,5 M pH, 6,8; SDS 10%, Glicerol 10%, azul de bromofenol 0,5%) en presencia o no de β-Mercaptoetanol 5 mM (según se indica en cada experimento) fue calentado a 100°C durante 5 min. Más tarde, fue sembrado en un gel de poliacrilamida al 10%/SDS 0,1% y fue sometido a corriente constante de 100 V durante aproximadamente 40 min en un equipo de electroforesis vertical (mini PROTEAN II, Bio-Rad). Al finalizar la corrida se realizó la transferencia del patrón electroforético hacia una membrana de PVDF de 0,22 µm de poro (BIO-RAD, CAT. #162-0177), en buffer de transferencia (Tris 20mM, glicina 150mM, metanol 20%) a 100V durante 2-4 h a 4° C; para ello se empleó un equipo de transferencia PS 1200 PC Power Supply, Hoefer Scientific Instruments⁶⁴. Luego, la membrana fue bloqueada con leche descremada al 5% disuelta en TBS 1X/Tween 20 0,5% y posteriormente fue incubada por 1 h con los anticuerpos correspondientes diluidos en solución de bloqueo. Después, se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con solución bloqueante, y las membranas fueron

incubadas con suero de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado a fosfatasa alcalina (Southern Biotechnology Associates, Inc.) en dilución 1/1000 durante 1 h a temperatura ambiente, y reveladas con sustrato para fosfatasa alcalina (BCIP/NBT). Una vez visualizadas las bandas se detuvo la reacción al sumergir las membranas en agua destilada. En otros casos se utilizaron anticuerpos secundarios anti-mouse conjugados a los fluoróforos IRDye 800CW o IRDye 640LT en dilución 1/20000 para la visualización utilizando el equipo Odyssey.

2.11. Modelado *in silico* del TMD de la VSP1267.

Los modelos de dimerización para el TMD de la VSP1267 fueron evaluados utilizando la herramienta bioinformática PREDDIMER⁶⁵. Secuencia analizada: GLSTGAIAGISVAAFVVVAGLVGFLCWWFI; Modo: homodimerización; pH 7. La representación tridimensional de los diferentes modelos se realizó con el software VMD⁶⁶. Los alineamientos de secuencias se realizaron con Clustal Omega⁶⁷ y Weblogo⁶⁸.

2.12. Ensayo de TOXCAT

2.12.1. Construcciones.

Para generar las construcciones que expresen las proteínas quiméricas necesarias para el ensayo de TOXCAT⁶⁹ ToxR'- dominio transmembrana de la VSP1267- proteína de unión a la maltosa (ToxR'-TMD-MBP) se diseñaron pares de oligonucleótidos complementarios correspondientes a la secuencia codificante de la región de 30 residuos de aminoácido de la VSP1267 (GL50803_112208) comprendida entre los residuos 562 y 591 que abarcan la región transmembrana predicha por Phobius más cinco aminoácidos de la región yuxtamembrana N-terminal hacia donde se extiende el motivo conservado GAS_{right}. También se diseñó una versión mutante en donde los residuos de glicinas y alanina del motivo GAS_{right} fueron reemplazados por leucina:

>1267TMD_fw

```
CTAGCGGCCTTTCCACTGGCGCCATCGCGGGGATCTCCGTTCGCAGCCTTCGTCGTCGTG  
GCCGGCCTCGTGGGCTTCTCTGCTGGTGGTTCATACG
```

>1267TMD_rv

```
GATCCGTATGAACCACCAGCAGAGGAAGCCCACGAGGCCGGCCACGACGACGAAGGC  
TGCGACGGAGATCCCCGCGATGGCGCCAGTGGAAAGGCCG
```

>1267TMD_GAS/Leu_fw

```
CTAGCCTTCTTTCCACTCTTGCCATCGCGCTTATCTCCGTTCCTTGCCTTCGTCGTCGTG  
GCCGGCCTCGTGGGCTTCTCTGCTGGTGGTTCATACG
```

>1267TMD_GAS/Leu_rv

```
GATCCGTATGAACCACCAGCAGAGGAAGCCCACGAGGCCGGCCACGACGACGAAGGC  
AAGGACGGAGATAAGCGCGATGGCAAGAGTGGAAAGAAGG
```

Dichos oligonucleótidos fueron diseñados de manera tal que su hibridación genere un fragmento de DNA doble hebra en cuyos extremos queden las secuencias correspondientes a los sitios de restricción de las enzimas NheI y BamHI. Para la hibridación de los mismos, se mezclaron 2 µl de solución stock (100 pmol/µl) de cada oligonucleótido del par complementario (cada uno a una concentración de 10 pmoles/µl) en 196 µl de buffer de hibridación (10 mM Tris-HCl pH 7.5–8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA). La mezcla se calentó en baño de agua a 95°C y se la dejó el tiempo suficiente para su enfriamiento a temperatura ambiente. Luego los insertos fueron clonados entre los sitios de corte NheI/BamHI del

plásmido pccKAN, que fue gentilmente provisto por la Dra. Camila Scorticatti (IIBio-UNSaM/CONICET).

2.12.2. Cuantificación de la expresión del gen reportero.

2.12.2.1. Ensayo de difusión en agar.

Bacterias *E. coli* MM39 (araD, Lac Δ U1269, malE Δ 444, strR) fueron transformadas con los plásmidos que contenían las construcciones ToxR'-TMD-MBP. Luego fueron cultivadas en medio Luria Bertani (LB) con ampicilina (Amp) (100 μ g/ml) hasta alcanzar una densidad óptica (DO A₆₀₀) de 0,6. Luego fueron sembradas en placas con medio LB con agar (100 μ l del cultivo). Para cada construcción se colocó en el centro de cada placa de petri un disco conteniendo 60 μ l de cloranfenicol (90 mg/ml en etanol 100%) y se incubaron a 37°C durante 12-16 h. De cada construcción se realizaron 3 placas por experimento y se cuantificaron los perímetros de los halos de inhibición. Las proteínas quiméricas que contienen el TMD de la GpA y el plásmido vacío (pccKAN) fueron usados como control positivo y control negativo respectivamente.

2.12.2.2. ELISA CAT.

Para que todos los cultivos bacterianos que contenían las construcciones quiméricas de interés crecieran al mismo tiempo éstos fueron inoculados a partir de los gliceroles de reserva guardados en un freezer a -70°C y se dejaron en agitación a 37°C hasta una DO A₆₀₀ de 0,6. Posteriormente 1 ml de cultivo bacteriano fue resuspendido en 0,5 ml de buffer de lisis. Estas muestras fueron guardadas en un freezer a -70°C hasta su medición. La concentración de CAT se midió con un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas comercial (CAT ELISA) (Roche, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una alícuota de cada condición ensayada fue tomada para medir concentración de proteínas por el método de Bradford. Este valor fue utilizado para normalizar los valores de concentraciones de CAT obtenidos a la cantidad de proteínas total en cada caso. Los resultados fueron además relativizados a la cantidad de CAT inducida por la expresión de la GpA.

2.12.3. Ensayo de complementación de malE.

Bacterias MM39 expresando las diferentes quimeras ToxR'-TMD-MBP fueron cultivadas en placas con medio mínimo M9 sólido (Na₂HPO₄ 3,37 mM, KH₂PO₄ 2,2 mM, NaCl 0,855 mM, NH₄Cl 0,935 mM, MgSO₄ 1 mM, CaCl₂ 0,3 mM, agar 1,5% p/v) suplementado con 0,4% p/v de maltosa y ampicilina (100 μ g/ml) durante 48 h. El crecimiento de las mismas en este medio con maltosa como única fuente de carbono, indica la correcta expresión y ubicación de la quimera ToxR'-TMD-MBP correspondiente, con el dominio MBP hacia el espacio periplásmico.

2.13. Purificación de membranas resistentes a detergente (DRM).

Los DRM se prepararon según fue descrito⁷⁰ con modificaciones. Se resuspendieron 2,5 x 10⁷ trofozoítos (clon VSP1267) en 5 ml de medio TYI-S-33 con 50 nM de mAb 7F5 o sin mAb durante 30 min a 37°C. El pretratamiento con metil- β -ciclodextrina (MBCD) 10 mM se realizó en PBS suplementado con ácido ascórbico al 0.01% p/v y cisteína al 2% p/v, pH 7.2 (PBSAC) durante 30 min y luego se incubó con 50 nM de MAb 7F5 en PBSAC. A continuación, los trofozoítos se lavaron con buffer TNE (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM) y se lisaron en 600 μ l de buffer TNE complementado con 1% p/v de Triton X-100 y cóctel inhibidor de proteasa 2X (Complete™ Roche) durante 40 min a 37 ° C. Se añadió un volumen igual de sacarosa al 80% en TNE a los lisados celulares para ajustar la concentración de sacarosa al 40%. A continuación, los lisados se colocaron en el fondo de un tubo de ultracentrifuga y se cubrieron cuidadosamente con 5 ml de TNE sacarosa al 35% y 1 ml de

TNE. Los tubos se centrifugaron a 250000 g en el rotor SW41Ti durante 20 h a 2°C. Se obtuvieron cuidadosamente 14 fracciones de 500 µl desde la parte superior de cada tubo. Se sometieron 36 µl de cada fracción a SDS-PAGE en condiciones no reductoras. La VSP1267 se detectó mediante Western blot usando el mAb 7F5 (dilución 1/1000) y anticuerpo secundario anti-mouse conjugado con IRDye 800CW (dilución 1/20000) para su revelado en equipo Odyssey. La cuantificación se realizó mediante densitometría utilizando el software Fiji/ImageJ. Las fracciones 3-12 se consideraron que contenían DRM y 13-14 que contenían DSM.

2.14. Extracción de lípidos ácidos y ensayo de dot-blot para la cuantificación de fosfoinosítidos.

La extracción de lípidos ácidos se realizó como ha sido descrito previamente⁷¹. Para la extracción de lípidos de *G. lamblia* se utilizaron $3,5 \times 10^6$ trofozoítos del clon VSP1267 para cada punto de tiempo analizado; para *T. brucei* se utilizaron 1×10^7 parásitos. Para el ensayo de dot-blot, se disolvieron los extractos de lípidos en 60 µl de metanol / cloroformo / agua (2: 1: 0,8, v/v/v), se colocaron 2 µl de cada muestra sobre membranas de nitrocelulosa y se secaron al aire. Las membranas se bloquearon con 4% de BSA en TBS con 0,05% de Tween 20 (TBST) durante 1 h a temperatura ambiente y luego se incubaron durante 12 h con mAb anti-PI(4,5)P₂ o anti-PI(3,4,5)P₃ (dilución 1/1000) en TBST con 2% de BSA a 4 °C. Después de un lavado extenso con TBST se realizó una incubación con anticuerpo anti-mouse conjugado con IRDye 640LT (dilución 1/20000) para su revelado en equipo Odyssey. La cuantificación se realizó mediante densitometría utilizando el software Fiji/ImageJ.

2.15. Inmunomarcación con oro para estudios de localización subcelular por microscopía electrónica.

Aproximadamente 5×10^6 trofozoítos de *Giardia lamblia* clones TSA417, VSP1267, VSP9B10 y VSPH7 fueron tratados en medio de cultivo conteniendo los respectivos mAbs (diluciones: mAb 7C2 4 nM; mAb 7F5 4 nM; mAb 9B10 1/1500; mAb G10/4 1/1500) en tubos de cultivo de 7 ml durante 1 h en hielo. Luego del tratamiento los trofozoítos fueron lavados para eliminar todo exceso de anticuerpo no unido, resuspendidos en medio de cultivo e incubados a 37°C durante 15, 30, 60 y 120 min. Finalizado cada tiempo de incubación, los tubos fueron enfriados en hielo durante 15 min para despegar las células, se realizaron 2 lavados con PBS frío y se procedió a la fijación de las células con paraformaldehído 4% en buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 7,2 durante 1 h. Luego se realizaron 3 lavados con incubaciones de 10 min en PBS, se bloquearon los grupos aldehídos reactivos incubando con PBS NH₄Cl 50 mM durante 10 min, y se realizó un bloqueo posterior incubando con PBS BSA 1% durante 15 min. La marcación se realizó incubando las células con anticuerpos anti-mouse conjugados a partículas de oro de 10 nm en dilución 1/10 en PBS BSA 1% durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron 3 lavados con PBS y las muestras fueron fijadas con glutaraldehído 2,5% en buffer cacodilato 0,1 M pH 7,2.

2.16. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Las células fijadas con glutaraldehído se fijaron posteriormente con OsO₄ al 1% y ferrocianuro de potasio al 0,8% durante 40 min. Las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona hasta el 100% y se embebieron en resina epoxi, Epon. Se realizaron secciones ultrafinas (50-60 nm de espesor), se recogieron y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Por último, las muestras se analizaron con un microscopio TEM Tecnai Spirit (FEI Co., Holanda).

2.17. Microscopía electrónica de barrido (SEM).

Las células fijadas con glutaraldehído se fijaron posteriormente durante 15 min en OsO₄ al 1%. Posteriormente, las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes

de etanol hasta el 100%, se secaron a punto crítico con CO₂ líquido y se recubrieron con carbono para observar detalladamente la superficie celular. Las muestras se examinaron en un equipo Quanta SEM (FEI Co., Holanda) con filamento FEG. Las imágenes se obtuvieron mediante detección de electrones secundarios (SE) y / o electrones retrodispersados (BSE) a un voltaje de aceleración de 15 kV. Para el análisis de microscopía de barrido de alta resolución (HR-SEM), la etapa de recubrimiento por pulverización catódica se realizó utilizando una capa fina (2 nm) de platino y las células se observaron en un equipo SEM de alta resolución Auriga (Zeiss, Alemania).

2.18. Purificación de microvesículas y validación.

Un número de $1,5 \times 10^8$ trofozoítos clon TSA417 en crecimiento exponencial se lavaron dos veces con PBS filtrado a 37°C y se incubaron 4 h a 37°C con mAb 7C2 (5 nM) en medio de purificación de microvesículas (medio TYI-S-33 ultrafiltrado - 100 KDa MWCO - suplementado con suero bovino adulto al 3% ultracentrifugado 12 h a 250.000 g). Los tubos de cultivo se colocaron en hielo para el desprendimiento de células y se centrifugaron durante 10 min (4°C) en un rotor de cubeta oscilante. Los sobrenadantes se recogieron en tubos de centrifuga de 50 ml y se centrifugaron a 3000g 40 min (4°C), este paso se repitió una vez más pasando los sobrenadantes a nuevos tubos. Después de eso, el sobrenadante se concentró 10X en un dispositivo de filtro centrífugo (Centricon® Plus-70-100K, Millipore CAT. #UFC710008) y se ultracentrifugó en un rotor SW41Ti Beckman (25000 rpm, 2 h, a 4°C). Los pellets se lavaron en una cantidad igual de PBS filtrado y enfriado con hielo y se ultracentrifugaron nuevamente para recuperar las microvesículas. La purificación de microvesículas fue validada por TEM. Brevemente, se resuspendió un pellet de microvesículas en 500 µl de PBS al 1% BSA con IgG anti-mouse conjugada con partículas de oro de 10 nm (dilución 1/100) y se incubó durante 2 h en hielo. Después de eso, la muestra se lavó dos veces con PBS filtrado y se fijó con PFA al 2% en PBS. También se fijaron microvesículas sin marcaje con oro. Para obtener imágenes TEM, se hicieron flotar rejillas de níquel recubiertas con Formvar sobre 10 µl de suspensión de microvesículas durante 20 min. Después de eso, las microvesículas adsorbidas en las rejillas se fijaron posteriormente en glutaraldehído al 1%. Las rejillas se enjuagaron con agua destilada y se contrastaron sucesivamente en acetato de uranilo al 2%, pH 7, y metilcelulosa al 2% / acetato de uranilo al 0,4%, pH 4⁷². Las microvesículas se visualizaron usando un microscopio electrónico de transmisión Zeiss Leo 906-E (Oberkochen, Alemania).

2.19. Proteómica de microvesículas.

Las microvesículas inducidas por mAb 7C2 en 3 clones independientes de *Giardia* expresando la VSP TSA417 se analizaron mediante proteómica. Las microvesículas purificadas se lisaron en buffer RIPA con cóctel inhibidor de proteasa Complete™ (Roche). El extracto proteico se cuantificó mediante el kit de ensayo de proteínas Pierce™ BCA (CAT. #23225). Se corrieron 15 µg de cada muestra en SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Las muestras en gel fueron enviadas para su análisis por la empresa MS Bioworks (Ann Arbor, Michigan, Estados Unidos). El perfil proteómico de las muestras se analizó mediante nano LC-MS/MS con un sistema de HPLC Waters NanoAcquity conectado a un espectrómetro de masas ThermoFisher Q Exactive. Se emplearon 2 h de tiempo instrumental. El espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo dependiente de los datos, con el Orbitrap funcionando a 70.000 FWHM y 17.500 FWHM para MS y MS / MS respectivamente. Los quince iones más abundantes fueron seleccionados para MS / MS. Los datos se procesaron utilizando Mascot (Matrix Science) con los siguientes parámetros: Enzima: Tripsina / P; Base de datos: NCBI *Giardia lamblia* (concatenados hacia adelante y hacia atrás más contaminantes comunes); Modificación fija: Carbamidometil (C); Modificaciones variables: oxidación (M), acetilo (término N), Pyro-Glu (término N Q), desamidación (N / Q); Valores de masa: monoisotópico; Tolerancia de masa de péptidos: 10 ppm; Tolerancia de masa del fragmento: 0,02 Da; Máx. Divisiones perdidas: 2. Los archivos DAT de mascot se

analizaron en Scaffold para su validación, filtrado y para crear una lista no redundante por muestra.

2.20. Análisis estadístico.

El análisis estadístico fue llevado a cabo utilizando el Test T de Student o ANOVA a un factor seguido de una prueba de Tukey según corresponda y referido en la leyenda de cada figura. Los cálculos fueron realizados y graficados con el programa Graph Pad Prism 6.0.

CAPÍTULO 3

**Efecto de los anticuerpos anti-VSP
sobre la variación antigénica en
*Giardia.***

3. CAPÍTULO 3: Efecto de los anticuerpos anti-VSP sobre la variación antigénica en *Giardia*.

Las observaciones previas acerca de la VA en poblaciones de trofozoítos tratadas con bajas concentraciones de mAb anti-VSP⁵⁹ nos llevaron a plantear la pregunta de cómo determinar fehacientemente si el cambio fenotípico observado es el resultado de procesos de *switching* espontáneos a nivel de algunas células individuales que luego son seleccionadas por un agente externo o si, por otra parte, resulta de la inducción que ejerce este agente sobre células individuales. Cuando el agente estresor es un anticuerpo, el problema es aún mayor, porque su posible “efecto inductor” no puede separarse de un efecto de selección, ya que inevitablemente va a unirse sólo a las células blanco y no a los *switchers*, alterando el crecimiento de las primeras sin afectar a estos últimos. De esta forma, la VA medida como la proporción de *switchers* a nivel de la población tratada con anticuerpos va a tener un componente “amplificador” producto de la selección de estos últimos por parte del anticuerpo, que no va a estar presente en la población control.

Considerando que este problema no podría resolverse mediante una perspectiva tradicional basada en mediciones promedio de poblaciones celulares (enfoque poblacional), decidimos encararlo mediante el análisis de clones derivados de células individuales (enfoque de célula individual o *single cell*⁷³). El diseño experimental se esquematiza en la Figura 3.1. Aproximadamente cincuenta trofozoítos de *Giardia* expresando una VSP particular se dispersaron en 20 ml de medio de cultivo conteniendo una concentración final de 5 nM de anticuerpo contra la respectiva VSP o un anticuerpo no relacionado (control) y se distribuyeron en placas de 96 pocillos de manera de obtener una relación de 0,5 células por pocillo. Luego de 7 días de cultivo se contó el número total de pocillos conteniendo células crecidas, y para cada uno se analizó la expresión de diferentes VSPs mediante ensayos de IFI. No se observaron diferencias significativas en el número de pocillos con trofozoítos crecidos al cabo de 7 días de cultivo entre las placas control y las placas tratadas con anticuerpos. Esto confirma la ausencia de efecto citotóxico por parte de los anticuerpos sobre los trofozoítos de *Giardia* a la concentración ensayada. Por otra parte, en las placas control un gran porcentaje de pocillos (del 55% al 100% del total) resultaron en poblaciones de trofozoítos que mantienen la VSP original en por lo menos un 80% de las células, mientras que en las poblaciones clonales obtenidas de las placas tratadas con anticuerpo el porcentaje de células expresando la VSP original no superó el 2% en ninguno de los casos (datos tomados de Ríos, D.N.; Tesis doctoral, 2021⁷⁴).

Este ensayo permitió independizarnos de los efectos de selección de los anticuerpos, ya que los resultados no dependen de la tasa de crecimiento de las células, sino que a través del recuento del número de clones y de su perfil de expresión de VSPs se pudo inferir el efecto generado por el tratamiento sobre células individuales aisladas en cada pocillo. Esto último confirma la hipótesis de que los anticuerpos anti-VSP son capaces de inducir la VA en *Giardia*, cambiando el paradigma actual acerca del rol de la interacción de los anticuerpos con las células blanco durante la VA y abriendo un sinnúmero de nuevos interrogantes.

En el presente capítulo se abordan cuestiones generales acerca de la VA en *Giardia* y el efecto de los anticuerpos anti-VSP sobre este proceso. Si bien este tema ha sido ampliamente estudiado por varios grupos de investigación con anterioridad, hemos adoptado nuevos criterios y estrategias experimentales para poder demostrar fehacientemente la capacidad de los anticuerpos anti-VSP de inducir el *switching* en células individuales. El abordaje en este capítulo es puramente celular y poblacional, con el objeto de caracterizar cómo responde la población de parásitos ante estímulos de anticuerpos anti-VSP de concentración y duración variables. Esta información es relevante como punto de partida para el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la regulación del *switching* inducido por anticuerpos anti-VSP a nivel celular, y para la construcción de un modelo capaz de explicarlo.

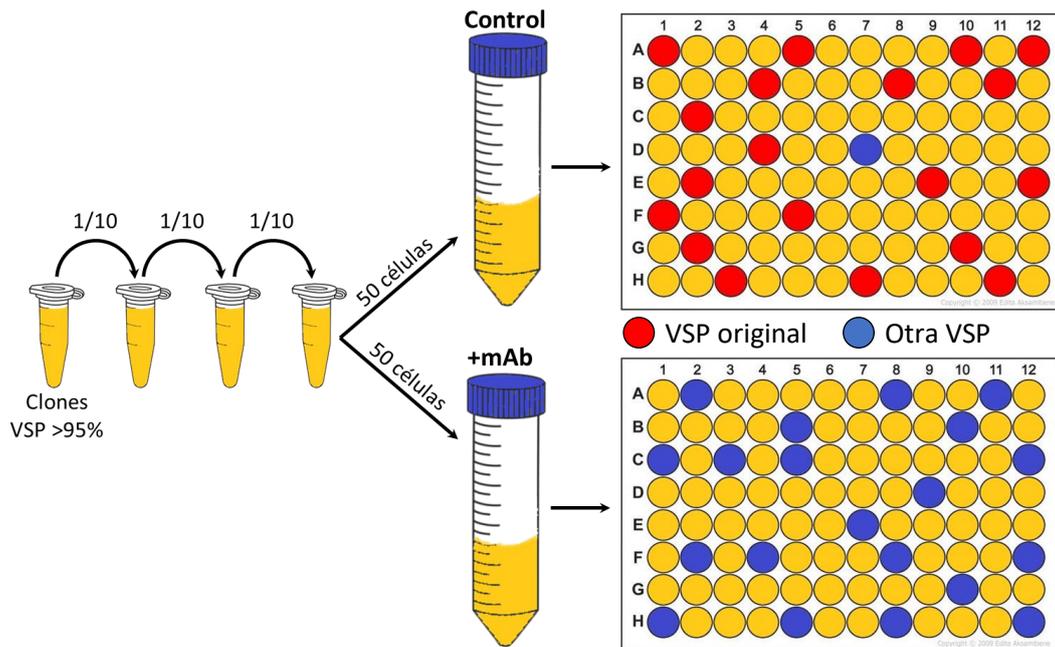


Figura 3.1: Efecto de los anticuerpos anti-VSP sobre trofozoítos de *Giardia* desde un enfoque de célula individual. Se muestra un esquema del experimento. Aproximadamente cincuenta trofozoítos provenientes de poblaciones clonales en las que se expresaba mayoritariamente una VSP particular (>95%) se dispersaron en 20 ml de medio de cultivo conteniendo anticuerpo contra la respectiva VSP (+mAb) o un anticuerpo no relacionado (control) y se distribuyeron en placas de 96 pocillos. Luego de 7 días de cultivo se contó el número total de pocillos conteniendo células crecidas, y para cada uno se analizó la expresión de diferentes VSPs mediante ensayos de IFI. No se observaron diferencias significativas en el número de clones obtenidos en cada tratamiento, confirmando la ausencia de citotoxicidad por parte de los anticuerpos. Por otra parte, mientras que los clones derivados de los parásitos control mantuvieron la expresión de la VSP original, en los clones derivados de las células individuales tratadas con anticuerpo contra la VSP original no se observó expresión de la misma, indicando la capacidad de estos anticuerpos de inducir el *switching* en células blanco (datos adaptados de Ríos, D.N.; Tesis doctoral 2021⁷⁴).

3.1. Efecto de los anticuerpos anti-VSP sobre trofozoítos de *Giardia* desde un enfoque de célula individual (*single cell*).

El diseño experimental basado en el análisis de clones derivados de células individuales obtenidas por dilución límite presentado en la Figura 3.1 nos permitió confirmar la capacidad de los anticuerpos monoclonales anti-VSP de inducir el *switching* en células blanco. Utilizando un diseño similar, nos propusimos caracterizar algunos parámetros del proceso de VA inducida por anticuerpos.

3.1.1. Análisis de la expresión de nuevas VSPs luego de la variación antigénica inducida por anticuerpos.

Para evaluar la existencia de algún orden o jerarquía en la secuencia de expresión de las VSPs, se inocularon dos placas de 96 pocillos con un clon de *Giardia* que expresa la VSP TSA417 (>95%) de manera de obtener una relación de 0,5 células por pocillo. Las placas se cultivaron en presencia continua del mAb 7C2 (5 nM) durante 6 días. Cada clon de las placas se recolectó y analizó por IFI usando el mAb 7C2 (específico contra la VSP original) y otros cuatro mAbs para distintas VSPs. El número de trofozoítos positivos para cada mAb se contó a partir de imágenes de campos seleccionados al azar para cada clon. Los resultados obtenidos para cada placa de cultivo se muestran en la Tabla 3.1.

Placa A						Placa B					
Clon	7C2	3B10	7F5	7C9	2B10	Clon	7C2	3B10	7F5	7C9	2B10
A6	1.9	7.5	1.1	2.1	1.9	A4	0.7	1.2	0.8	0.9	1.1
A11	0.5	8.9	2.5	0.9	2.3	A9	9.4	0.8	10.2	1.6	0.9
B10	2.3	3.2	1.9	7.1	10	B1	0.9	0.9	1.4	4.8	1.3
C1	0.7	1.0	1.9	1.3	1.1	B3	1.2	1.3	0.9	1.1	2.7
C2	0.0	3.8	1.2	10.9	2.3	B8	0.7	0.4	0.0	1.9	2.5
C5	0.2	5.1	0.4	41.3	0.3	B11	1.1	3.5	1.1	1.3	1.7
C10	0.7	0.9	1.3	1.3	1.8	C11	1.4	0.8	1.4	6.1	2.9
C11	0.7	5.7	92.2	1.1	0.4	C12	0.8	0.7	1.1	15.5	1.7
C12	0.0	4.7	1.1	15.4	1.0	D1	0.0	0.0	1.1	1.7	0.0
D5	0.0	1.0	0.4	1.5	1.3	D5	0.4	1.1	0.8	16.4	24.3
D11	1.25	3.0	1.6	0.9	2.2	D8	1.7	1.4	0.9	1.6	0.9
E3	1.7	4.0	3.1	2.4	1.7	E3	1.1	3.7	0.9	1.1	2.5
E4	0.5	0.8	0.4	1.0	2.2	E10	0.0	8.5	3.6	3.0	1.7
E10	9.3	4.9	7.0	4.1	6.1	F2	0.8	0.4	0.8	0.7	0.6
E12	0.5	0.9	0.7	1.6	2.0	F5	1.0	0.4	0.9	2.8	0.7
F8	0.5	11.7	0.6	20.5	21.2	F9	11.8	0.0	17.6	3.4	0.0
G2	3.8	0.7	1.0	1.7	1.9	G1	0.0	2.9	1.4	1.0	1.2
G3	0.3	0.5	5.0	4.1	2.4	G9	0.2	75.5	0.6	2.3	0.6
G5	2.6	3.6	2.6	2.1	1.0	G11	0.0	1.4	0.0	2.3	0.8
G12	0.5	1	0.8	8.0	1.6	H2	0.0	0.9	0.3	13.3	0.9
H9	0.0	0.0	0.0	3.8	3.7	H6	1.7	0.8	0.8	2.3	0.8
H12	0.0	7.3	1.7	12.8	4.8	H10	0.7	0.8	0.9	2.4	1.3
Promedio	1.3	3.7	5.8	6.6	3.3	Promedio	1.6	4.9	2.2	4.0	2.3
SD	2.1	3.2	19.4	9.4	4.5	SD	3.0	15.9	4.0	4.7	5.0

Tabla 3.1: Análisis de la expresión de nuevas VSPs luego del *switching*. Porcentaje de trofozoítos de *Giardia* positivos para distintas VSPs en cada clon obtenido luego del *switching* inducido sobre trofozoítos expresando la VSP TSA417 con mAb 7C2 5 nM. El promedio y la desviación estándar (SD) de los porcentajes de células positivas para cada VSP se indican en la parte inferior.

En la mayoría de los clones obtenidos se observaron pequeños porcentajes de células positivas para todas las VSPs analizadas. Considerando que cada clon proviene de una única célula expresando la VSP TSA417, y que luego de 6 días en cultivo cada población clonal contiene representantes de todas las VSPs analizadas en diferentes proporciones (entre una variedad de VSPs no detectadas por nuestro panel de mAbs) se puede deducir en primer lugar, que el *switching* no ocurre necesariamente en la primera célula que origina cada población clonal, ya que de ser así se esperaría que todos los clones descendientes expresaran una misma VSP diferente de TSA417. Por el contrario, una amplia variedad de células expresando diferentes VSPs sólo puede explicarse asumiendo que la célula TSA417 original se divide varias veces antes de que el mAb 7C2 induzca el *switching* en las mismas, y que las células descendientes varían hacia diferentes VSPs. De ser así, esto indica que no existe un orden en la secuencia de cambio en la expresión de una VSP por otra, sino más bien apunta a que la elección de una nueva VSP durante el *switching* es un proceso aleatorio.

3.1.2. Dependencia de la VA con la concentración de anticuerpo y la duración del estímulo.

Los experimentos de inducción de la VA descritos anteriormente fueron realizados en presencia constante del anticuerpo inductor durante 3 a 6 días, al cabo de lo cual se observa prácticamente la desaparición de células expresando la VSP original (Ríos, D.N.; Tesis doctoral 2021⁷⁴, Torri, A.; Tesis doctoral 2016⁵⁹). En estas condiciones, los anticuerpos no sólo

estimulan la población original de trofozoítos, sino también a las sucesivas generaciones de células hasta la total desaparición de la VSP original. Para profundizar en el entendimiento del sistema de regulación de la VA, en este trabajo nos propusimos estudiar la dependencia de la respuesta (*switching*) ante “pulsos” de señal (mAbs) de concentración y duración variables, a diferencia de estímulos constantes.

En primera instancia, se evaluó el efecto de pulsos de anticuerpos desde un enfoque poblacional. Poblaciones de 5×10^4 trofozoítos clones que expresan las VSPs 1267 o TSA417 fueron incubados con distintas concentraciones de los mAbs correspondientes (7F5 y 7C2, respectivamente) durante 1 h en hielo (para permitir la unión de los mAbs e inhibir cualquier proceso de transporte que pueda darse en la membrana plasmática), luego de lo cual se realizaron lavados de las células para eliminar los mAbs no unidos y se pusieron a crecer en condiciones normales durante 72 h. Al cabo de este tiempo, se procedió a la fijación y marcación de las células con los anticuerpos correspondientes marcados con FITC para cuantificar el porcentaje de células que expresaban la VSP original por citometría de flujo.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.2. Para ambos clones se observa una disminución del porcentaje de células positivas para la VSP original a medida que aumenta la concentración de anticuerpo inductor; sin embargo, no se logra una VA poblacional completa. Por el contrario, queda un porcentaje significativo de células expresando la VSP original pese al tratamiento con anticuerpos por cortos periodos.

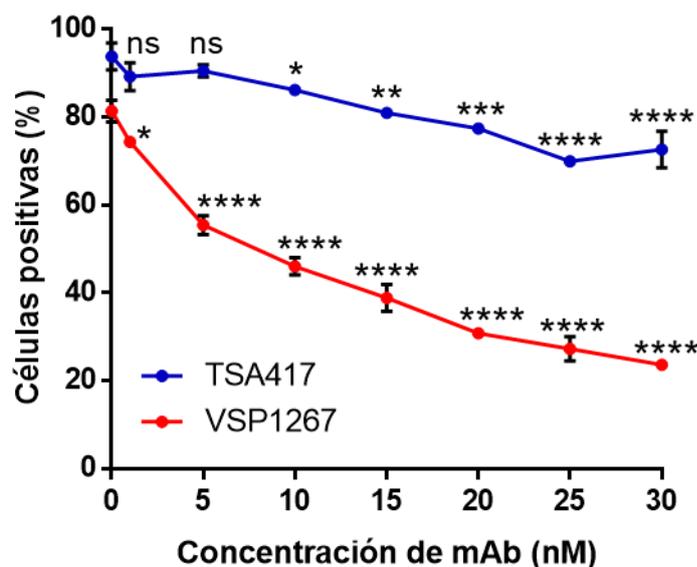


Figura 3.2: Dependencia de la VA a nivel poblacional con la concentración de mAb en pulsos de estímulo discretos. Trofozoítos de *G. lamblia* expresando la VSP1267 o TSA417 fueron tratados con diferentes concentraciones de sus mAbs correspondientes (7F5 y 7C2, respectivamente) durante 1 h en hielo. Luego de eliminar el exceso de anticuerpo, se incubaron en condiciones normales durante 72 h. Al cabo de dicho tiempo, se determinó el porcentaje de trofozoítos positivos para cada VSP por citometría de flujo. Cada condición se ensayó por duplicado. Los puntos de cada curva fueron comparados con su respectivo control (mAb 0 nM) por ANOVA a un factor. * $p < 0,05$; ** $p < 0,1$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns, diferencia no significativa $p > 0,05$. Barras de error: desviación estándar.

Remarcablemente, los dos clones responden de manera distinta a sus respectivos anticuerpos, mostrando el clon que expresa la VSP1267 una mayor respuesta al pulso de su respectivo mAb que el clon que expresa la VSP TSA417. Esta última observación es coherente con lo observado para los mismos clones respecto de la tasa espontánea de VA *in vitro*⁷⁴ y parece indicar alguna diferencia a nivel de la regulación de la expresión de estas VSPs individuales.

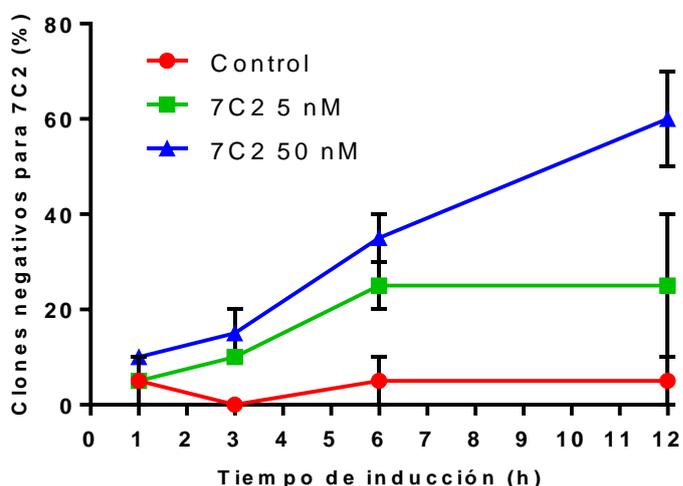
Para independizarnos de posibles efectos de los anticuerpos en la proliferación de las células blanco, se analizó también el efecto de pulsos de anticuerpo de concentración y duración variable desde un enfoque *single cell*, analizando clones derivados de células individuales. Clones de trofozoítos expresando la VSP TSA417 se incubaron con diferentes concentraciones de mAb 7C2 durante diferentes tiempos. Luego se realizó una dilución y los trofozoítos se distribuyeron en una placa de 96 pocillos para obtener 0,5 células por pocillo. Las placas se incubaron durante 5 días en condiciones normales al cabo de los cuales se

contó el número de clones obtenidos. Diez clones por condición fueron seleccionados al azar y se sometieron a inmunofluorescencia usando el mAb 7C2 para cuantificar los porcentajes de células expresando la VSP original en cada pocillo.

Se encontró la misma cantidad de clones totales de *Giardia* crecidos a partir de células individuales en las placas, independientemente de la concentración de anticuerpo y la duración del estímulo, confirmando la ausencia de citotoxicidad por parte de los anticuerpos en las condiciones del ensayo. El porcentaje de células expresando la VSP original en cada pocillo resultó ser muy variable, por lo que para el análisis de los resultados se consideró como clones negativos para la VSP original a aquellos en los que el porcentaje de células expresando esa VSP fuera menor al 30%. Considerando estos parámetros, se observó que el porcentaje de clones que cambiaron a una VSP diferente después del estímulo aumentó no solo con el tiempo sino también con la concentración de anticuerpos utilizada (Figura 3.3).

Figura 3.3: Dependencia de la variación antigénica con la concentración de anticuerpo y la duración del estímulo.

Clones de trofozoítos expresando la VSP TSA417 se incubaron con diferentes concentraciones de mAb 7C2 (5 y 50 nM) o sin mAb (control), durante diferentes tiempos (1, 3, 6 y 12 h). Luego se realizó una dilución y los trofozoítos se distribuyeron en placas de 96 pocillos para obtener 0,5 células por pocillo. Las placas se incubaron durante 5 días en condiciones normales y se contó el número de clones obtenidos (número de pocillos crecidos). Diez clones por condición fueron seleccionados al azar para su análisis por IFI usando el mAb 7C2 para cuantificar el porcentaje de células conteniendo la VSP original en cada pocillo. Se muestra el porcentaje de pocillos conteniendo menos del 30% de células positivas para la VSP original para cada condición. Barras de error: SEM, n=2.



Resulta interesante notar que no todos los trofozoítos respondieron al pulso de estímulo, porque incluso a altas concentraciones de anticuerpo (50 nM) y durante un período relativamente largo en presencia del mismo (12 h), muchas células aún mantuvieron la VSP original en su superficie. Por otra parte, aún a la concentración de anticuerpo más baja ensayada (5 nM), la VA es completa cuando el estímulo se deja de manera constante durante 3 a 6 días (Ríos, D.N.; Tesis doctoral 2021⁷⁴, Torri, A.; Tesis doctoral 2016⁵⁹ y Tabla 3.1). Estos resultados parecen indicar que no todas las células responden de manera sincronizada al estímulo, sino que existe una cierta probabilidad de *switching* a nivel de cada célula individual que se ve aumentada cuanto mayor es el tiempo de duración del estímulo, incluso cuando se estimulan varias generaciones celulares.

3.2. Efecto de los anticuerpos anti-VSP en la cinética de la VA *in vitro*.

Los métodos de medición del porcentaje de VA utilizados en los ensayos descritos en los apartados anteriores se basaron exclusivamente en cuantificar células negativas para la VSP original (*switchers*). Sin embargo, teniendo en cuenta que durante el *switching* a nivel celular transcurre un período en donde la VSP original y la nueva colocalizan en la superficie hasta que la primera desaparece⁴⁷, es probable que el cambio en la expresión de una VSP por otra antigénicamente diferente se dé mucho antes (incluso quizás en generaciones celulares anteriores) de lo observado mediante la desaparición total de la VSP original.

Para poder estudiar la cinética del *switching* y profundizar en la comprensión de la dinámica del reemplazo de una VSP por otra durante la VA estimulada por anticuerpos, buscamos generar anticuerpos capaces de detectar la expresión de la nueva VSP después de inducir la VA. Como una población clonal de trofozoítos expresando una única VSP puede cambiar a una variedad de VSPs diferentes, se procedió a generar un suero policlonal capaz de reconocer un gran conjunto de VSPs que no incluyera la VSP TSA417.

Clones de trofozoítos de *G. lamblia* ensamblaje A aislamiento WB expresando la VSP TSA417 se cultivaron en presencia de mAb 7C2 1 μ M durante una semana para obtener una población de células que expresan múltiples VSP, sino todas excepto la TSA417. Estas células se usaron para inocular ratas y obtener un suero policlonal anti-TSA417(-) (pAb TSA417(-)). El pAb TSA417(-) fue probado por IFI en células vivas confirmando la detección de muchas VSPs y descartando su reactividad cruzada con células positivas para TSA417 (Figura 3.4).

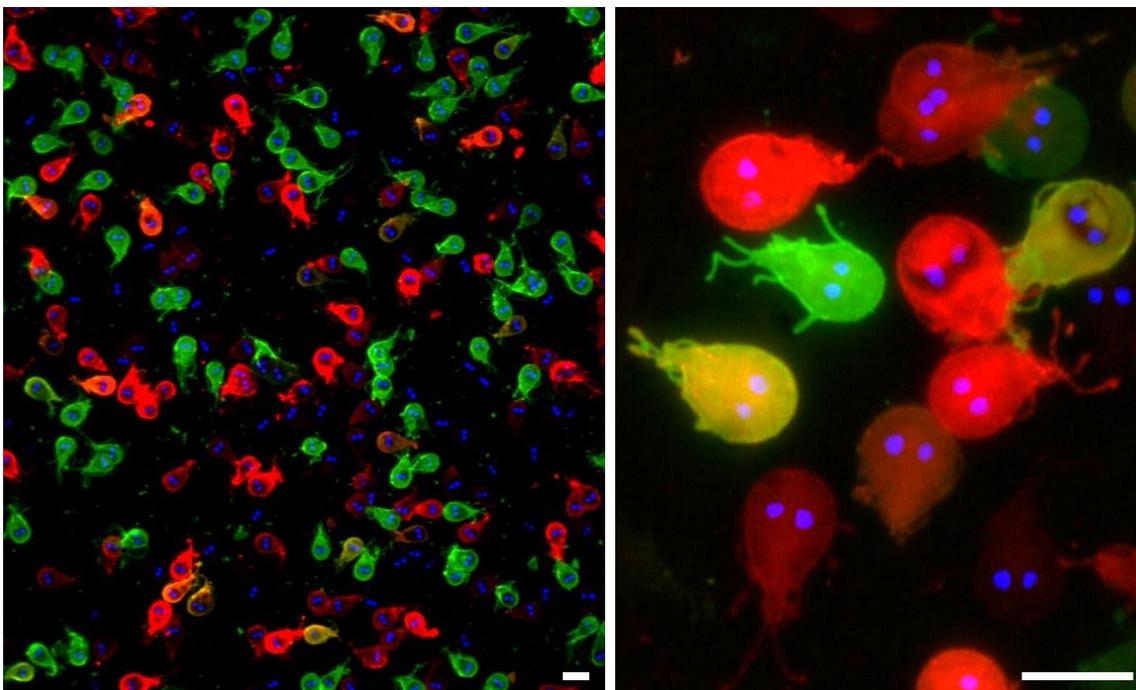


Figura 3.4: Patrón de marcación del suero policlonal anti-TSA417(-) y el mAb 7C2 en una población de trofozoítos de *Giardia*. Ensayos de inmunofluorescencia utilizando el suero policlonal anti-TSA417(-) (rojo) y el mAb 7C2 (anti-TSA417, verde) sobre una población no clonal de *G. lamblia* ensamblaje A aislamiento WB. Puede observarse la marcación en la superficie y flagelos de los trofozoítos y la ausencia de reactividad cruzada entre ambos anticuerpos. La colocalización de ambos marcadores se muestra en amarillo, y corresponde a células en proceso de *switching*. Barra de escala, 10 μ m. Los núcleos se encuentran teñidos con DAPI (azul).

Para el ensayo de cinética, se cultivaron trofozoítos del clon que expresa la VSP TSA417 en presencia de mAb 7C2 2 nM (o con un anticuerpo no relacionado como control) en tubos de cultivo de 7 ml durante diferentes tiempos hasta las 48 h. Dada la cantidad de parásitos requeridos para su recuento en hemocitómetro y análisis por citometría de flujo se prepararon tubos de cultivo individuales para cada tiempo de la curva, con un número inicial de parásitos calculado de manera tal que llegaran a un número de 1.5×10^6 parásitos por tubo a tiempo final (estimando un tiempo de duplicación de 8 h). En cada tiempo de la curva, se contó el número total de trofozoítos en los tubos correspondientes y se realizaron las marcaciones con mAb 7C2 y pAb TSA417(-) para analizar la expresión por citometría de flujo de células positivas y negativas para la VSPs TSA417. La Figura 3.5 muestra las curvas de crecimiento para los trofozoítos control y tratados, reconstruidas a partir de los números de

generaciones medidos para cada punto considerando un valor inicial arbitrario de células de 5×10^4 . Las células tratadas con anticuerpos no mostraron diferencias significativas en la tasa de crecimiento en comparación con el control a la concentración de anticuerpo utilizada. En ambos casos, la tasa de duplicación estimada fue de 9,6 h.

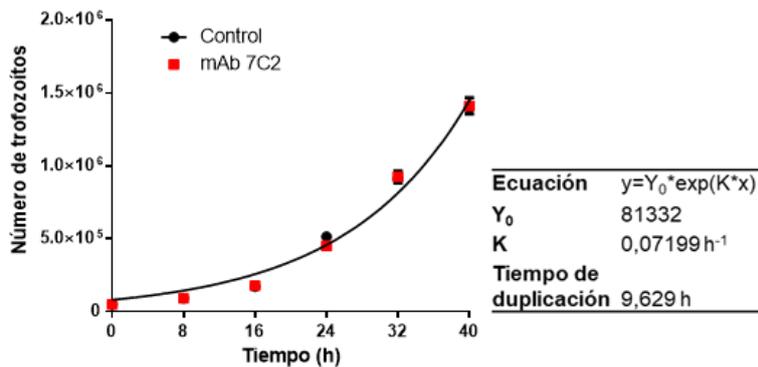


Figura 3.5: Cinética de crecimiento de trofozoítos de *Giardia* en presencia de mAb anti-VSP. Curvas de crecimiento de trofozoítos expresando la VSP TSA417 en presencia de mAb 7C2 2 nM o un anticuerpo no relacionado como control. No se observan diferencias significativas entre las curvas ($p > 0,05$). Se detallan los parámetros del ajuste.

La Figura 3.6 A muestra los porcentajes de células positivas para la VSP TSA417, células positivas para otras VSPs (TSA417(-)) y su comarcación, para cada condición. En el control prácticamente no se observaron cambios en los porcentajes de células que expresan la VSP TSA417 o en las células que expresan otras VSPs. Remarcablemente, las células tratadas con mAb 7C2 mostraron un patrón de conversión de células VSP TSA417 positivas en células TSA417 negativas durante las 48 h de tratamiento. En la Figura 3.6 B pueden observarse citogramas representativos que muestran el cambio en la distribución de la población de células VSP TSA417 positivas (cuadrante inferior derecho de cada citograma) a las células TSA417 negativas (cuadrante superior izquierdo de cada citograma), pasando por la comarcación de ambas VSPs (cuadrante superior derecho de cada citograma) cuando las células se estimulan con mAb 7C2 (columna derecha). Por otra parte, las células control no mostraron redistribución durante las 48 h de ensayo (columna izquierda). En la Figura 3.6 C se muestran los histogramas de distribución de trofozoítos expresando la VSP TSA417 que se corresponden a los citogramas de la Figura 3.6 B. Puede observarse un proceso paulatino de pérdida de la VSP TSA417 a nivel de la población celular tratada con el mAb 7C2.

Para estudiar los efectos de la concentración de anticuerpo inductor en la cinética de la VA, se realizó el mismo esquema experimental utilizando diferentes concentraciones de dicho anticuerpo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.7, donde se observa que un aumento en la concentración de anticuerpo genera un incremento en la cinética del *switching*; esto es, una caída más marcada en la expresión de la VSP TSA417 acompañada de un mayor incremento en la expresión de otras VSPs (TSA417(-)) y de la comarcación de ambas.

La colocalización de la VSP original y la nueva VSP durante el *switching* fue confirmada mediante IFI utilizando el mAb 7C2 y el pAb TSA417(-) y se observa en la Figura 3.8. La colocalización de las VSPs TSA417 y de otras VSPs distintas a la TSA417 en células individuales durante la conversión de la población de células TSA417 positivas en una población de células TSA417 negativas respalda nuestros hallazgos anteriores acerca de la inducción de la VA por anticuerpos al mostrar claramente y de manera más directa cómo los anticuerpos inducen el *switching* en células individuales, descartando la presencia de efectos de selección de *switchers* espontáneos por parte de los anticuerpos.

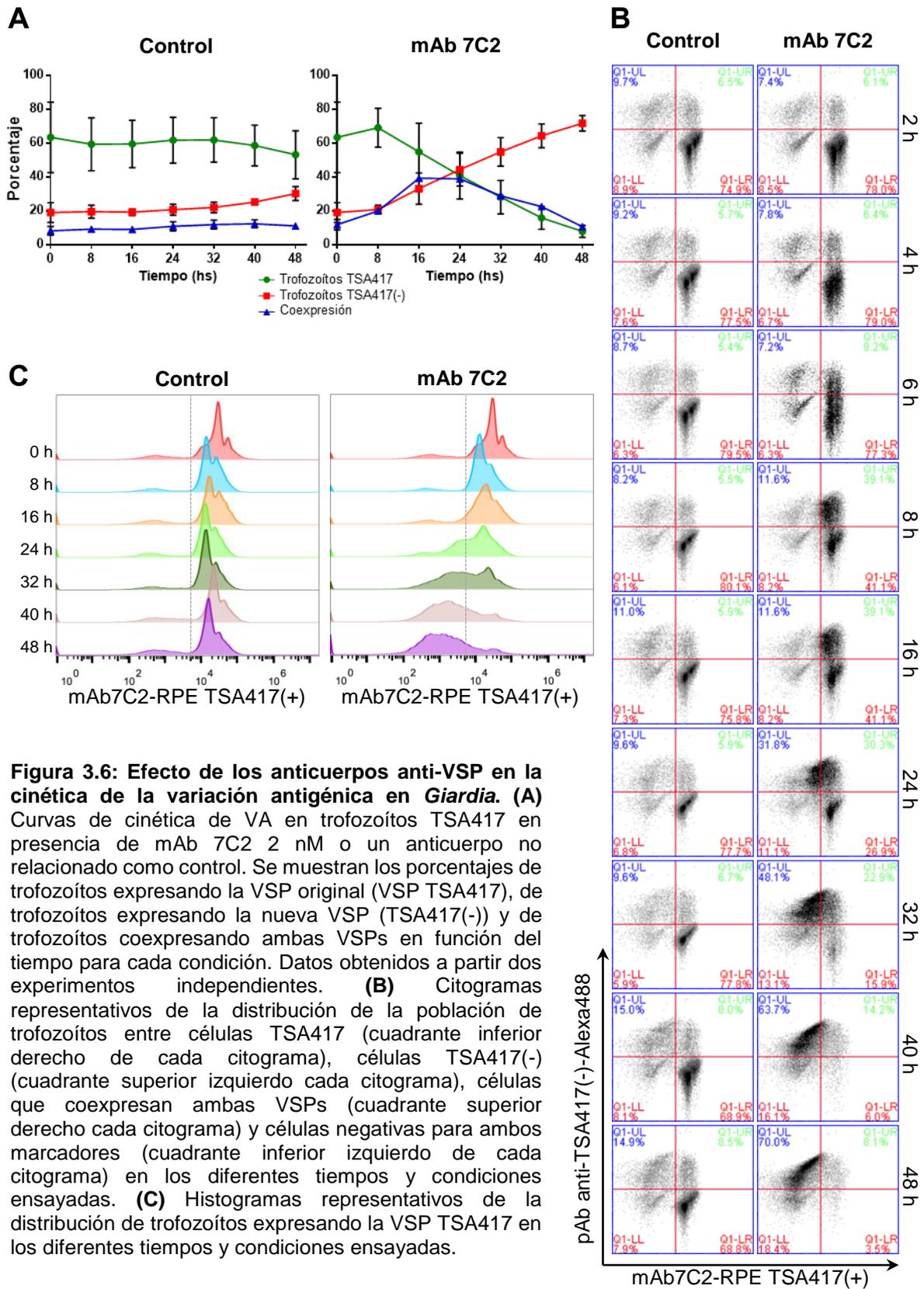


Figura 3.6: Efecto de los anticuerpos anti-VSP en la cinética de la variación antigénica en *Giardia*. (A) Curvas de cinética de VA en trofozoitos TSA417 en presencia de mAb 7C2 2 nM o un anticuerpo no relacionado como control. Se muestran los porcentajes de trofozoitos expresando la VSP original (VSP TSA417), de trofozoitos expresando la nueva VSP (TSA417(-)) y de trofozoitos coexpresando ambas VSPs en función del tiempo para cada condición. Datos obtenidos a partir dos experimentos independientes. (B) Citogramas representativos de la distribución de la población de trofozoitos entre células TSA417 (cuadrante inferior derecho de cada citograma), células TSA417(-) (cuadrante superior izquierdo cada citograma), células que coexpresan ambas VSPs (cuadrante superior derecho cada citograma) y células negativas para ambos marcadores (cuadrante inferior izquierdo de cada citograma) en los diferentes tiempos y condiciones ensayadas. (C) Histogramas representativos de la distribución de trofozoitos expresando la VSP TSA417 en los diferentes tiempos y condiciones ensayadas.

Es interesante observar que aunque la expresión de la nueva VSP se puede detectar a las 6-8 h después del tratamiento con anticuerpos (Figura 3.6 B), el cambio completo de la población de células VSP TSA417 positivas a VSP TSA417 negativas tiene lugar 48 h luego de iniciado el tratamiento con mAb 7C2, lo que significa que el recambio de la VSP a nivel poblacional no se completó en una sola generación, sino en alrededor de 5 generaciones (considerando un tiempo de duplicación de 9,6 h). Sorprendentemente, incluso a las 24 y 32 h luego de la inducción, hay un grupo considerable de células que no han respondido a la estimulación de anticuerpos. Estas observaciones son consistentes con nuestros resultados anteriores de inducción del *switching* con pulsos discretos de anticuerpo e indican que la probabilidad de respuesta ante el estímulo es diferente en cada célula, siendo necesaria una estimulación continua con anticuerpos durante varias generaciones para completar la VA a nivel poblacional.

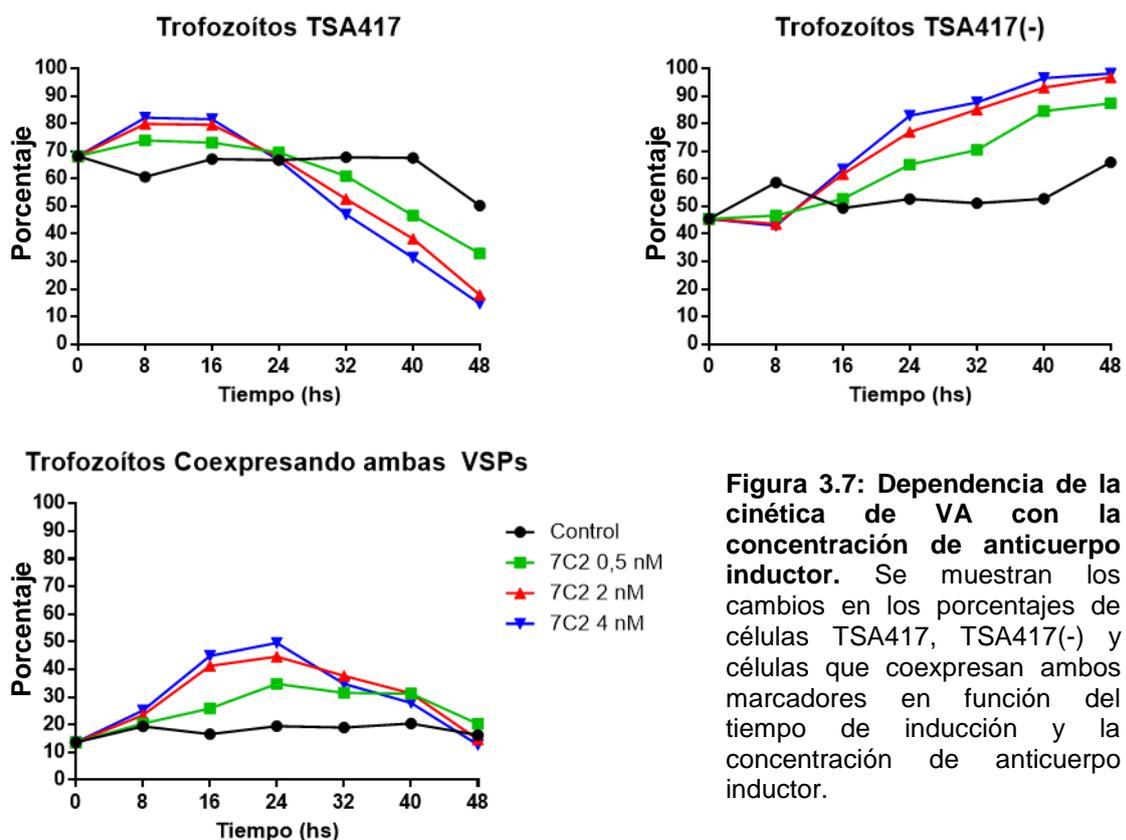


Figura 3.7: Dependencia de la cinética de VA con la concentración de anticuerpo inductor. Se muestran los cambios en los porcentajes de células TSA417, TSA417(-) y células que coexpresan ambos marcadores en función del tiempo de inducción y la concentración de anticuerpo inductor.

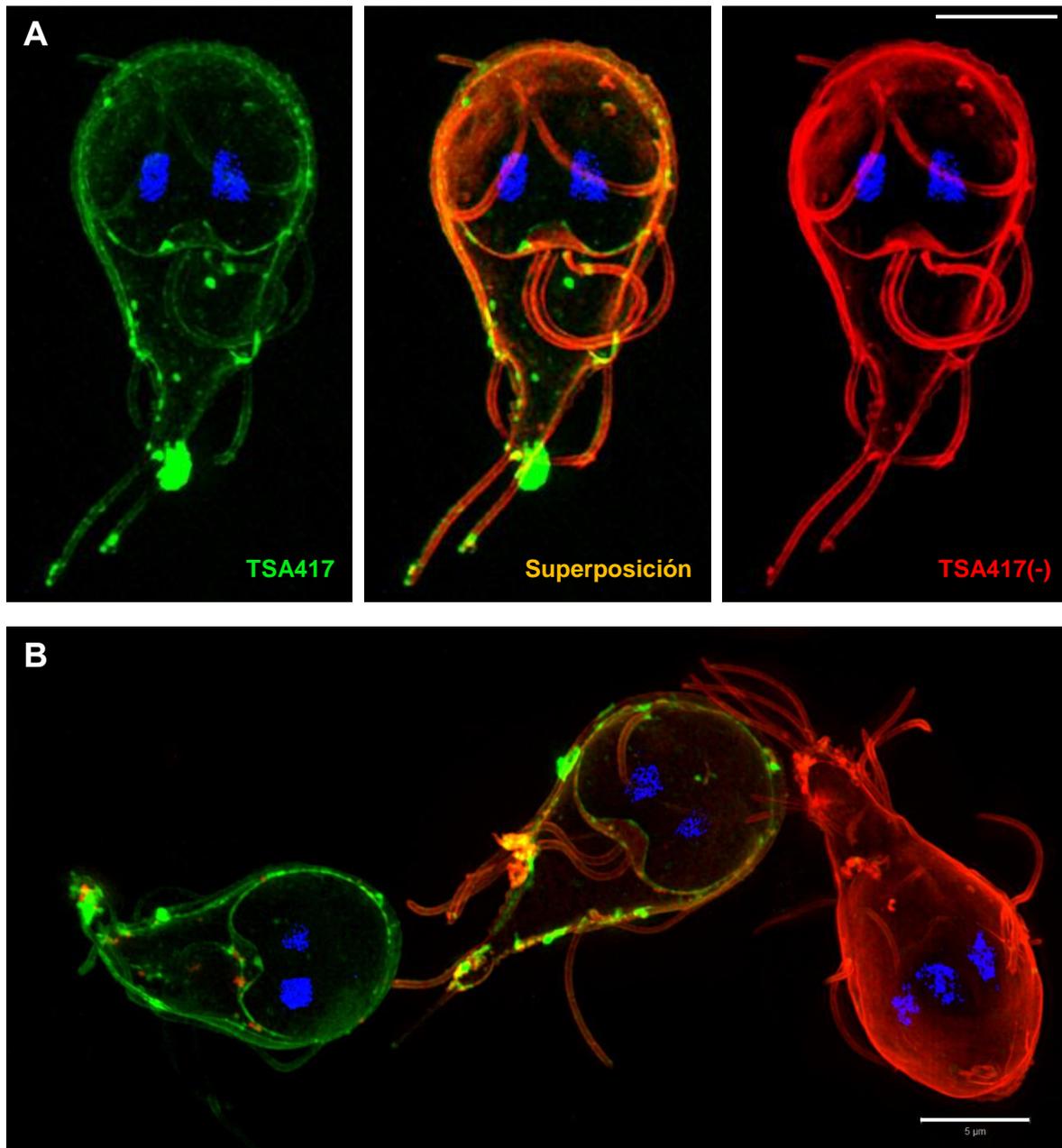


Figura 3.8: Coexpresión de la VSP original y la nueva VSP durante el *switching*. Imágenes obtenidas por microscopía de iluminación estructurada de alta resolución (HR-SIM) de trofozoítos de *Giardia* clon TSA417 a las 24 h post inducción con mAb 7C2 (2 nM). La VSP TSA417 se observa en verde y la nueva VSP (reconocida por pAb TSA417(-)) se observa en rojo. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. (A) Se muestran los dos canales (verde y rojo) y su superposición (según se indica) para un mismo trofozoíto en proceso de *switching*. Nótese la presencia de microdominios y conglomerados altamente enriquecidos en la VSP TSA417 (verde) y la distribución más homogénea en la superficie de la nueva VSP (rojo). (B) Se observan en un mismo campo tres trofozoítos en diferentes estadios del proceso de *switching*. Barra de escala, 5 µm.

3.3. Estudio del mecanismo de VA poblacional (selección vs. inducción) durante infecciones experimentales.

El efecto de la respuesta inmunológica humoral en la VA en *G. lamblia* se ha estudiado ampliamente en varios modelos, incluidos humanos y jerbos, así como en ratones neonatos y adultos⁷⁵. En la mayoría de estos modelos se han utilizado clones de *G. lamblia* ensamblaje B, aislamiento GS, expresando la VSPH7 para realizar las infecciones, y la VA se ha estudiado mediante ensayos de IFI midiendo el porcentaje de células negativas para la VSP inicial. Si bien estos enfoques experimentales han sido útiles para comprobar que la respuesta de anticuerpos del hospedador produce una disminución del contenido intestinal de parásitos acompañada por el surgimiento de trofozoítos expresando VSPs diferentes de la inicial, no permiten distinguir acerca de si estos *switchers* surgen por selección de variantes espontáneas pre-existentes o por inducción del *switching* en células individuales.

Para dilucidar el mecanismo que subyace a la VA poblacional observada durante las infecciones (selección de variantes pre-existentes vs. inducción en células individuales), tomamos un enfoque similar al descrito en el apartado anterior, analizando por citometría de flujo la coexpresión de la VSP original (la que expresa el clon con que se realizó la infección) y la nueva VSP en células individuales extraídas de jerbos infectados con un clon de *Giardia*. Como modelo animal para las infecciones se utilizaron jerbos (*Meriones unguiculatus*) ya que estos animales, a diferencia de los ratones, pueden ser infectados con trofozoítos de *G. lamblia* ensamblaje A1 (aislamiento WB), pudiéndose de esta forma estudiar el comportamiento *in vivo* de un clon expresando la VSP TSA417 haciendo uso de las mismas herramientas utilizadas en el apartado anterior. Los jerbos fueron infectados con 2×10^5 trofozoítos de *G. lamblia* clon TSA417 por vía orogástrica. A diferentes días post-infección, grupos no menores de tres jerbos fueron sacrificados para extraer los trofozoítos presentes en la parte superior del intestino delgado, los cuales fueron analizados por citometría de flujo utilizando el mAb 7C2 (para medir la expresión de TSA417) y el pAb TSA417(-) (para medir la expresión de otras VSPs diferentes de TSA417). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.9 A-C. Los niveles de inmunoglobulinas G (IgG) reactivas contra *Giardia* se midieron también en el suero de cada jerbo infectado mediante ELISA, y se muestran en la Figura 3.9 D. El perfil de la infección, descrito a través de la carga intestinal de parásitos en función del tiempo de infección se muestra en la Figura 3.9 E-F.

Como puede observarse, la VA en *Giardia* ocurre entre los días 10 y 12 post-infección (dpi), coincidiendo con el inicio de la respuesta humoral por parte del hospedador. A los 11 dpi se observa una abrupta caída en el porcentaje de trofozoítos TSA417 (Figura 3.9 A) acompañada de un aumento en la proporción de trofozoítos TSA417(-) (Figura 3.9 B). Remarcablemente, este cambio en las proporciones poblacionales de células TSA417 se acompaña de un pico de coexpresión TSA417/TSA417(-) en las células individuales (Figura 3.9 C). Citogramas representativos de la distribución de la población de trofozoítos en el intestino en los distintos días post-infección se muestran en la Figura 3.9 G.

La coexpresión de la VSP original y la nueva VSP durante la VA confirman que la respuesta inmune humoral del hospedador es capaz de inducir el *switching* en las células individuales, descartando de esta forma el modelo de VA poblacional por selección de variantes pre-existentes. Además, en la Figura 3.9 F puede observarse que la caída en el número de trofozoítos presentes en el intestino entre los días 10 y 12 es del 37,2%, mucho menor a lo esperado si la baja se debiera a la muerte de los trofozoítos TSA417 en cuyo caso se esperaría una disminución de la carga intestinal de parásitos del 84,9% entre los días 10 y 12.

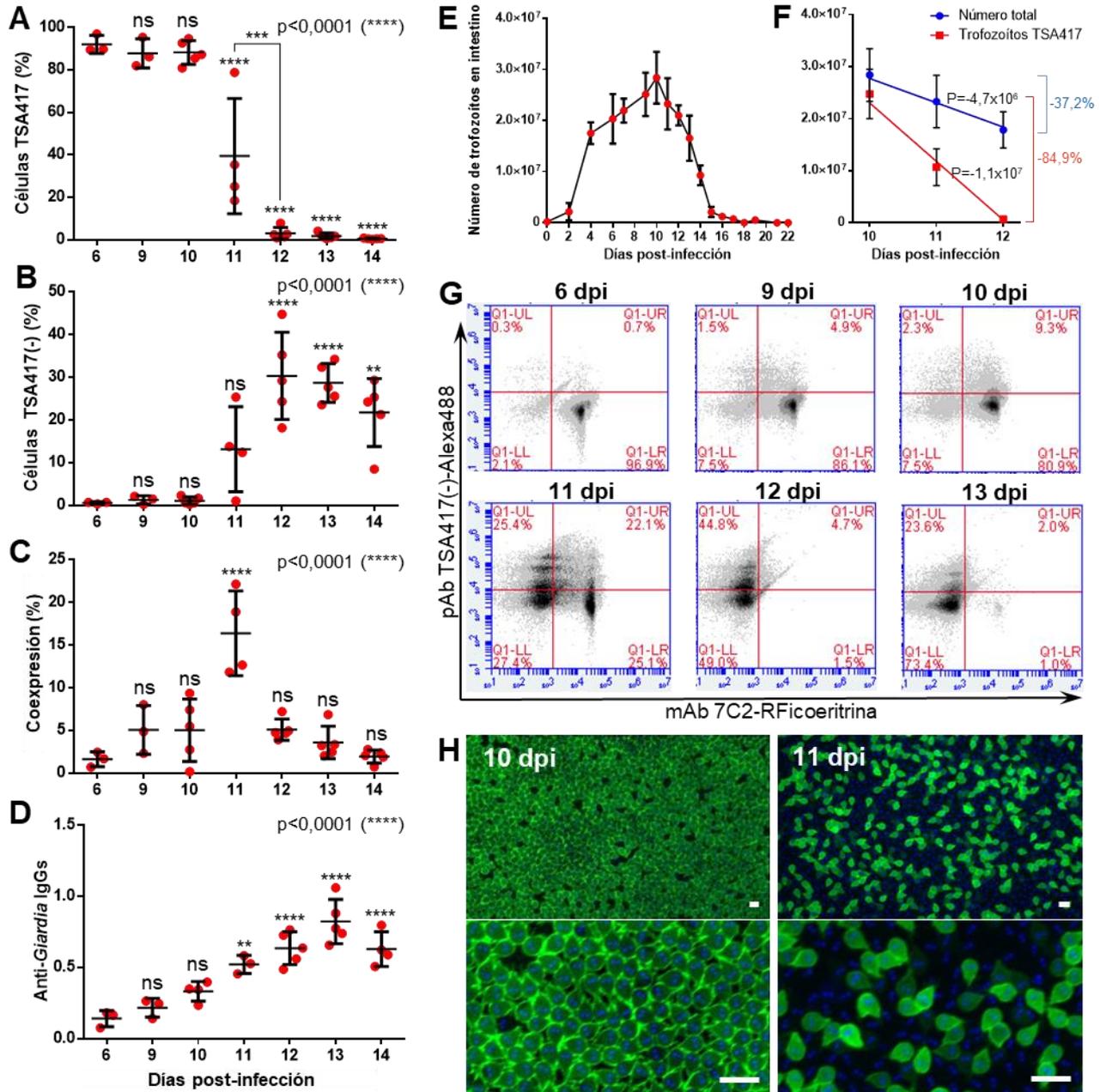


Figura 3.9: Dinámica de la VA de *Giardia* clon TSA417 durante la infección en jirdos. (A) Porcentaje de trofozoitos en el intestino expresando la VSP inicial TSA417. (B) Porcentaje de trofozoitos en el intestino que son positivos para el pAb TSA417(-). (C) Porcentaje de trofozoitos en el intestino que coexpresan la VSP inicial (TSA417) y otra VSP (reconocida por pAb TSA417(-)). (D) Niveles de inmunoglobulinas G (IgGs) específicas para *Giardia* en suero de jirdos infectados a diferentes días post-infección (dpi). (E) Número total de trofozoitos en el intestino de jirdos a diferentes días post infección. (F) Número de trofozoitos TSA417 y totales en el intestino de jirdos durante la VA (10 a 12 dpi). A la derecha se indica el porcentaje de disminución de la carga intestinal de parásitos entre los días 10 y 12 (azul) y el porcentaje de disminución de la carga intestinal de trofozoitos TSA417 (rojo). Las pendientes de ambas rectas se indican en el gráfico y son significativamente diferentes ($p < 0,05$). (G) Citogramas representativos mostrando la distribución de la población de trofozoitos intestinales según la VSP que expresan a distintos días post-infección (dpi). En el eje horizontal de cada citograma se muestra la distribución de trofozoitos positivos para el mAb 7C2 (trofozoitos que expresan la VSP TSA417) y en el eje vertical la distribución de trofozoitos positivos para el pAb TSA417(-). (H) Imágenes de inmunofluorescencia en trofozoitos extraídos de intestino de jirdos a los 10 y 11 días post-infección (dpi). La VSP TSA417 se marca en verde. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Barra de escala, 10 μ m. * $p < 0,05$; ** $p < 0,1$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns, diferencia no significativa ($p > 0,05$). Barras de error: desviación estándar.

En la Figura 3.9 H puede observarse la expresión de la VSP TSA417 (en verde) en trofozoítos extraídos del intestino de jerbos a tiempos anteriores a la VA (10 dpi) y durante la VA (11 dpi) mediante ensayo de IFI. Mientras que la expresión de TSA417 es homogénea en toda la población de trofozoítos intestinales a los 10 dpi, se observa que a 11 dpi la expresión poblacional de esta VSP se torna heterogénea, con células expresando la VSP TSA417 en niveles variables que sólo pueden explicarse por la inducción del *switching* en estas células.

Para analizar la expresión de algunas VSPs individuales durante la VA inducida por la respuesta humoral del hospedador, se realizó también la comarcación de trofozoítos intestinales con el mAb 7C2 y mAbs correspondientes a otras VSPs (mAb 7C9 para VSP7C9, mAb 6E7 para VSPA6 y mAb 7F5 para VSP1267) y su análisis por citometría de flujo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.10, donde puede observarse un aumento en las proporciones de las tres VSPs ensayadas luego del inicio de la VA (a los 11 dpi) que se correlaciona con un aumento en la coexpresión de las mismas con la VSP original (TSA417). Por otra parte, las células que varían a la VSP7C9 parecen alcanzar mayores proporciones que las que varían a las otras dos VSPs ensayadas, y las que varían a la VSPA6 parecen estar en mayor proporción que las que varían a la VSP1267. Estos resultados sugieren fuertemente que la selección de la nueva VSP durante la VA en células individuales es estocástica, si bien podrían existir ciertas VSPs con mayor probabilidad de expresarse que otras.

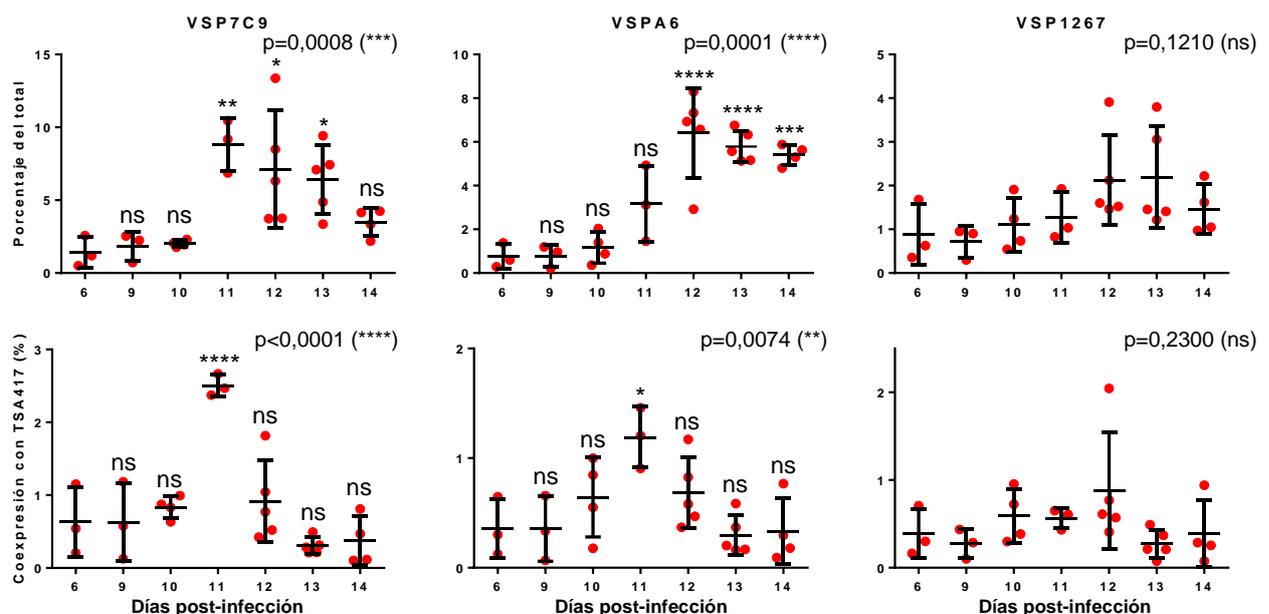


Figura 3.10: Perfil de expresión de distintas VSPs durante la infección en jerbos con *G. lamblia* clon TSA417. Fila superior: porcentaje de trofozoítos expresando diferentes VSPs (indicadas en la parte superior de cada gráfico) en el intestino de jerbos infectados con un clon de *G. lamblia* VSP TSA417. Fila inferior: porcentaje de trofozoítos que coexpresan la VSP original (TSA417) y la VSP analizada en cada caso. El p-valor (p) obtenido para el test ANOVA unilateral se muestra en la parte superior derecha de cada gráfico. * $p < 0,05$; ** $p < 0,1$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns, diferencia no significativa $p > 0,05$. Barra de error: desviación estándar.

3.4. Conclusiones parciales.

Los resultados expuestos hasta aquí demuestran que la VA en *Giardia* puede ser inducida por mAbs anti-VSPs. El abordaje de este problema desde un enfoque de *single cell*, nunca antes utilizado en este modelo, nos permitió descartar los efectos de selección por

parte de los anticuerpos y demostrar que estos parásitos son capaces de sentir la presencia de éstos y responder mediante el recambio en la expresión de la VSP original por otra antigénicamente diferente. Este nuevo modelo se ve además reforzado por la observación mediante análisis por citometría de flujo (Figura 3.6) de que las células individuales al ser tratadas con mAbs contra la VSP original muestran un “camino” de conversión hacia la expresión de una nueva VSP que se caracteriza por un período de coexpresión de ambas proteínas de superficie. Esto último es remarcable, puesto que demuestra concretamente que los anticuerpos inducen un proceso de *switching* a nivel de las células individuales descartando también posibles efectos de selección, en cuyo caso se esperaría una disminución de la población de células expresando la VSP original junto con un aumento de las células expresando otras VSPs sin la presencia de poblaciones de células coexpresando ambas proteínas.

Sin embargo, el hecho de que la VA pueda ser inducida por anticuerpos no descarta la existencia de mecanismos espontáneos. En ausencia de anticuerpos, la VA en *Giardia* ocurre en cultivos *in vitro* a una tasa que depende de la VSP expresada originalmente^{48,74}. Un cultivo clonal expresando una dada VSP tiende a diversificarse a lo largo del tiempo, disminuyendo la expresión poblacional de la VSP original en un 50% en un período que va desde los 10 a 40 días según la VSP⁷⁴. Por otra parte, ante la presencia constante de bajas concentraciones de anticuerpo contra la VSP original, la VA a nivel poblacional se completa en alrededor de 2 a 3 días dependiendo de la concentración de anticuerpo (Figura 3.6 y 3.7). Esto último indica que los anticuerpos anti-VSP inducen una aceleración considerable del proceso de VA, que lleva a la diversificación de la población de parásitos siendo que no parecen existir jerarquías en la secuencia de expresión de VSPs a nivel celular (Tabla 3.1 y Figura 3.10).

La inducción de la VA por los anticuerpos es dependiente de la concentración de estos últimos y del tiempo de duración del tratamiento, siendo más eficiente a mayores concentraciones y mayores períodos de inducción (Figura 3.3). Dentro de una población clonal inducida por anticuerpos, la respuesta de *switching* a nivel de los parásitos individuales no ocurre de manera sincronizada, existiendo una amplia distribución de tiempos de respuesta que oscila entre aproximadamente 6 y 32 h, lo que indica que mientras algunas células responden inmediatamente otras lo hacen luego de varias divisiones celulares (Figura 3.6 y 3.7).

Este patrón de respuesta observado *in vitro*, también se observó *in vivo* durante infecciones experimentales en jerbos con una población clonal de trofozoítos de *Giardia* expresando una única VSP (Figura 3.9). Luego de la infección, no se observan cambios significativos en la expresión poblacional de la VSP original hasta los 11 dpi, coincidiendo con el inicio de la respuesta adaptativa (estimado por el incremento significativo de IgGs específicas para *Giardia* en suero). Remarcablemente, en este punto se observa un pico máximo en el número de parásitos que coexpresan la VSP original con otra VSP diferente (Figuras 3.9 C y 3.10). La observación de un incremento significativo en el número de parásitos coexpresando la VSP original junto con otra VSP en un período relativamente corto de tiempo que coincide con el inicio de la respuesta adaptativa, indica fuertemente que los anticuerpos generados por el hospedador están induciendo la aceleración de la VA, diversificando la población de parásitos en cuanto a la expresión de VSPs en su superficie.

CAPÍTULO 4

Detección de la señal y fenómenos de transducción inducidos a nivel de la membrana plasmática durante el proceso de variación antigénica disparada por anticuerpos.

4. CAPÍTULO 4: Detección de la señal y fenómenos de transducción inducidos a nivel de la membrana plasmática durante el proceso de variación antigénica disparada por anticuerpos.

La observación de que la presencia de mAbs anti-VSPs “acelera” la VA poblacional indica la existencia de un sistema de sensado por parte de las células individuales. Por consiguiente, siendo que los anticuerpos están dirigidos hacia las VSPs y que éstas forman una densa capa en la superficie de los trofozoítos constituyendo la principal barrera de contacto entre el parásito y el medio^{3,14}; se puede asumir que las VSPs están actuando como “receptores” de la señal.

En el presente capítulo se aborda la caracterización a nivel molecular del proceso de transducción de la señal durante la inducción del *switching*. Se exponen una serie de resultados experimentales tendientes a determinar cómo es el proceso por el cual la unión de un anticuerpo a una VSP de la superficie del trofozoíto se traduce en una señal detectable por la célula, y cuya respuesta final es el cambio en la expresión de la VSP original por otra antigénicamente diferente.

4.1. Las VSPs como receptores de la señal: análisis bioinformático de estructuras potencialmente involucradas en el proceso de señalización.

Habiendo demostrado que la unión de anticuerpos a las VSPs es capaz de estimular el proceso de VA, la VSP expresada en un momento dado por el trofozoíto adquiere una nueva función no descrita previamente, que es la de “sensar” señales extracelulares. Mediante posibles cambios conformacionales inducidos por la unión de un anticuerpo o por rearrreglos producidos por cambios del microambiente, las VSPs podrían ser capaces, directa o indirectamente, de desencadenar una cascada de transducción de la señal aún no determinada que induciría el proceso de VA.

Dado que el dominio extracelular N-terminal de las VSPs es altamente variable de acuerdo con su función en la VA y que, en cambio, el extremo C-terminal de las mismas está altamente conservado, nos enfocamos en este último para identificar secuencias o motivos potencialmente involucrados en la función de las VSPs como moléculas receptoras.

El rol del tallo citoplasmático C-terminal invariable de las VSPs ha sido estudiado por otros grupos con anterioridad^{33,58} bajo el paradigma de VA como fenómeno espontáneo afectado por procesos de selección por anticuerpos citotóxicos. Mediante la expresión de variantes de la VSPH7 mutadas en los residuos de cisteína (C) y arginina (R) del tallo citoplasmático de secuencia CRGKA en trofozoítos del aislamiento WB, se determinó que modificaciones postraduccionales de estos residuos de aminoácidos (palmitoilación en el caso de C y citrulinación en el caso de R) afectarían la citotoxicidad mediada por mAbs contra dicha VSP (mAb G10/4), y de esta forma la VA a nivel poblacional. Estos estudios, sin embargo, fueron realizados desde una perspectiva diferente a la nuestra, midiendo parámetros poblacionales con el foco puesto en la población de células supervivientes a tratamientos citotóxicos de anticuerpos. De esta forma, estos resultados no explican fehacientemente si las modificaciones postraduccionales de estos residuos tienen algún rol en la transducción de señales durante el *switching* inducido por anticuerpos.

Por consiguiente, en el trabajo de tesis doctoral del Lic. Ríos D.N.⁷⁴, se propuso estudiar el rol del tallo citoplasmático de secuencia CRGKA bajo nuestro nuevo paradigma. En este caso, se analizaron las mismas mutaciones del tallo CRGKA de la VSP H7 expresada en trofozoítos del aislamiento WB expresando la VSP 1267, pero se estudió el efecto del mAb G10/4 (anti-VSPH7) en *trans*, es decir, sobre la expresión de la VSP1267. De esta forma pudo determinarse en primera instancia que los anticuerpos anti-VSP H7 eran capaces de inducir el recambio de la VSP 1267. Además, se observó que ninguna de las mutaciones del tallo

CRGKA estudiadas logró evitar completamente la inducción del *switching* en *trans* por el mAb G10/4.

Para buscar otras estructuras conservadas y posiblemente implicadas en el proceso de transducción de la señal, se realizó un alineamiento múltiple de los últimos 50 aminoácidos C-terminales de las secuencias identificadas como VSPs en el genoma de *G. lamblia* ensamblaje A1, aislamiento WB (NCBI *Giardia* genome versión 2.1). La lista completa de VSPs se muestra en el Anexo I. Las 135 secuencias obtenidas fueron apiladas en busca de aminoácidos conservados mediante los servidores *on-line* Clustal Omega⁶⁷ y Weblogo⁶⁸. En la Figura 4.1A se puede observar el logo-secuencia obtenido para los últimos 50 aminoácidos C-terminales de las VSPs. A partir de este análisis se encontró un alto grado de conservación tanto en el TMD como en la región N-terminal adyacente a la membrana plasmática.

El alto grado de conservación de los TMDs de las VSPs sugiere que los mismos podrían no ser sólo dominios de anclaje a la membrana plasmática, sino que podrían estar implicados en alguna otra función particular. En un análisis más detallado, encontramos que muchos de los residuos de aminoácido más conservados del TMD de las VSPs se corresponden con un motivo conocido como “cierre de glicina”, implicado en dimerización de TMDs⁷⁶⁻⁷⁸ y en transducción de señales^{79,80}. Los motivos “cierre de glicina” consisten en secuencias lineales de residuos de glicina separados por tres residuos de aminoácidos (GxxxG). Estudios acerca de la homodimerización del TMD de la glicoforina A (GpA) mostraron que estos motivos facilitan la interacción de los TMDs al crear una superficie plana o interfase que permite un mayor acercamiento entre las hélices, lo que maximiza las interacciones de Van der Waals entre los TMD, y a determinados ángulos de interacción permite la formación de puentes hidrógeno entre los mismos⁸¹⁻⁸⁴. También han sido descritos motivos similares a GxxxG, donde otro aminoácido pequeño (principalmente alanina o serina) reemplaza a la glicina⁸⁵⁻⁸⁹. En general, estos motivos se conocen como GAS_{right}, por consistir en dos aminoácidos pequeños (G, A o S) que forman motivos de dimerización entre dos hélices en ángulo negativo (sentido dextrógiro). En el TMD de las VSPs, las glicinas 16, 20 y 24 junto con la alanina 28, y las glicinas 34 y 38 (según la numeración de la Figura 4.1A) forman un motivo GAS_{right} extendido GxxxGxxxGxxxA y GxxxG que se encuentra de manera invariable en todas las VSPs, lo que podría indicar alguna función en el mecanismo de transducción de señales.

Sorprendentemente, encontramos un alto grado de homología entre el TMD de las VSPs y el de la proteína de mamíferos CEACAM1 (Figura 4.1B). CEACAM1 (**C**arcinoembryonic antigen-related **c**ell **a**dhesion **m**olecule 1) es un miembro de la familia de genes de antígenos carcinoembrionarios (CEA), que agrupa moléculas de adhesión célula-célula similares a Inmunoglobulinas^{90,91}. Al igual que otros miembros de esta familia, CEACAM1 es una proteína transmembrana de tipo I con una región fuertemente glicosilada extracelular compuesta de cuatro dominios similares a inmunoglobulina, un dominio transmembrana y una cola citoplasmática⁹². En los seres humanos, se han detectado 11 variantes de *splicing* diferentes de CEACAM1. Las distintas isoformas difieren con respecto al número de dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina (por ejemplo, CEACAM1 con cuatro dominios se conoce como CEACAM1-4), el anclaje de la membrana y/o la longitud de su cola citoplasmática (por ejemplo, CEACAM1-4 con una cola citoplasmática larga se conoce como CEACAM1-4L y CEACAM1-4 con una cola citoplasmática corta es conocido como CEACAM1-4S)⁹³. En ratones, solamente han sido detectadas las isoformas CEACAM1-2L, CEACAM1-2S, CEACAM1-4L y CEACAM1-4S⁹¹.

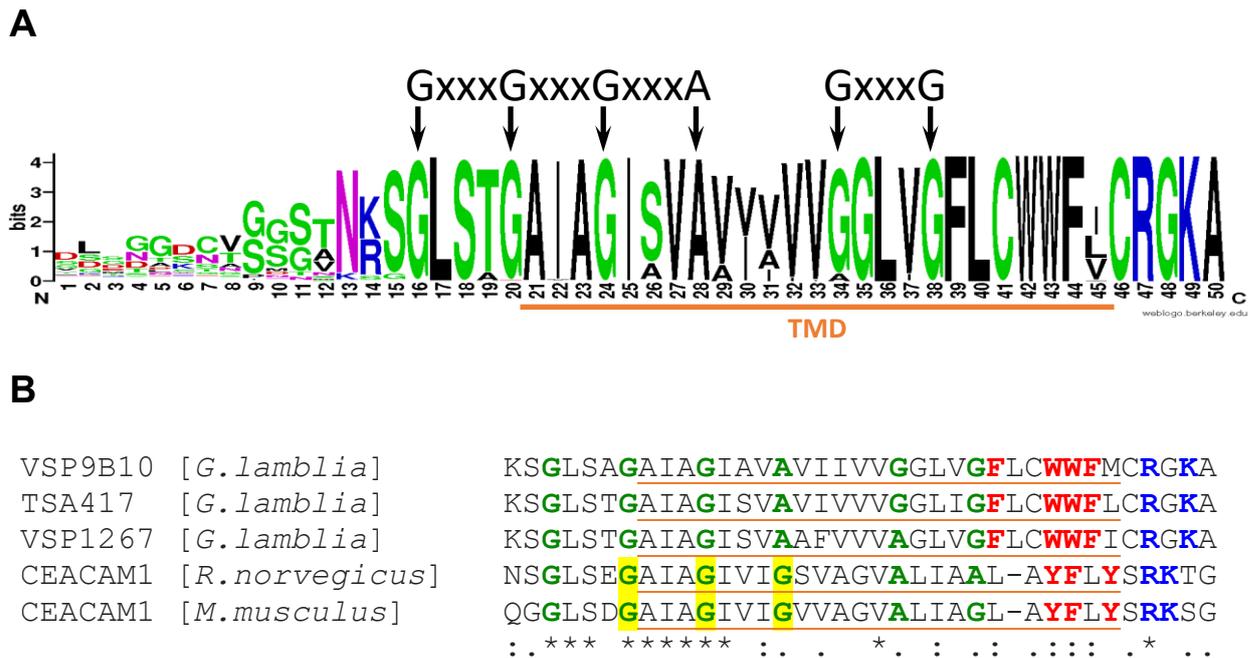


Figura 4.1: Características conservadas del extremo C-terminal de las VSPs. (A) Logo consenso construido mediante Weblogo utilizando los últimos 50 aminoácidos C-terminales de las VSPs enumerados de 1 a 50, correspondiendo el 50 al último residuo de aminoácido de cada VSP. Cada residuo en la secuencia se indica según su símbolo de una letra. La altura total de la pila de símbolos indica la conservación de la secuencia en esa posición, mientras que la altura de los símbolos dentro de la pila indica la frecuencia relativa de cada aminoácido en dicha posición. Subrayado en naranja se indica la secuencia correspondiente al dominio transmembrana (TMD) predicho por el servidor web Phobius. Los residuos de aminoácido involucrados en el motivo GAS_{right} están señalados con flechas y se indican en la parte superior. (B) Homología entre el TMD de las VSPs de *G. lamblia* y el TMD de CEACAM 1. Apilamiento de las secuencias correspondientes al TMD y regiones yuxtamembrana de algunas VSPs de *G. lamblia* ensamblaje A1 (VSP9B10 GenBankID: KAE8302587.1, TSA417 GenBankID: KAE8303064.1 y VSP1267 GenBankID: KAE8301460.1) y CEACAM 1 de diferentes especies de mamíferos (CEACAM1 de *Rattus norvegicus* GenBankID: NP_001029032.1; CEACAM1 de *Mus musculus* GenBankID: NP_001034274.1) utilizando el programa Clustal Omega. La región transmembrana predicha por Phobius se indica subrayada en color naranja. Los residuos de aminoácidos involucrados en el dominio GAS_{right} se indican en verde, los residuos de aminoácidos aromáticos en el extremo C-terminal del TMD se marcan en rojo y los cargados positivamente en la región yuxtamembrana citoplasmática se indican en azul. Los residuos de glicina que han sido reportados como involucrados en la homodimerización de los TMD y/o en la transducción de señales a través de CEACAM1^{79,80} se resaltan en amarillo.

El alto grado de homología entre los dominios transmembrana de las VSPs y de CEACAM1 resulta de particular importancia dado a que existe, además, cierto grado de paralelismo entre las observaciones reportadas respecto a la transducción de señales mediadas por CEACAM1, y nuestras propias observaciones en la transducción de señales mediadas por las VSPs:

- Varios estudios indican que anticuerpos específicos anti-CEACAM1 son capaces de desencadenar un proceso de señalización a través del agrupamiento de este receptor en microdominios⁹⁴⁻⁹⁶.
- Existen variantes de splicing de CEACAM1 con cola citoplasmática corta (10-12 aminoácidos) y a pesar de ello son capaces de actuar como receptores en una vía de señalización⁹⁷.
- El TMD de CEACAM1 tiene un rol esencial en el proceso de transducción de señales mediado por este receptor:

- Se ha reportado que la expresión constitutiva de CEACAM1-4S en células de carcinoma hepático permite su crecimiento independiente de anclaje *in vitro* y un fenotipo tumorigénico *in vivo*. La expresión de mutantes de CEACAM1-4S en los que las glicinas del motivo GAS_{right} del TMD son reemplazadas por leucinas (aminoácido de mayor tamaño) no muestran crecimiento independiente de anclaje ni fenotipo tumorigénico. Por otra parte, versiones mutantes en los aminoácidos aromáticos del TMD mostraron fenotipos más exacerbados respecto a los observados para CEACAM1-4S *wild-type*⁷⁹.
- Muchas bacterias patógenas se adhieren al epitelio intestinal a través de las CEACAMs, y las utilizan para promover su internalización dentro de la célula hospedadora (lo que implica un proceso de señalización en la célula hospedadora, mediado por CEACAM). Estudios sobre los mecanismos moleculares que dirigen la internalización de bacterias mediante CEACAM1-4L han determinado que el TMD de esta molécula es necesario y suficiente para promover la internalización de bacterias. Mutantes de CEACAM1-4L carentes de dominio citoplasmático son capaces de mediar el proceso de internalización. Se ha determinado en estos casos que la transducción mediada por CEACAM1-4L implica la dimerización de los mismos a través de su TMD y su partición en microdominios de membrana con características de *lipid rafts*⁹⁸⁻¹⁰⁰.
- Se ha reportado que el TMD de CEACAM1 tiene una propensión a formar homodímeros a través del motivo G₄₃₂XXXG₄₃₆ (resaltado en amarillo en la Figura 4.1 B), siendo este proceso regulado por la unión de calmodulina activada a su dominio citoplasmático. Mutaciones en el motivo G₄₃₂XXXG₄₃₆ reducen la oligomerización de CEACAM1⁸⁰.

Estos últimos hallazgos parecen indicar que el TMD tiene una contribución significativa en la funcionalidad de CEACAM1, no sólo en la dimerización, sino también en la transducción de señales externas. El alto grado de homología entre los TMDs de las VSPs con el de CEACAM1 sugiere una funcionalidad similar en ambas moléculas.

4.2. Estudio del rol del TMD de las VSPs en la señalización celular.

4.2.1. Estudio *in silico* de los potenciales modelos de homodimerización de los TMD de las VSPs.

Para estudiar el rol del motivo conservado GAS_{right} en la homodimerización de las VSPs a través de sus TMDs, se procedió a evaluar *in silico* los posibles modelos de homodimerización entre los TMDs de las VSPs mediante el uso del *software* PREDDIMER⁶⁵. Esta herramienta web utiliza un algoritmo basado en la superficie para la predicción de conformaciones de dímeros de hélices transmembrana, consideradas como hélices- α ideales. Se utilizó como secuencia a analizar un fragmento de 30 aminoácidos de la VSP 1267 (GL50803_00112208) comprendido entre los aminoácidos 562 y 591 que abarcan la región transmembrana más cinco aminoácidos de la región yuxtamembrana N-terminal hacia donde se extiende el motivo conservado GAS_{right} (aminoácidos 16 a 44 según la numeración de la Figura 4.1 A).

Se obtuvieron cinco modelos potenciales para la homodimerización del TMD de la VSP1267 (Figura 4.2). Los modelos proponen diferentes aminoácidos implicados en la interacción entre los TMD, como así también diferentes ángulos de interacción, y se describen en el Anexo II. Cada uno de estos modelos fue evaluado comparando los aminoácidos implicados directamente en la interacción, con el grado de conservación de los mismos (cuantificado a través del coeficiente de Contenido de Información, IC) en el TMD de las VSPs de *Giardia*, según los datos obtenidos a partir del logo HMM¹⁰¹ depositado en la base de datos de la familia de proteínas VSP de Pfam (VSP family PF03302).

A

Modelo	F _{scor}	Angulo de cruce	Angulo de rotación	Residuos de aminoácidos interactuantes
1	3.160	-40.0°	110°	G9, A13, V17
2	3.087	-60.2°	206°	A19, G23, W27
3	2.549	-15.3°	224°	G1, G5, G9, V12, A13, V16, G20, G23, F24, W27, W28
4	2.461	35.1°	392°	L2, G9, V12, A13, V16, A19
5	2.212	10.5°	308°	L2, G9, V12, A13, V16, A19, G20, G23, C26, I30

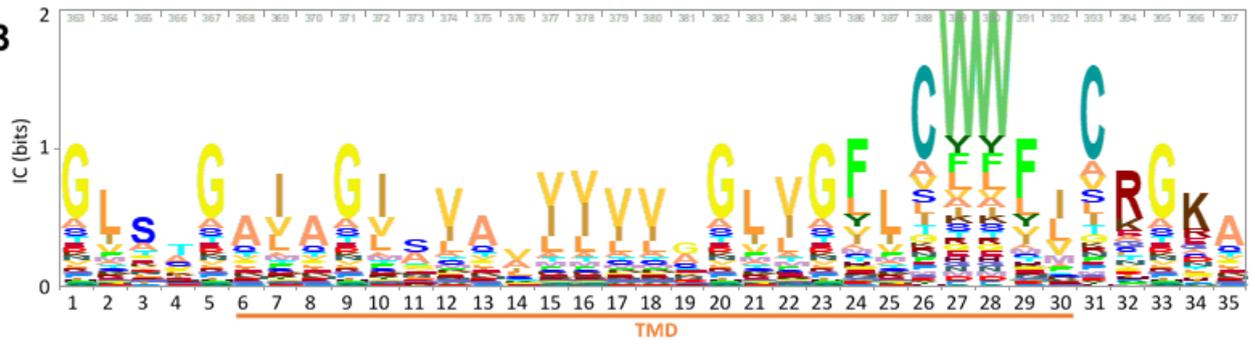
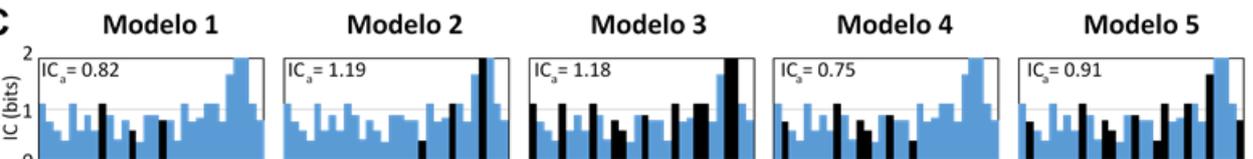
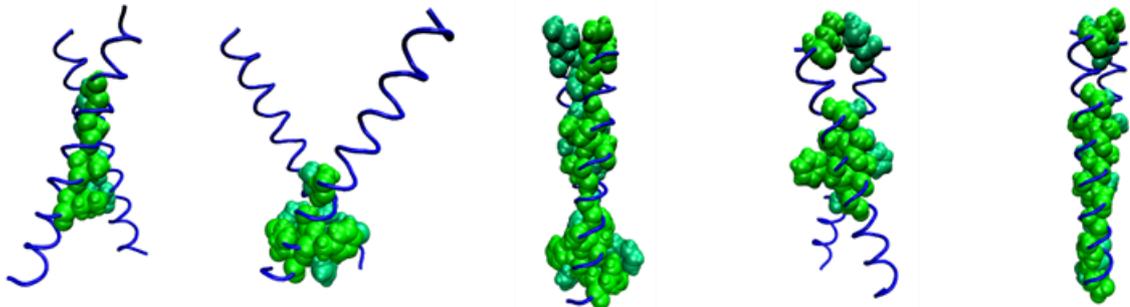
B**C****D**

Figura 4.2: Características del TMD de las VSPs de *Giardia* y modelos de interacción. (A) Modelos predichos *in silico* para la homodimerización de los TMD de las VSPs. Los diferentes modelos (1-5) se ordenan según el valor de F_{scor}. Los ángulos de cruce y rotación están indicados para cada modelo junto con los residuos de aminoácidos involucrados en la interfase de interacción. Los residuos de aminoácidos se numeran de acuerdo con su posición en el logo HMM. (B) Fragmento del logo HMM de la familia Pfam VSP (PF03302) correspondiente a las regiones TMD y yuxtamembrana. Cada posición se volvió a numerar por conveniencia (los números de posición se indican en la parte inferior del logo). La región TMD está subrayada. (C) Reproducción del perfil del logo HMM correspondiente a la región comprendida entre las posiciones 1 y 30 (TMD + región yuxtamembrana extracelular). La altura de cada columna representa el grado de conservación del residuo en esa posición medido por el coeficiente de Contenido de Información (IC, en bits). Las barras correspondientes a los residuos de aminoácidos involucrados en la interacción se muestran en negro, y el IC promedio para estos aminoácidos (IC_a) se indica para cada modelo predicho. (D) Representaciones tridimensionales de los diferentes modelos de dimerización para el TMD de las VSPs. El esqueleto de cada hélice se representa como cintas de color azul, y sólo los residuos de aminoácidos involucrados en la interacción entre las hélices de cada modelo se representan con volúmenes determinados por el radio de Van der Waals de sus átomos constitutivos (en verde).

Se encontró que el modelo 3, caracterizado por un ángulo de cruce de $-15,3^\circ$, es el que mejor explica la conservación de determinados aminoácidos en el TMD de las VSPs, ya que los aminoácidos involucrados en la interfase de interacción entre los TMDs coinciden con los más conservados en el TMD de las VSPs (Figura 4.2 B-D). Es interesante observar que no solo el motivo $G_{16}xxxG_{20}xxxG_{24}xxxA_{28}$, sino también el $G_{35}xxG_{38}$ está presente en la interfase de interacción, lo que proporciona un área bastante extendida de exposición del esqueleto carbonado de la hélice, que podría permitir a las mismas un alto grado de proximidad entre sí para maximizar las interacciones de Van der Waals (Figura 4.3). En la Figura 4.4 se muestra una representación del modelo 3 de interacción entre los dominios transmembrana visualizado mediante el software *Visual Molecular Dynamics* (VMD)⁶⁶.

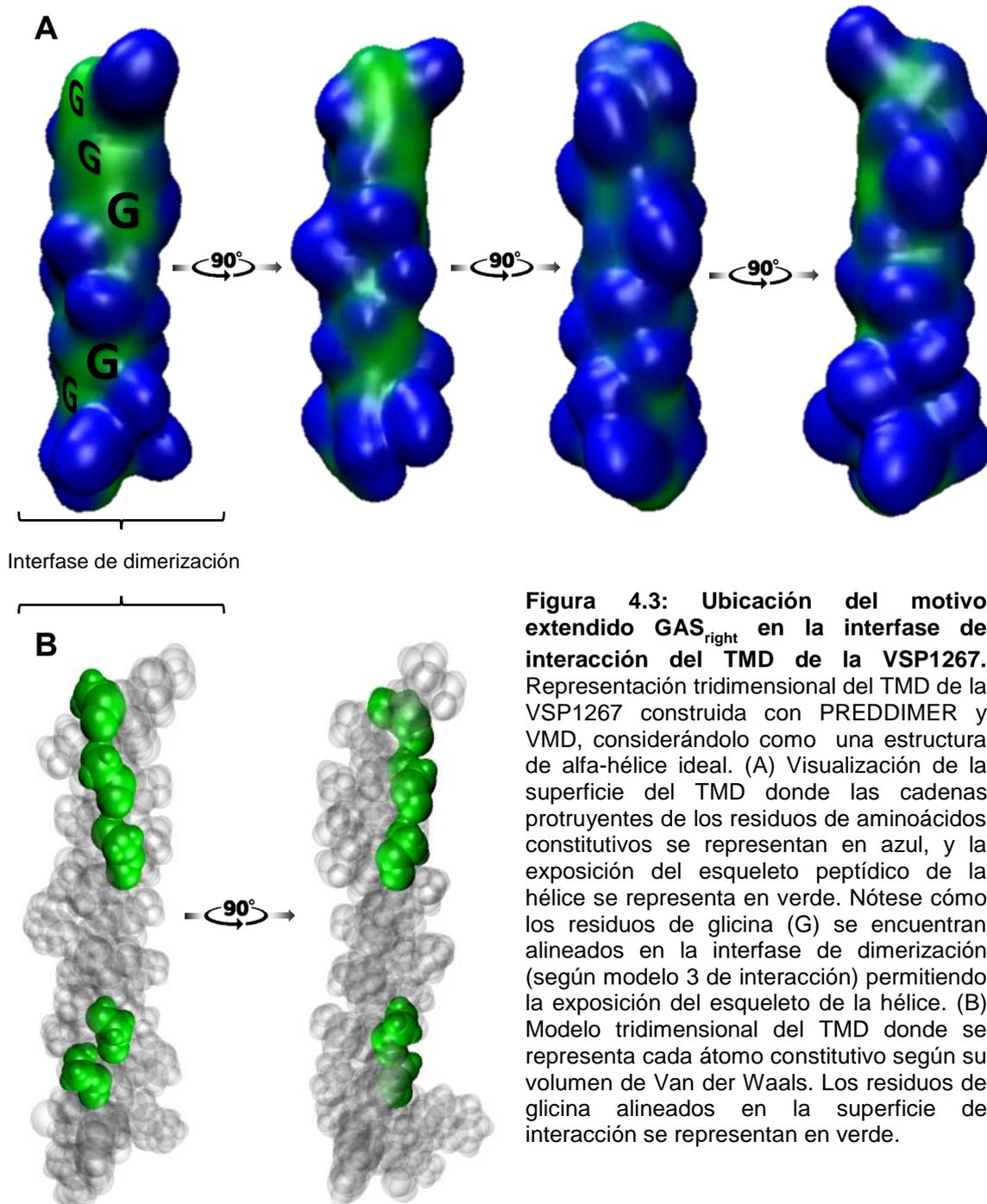


Figura 4.3: Ubicación del motivo extendido GAS_{right} en la interfase de interacción del TMD de la VSP1267. Representación tridimensional del TMD de la VSP1267 construida con PREDDIMER y VMD, considerándolo como una estructura de alfa-hélice ideal. (A) Visualización de la superficie del TMD donde las cadenas protruyentes de los residuos de aminoácidos constitutivos se representan en azul, y la exposición del esqueleto peptídico de la hélice se representa en verde. Nótese cómo los residuos de glicina (G) se encuentran alineados en la interfase de dimerización (según modelo 3 de interacción) permitiendo la exposición del esqueleto de la hélice. (B) Modelo tridimensional del TMD donde se representa cada átomo constitutivo según su volumen de Van der Waals. Los residuos de glicina alineados en la superficie de interacción se representan en verde.

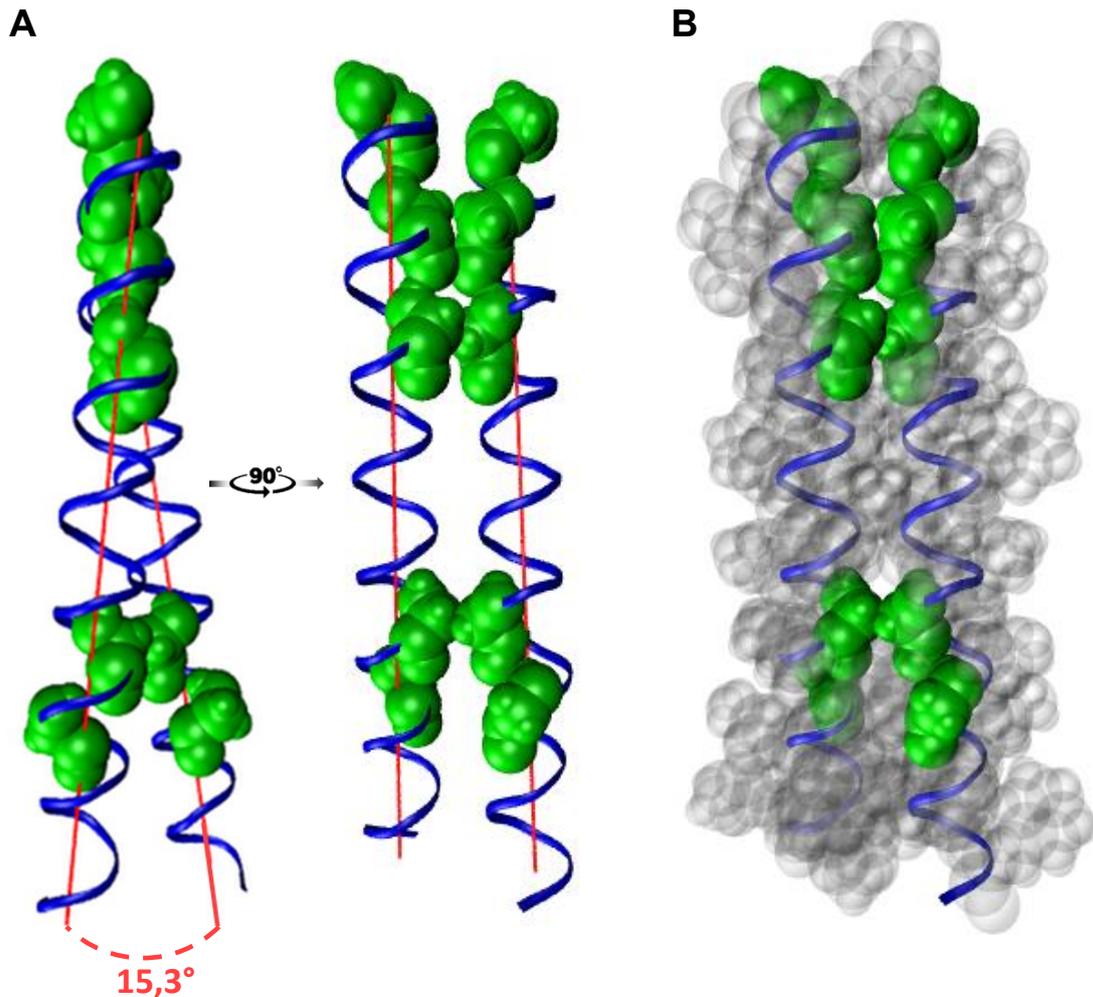


Figura 4.4: Modelo 3 de interacción entre los dominios transmembrana de la VSP1267. (A) Se representa el esqueleto peptídico de cada TMD como cintas azules y los residuos de glicina del motivo GAS_{right} en verde. Se muestra además el eje axial de cada hélice y se indica el ángulo de cruce entre los mismos. (B) Se representa, además, el resto de los residuos de aminoácidos constitutivos de los TMD en gris. Para la predicción del modelo se utilizó el *software* PREDDIMER y para las representaciones tridimensionales se utilizó VMD.

4.2.2. Determinación cuantitativa de la fuerza de interacción homotípica entre los TMD de las VSPs: ensayo de TOXCAT

Con el objeto de estudiar la interacción entre los TMD de las VSPs, y evaluar el potencial rol del motivo de dimerización conservado GAS_{right} , se procedió a medir la fuerza de la asociación homotípica del TMD de la VSP1267 a través del ensayo *in vitro* TOXCAT⁶⁹.

El ensayo de TOXCAT permite cuantificar la interacción homotípica de un TMD en particular en una membrana biológica (Figura 4.5). El sistema cuenta con un plásmido llamado pccKAN que codifica una construcción quimérica compuesta por el dominio N-terminal de unión al ADN de ToxR (un activador transcripcional dependiente de dimerización), que se indica como ToxR', fusionado a un TMD de interés y a una proteína periplásmica monomérica (la proteína de unión a maltosa, MBP). La interacción entre los TMD da como resultado la activación mediada por ToxR' de un gen reportero que codifica para la cloranfenicol acetil-transferasa (CAT). El nivel de expresión de CAT indica la fuerza de la interacción entre los TMDs.

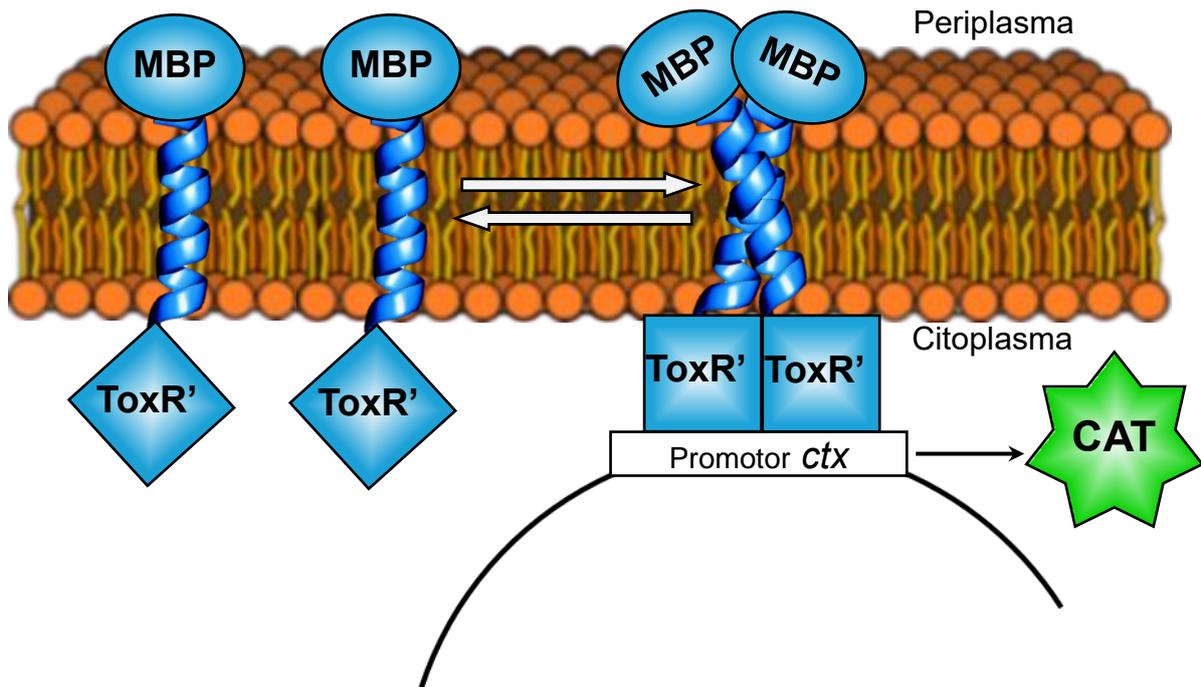


Figura 4.5: Representación esquemática del ensayo TOXCAT. Los diferentes dominios transmembrana (TMD) a ensayar se fusionan al activador transcripcional ToxR' y a la proteína periplásmica de unión a maltosa (MBP). Los dominios ToxR' (cuadrados) pueden activar la transcripción del gen reportero (CAT) si se dimerizan mediante los TMDs ensayados. La MBP ayuda a dirigir la inserción de la construcción en la membrana, complementa la mutación *malE* en las células hospedadoras y sirve como epítipo para cuantificar el nivel de expresión de la proteína de fusión.

El ensayo se realiza en la cepa de *Escherichia coli* MM39, que posee una delección en el gen *malE* (*malE*-), por lo que no expresa la MBP y no puede crecer en maltosa como única fuente de carbono. De esta forma, la correcta ubicación de la proteína quimérica en la membrana plasmática puede ser verificada mediante un ensayo de complementación de *malE*. Bacterias transformadas con cada una de las construcciones son crecidas en medio mínimo M9 sólido, suplementado con maltosa como única fuente de carbono. El crecimiento de las mismas en estas condiciones indica la correcta ubicación de la proteína quimérica en la membrana plasmática con la MBP hacia el periplasma, y ToxR' hacia el citoplasma.

El nivel de expresión del gen reportero se puede determinar por dos ensayos: i) Ensayo de difusión en agar: consiste en medir los niveles de CAT indirectamente a través de su actividad enzimática. La CAT desactiva el antibiótico cloranfenicol enlazando uno o dos grupos acetilo a los grupos hidroxilo del mismo. Esta acetilación impide la unión del cloranfenicol al ribosoma bacteriano y por ende le confiere a la bacteria resistencia a este antibiótico. Bacterias *E. coli* MM39 que expresan la proteína quimérica que contiene el TMD de interés son sembradas en un medio LB-Agar en presencia de un disco de papel de filtro embebido en cloranfenicol, generándose un halo de inhibición cuyo perímetro será inversamente proporcional a los niveles de CAT. ii) CAT ELISA: Es una manera directa de medir la concentración de CAT mediante la utilización de un ensayo de ELISA de tipo sándwich comercial.

En la Tabla 4.1 se indican las secuencias de los TMD ensayados por TOXCAT. Se utilizó como secuencia a analizar un fragmento de 30 residuos de aminoácido de la VSP1267 (GL50803_112208) comprendido entre los residuos 562 y 591 que abarcan la región transmembrana predicha por Phobius⁶⁷ más cinco aminoácidos de la región yxtamembrana N-terminal hacia donde se extiende el motivo conservado GAS_{right} (misma secuencia que la modelada por PREDDIMER, aminoácidos 16 a 44 según la numeración de la Figura 4.1 A). Para evaluar el rol del motivo GAS_{right} en la interacción entre TMDs de la VSP 1267, se diseñó

una versión mutante en donde las glicinas y alanina del motivo fueron reemplazados por leucina. Como controles se utilizó el TMD de la Glicoforina A (GpA), que se conoce tiene una fuerte interacción homotípica, y la versión del mismo TMD conteniendo la mutación G83I en la cual la glicina en posición 83 que forma parte del motivo de interacción GxxxG de la GpA es reemplazado por isoleucina lo que disminuye considerablemente la fuerza de la interacción entre TMDs⁶⁹. Cada uno de los TMDs ensayados fue clonado en marco de lectura con el dominio periplasmático de la proteína MBP y con el dominio citoplasmático ToxR' en el plásmido pccKAN, y fueron analizados independientemente en el ensayo TOXCAT. Como control negativo se utilizó el plásmido pccKAN vacío, que contiene un cassette de resistencia a kanamicina interrumpiendo el marco de lectura entre ToxR' y MBP, evitándose de esta forma la expresión de la proteína quimérica. El nivel de expresión de cada quimera fue evaluado por inmunomarcación de MBP mediante Western blot.

Tabla 4.1: Dominios transmembrana ensayados por TOXCAT

Glicoforina A <i>wild type</i> (GpAwt)	MBP-ITLIIIFGVMAGVIGTILLISYGI-ToxR'
Glicoforina A G83I (GpAmut)	MBP-ITLIIIFGVMALVIGTILLISYGI-ToxR'
VSP1267 <i>wild type</i> (VSPwt)	MBP-GLSTGAIAGISVAAFVVVAGLVGFLCWWFI-ToxR'
VSP1267 G(562,566,570,574)L (VSPmut)	MBP-LLSTLAIALISVLAFAVVVAGLVGFLCWWFI-ToxR'

En la Figura 4.6 A se muestra el grado de interacción homotípica entre cada uno de los TMDs ensayados, medidos por ensayo de difusión en agar, y expresado en función del perímetro del halo de inhibición. Una imagen representativa del tamaño del halo de inhibición para cada TMD se muestra en la Figura 4.6 C. Los resultados obtenidos indican que el TMD de la VSP1267 presenta un nivel moderado de interacción, menor al del TMD de la GpA. Las mutaciones en el motivo GAS_{right} del TMD de la VSP disminuyen la fuerza de interacción, indicando que el mismo tiene un rol en la dimerización de los mismos. La expresión del gen reportero fue medida además mediante ELISA CAT y se muestra en la Figura 4.6 B. Los niveles de expresión están expresados como la concentración de CAT en cada TMD ensayado, normalizada a los niveles de CAT del TMD control (GpAwt). En este caso también puede observarse que el TMD de la VSP1267 presenta una fuerza de interacción homotípica menor al del TMD de la GpA, y que esta fuerza disminuye al mutarse el motivo GAS_{right}. El nivel de expresión de cada proteína quimera evaluada por Western blot contra MBP se indica al pie de cada gráfico, pudiéndose observar que no existen variaciones significativas, por lo que la diferencia en los niveles de CAT en cada TMD ensayado no se debe a variaciones en la cantidad total de proteína expresada. La correcta localización de cada una de las quimeras en la membrana plasmática de la bacteria hospedadora se verificó mediante ensayo de complementación de *malE* (Figura 4.6 D).

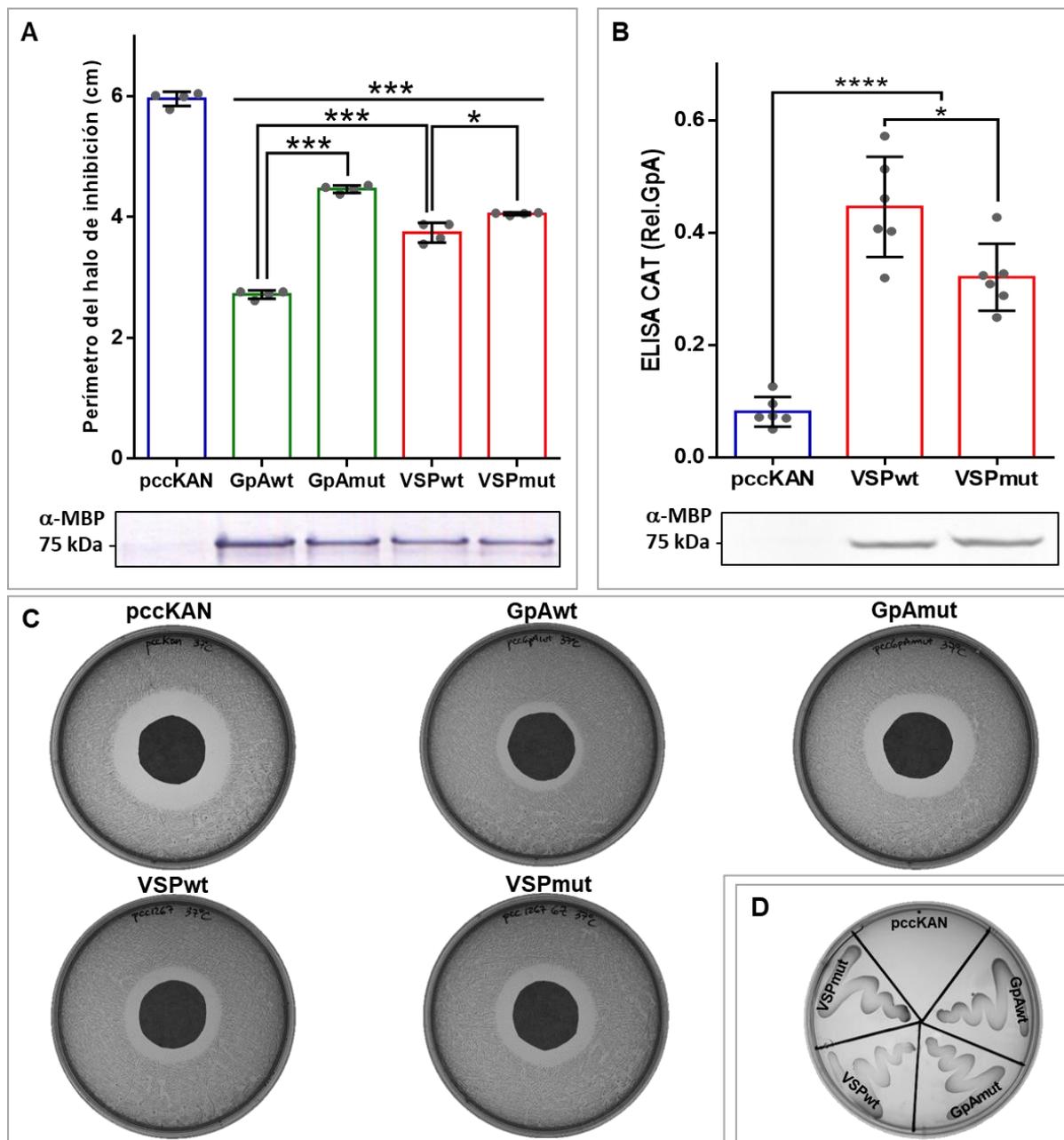


Figura 4.6: Determinación semicuantitativa de la fuerza de interacción homotípica entre los TMD de las VSP1267 mediante ensayo de TOXCAT. (A) Ensayo de difusión en agar. Se muestra el grado de interacción entre cada uno de los TMDs ensayados, expresados en función del perímetro del halo de inhibición generado en torno a un disco de papel de filtro embebido en cloranfenicol. Los resultados corresponden al promedio de dos experimentos independientes. Barras de error: SD. Los niveles de expresión de cada proteína quimera fueron determinados por western blot contra la MBP y se muestran en la parte inferior del gráfico. (B) Medición de CAT por ELISA. Se muestran los niveles de CAT expresados por las distintas quimeras y el control, relativizados a los niveles de expresión de bacterias conteniendo el TMD canónico de la GpAwT. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes. Barras de error: SEM. Los niveles de expresión de cada proteína quimera se muestran en la parte inferior del gráfico. (C) Ensayo de difusión en agar. Imágenes representativas. (D) Ensayo de complementación de *malE*. Bacterias *E. coli* MM39 (deficientes en *MalE*) que portaban las diversas construcciones se fueron crecidas en medio sólido M9 con maltosa como única fuente de carbono y se cultivaron durante dos días a 37 °C. Todas las quimeras MBP-TMD-ToxR' permiten el crecimiento de las bacterias en maltosa, mientras que los transformantes con el plásmido control (pccKAN) no lo hacen. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

4.2.3. Estudio del rol de la capacidad dimerizante de los anticuerpos en la inducción de la VA.

Dado que los anticuerpos son al menos bivalentes y capaces de unir dos VSPs, evaluamos la posibilidad de que la dimerización de las VSPs inducida por los anticuerpos pueda mediar la transducción de la señal en la VA. Para evaluar el rol de los anticuerpos como moléculas bivalentes en la inducción del *switching*, se procedió a generar fragmentos Fab y estudiar si los mismos tienen las mismas propiedades que los correspondientes mAbs en la inducción del *switching*. El mAb 7F5 (anti-VSP1267) fue fragmentado a los Fab correspondientes mediante tratamiento con papaína y fue purificado a través de cromatografía de afinidad con proteína A.

Para determinar el rol de la agregación de las VSPs inducidas por los anticuerpos en la VA, grupos de 5×10^4 trofozoítos expresando la VSP1267 fueron sometidos a los siguientes tratamientos:

- a. Control: sin anticuerpos
- b. Control con anticuerpo anti-mouse: 1 h en hielo con anticuerpo policlonal anti-Ig de ratón en una dilución de 1/3000.
- c. mAb 7F5: 1 h en hielo en una concentración final de 25 nM.
- d. mAb 7F5 + anti-mouse: 1 h en hielo con 25 nM de mAb 7F5, lavado con PBS, 1 h en hielo con anticuerpo policlonal anti-Ig de ratón 1/3000.
- e. Fab 7F5: 1 h en hielo en una concentración final de 50 nM (para asegurar concentraciones iguales de dominios de unión respecto del mAb 7F5 completo).
- f. Fab 7F5 + anti-mouse: 1 h en hielo con 50 nM de Fab 7F5, lavado con PBS, 1 h en hielo con anticuerpo policlonal anti-Ig de ratón 1/3000.

Al finalizar cada tratamiento, los trofozoítos fueron transferidos a tubos de cultivo e incubados a 37°C durante 72 h. Al cabo de dicho tiempo, los tubos fueron enfriados para despegar las células, se realizaron tres lavados con PBS y se fijaron con paraformaldehído. El porcentaje de trofozoítos positivos para la VSP1267 se determinó por citometría de flujo, marcando previamente las células con el mAb 7F5 marcado con FITC.

Los resultados obtenidos se muestran en el gráfico de la Figura 4.7, donde puede observarse que la población de trofozoítos tratados con el fragmento Fab 7F5 no muestra diferencias significativas en el porcentaje de células positivas para la VSP1267 respecto del control sin anticuerpo. Por otra parte, el tratamiento con mAb 7F5 induce VA como es esperado. Estos resultados indican que la capacidad aglutinadora de los anticuerpos es necesaria para la inducción de la VA.

El tratamiento con anticuerpo policlonal anti-Igs de ratón sobre trofozoítos pre-tratados con mAb o Fab 7F5 aumenta de manera significativa la VA, respecto de los respectivos tratamientos solo con mAb o Fab, mientras que el solo tratamiento con anticuerpo policlonal anti-Ig de ratón no muestra diferencias significativas respecto del control sin anticuerpos. En conjunto, estos resultados indican que la aglutinación de las VSPs en la superficie de las células favorece la inducción de la VA.

Por otra parte, hemos observado que el Fab 7F5 es capaz de inducir el *switching* en una población de trofozoítos expresando la VSP1267 si el estímulo se deja de manera constante durante 3 días, aunque la eficiencia de inducción es menor respecto de los anticuerpos completos. Estudios complementarios indicaron que la unión de fragmentos Fab 7F5 es capaz de inducir cambios conformacionales en la VSP1267 (Ríos, D.N.; Tesis doctoral, 2021⁷⁴). Una posible explicación de la capacidad de los fragmentos Fab de inducir el *switching* a pesar de la falta de capacidad dimerizante podría ser que la desestabilización del ectodominio de las VSPs produzca su dimerización o multimerización *per se*. De ser así, la dimerización de las VSPs dependería en gran medida de la desestabilización de sus dominios variables N-terminales por la unión de ligandos, mientras que la reticulación de las

mismas mediada por ligandos multivalentes actuaría sinérgicamente favoreciendo este proceso de agregación.

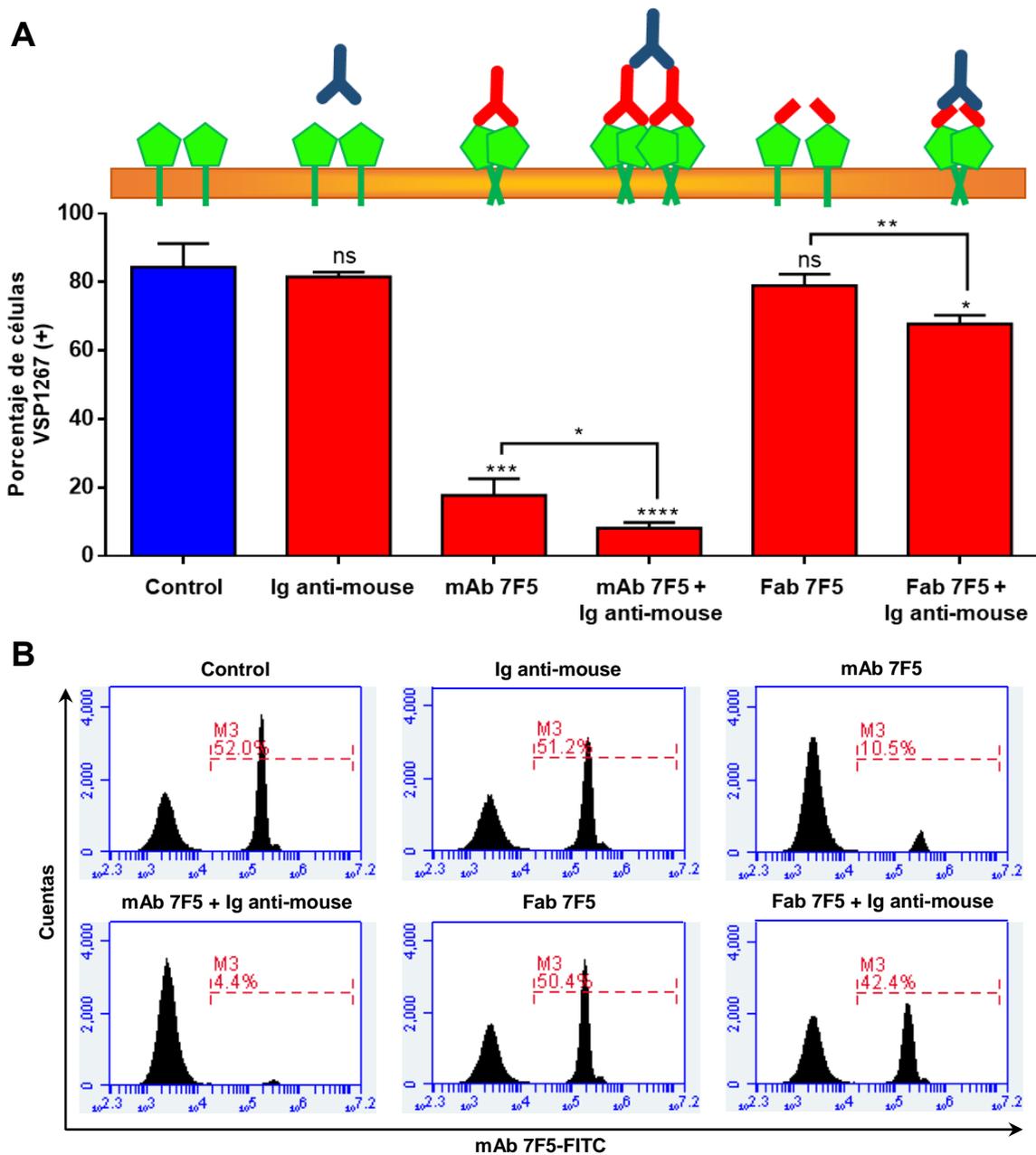


Figura 4.7: Rol de la capacidad dimerizadora de los anticuerpos en la inducción de la variación antigénica. Trofozoítos de *G. lamblia* expresando la VSP 1267 fueron tratados con mAb o Fab 7F5 seguido de tratamiento con anticuerpos policlonales anti-mouse (o no, en el caso de los respectivos controles) en hielo durante 1 hora. Al finalizar cada tratamiento, los trofozoítos fueron transferidos a tubos de cultivo con 7 ml de medio e incubados a 37°C durante 72 h. Al cabo de dicho tiempo se determinó el porcentaje de trofozoítos positivos para la VSP1267 por citometría de flujo, marcando previamente las células con el anticuerpo 7F5 unido a FITC. **(A)** Los resultados obtenidos se muestran en el gráfico y corresponden al promedio de tres experimentos independientes. Barras de error: SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns, diferencia no significativa. En la parte superior del gráfico se muestra un esquema representativo de cada tratamiento. En verde se representa la VSP1267, el anticuerpo 7F5 (mAb o Fab) se representa en rojo, y el anticuerpo secundario anti-mouse se representa en azul. **(B)** Histogramas representativos de la distribución de células negativas (primer pico de cada gráfico, correspondiente a células expresando VSPs diferentes de la 1267) y positivas (segundo pico de cada gráfico correspondiente a células que expresan la VSP1267, se indica el porcentaje) para el mAb 7F5 en cada condición ensayada.

4.3. Estudio del rol de los *lipid rafts* como plataformas de señalización en la variación antigénica.

Habiendo demostrado que el TMD de las VSPs tiene un rol en la dimerización de las mismas, y que la dimerización provocada por unión del anticuerpo es necesaria para inducir la VA, nos abocamos en determinar cuáles son los siguientes eventos en el proceso de transducción de la señal. Bajo la hipótesis de que el mecanismo de transducción de la señal por parte de las VSPs sería similar al de CEACAM1, nos propusimos estudiar el rol de los *lipid rafts* en el proceso de señalización.

Los *lipid rafts*, o balsas lipídicas, son nanodominios de membrana (10-200 nm) que surgen de las interacciones preferidas entre lípidos saturados, glico-esfingolípidos y colesterol que dan lugar a una fase líquida ordenada (Lo) dependiente de colesterol que puede coexistir con una fase líquida desordenada (Ld) en condiciones fisiológicas^{102,103}. Los *lipid rafts* son heterogéneos y dinámicos en términos de movilidad lateral y asociación-disociación, y tienen el potencial para formar dominios microscópicos (>300 nm) mediante el agrupamiento inducido por interacciones proteína-proteína o proteína-lípido^{102,104}. Estos dominios están presentes en ambas caras de las membranas celulares, formando plataformas funcionales para la regulación de los procesos celulares. Recientemente, varias técnicas bioquímicas y biofísicas emergentes han aportado evidencia acerca de la presencia de estos dominios en las células y se han descubierto roles clave en varias funciones celulares¹⁰². Los *lipid rafts* suelen contener principalmente proteínas de membrana ancladas en lípidos (aciladas o unidas a glicosilfosfatidilinositol [GPI]), aunque algunas proteínas transmembrana también se han descrito como residentes de *lipid rafts*. Estos microdominios desempeñan funciones críticas en diversas funciones celulares, como la compartimentación de proteínas transductoras de señales, el acoplamiento de estas proteínas con diferentes receptores, el aislamiento espaciotemporal de algunas proteínas reguladoras de estos dominios, el control de la activación de los receptores de muerte celular o como blancos específicos para entrada de algunos virus (p. ej., virus de inmunodeficiencia humana y virus de la Influenza) o moléculas inflamatorias (p. ej., toxinas o lipopolisacáridos) de origen bacteriano en las células hospedadoras. La importancia biológica de los *lipid rafts* es tal, que se ha demostrado su presencia en todo el árbol de la vida¹⁰².

La presencia de *lipid rafts* en *G. lamblia* ha sido reportada previamente y se ha demostrado que estos dominios son importantes para la transducción de señales durante el enquistamiento^{105,106}. Por otra parte, se ha informado que las VSPs están palmitoiladas^{34,35} y que esta palmitoilación se produce en el residuo de cisteína en la cola CRGKA dirigiendo a las VSPs a *lipid rafts*³³. En cuanto a su rol fisiológico, la palmitoilación de las VSPs ha sido asociada a la citotoxicidad mediada por anticuerpos anti-VSP³³. Sin embargo, esta concepción ha quedado obsoleta a la luz de nuestros resultados por lo que nos propusimos repetir y complementar estos experimentos bajo la perspectiva de un proceso de transducción de señales inducido por anticuerpos.

4.3.1. Determinantes estructurales de raftofilicidad en el extremo C-terminal conservado de las VSPs.

En un análisis más detallado del TMD de las VSPs encontramos algunos determinantes estructurales muy conservados de afinidad a *lipid rafts* (es decir, raftofilicidad) además de la palmitoilación (Figura 4.8).



Figura 4.8: Determinantes estructurales de raftofilicidad en el extremo C-terminal conservado de las VSPs. Logo consenso construido mediante Weblogo utilizando los últimos 50 aminoácidos C-terminales de las VSPs enumerados de 1 a 50, correspondiendo el 50 al último residuo de aminoácido de cada VSP. Cada residuo en la secuencia se indica según su símbolo de una letra. La altura total de la pila de símbolos indica la conservación de la secuencia en esa posición, mientras que la altura de los símbolos dentro de la pila indica la frecuencia relativa de cada aminoácido en esa posición. Subrayado en naranja se indica la secuencia correspondiente al dominio transmembrana (TMD) predicho por el servidor web Phobius. Los residuos de aminoácido que forman parte del motivo de dimerización GAS_{right} se resaltan en verde. Los residuos potencialmente involucrados en el motivo de unión de colesterol CRAC se indican en azul, y en rojo se indica el residuo de cisteína que sufre S-palmitoilación.

Uno de estos determinantes estructurales de raftofilicidad es un motivo de unión de colesterol (CRAC, *Cholesterol Recognition Amino acid Consensus*), definido por la secuencia lineal (L/V)-X₁₋₅-(Y/F/W)-X₁₋₅-(K/R), es decir, un residuo de leucina o valina separado por 1 a 5 residuos de aminoácido de un residuo aromático como tirosina, fenilalanina o triptófano, el cual a su vez está separado por 1 a 5 residuos de un aminoácido cargado positivamente como lisina o arginina. Este motivo suele estar ubicado en la mitad de un TMD que mira hacia el citoplasma (lado C-terminal), y puede estar acompañado por otro motivo ubicado en espejo a este, en la mitad N-terminal del TMD¹⁰⁷. En la Figura 4.8 se muestran en azul los residuos de aminoácidos que podrían constituir el motivo CRAC del TMD de las VSPs, dichos residuos se mantienen invariables en las 135 VSPs analizadas.

Otro sello distintivo de raftofilicidad es la longitud del TMD. En general, las proteínas con TMDs más largos se particionan preferentemente en *lipid rafts*, ya que estos dominios tienen mayor espesor que la fase desordenada de la membrana plasmática¹⁰⁸. Si bien se predice que el TMD de las VSPs tiene 25 aminoácidos de longitud utilizando muchos servidores web como Phobius o TMHMM¹⁰⁹, hemos visto que el motivo GAS_{right} conservado se extiende en la parte N-terminal del TMD predicho, lo que podría sugerir un TMD más largo. Esto no es sorprendente, como se demostró en estudios que comparan las estructuras de TMD obtenidas experimentalmente con las estructuras predichas, que las longitudes de TMD a menudo son mayores de lo que predicen los algoritmos¹¹⁰. La presencia de esta extensión del motivo GAS_{right} podría ser importante luego de la dimerización inducida por anticuerpo, brindándole al dímero de VSPs mayor raftofilicidad.

4.3.2. Efecto de la dimerización por anticuerpo en la raftofilicidad de las VSPs

Los *lipid rafts* se caracterizan fisicoquímicamente por su insolubilidad en detergentes no iónicos como Tritón X-100 o Nonidet P-40. La insolubilidad de estos microdominios se ha atribuido al alto grado de interacción entre sus componentes por fuerzas de Van der Waals y puente hidrógeno que generan un alto grado de empaquetamiento evitando el ingreso del detergente. Esta propiedad de los *lipid rafts* ha sido ampliamente utilizada para la caracterización de proteínas residentes en los mismos¹¹¹.

Como ensayo preliminar para determinar la raftofilicidad de las VSPs, se realizó un ensayo de resistencia diferencial a detergente por citometría de flujo (FCDR, *Flow Cytometric Assay of Differential detergent Resistance*)¹¹². Dicho ensayo permite una rápida

caracterización de las proteínas superficiales de un determinado tipo celular, en cuanto a su anclaje o no en *lipid rafts*, fase desordenada de la membrana, o citoesqueleto (Figura 4.9 A). Este ensayo consiste en la marcación de la proteína de interés con un anticuerpo específico unido de manera directa a un fluoróforo. Las células marcadas de esta forma son analizadas por citometría de flujo obteniéndose un histograma de cantidad de células en función de la intensidad de fluorescencia. Este gráfico muestra un pico centrado en el valor medio de intensidad de fluorescencia de las células. Dicho valor dependerá de la cantidad de antígeno (es decir, la proteína de superficie en estudio) inmunomarcado en la superficie celular. Después de medir la intensidad de fluorescencia, las células son tratadas con 0.1% p/v de Tritón X-100 en frío durante 5 min luego de lo cual se vuelve a medir la intensidad media de fluorescencia por citometría de flujo. Un corrimiento del pico de intensidad de fluorescencia hacia valores menores indica la solubilización de parte de la proteína de superficie en estudio, lo que indica su localización en la fase desordenada de la membrana. La situación opuesta indica la ubicación de la proteína en *lipid rafts* o su anclaje al citoesqueleto.

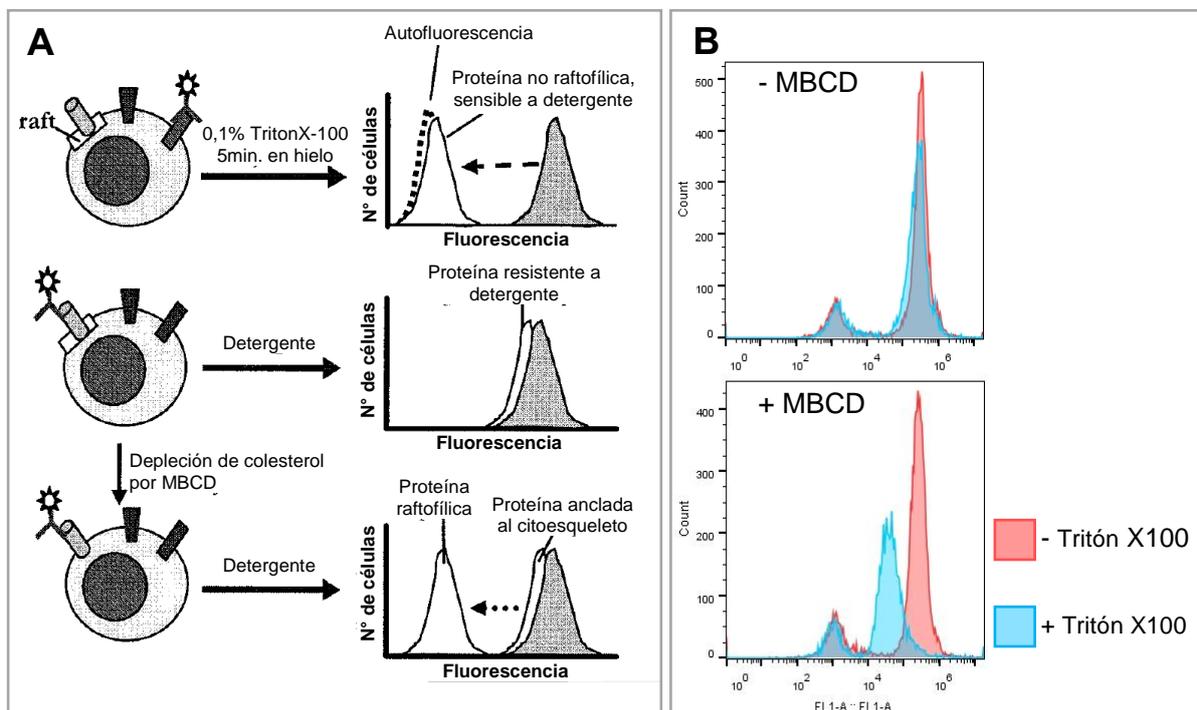


Figura 4.9: Ensayo de resistencia diferencial a detergente por citometría de flujo (FCDR). (A) Esquema explicativo del ensayo. Arriba: las proteínas de la membrana plasmática sensibles a detergente se disuelven rápidamente incluso en bajas concentraciones de detergentes no iónicos en poco tiempo. Este proceso puede seguirse midiendo la intensidad de fluorescencia antes y después de 5 min de tratamiento con detergente. Medio: Las proteínas raftofílicas o ancladas al citoesqueleto muestran una alta resistencia al tratamiento con detergente. Abajo: el mecanismo principal subyacente a la resistencia detergente observada podría identificarse mediante la interrupción selectiva de los lipid rafts (por depleción de colesterol con MBCD) o el citoesqueleto (por citocalasina D o latrunculina) antes del tratamiento con detergente. Un aumento de la solubilidad en detergente de la proteína después de estos tratamientos se considera una indicación de su asociación a lipid rafts o citoesqueleto, respectivamente. Figura tomada de Gombos *et al.*, 2004¹¹² y adaptada. **(B) Determinación de la raftofilicidad de las VSPs por FCDR.** Las gráficas muestran el número de células en función de la intensidad de fluorescencia de dos poblaciones de trofozoítos de *G. lamblia* WB clon 1267 sin tratar y pre-tratados con MBCD, las cuales fueron marcadas con el mAb 7F5-FITC y analizadas por citometría de flujo antes (curvas indicadas en rojo) y después de un tratamiento con Tritón X-100 0,1% (curvas indicadas en azul). El primer pico en cada gráfica corresponde a un porcentaje minoritario de células en la población que expresan VSPs diferentes de la VSP1267 (autofluorescencia). Nótese que el segundo pico (correspondientes a células 1267) se corre hacia menores intensidades de fluorescencia luego del tratamiento con detergente en las células pre-tratadas con MBCD y no en las células control, lo que indica la presencia de las VSPs en *lipid rafts*.

Para discernir entre estos dos casos, el procedimiento se repite pero con células pre-tratadas con metil- β -ciclodextrina (MBCD), compuesto capaz de extraer y secuestrar el colesterol de la membrana plasmática generando la disrupción de los *lipid rafts*¹¹³. El corrimiento del pico de intensidad de fluorescencia hacia valores menores luego del tratamiento con Tritón X-100 en células pre-tratadas con MBCD indica que la proteína se encuentra anclada en *lipid rafts*. El caso contrario indicaría su anclaje al citoesqueleto.

Trofozoítos de *G. lamblia* WB clon 1267 sin tratar y pre-tratados con MBCD 10 mM en PBS durante 15 min a 37°C fueron marcados con el mAb 7F5-FITC en una dilución 1/500 en PBS durante 40 min en hielo. Luego de lavar con PBS, ambas poblaciones fueron analizadas por citometría de flujo obteniéndose los gráficos que se muestran en la Figura 4.9 B (curvas indicadas en rojo). La comparación de ambos histogramas muestra que el pre-tratamiento con MBCD no afecta la intensidad de fluorescencia de las células. Posteriormente las células fueron tratadas con 0.1% p/v de Tritón X-100 en frío durante 5 min y se volvieron a analizar por citometría. Los histogramas resultantes se muestran en la Figura 4.9 B en azul, superpuestas a los correspondientes histogramas anteriores al tratamiento con Tritón X-100. Como puede observarse, el tratamiento con Tritón X-100 en células sin tratar con MBCD, no produce corrimiento del pico de intensidad de fluorescencia. Por otra parte, las células pre-tratadas con MBCD muestran un corrimiento del pico luego del tratamiento con Tritón, lo que indica su localización en *lipid rafts*.

El ensayo FCDR nos permitió determinar que las VSP están posiblemente ancladas en *lipid rafts*. Sin embargo, tiene la limitación de que las células deben ser marcadas con anticuerpo para su visualización y no nos permitió determinar si las VSPs se encuentran en *lipid rafts* antes de su dimerización por anticuerpo. Para indagar acerca del efecto de la unión del anticuerpo en la raftofilicidad de las VSPs se procedió a la purificación de membranas resistentes a detergente (DRMs, *Detergent Resistant Membranes*). Los *lipid rafts* han sido estudiados ampliamente aislando DRMs por flotación en gradiente de sucrosa. Si bien se ha demostrado que los DRMs no son equivalentes a los *lipid rafts* preexistentes (no son *lipid rafts* purificados), se siguen utilizando para determinar la raftofilicidad de proteínas¹¹¹.

Se purificaron DRMs a partir de trofozoítos de *G. lamblia* WB clon VSP1267 que fueron tratados previamente con mAb 7F5 en una concentración final de 50 nM en medio de cultivo durante 30 min a 37°C. Como control, la misma cantidad de trofozoítos fueron incubados en las mismas condiciones, pero sin anticuerpo. También se incluyó otra condición en la que los trofozoítos fueron pre-tratados con 10 mM de MBCD en buffer PBSAC (PBS suplementado con ácido ascórbico 0.01% p/v y cisteína 0.2% p/v, pH=7) durante 30 min a 37°C para depletar el colesterol de las membranas, luego de lo cual se procedió al tratamiento con mAb 7F5 50 nM en buffer PBSAC. La purificación de los DRMs se realizó por ultracentrifugación en gradiente de sucrosa según se describe en Materiales y Métodos. Finalmente, se separaron las diferentes fracciones desde la parte superior de cada tubo las cuales fueron sometidas a SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Posteriormente se realizó un Western blot para determinar la presencia de la VSP1267 en cada fracción.

La Figura 4.10 A corresponde a imágenes representativas de los Western blots obtenidos para cada condición. La numeración en la parte superior de la imagen indica el número de fracción, siendo 1 la fracción superior y 14 la fracción del fondo del tubo. Los DRMs se concentran hacia la interfase entre las fracciones 2 y 3, y están presentes en las fracciones 3 a 11. Las fracciones 12 a 14 corresponden al lisado original conteniendo las membranas y proteínas solubles en detergente (indicado como DSM, *Detergent Soluble Membranes*). La Figura 4.10 B resume los resultados obtenidos como proporción de VSP1267 presente en DRMs respecto de la presente en DSM para los distintos tratamientos en tres ensayos independientes. Como puede observarse, el tratamiento con mAb específico contra las VSP1267 incrementa los niveles de esta proteína en las fracciones correspondientes a DRM respecto del control sin tratar. Por otra parte, las VSPs se mantiene en la fase soluble cuando

se depleta el colesterol de las membranas celulares a pesar del tratamiento con mAb, confirmando que la integridad de estos dominios de membrana es dependiente de colesterol.

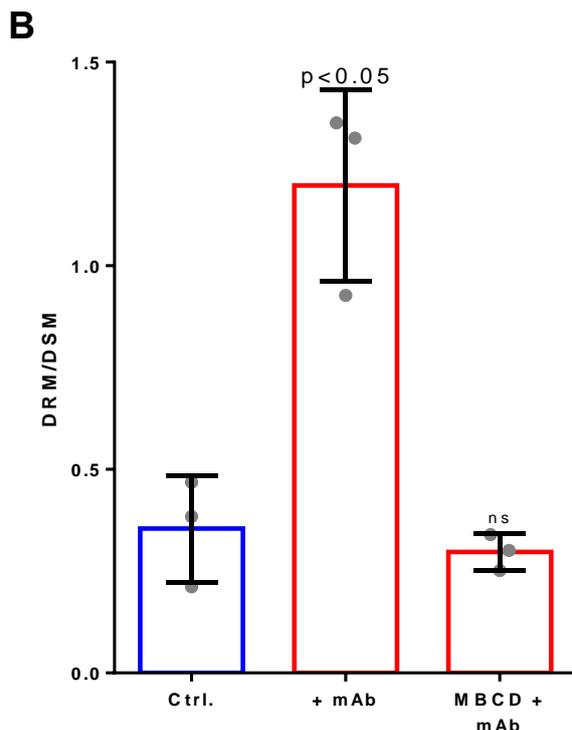
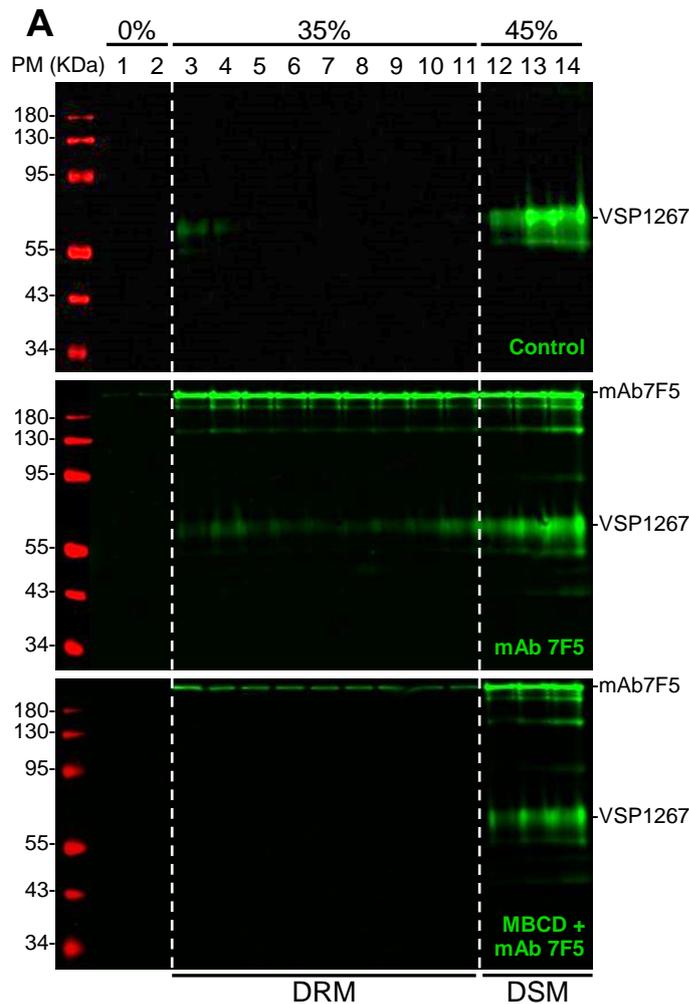


Figura 4.10: Efecto de los anticuerpos en el equilibrio de partición de las VSPs en membranas resistentes a detergentes (DRMs)

Trofozoítos de *G. lamblia* WB clon VSP1267 fueron tratados con mAb 7F5 (con y sin pretratamiento con MBCD) o dejados sin tratamiento como control antes de su lisis con Tritón X-100 1% en sucrosa 45%. Los lisados fueron ultracentrifugados bajo colchones de sacarosa 0% y 35% para permitir el aislamiento de DRMs por flotación. (A) Western blots representativos de cada condición ensayada. Se tomaron 14 alícuotas desde la parte superior de cada tubo de ultracentrifugación. Muestras de cada fracción fueron sometidas a SDS-PAGE en condiciones no reductoras, y la VSP1267 fue determinada mediante western blot con mAb 7F5. Se muestra una imagen representativa de cada western blot para cada condición, la cual se indica en la parte inferior derecha de cada una. La numeración en la parte superior de la imagen indica el número de fracción, siendo 1 la fracción superior y 14 la fracción del fondo del tubo. Los DRMs están presentes en las fracciones 3 a 11 correspondientes al colchón de sacarosa 35%. Las fracciones 12 a 14 corresponden al lisado original conteniendo las membranas y proteínas solubles en detergente (indicado como DSM, *Detergent Soluble Membranes*). El patrón de peso molecular se indica a la izquierda de cada panel en kDa. En la parte derecha de cada panel se identifica la proteína correspondiente a cada banda. (B) Gráfico de distribución de la VSP1267 en DRMs. Se muestra la proporción de VSP1267 presente en DRM respecto de la presente en DSM para cada condición ensayada en tres experimentos independientes. Barras de error: desviación estándar. ns, diferencia no significativa ($p > 0,05$).

4.4. Estudio del rol de los fosfoinosítidos (PIs) en la señalización durante la variación antigénica.

La agrupación de receptores de membrana en *lipid rafts* estabilizada por unión a ligandos multivalentes extracelulares ha sido descrita como plataforma para la transducción de señales en múltiples modelos^{104,114–117}. Estos receptores suelen ser proteínas integrales de membrana cuyo TMD es raftofílico, o también proteínas ancladas a membrana mediante el lípido GPI, el cual tiene alta afinidad a *lipid rafts*. En muchos de estos modelos de transducción de señales, la estabilización de los receptores en *lipid rafts* se ve acompañada de un incremento en los niveles celulares de ciertos fosfoinosítidos (PIs), los cuales se acumulan en los mismos *lipid rafts* desde su lado citoplasmático, generando sitios de unión para determinados efectores citoplasmáticos específicos capaces de continuar la transmisión de la señal^{116,117}.

Los PIs son fosfolípidos esenciales que controlan de manera directa o indirecta múltiples funciones celulares incluyendo el tráfico de membranas, la transducción de señales, el crecimiento celular, la dinámica del citoesqueleto y la regulación de proteínas integrales de membrana. Los PIs resultan de la fosforilación del fosfatidilinositol. La fosforilación reversible del anillo de inositol en posiciones 3, 4 y 5 da lugar a las siete isoformas de PIs identificadas en células eucariotas. Estas son fosfatidil-inositol 3-fosfato (PI3P), fosfatidil-inositol 4-fosfato (PI4P), fosfatidil-inositol 5-fosfato (PI5P), fosfatidil-inositol (3,4)-bifosfato [PI(3,4)P₂], fosfatidil-inositol (3,5)-bifosfato [PI(3,5)P₂], fosfatidil-inositol (4,5)-bifosfato [PI(4,5)P₂] y fosfatidil-inositol (3,4,5)-trifosfato [PI(3,4,5)P₃]¹¹⁸.

En el caso de la transducción de señales mediada por CEACAM1 durante la internalización de bacterias por parte de células epiteliales, se ha reportado una alta acumulación de PI(3,4,5)P₃ en los sitios de internalización^{99,119}. En otros modelos, como en la transducción de señales durante la inducción de la respuesta pro-inflamatoria en macrófagos desencadenada por la unión de lipopolisacáridos (LPS) al receptor CD14 (unido a membrana por GPI), se ha descrito que el LPS induce el agrupamiento de CD14 en *lipid rafts*, lo que dispara un aumento en los niveles de PI(4,5)P₂ en estos microdominios¹¹⁶. En *Entamoeba histolytica* se ha descrito un fenómeno similar, con acumulación de PI(4,5)P₂ en *lipid rafts* en los sitios de aglutinación de receptores superficiales con la lectina concanavalina A¹¹⁷. Dado que los eventos desencadenados a nivel de la membrana celular durante la inducción de la VA con anticuerpos anti-VSP en *Giardia* son similares a los observados en los modelos mencionados, decidimos indagar acerca del rol de los PIs en el proceso de transducción de señales durante la VA.

Trofozoítos de *Giardia* del clon que expresa la VSP1267 fueron tratados con mAb 7F5 en una concentración final de 30 nM. Se utilizaron 3.5x10⁶ trofozoítos por condición. A distintos tiempos post-inducción se procedió a la extracción de lípidos ácidos (ver Materiales y Métodos). Volúmenes de 2 µl de los diferentes extractos lipídicos fueron alicuotados sobre membrana de nitrocelulosa y dejados secar. Los niveles de PI(4,5)P₂ y PI(3,4,5)P₃ se cuantificaron sobre esta membrana utilizando anticuerpos específicos. Los resultados obtenidos pueden observarse en la Figura 4.11 A-B. Los niveles de PIs se muestran relativizados a los niveles del control (trofozoítos sin tratar con mAb) en la Figura 4.11 A. Tanto el nivel de PI(4,5)P₂ como el de PI(3,4,5)P₃ se incrementan en promedio tres veces respecto del control al minuto luego del tratamiento con anticuerpo. A los 15 min los niveles de ambos PIs vuelven a los niveles basales. La localización subcelular del PI(4,5)P₂ fue determinada mediante ensayo de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo específico en trofozoítos de *Giardia* clon VSP1267, mostrando una distribución en parches en toda la superficie de los trofozoítos incluidos los flagelos (Figura 4.11 C).

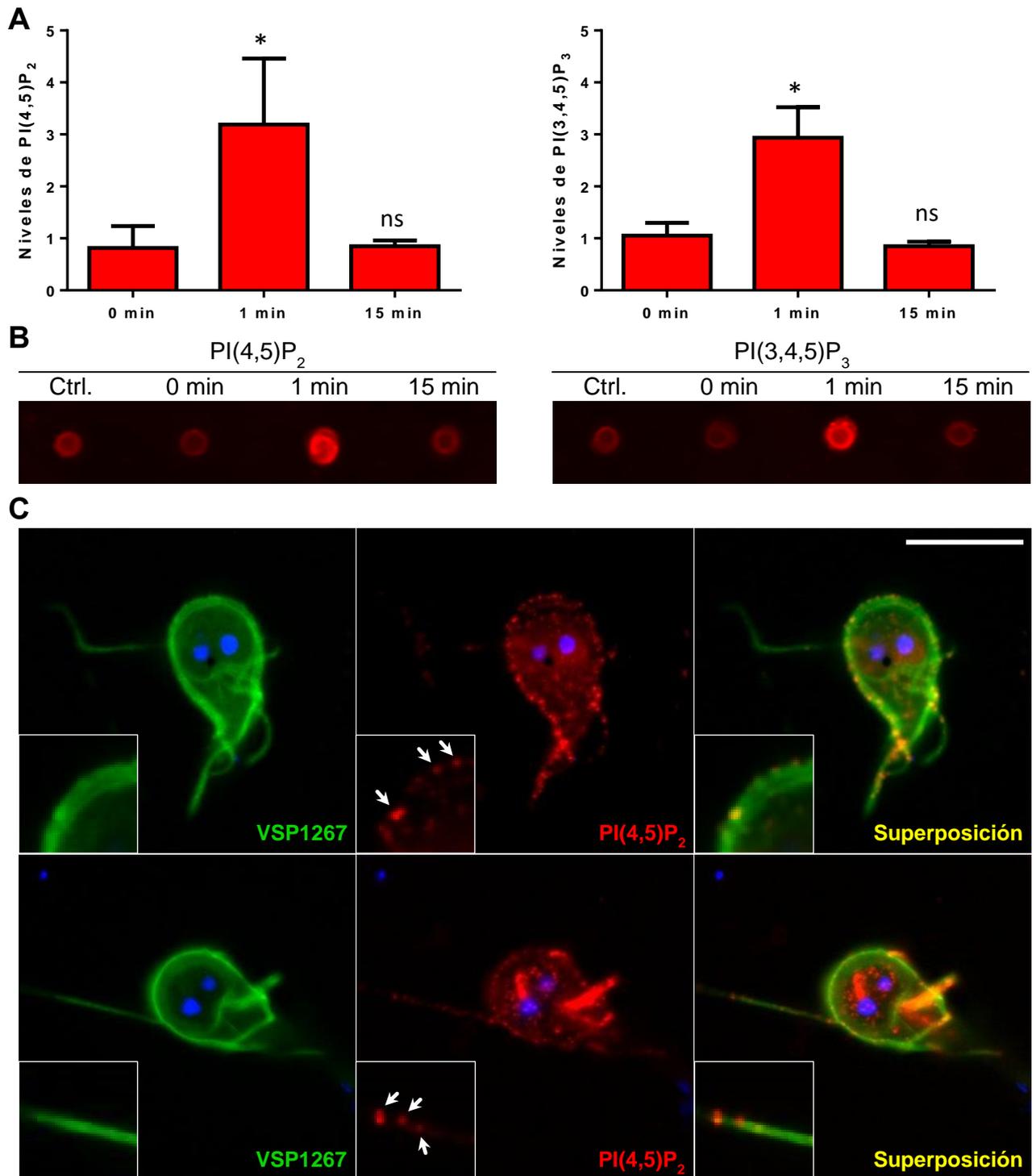


Figura 4.11: Rol de los fosfoinosítidos en la señalización durante la VA. (A) Niveles de PI(4,5)P₂ (izquierda) y PI(3,4,5)P₃ (derecha) en trofozoítos de *Giardia* clon VSP1267 a distintos tiempos post-inducción con mAb 7F5, relativos al control sin inducción. Los niveles de fosfoinosítidos fueron medidos utilizando anticuerpos específicos en *dot blots* realizados a partir de extractos de lípidos ácidos de *Giardia*. * $p < 0,05$; ns, diferencia no significativa ($p > 0,05$). (B) Imágenes representativas de los *dot blots* realizados para la cuantificación de PI(4,5)P₂ y PI(3,4,5)P₃ sobre trofozoítos de *Giardia* sin inducir (Ctrl) y a distintos tiempos post-inducción. (C) Ensayo de inmunofluorescencia mostrando la localización de PI(4,5)P₂ en trofozoítos de *Giardia* clon VSP 1267. Se muestra la distribución homogénea de la VSP1267 en la superficie del trofozoítos (verde) y la distribución de las moléculas de PI(4,5)P₂ en la membrana plasmática del trofozoito formando “parches” o microdominios (señalados con flechas) en toda la superficie, incluidos los flagelos. Los núcleos están teñidos con DAPI. Barra de escala: 10 μm.

Estos resultados sugieren que al igual que en los otros modelos de señalización dependientes de la agrupación de receptores de membrana en lipid rafts anteriormente descritos, la unión de mAbs a las VSPs desencadenaría un incremento en los niveles de PI(4,5)P₂ y PI(3,4,5)P₃ a nivel de la membrana plasmática, generando sitios de unión para determinados factores citoplasmáticos capaces de continuar la señalización intracelular.

4.5. Evaluación de estímulos alternativos capaces de inducir VA.

Las VSPs codificadas en el genoma de *G. lamblia* difieren entre sí en su extremo N-terminal extracelular, y esta porción es la que constituye la interfase hospedador-parásito ya que varios anticuerpos monoclonales que reconocen la superficie del parásito también reconocen un epítipo en la porción N-terminal de la VSP^{23,28,29}. Por otra parte, todos los mAbs anti-VSP de nuestro panel son capaces de disparar la VA, independientemente del epítipo que reconozcan dentro de la porción N-terminal de las mismas.

Teniendo en cuenta, entonces, que los receptores de la señal (VSPs) son altamente variables entre sí, y que no parece haber restricciones en cuanto al sitio específico del receptor que un mAb deba tocar para inducir la señal (puesto que los epítopos reconocidos por los mAbs se generan al azar), parece bastante probable que la inducción de la señal sólo dependa de la aglutinación de las VSPs en *lipid rafts* estabilizada por unión a ligandos multivalentes como son los anticuerpos.

Bajo la premisa de que la aglutinación de VSPs por ligandos inespecíficos en cuanto a su sitio de unión a las mismas es suficiente para disparar la señalización, es de esperar que cualquier otro estímulo o ligando distinto de un anticuerpo, pero que sea capaz de unirse a las VSPs y generar su aglutinación, sea capaz de inducir la VA. Para comprobar estas predicciones y corroborar la validez del modelo propuesto, nos abocamos a estudiar otros estímulos capaces de inducir aglutinación de las VSPs en la superficie del trofozoíto.

4.5.1. Lectinas como inductoras de la variación antigénica.

Las lectinas son proteínas que se unen específicamente a residuos de carbohidratos y se distribuyen ampliamente en la naturaleza. Muchos protozoarios parásitos tienen tales residuos de carbohidratos en su superficie, los cuales varían en sus configuraciones¹²⁰. En *Entamoeba histolytica*, se ha reportado que el tratamiento con la lectina Concanavalina A (ConA), al igual que el tratamiento con anticuerpos contra antígenos de superficie del parásito, producen la aglutinación de los ligandos en la superficie del parásito en estructuras llamadas *caps*, las cuales posteriormente se desprenden de la superficie en estructuras que son liberadas al medio (un proceso conocido como *capping*)¹²¹. Remarcablemente, se ha descrito que estas estructuras están enriquecidas en PI(4,5)P₂¹¹⁷.

En el caso de *Giardia*, se ha descrito que varias lectinas, principalmente la aglutinina de germen de trigo (WGA), se unen a la superficie de trofozoítos del aislamiento Portland-1 (ensamblaje A1) produciendo aglutinación de los mismos¹²². Por otra parte, se ha descrito que la VSP4A1, perteneciente a un aislamiento de *G. lamblia* derivado de oveja (CH-O2, ensamblaje A tipo 1-2) estaría glicosilada con una pequeña cadena de di o tri-sacárido compuesta de glucosa y N-acetil-glucosamina (GlcNAc)³⁵. Posteriormente, fue reportado que la VSPA6 del aislamiento WBC6 (ensamblaje A1) y la VSPH7 del aislamiento GS (ensamblaje B) estarían también glicosiladas, sugiriendo que la glicosilación sería una característica general de las VSPs de *Giardia*³⁴. Sin embargo, en nuestro grupo de investigación hemos confirmado la ausencia de modificaciones postraduccionales en la VSPH7⁴⁰, por lo que la glicosilación de las VSPs de *Giardia* sigue siendo un tema de debate.

Estudios posteriores sobre la glicosilación de proteínas en *Giardia* han mostrado que este sistema está muy simplificado en comparación al de los eucariotas superiores. Este protista carece de las glucosiltransferasas que agregan manosa y glucosa a los precursores de N-glucano y, por lo tanto, la glicosilación de proteínas en *Giardia* consiste en un disacárido

de GlcNAc (GlcNAc₂)¹⁵. Estos residuos de GlcNAc₂ son suficientes, sin embargo, para unir la lectina WGA ya que se ha reportado que las proteínas glicosiladas de *Giardia* pueden ser enriquecidas por cromatografía de afinidad con WGA. Además, mediante microscopía de fluorescencia de alta resolución utilizando WGA unida a fluoróforos, se ha determinado que dicha lectina es capaz de unirse a la superficie de trofozoítos no permeabilizados¹²³.

Considerando que los residuos de GlcNAc₂ podrían estar expuestos al medio en la superficie de los trofozoítos (ya sea como parte de las VSPs, o de otra proteína de membrana), decidimos evaluar la capacidad de las lectinas WGA y ConA de inducir el switching a través de la oligomerización de sus ligandos en la superficie de trofozoítos de *Giardia*.

Trofozoítos de *G. lamblia* aislamiento WB expresando la VSP TSA417 y la VSP9B10 en crecimiento exponencial fueron lavados con PBS, enfriados para despegarlos y contados en cámara de Neubauer. 5x10⁵ trofozoítos de cada clon fueron tratados con 1 ml de PBSAC (PBS suplementado con ácido ascórbico al 0.01% p/v y cisteína al 2% p/v, pH 7.2) conteniendo 250 µg de WGA o 250 µg de ConA a 37°C durante 1 h. Durante este tiempo no se observaron efectos de aglutinación de las células. Posteriormente, los trofozoítos fueron transferidos a tubos de cultivo (sin eliminar las lectinas) y crecidos en condiciones normales durante 72 h. El porcentaje de trofozoítos expresando la VSP original se determinó por citometría de flujo realizando una marcación previa con los mAbs correspondientes.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.12. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de VSP original entre los trofozoítos tratados respecto del control para ninguno de los dos clones de VSP evaluados.

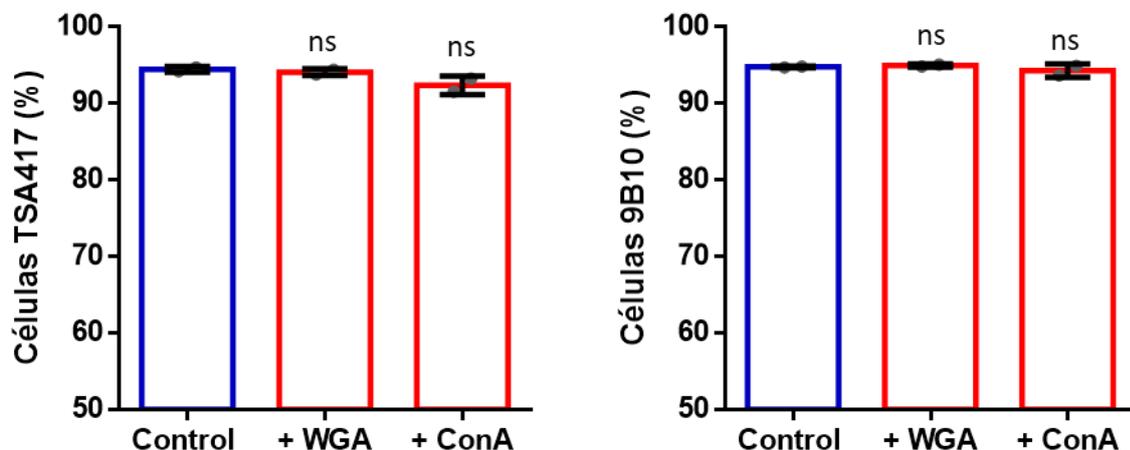


Figura 4.12: Análisis de lectinas como inductoras de la VA en *Giardia*. Trofozoítos de *G. lamblia* ensamblaje A1 expresando la VSP TSA417 o VSP9B10 fueron tratados durante 1 h con 250 µg/ml de aglutinina de germen de trigo (WGA) o de concanavalina A (ConA) en PBSAC a 37°C y posteriormente crecidas en condiciones normales. Los gráficos muestran el porcentaje de trofozoítos expresando la VSP original luego de 72 h de cultivo. ns, diferencia no significativa ($p > 0,05$). Barras de error: desviación estándar.

Para confirmar la interacción de la WGA con ligandos de la superficie de los trofozoítos, clones de ambas VSPs ensayadas fueron fijados y tratados con WGA marcada con ficoeritrina (WGA-PE) sin previa permeabilización para su análisis por microscopía de fluorescencia. Además, se incluyó un control, tratando trofozoítos vivos con WGA-PE para su observación directa por microscopía de fluorescencia. Mientras que en los trofozoítos fijados se observó una marcación en la superficie similar a lo previamente reportado¹²³, no se observó marcación en los trofozoítos vivos. Esta observación sugiere que las proteínas glicosiladas de la superficie se encontrarían “enmascaradas” por la densa capa de VSPs, que no permitiría el acceso de la lectina a sus blancos en las células vivas. Por otra parte, sugiere

además que las VSPs 9B10 y TSA417 no estarían glicosiladas, por lo menos en la porción expuesta al medio.

Para evaluar la posibilidad de que las VSPs estén diferencialmente glicosiladas, se realizó una marcación de trofozoítos vivos de *Giardia* no clonados (expresando diferentes VSPs) con WGA-PE. Sin embargo, no se observó marcación alguna en la población analizada, lo que apunta a favor de que las VSPs no estarían glicosiladas.

4.5.2. Estrés redox como inductor de la variación antigénica.

Los trofozoítos de *G. lamblia* son células sensibles al oxígeno que crecen *in vitro* preferentemente en condiciones microaerófilas en medio reductor¹²⁴. El carácter reductor del medio de cultivo de *Giardia* está dado principalmente por altas concentraciones de cisteína y ácido ascórbico¹²⁵⁻¹²⁷. *In vivo*, los trofozoítos infectan preferentemente la parte superior del intestino delgado, que posee mayor capacidad amortiguadora redox respecto del intestino grueso, debido principalmente a la presencia de compuestos antioxidantes secretados con la bilis (glutación, cisteína, bilirrubina, etc.)¹²⁸.

En *Giardia*, los grupos tioles reducidos y el sistema de las tiorredoxinas juegan un papel importante en la mantención de un ambiente intracelular reducido, y por lo tanto, en la defensa contra el estrés oxidativo¹²⁹. Las VSPs, por ser ricas en cisteína y estar ubicadas en la superficie celular podrían también tener un rol protector frente al estrés redox¹²⁷. De ser así, la estructura de las mismas podría verse afectada ante procesos de oxidación por formación de puentes disulfuro intracatenarios o intercatenarios, que de producirse, llevarían a la dimerización de las VSPs y posiblemente, a la inducción de la VA de la misma manera que lo hacen los anticuerpos.

Para evaluar la posibilidad de que las VSPs sufran cambios conformacionales por formación de puentes disulfuro frente al estrés oxidativo, trofozoítos de *G. lamblia* ensamblaje A1 clones VSP1267 y TSA417 fueron tratados con diferentes concentraciones de H₂O₂ en PBS pH=6 (purgado previamente con nitrógeno para eliminar el oxígeno disuelto) durante 2 h en hielo luego de lo cual fueron lisados con buffer Laemmli. Para analizar el estado conformacional de las VSPs, las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE en condiciones no reductoras y se inmunomarcaron mediante Western blot con los anticuerpos monoclonales específicos.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.13 A. No se observaron cambios en la movilidad electroforética para la VSP1267, para la cual se observa una única banda de peso molecular aparente de ~55 kDa tanto para el control como para todos los tratamientos con H₂O₂. Por otra parte, para la TSA417 se observan 2 bandas de peso molecular aparente de ~45 kDa y ~90 kDa. La intensidad de la banda de 90 kDa parece aumentar a expensas de la banda de 45 kDa a medida que aumenta la concentración de H₂O₂, lo que indica que la banda de 90 kDa corresponde a la forma dimerizada de la TSA417. Además, para las concentraciones de 10 y 100 mM de H₂O₂, se observa una banda extra de alto peso molecular que se mantiene en el sitio de siembra de la muestra y podría corresponder a la forma oligomerizada de dicha VSP.

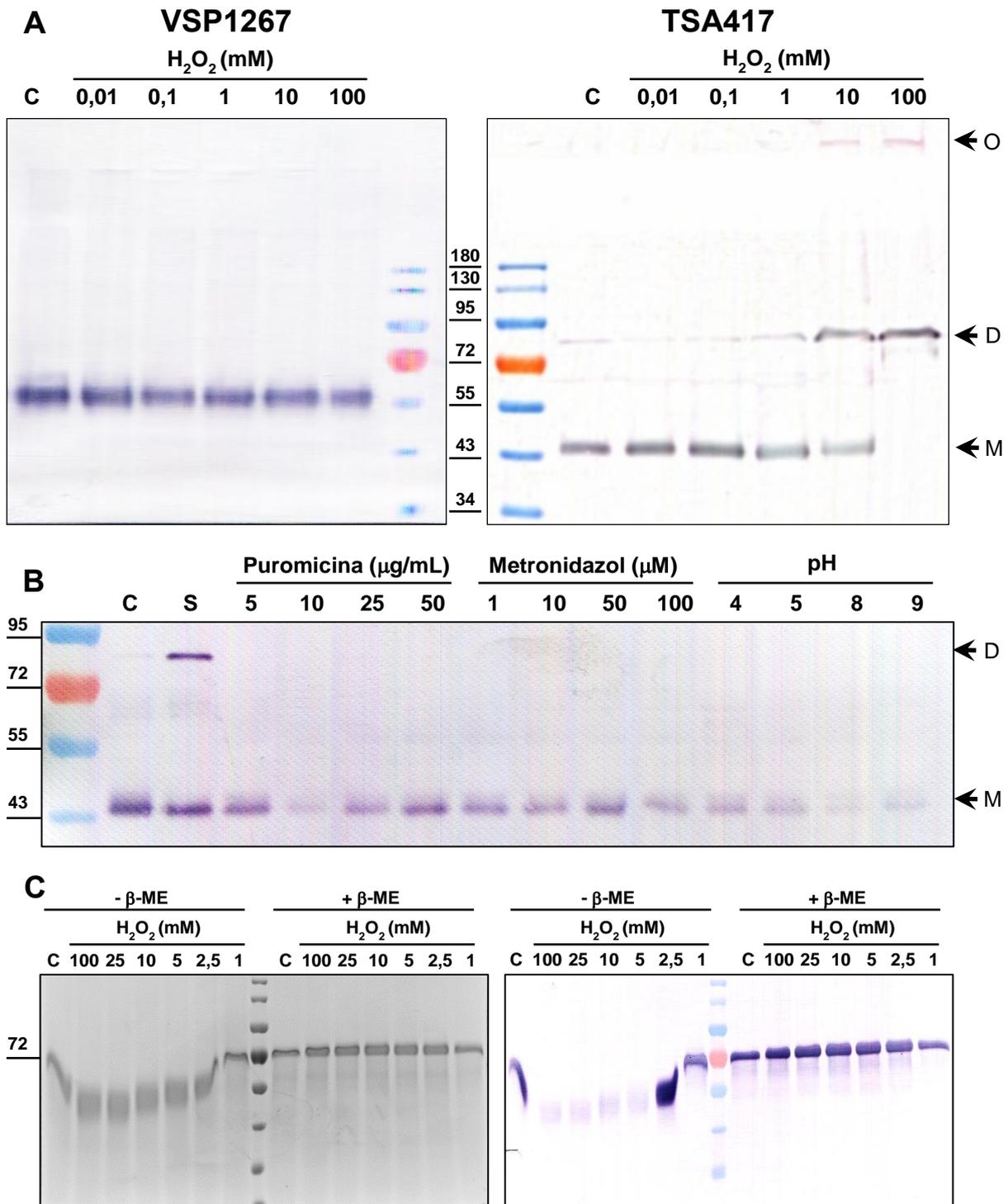


Figura 4.13: Cambios conformacionales en VSPs inducidos por estrés oxidativo. (A) Trofozoítos de *Giardia* clones VSP1267 y TSA417 fueron tratados con diferentes concentraciones de H_2O_2 . El estado de dimerización de cada VSP se evaluó por SDS-PAGE en condiciones no reductoras y western blot con anticuerpos específicos. (B) Trofozoítos de *Giardia* clon TSA417 fueron sometidos a diferentes condiciones de estrés incluyendo sobrecrecimiento (S), diferentes concentraciones de puromicina o metronidazol, y diferentes pH. C, indica el control y corresponde a células en crecimiento exponencial sin tratar. Los pesos moleculares se indican en kilodaltons (kDa). O, oligómeros; D, dímeros; M, monómeros. (C) VSP1267 recombinante reducida tratada con diferentes concentraciones de H_2O_2 analizada por SDS-PAGE en condiciones no reductoras (sin β -mercaptoetanol, - β -ME) y reductoras (con β -mercaptoetanol, + β -ME). La imagen de la izquierda corresponde a la tinción del gel con azul de Coomassie y la de la derecha a un western blot realizado a partir de un gel similar, revelado con mAb 7F5.

Por otra parte, en la Figura 4.13 A se observa que el monómero de TSA417 tiene un peso aparente de ~45 kDa en condiciones no reductoras, mientras que el peso molecular predicho es de 72.5 kDa. Esto sugiere que la estructura nativa de esta VSP involucra al menos un puente disulfuro intracatenario. El cambio en el peso molecular aparente en condiciones reductoras no pudo ser ensayado para esta VSP debido a que el mAb disponible para su detección por Western blot (7C2) es conformacional.

Para confirmar que la dimerización de la VSP TSA417 es debida a la acción directa del H₂O₂, y descartar la posibilidad de que la misma ocurra de manera regulada por la célula como respuesta al estrés, se evaluó el estado de dimerización de la TSA417 en trofozoítos expuestos a diferentes condiciones de estrés, incluyendo sobrecrecimiento, dosis subletales de puromicina (antibiótico inhibidor de la síntesis de proteínas) y metronidazol (antiparasitario del grupo de los nitroimidazoles, que inhibe la síntesis de los ácidos nucleicos y es utilizado para el tratamiento de la giardiasis), y crecimiento a diferentes pH. Para esto, 5x10⁴ trofozoítos clon TSA417 fueron crecidos durante 48 h en condiciones normales. Posteriormente, el medio de cultivo fue reemplazado por medio fresco conteniendo puromicina o metronidazol en las concentraciones indicadas en la Figura 4.13 B, o con el pH ajustado a los puntos indicados. Los trofozoítos fueron incubados 3 h a 37°C en estas condiciones, al cabo de lo cual fueron lisados en buffer Laemmli. Para la condición de sobrecrecimiento, se dejó a los trofozoítos sin cambiar el medio de cultivo durante 24 h más antes de proceder al lisado. Los lisados fueron posteriormente sometidos a SDS-PAGE en condiciones no reductoras, y la VSP TSA417 se detectó por Western blot utilizando el mAb 7C2. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.13 B. Sólo se observó la formación de dímeros de TSA417 en la condición de sobrecrecimiento, posiblemente debido al agotamiento de la capacidad reductora del medio de cultivo. Ninguna de las otras condiciones de estrés ensayadas produjo la dimerización de TSA417, sugiriendo que este proceso ocurriría de manera espontánea por acción del agente oxidante directamente sobre la molécula.

Por otra parte, hemos visto que el oxígeno atmosférico es suficiente para producir la dimerización de TSA417, ya que en los Western blots realizados a partir de trofozoítos de este clon crecidos en condiciones normales sólo muestran la banda correspondiente al dímero si los trofozoítos son enfriados para despegar y lavados en PBS (no desgasificado) previo al lisado. Por esta razón todos los lavados previos a las lisis celulares en los experimentos anteriores se realizaron utilizando PBS previamente purgado con nitrógeno para los lavados.

La capacidad del H₂O₂ de formar puentes disulfuro entre proteínas ha sido reportada en otros modelos. Sin embargo, para verificar que este agente oxidante es suficiente para inducir la formación de puentes disulfuro en las VSPs, se estudió su efecto sobre proteínas recombinantes purificadas. Dado que la VSP TSA417 no ha podido ser producida de manera recombinante hasta el momento, se utilizó la VSP1267 producida en células de insecto⁶². Habiendo determinado que la VSP1267 en su estado nativo no dimeriza por estrés oxidativo (Figura 4.13 A), la proteína fue reducida mediante tratamiento con ácido ascórbico y posteriormente dializada contra PBS. Alícuotas de 0,2 µg de proteína fueron tratadas con diferentes concentraciones de H₂O₂ en un volumen final de 70 µl de PBS pH 6 durante 2 h a 4°C. Posteriormente dichas alícuotas se dividieron en dos volúmenes iguales, uno de los cuales se trató con buffer de siembra Laemmli sin β-mercaptoetanol y se calentó 5 min a 60°C antes de la siembra, el otro se trató con buffer de siembra Laemmli con 5% de β-mercaptoetanol y se calentó 5 min a 100°C antes de la siembra. Cada una de estas muestras fue sembrada en dos geles de poliacrilamida 10% (se sembró la mitad del volumen en cada gel, es decir 0.5 µg de proteína) de los cuales uno fue teñido con azul de coomasie y el otro fue sometido a Western blot utilizando el mAb 7F5. Los resultados se muestran en la Figura 4.13 C. Como puede observarse, el tratamiento con H₂O₂ a concentraciones de entre 2.5 a 100 mM produce un cambio en la movilidad electroforética de la VSP1267 hacia menores pesos moleculares aparentes respecto del control no tratado. La reducción de estas muestras

con β -mercaptoetanol las restituye a los mismos pesos moleculares que el control, indicando que el corrimiento en el peso molecular aparente está causado por la formación de puentes disulfuro intracatenarios generados por el tratamiento con H_2O_2 . Por otra parte, mediante Western blot puede observarse que las proteínas tratadas con H_2O_2 no son reconocidas por el mAb 7F5. La reducción de las mismas restituye la capacidad de unión a dicho anticuerpo, indicando que la formación de estos puentes disulfuro intracatenarios producen estructuras diferentes a la estructura nativa, en las que el epítipo reconocido por el mAb 7F5 queda enmascarado.

Estos resultados muestran por primera vez que las VSPs de *Giardia*, además de tener diferentes propiedades antigénicas y de resistencia a enzimas digestivas^{3,130}, presentan diferentes comportamientos ante el estrés redox debido, posiblemente, a diferencias en la configuración de los múltiples motivos CXXC presentes en el dominio extracelular variable de las mismas y en el número y localización de los residuos de cisteína libres.

Habiendo demostrado que el tratamiento con H_2O_2 es capaz de inducir la dimerización de la VSP TSA417, nos avocamos a analizar la posibilidad de que este proceso pueda disparar la VA, tal como lo hacen los anticuerpos anti-VSP. Dado que los trofozoítos de *Giardia* crecen normalmente en un medio de cultivo altamente reductor^{125,126}, el efecto del H_2O_2 en la VA sólo puede estudiarse mediante pulsos y no de manera constante en el medio como en el caso de los anticuerpos. Poblaciones de 2×10^5 trofozoítos de *Giardia* clon TSA417 fueron tratadas con diferentes concentraciones de H_2O_2 (10, 20, 40 y 80 μM) en PBS durante 5 min a 37°C luego de lo cual se pusieron a crecer en condiciones normales durante 72 h. Al cabo de este tiempo, el porcentaje de trofozoítos expresando la TSA417 se cuantificó por citometría de flujo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.14 A. Las concentraciones de 40 y 80 μM de H_2O_2 resultaron tóxicas en las condiciones ensayadas, por lo que sólo se muestra el efecto de los tratamientos con 10 y 20 μM de H_2O_2 . Para el tratamiento con 10 μM de H_2O_2 no se observaron diferencias significativas respecto del control. Por otra parte, el tratamiento con 20 μM de H_2O_2 genera una disminución en el porcentaje de células expresando la VSP original, lo que podría sugerir un efecto de inducción de la VA por el H_2O_2 . Si bien esta disminución en el porcentaje de células expresando la TSA417 es relativamente pequeño, es comparable a la disminución inducida por un pulso de mAb 7C2 sobre el mismo clon (Figura 3.2).

Considerando que la inducción efectiva de la VA se logra con estimulación constante de las células durante varias generaciones, decidimos intentar reproducir un estrés oxidativo constante durante el crecimiento de los trofozoítos TSA417. Dada la imposibilidad de utilizar H_2O_2 por su inestabilidad e incompatibilidad con el medio de cultivo de *Giardia*, optamos por crecer los trofozoítos en condiciones más aeróbicas, utilizando un medio menos reductor (sin agregado de ácido ascórbico) y en presencia de una atmósfera de aire (llenando los tubos hasta la mitad). Poblaciones de 5×10^4 trofozoítos TSA417 fueron crecidas en estas condiciones y paralelamente, poblaciones del mismo clon se crecieron en condiciones normales (anaeróbicas en presencia de ácido ascórbico). Cada 24 h los tubos bajo tratamiento oxidante se abrieron en campana de cultivo para recambiar la atmósfera de aire. Al cabo de 72 h de cultivo, se contó el porcentaje de trofozoítos expresando TSA417 por citometría de flujo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.14 B. Sorprendentemente, el porcentaje de trofozoítos expresando la VSP original al cabo de 72 h en condiciones oxidantes resultó ser mayor que el control.

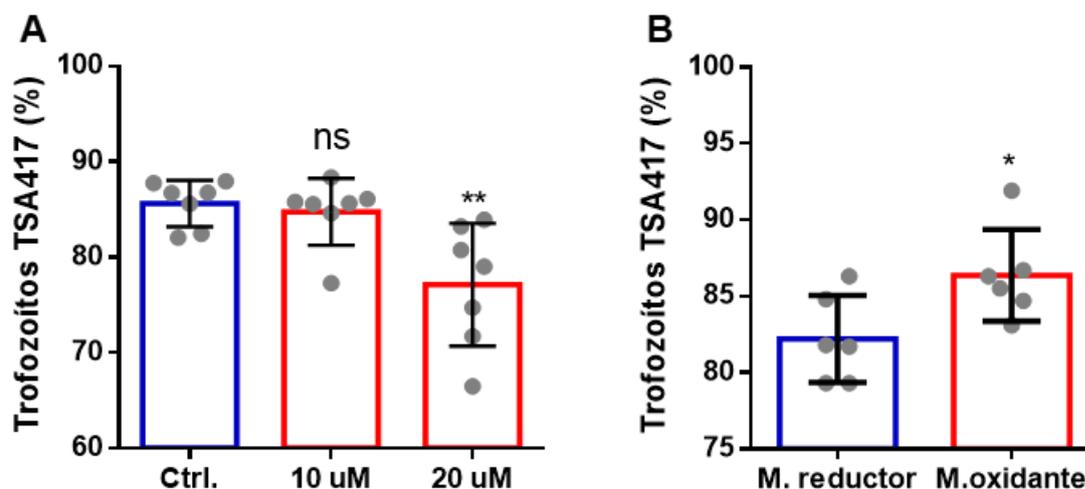


Figura 4.14: Efecto del estrés oxidativo en la VA de *G. lamblia*. (A) Porcentaje de trofozoítos expresando la VSP TSA417 a las 72 h de cultivo en condiciones normales luego de un pulso de H₂O₂ (concentraciones indicadas). El control corresponde a trofozoítos no tratados. (B) Porcentaje de trofozoítos expresando la VSP TSA417 a las 72 h de cultivo en condiciones normales (medio de cultivo con ácido ascórbico en anaerobiosis), indicado como “medio reductor” (M. reductor) o en condiciones oxidantes (medio de cultivo sin ácido ascórbico en aerobiosis), indicado como “medio oxidante” (M. oxidante). *, p<0,05; **, p<0,001, ns, diferencia no significativa (p>0,05).

Una posible explicación del aumento en el porcentaje de células TSA417 en condiciones de crecimiento más oxidantes podría ser que estaría ocurriendo un proceso de selección de células expresando la VSP TSA417, respecto de las que expresan otras VSPs en la misma población. Dado que TSA417 tiene la capacidad de reaccionar frente al agente oxidante, se podría esperar que las células expresando esta VSP tengan mayor resistencia al estrés oxidativo. De hecho, hemos observado que durante las infecciones experimentales en jerbos utilizando poblaciones mixtas compuestas en un 50% por trofozoítos TSA417 y en otro 50% por trofozoítos VSP1267, ocurren procesos de selección que llevan a la eliminación de los parásitos que expresan la VSP1267 y su reemplazo por una población prácticamente compuesta en un 100% por trofozoítos expresando la VSP TSA417 hacia los 7 dpi, antes del surgimiento de la respuesta inmune adquirida (Ríos, D.N.; Tesis doctoral, 2021⁷⁴).

4.6. Conclusiones parciales.

Los resultados presentados en el presente capítulo, confirman el rol de las VSPs como sensores de señales extracelulares. Dicha función no ha sido descrita previamente para esta familia de proteínas. La capacidad señalizadora de las VSPs reside en su extremo C-terminal conservado, el cual contiene un TMD capaz de dimerizarse gracias a los motivos GAS_{right} presentes en el mismo. Mediante ensayos de estimulación con pulsos de mAbs completos y fragmentos Fab correspondientes, se determinó que el grado de entrecruzamiento o aglutinación de las VSPs en la superficie de los parásitos favorece la inducción de la VA. Dado que la fuerza de interacción entre los TMD de las VSPs es relativamente débil comparada con el TMD canónico de la GpA (el cual tiene una función estructural), es posible que el estado de dimerización de los mismos se encuentre en un equilibrio, el cual sería desplazado hacia la formación de dímeros mediante el entrecruzamiento producido por los anticuerpos.

Por otra parte, la capacidad raftofílica de las VSPs ha sido previamente reportada y atribuida a la palmitoilación de las mismas en el residuo de cisteína del tallo citoplasmático³³. Nuestros resultados complementan y amplían esta observación al demostrar que la interacción con anticuerpos incrementa la raftofilicidad de las VSPs con importantes

consecuencias fisiológicas para los parásitos. Esto apunta a un modelo de señalización según el cual las VSPs estarían en un equilibrio dinámico de dimerización y localización fluctuante entre las fases ordenadas (*lipid rafts*) y desordenadas de la membrana plasmática. La interacción con anticuerpos provocaría la dimerización de sus TMDs con el consiguiente aumento de la raftofilicidad, lo que llevaría a la estabilización temporal de *lipid rafts* en estructuras de mayor tamaño. Este proceso estaría acompañado por cambios locales en la topología de la cara interna de la membrana, que junto con un incremento en los niveles de PI(4,5)P₂ y PI(3,4,5)P₃, reclutaría efectores citoplasmáticos específicos necesarios para la transmisión de la señal.

La capacidad de algunas VSPs de responder al estrés redox resalta la capacidad de las mismas de responder a otro tipo de señales del ambiente además de los anticuerpos. Nuestros resultados muestran que las distintas VSPs responden de manera diferente al estrés oxidativo, pudiendo o no formar multímeros mediante puentes disulfuro intercatenarios. Esta capacidad variable de las VSPs, les confiere una resistencia diferencial a los trofozoítos frente al estrés oxidativo. Al parecer, una VSP capaz de reaccionar frente al agente oxidante (como la TSA417) otorga mayor resistencia al trofozoíto frente a este tipo de estrés, que otra VSP incapaz de reaccionar frente al mismo agente estresor como ha quedado demostrado mediante ensayos *in vitro* de resistencia a pulsos de diferentes dosis de H₂O₂⁷⁴. El mismo fenómeno de selección de células TSA417 por sobre las VSP1267 se observó *in vivo* (Ríos, D.N.; Tesis doctoral, 2021⁷⁴). Una causa posible de este efecto podría ser la respuesta inmunológica innata del hospedador, particularmente la liberación de agentes oxidantes. Sin embargo, el efecto de otros factores no puede ser descartado.

CAPÍTULO 5

Mecanismos involucrados en el recambio de las VSPs durante el proceso de variación antigénica disparada por anticuerpos.

5. CAPÍTULO 5: Mecanismos involucrados en el recambio de las VSPs durante el proceso de VA disparada por anticuerpos.

Habiendo demostrado la falta de citotoxicidad de anticuerpos anti-VSP en trofozoítos de *G. lamblia*, surge la pregunta de cómo se da el recambio de las VSPs unidas a anticuerpo en la superficie del trofozoíto. Si bien la inducción de la VA por anticuerpos no ha sido demostrada en ningún otro protozooario parásito hasta la fecha, el fenómeno de recambio de proteínas de superficie unidas a anticuerpos ha sido estudiado en *Entamoeba histolytica* y *Trypanosoma brucei* y se ha propuesto que dichos procesos constituyen un mecanismo de evasión de la respuesta inmune adaptativa, al eliminar los anticuerpos unidos a su superficie, evitando hasta cierto punto la opsonización y los sucesivos procesos inmunológicos del hospedador para eliminar estos parásitos^{121,131,132}.

En *E. histolytica* se ha reportado que el tratamiento de trofozoítos con suero de pacientes infectados con el parásito produce la aglutinación de receptores de superficie en parches o microdominios, los cuales son dirigidos y concentrados en el polo posterior de la célula donde se forma una estructura característica conocida como uroide. Esta redistribución de los antígenos de superficie hacia el polo posterior de las células se conoce en general como *capping*. Desde estas estructuras llamadas *caps*, los antígenos unidos a anticuerpo son liberados al medio¹²¹.

En *Trypanosoma brucei*, por otra parte, se ha demostrado que las fuerzas hidrodinámicas generadas por el nado del parásito crean una corriente que hace que los anticuerpos unidos a la superficie actúen como "velas moleculares". En consecuencia, las fuerzas hidrodinámicas barren los complejos antígeno-anticuerpo hacia la parte posterior de la célula, donde se internalizan a través del bolsillo flagelar y se degradan¹³³.

En el caso de *Giardia*, si bien se ha reportado que las VSPs podrían ser cortadas proteolíticamente a nivel de la membrana plasmática y liberadas al medio en condiciones fisiológicas normales¹³⁴, no existen evidencias concretas en este sentido. Por otra parte, el efecto de los anticuerpos en este proceso no ha sido estudiado, principalmente por ser considerados citotóxicos.

5.1. Estudio de los cambios en la localización subcelular de los complejos VSP-anticuerpo luego de la inducción del *switching*.

Para indagar en el proceso de recambio de las VSPs unidas a anticuerpo durante el proceso de *switching*, se procedió en primera instancia a estudiar el destino de las VSPs unidas a anticuerpo mediante un ensayo de inmunofluorescencia. Clones de *G. lamblia* que expresan las VSPs TSA417 y 9B10 fueron tratados con los respectivos anticuerpos anti-VSP. En el caso del clon que expresa la VSP TSA417 se utilizó el mAb 7C2 en una concentración final de 2,5 nM. Para el clon que expresa la VSP 9B10 se utilizó suero policlonal en una dilución de 1/100. El tratamiento se realizó durante 1 h en frío, permitiendo la unión de los anticuerpos a sus respectivos antígenos, pero bloqueando los mecanismos de transporte intracelular y disminuyendo el metabolismo celular. Luego del tratamiento, las células fueron lavadas con PBS para eliminar todo exceso de anticuerpo, resuspendidas en medio de cultivo e incubadas a 37°C durante 0, 30, 60 y 120 min para así analizar el destino solo de las VSPs en superficie que fueron "activadas" por el anticuerpo. Al finalizar cada tiempo de incubación, los trofozoítos fueron lavados con PBS y fijados con paraformaldehído 4% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente, deteniendo cualquier proceso que defina el destino de las mismas. El ensayo de inmunofluorescencia para detectar la localización subcelular de los complejos VSP-anticuerpo se realizó sin permeabilizar las células, marcando directamente con anticuerpo secundario anti-mouse marcado con el fluoróforo Alexa 488 (verde). Para poder visualizar la totalidad de las VSPs de la superficie celular (es decir, las que no habían sido marcadas inicialmente), se realizó luego una segunda incubación con anticuerpo primario, pero ahora seguido de anticuerpo secundario anti-mouse unido a Alexa 546 (rojo).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.1 A-B, donde puede observarse que para ambas VSPs analizadas (9B10 y TSA417) la marca es homogénea en la superficie celular inmediatamente después del tratamiento con los anticuerpos anti-VSP correspondientes. Sin embargo, hacia los 30 y 60 min posteriores al tratamiento, los complejos VSP-anticuerpo se segregan del resto de las VSPs no unidas a anticuerpo y se agrupan en microdominios. Estas agrupaciones de VSP unidas a anticuerpo están distribuidas por toda la superficie del trofozoíto como puede observarse con mayor resolución en la Figura 5.2, aunque se presentan con mayor frecuencia en grandes agrupaciones en la parte caudal de los mismos, especialmente en las células 9B10 tratadas con suero policlonal (Figura 5.1 A). Hacia los 120 min post-tratamiento no se observa presencia de complejos VSP-anticuerpo en la superficie de las células y la intensidad de la fluorescencia en toda la superficie de los trofozoítos es casi imperceptible (en comparación a los 0 min), indicando que el recambio de las VSPs unidas a anticuerpo específico fue completo.

Estos microdominios de VSPs unidas a anticuerpo también se observaron durante el *switching* de células TSA417 en presencia constante de mAb 7C2 (Figura 3.6). En estos casos se observa una distribución heterogénea de la VSP original (TSA417) en la superficie del trofozoíto y mayormente concentrada en estructuras que parecen extenderse desde la membrana plasmática. Por otra parte, la nueva VSP presenta una distribución más homogénea en la superficie.

5.2. Estudio del rol de la capacidad aglutinante de los anticuerpos en el recambio de las VSPs.

Dado que el entrecruzamiento de las VSPs mediada por anticuerpos en la superficie de las células favorece la inducción de la VA, decidimos indagar acerca de si la misma tiene un rol en el recambio de las VSPs durante este proceso.

Para evaluar el rol de la aglutinación mediada por anticuerpos en el proceso de recambio de las VSPs, se realizó un ensayo similar al del punto anterior con clones que expresan la VSP TSA417, pero ahora tratándolos solo con los fragmentos Fab del anticuerpo monoclonal 7C2.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.1 C, donde se observa una distribución homogénea de los complejos VSP TSA417-Fab7C2 en todos los tiempos post-inducción ensayados. La presencia de estos complejos aún a los 120 min luego del tratamiento, y la ausencia de formación de microdominios en la superficie celular indican que la aglutinación de las VSPs mediada por anticuerpos tiene un rol en el recambio de las mismas durante el *switching*.

5.3. Estudio a nivel ultraestructural de los microdominios de membrana formados durante el recambio de los complejos VSP-anticuerpo.

Mediante microscopía de fluorescencia pudimos determinar que las VSPs, luego de unirse a anticuerpos específicos, se agrupan en microdominios de membrana dispersos de manera aparentemente aleatoria en la superficie celular antes de ser totalmente eliminados de la membrana hacia las 2 h post-tratamiento.

Para profundizar el estudio del mecanismo de recambio de las VSPs unidas a anticuerpo, se procedió a realizar estudios ultraestructurales de los microdominios de membrana formados durante el recambio de los complejos VSP-anticuerpo mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM).

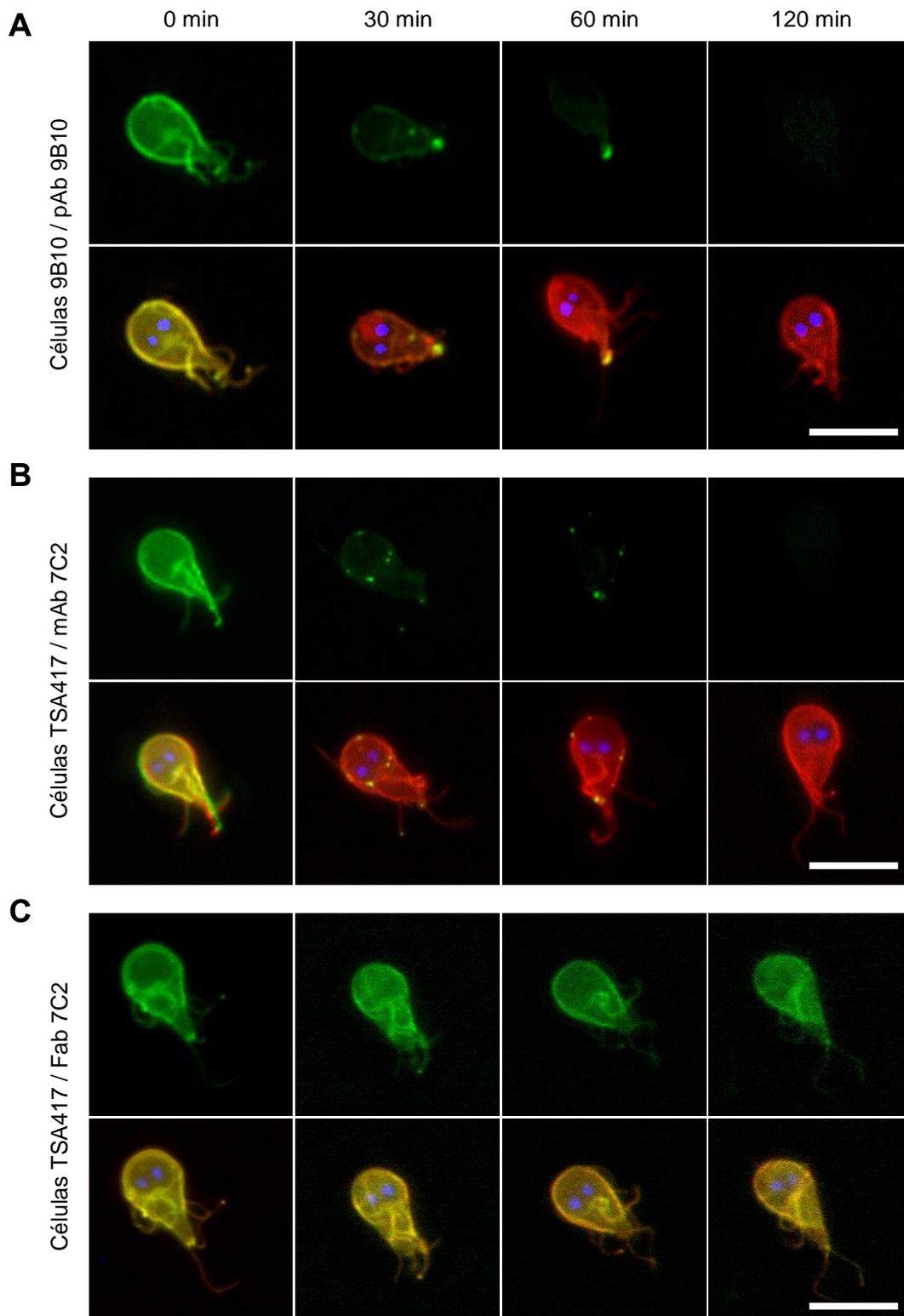


Figura 5.1: Cambios en la localización subcelular de los complejos VSP-anticuerpo en el tiempo. Trofozoítos de *Giardia* fueron tratados con anticuerpos en frío y luego crecidos en condiciones normales. El destino de las VSPs unidas a anticuerpo se siguió en el tiempo mediante IFI con anticuerpo secundario unido a Alexa 488 (verde, fila superior de cada panel). Sobre las mismas células, un segundo ensayo de IFI con el mismo anticuerpo primario pero un anticuerpo secundario unido a Alexa 546 muestra la totalidad de las VSPs superficiales (rojo, se muestra en la fila inferior superpuesta a la imagen de la fila superior de cada panel). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. (A) Trofozoítos 9B10 tratados con suero policlonal anti-VSP9B10 dilución 1:100. (B) Trofozoítos TSA417 tratados con mAb 7C2 2,5 nM. (C) Trofozoítos TSA417 tratados con Fab 7C2 5 nM. Barra de escala: 10 μ m.

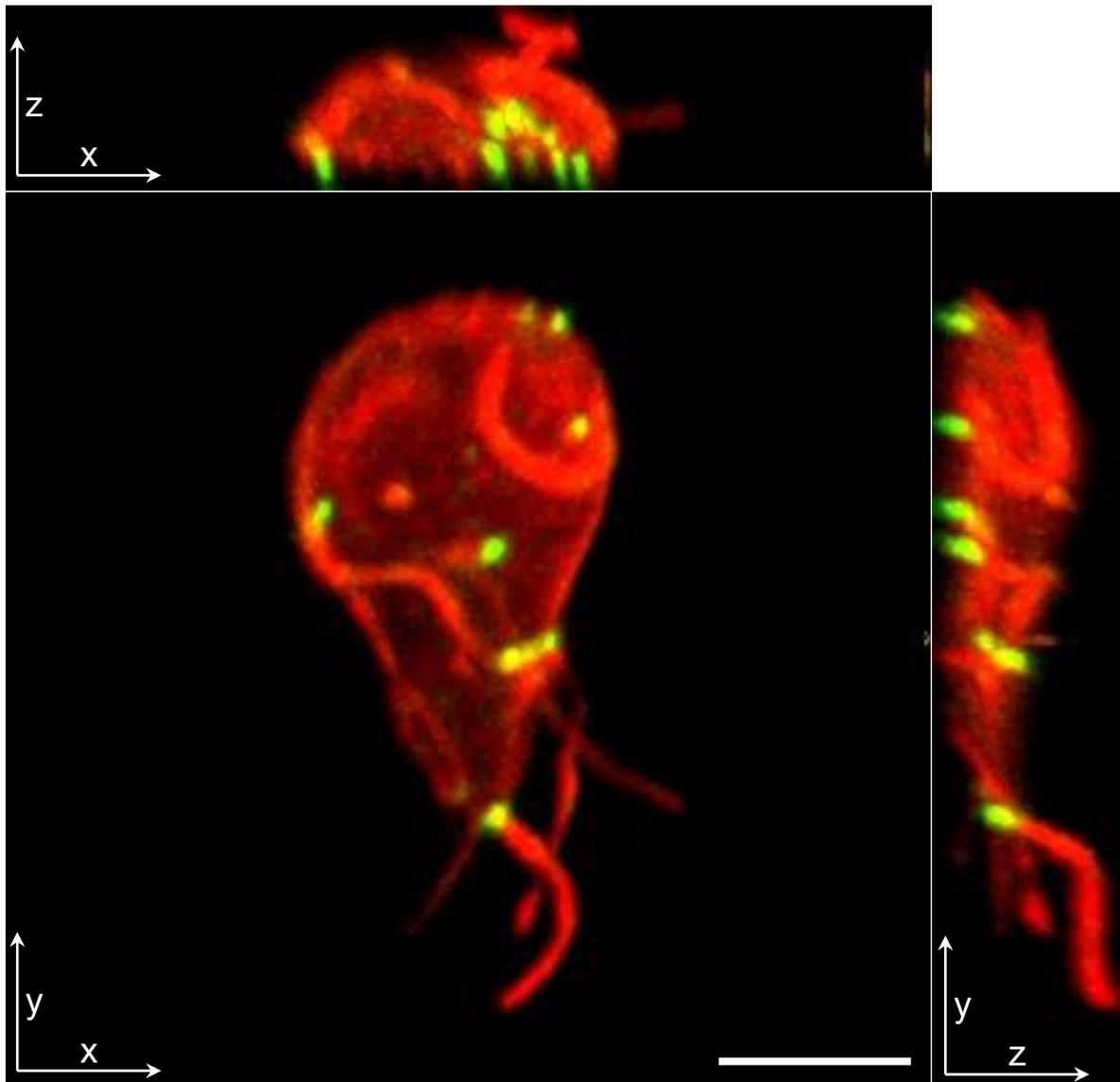


Figura 5.2: Microdominios observados durante el recambio de las VSPs unidas a anticuerpo. Trofozoíto TSA417 luego de 1 h post-tratamiento con mAb 7C2. Proyecciones de máxima intensidad sobre los tres ejes ortogonales (indicados en cada caso) a partir de imágenes tomadas en Z-stack mediante microscopía confocal. En verde se muestran los microdominios de VSP TSA417 unida a anticuerpo y en rojo las VSP TSA417 libres. Barra de escala: 5 μm .

Para los estudios de ultraestructura se utilizaron trofozoítos de *G. lamblia* del ensamblaje A1 (clones que expresan las VSP 1267, TSA417 y 9B10), y del ensamblaje B (clon que expresa la VSP H7). Los mismos fueron tratados en frío con sus respectivos anticuerpos anti-VSP durante 1 h. Para los clones que expresan la VSP1267 y la VSP TSA417 se utilizaron los mAbs purificados 7F5 y 7C2 respectivamente, en una concentración de 4 nM. Para los clones que expresan la VSP 9B10 y la VSP H7 se utilizaron mAbs provenientes de fluido ascítico en una dilución de 1/1500. Luego del tratamiento los trofozoítos fueron lavados para eliminar todo exceso de anticuerpo no unido, resuspendidos en medio de cultivo e incubados a 37°C durante 15, 30, 60 y 120 min. Al finalizar cada tiempo de incubación, los trofozoítos fueron lavados, fijados, marcados con anticuerpo secundario unido a partículas de oro de 10 nm y preparados para microscopía electrónica de barrido y de transmisión según se detalla en la sección de Materiales y Métodos.

En la Figura 5.3 se muestran imágenes representativas de trofozoítos de *G. lamblia* del clon que expresa la VSP H7 no tratados con anticuerpos y marcados con mAb G10/4

post-fijación (control) obtenidas por SEM. Se utilizó un detector de electrones secundarios convencional para obtener la imagen tridimensional de la superficie celular con buena resolución, y acoplado a éste, un detector de electrones retrodifundidos (detector *backscatter*) que permite obtener contrastes en función del número atómico de los elementos, y por lo tanto distinguir las partículas de oro (alto número atómico) del resto del material orgánico (bajos números atómicos). Las imágenes de electrones secundarios (Figura 5.3 A, C y E) y de *backscatter* (Figura 5.3 B, D y F) fueron tomadas en simultáneo haciendo posible la visualización de las estructuras con buena resolución, al tiempo que permiten la localización de las partículas de oro en estas estructuras (que se visualizan como puntos blancos). En dichas imágenes puede observarse la morfología típica del trofozoíto, con una densa marcación de oro (VSPs) homogéneamente distribuida en toda la superficie del mismo, incluidos los flagelos.

En la Figura 5.4 se muestran imágenes representativas de trofozoítos (clon VSPH7) fijados a distintos tiempos post-tratamiento con el mAb G10/4. Las Figuras 5.4 A y C corresponden a las imágenes de trofozoítos a los 30 min luego del tratamiento con mAb G10/4 obtenidas mediante detector de electrones secundarios. Las respectivas imágenes obtenidas por detector *backscatter* se muestran a la derecha en las Figuras 5.4 B y D. Las Figuras 5.4 E y F son representativas de trofozoítos a los 60 min post-tratamiento. En estas imágenes puede observarse la aparición de protrusiones en diferentes partes de la membrana celular (Figuras 5.4 A, C y E, indicadas con una flecha), las cuales están densamente marcadas con oro (Figuras 5.4 B, D y F). Por otra parte, se puede observar que la densidad de marcación en el resto de la superficie celular es menor respecto del control.

Mediante esta técnica puede observarse que luego de la unión a anticuerpos, las VSPs se aglutinan en estructuras protruyentes de la membrana plasmática. El patrón de distribución de las VSPs unidas a anticuerpo en los distintos tiempos post-tratamiento es coherente con lo observado previamente por microscopía de fluorescencia (Figuras 3.6, 5.1 y 5.2), indicando que los microdominios observados se corresponden con estas estructuras que protruyen de la membrana plasmática y están enriquecidas en VSPs unidas al anticuerpo.

Para obtener mayor detalle ultraestructural de estas proyecciones de membrana, se procedió a realizar microscopías electrónicas de transmisión a partir de las mismas muestras utilizadas para SEM. La Figura 5.5 corresponde a imágenes tomadas por TEM de las muestras de trofozoítos de *Giardia* clon TSA417 fijados a los 15 min (Figuras 5.5 A y B), 30 min (Figuras 5.5 C y D) y 60 min (Figuras E y F) post-tratamiento. En las mismas puede observarse la aparición de vesículas extracelulares, las cuales aumentan en número hacia los 60 min post tratamiento. Las mismas se encuentran aglutinadas en la superficie de los trofozoítos y están densamente marcadas con partículas de oro, lo que indica su enriquecimiento en VSPs unidas a anticuerpo. El mismo efecto se observó para el resto de los clones analizados (clon VSPH7, clon VSP1267 y clon VSP9B10) (Figura 5.6). El tamaño de las vesículas generadas por tratamiento de los trofozoítos con anticuerpo anti-VSP fue medido a partir de las imágenes de TEM, determinándose que oscila entre 60 y 200 nm, con un tamaño promedio de 107 nm (Figura 5.7). A pesar de que este rango de tamaños de las vesículas extracelulares podría corresponder tanto a exosomas como a microvesículas, el hecho de que las mismas estén marcadas con oro indica que se generan a partir de brotes desde la membrana plasmática, sugiriendo que se trata de microvesículas.

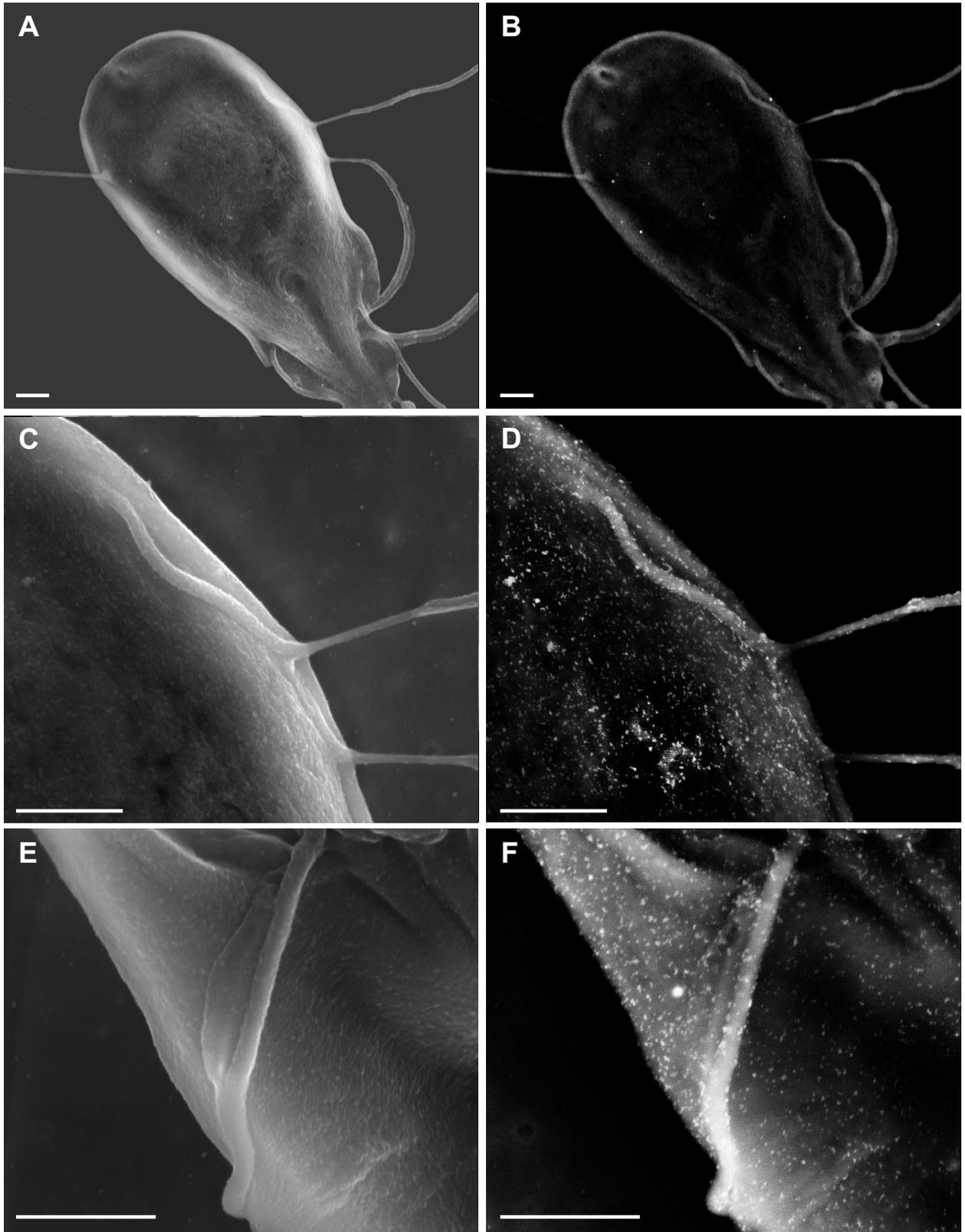


Figura 5.3: Microscopía electrónica de barrido (SEM) de trofozoítos no tratados con anticuerpos. Trofozoítos de *Giardia* ensamblaje B clon VSPH7 fueron fijados e inmunomarcados contra la VSP H7 utilizando el mAb G10/4 y anticuerpo secundario unido a partículas de oro de 10 nm. Las imágenes de la izquierda corresponden a las tomadas por el detector de electrones secundarios, mostrando mayor detalle de la superficie celular y las de la derecha corresponden a las tomadas por el detector *backscatter*, mostrando la distribución de las partículas de oro como puntos blancos en la superficie celular. Barra de escala: 1 μ m.

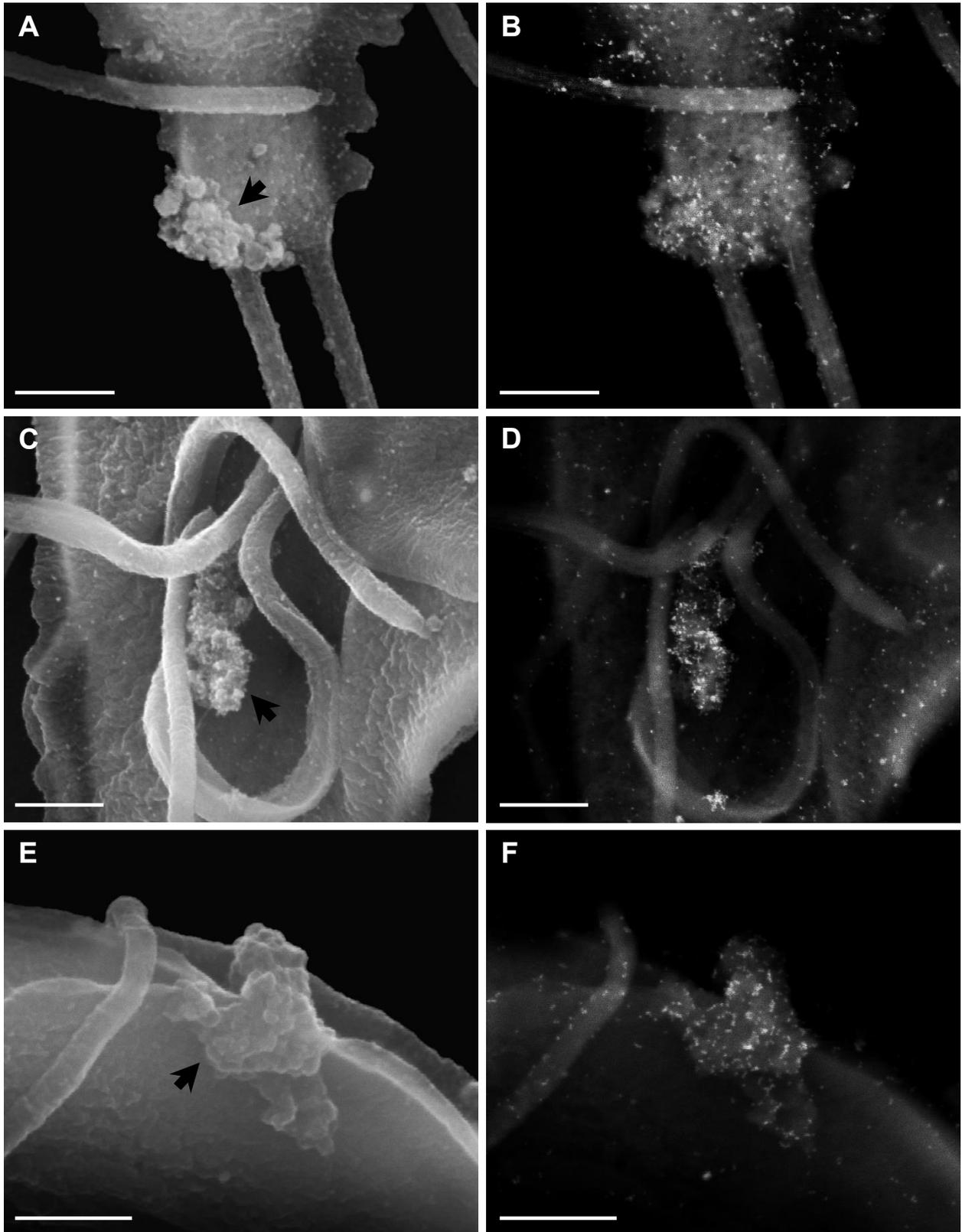


Figura 5.4: Microscopía electrónica de barrido (SEM) de trofozoítos tratados con anticuerpos anti-VSP. Trofozoítos de *Giardia* ensamblaje B, clon que expresa la VSP H7, fueron tratados con mAb G10/4 (dilución 1:1500), fijados a diferentes tiempos post-tratamiento e inmunomarcados utilizando anticuerpo secundario unido a partículas de oro de 10 nm. Las imágenes de la izquierda corresponden a las tomadas por el detector de electrones secundarios, y las de la derecha corresponden a las tomadas por el detector *backscatter*. (A-D) Trofozoítos fijados a los 30 min post-tratamiento. (E-F) Trofozoítos fijados a los 60 min post-tratamiento. Las flechas indican las estructuras protruyentes generadas por el tratamiento. Barra de escala: 0,5 μm .

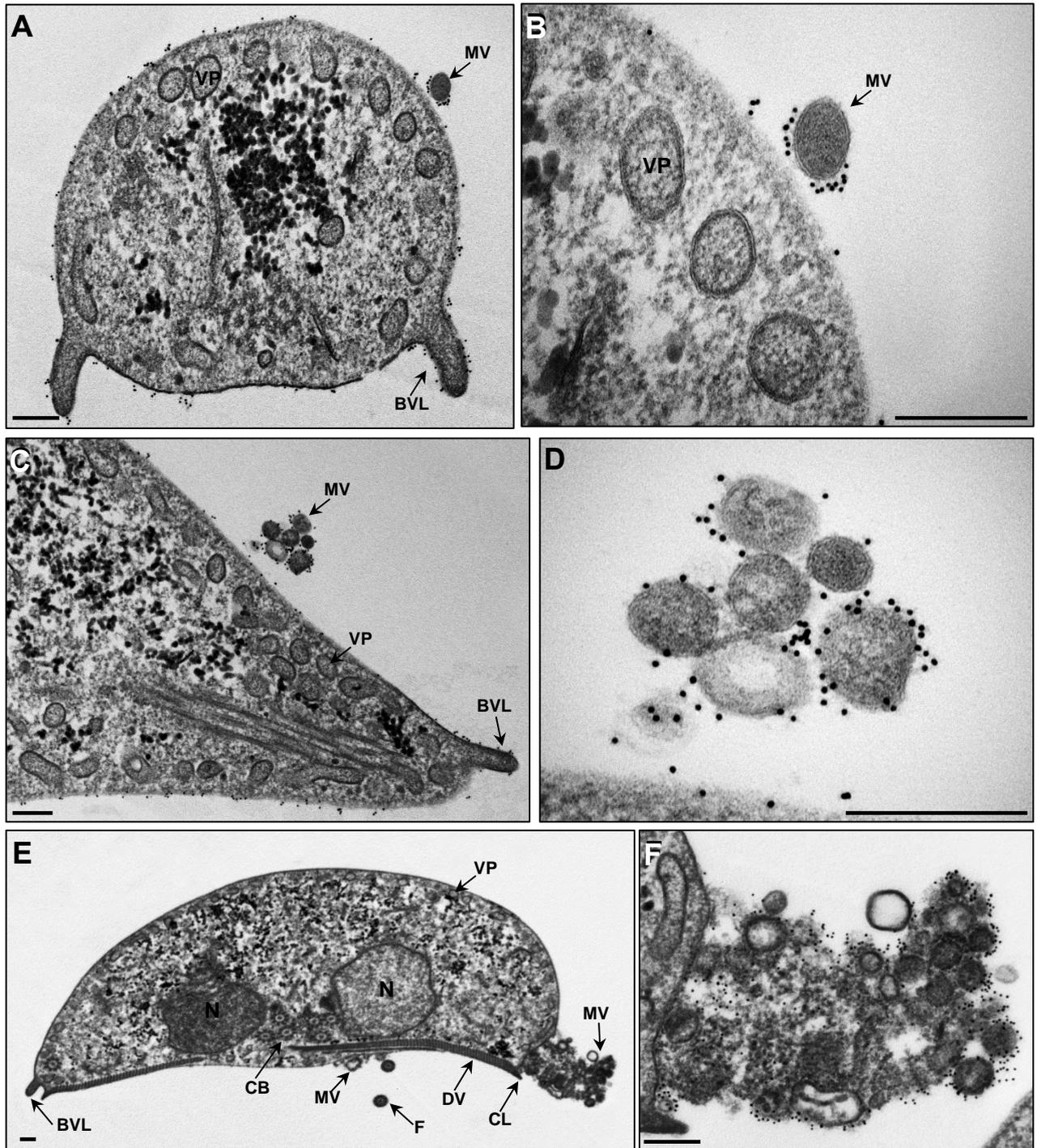


Figura 5.5: Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de trofozoítos TSA417 tratados con mAb 7C2. Trofozoítos de *Giardia* ensamblaje A1, clon que expresa la VSP TSA417, fueron tratados con mAb 7C2 (4 nM), fijados a diferentes tiempos post-tratamiento e inmunomarcados utilizando anticuerpo secundario unido a partículas de oro de 10 nm. Las imágenes de la derecha son ampliaciones de las imágenes correspondientes a la izquierda. Las partículas de oro se observan como puntos negros. (A-B) Trofozoítos fijados a los 15 min post-tratamiento. (C-D) Trofozoítos fijados a los 30 min post-tratamiento. (E-F) Trofozoítos fijados a los 60 min post-tratamiento. BVL, borde ventro-lateral; CB, cuerpos basales; CL, cresta lateral; DV, disco ventral; F, flagelo; MV, microvesículas; N, núcleo; VP, vesículas periféricas. Barra de escala: 250 nm

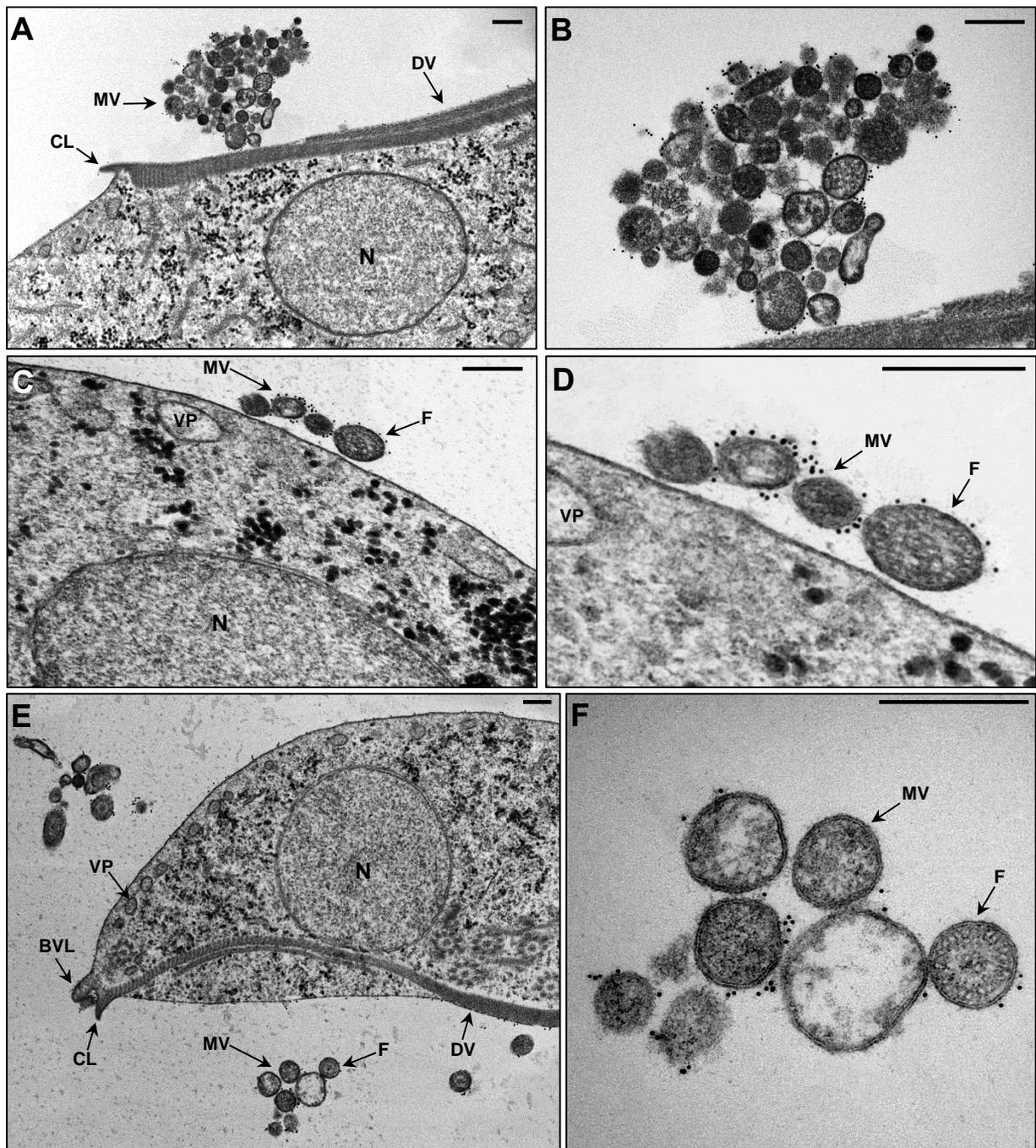


Figura 5.6: Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de trofozoítos de diferentes clones tratados con anticuerpos anti-VSP. Trofozoítos de *Giardia* expresando diferentes VSPs fueron tratados con sus respectivos mAbs, fijados a los 60 min post-tratamiento e inmunomarcados utilizando anticuerpo secundario unido a partículas de oro de 10 nm. Las imágenes de la derecha son ampliaciones de las imágenes correspondientes a la izquierda. Las partículas de oro se observan como puntos negros. (A-B) Trofozoítos de *Giardia* ensamblaje B, clon que expresa la VSP H7, tratado con mAb G10/4 (dilución 1:1500). (C-D) Trofozoítos de *Giardia* ensamblaje A1, clon que expresa la VSP 1267, tratado con mAb 7F5 (4 nM). (E-F) Trofozoítos de *Giardia* ensamblaje A1, clon que expresa la VSP 9B10, tratado con mAb 9B10 (dilución 1:1500). BVL, borde ventro-lateral; CL, cresta lateral; DV, disco ventral; F, flagelo; MV, microvesículas; N, núcleo; VP, vesículas periféricas. Barra de escala: 250 nm

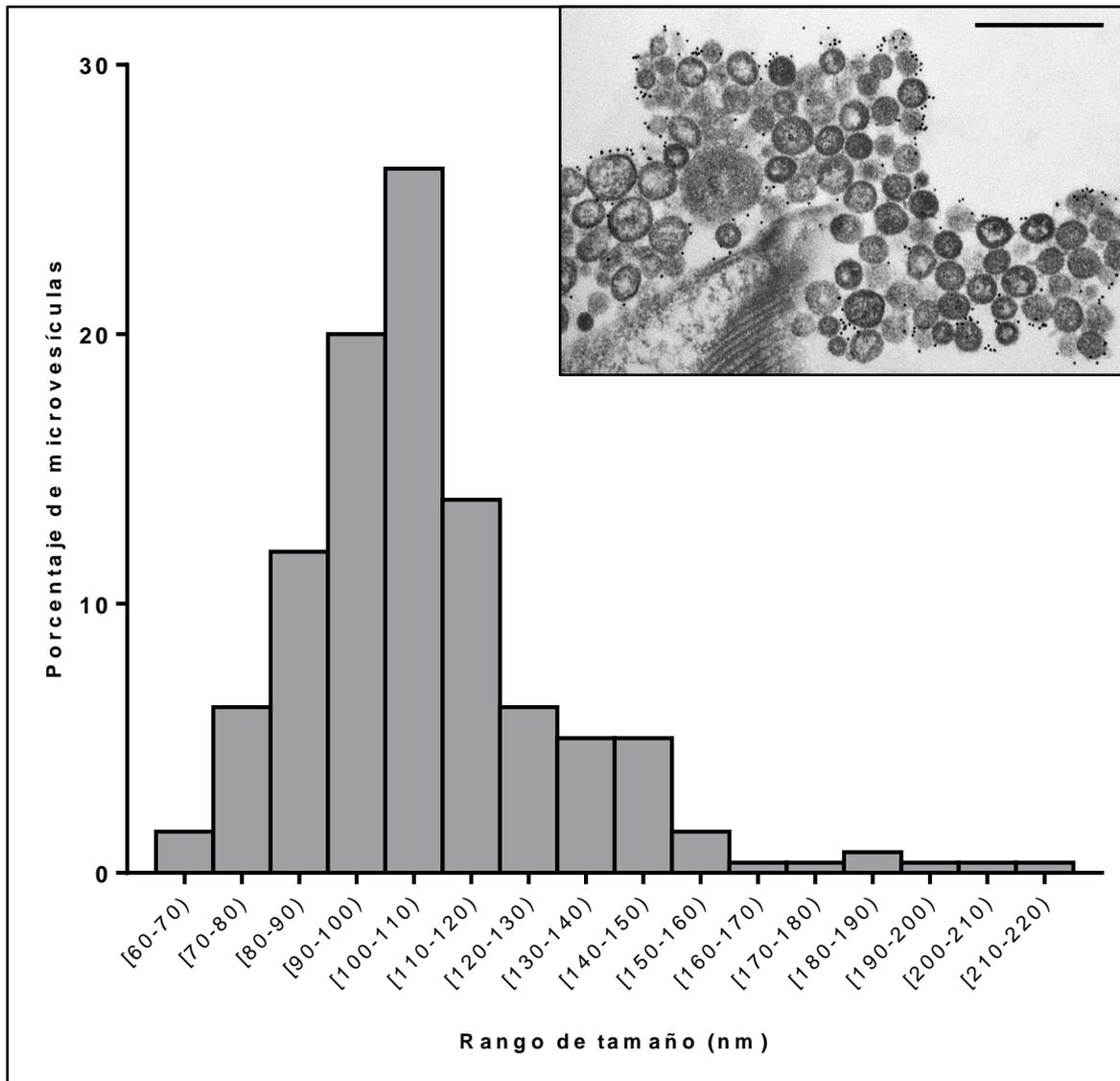


Figura 5.7: Distribución de tamaños de las microvesículas liberadas por *Giardia* en respuesta a anticuerpos. Histograma mostrando la distribución de tamaños de las microvesículas en porcentaje respecto del total. El tamaño se midió a través del diámetro de las mismas utilizando el *software* ImageJ, a partir de imágenes obtenidas por TEM (se muestra una imagen representativa). Barra de escala: 0,5 μm.

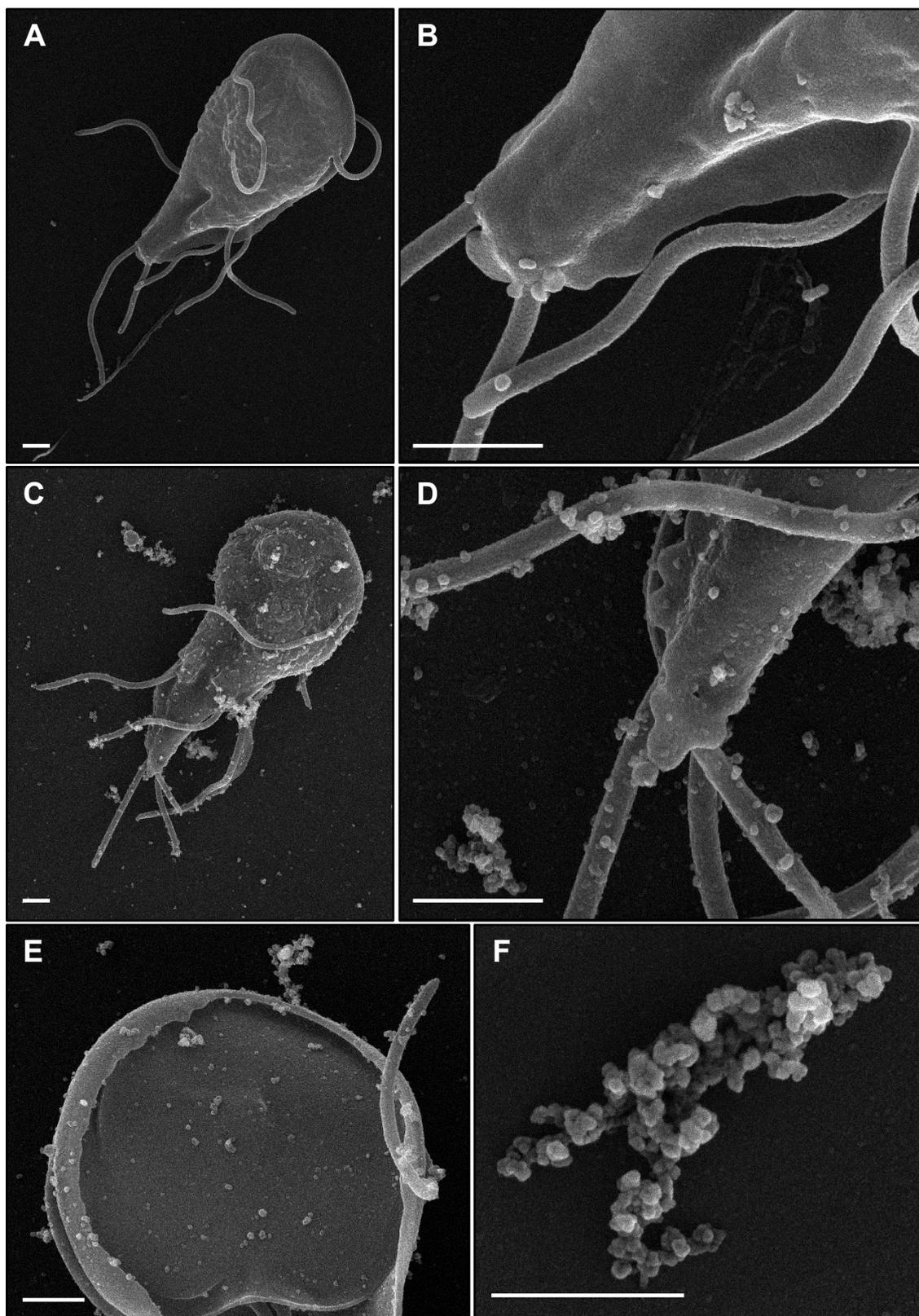


Figura 5.8: Microscopía electrónica de barrido de alta resolución (HR-SEM) de trofozoítos que expresan la VSP TSA417 tratados con mAb 7C2. (A-B) Trofozoítos sin tratar con anticuerpo. La foto B es una ampliación de una región de A. (C-E) Trofozoítos tratados con mAb 7C2 (4 nM) durante 60 min antes de la fijación. La foto D es una ampliación de una región de C. (F) Microvesículas aglutinadas desprendida de los trofozoítos tratados. Barra de escala: 1 μ m.

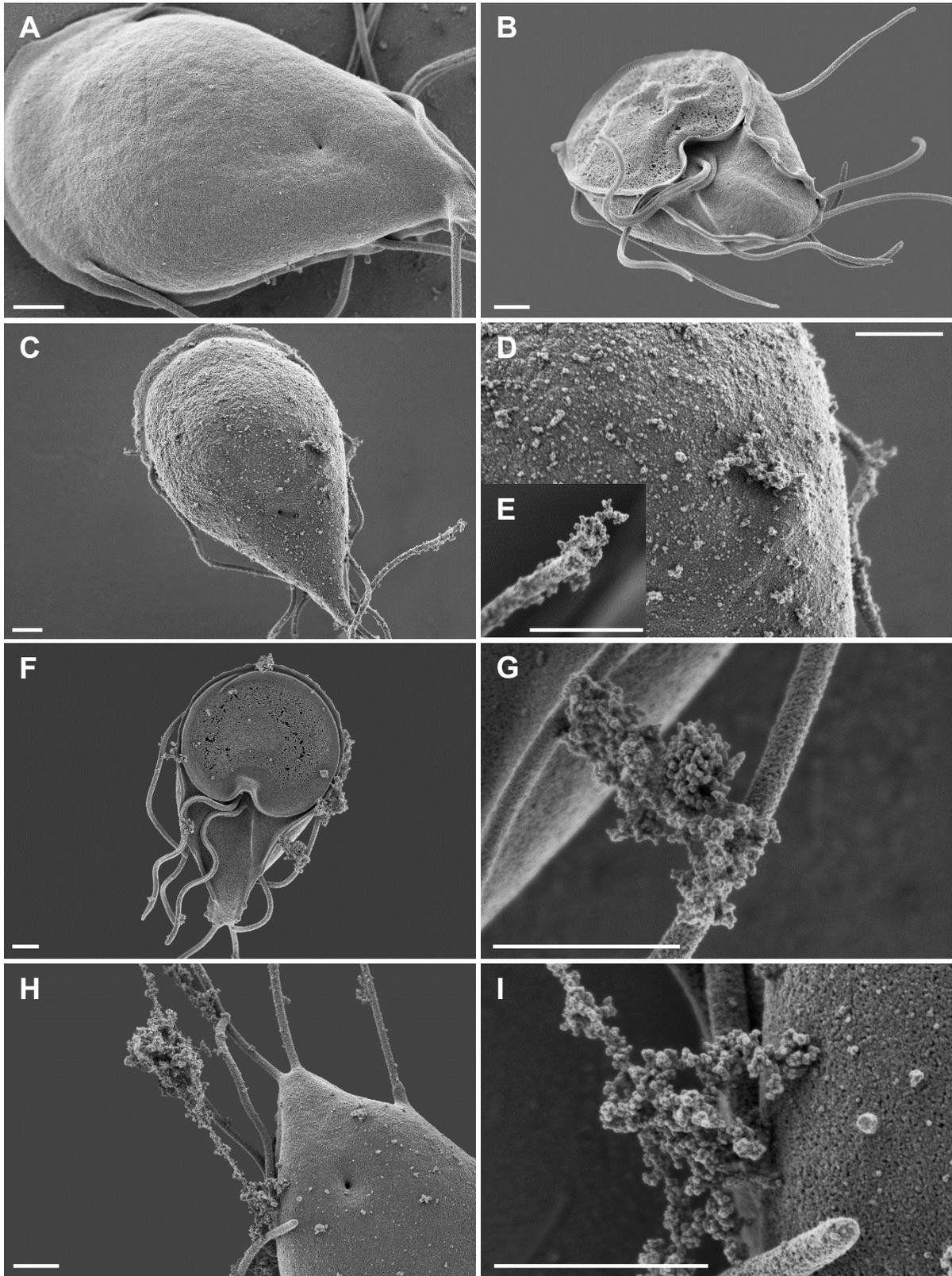


Figura 5.9: Microscopía electrónica de barrido de alta resolución (HR-SEM) de trofozoítos que expresan la VSP TSA417 sometidos a estrés oxidativo. Trofozoítos fueron tratados con H_2O_2 $10 \mu\text{M}$ durante 10 min y puestos a recuperar en medio de cultivo durante diferentes períodos de tiempo antes de su fijación. (A-B) Trofozoítos no tratados. (C-E) Trofozoítos fijados a los 15 min post-tratamiento. Las figuras D y E son ampliaciones de distintas regiones de C. (F-I) Trofozoítos fijados a los 30 min post-tratamiento. La imagen G es una ampliación de una región de F, e I es una ampliación de H. Barra de escala: $1 \mu\text{m}$

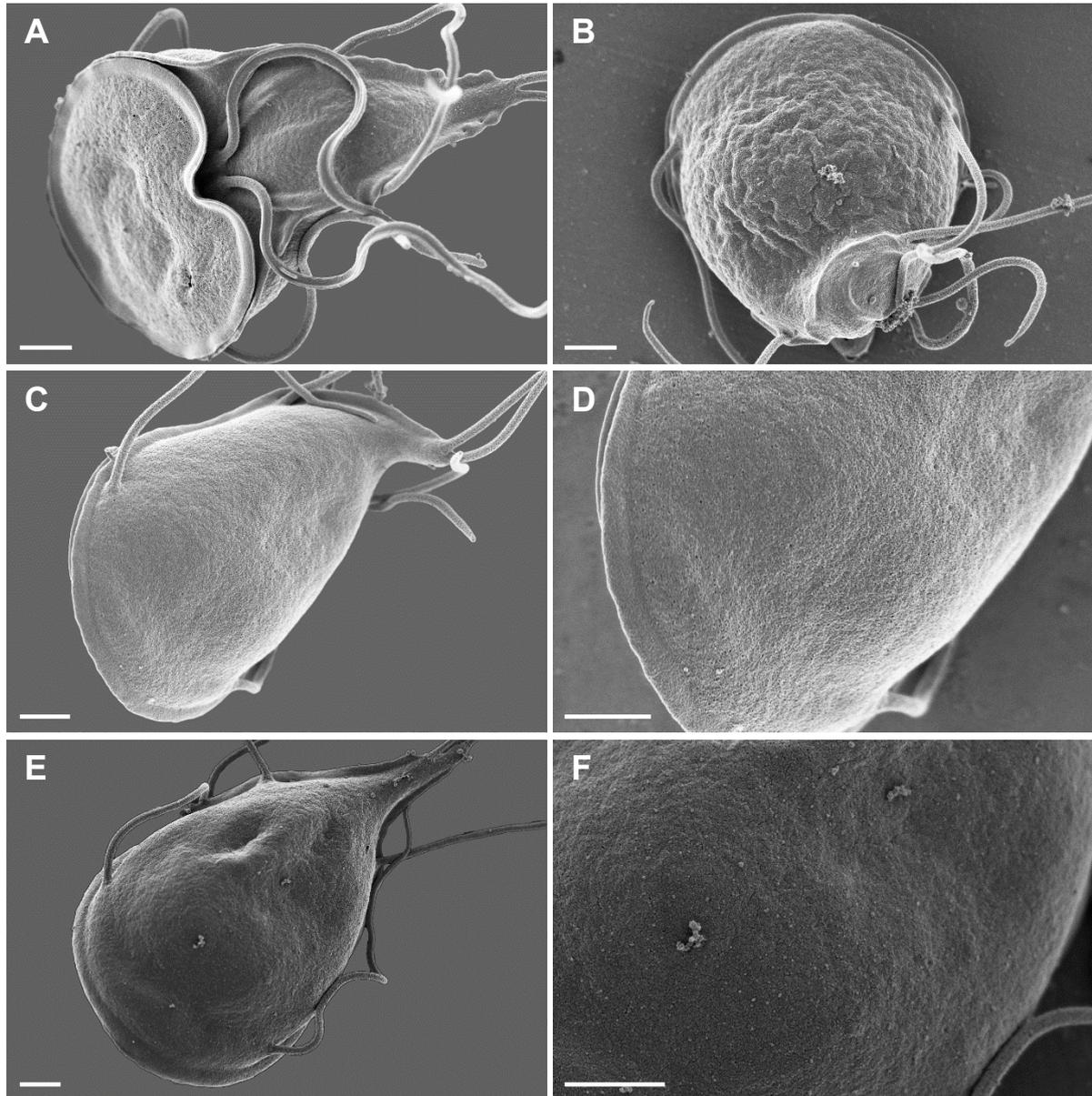


Figura 5.10: Microscopía electrónica de barrido de alta resolución (HR-SEM) de trofozoítos que expresan la VSP 1267 sometidos a estrés oxidativo. Trofozoítos ueron tratados con H_2O_2 10 μM durante 10 min y puestos a recuperar en medio de cultivo durante diferentes períodos de tiempo antes de su fijación. (A-B) Trofozoítos no tratados. (C-D) Trofozoítos fijados a los 15 min post-tratamiento. La figura D corresponde a una ampliación de C. (E-F) Trofozoítos fijados a los 30 min post-tratamiento. La figura F corresponde a una ampliación de E. Barra de escala: 1 μm

Los resultados obtenidos por TEM indican que las protrusiones de membrana altamente marcadas con partículas de oro observadas mediante SEM, son en realidad aglutinaciones formadas por microvesículas. Para confirmarlo realizamos un análisis por microscopía electrónica de barrido de alta resolución (HR-SEM) de trofozoítos del clon que expresa la VSP TSA417 fijados luego de 1 h post-tratamiento con mAb específico 7C2 y otros sin tratar como control. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.8, donde puede observarse un considerable incremento en la formación de microvesículas extracelulares en las células tratadas (Figuras 5.8 C-F) respecto del control (Figuras 5.8 A y B). Además, la alta resolución de la técnica permite confirmar que las mismas se producen en toda la superficie del trofozoíto, incluyendo la parte dorsal (Figura 5.8 C), flagelos (Figura 5.8 D) y disco ventral (Figura 5.8 E), y que se originan a partir de evaginaciones de la membrana plasmática confirmando que se trata de microvesículas.

La formación de estas estructuras protruyentes de la membrana plasmática como respuesta al tratamiento con anticuerpos fue también confirmada *in vivo* en infecciones experimentales en jerbos, donde se observó la presencia no sólo de microvesículas sino también de nanotubos en la superficie de trofozoítos presentes en el intestino de jerbos a los 12 dpi, coincidiendo con el inicio del *switching* inducido por la respuesta de anticuerpos del hospedador (Ríos, D.N.; Tesis doctoral, 2021⁷⁴).

5.4. Estudio a nivel ultraestructural de los efectos del estrés redox en trofozoítos de *G. lamblia*.

A la luz de los resultados obtenidos en cuanto al mecanismo de liberación de las VSPs unidas a anticuerpos en microvesículas, y teniendo en cuenta las observaciones realizadas en la sección 4.5.2 acerca de la capacidad de dimerización de la VSP TSA417 por estrés oxidativo, nos preguntamos si este efecto produce la liberación de microvesículas desde la superficie celular, tal como lo hacen los anticuerpos al aglutinar las VSPs.

Trofozoítos de *Giardia* que expresan las VSPs TSA417 y 1267 en crecimiento exponencial fueron tratados con 10 μ M de H₂O₂ en PBS durante 10 min a 37°C. Posteriormente, el medio de tratamiento fue reemplazado por medio de cultivo y las células se dejaron recuperar durante 15, 30 y 60 min a 37°C. A cada uno de estos tiempos, los trofozoítos fueron enfriados para despegarlos del sustrato de cultivo, fijados y preparados para microscopía electrónica de barrido de alta resolución (HR-SEM).

Los resultados obtenidos para el clon que expresa la VSP TSA417 se muestran en la Figura 5.9. Sorprendentemente, el H₂O₂ estimuló la liberación de microvesículas en toda la superficie de los trofozoítos. Las Figuras 5.9 C-E muestran la aparición de microvesículas homogéneamente distribuidas en la superficie celular y flagelos a los 15 min post-tratamiento. Estas estructuras no se observan en las células no tratadas con H₂O₂ (Figuras 5.9 A-B). A los 30 min post-tratamiento se observa la aglutinación de estas microvesículas en determinados focos y su desaparición de la superficie celular (Figuras 5.9 F-I). Las estructuras resultaron muy similares a las observadas durante los tratamientos con anticuerpos. Por otra parte, en el caso de las células que expresan la VSP 1267 tratadas en las mismas condiciones no se observó la formación de microvesículas (Figura 5.10). Estos resultados son coherentes con las observaciones previas acerca de la falta de reactividad de la VSP 1267 ante el estrés oxidativo.

5.5. Estudio del perfil proteómico de microvesículas liberadas por inducción con anticuerpos.

Para profundizar el estudio de los mecanismos de formación de las microvesículas inducidas por anticuerpos anti-VSPs en trofozoítos de *Giardia*, se procedió a purificar estas vesículas extracelulares para su estudio por proteómica cuantitativa. Tres clones diferentes de trofozoítos que expresan la VSP TSA417 fueron tratados con una concentración final de 5 nM de mAb 7C2 durante 4 h a 37°C. Posteriormente, las microvesículas fueron purificadas a

partir de los sobrenadantes de cultivo (ver Materiales y Métodos) y validadas por Western blot y TEM con tinción negativa (Figura 5.11). Mediante Western blot se confirmó la presencia de mAb 7C2 y de la VSP TSA417 en las mismas (Figura 5.11 A). Por otra parte, una fracción de las microvesículas purificadas fue tratada directamente con anticuerpo secundario unido a partículas de oro de 10 nm previamente a su visualización por TEM con tinción negativa. Las imágenes obtenidas se muestran en la Figura 5.11 B, donde pueden observarse las vesículas aglutinadas y densamente marcadas con oro, lo que indica la presencia de los complejos VSP TSA417-mAb 7C2, confirmando que estas estructuras son efectivamente microvesículas y descartando la presencia de exosomas.

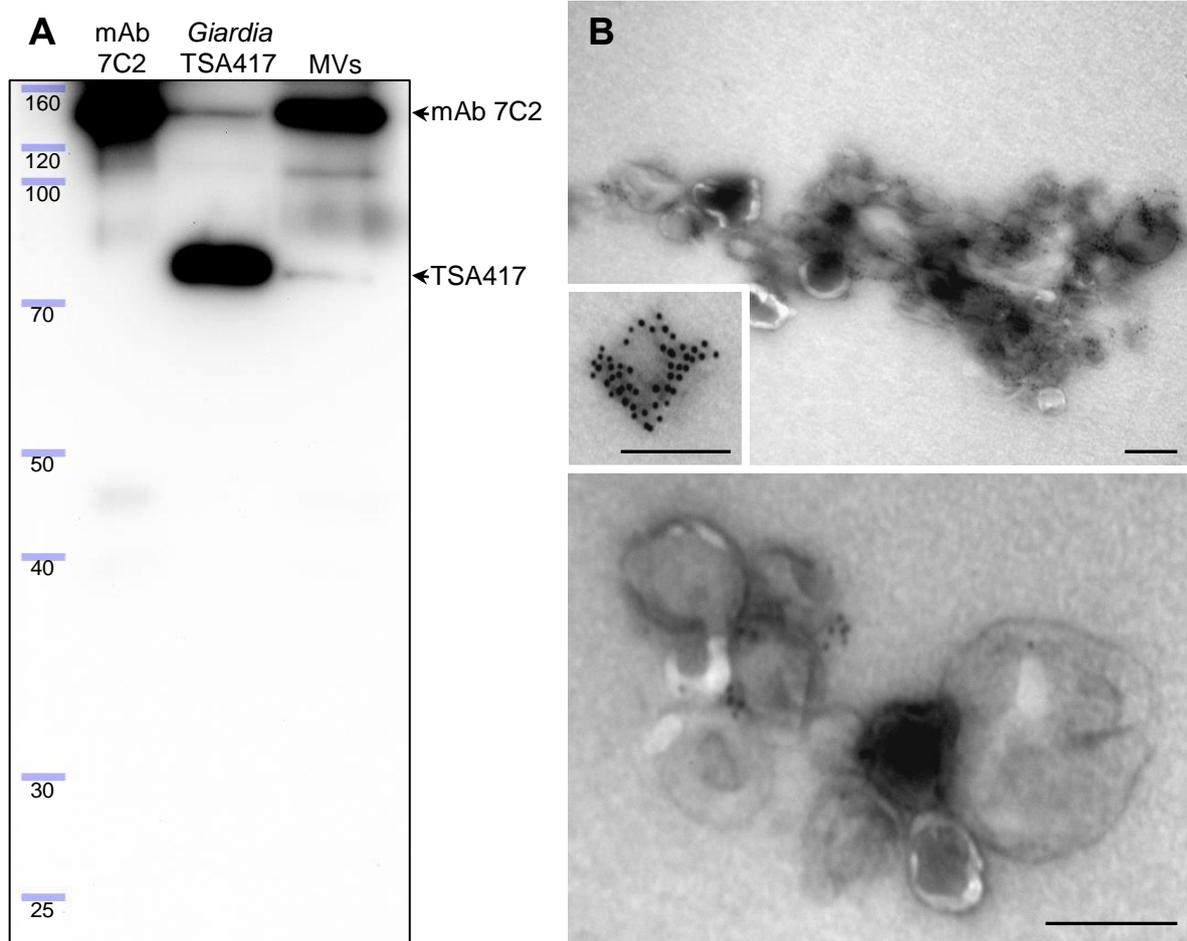


Figura 5.11: Validación de microvesículas purificadas a partir de trofozoítos que expresan la VSP TSA417. (A) Muestras de microvesículas purificadas (MV) fueron sometidas a SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Como controles se sembraron un extracto total de proteínas de *Giardia* clon que expresa la VSP TSA417 y mAb 7C2 purificado. El gel fue transferido a membrana de PVDF y revelado con mAb 7C2 y anticuerpo secundario anti-mouse-peroxidasa de rabanito. Se observa la presencia de mAb 7C2 y TSA417 en las muestras de microvesículas. (B) Muestras de microvesículas fueron tratadas con anticuerpo secundario unido a nanopartículas de oro de 10 nm y observadas por TEM con tinción negativa. Barra de escala: 200 nm.

Las muestras de microvesículas fueron analizadas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) para obtener el perfil proteómico de las mismas. Los resultados obtenidos se detallan en el Anexo III. Se detectaron un total de 417 proteínas. La Tabla 5.1 muestra las 15 proteínas más abundantes, que constituyen el 25% del total de proteínas. La abundancia de las mismas (medida a través del Recuento Espectral, SpC¹³⁵) se muestra en la Figura 5.12 A. La proteína más abundante es la VSP TSA417, el resto corresponde a enzimas metabólicas, proteínas pertenecientes a la maquinaria ESCRT necesaria para la formación de las microvesículas¹³⁶, α -giardinas (proteínas homólogas a las

anexinas¹³⁷) y chaperonas. Los gráficos de la Figura 5.12 B-C muestran las abundancias relativas de las proteínas constituyentes de las microvesículas en función de su localización y funcionalidad. Las proteínas más abundantes en las microvesículas, a excepción de la VSP que está siendo expresada, son enzimas metabólicas altamente abundantes en el citoplasma de las células, seguidas de proteínas de unión a calcio (de las cuales la gran mayoría son α -giardinas), proteínas de las maquinaria ESCRT y proteínas de membrana ricas en cisteína (de las cuales TSA417 es la mayoritaria). Estos cuatro grupos funcionales representan el 55% del total de proteínas presentes en las microvesículas.

Tabla 5.1: Proteínas más abundantes en las microvesículas generadas a partir de trofozoítos TSA417 tratados con mAb 7C2.

Locus tag ID (GiardiaDB)	Proteína identificada	Peso molecular	Localización / Función
GL50803_113797	TSA417	73 kDa	Membrana plasmática / VSP
GL50803_10311	Ornitina carbamoiltransferasa (OCT)	36 kDa	Secretada / Enzima metabólica
GL50803_88765	Proteína de choque térmico HP70	72 kDa	Citosólica / Chaperona
GL50803_103709	Proteína con dominio BRO1	95 kDa	Citosólica / Maquinaria ESCRT
GL50803_112103	Arginina deiminasa (ADI)	64 kDa	Citosólica / Enzima metabólica
GL50803_98054	Proteína de choque térmico HP90	81 kDa	Citosólica / Chaperona
GL50803_114787	Alfa-7.3 giardina	33 kDa	Asociada al citoesqueleto / Unión a membrana mediada por calcio.
GL50803_6687	Gliceraldehido-3P deshidrogenasa	36 kDa	Citosólica / Enzima metabólica
GL50803_103373	Alfa-7.1 giardina	43 kDa	Asociada al citoesqueleto / Unión a membrana mediada por calcio.
GL50803_6430	Proteína 14-3-3	29 kDa	Citosólica / Unión y regulación de proteínas de señalización.
GL50803_16453	Carbamato kinasa	34 kDa	Citosólica / Enzima metabólica
GL50803_2107	Proteína hipotética	36 kDa	Nuclear / Desconocida
GL50803_112304	Factor de elongación 1 alfa (Ef1 α)	49 kDa	Citosólica / Maquinaria de traducción y otras funciones no canónicas
GL50803_11129	Proteína IST1 asociada a Vps	34 kDa	Citosólica / Maquinaria ESCRT
GL50803_16795	Vacuolar protein sorting 4b (Vps4b)	53 kDa	Citosólica / Maquinaria ESCRT

Tabla 5.2: VSPs presentes en las muestras de microvesículas generadas a partir de trofozoítos TSA417 tratados con mAb 7C2.

Locus Tag ID (GiardiaDB)	Proteína identificada	Peso molecular	SpC 44674	SpC 40291	SpC 44675	SpCTotal
GL50803_00113797	VSP	73 kDa	145	101	101	347
GL50803_00113450	VSP	73 kDa	39	29	0	68
GL50803_00101074	VSP	77 kDa	12	9	5	26
GL50803_00137618	VSP	76 kDa	11	15	0	26
GL50803_0014586	VSP	74 kDa	0	14	0	14
GL50803_00137612	VSP	75 kDa	10	0	0	10
GL50803_00116477	VSP	76 kDa	4	5	0	9
GL50803_00137617	VSP	76 kDa	0	7	0	7
GL50803_00114674	VSP	73 kDa	3	0	0	3
GL50803_00112135	HCMP tipo VSP	121 kDa	0	2	0	2
GL50803_00119706	VSP	70 kDa	0	2	0	2
GL50803_0050143	VSP	63 kDa	0	2	0	2
GL50803_0050259	VSP	70 kDa	0	2	0	2

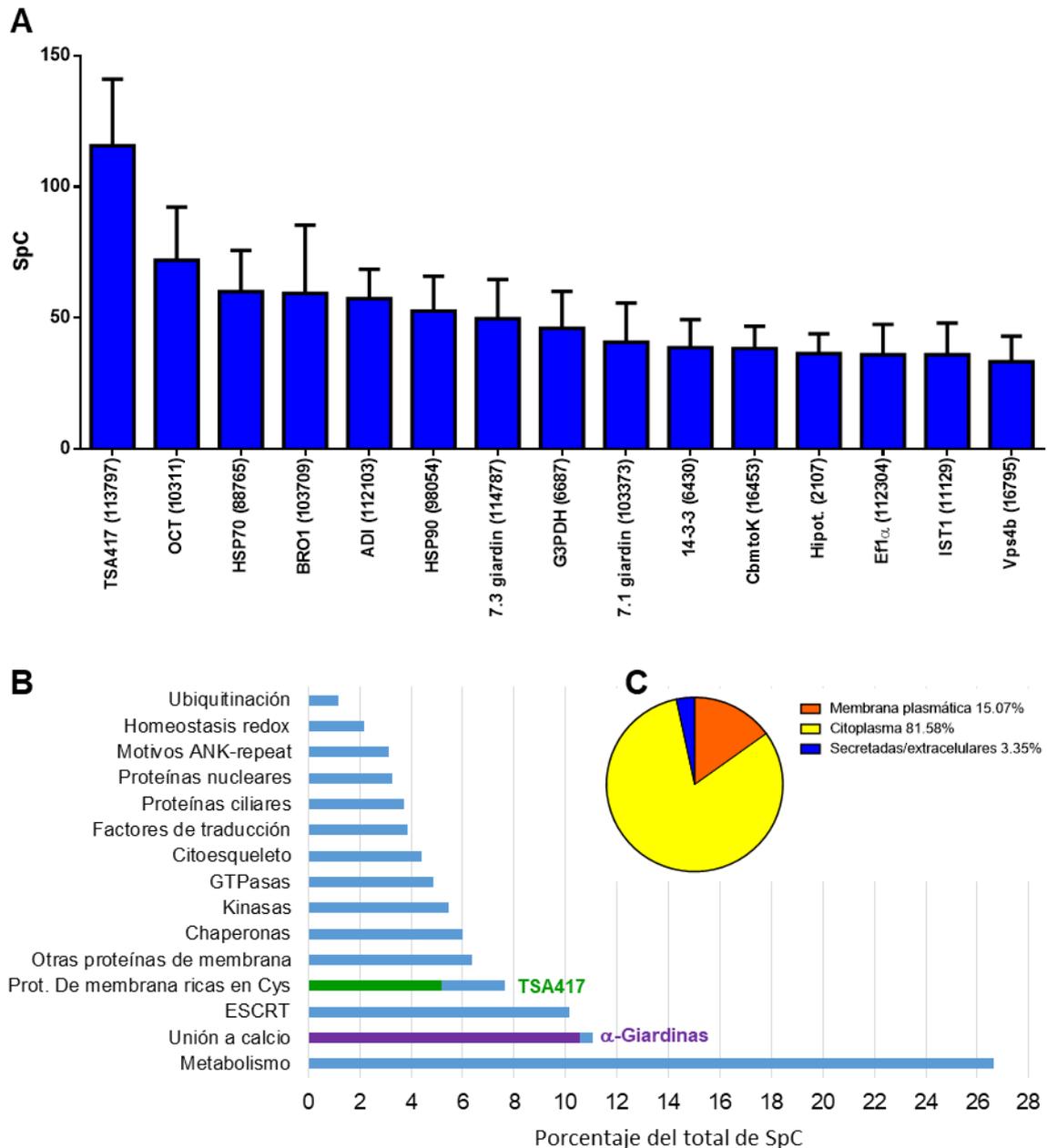


Figura 5.12: Perfil proteómico de microvesículas derivadas de trofozoítos de *Giardia* que expresan la VSP TSA417. (A) Se muestran los valores de recuento espectral (SpC) de las 15 proteínas más abundantes en el proteoma de las microvesículas. En conjunto, estas proteínas constituyen el 25% de la abundancia total de proteínas. Barras de error: desviación estándar. (B) Abundancia relativa (expresada en porcentajes respecto del total) de las proteínas agrupadas por función. (C) Abundancia relativa (expresada en porcentajes respecto del total) de las proteínas en función de su localización celular.

La Tabla 5.2 enumera las VSPs presentes en las microvesículas aisladas de los tres clones diferentes que expresan la VSP TSA417 (indicados como 40291, 44674 y 44675). En la misma puede observarse que la VSP mayoritaria es la TSA417 en los tres clones analizados. Sin embargo, se observa la presencia de otras VSPs menos abundantes en las microvesículas aisladas, que posiblemente correspondan a las nuevas VSPs que comenzaron a ser expresadas por inducción de la VA con el mAb 7C2. La presencia de otras VSPs (resaltadas en amarillo) es variable de clon a clon, lo que es coherente con la aleatoriedad en la expresión de la nueva VSP discutida en el apartado 3.1.1 del Capítulo 3.

5.6. Estudio del rol del calcio intracelular en el recambio de las VSPs unidas a anticuerpo.

A partir de la obtención del perfil proteómico de las microvesículas liberadas durante el recambio de las VSPs unidas a anticuerpo pudo determinarse que una gran parte del contenido proteico de las mismas (aproximadamente un 10%) consiste en proteínas con dominios de unión a calcio, principalmente α -giardinas (Figura 5.12 B). Estas proteínas están relacionadas con las anexinas y comprenden una familia de múltiples genes con 21 miembros en *Giardia*¹³⁷. Las anexinas tienen la capacidad de unirse a ciertos fosfolípidos de membrana de una manera dependiente de calcio, proporcionando un vínculo entre la señalización por calcio y las funciones de la membrana. Al formar redes en la superficie de la membrana, estas proteínas pueden funcionar como organizadores de dominios de membrana y plataformas de reclutamiento para otras proteínas con las que interactúan¹³⁸. Las α -giardinas, entonces, podrían tener algún rol en la formación de las microvesículas (lo que explicaría su gran abundancia en las mismas) y por consiguiente en la eliminación de las VSPs unidas a anticuerpos.

Considerando que la unión de las α -giardinas a la membrana plasmática es dependiente de la concentración de calcio intracelular, reportándose una muy baja interacción a bajas concentraciones del mismo¹³⁹, nos propusimos indagar en el efecto de la depleción de calcio intracelular en el recambio de las VSPs unidas a anticuerpo. Para ello se estudió el recambio de las VSPs unidas a anticuerpos (mAb 7C2) en trofozoítos de *G. lamblia* clon TSA417 en presencia del quelante de calcio intracelular permeable a membranas BAPTA-AM. Poblaciones de 1×10^6 trofozoítos de *Giardia* clon TSA417 fueron tratadas en 1 ml de PBSAC-Glc (PBS con ácido ascórbico 0.01% p/v y cisteína 0.2% p/v, pH=7, suplementado con glucosa 20 mM) con 5 μ l de solución de BAPTA-AM 10 mM en DMSO (concentración final de 25 μ M) o un volumen equivalente de DMSO (control) a 37°C durante 15 minutos para permitir la difusión del BAPTA-AM a través de la membrana y el secuestro del calcio intracelular. Los tubos fueron posteriormente enfriados en hielo y tratados con mAb 7C2 a una concentración final de 2,5 nM durante 40 min. Luego se realizaron dos lavados con PBSAC para eliminar la fracción no unida de mAb 7C2, y los trofozoítos se incubaron a 37°C en PBSAC-Glc conteniendo la misma concentración de BAPTA-AM (o de DMSO en el caso del control) durante 30, 60 o 90 minutos para permitir la eliminación de los mAbs unidos a las VSPs en microvesículas. Al cabo de cada tiempo de incubación los trofozoítos fueron fijados en paraformaldehído 4% en PBS.

Para la cuantificación del grado de recambio de las VSPs unidas a mAb 7C2, se realizó una marcación directa con anticuerpo secundario anti-mouse Alexa 488. Para poder cuantificar la totalidad de los trofozoítos que expresan la VSP TSA417, se realizó luego una segunda incubación con anticuerpo primario (mAb 7C2), pero esta vez seguido de anticuerpo secundario anti-mouse RPE. Los trofozoítos fueron luego analizados por citometría de flujo. Los resultados se muestran en la Figura 5.13. En la Figura 5.13 A se muestran los citogramas obtenidos para las condiciones control y tratada, a los diferentes tiempos ensayados. Sólo fueron analizados los trofozoítos positivos para el anticuerpo secundario anti-mouse RPE (es decir, los que expresan la VSP TSA417 descartando aquellos que expresan otras VSPs), dentro de esta población, el porcentaje que resultó negativo para el anticuerpo secundario anti-mouse Alexa 488 corresponde a las células que eliminaron el mAb 7C2 de su superficie (se indica como porcentaje de recambio en la Figura 5.13 B). Como puede observarse, el tratamiento con BAPTA-AM inhibe el proceso de recambio de las VSPs unidas a anticuerpo, lo que indica que el calcio intracelular tiene un rol clave en el mecanismo de recambio, posiblemente regulando la asociación de α -giardinas a la membrana plasmática.

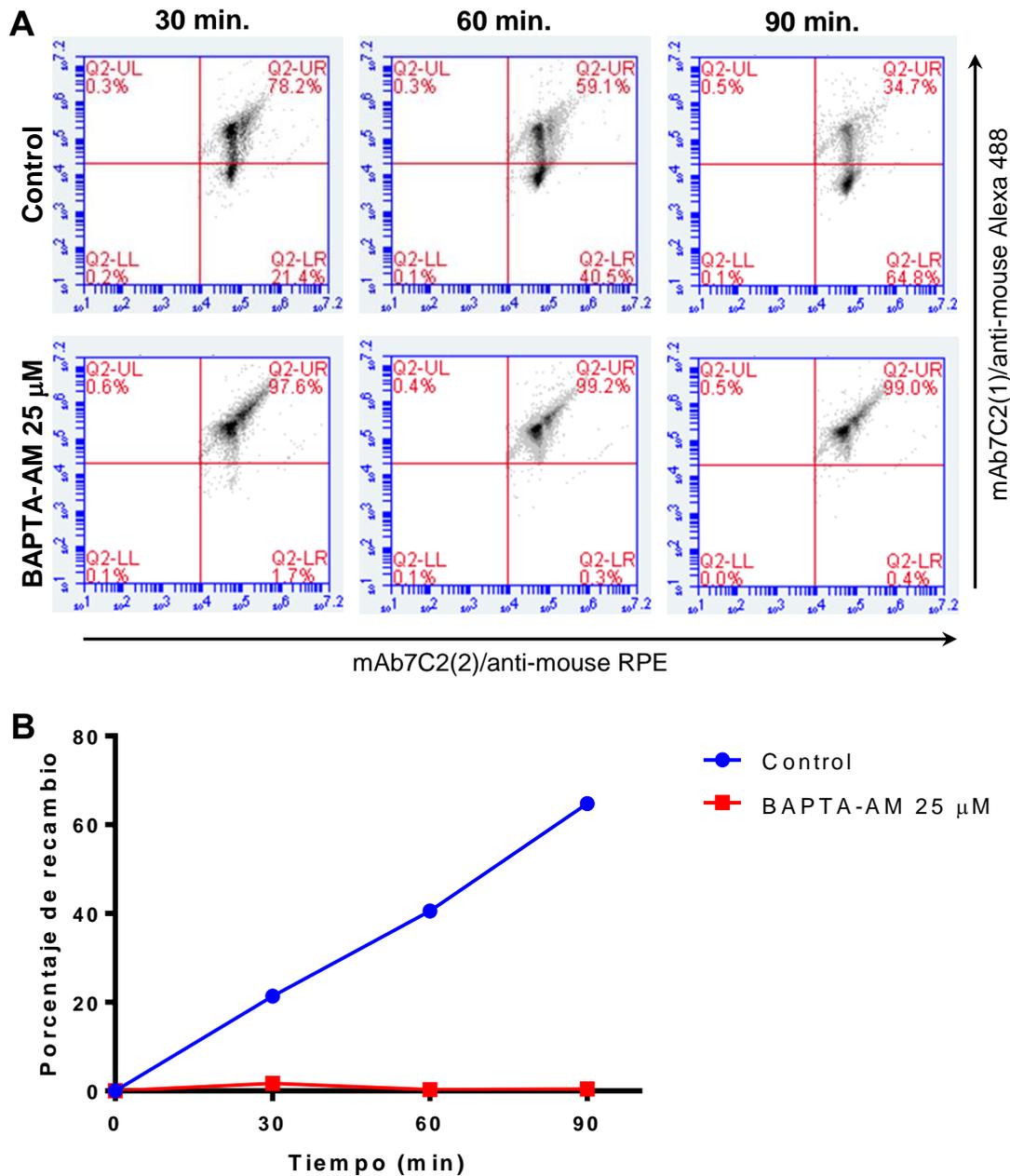


Figura 5.13: Rol del calcio intracelular en el recambio de las VSPs unidas a anticuerpo. Trofozoítos de *Giardia* clon TSA417 fueron tratados con mAb 7C2 2,5 nM en frío, lavados para eliminar el mAb no unido, e incubados a 37°C en presencia de BAPTA-AM 25 μ M o de vehículo (control) durante los tiempos indicados. Los trofozoítos fueron posteriormente fijados y marcados con anti-mouse Alexa 488 para detectar el mAb 7C2 unido (mAb 7C2(1)) y así cuantificar el grado de recambio o eliminación del mismo. Posteriormente se realizó una segunda marcación con mAb 7C2 (mAb 7C2 (2)) seguido de anti-mouse RPE para cuantificar la totalidad de trofozoítos expresando la VSP TSA417. (A) Se muestran los citogramas correspondientes a cada tratamiento y tiempo de incubación ensayado. Sólo se analizó la población de trofozoítos TSA417 (mitad derecha de cada citograma). Dentro de esta población, los trofozoítos negativos para el mAb 7C2(1)/anti-mouse Alexa 488 corresponden a aquellos que eliminaron el anticuerpo de su superficie (cuadrante inferior derecho de cada citograma). (B) Se muestra el porcentaje de recambio (porcentaje de trofozoítos TSA417 que eliminaron el mAb 7C2(1), correspondiente al cuadrante inferior derecho de los citogramas) para las poblaciones de trofozoítos control y tratada a los diferentes tiempos de incubación ensayados.

5.7. Conclusiones parciales.

En conjunto, los resultados expuestos en el presente capítulo complementan los hallazgos discutidos en el capítulo anterior acerca de los mecanismos que se desencadenan a nivel de la membrana plasmática cuando las VSPs son estimuladas por señales externas (anticuerpos específicos o estrés oxidativo). Dichas señales, afectan el estado de agregación de las VSPs superficiales y consecuentemente, la raftofilicidad de las mismas. Los *lipid rafts* estarían actuando según este modelo, como plataformas multipropósito. Por un lado, permitiendo la segregación de las VSPs unidas a anticuerpo respecto de las no unidas (incluyendo las nuevas VSPs que se comienzan a expresar durante el *switching*). Por el otro, favoreciendo el ensamblaje de la maquinaria de formación de microvesículas, las cuales son liberadas al medio permitiendo así el recambio de las VSPs.

El mecanismo de recambio de las VSPs unidas a anticuerpos (es decir, su eliminación de la superficie en microvesículas) es dependiente de la concentración de calcio intracelular. Esto es coherente con reportes previos acerca de la liberación de microvesículas desde la superficie celular en respuesta a tratamientos con calcio tanto en *Giardia lamblia* como en *Trichomonas vaginalis*^{140,141}. Sin embargo, el mecanismo por el cual el calcio estimula la formación de microvesículas no ha sido aún dilucidado. La interacción dependiente de calcio de las α -giardinas con la membrana plasmática podría explicar por qué la depleción de calcio intracelular inhibe el recambio de las VSPs, si se asume que éstas tienen algún rol en el mecanismo de formación de las microvesículas.

Finalmente, considerando que las microvesículas liberadas por estimulación de trofozoítos con anticuerpos anti-VSP están altamente enriquecidas en los complejos VSP-anticuerpo (es decir, son la vía de eliminación de las VSPs unidas a anticuerpo), es muy probable que las microvesículas liberadas por células que expresan la VSP TSA417 ante el estrés oxidativo estén enriquecidas en la forma dimerizada de esta VSP. Dicho de otra forma, la liberación de microvesículas inducidas por estrés oxidativo estaría permitiendo el recambio de las VSPs TSA417 dimerizadas (oxidadas, y por lo tanto incapaces de reaccionar al estresor) por monómeros de la misma VSP recién sintetizados (reducidos) y capaces de reaccionar dimerizándose. De esta forma, el agente oxidante se consume en la generación de dímeros de VSPs, los cuales a su vez estimulan su propio recambio y eliminación en microvesículas, manteniendo así la capacidad reductora de la superficie celular. Este mecanismo molecular podría explicar la mayor resistencia de las células que expresan la VSP TSA417 al estrés oxidativo respecto de las células que expresan la VSP 1267⁷⁴. Estas últimas, ante la incapacidad de reaccionar con el agente oxidante, permitirían su difusión al citoplasma aumentando la probabilidad de citotoxicidad.

CAPÍTULO 6

Discusión

6. CAPÍTULO 6: Discusión

6.1. La variación antigénica en relación con el microambiente: *Bet-hedging* vs Plasticidad Adaptativa.

Un requisito esencial para cualquier parásito microbiano es sobrevivir como población dentro del hospedador un tiempo suficiente como para expandirse, transmitirse y restablecerse en un nuevo hospedador perpetuando así su ciclo de vida. Los hospedadores animales proporcionan una amplia gama de nichos, que están sujetos a cambios temporales a través de varios mecanismos, incluida la inmunidad adaptativa. Una forma en que los parásitos eluden este problema es mediante la variación fenotípica en la población, de modo que ciertos individuos tienen una ventaja selectiva en un microambiente particular. La variación fenotípica se puede lograr de dos maneras:

- La población en su conjunto puede generar repertorios suficientemente grandes de variantes, a frecuencias adecuadas, para garantizar la supervivencia de algunos individuos. Es importante destacar que las variantes supervivientes que resultan de esta estrategia deben heredar la capacidad de regenerar grandes repertorios fenotípicos.
- Los organismos individuales pueden alterar específicamente su fenotipo en respuesta a las señales sensoriales del entorno cambiante¹⁴².

Aplicando conceptos tomados de la biología evolutiva, la primera estrategia se conoce como “*Bet-hedging*” y se basa en la generación estocástica de variantes de manera espontánea, es decir, **independientemente de las señales del entorno**. Si bien muchas variantes podrían ser incluso menos aptas para sobrevivir en el entorno inmediato, la estrategia se basa en que alguna de estas variantes pueda resultar ser más apta ante un cambio imprevisto del microambiente por lo que se seleccionará positivamente asegurando la supervivencia de la especie. Por otra parte, la segunda estrategia se conoce como “Plasticidad adaptativa”⁷³. La plasticidad en este contexto (plasticidad fenotípica) se define como la capacidad de los organismos para modificar sus fenotipos **en respuesta a señales del ambiente**¹⁴³. Si el cambio fenotípico ocurre en el sentido en que le confiere al organismo alguna ventaja en el nuevo ambiente, se dice que la plasticidad es “adaptativa”. Sin embargo, este último término ha sido ampliamente utilizado en microbiología de una manera más general para referirse a todos los cambios fenotípicos inducidos por el ambiente, independientemente de que confieran o no una ventaja selectiva¹⁴⁴. De acuerdo con esto, se utilizará el término “adaptativo/a” para indicar cualquier cambio fenotípico en respuesta a señales del ambiente.

La VA, en tanto es una forma de variación fenotípica puede estar sujeta a cualquiera de estas estrategias. El problema de determinar si la VA es espontánea o adaptativa ha sido encarado en general desde enfoques poblacionales en diferentes microorganismos. En *Giardia*, se ha reportado que el *switching* en trofozoítos individuales ocurre espontáneamente con una frecuencia de entre 6.5 y 13.5 generaciones dependiendo del ensamblaje y de la VSP expresada⁴⁸, y que los anticuerpos anti-VSP citotóxicos actuarían seleccionando las nuevas variantes no reconocidas por el sistema inmune del hospedador^{23,53,145}. En *T. brucei*, la interacción con los anticuerpos también ha sido estudiada no habiéndose podido demostrar ningún efecto de inducción en la VA^{146,147}. En el caso de *Plasmodium*, el agente causante de la malaria, existe un único reporte aislado acerca de que la VA en estos parásitos sería adaptativa¹⁴⁸. Sin embargo, se basan en resultados de experimentos *in vivo*, que no permiten descartar fehacientemente la posibilidad de que estén ocurriendo procesos de selección. Publicaciones más recientes consideran que la VA en *Plasmodium* ocurre por procesos de variación espontánea y selección^{149,150}. En el caso de *Mycoplasma*, un género de bacterias que carecen completamente de pared celular, muchas de las cuales generan enfermedades crónicas¹⁴² existe también una única publicación sugiriendo un mecanismo adaptativo de

VA¹⁵¹, aunque finalmente se reportó que la estrategia adoptada por estas bacterias consistiría, en realidad, en una serie de mecanismos espontáneos de recombinación genética dirigidos hacia la variación de fase y tamaño de los principales componentes de la superficie, de modo que cuando se enfrentan a desafíos imprevistos, puede prevalecer una variante¹⁵². En general, hay un consenso en la comunidad científica acerca de que la VA en los microorganismos patógenos sigue una estrategia de *bet-hedging*, es decir, el *switching* ocurriría espontáneamente en células individuales independientemente de la respuesta inmune del hospedador. Posteriormente el sistema inmunitario humoral actuaría seleccionando las células que cambian sus antígenos de superficie.

En este contexto, nuestro descubrimiento de que la VA en *Giardia* puede ser inducida por anticuerpos contra sus proteínas variables de superficie constituye la primera descripción de un mecanismo de VA adaptativo en protozoarios patógenos y cambia el actual paradigma de la VA al proveer un nuevo marco de estudio de este proceso, concibiendo a las proteínas variables de superficie como sensores de señales externas y a la VA como un mecanismo de diferenciación regulado por éstas. Según nuestros resultados, el efecto de los anticuerpos es el de acelerar la VA a nivel poblacional. A nivel individual, la respuesta de los parásitos no es homogénea, permaneciendo una gran parte de los mismos sin responder al estímulo al tiempo que otros responden cambiando la expresión de su antígeno de superficie. A su vez, entre los parásitos que responden, la elección de la nueva proteína variable de superficie también parece ser aleatoria. La falta de respuesta homogénea en la población explica por qué, a pesar de que los anticuerpos inducen la VA, la población de parásitos del intestino se ve considerablemente disminuida al inicio de la respuesta inmune adaptativa por parte del hospedador.

Por otra parte, la existencia de mecanismos estocásticos de *switching* no pueden ser descartados, siendo que se observa la aparición espontánea de *switchers* durante los cultivos *in vitro*. Esto podría indicar que los anticuerpos estimulan y aceleran los mismos mecanismos celulares que llevan al *switching* espontáneo en condiciones normales (sin estimulación). De esta forma, la VA en estos parásitos podría describirse como un proceso adaptativo a nivel poblacional, pero estocástico en cuanto a la respuesta individual al estímulo. El resultado de esto es una población de parásitos capaz de adecuar su frecuencia de *switching* sensando la respuesta de anticuerpos del hospedador. En otras palabras, la respuesta individual estocástica al estímulo, hace que la población en su conjunto se diversifique de manera sincronizada con la respuesta de anticuerpos del hospedador. La ventaja de este mecanismo es que permite mantener bajos los niveles de diversificación antigénica con la ventaja de mostrar la menor cantidad de variantes antigénicas al sistema inmune del hospedador, pero aumentarlos al inicio de la respuesta de anticuerpos. Una alta tasa de *switching* durante el pico de infección asegura un gran repertorio de variantes antigénicas que resulta sobre todo importante en etapas tardías de la infección o durante la diferenciación a quiste, para asegurar el escape antigénico de por lo menos una pequeña proporción de éstas, que sean útiles para la transmisión a otros hospedadores o re-infectar al mismo hospedador.

6.2. Mecanismos moleculares de sensado de la señal y recambio de las VSPs durante el *switching* adaptativo en *Giardia*.

Nuestros resultados a partir de microscopías electrónicas y de fluorescencia muestran que luego de la unión de los anticuerpos a las VSPs, los complejos VSP-anticuerpo se segregan del resto de las VSPs no unidas y se liberan en microvesículas en un tiempo inferior a 30 min. El hecho de que las VSPs unidas a anticuerpo se separen de las no unidas y se carguen preferencialmente en microvesículas, siendo que ambas son idénticas, indica que la unión del anticuerpo a las VSPs debe desencadenar algún tipo de cambio conformacional que permita la distinción entre VSPs unidas a anticuerpos y VSPs libres a nivel de la membrana plasmática. Analizando los residuos de aminoácido conservados en el TMD de las VSPs hemos encontrado un motivo GAS_{right} altamente conservado y demostramos que estaría involucrado en la homodimerización de los mismos, aunque la fuerza de interacción

entre éstos es más débil comparada con el TMD canónico de la GpA, indicando que el equilibrio de dimerización podría ser regulable por ligandos externos como los anticuerpos. Más aún, hemos demostrado que los anticuerpos IgG divalentes tienen mayor capacidad de segregación de las VSPs unidas en microdominios que los correspondientes fragmentos Fab monovalentes. Estos resultados apuntan a un mecanismo mediante el cual el equilibrio de dimerización de las VSPs a nivel de sus TMD sería desplazado hacia la formación de dímeros estables por la unión de anticuerpos al extremo N-terminal variable de las VSPs.

Por otra parte, la tendencia de las VSPs a particionarse en *lipid rafts* ha sido reportada por otros³³ y atribuida a la palmitoilación del residuo de cisteína del tallo citoplasmático C-terminal conservado. Nuestros resultados complementan esta observación y muestran que la partición de las mismas en *lipid rafts* se incrementa significativamente ante el tratamiento con anticuerpos. Un posible modelo que explicaría la mayor raftofilicidad de las VSPs unidas a anticuerpos respecto de las VSPs libres se muestra en la Figura 6.1. En general, los dominios transmembrana helicoidales de las proteínas de membrana se empaquetan mejor con los lípidos de la fase líquida desordenada (Ld) que con los de la fase líquida ordenada (Lo, *lipid rafts*). Si bien se ha propuesto que las proteínas con TMD largos se particionan preferentemente en *lipid rafts* (que son más anchos) para evitar el desajuste hidrofóbico (*hydrophobic mismatch*), la evidencia experimental muestra que esto no ocurre. Las interacciones de empaquetamiento desfavorables en los *lipid rafts* superan cualquier ventaja de minimizar el desajuste hidrofóbico por lo que los TMD largos se mantienen en la fase desordenada (más estrecha) inclinándose en el plano de la membrana para evitar el desajuste hidrofóbico. En el caso de los TMDs palmitoilados, se cree que podrían ubicarse en los bordes de los *lipid rafts* exponiendo el palmitato hacia estos, pero manteniendo la parte proteica en la fase desordenada de la membrana¹¹¹. Dado que el TMD de las VSPs sería más largo de lo predicho y está palmitoilado, es probable que en condiciones normales se encuentren inclinados en la fase Ld, interaccionando con los *lipid rafts* mediante el resto de palmitato (Figura 6.1 B). Sin embargo, al producirse la homodimerización de los TMDs a través del dominio GAS_{right}, estos tenderían a estabilizar los pequeños y dinámicos *lipid rafts* en estructuras más grandes y estables. Según el modelo de interacción más probable predicho mediante análisis *in silico*, los TMDs de las VSPs interaccionarían en un ángulo de -15.3° quedando ambas hélices prácticamente paralelas entre sí (Figura 4.4) lo que dificultaría la inclinación necesaria de cada TMD individual para evitar el desajuste hidrofóbico, potencialmente favoreciendo la inserción de estos dímeros en el interior de los *lipid rafts* (Figura 6.1 C). Acorde con esta hipótesis, estudios realizados en vesículas gigantes de membrana plasmática (GPMVs) han mostrado que la inducción artificial de la dimerización de dominios transmembrana palmitoilados produce un incremento significativo en la partición de éstos en *lipid rafts*¹⁵³. De hecho, la estabilización de *lipid rafts* en estructuras más grandes y estables por unión de receptores a ligandos multivalentes ha sido reportada previamente en otros modelos¹⁰⁴.

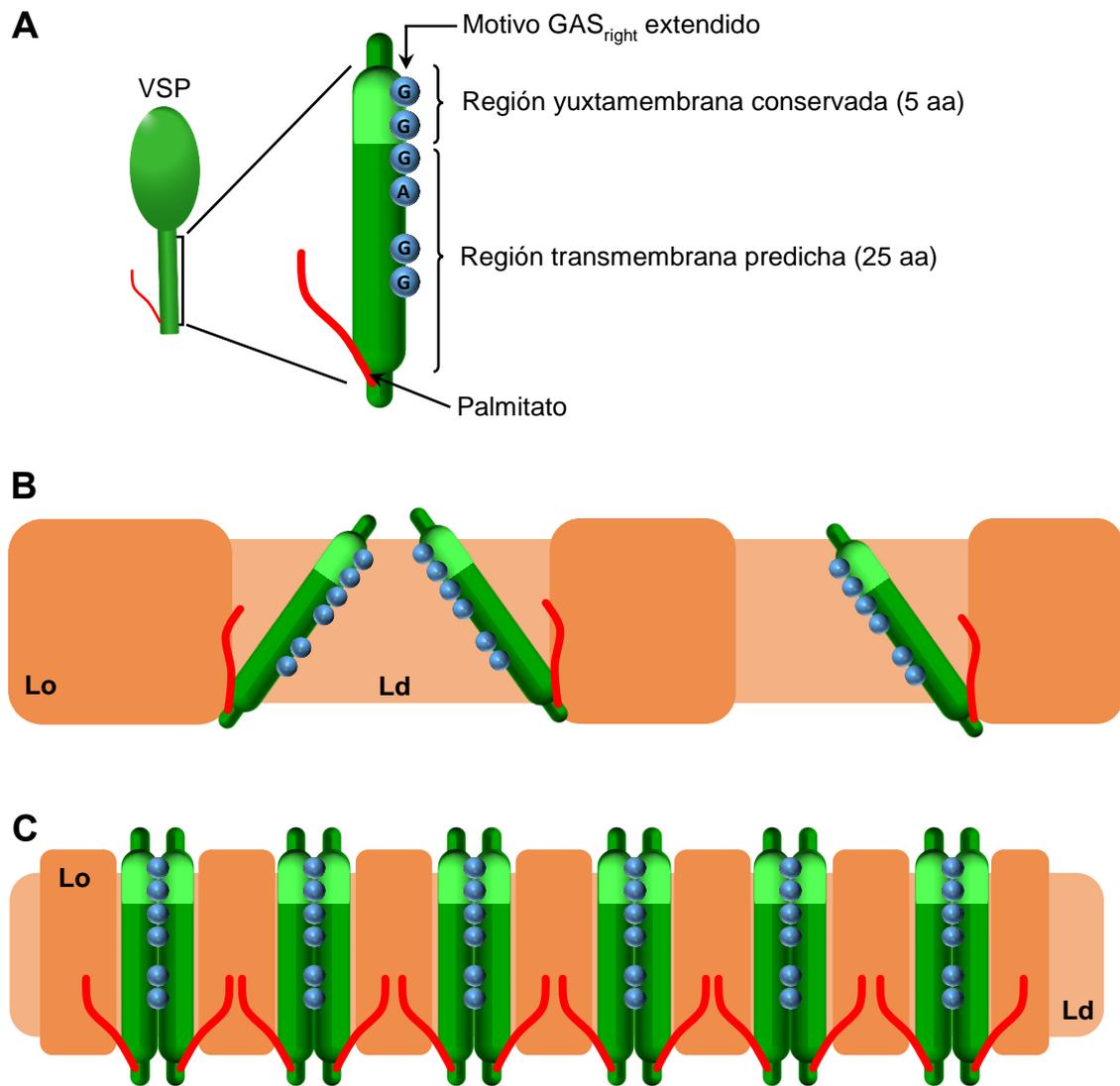


Figura 6.1: Modelo de dimerización de los TMD de las VSPs y su partición en *lipid rafts*. (A) Representación esquemática del TMD de las VSPs donde se indican sus principales características conservadas. (B) Localización de los TMDs en la fase líquida desordenada (Ld) de la membrana plasmática. La inclinación de los TMDs (más largos que el espesor de esta fase de la membrana) permitiría evitar el desajuste hidrofóbico. Las cadenas de palmitato interaccionarían con la fase líquida ordenada de la membrana (Lo) o *lipid rafts*. (C) La homodimerización de los TMDs a través del motivo GAS_{right} extendido fuerza una disposición casi paralela entre los TMDs lo que favorecería su partición en *lipid rafts* para evitar el desajuste hidrofóbico.

Por otra parte, en los estudios realizados acerca de la capacidad de la variante de la VSP H7 mutada en el residuo de cisteína del tallo CRGKA (y por lo tanto no palmitoilada) de transducir la señal de unión de anticuerpos, se ha observado una disminución en la eficiencia de inducción del *switching* con el mAb G10/4, lo que resalta la importancia de la palmitoilación del residuo de cisteína del tallo citoplasmático en el proceso de transducción de la señal (Ríos, D.N.; Tesis doctoral, 2021⁷⁴). Sin embargo, el hecho de que el *switching* pueda ser inducido aún a través de esta variante de VSP no palmitoilada (aunque con menor eficiencia), indica que posiblemente los otros determinantes de raftofilicidad del dominio TMD y quizás los cambios en el propio entorno lipídico producto de la agregación de las VSPs forzada por los anticuerpos son tan importantes como la palmitoilación (tienen roles redundantes) en lo que refiere a la capacidad de estabilizar los *lipid rafts* para favorecer la transducción de la señal al interior celular.

Estas observaciones en su conjunto, sugieren que no sólo las VSPs superficiales, sino también la propia membrana plasmática en la que las mismas están embebidas (incluyendo los *lipid rafts*) forman parte del sistema de sensado. En línea con esto, se ha demostrado en estudios realizados acerca de las interacciones entre proteínas ancladas a la membrana plasmática por GPI, que las mismas se particionan preferentemente en *lipid rafts*, y que alrededor de un 20-40% de éstas se encuentran formando homodímeros con una estabilidad considerable (del orden de varios segundos). Más aún, la depleción de colesterol de la membrana evita la formación de estos dímeros¹⁵⁴. Se ha sugerido que la constante de equilibrio de la dimerización de estas proteínas no sólo depende de factores intrínsecos de las mismas (como la presencia de fuerzas débiles de interacción entre sus ectodominios), sino también del entorno lipídico¹⁵⁴. Consecuentemente, este sistema sería capaz de sensar cambios físicos del microambiente que afecten la constante de dimerización de estas proteínas de membrana ya sea alterando la interacción entre los ectodominios, o alterando parámetros relacionados al empaquetamiento y partición de los lípidos de membrana. De la misma forma, las VSPs junto con los *lipid rafts* constituirían un único sistema de sensado cuyo grado de agregación determinado por señales del microambiente dispararía las señales intracelulares.

Considerando que las VSPs como receptores son altamente variables entre sí, y que no parece haber restricciones en cuanto al sitio específico al cual un mAb deba unirse para inducir la señal, sumado al hecho de que otro tipo de señal de diferente naturaleza como el estrés oxidativo es capaz de ser sensado por algunas VSPs y transducido posiblemente de la misma forma que la señal de anticuerpos, queda en evidencia la “promiscuidad” de este sistema sensor a las señales del microambiente. Cabe destacar en este sentido, que la unión de fragmentos Fab de anticuerpos (no dimerizantes) son capaces de alterar la conformación del ectodominio de por lo menos algunas VSPs y disparar (aunque con menor eficiencia) el *switching* (Ríos, D.N.; Tesis doctoral, 2021⁷⁴). Esto último indica que la desestabilización del ectodominio de las VSPs (por unión de ligandos monovalentes, sin descartar otros factores) podría favorecer la constante de equilibrio de dimerización de las mismas y de esta forma disparar un proceso de señalización intracelular. Teniendo en cuenta esto, se puede describir a este modelo de sensado como un “receptor multimodal”, capaz de sensar diversos estímulos del microambiente incluidos la unión de diversos ligandos y el estrés oxidativo (Figura 6.2).

De esta forma, la unión de los anticuerpos a la región N-terminal variable de las VSPs favorecería la homodimerización de éstas a través de sus TMDs, aumentando la raftofilicidad de las mismas. La partición diferencial de las VSPs libres y dimerizadas entre las fases Lo y Ld sería la responsable de que éstas se segreguen, concentrándose las VSPs unidas a anticuerpos en los *lipid rafts* y permaneciendo las VSPs no unidas mayormente en la fase Ld. La estabilización de los *lipid rafts* en estructuras más grandes podría producir cambios en la topología y composición de esta región en la cara interna de la membrana plasmática, incluyendo un incremento en las concentraciones locales de PI(4,5)P₂ y PI(3,4,5)P₃, y reclutando efectores citoplasmáticos necesarios para el ensamblaje de la maquinaria de formación de las microvesículas. Los anticuerpos anti-VSP estarían de esta forma acelerando la eliminación de la VSP original y facilitando su recambio por la nueva VSP durante el *switching* (Figura 6.3). Su eliminación de la superficie celular, además, constituye un mecanismo de evasión de la opsonización y aglutinación que da tiempo al parásito para completar el cambio de VSP en su superficie.

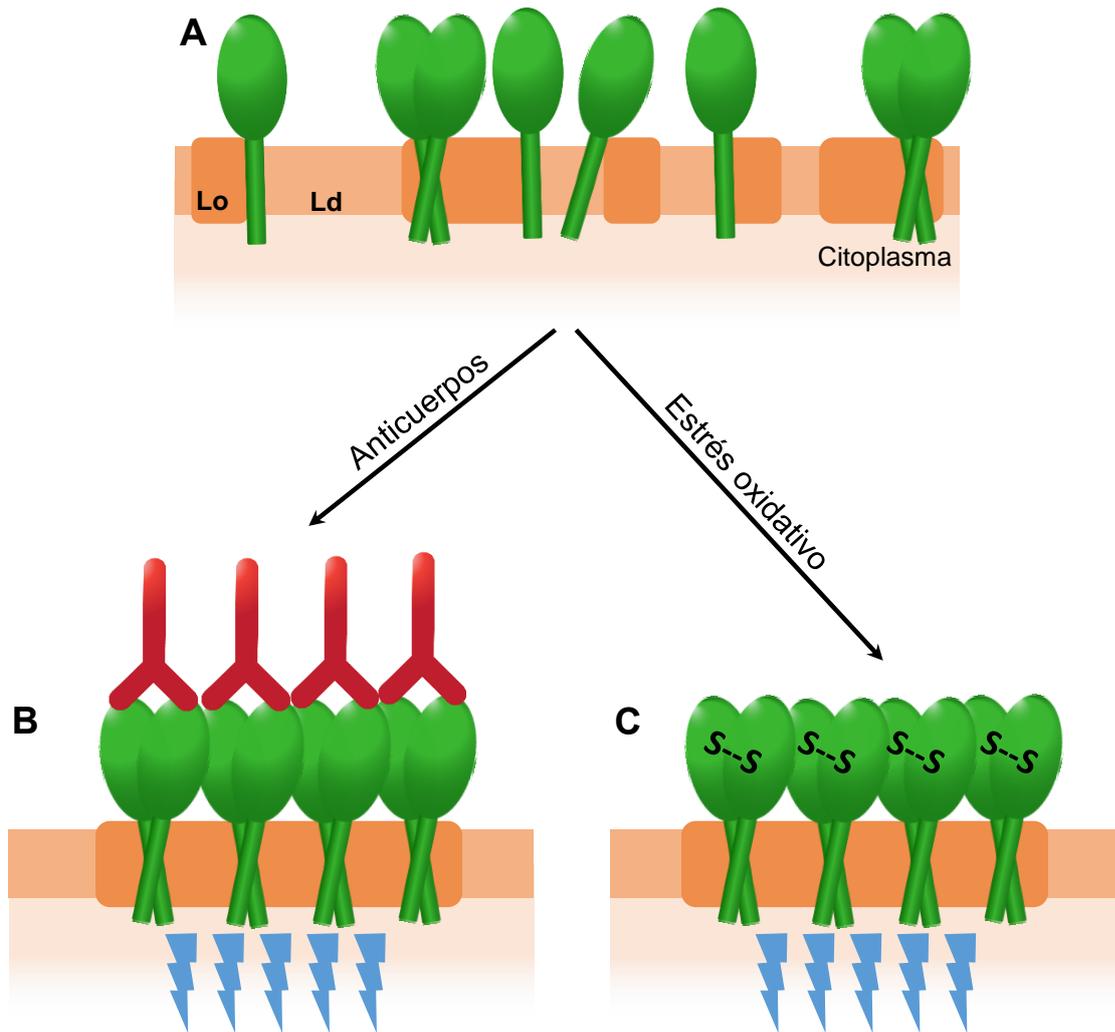


Figura 6.2: Modelo de sensado de señales multimodal. Se muestra un esquema del sistema sensor de señales del microambiente, constituido por las VSPs y la membrana plasmática. En ausencia de estimulación, las VSPs se distribuyen de manera homogénea en la membrana plasmática, distribuyéndose entre las fases ordenada (Lo, *lipid rafts*) y desordenada (Ld) de la misma (A). Ante la presencia de estímulos del microambiente como la unión de anticuerpos (B) o el estrés oxidativo capaz de generar uniones intercatenarias por puentes disulfuro (S--S) (C), las VSPs se particionan preferentemente en la fase Lo, estabilizando los *lipid rafts* en estructuras más grandes y capaces de transmitir la señal al interior celular.

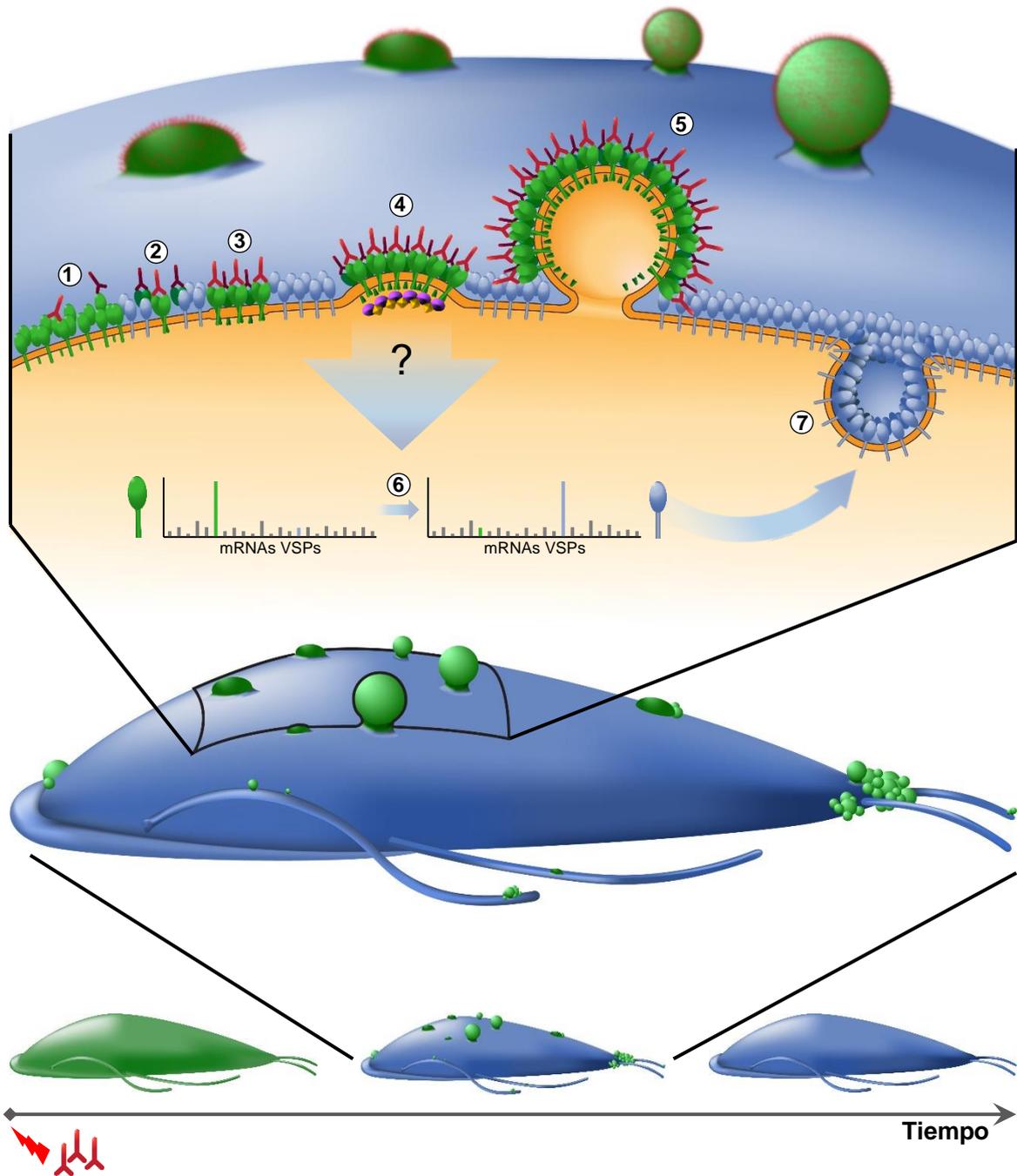


Figura 6.3: Modelo de *switching* inducido por anticuerpos en *Giardia*. En presencia de anticuerpos contra la VSP original (verde), éstos se unen a las mismas (1) induciendo su dimerización a nivel de los TMDs (2). Los dímeros de VSP unidas a anticuerpo se segregan en *lipid rafts*, estabilizándolos en estructuras más grandes que reclutarían efectores citoplasmáticos responsables de la formación de microvesículas (3). Las microvesículas cargadas de anticuerpos anti-VSP son liberadas al medio (4) evitando de esta manera los procesos de opsonización y aglutinación de los parásitos durante el tiempo suficiente para que se induzca el *switching* a nivel de la regulación de la expresión de una nueva VSP antigénicamente diferente (6). La nueva VSP (azul) comienza a ser sintetizada y dirigida a la membrana plasmática (7) donde colocaliza con la VSP original. La unión de nuevos anticuerpos a las VSPs originales remanentes facilitan su eliminación de la superficie en microvesículas (1-5) logrando el reemplazo total de éstas por la VSP nueva no reconocida por anticuerpos.

6.3. La inducción del *switching* como resultado del estrés celular causado por anticuerpos.

Entre los objetivos particulares del presente trabajo de tesis se propuso además de estudiar el mecanismo de recambio de las VSPs durante el *switching* (descrito en el apartado anterior), estudiar el mecanismo de transducción de la señal responsable de producir un cambio en la expresión de las VSPs ante el estímulo con anticuerpos. Esto último supone la posibilidad de encontrar una vía de señalización molecular que conecte los eventos desencadenados a nivel de la superficie celular por la interacción de las VSPs con los anticuerpos, con la maquinaria responsable de la regulación del *switching*.

Los eventos desencadenados a nivel de la membrana plasmática que llevan a la eliminación de los anticuerpos en microvesículas se comportan como un “verdadero” sistema de transducción de señales. Es decir, ante la señal de unión de anticuerpos a las VSPs (sensores), ocurren una serie de eventos de transducción de la señal que llevan a la formación y eliminación de microvesículas cargadas selectivamente con los complejos VSP-anticuerpo (respuesta) en un tiempo relativamente corto (significativamente inferior al tiempo de división celular) y de manera sincronizada a nivel de la población. Por otra parte, el *switching* como respuesta al estímulo con anticuerpos ocurre a tiempos largos (iguales o superiores al tiempo de división celular) y de manera desincronizada a nivel poblacional tal como se describió en el Capítulo 3. Esto último indica, por un lado, que la respuesta de microvesículas ocurre con bastante antelación al proceso de *switching*, y por el otro, que la relación entre la señal (unión del anticuerpo) y la respuesta (*switching*) es más laxa, es decir, menos directa en relación a lo esperado para un mecanismo clásico de transducción de señales. En este contexto, no parece correcto estudiar el proceso de VA inducida por anticuerpos como un simple fenómeno de transducción de la señal y respuesta. Por el contrario, nuestras observaciones acerca de cómo se comporta la población clonal de parásitos en respuesta al tratamiento con anticuerpos parecen indicar que el *switching* se daría como respuesta a un estrés prolongado, quizás no por una vía específica de transducción de la señal, sino por una alteración específica de la homeostasis celular que afecta a la maquinaria de regulación de la expresión de las VSPs.

El fenómeno de generación de “mutaciones adaptativas” en bacterias proporciona un marco teórico más adecuado para entender cómo el estrés generado por los anticuerpos podría desencadenar el *switching*. Las mutaciones adaptativas pueden definirse como mutaciones que ocurren en respuesta a estímulos del ambiente. Antes de su descubrimiento en la década de 1980^{155,156}, se creía que las mutaciones sólo se generaban de manera espontánea e independiente del ambiente que las selecciona. Los mecanismos moleculares mediante los cuales se producen las mutaciones adaptativas han sido ampliamente estudiados en *E. coli* determinándose que se trata de un “caos genómico inducible” incluyendo rupturas del ADN, mecanismos de reparación recombinacionales, hipermutación general del genoma en una subpoblación celular y la inducción de la ADN polimerasa propensa a errores DinB¹⁴⁴. Si bien es poco probable que la VA adaptativa en protozoarios tenga que ver con mutaciones a nivel del genoma, el concepto de una respuesta fenotípica variable en la población como resultado de diversos mecanismos específicos que se activan ante un determinado estrés del ambiente resulta útil para explicar nuestras observaciones.

La regulación de la expresión mutuamente excluyente de las VSPs en *Giardia* depende fundamentalmente de factores epigenéticos¹⁵⁷ y de mecanismos dependientes de ARN pequeños⁴³. En cada célula individual, estos factores regulan la expresión de una única VSP y aseguran la mantención de este estado a través de varias generaciones celulares. Marcas epigenéticas en las histonas o el ADN, o incluso el pool de ARNs pequeños derivados de transcritos de VSPs presentes en una célula podrían ser responsables de la mantención de esta “memoria epigenética transgeneracional” que permite la herencia en la expresión de la misma VSP a lo largo de varias generaciones celulares. Sin embargo, esta memoria epigenética es falible, y se producen eventos espontáneos de *switching* luego de un dado

número de divisiones celulares. Nuestras observaciones indican que la VA a nivel poblacional se acelera ante la estimulación con anticuerpos, por lo que es posible que este tipo de estrés aumente la frecuencia de estos eventos de “reseteo” de la memoria epigenética, dando lugar a la expresión de una nueva VSP. Dado que los anticuerpos inducen cambios importantes en toda la extensión de la membrana plasmática, liberando una gran cantidad de microvesículas que se llevan gran parte del contenido citoplasmático celular y alterando seguramente el metabolismo de la célula, es probable que el *switching* sea el resultado de la suma de varios factores desencadenados por los anticuerpos. Sin embargo, un mejor entendimiento de los eventos celulares que llevan a la inducción del *switching* sólo será posible cuando se logre una mayor comprensión de los mecanismos moleculares que regulan este proceso en *Giardia*.

6.4. Comentarios finales.

La interacción de los microorganismos que poseen VA con los anticuerpos fue uno de los primeros y principales focos de estudios en lo que concierne a la VA como área de investigación. Los primeros reportes acerca de las interacciones de los tripanosomas africanos, así como también de protozoarios de vida libre con anticuerpos datan de principios del siglo XX y coinciden con el descubrimiento de la VA en sí. Estudios posteriores en estos mismos protozoarios y en otros en los que también se describió un mecanismo de VA se dieron a lo largo del mismo siglo con un enfoque similar²⁰. Posteriormente, la revolución en la Biología Molecular hacia finales del siglo pasado cambió el foco de las investigaciones en el área de la VA hacia los mecanismos moleculares responsables de la regulación de estos procesos¹⁹. Sin embargo, dada la noción generalizada de la VA como un proceso espontáneo e independiente del ambiente¹⁹, si bien se han hecho avances considerables en lo que concierne a los mecanismos moleculares de regulación de la VA en diferentes microorganismos, no se ha puesto el mismo énfasis en indagar si estos mecanismos podrían estar afectados por señales extracelulares.

En este trabajo de tesis nos propusimos indagar este aspecto relegado de la VA utilizando como modelo al protozoario parásito *Giardia lamblia*. La aplicación de un enfoque de *single cell* (mediante la medición de propiedades de células individuales por citometría, así como también con diseños experimentales basados en la clonación de células individuales) junto con la utilización de tecnologías más modernas de microscopía y de biología celular y molecular sumados al mayor entendimiento actual de los mecanismos celulares básicos, nos permitieron encarar este fenómeno ampliamente estudiado en el pasado, pero desde otra perspectiva sacando nuevas conclusiones.

El principal avance logrado se puede resumir en la descripción de un modelo de interacción de los protozoarios con los anticuerpos, que se basa en una serie de eventos principalmente a nivel de la membrana plasmática que aceleran el *switching* a nivel de su regulación (*switching* genético) y del recambio efectivo de la proteína variable original por la nueva (*switching* propiamente dicho):

- i. Durante una infección, el contacto inicial de los parásitos con los anticuerpos dirigidos hacia las proteínas variables de superficie desencadena una serie de eventos a nivel de la membrana plasmática que llevan a la liberación de los anticuerpos de la superficie celular en microvesículas. Dado que la activación de este proceso es dependiente de la aglutinación de las proteínas de superficie, es posible que cualquier otro efector de la inmunidad capaz de adherirse a la superficie del parásito genere el mismo efecto. De esta forma, los parásitos podrían evitar la opsonización y aglutinación, como así también las respuestas inmunológicas subsiguientes durante una ventana de tiempo hasta que la concentración de anticuerpos llegue a niveles capaces de saturar este sistema.

- ii. Los procesos desencadenados por los anticuerpos a nivel de la membrana plasmática alteran la homeostasis celular incrementando la probabilidad de *switching* genético a nivel de las células individuales.
- iii. En la subpoblación de células en las que ocurre el *switching* genético hay una colocación de las proteínas variables iniciales con las nuevas. En este caso, dado que las proteínas variables iniciales se siguen uniendo a los anticuerpos, éstas se eliminan preferencialmente en microvesículas acelerándose así el *switching* propiamente dicho. Este proceso achica aún más la ventana de tiempo en donde el parásito es vulnerable a la acción de los anticuerpos, permitiendo que un mayor número de *switchers* sobrevivan a la respuesta inmunológica adquirida del hospedador.
- iv. Dado que la inducción del *switching* genético es aleatoria en la población, es posible que gran parte de los parásitos no lleguen a completar el proceso. Esta podría ser la causa por la que se observa una baja significativa en el número de parásitos luego del inicio de la respuesta inmunológica adquirida.

6.5. Perspectivas futuras.

El presente trabajo de tesis aporta una nueva arista al estudio de los mecanismos de VA en protozoarios, desafiando conceptos ampliamente normalizados en esta área de estudio y sirviendo de base para el planteamiento de nuevos interrogantes que permitan avanzar en el entendimiento de éste fenómeno.

Uno de los principales interrogantes que quedan aún abiertos tiene que ver con los mecanismos moleculares que conectan los eventos desencadenados a nivel de la membrana plasmática con la maquinaria de regulación de la expresión mutuamente excluyente de las VSPs. Considerando que el *switching* genético como respuesta al estrés de anticuerpos se induce de manera bastante aleatoria en la población, las estrategias para encarar este problema deben ser mediante enfoques de *single cell*. Las disciplinas ómicas podrían resultar de suma utilidad para la identificación de potenciales mecanismos involucrados. Los análisis comparativos de transcriptómica y proteómica entre parásitos tratados con anticuerpos anti-VSP y parásitos no tratados podrían ser de utilidad para la identificación de potenciales moléculas involucradas, que servirían de punto de partida para futuros estudios que lleven a una comprensión más acabada de este fenómeno.

Finalmente, dado que nuestras observaciones inauguran un nuevo paradigma de VA entendida como un fenómeno de variación fenotípica adaptativa, cabe preguntarse si esto ocurre también en otros protozoarios parásitos con VA como *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei* o *Babesia bovis*. La aplicación de estrategias similares a las utilizadas para *Giardia* en este trabajo, podrían resultar de utilidad para indagar el mismo problema en otros modelos.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo I.

VSPs identificadas en el genoma de *G. lamblia* ensamblaje A1 utilizando como criterio la presencia de péptido señal, de una región N-terminal rica en motivos CXXC, un dominio transmembrana y un tallo citoplasmático de secuencia CRGKA. Se indica el número de identificación (ID) de cada VSP tanto en la base de datos GenBank como en GiardiaDB, el producto de cada gen según su anotación en la base de datos, su longitud en número de residuos de aminoácidos (AAs), el número de motivos CXXC y la secuencia correspondiente a los últimos 39 residuos de aminoácidos C-terminales alineadas por Clustal Omega. El código de colores en las secuencias alineadas indican las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos correspondientes (verde, glicinas y aminoácidos con grupo hidroxilo, sulfhidrilo o amina; magenta, aminoácidos básicos; rojo, aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos; azul, aminoácidos ácidos). Al final del alineamiento se indican los parámetros de conservación en cada posición (un asterisco en la posición indica la conservación completa de un residuo de aminoácido en esa posición, los dos puntos indican conservación entre residuos con propiedades muy similares, el punto indica conservación entre residuos con propiedades menos similares, la ausencia de símbolo indica la ausencia de conservación en la posición correspondiente).

ID GenBank	ID GiardiaDB	Producto	AAs	CXXC	Secuencia C-terminal
KAE8301267.1	GL50803_00137612	VSP	732	28	NTNKSGLSAGAIAGISVAVIIVVGGLVGFLCWWFMCRGKA
KAE8304846.1	GL50803_0014586	VSP with INR	719	29	STNKSGLSAGAIAGISVAVIIVVGGLVGFLCWWFMCRGKA
KAE8304847.1	GL50803_00d14586	VSP with INR	719	29	STNKSGLSAGAIAGISVAVIIVVGGLVGFLCWWFMCRGKA
KAE8301208.1	GL50803_00137614	VSP	689	28	GSNRSGLSTGAIAGISVAVIIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8305600.1	GL50803_00d14331	VSP	419	15	GSNRSGLSTGAIAGISVAVIIVVGGLVGFLCWWFVCRGKA
KAE8305601.1	GL50803_0014331	VSP	419	15	GSNRSGLSTGAIAGISVAVIIVVGGLVGFLCWWFVCRGKA
KAE8303950.1	GL50803_00137606	VSP	736	28	NTNRSGLSTGAIAGISVAVIIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8302112.1	GL50803_00113450	VSP with INR	709	29	NTNRSGLSTGAIAGISVAVVAVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8303365.1	GL50803_0050143	VSP AS8	616	26	STNRSGLSTGAIAGISVAVVAVVGGLVGFLCWWFVCRGKA
KAE8305454.1	GL50803_00115742	VSP	591	22	STNKSGLSTGAIAGISVAVVAVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8305472.1	GL50803_0050101	VSP	593	22	STNKSGLSTGAIAGISVAVVAVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8306023.1	GL50803_00137604	VSP S8	633	25	SANRSGLSTGAIAGISVAVIIVVAGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8305263.1	GL50803_0041472	VSP	587	22	SMNKSGLSTGTIAGISVAVIIVVGGLVGFLCWWFVCRGKA
KAE8304145.1	GL50803_00137620	VSP	680	28	SSNRSGLSTGAIAGISVAVIIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8302797.1	GL50803_0050289	VSP	938	30	STNRSGLSTGAIIVGIFVAVIIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8302100.1	GL50803_00113439	VSP with INR	704	29	NTNKSGLSAGAIAGISVAVIIVVAGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8303639.1	GL50803_00137618	VSP	737	28	NTNKSGLSAGAIAGISVAVIIVVAGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8301207.1	GL50803_0050370	VSP AS12	547	19	SMNKSGLSTGAIAGISVAAIIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8301284.1	GL50803_0013727	VSP	540	19	SMNKSGLSTGAIAGISVAVIIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8303589.1	GL50803_0016501	VSP with INR	692	29	SMNKSGLSTGAIAGISVAVIIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8303590.1	GL50803_00d16501	VSP with INR	692	29	SMNKSGLSTGAIAGISVAVIIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8304970.1	GL50803_0013390	VSP	721	31	STNKSGLSTGAIAGISVAVIIVVGGLVGFLCWWFVCRGKA
KAE8304974.1	GL50803_00137722	VSP	661	27	STNKSGLSTGAIAGISVAVIIVVGGLVGFLCWWFVCRGKA
KAE8304975.1	GL50803_00137723	VSP	661	27	STNKSGLSTGAIAGISVAVIIVVGGLVGFLCWWFVCRGKA
KAE8304612.1	GL50803_00d113304	VSP	636	27	NTNKSGLSTGAIAGISVAVIIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8304640.1	GL50803_00113304	VSP	636	27	NTNKSGLSTGAIAGISVAVIIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8303502.1	GL50803_0040591	VSP AS8	617	26	STNRSGLSTGAIAGISVAVIIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8303324.1	GL50803_0050317	VSP	699	30	STNKSGLSMGAIAGISVAVIIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8303064.1	GL50803_00113797	VSP with INR (TSA417)	713	29	STNKSGLSTGAIAGISVAVIIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8302221.1	GL50803_00101010	VSP with INR	419	16	STNRSGLSTGAIAGISVAVIIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8301851.1	GL50803_0087628	VSP	616	21	STNKSGLSTGAIAGISVAVIIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8301981.1	GL50803_00d11521	VSP	628	24	STNKSGLSTGAIAGISVAVIIVVGGLVGFLCWWFICRGKA

KAE8301982.1	GL50803_0011521	VSP	628	24	STNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLIGFLCWWFICRGKA
KAE8303879.1	GL50803_00d103992	VSP	627	25	STNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLIGFLCWWFICRGKA
KAE8303880.1	GL50803_00103992	VSP	627	25	STNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLIGFLCWWFICRGKA
KAE8301682.1	GL50803_0089315	VSP	1621	40	STNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8301901.1	GL50803_0038901	VSP with INR	1937	56	STNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8303206.1	GL50803_00137752	VSP	1419	64	STNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8304911.1	GL50803_0050066	VSP	1229	38	STNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8305455.1	GL50803_0050100	VSP	775	26	STNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8305473.1	GL50803_0050102	VSP	410	16	STNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8305587.1	GL50803_00102662	VSP	521	24	STNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8301639.1	GL50803_0050392	VSP	926	43	STNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8301640.1	GL50803_00112647	VSP	419	17	STNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8301798.1	GL50803_00113163	VSP	632	26	STNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8302411.1	GL50803_00137729	VSP	403	18	STNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8302464.1	GL50803_0050359	VSP	636	25	STNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8302465.1	GL50803_00134710	VSP	636	25	STNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8302693.1	GL50803_00119706	VSP	673	23	STNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8302694.1	GL50803_00119707	VSP	673	23	STNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8303272.1	GL50803_00d101765	VSP	699	30	STNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8303273.1	GL50803_00101765	VSP	699	30	STNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8304422.1	GL50803_0050229	VSP	740	28	STNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8304423.1	GL50803_00d50229	VSP	740	28	STNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8304551.1	GL50803_00111933	VSP	741	28	STNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8304552.1	GL50803_00111936	VSP	741	28	STNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8304748.1	GL50803_00114813	VSP	532	24	STNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8305191.1	GL50803_00137714	VSP with INR	627	24	STNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8305192.1	GL50803_0011470	VSP with INR	627	24	STNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8301316.1	GL50803_0050379	VSP	687	27	SSNKSGLSTGAIAGISVAAIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8301282.1	GL50803_00112113	VSP	681	27	GTNKSGLSTGAIAGISVAAIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8301283.1	GL50803_0050375	VSP	681	27	GTNKSGLSTGAIAGISVAAIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8301306.1	GL50803_0041227	VSP	529	22	STNKSGLSTGAIAGISVAAIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8304120.1	GL50803_00113357	VSP	1480	48	SVNKGGLSTGAIAGITVAVVVVVGGLAGFLCWWFICRGKA
KAE8304113.1	GL50803_005812	VSP	409	14	GVNKSGLSTGAIAGISVAVIAVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8304321.1	GL50803_00114162	VSP	864	42	NVNKSGLSTGAIAGISVAVIVIVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8304771.1	GL50803_00137605	VSP with INR	445	20	SVNKSGLSTGAIAGISVAVVVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8304084.1	GL50803_00137608	VSP with INR	531	22	SVNKSGLSTGAIAGIAVAVVVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8304195.1	GL50803_00221693	VSP (VSPA6)	1181	52	SVNKSGLSTGAIAGISVAVVVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8306128.1	GL50803_0041626	VSP	1088	54	SVNKSGLSTGAIAGIAVAVIVIVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8304979.1	GL50803_0037093	VSP	734	31	SVNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8304374.1	GL50803_00113024	VSP	385	17	SVNKSGLSTGAIAGISVAVIVIVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8304378.1	GL50803_0050225	VSP	1154	54	SVNKSGLSTGAIAGISVAVIVIVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8303800.1	GL50803_0028626	VSP	168	4	SVNKSGLSTGAIAGIAVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8302141.1	GL50803_0050345	VSP	1347	38	SVNKSGLSTGAIAGIAVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8303364.1	GL50803_00137613	VSP with INR	394	16	SVNKSGLSTGAIAGIAVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8304590.1	GL50803_00103142	VSP with INR	1474	70	SVNKSGLSTGAIAGIAVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8302259.1	GL50803_00115047	VSP	587	26	SVNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8302295.1	GL50803_0033279	VSP	900	44	SVNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8302555.1	GL50803_0050366	VSP with INR	870	42	SVNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8303799.1	GL50803_00112867	VSP	842	24	SVNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8304991.1	GL50803_00137721	VSP	583	24	SVNKSGLSTGAIAGISVAVIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8302857.1	GL50803_00115830	VSP with INR	633	26	STNKSGLSTGAIAGIAVAAIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8302858.1	GL50803_00115831	VSP with INR	633	26	STNKSGLSTGAIAGIAVAAIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA
KAE8305908.1	GL50803_00137681	VSP	370	16	STNKSGLSTGAIAGIAVAAIVVVGGLVGFCLCWWFICRGKA

KAE8305781.1	GL50803_0050116	VSP	271	8	SVNKSGLSTGAIAGIAVAAIIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8301440.1	GL50803_00115797	VSP with INR	682	28	SVNKSGLSTGAIAGISVAAVVVVAGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8301903.1	GL50803_00d115797	VSP with INR	682	28	SVNKSGLSTGAIAGISVAAVVVVAGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8301459.1	GL50803_00d112208	VSP with INR	596	23	STNKSGLSTGAIAGISVAAFVVVAGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8301460.1	GL50803_00112208	VSP with INR (VSP1267)	596	23	STNKSGLSTGAIAGISVAAFVVVAGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8304498.1	GL50803_00d112801	VSP	747	28	STNKSGLSTGAIAGISVAAVVIVAGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8304499.1	GL50803_00112801	VSP	747	28	STNKSGLSTGAIAGISVAAVVIVAGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8305807.1	GL50803_00111732	VSP	708	31	GGNRSGLSTGAIAGISVAVVVVAGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8304683.1	GL50803_00116477	VSP	748	34	GTNRSGLSTGAIAGISVAVVVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8305305.1	GL50803_00137708	VSP	593	22	SMNKSGLSTGAIAGISVAVVVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8305306.1	GL50803_00137707	VSP	593	22	SMNKSGLSTGAIAGISVAVVVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8302717.1	GL50803_00101380	VSP	635	25	STNKSGLSTGAIAGISVAVVVVAGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8303243.1	GL50803_00136003	VSP	551	18	STNKSGLSTGAIAGISVAVVVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8303244.1	GL50803_00136004	VSP	551	18	STNKSGLSTGAIAGISVAVVVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8304652.1	GL50803_0026894	VSP	142	2	TNKSNGSLSTGAIAGIVVAIVIGGLVFLCWWFICRGKA
KAE8302884.1	GL50803_00137740	VSP	598	14	TNKSGSLSTGAIAGIAVAAIIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8302825.1	GL50803_0050290	VSP	2153	56	TNKSSGLSTGAIAGIAVAIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8302826.1	GL50803_00102178	VSP	128	2	TNKSSGLSTGAIAGIAVAIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8301612.1	GL50803_0050391	VSP	1949	45	TNKSSGLSTGAIAGIAVAIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8302093.1	GL50803_008595	VSP	127	2	TNKSSGLSTGAIAGIAVAIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8302436.1	GL50803_0015400	VSP	228	4	TNKSSGLSTGAIAGIAVAIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8302962.1	GL50803_00137744	VSP	1487	70	TNKSSGLSTGAIAGIAVAIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8303742.1	GL50803_0050163	VSP	1983	52	TNKSSGLSTGAIAGIAVAIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8303776.1	GL50803_0050165	VSP	1029	26	TNKSSGLSTGAIAGIAVAIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8304928.1	GL50803_00112207	VSP	205	4	TNKSSGLSTGAIAGIAVAIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8304929.1	GL50803_0050070	VSP	2293	62	TNKSSGLSTGAIAGIAVAIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8305104.1	GL50803_00101496	VSP	398	16	TNKSSGLSTGAIAGIAVAIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8302768.1	GL50803_0014831	VSP4A1	128	2	TNKSSGLSTGAIAGIAVAIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8305958.1	GL50803_0041401	VSP	718	31	ANKSSGLSTGAIAGISVAVVVVAGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8304884.1	GL50803_0050064	VSP	485	24	INKSSGLSTGAIAGISVAVVVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8303846.1	GL50803_0050169	VSP	1602	48	TNKSSRLSTGAIAGISVAVVVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8303970.1	GL50803_0050181	VSP	793	26	TNKSSGLSTGAIAGISVAVVVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8305145.1	GL50803_00137717	VSP	1921	56	TNKSSGLSTGAIAGISVAVVVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8306113.1	GL50803_0013194	VSP AS8	615	26	STNRSGLSTGAIAGISVAV-IVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8303325.1	GL50803_00114674	VSP	720	28	GANRSGLSTGAIAGIAVAVVVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8304460.1	GL50803_0050259	VSP	689	28	GANRSGLSAGAIAGISVAVVAVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8303702.1	GL50803_0032933	VSP	658	25	SVNRGGLSTGAIAGISVAVVAVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8306077.1	GL50803_00137697	VSP	493	15	STNRGGLSTGAIAGISIAVVVVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8305218.1	GL50803_0016472	VSP	425	16	STNKSGLSTGAIAGISVTAVVVVAGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8302587.1	GL50803_00101074	VSP with INR (VSP9B10)	739	28	NTNKSGLSAGAIAGIAVAVIIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8305733.1	GL50803_00137617	VSP	734	29	NTNKGGLSTGAIAGIAVAVIIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8303660.1	GL50803_0014043	VSP	239	6	NVNKSGLSTGAIAGIAVAVVIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8302486.1	GL50803_0050363	VSP	1099	34	STNKSGLSTGAIAGIAVAAVIIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8302366.1	GL50803_00117472	VSP	200	4	SANKSGLSTGAIAGIAVAAVIIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8302368.1	GL50803_00117473	VSP	200	4	SANKSGLSTGAIAGIAVAAVIIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8301969.1	GL50803_0050332	High cysteine membrane protein	419	16	SVNKSGLSTGAIAGIAVAIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8302023.1	GL50803_00117204	VSP	255	4	SVNKSGLSTGAIAGIAVAIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8302558.1	GL50803_00d117204	VSP	255	4	SVNKSGLSTGAIAGIAVAIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8305250.1	GL50803_00112693	VSP	1431	40	SVNKSGLSTGAIAGIAVAIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
KAE8305395.1	GL50803_004313	VSP	197	4	SVNKSGLSTGAIAGIAVAIVVGGLVGFLCWWFICRGKA
Grado de conservación en cada posición					: . ** *.*.** :. :.*.*****:*****

Anexo II.

Modelos de homodimerización para el dominio transmembrana (TMD) de la VSP1267 (GL50803_00112208). Los mismos fueron predichos mediante el *software* PREDDIMER⁶⁵, utilizando la secuencia correspondiente al TMD de la VSP predicho por Phobius⁶⁷ más cinco residuos adicionales correspondientes a la región yxtamembrana conservada hacia el extremo N-terminal (residuos 562 al 591, secuencia: GLSTGAIAGISVAAFVVVAGLVGFLCWWFI), considerando un pH=7. Para cada modelo se indican los ángulos de cruce entre las hélices y el ángulo de giro de cada una, los mapas bidimensionales de potencial de hidrofobicidad molecular (MHP) de la superficie de cada TMD y los modelos tridimensionales de interacción. Los mapas bidimensionales de MHP¹⁵⁸ muestran el grado de hidrofobicidad a lo largo de la superficie de cada TMD y están coloreados de acuerdo a las unidades arbitrarias de MHP, correspondiendo el azul a las regiones más hidrofílicas y el marrón a las regiones más hidrofóbicas. La/s región/es contorneadas en cada mapa indican la porción de superficie de cada TMD que forman parte de la interfase de interacción. Los valores de los ejes corresponden al ángulo de rotación alrededor del eje axial y la distancia a lo largo del mismo (Z, medida en Angstroms), respectivamente. Para las representaciones tridimensionales de los modelos de interacción se utilizó el programa *Visual Molecular Dynamics* (VMD)⁶⁶. El esqueleto de cada hélice se representa como cintas de color azul, y sólo los residuos de aminoácidos involucrados en la interacción entre las hélices de cada modelo se representan con volúmenes determinados por el radio de Van der Waals de sus átomos constitutivos (en verde).

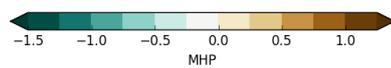
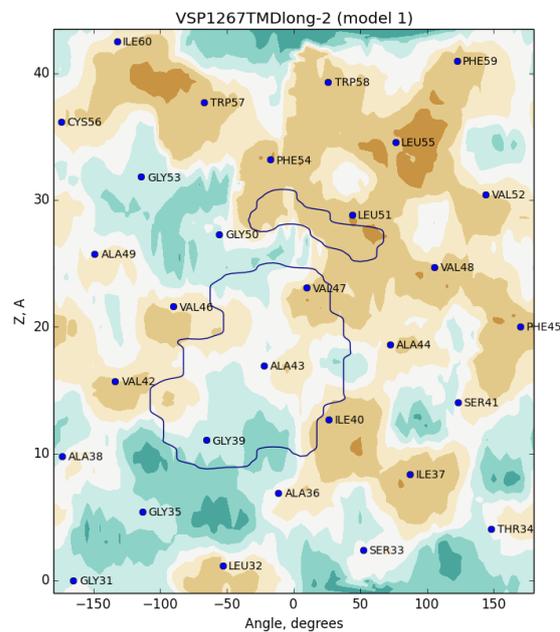
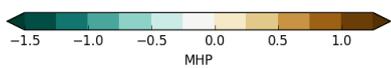
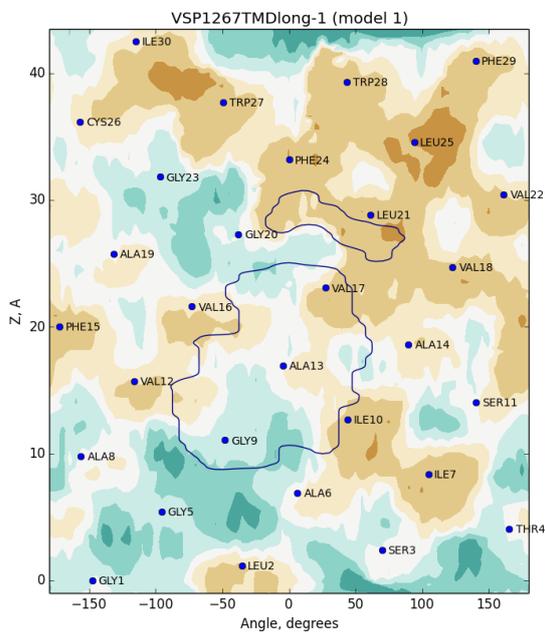
Modelo 1

Ángulo de cruce entre las hélices: -40°

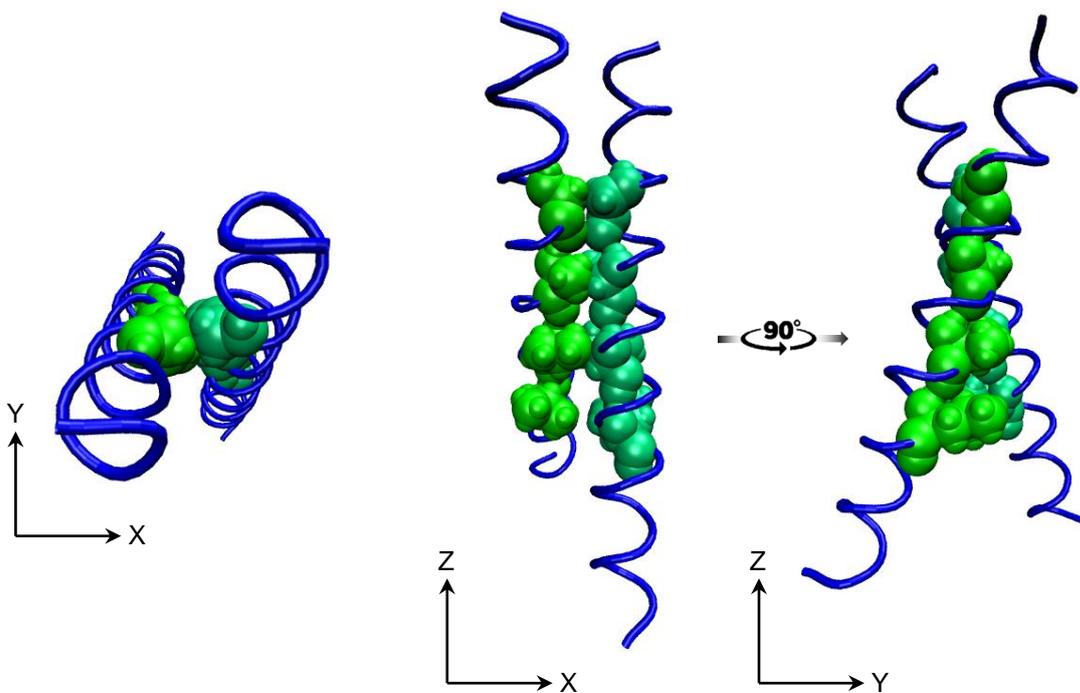
Ángulo de rotación hélice 1: 110°

Ángulo de rotación hélice 2: 110°

Superficie de interacción:



Representación tridimensional:



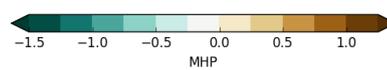
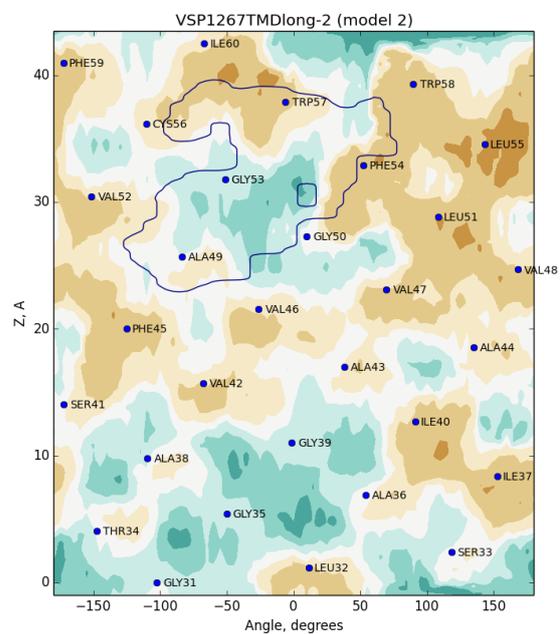
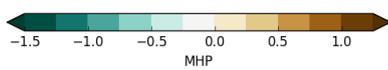
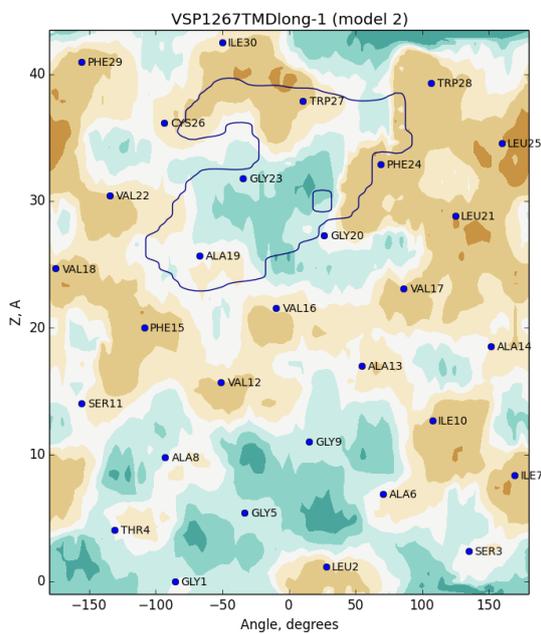
Modelo 2

Ángulo de cruce entre las hélices: $-60,2^\circ$

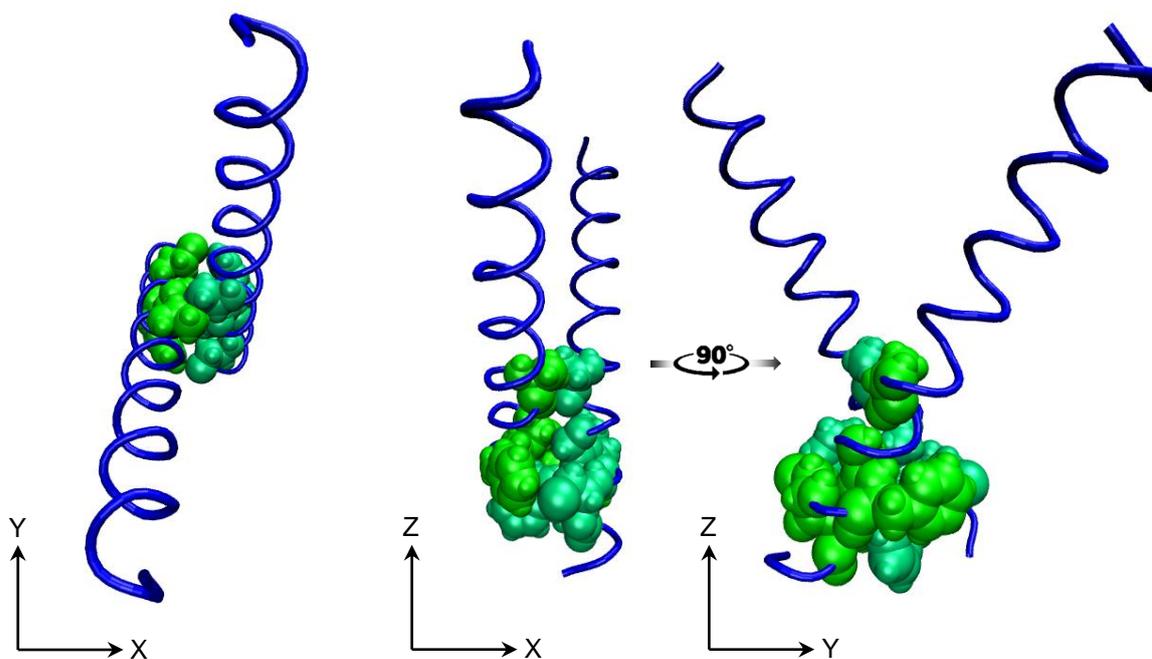
Ángulo de rotación hélice 1: 206°

Ángulo de rotación hélice 2: 206°

Superficie de interacción:



Representación tridimensional:



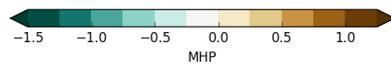
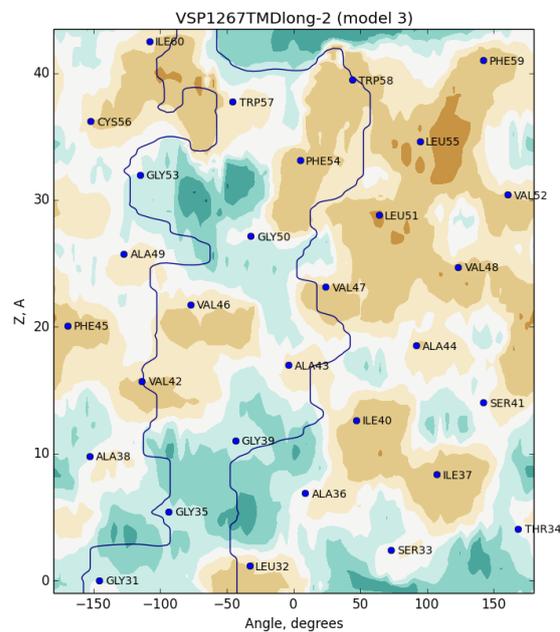
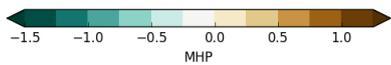
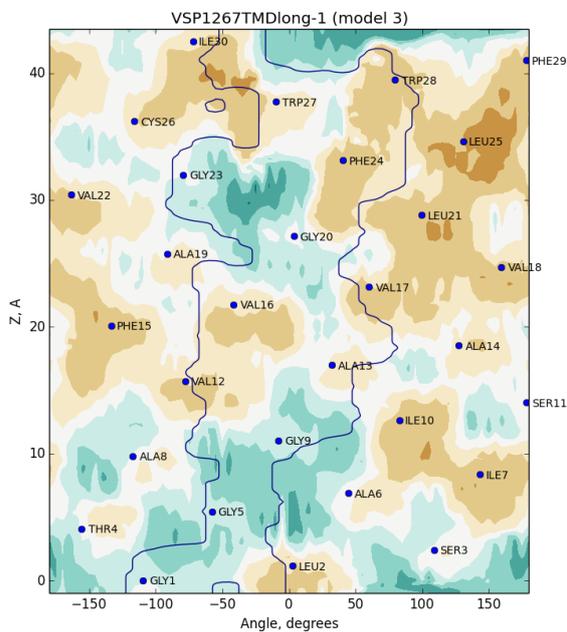
Modelo 3

Ángulo de cruce entre las hélices: $-15,3^\circ$

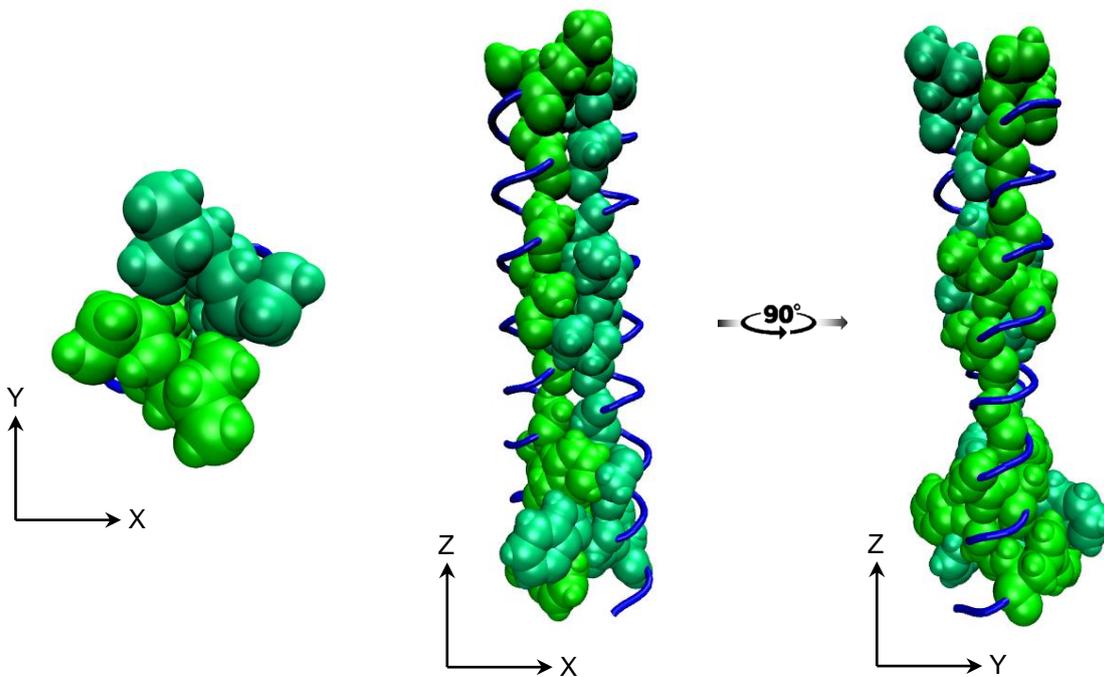
Ángulo de rotación hélice 1: 224°

Ángulo de rotación hélice 2: 224°

Superficie de interacción:



Representación tridimensional:



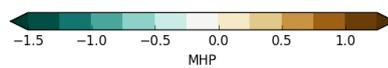
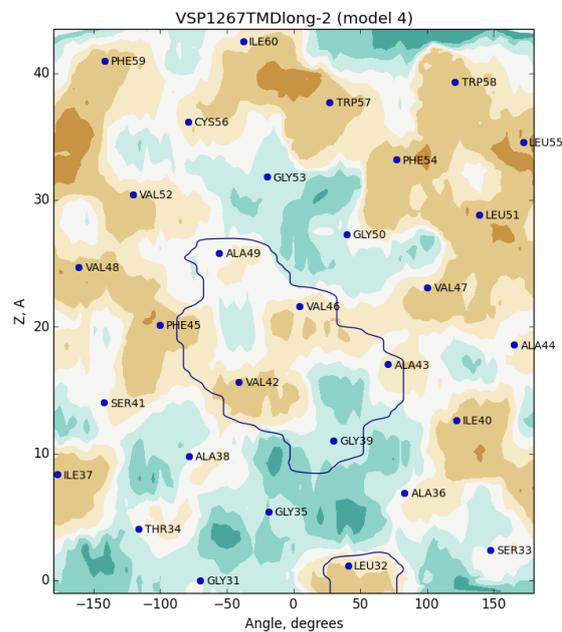
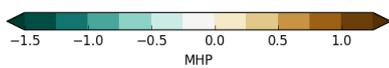
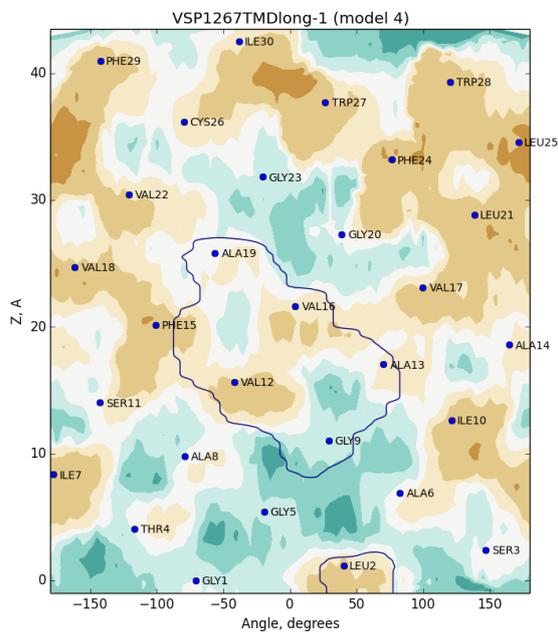
Modelo 4

Ángulo de cruce entre las hélices: $35,1^\circ$

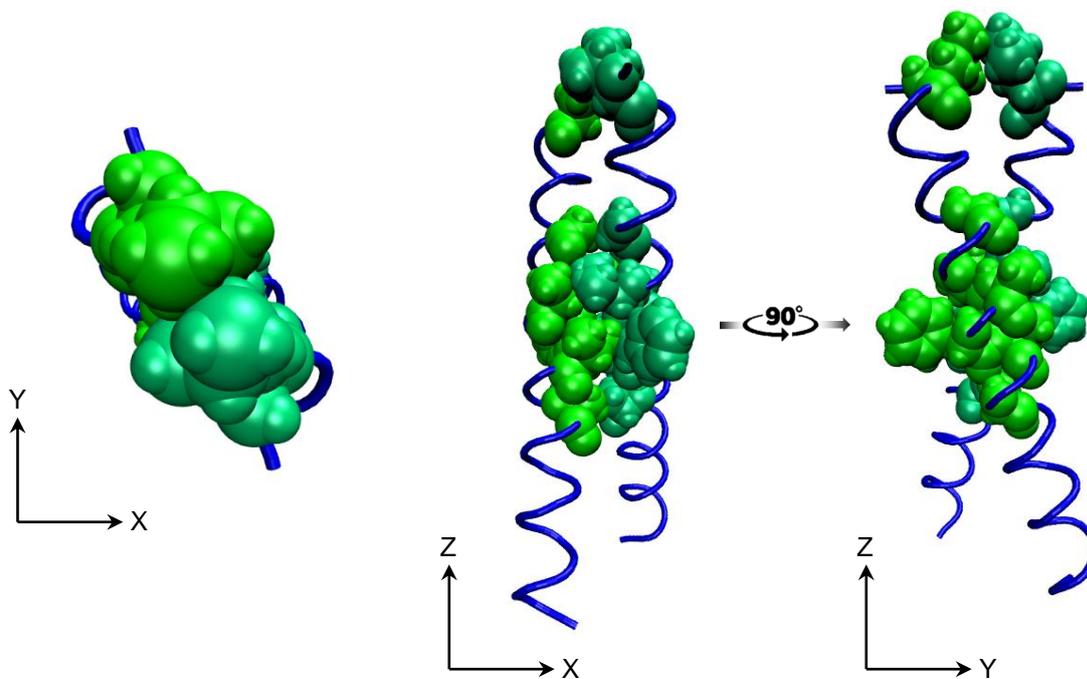
Ángulo de rotación hélice 1: 392°

Ángulo de rotación hélice 2: 392°

Superficie de interacción:



Representación tridimensional:



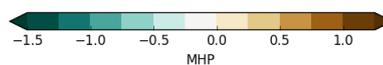
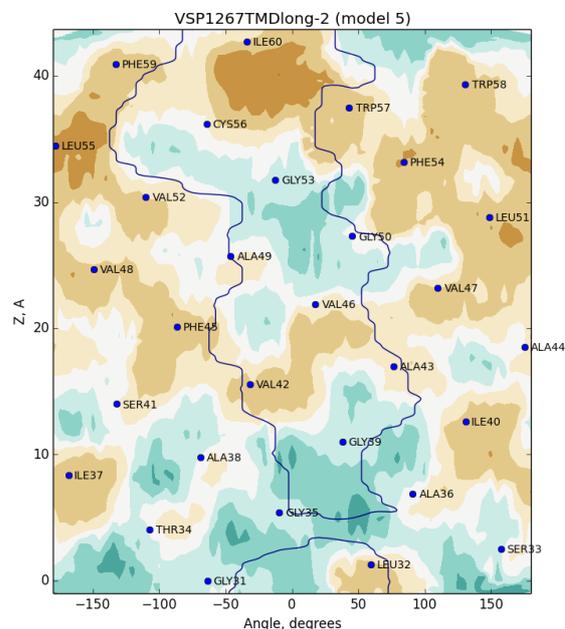
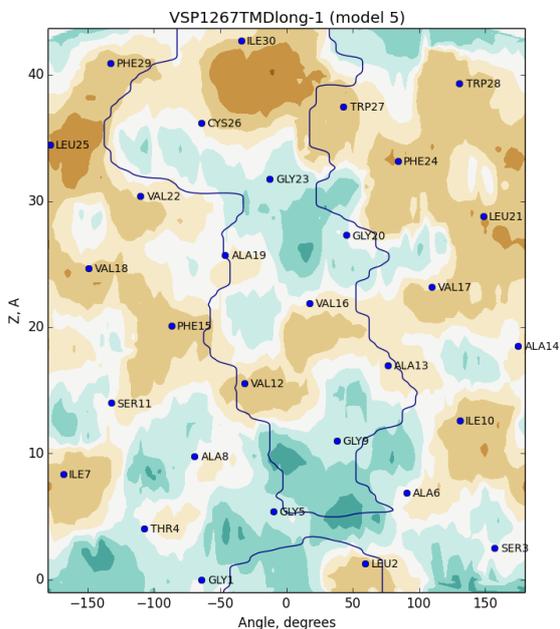
Modelo 5

Ángulo de cruce entre las hélices: $10,5^\circ$

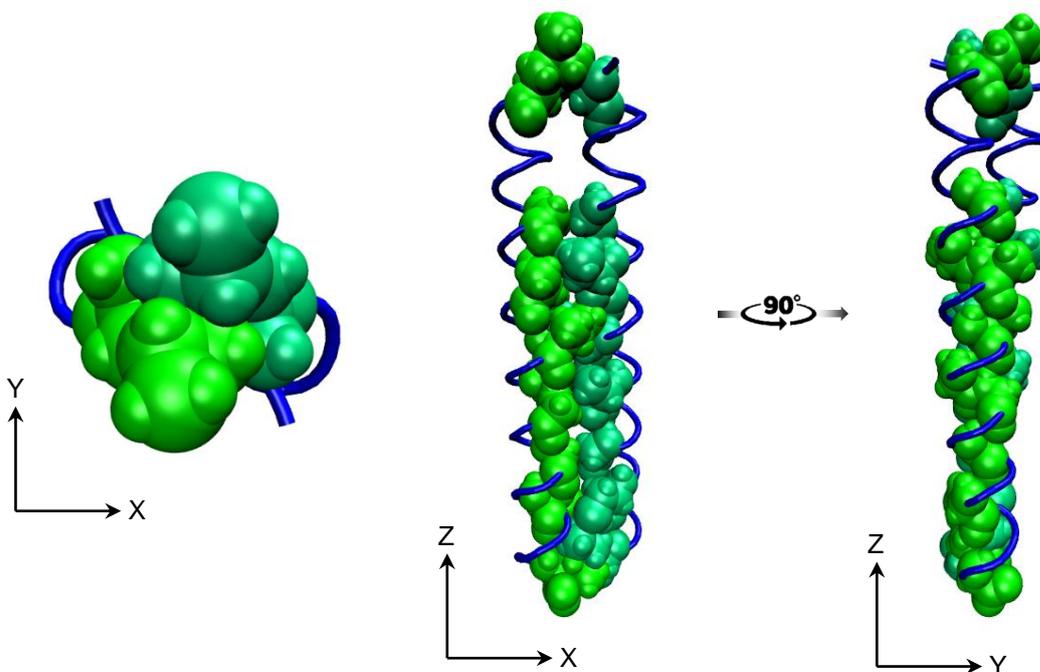
Ángulo de rotación hélice 1: 308°

Ángulo de rotación hélice 2: 308°

Superficie de interacción:



Representación tridimensional:



Anexo III.

Proteínas identificadas en las microvesículas de *G. lamblia* ensamblaje A1 clon TSA417 generadas por tratamiento con mAb 7C2. El perfil proteómico de las mismas se realizó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) a partir de tres clones independientes (indicados como 44674, 40291 y 44675). La lista de proteínas identificadas está ordenada según su abundancia relativa en la muestra (medida a través de la suma del recuento espectral de cada clon, SpC total) en orden decreciente. Se indica el número de identificación (ID) en la base de datos GiardiaDB, el nombre de la proteína identificada (según la anotación en la base de datos), el peso molecular, los recuentos espectrales total e individuales para cada clon, el número de dominios transmembrana presentes en cada proteína (N° TMD) y la presencia o ausencia de péptido señal.

ID GiardiaDB	Proteína identificada	Peso molecular	SpC Total	SpC 44674	SpC 40291	SpC 44675	N° TMD	Péptido señal
GL50803_00113797	VSP with INR (TSA417)	73 kDa	347	145	101	101	1	Si
GL50803_0010311	Ornithine carbamoyltransferase	36 kDa	216	95	64	57	0	Si
GL50803_0088765	Cytosolic heat shock protein 70	72 kDa	180	78	49	53	0	No
GL50803_00103709	BRO1-like domain-containing protein	95 kDa	178	80	30	68	0	No
GL50803_00112103	Arginine deiminase	64 kDa	172	70	53	49	0	No
GL50803_0098054	Heat shock protein 90	81 kDa	158	67	41	50	0	No
GL50803_00114787	Alpha-7.3 giardin	33 kDa	149	67	41	41	0	No
GL50803_006687	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	36 kDa	138	61	33	44	0	No
GL50803_00103373	Alpha-7.1 giardin	43 kDa	122	58	31	33	0	Si
GL50803_006430	14-3-3 protein	29 kDa	116	51	33	32	0	No
GL50803_0016453	Carbamate kinase	34 kDa	115	38	47	30	0	No
GL50803_002107	Hypothetical protein GL50803_002107	36 kDa	109	45	31	33	0	No
GL50803_00112304	Elongation factor 1-alpha	49 kDa	108	49	32	27	0	No
GL50803_0011129	Hypothetical protein GL50803_0011129	34 kDa	108	48	36	24	0	No
GL50803_0016795	Vacuolar protein sorting 4b	53 kDa	100	44	31	25	0	No
GL50803_0011043	Fructose-bisphosphate aldolase	35 kDa	98	44	28	26	0	No
GL50803_0011654	Alpha-1 giardin	34 kDa	96	44	27	25	0	No
GL50803_0014225	CXC-rich protein	189 kDa	96	55	13	28	1	Si
GL50803_0017060	Ankyrin repeat protein 1	66 kDa	95	50	12	33	0	No
GL50803_007796	Alpha-2 giardin	34 kDa	94	45	25	24	0	No
GL50803_006377	Hypothetical protein GL50803_006377	93 kDa	93	50	6	37	0	No
GL50803_0017143	Pyruvate kinase	61 kDa	92	37	24	31	0	No
GL50803_003206	Pyruvate kinase	71 kDa	91	44	17	30	0	No
GL50803_0021942	NADP-specific glutamate dehydrogenase	50 kDa	89	35	30	24	0	No
GL50803_0011118	Enolase	48 kDa	88	36	30	22	0	No
GL50803_0016867	AAA family ATPase	96 kDa	85	49	8	28	0	No
GL50803_0014373	Dynamin	80 kDa	83	38	20	25	0	No
GL50803_00101291	Beta-tubulin 1	50 kDa	81	43	23	15	0	No
GL50803_0013608	Acetyl-CoA synthetase	77 kDa	79	40	15	24	0	No
GL50803_0024842	Ankyrin repeat protein 1	201 kDa	78	39	16	23	1	No
GL50803_00114915	Cysteine protease	70 kDa	71	29	27	15	1	Si
GL50803_0014521	Peroxiredoxin 1	23 kDa	71	27	22	22	0	No
GL50803_00101906	Vacuolar protein sorting 4a	50 kDa	71	33	20	18	0	No
GL50803_00113450	VSP with INR	73 kDa	68	39	29	0	1	Si
GL50803_0017570	Elongation factor 2	100 kDa	66	35	6	25	0	No
GL50803_00112079	Alpha-tubulin	51 kDa	62	27	21	14	0	No
GL50803_009779	Uridine phosphorylase 1	34 kDa	62	27	15	20	0	No
GL50803_0015097	Alpha-14 giardin	38 kDa	60	34	12	14	0	No
GL50803_0029327	Vacuolar protein sorting 2	23 kDa	60	27	15	18	0	No
GL50803_0090872	Phosphoglycerate kinase	44 kDa	58	23	22	13	0	No
GL50803_0010255	Putative Translation initiation factor eIF-4A	43 kDa	55	23	18	14	0	No
GL50803_0017105	Intraflagellar transport protein IFT172	215 kDa	53	28	11	14	0	No
GL50803_0012830	Hypothetical protein GL50803_0012830	28 kDa	52	22	19	11	6	No
GL50803_00113553	Kinase, NEK	72 kDa	52	25	7	20	0	No
GL50803_0017163	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	18 kDa	51	19	14	18	0	No
GL50803_001695	Rab11	24 kDa	50	20	14	16	0	No
GL50803_009157	Hypothetical protein GL50803_009157	31 kDa	48	20	12	16	0	No
GL50803_00103454	High cysteine membrane protein Group 1	79 kDa	46	21	13	12	1	Si
GL50803_0011683	Alpha-3 giardin	33 kDa	45	20	12	13	0	No

GL50803_009558	Rab1a	23 kDa	45	15	15	15	0	No
GL50803_008044	Seven transmembrane protein 1	35 kDa	44	14	18	12	7	No
GL50803_005346	Kinase, NEK	55 kDa	43	19	11	13	1	No
GL50803_0014285	Malate dehydrogenase	62 kDa	43	16	19	8	0	No
GL50803_0011301	Nucleoside diphosphate kinase	17 kDa	43	15	17	11	0	No
GL50803_009704	Transketolase	78 kDa	42	19	7	16	0	No
GL50803_00112846	Kinesin-3	121 kDa	41	24	7	10	0	No
GL50803_0060750	Hypothetical protein GL50803_0060750	24 kDa	39	14	15	10	3	No
GL50803_0010358	A-type flavoprotein	47 kDa	38	18	9	11	0	No
GL50803_0033769	NADH oxidase	50 kDa	38	15	14	9	0	No
GL50803_0087202	Putative TPR repeat family protein	75 kDa	37	20	7	10	1	No
GL50803_007532	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A	72 kDa	37	18	6	13	0	No
GL50803_004026	Alpha-19 giardin	48 kDa	36	18	6	12	0	No
GL50803_008805	Kinase, SCY1	103 kDa	36	21	0	15	0	No
GL50803_0012150	Putative Alanine aminotransferase	58 kDa	36	15	14	7	0	No
GL50803_0016125	FAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase	119 kDa	34	14	9	11	0	No
GL50803_0016353	Hypothetical protein GL50803_0016353	84 kDa	34	15	7	12	1	No
GL50803_007789	ADP-ribosylation factor 1	22 kDa	33	14	10	9	0	No
GL50803_00137713	Hypothetical protein GL50803_00137713	136 kDa	33	17	9	7	5	No
GL50803_0016375	Intraflagellar transport protein IFT56	60 kDa	33	16	10	7	0	No
GL50803_009750	Intraflagellar transport protein IFT74/72	63 kDa	33	14	7	12	0	No
GL50803_0022850	Kinase, CMGC MAPK	41 kDa	33	15	11	7	0	No
GL50803_005810	Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	15 kDa	33	15	8	10	0	No
GL50803_0027310	Stress-induced-phosphoprotein 1	65 kDa	33	16	8	9	0	No
GL50803_008496	Rac/Rho-like protein	24 kDa	32	13	12	7	0	No
GL50803_0015214	Serine/threonine-protein phosphatase	35 kDa	32	16	8	8	0	No
GL50803_0017451	Deoxynucleoside kinase	29 kDa	31	9	13	9	0	No
GL50803_0014614	Eukaryotic translation initiation factor 5A	17 kDa	31	13	9	9	0	No
GL50803_008826	Glucokinase	38 kDa	31	13	10	8	0	No
GL50803_003331	Malate dehydrogenase	35 kDa	31	14	8	9	0	No
GL50803_007439	Ser/Thr phosphatase 2A regulatory subunit A	72 kDa	31	12	10	9	0	No
GL50803_0016504	Hypothetical protein GL50803_0016504	97 kDa	30	15	6	9	0	No
GL50803_007244	Hypothetical protein GL50803_007244	21 kDa	30	10	13	7	3	No
GL50803_007843	Hypothetical protein GL50803_007843	22 kDa	30	14	10	6	0	No
GL50803_0015106	Importin beta-3 subunit	128 kDa	30	16	4	10	0	No
GL50803_0015297	Ribokinase	37 kDa	30	15	7	8	0	No
GL50803_0014551	Alpha-6 giardin	33 kDa	29	13	9	7	0	No
GL50803_0016412	Putative Heat-shock protein	95 kDa	29	19	0	10	0	No
GL50803_005649	Alpha-10 giardin	34 kDa	28	10	11	7	0	No
GL50803_00103437	Alpha-9 giardin	34 kDa	28	13	9	6	0	No
GL50803_008407	Aminoacyl-histidine dipeptidase	55 kDa	28	15	7	6	0	No
GL50803_00112831	Cysteine protease	70 kDa	28	28	0	0	1	Si
GL50803_009115	Glucose-6-phosphate isomerase	64 kDa	28	15	4	9	0	No
GL50803_0016916	Hypothetical protein GL50803_0016916	187 kDa	28	11	8	9	1	Si
GL50803_0015411	Kinase, NEK	78 kDa	28	9	11	8	0	No
GL50803_0010429	Wos2 protein	21 kDa	28	9	12	7	0	No
GL50803_0016653	FYVE zinc finger domain-containing protein	103 kDa	27	10	9	8	0	No
GL50803_004197	Phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform	39 kDa	27	13	7	7	0	No
GL50803_008822	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	65 kDa	26	18	0	8	0	No
GL50803_00113656	Cysteine protease	70 kDa	26	0	26	0	1	Si
GL50803_0016235	Kinase, CAMK CAMKL	38 kDa	26	13	5	8	0	No
GL50803_00101074	VSP with INR	77 kDa	26	12	9	5	1	Si
GL50803_00137618	VSP with INR	76 kDa	26	11	15	0	1	Si
GL50803_008903	Copine I	29 kDa	25	10	7	8	0	No
GL50803_0014993	Diphosphate-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase	60 kDa	25	15	10	0	0	No
GL50803_0015869	GTP-binding nuclear protein RAN/TC4	25 kDa	25	11	7	7	0	No
GL50803_0017223	Intraflagellar transport protein IFT80	115 kDa	25	16	5	4	1	No
GL50803_0016636	Rab2b	25 kDa	25	14	8	3	0	No
GL50803_0013998	Threonyl-tRNA synthetase	79 kDa	25	17	0	8	0	No
GL50803_0017153	Alpha-11 giardin	35 kDa	24	6	13	5	0	No
GL50803_0014567	Hypothetical protein GL50803_0014567	21 kDa	24	11	7	6	0	No
GL50803_0017251	Intraflagellar transport protein IFT140	212 kDa	24	13	3	8	2	No

GL50803_005643	Kinase, NEK	76 kDa	24	17	2	5	0	No
GL50803_0017254	Phosphoglucomutase	74 kDa	24	11	5	8	0	No
GL50803_0015472	Vacuolar protein sorting 46a	20 kDa	24	11	7	6	0	No
GL50803_0091056	Aspartate aminotransferase	48 kDa	23	9	8	6	0	No
GL50803_007195	Glutamate synthase	98 kDa	23	13	0	10	0	No
GL50803_0033629	Hypothetical protein GL50803_0033629	41 kDa	23	13	4	6	0	No
GL50803_0015428	Intraflagellar transport protein IFT81	76 kDa	23	10	5	8	0	No
GL50803_0015567	Rab2a	24 kDa	23	13	5	5	0	No
GL50803_0014469	R-SNARE 3	26 kDa	23	10	8	5	2	No
GL50803_0087817	WD40 repeat protein	168 kDa	23	16	0	7	0	No
GL50803_0027925	Ankyrin repeat protein 1	88 kDa	22	10	6	6	0	No
GL50803_0011354	Hypothetical protein GL50803_0011354	30 kDa	22	11	5	6	0	No
GL50803_008348	Hypothetical protein GL50803_008348	23 kDa	22	9	7	6	0	No
GL50803_0016660	Intraflagellar transport protein IFT88	93 kDa	22	16	0	6	0	No
GL50803_009827	Thioredoxin reductase	34 kDa	21	8	4	9	0	No
GL50803_0090710	Vacuolar protein sorting 22	27 kDa	21	9	6	6	0	No
GL50803_008944	GTPase SAR1 family protein	21 kDa	20	8	5	7	0	No
GL50803_0014318	Hypothetical protein GL50803_0014318	26 kDa	20	7	6	7	0	No
GL50803_009413	Protein disulfide isomerase PDI2	50 kDa	20	10	6	4	1	Si
GL50803_00104250	Thioredoxin	14 kDa	20	7	8	5	0	No
GL50803_0017255	Hypothetical protein GL50803_0017255	74 kDa	19	10	5	4	0	No
GL50803_0028962	Hypothetical protein GL50803_0028962	34 kDa	19	7	8	4	1	Si
GL50803_002483	Kinase, NEK	57 kDa	19	10	6	3	0	No
GL50803_0017333	Kinesin-2	80 kDa	19	10	2	7	0	No
GL50803_008329	Vacuolar protein sorting 25	21 kDa	19	8	6	5	0	No
GL50803_0011540	Hexose transporter	56 kDa	18	7	3	8	11	Si
GL50803_0010882	Hypothetical protein GL50803_0010882	33 kDa	18	10	4	4	0	No
GL50803_0016547	Intraflagellar transport protein IFT122	188 kDa	18	10	3	5	0	No
GL50803_0014713	Intraflagellar transport protein IFT57	41 kDa	18	10	4	4	0	No
GL50803_0016802	Kinase, CMGC CDK	33 kDa	18	8	7	3	0	No
GL50803_0095549	Kinase, NEK	85 kDa	18	8	3	7	0	No
GL50803_0016717	START domain-containing protein	29 kDa	18	9	7	2	0	No
GL50803_0014045	Hypothetical protein GL50803_0014045	36 kDa	17	9	3	5	0	No
GL50803_0015409	Kinase, NEK	57 kDa	17	8	9	0	0	No
GL50803_005795	Leucine-rich repeat protein 1 virus receptor protein	85 kDa	17	3	8	6	0	Si
GL50803_0093938	Triosephosphate isomerase, cytosolic	28 kDa	17	7	5	5	0	No
GL50803_009808	Chaperone protein DnaJ subfamily A	45 kDa	16	10	6	0	0	No
GL50803_0017400	Cyclin	35 kDa	16	12	2	2	0	No
GL50803_003042	Hybrid cluster protein	63 kDa	16	9	4	3	0	No
GL50803_0014846	Hypothetical protein GL50803_0014846	117 kDa	16	9	0	7	0	No
GL50803_0060774	Hypothetical protein GL50803_0060774	136 kDa	16	16	0	0	5	No
GL50803_0010939	Kelch motif-containing protein	38 kDa	16	6	5	5	0	No
GL50803_0016945	Kinesin-13	80 kDa	16	12	0	4	0	No
GL50803_0017195	NECAP	19 kDa	16	7	5	4	0	No
GL50803_007110	Ubiquitin	9 kDa	16	8	4	4	0	No
GL50803_0015252	Ubiquitin-conjugating enzyme E2	19 kDa	16	7	4	5	0	No
GL50803_007323	Vacuolar protein sorting 24	23 kDa	16	7	6	3	0	No
GL50803_0010881	WD40 repeat protein	56 kDa	16	7	4	5	0	No
GL50803_00102813	Ankyrin repeat protein 1	37 kDa	15	5	6	4	0	No
GL50803_002201	Hypothetical protein GL50803_002201	28 kDa	15	5	10	0	0	No
GL50803_009861	Hypothetical protein GL50803_009861	43 kDa	15	9	6	0	0	No
GL50803_0017563	Kinase, CMGC MAPK	44 kDa	15	9	0	6	0	No
GL50803_0016824	Kinase, NEK	91 kDa	15	8	3	4	0	No
GL50803_00102101	Kinesin-3	115 kDa	15	15	0	0	0	No
GL50803_0061550	Superoxide reductase (Desulfoferredoxin)	13 kDa	15	5	6	4	0	No
GL50803_0011100	Tetratricopeptide repeat-containing protein	201 kDa	15	9	0	6	2	No
GL50803_0017090	Trophozoite antigen GTA-1	21 kDa	15	9	6	0	0	No
GL50803_006226	Glycogen phosphorylase	105 kDa	14	8	0	6	0	No
GL50803_0015847	Hypothetical protein GL50803_0015847	29 kDa	14	4	5	5	0	No
GL50803_007422	Hypothetical protein GL50803_007422	69 kDa	14	9	0	5	0	No
GL50803_0014584	Kelch repeat-containing protein	110 kDa	14	10	0	4	0	No
GL50803_0015397	Kinase, CMGC CDK	38 kDa	14	7	4	3	0	No
GL50803_0017625	Kinase, CMGC GSK	40 kDa	14	8	3	3	0	No
GL50803_009421	Kinase, NEK	64 kDa	14	7	2	5	0	No

GL50803_0013272	Uridine nucleosidase	40 kDa	14	6	5	3	0	No
GL50803_0014586	VSP with INR	74 kDa	14	0	14	0	1	Si
GL50803_0010822	WD40 repeat protein	39 kDa	14	6	5	3	0	No
GL50803_003593	Alcohol dehydrogenase 3	45 kDa	13	5	5	3	0	No
GL50803_00114623	EamA-like transporter family protein	46 kDa	13	6	5	2	10	No
GL50803_006633	Farnesyl diphosphate synthase	46 kDa	13	8	0	5	0	No
GL50803_0011380	Hypothetical protein GL50803_0011380	52 kDa	13	8	0	5	0	No
GL50803_0016384	Hypothetical protein GL50803_0016384	27 kDa	13	4	5	4	4	No
GL50803_0088960	Hypothetical protein GL50803_0088960	22 kDa	13	6	7	0	4	No
GL50803_007588	Serine/threonine protein phosphatase 7	47 kDa	13	6	5	2	0	No
GL50803_008682	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	83 kDa	12	8	0	4	0	No
GL50803_007522	Eukaryotic initiation factor 5C	47 kDa	12	9	0	3	0	No
GL50803_003643	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	38 kDa	12	7	5	0	0	No
GL50803_0016818	Glycine-, glutamate-, thienylcyclohexylpiperidine-binding protein	122 kDa	12	9	0	3	0	No
GL50803_008528	Hypothetical protein GL50803_008528	57 kDa	12	6	3	3	0	No
GL50803_0012853	Molybdopterin biosynthesis MoeB protein	30 kDa	12	7	2	3	0	No
GL50803_003417	Preimplantation protein 3	27 kDa	12	9	3	0	0	No
GL50803_0011299	Putative Amino acid transporter	64 kDa	12	6	6	0	11	No
GL50803_0017063	Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase	132 kDa	12	7	0	5	0	No
GL50803_0017053	Ankyrin repeat protein 1	114 kDa	11	9	0	2	0	No
GL50803_0016745	Axoneme-associated protein GASP-180	116 kDa	11	5	0	6	0	No
GL50803_007188	Hypothetical protein GL50803_007188	116 kDa	11	5	2	4	1	Si
GL50803_008692	Hypothetical protein GL50803_008692	37 kDa	11	5	4	2	0	No
GL50803_00d40995	IFT complex B	45 kDa	11	8	0	3	0	No
GL50803_0014004	Kinase, CMGC RCK/Long-flagella protein	60 kDa	11	4	3	4	0	No
GL50803_0024662	L-serine dehydratase	57 kDa	11	5	2	4	0	No
GL50803_00114777	Major facilitator superfamily transporter	73 kDa	11	7	4	0	12	No
GL50803_009098	MT associated TRAF3 interacting protein	52 kDa	11	6	5	0	0	No
GL50803_00102438	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 2	85 kDa	11	5	6	0	10	No
GL50803_0017224	Putative Alpha-SNAP	33 kDa	11	6	2	3	0	No
GL50803_0015347	Putative Glycosaminoglycan polysaccharide lyase	113 kDa	11	8	0	3	1	Si
GL50803_0011495	Rab GDI	53 kDa	11	6	3	2	0	No
GL50803_0096670	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha	148 kDa	11	8	0	3	8	No
GL50803_0013903	Hypothetical protein GL50803_0013903	81 kDa	10	7	0	3	0	No
GL50803_00d7183	Kinase, NEK	87 kDa	10	5	0	5	0	No
GL50803_0016969	RAN binding protein 1	19 kDa	10	6	4	0	0	No
GL50803_0012216	Vacuolar ATP synthase subunit B	55 kDa	10	4	6	0	0	No
GL50803_00137612	VSP with INR	75 kDa	10	10	0	0	1	Si
GL50803_0017327	Xaa-Pro dipeptidase	50 kDa	10	7	3	0	0	No
GL50803_0017054	Acidic ribosomal protein P0	35 kDa	9	7	0	2	0	No
GL50803_0086511	Acyl-CoA synthetase	99 kDa	9	6	0	3	0	No
GL50803_0016779	Cathepsin B	33 kDa	9	0	6	3	0	Si
GL50803_009848	Dynein light chain LC8	10 kDa	9	5	4	0	0	No
GL50803_009719	FAD/FMN dependent oxidoreductase	47 kDa	9	6	3	0	0	No
GL50803_0022543	Hypothetical protein GL50803_0022543	147 kDa	9	5	0	4	0	No
GL50803_007242	Hypothetical protein GL50803_007242	27 kDa	9	2	7	0	3	No
GL50803_0087519	Hypothetical protein GL50803_0087519	34 kDa	9	3	6	0	1	Si
GL50803_009807	Hypothetical protein GL50803_009807	155 kDa	9	9	0	0	0	No
GL50803_0017566	Kinase, CAMK CAMKL	71 kDa	9	5	0	4	0	No
GL50803_0022165	Kinase, STE STE7	40 kDa	9	5	0	4	0	Si
GL50803_0093548	Phospholipase B	63 kDa	9	3	3	3	0	Si
GL50803_007766	Ribosomal protein SA	28 kDa	9	4	3	2	0	No
GL50803_00116477	VSP with INR	76 kDa	9	4	5	0	1	Si
GL50803_0015956	WD40 repeat protein	67 kDa	9	4	2	3	0	No
GL50803_0015218	WD40 repeat protein	84 kDa	9	9	0	0	0	No
GL50803_0010856	Alpha-snap	31 kDa	8	4	4	0	0	No
GL50803_0013273	Axonemal dynein light chain	27 kDa	8	6	0	2	0	No
GL50803_0032399	Hypothetical protein GL50803_0032399	43 kDa	8	4	2	2	0	No
GL50803_00101534	Kinase, NEK	31 kDa	8	4	2	2	0	No
GL50803_0015514	Kinase, STE STE20	58 kDa	8	5	0	3	0	No
GL50803_00115052	Multidrug resistance-associated protein 1	179 kDa	8	6	0	2	12	No
GL50803_002933	Programmed cell death protein-like protein	20 kDa	8	3	2	3	0	No

GL50803_0016709	WD40 repeat protein	213 kDa	8	5	0	3	4	No
GL50803_007962	20S proteasome alpha subunit 6	28 kDa	7	3	2	2	0	No
GL50803_0016667	Acyl-CoA synthetase	99 kDa	7	4	3	0	0	No
GL50803_00112885	Adenine phosphoribosyltransferase	19 kDa	7	3	4	0	0	No
GL50803_00137703	Ankyrin repeat protein 1	57 kDa	7	5	0	2	0	No
GL50803_0010238	Glycosaminoglycan polysaccharide lyase	113 kDa	7	7	0	0	1	Si
GL50803_00101278	Hypothetical protein GL50803_00101278	150 kDa	7	5	0	2	0	No
GL50803_0014704	Hypothetical protein GL50803_0014704	110 kDa	7	7	0	0	2	Si
GL50803_0025205	Hypothetical protein GL50803_0025205	136 kDa	7	4	0	3	15	No
GL50803_0032730	Hypothetical protein GL50803_0032730	188 kDa	7	7	0	0	7	No
GL50803_00112076	Kinase, CDC7	190 kDa	7	7	0	0	0	No
GL50803_009658	Kinase, NEK	35 kDa	7	5	0	2	0	No
GL50803_0014392	Metallo-beta-lactamase superfamily protein	35 kDa	7	5	2	0	0	No
GL50803_0032658	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 2	120 kDa	7	4	0	3	10	No
GL50803_0016707	Putative Clusterin associated protein 1	49 kDa	7	5	0	2	0	No
GL50803_00114609	Pyruvate-flavodoxin oxidoreductase	139 kDa	7	7	0	0	0	No
GL50803_0041927	Rab GTPase-like family protein	19 kDa	7	2	5	0	0	No
GL50803_0021750	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	41 kDa	7	5	0	2	0	No
GL50803_008118	Ribosomal protein S2	27 kDa	7	3	4	0	0	No
GL50803_004653	Serpin 1	39 kDa	7	7	0	0	0	No
GL50803_006242	Translationally controlled tumor protein-like protein	17 kDa	7	3	2	2	0	No
GL50803_00137617	VSP with INR	76 kDa	7	0	7	0	1	Si
GL50803_0092645	5' nucleotidase family protein	67 kDa	6	4	2	0	1	Si
GL50803_009030	Ankyrin repeat protein 1	37 kDa	6	3	3	0	0	No
GL50803_004812	Beta-giardin	31 kDa	6	3	3	0	0	No
GL50803_0033218	Dynein intermediate chain	84 kDa	6	6	0	0	0	No
GL50803_0010829	Glucosamine-6-phosphate deaminase	29 kDa	6	4	2	0	0	No
GL50803_0011309	High cysteine membrane protein Group 1	140 kDa	6	6	0	0	1	Si
GL50803_004149	Homing endonuclease	50 kDa	6	4	2	0	0	No
GL50803_00114497	Hypothetical protein GL50803_00114497	116 kDa	6	4	0	2	0	No
GL50803_0060213	Hypothetical protein GL50803_0060213	186 kDa	6	6	0	0	0	No
GL50803_0060647	Hypothetical protein GL50803_0060647	172 kDa	6	3	0	3	1	No
GL50803_0040496	IAD-4 Dynein heavy chain	553 kDa	6	6	0	0	0	No
GL50803_003581	Intraflagellar transport complex B, subunit 20	15 kDa	6	3	3	0	0	No
GL50803_0016456	Kinesin-2	73 kDa	6	6	0	0	0	No
GL50803_0016443	Protein phosphatase 2A B' regulatory subunit Wdb1	93 kDa	6	4	0	2	0	No
GL50803_00101501	Seryl-tRNA synthetase	52 kDa	6	6	0	0	0	No
GL50803_0010708	Sir2 family protein	75 kDa	6	6	0	0	0	No
GL50803_006563	Uracil phosphoribosyltransferase	23 kDa	6	4	0	2	0	No
GL50803_00114776	Vesicle-fusing ATPase	87 kDa	6	6	0	0	0	No
GL50803_0040817	Actin	42 kDa	5	2	3	0	0	No
GL50803_0028234	Adenylate kinase	32 kDa	5	2	0	3	0	No
GL50803_007562	ADP-ribosylation factor	19 kDa	5	5	0	0	0	No
GL50803_0032778	Ankyrin repeat protein 1	64 kDa	5	5	0	0	0	No
GL50803_00113284	Ankyrin repeat protein 2	28 kDa	5	5	0	0	0	No
GL50803_0016202	Axoneme central apparatus protein	54 kDa	5	5	0	0	0	No
GL50803_0029490	Copine I	30 kDa	5	5	0	0	0	No
GL50803_004349	Endothelin-converting enzyme 2	25 kDa	5	5	0	0	0	No
GL50803_00114246	GTP dependent nucleic acid binding protein	45 kDa	5	5	0	0	0	No
GL50803_0010229	Hypothetical protein GL50803_0010229	59 kDa	5	5	0	0	0	No
GL50803_0010572	Hypothetical protein GL50803_0010572	35 kDa	5	0	5	0	1	Si
GL50803_007664	Intraflagellar transport protein IFT46/ FAP32	36 kDa	5	5	0	0	0	No
GL50803_0015442	KIF-1 binding protein C terminal-containing protein	105 kDa	5	5	0	0	0	No
GL50803_008587	Kinase, AGC NDR	55 kDa	5	2	3	0	0	No
GL50803_00104150	Kinase, PLK	77 kDa	5	5	0	0	0	No
GL50803_00114885	Kinesin-associated protein	86 kDa	5	5	0	0	0	No
GL50803_0022677	Nitroreductase Fd-NR2	29 kDa	5	3	0	2	0	No
GL50803_004063	Nuclear LIM interactor-interacting factor 1	47 kDa	5	3	2	0	0	No
GL50803_0029487	Protein disulfide isomerase	26 kDa	5	2	3	0	0	Si
GL50803_006289	Putative FixW protein	15 kDa	5	2	3	0	0	No
GL50803_007662	RNase L inhibitor	75 kDa	5	3	2	0	0	No
GL50803_0014311	Serine/threonine-protein phosphatase	38 kDa	5	0	5	0	0	No

GL50803_007287	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein	32 kDa	5	3	0	2	0	No
GL50803_0016924	20S proteasome alpha subunit 1	27 kDa	4	2	2	0	0	No
GL50803_0021411	ABC transporter, ATP-binding protein	222 kDa	4	4	0	0	14	No
GL50803_0013478	ADP-ribosylation factor like protein 2a	20 kDa	4	4	0	0	0	No
GL50803_0014019	Cathepsin B	33 kDa	4	0	4	0	0	Si
GL50803_006691	GA binding protein beta-1 chain	24 kDa	4	4	0	0	0	No
GL50803_00103540	Hypothetical protein GL50803_00103540	32 kDa	4	2	0	2	0	No
GL50803_0010698	Hypothetical protein GL50803_0010698	85 kDa	4	4	0	0	0	No
GL50803_00113871	Hypothetical protein GL50803_00113871	91 kDa	4	4	0	0	0	No
GL50803_0016888	Hypothetical protein GL50803_0016888	129 kDa	4	2	0	2	5	Si
GL50803_0017298	Hypothetical protein GL50803_0017298	45 kDa	4	4	0	0	0	No
GL50803_0017332	Hypothetical protein GL50803_0017332	179 kDa	4	4	0	0	0	No
GL50803_002366	Hypothetical protein GL50803_002366	46 kDa	4	4	0	0	0	No
GL50803_0041304	Hypothetical protein GL50803_0041304	313 kDa	4	4	0	0	0	No
GL50803_007537	Kinase, CK1 CK1	46 kDa	4	4	0	0	0	No
GL50803_0092498	Kinase, NEK	102 kDa	4	4	0	0	0	No
GL50803_0024321	Kinase, NEK	33 kDa	4	2	0	2	0	No
GL50803_0013215	Kinase, NEK	66 kDa	4	4	0	0	2	No
GL50803_00103838	Kinase, ULK	212 kDa	4	4	0	0	4	No
GL50803_0024425	PPPDE Putative peptidase domain-containing protein	50 kDa	4	4	0	0	0	No
GL50803_0011740	Putative Ser/Thr phosphatase 2C	39 kDa	4	4	0	0	0	No
GL50803_009909	Pyruvate, phosphate dikinase	98 kDa	4	4	0	0	0	No
GL50803_0060211	Ribosomal protein S19e	15 kDa	4	0	4	0	0	No
GL50803_005010	Ser/Thr phosphatase PP2A-2 catalytic subunit	35 kDa	4	4	0	0	0	No
GL50803_0015215	Serine/threonine-protein phosphatase	35 kDa	4	4	0	0	0	No
GL50803_0014787	Type II inositol-1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase	81 kDa	4	4	0	0	1	No
GL50803_0014460	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	93 kDa	4	4	0	0	0	No
GL50803_00100864	Vacuolar protein sorting 26	55 kDa	4	2	2	0	0	No
GL50803_004204	ADP-sugar diphosphatase	27 kDa	3	3	0	0	0	No
GL50803_007260	Aldose reductase	35 kDa	3	3	0	0	0	No
GL50803_0017121	Bip	73 kDa	3	0	3	0	0	Si
GL50803_009430	CAF1 family ribonuclease	75 kDa	3	0	0	3	0	No
GL50803_0015148	Chaperone protein DnaJ	67 kDa	3	3	0	0	0	No
GL50803_0034684	DEAD box RNA helicase Vasa	74 kDa	3	3	0	0	0	No
GL50803_0015127	Deoxyribose-phosphate aldolase	27 kDa	3	0	3	0	0	No
GL50803_006939	Dynein intermediate chain	70 kDa	3	0	0	3	0	No
GL50803_004463	Dynein light chain	21 kDa	3	3	0	0	0	No
GL50803_0017476	High cysteine membrane protein	224 kDa	3	0	3	0	1	Si
GL50803_0015317	High cysteine membrane protein Group 1	170 kDa	3	0	0	3	1	Si
GL50803_009276	High cysteine protein	50 kDa	3	0	3	0	0	Si
GL50803_0013922	Hypothetical protein GL50803_0013922	114 kDa	3	3	0	0	1	Si
GL50803_0014689	Hypothetical protein GL50803_0014689	98 kDa	3	3	0	0	1	No
GL50803_0021628	Hypothetical protein GL50803_0021628	42 kDa	3	3	0	0	0	No
GL50803_005883	Hypothetical protein GL50803_005883	63 kDa	3	3	0	0	0	No
GL50803_0061272	Hypothetical protein GL50803_0061272	16 kDa	3	3	0	0	0	No
GL50803_0014786	Kinase, NEK	119 kDa	3	3	0	0	0	No
GL50803_0013981	Kinase, NEK	123 kDa	3	3	0	0	0	No
GL50803_0014905	Nuclear LIM interactor-interacting factor 1	30 kDa	3	3	0	0	0	No
GL50803_002452	Ornithine cyclodeaminase	34 kDa	3	3	0	0	0	No
GL50803_0094582	Ornithine decarboxylase	50 kDa	3	3	0	0	0	No
GL50803_0016567	Protein phosphatase PP2A regulatory subunit A	73 kDa	3	3	0	0	0	No
GL50803_0017347	Regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase	23 kDa	3	3	0	0	0	No
GL50803_0014938	Ribosomal protein L12	20 kDa	3	0	3	0	0	No
GL50803_008250	RNA recognition motif-containing protein	17 kDa	3	3	0	0	0	No
GL50803_0023833	Vacuolar protein sorting 35	88 kDa	3	3	0	0	0	No
GL50803_0024947	Vacuolar protein sorting 46b	21 kDa	3	0	3	0	0	No
GL50803_00114674	VSP with INR	73 kDa	3	3	0	0	1	Si
GL50803_0017003	Zinc finger domain-containing protein	38 kDa	3	0	3	0	0	No
GL50803_0015099	20S proteasome alpha subunit 4	23 kDa	2	2	0	0	0	No
GL50803_004059	5'-methylthioadenosine nucleosidase	32 kDa	2	2	0	0	0	No

GL50803_0011599	Acid phosphatase	45 kDa	2	0	2	0	0	Si
GL50803_0090402	Adenylate kinase/UMP-CMP kinase	21 kDa	2	2	0	0	0	Si
GL50803_007414	Ankyrin repeat protein 1	41 kDa	2	2	0	0	0	No
GL50803_0011720	Ankyrin repeat protein 1	48 kDa	2	0	2	0	0	No
GL50803_0012139	Ankyrin repeat protein 3	76 kDa	2	2	0	0	0	No
GL50803_005328	AP2 sigma adaptin	17 kDa	2	0	2	0	0	No
GL50803_006184	Branched-chain amino acid aminotransferase	39 kDa	2	0	2	0	0	No
GL50803_005333	Calmodulin	17 kDa	2	0	2	0	0	No
GL50803_0016468	Cathepsin B	34 kDa	2	0	2	0	0	Si
GL50803_003169	Cathepsin L	62 kDa	2	2	0	0	1	Si
GL50803_00104685	Centrin	20 kDa	2	0	2	0	0	No
GL50803_0017190	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1	51 kDa	2	2	0	0	0	No
GL50803_0013943	Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha subunit	38 kDa	2	2	0	0	0	No
GL50803_0010450	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	12 kDa	2	0	2	0	0	No
GL50803_007569	GTP-binding protein Sar1	21 kDa	2	2	0	0	0	No
GL50803_006283	Helicase	54 kDa	2	2	0	0	0	No
GL50803_00112135	High cysteine membrane protein VSP-like	121 kDa	2	0	2	0	1	Si
GL50803_0016507	Hypothetical protein GL50803_0016507	99 kDa	2	0	2	0	1	No
GL50803_0016522	Hypothetical protein GL50803_0016522	11 kDa	2	0	2	0	0	No
GL50803_006886	Hypothetical protein GL50803_006886	103 kDa	2	2	0	0	0	No
GL50803_009780	Hypothetical protein GL50803_009780	27 kDa	2	0	2	0	1	No
GL50803_00137733	Kinase, NEK	33 kDa	2	2	0	0	0	No
GL50803_004039	Leucine-rich repeat protein	78 kDa	2	0	2	0	0	Si
GL50803_0086600	Methionine aminopeptidase	44 kDa	2	2	0	0	0	No
GL50803_0010858	MYG1 protein	41 kDa	2	2	0	0	0	No
GL50803_0015983	Prolyl-tRNA synthetase	61 kDa	2	2	0	0	0	No
GL50803_0013127	Proteasome subunit beta type 1	25 kDa	2	2	0	0	0	No
GL50803_009088	Protein deglycase	20 kDa	2	2	0	0	0	No
GL50803_0014670	Protein disulfide isomerase PDI3	13 kDa	2	0	2	0	0	Si
GL50803_0016180	Protein phosphatase methylesterase-1	41 kDa	2	0	0	2	0	No
GL50803_0016817	Putative Transglutaminase/protease	52 kDa	2	0	0	2	0	No
GL50803_0010315	Qb-SNARE 5	25 kDa	2	2	0	0	1	No
GL50803_0016720	Radial spokehead-like protein	96 kDa	2	2	0	0	0	No
GL50803_001345	Ribosomal protein L10a	25 kDa	2	2	0	0	0	No
GL50803_0017244	Ribosomal protein L7a	25 kDa	2	2	0	0	0	No
GL50803_006022	Ribosomal protein S20	14 kDa	2	0	2	0	0	No
GL50803_007999	Ribosomal protein S3	25 kDa	2	0	2	0	0	No
GL50803_0016265	Ribosomal protein S3a	28 kDa	2	0	2	0	0	No
GL50803_0014620	Ribosomal protein S6e	28 kDa	2	2	0	0	0	No
GL50803_004547	Ribosomal protein S9	22 kDa	2	0	2	0	0	No
GL50803_005659	S-adenosylmethionine synthetase	48 kDa	2	2	0	0	0	No
GL50803_00137698	Sec13	31 kDa	2	2	0	0	0	No
GL50803_0017460	Selenocysteine-specific translation elongation factor	51 kDa	2	2	0	0	0	No
GL50803_002053	Serine/threonine protein phosphatase	35 kDa	2	2	0	0	0	No
GL50803_009825	TBP-interacting protein TIP49	51 kDa	2	2	0	0	0	No
GL50803_0017411	TCP-1 chaperonin subunit gamma	62 kDa	2	2	0	0	0	No
GL50803_0095162	Tenascin-like protein	62 kDa	2	0	2	0	0	Si
GL50803_0013561	Translation elongation factor 1-beta	25 kDa	2	2	0	0	0	No
GL50803_00480	Translation initiation inhibitor	13 kDa	2	2	0	0	0	No
GL50803_00103785	Transmembrane domain-containing protein	26 kDa	2	2	0	0	6	No
GL50803_004789	Tubulin binding cofactor C family protein	60 kDa	2	2	0	0	0	No
GL50803_0029307	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	49 kDa	2	2	0	0	0	No
GL50803_0087058	Vacuolar ATP synthase subunit C	56 kDa	2	2	0	0	0	No
GL50803_0014961	Vacuolar ATP synthase subunit H	59 kDa	2	2	0	0	2	No
GL50803_0050143	VSP with INR	63 kDa	2	0	2	0	1	Si
GL50803_00119706	VSP with INR	70 kDa	2	0	2	0	1	Si
GL50803_0050259	VSP with INR	70 kDa	2	0	2	0	1	Si
GL50803_007807	WD40 repeat protein	60 kDa	2	2	0	0	0	No

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dobell, C. The Discovery of the Intestinal Protozoa of Man. *Proc. R. Soc. Med.* **13**, 1–15 (1920).
2. Ford, B. Antony van Leeuwenhoek ' s Microscope and the Discovery of Giardia BIOGRAPHY. **21**, 5–7 (2007).
3. Adam, R. D. Biology of Giardia lamblia Biology of Giardia lamblia. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 447–469 (2001).
4. Cacciò, S. M., Thompson, R. C. A., McLauchlin, J. & Smith, H. V. Unravelling Cryptosporidium and Giardia epidemiology. *Trends Parasitol.* **21**, 430–437 (2005).
5. Thompson, R. C. A. Presidential address: Rediscovering parasites using molecular tools - Towards revising the taxonomy of Echinococcus, Giardia and Cryptosporidium. *Int. J. Parasitol.* **32**, 493–496 (2002).
6. Plutzer, J., Ongerth, J. & Karanis, P. Giardia taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **213**, 321–333 (2010).
7. Cavalier-Smith, T. Protist phylogeny and the high-level classification of Protozoa. *Eur. J. Protistol.* **39**, 338–348 (2003).
8. Lipoldová, M. Giardia and Vilém Dušan Lambl. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, 1–4 (2014).
9. Hampl, V. *et al.* Inference of the phylogenetic position of oxymonads based on nine genes: Support for metamonada and Excavata. *Mol. Biol. Evol.* **22**, 2508–2518 (2005).
10. Keeling, P. J. *et al.* The tree of eukaryotes. *Trends Ecol. Evol.* **20**, 670–676 (2005).
11. Carranza, P. G. & Lujan, H. D. New insights regarding the biology of Giardia lamblia. *Microbes Infect.* **12**, 71–80 (2010).
12. Boucher, S. E. & Gillin, F. D. Excystation of in vitro-derived Giardia lamblia cysts. *Infect. Immun.* **58**, 3516–3522 (1990).
13. Elmendorf, H. G., Dawson, S. C. & McCaffery, J. M. The cytoskeleton of Giardia lamblia. *Int. J. Parasitol.* **33**, 3–28 (2003).
14. Prucca, C. G. & Lujan, H. D. Antigenic variation in Giardia lamblia. *Cell. Microbiol.* **11**, 1706–1715 (2009).
15. Luján, H. D. & Svärd, S. G. *Giardia, a model organism.* (Springer, 2011).
16. Deitsch, K. W., Lukehart, S. A. & Stringer, J. R. Common strategies for antigenic variation by bacterial, fungal and protozoan pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 493–503 (2009).
17. EHRLICH, P. Partial Cell Functions. *Scand. J. Immunol.* **31**, 4–13 (1990).
18. Ross, R., Thomson, D. & B, P. R. S. L. A case of sleeping sickness studied by precise enumerative methods: Regular periodical increase of the parasites disclosed. *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Contain. Pap. a Biol. Character* **82**, 411–415 (1910).
19. Turner, C. M. R. A perspective on clonal phenotypic (antigenic) variation in protozoan parasites. *Parasitology* **125**, 17–23 (2002).
20. Craig, A. & Scherf, A. *Antigenic Variation.* (Academic Press).
21. Nash, T. E., Aggarwal, A., Adam, R. D., Conrad, J. T. & Merritt, J. W. J. Antigenic

- variation in *Giardia lamblia*. *J. Immunol.* **141**, 636–641 (1988).
22. Nash, T. E. & Keister, D. B. Differences in excretory-secretory products and surface antigens among 19 isolates of *Giardia*. *J. Infect. Dis.* **152**, 1166–1171 (1985).
 23. Nash, T. E. & Aggarwal, A. Cytotoxicity of monoclonal antibodies to a subset of *Giardia* isolates. *J. Immunol.* **136**, 2628–2632 (1986).
 24. Muller, N. & Gottstein, B. Antigenic variation and the murine immune response to *Giardia lamblia*. *Int. J. Parasitol.* **28**, 1829–1839 (1998).
 25. 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.* **12**, 659–673 (1990).
 26. Gargantini, P. R., Serradell, M. D. C., Rios, D. N., Tenaglia, A. H. & Lujan, H. D. Antigenic variation in the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Curr. Opin. Microbiol.* **32**, 52–58 (2016).
 27. Smith, M. W., Aley, S. B., Sogin, M., Gillin, F. D. & Evans, G. A. Sequence survey of the *Giardia lamblia* genome. *Mol. Biochem. Parasitol.* **95**, 267–280 (1998).
 28. Mowatt, M. R., Aggarwal, A. & Nash, T. E. Carboxy-terminal sequence conservation among variant-specific surface proteins of *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **49**, 215–227 (1991).
 29. Stager, S. & Muller, N. *Giardia lamblia* infections in B-cell-deficient transgenic mice. *Infect. Immun.* **65**, 3944–3946 (1997).
 30. Kulakova, L., Singer, S. M., Conrad, J. & Nash, T. E. Epigenetic mechanisms are involved in the control of *Giardia lamblia* antigenic variation. *Mol. Microbiol.* **61**, 1533–1542 (2006).
 31. Adam, R. D. The *Giardia lamblia* genome. *Int. J. Parasitol.* **30**, 475–484 (2000).
 32. Nash, T. E. & Mowatt, M. R. Characterization of a *Giardia lamblia* variant-specific surface protein (VSP) gene from isolate GS/M and estimation of the VSP gene repertoire size. *Mol. Biochem. Parasitol.* **51**, 219–227 (1992).
 33. Touz, M. C., Conrad, J. T. & Nash, T. E. A novel palmitoyl acyl transferase controls surface protein palmitoylation and cytotoxicity in *Giardia lamblia*. *Mol. Microbiol.* **58**, 999–1011 (2005).
 34. Hiltbold, A., Frey, M., Hulsmeier, A. & Kohler, P. Glycosylation and palmitoylation are common modifications of giardia variant surface proteins. *Mol. Biochem. Parasitol.* **109**, 61–65 (2000).
 35. Papanastasiou, P., McConville, M. J., Ralton, J. & Kohler, P. The variant-specific surface protein of *Giardia*, VSP4A1, is a glycosylated and palmitoylated protein. *Biochem. J.* **322** (Pt 1, 49–56 (1997).
 36. Nash, T. E., Conrad, J. T. & Mowatt, M. R. *Giardia lamblia*: identification and characterization of a variant-specific surface protein gene family. *J. Eukaryot. Microbiol.* **42**, 604–609 (1995).
 37. Gill, G. N. The enigma of LIM domains. *Structure* **3**, 1285–1289 (1995).
 38. Borden, K. L. RING domains: master builders of molecular scaffolds? *J. Mol. Biol.* **295**, 1103–1112 (2000).
 39. Nash, T. E. & Mowatt, M. R. Variant-specific surface proteins of *Giardia lamblia* are

- zinc-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 5489–5493 (1993).
40. Luján, H. D. *et al.* Purification of a variant-specific surface protein of *Giardia lamblia* and characterization of its metal-binding properties. *J. Biol. Chem.* **270**, 13807–13813 (1995).
 41. Udomkesmalee, E. *et al.* Effect of vitamin A and zinc supplementation on the nutriture of children in Northeast Thailand. *Am. J. Clin. Nutr.* **56**, 50–57 (1992).
 42. Mowatt, M. R., Nguyen, B. Y., Conrad, J. T., Adam, R. D. & Nash, T. E. Size heterogeneity among antigenically related *Giardia lamblia* variant-specific surface proteins is due to differences in tandem repeat copy number. *Infect. Immun.* **62**, 1213–1218 (1994).
 43. Prucca, C. G. *et al.* Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. *Nature* **456**, 750–754 (2008).
 44. Saraiya, A. A., Li, W., Wu, J., Chang, C. H. & Wang, C. C. The microRNAs in an ancient protist repress the variant-specific surface protein expression by targeting the entire coding sequence. *PLoS Pathog.* **10**, e1003791 (2014).
 45. Kim, V. N. Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Mol. Cells* **19**, 1–15 (2005).
 46. Rivero, F. D. *et al.* Disruption of antigenic variation is crucial for effective parasite vaccine. *Nat. Med.* **16**, 551–7, 1p following 557 (2010).
 47. Nash, T. E., Lujan, H. T., Mowatt, M. R. & Conrad, J. T. Variant-specific surface protein switching in *Giardia lamblia*. *Infect. Immun.* **69**, 1922–1923 (2001).
 48. Nash, T. E., Banks, S. M., Alling, D. W., Merritt, J. W. J. & Conrad, J. T. Frequency of variant antigens in *Giardia lamblia*. *Exp. Parasitol.* **71**, 415–421 (1990).
 49. Prucca, C. G., Rivero, F. D. & Luján, H. D. Regulation of antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Annu. Rev. Microbiol.* **65**, 611–630 (2011).
 50. Aggarwal, A. & Nash, T. E. Comparison of two antigenically distinct *Giardia lamblia* isolates in gerbils. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **36**, 325–332 (1987).
 51. Langford, T. D. *et al.* Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia* spp. *Infect. Immun.* **70**, 11–18 (2002).
 52. Birkhead, G., Janoff, E. N., Vogt, R. L. & Smith, P. D. Elevated levels of immunoglobulin A to *Giardia lamblia* during a waterborne outbreak of gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 1707–1710 (1989).
 53. Singer, S. M. & Nash, T. E. T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect. Immun.* **68**, 170–175 (2000).
 54. Singer, S. M., Elmendorf, H. G., Conrad, J. T. & Nash, T. E. Biological selection of variant-specific surface proteins in *Giardia lamblia*. *J. Infect. Dis.* **183**, 119–124 (2001).
 55. Aggarwal, A., Merritt, J. W. J. & Nash, T. E. Cysteine-rich variant surface proteins of *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **32**, 39–47 (1989).
 56. Hemphill, A., Stäger, S., Gottstein, B. & Müller, N. Electron microscopical investigation of surface alterations on *Giardia lamblia* trophozoites after exposure to a cytotoxic monoclonal antibody. *Parasitol. Res.* **82**, 206–210 (1996).
 57. Stäger, S., Felleisen, R., Gottstein, B. & Müller, N. *Giardia lamblia* variant surface protein H7 stimulates a heterogeneous repertoire of antibodies displaying differential

- cytological effects on the parasite. *Mol. Biochem. Parasitol.* **85**, 113–124 (1997).
58. Touz, M. C. *et al.* Arginine deiminase has multiple regulatory roles in the biology of *Giardia lamblia*. *J. Cell Sci.* **121**, 2930–2938 (2008).
 59. Torri, A. Efecto de los anticuerpos monoclonales anti Proteínas Variables de Superficie sobre el proceso de Variación Antigénica en *Giardia lamblia*. (Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba, 2016).
 60. Gillin, F. D. & Diamond, L. S. Clonal growth of *Entamoeba* in agar: some applications of this technique to the study of their cell biology. *Arch. Invest. Med. (Mex)*. **9 Suppl 1**, 237–246 (1978).
 61. Nash, T. E., Conrad, J. T. & Merritt, J. W. J. Variant specific epitopes of *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **42**, 125–132 (1990).
 62. Serradell, M. C. *et al.* Efficient oral vaccination by bioengineering virus-like particles with protozoan surface proteins. *Nat. Commun.* **10**, (2019).
 63. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
 64. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 4350–4354 (1979).
 65. Polyansky, A. A. *et al.* PREDDIMER: A web server for prediction of transmembrane helical dimers. *Bioinformatics* **30**, 889–890 (2014).
 66. Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 27-28,33-38 (1996).
 67. Madeira, F. *et al.* The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.* **47**, W636–W641 (2019).
 68. Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J.-M. & Brenner, S. E. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* **14**, 1188–1190 (2004).
 69. Russ, W. P. & Engelman, D. M. TOXCAT: a measure of transmembrane helix association in a biological membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 863–868 (1999).
 70. Serrano-Pertierra, E. & López-Larrea, C. Using NK cell lipid raft fractionation to understand the role of lipid rafts in NK cell receptor signaling. *Methods Mol. Biol.* **1441**, 131–139 (2016).
 71. Gray, A., Olsson, H., Batty, I. H., Priganica, L. & Downes, C. P. Nonradioactive methods for the assay of phosphoinositide 3-kinases and phosphoinositide phosphatases and selective detection of signaling lipids in cell and tissue extracts. *Anal. Biochem.* **313**, 234–245 (2003).
 72. Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G. & Clayton, A. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **30**, 1–29 (2006).
 73. Seco-Hidalgo, V., Osuna, A. & De Pablos, L. M. To bet or not to bet: Deciphering cell to cell variation in protozoan infections. *Trends Parasitol.* **31**, 350–356 (2015).
 74. Ríos, D. N. Rol de las proteínas variables de superficie en la dinámica infectiva del parásito intestinal *Giardia lamblia*. (Facultad de Ciencias Químicas - Universidad Nacional de Córdoba, 2021).

75. Nash, T. E. Antigenic variation in *Giardia lamblia* and the host's immune response. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **352**, 1369–1375 (1997).
76. Russ, W. P. & Engelman, D. M. The GxxxG motif: A framework for transmembrane helix-helix association. *J. Mol. Biol.* **296**, 911–919 (2000).
77. Teese, M. G. & Langosch, D. Role of GxxxG Motifs in Transmembrane Domain Interactions. *Biochemistry* **54**, 5125–5135 (2015).
78. Khadria, A. S. *et al.* A gly-zipper motif mediates homodimerization of the transmembrane domain of the mitochondrial kinase ADCK3. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 14068–14077 (2014).
79. Lawson, E. L., Mills, D. R., Brilliant, K. E. & Hixson, D. C. The transmembrane domain of CEACAM1-4S is a determinant of anchorage independent growth and tumorigenicity. *PLoS One* **7**, 1–14 (2012).
80. Patel, P. C. *et al.* Inside-out signaling promotes dynamic changes in the carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 (CEACAM1) oligomeric state to control its cell adhesion properties. *J. Biol. Chem.* **288**, 29654–29669 (2013).
81. Lemmon, M. A. *et al.* Glycophorin A dimerization is driven by specific interactions between transmembrane alpha-helices. *J. Biol. Chem.* **267**, 7683–7689 (1992).
82. Smith, S. O. *et al.* Structure of the transmembrane dimer interface of glycophorin A in membrane bilayers. *Biochemistry* **40**, 6553–6558 (2001).
83. Senes, A., Engel, D. E. & DeGrado, W. F. Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 465–479 (2004).
84. Senes, A., Ubarretxena-Belandia, I. & Engelman, D. M. The Calpha ---H...O hydrogen bond: a determinant of stability and specificity in transmembrane helix interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 9056–9061 (2001).
85. Eilers, M., Shekar, S. C., Shieh, T., Smith, S. O. & Fleming, P. J. Internal packing of helical membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 5796–5801 (2000).
86. Eilers, M., Patel, A. B., Liu, W. & Smith, S. O. Comparison of helix interactions in membrane and soluble alpha-bundle proteins. *Biophys. J.* **82**, 2720–2736 (2002).
87. Dawson, J. P., Weinger, J. S. & Engelman, D. M. Motifs of serine and threonine can drive association of transmembrane helices. *J. Mol. Biol.* **316**, 799–805 (2002).
88. Adamian, L. & Liang, J. Interhelical hydrogen bonds and spatial motifs in membrane proteins: polar clamps and serine zippers. *Proteins* **47**, 209–218 (2002).
89. Smith, S. O. *et al.* Implications of threonine hydrogen bonding in the glycophorin A transmembrane helix dimer. *Biophys. J.* **82**, 2476–2486 (2002).
90. Benchimol, S. *et al.* Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell* **57**, 327–334 (1989).
91. Beauchemin, N. *et al.* Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Exp. Cell Res.* **252**, 243–249 (1999).
92. Robitaille, J. *et al.* Comparison of expression patterns and cell adhesion properties of the mouse biliary glycoproteins Bbgp1 and Bbgp2. *Eur. J. Biochem.* **264**, 534–544 (1999).
93. Gray-Owen, S. D. & Blumberg, R. S. CEACAM1: contact-dependent control of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 433–46 (2006).

94. Kammerer, R., Hahn, S., Singer, B. B., Luo, J. S. & von Kleist, S. Biliary glycoprotein (CD66a), a cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, on human lymphocytes: structure, expression and involvement in T cell activation. *Eur. J. Immunol.* **28**, 3664–3674 (1998).
95. Donda, A. *et al.* Locally inducible CD66a (CEACAM1) as an amplifier of the human intestinal T cell response. *Eur. J. Immunol.* **30**, 2593–2603 (2000).
96. Budt, M., Cichocka, I., Reutter, W. & Lucka, L. Clustering-induced signaling of CEACAM1 in PC12 cells. *Biol. Chem.* **383**, 803–812 (2002).
97. Chen, L. *et al.* The short isoform of the CEACAM1 receptor in intestinal T cells regulates mucosal immunity and homeostasis via Tfh cell induction. *Immunity* **37**, 930–946 (2012).
98. Muenzner, P., Bachmann, V., Kuespert, K. & Hauck, C. R. The CEACAM1 transmembrane domain, but not the cytoplasmic domain, directs internalization of human pathogens via membrane microdomains. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01106.x
99. Tchoupa, A. K., Schuhmacher, T. & Hauck, C. R. Signaling by epithelial members of the CEACAM family - Mucosal docking sites for pathogenic bacteria. *Cell Commun. Signal.* **12**, 1–10 (2014).
100. Muenzner, P. *et al.* Uropathogenic E. coli Exploit CEA to Promote Colonization of the Urogenital Tract Mucosa. *PLoS Pathog.* **12**, 1–26 (2016).
101. Rahmann, S., Schuster-Böckler, B. & Schultz, J. HMM logos for visualization of protein families. *BMC Bioinformatics* **5**, 7 (2004).
102. Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S. & Eggeling, C. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 361–374 (2017).
103. Lingwood, D. & Simons, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**, 46–50 (2010).
104. Garcia-Parajo, M. F., Cambi, A., Torreno-Pina, J. A., Thompson, N. & Jacobson, K. Nanoclustering as a dominant feature of plasma membrane organization. *J. Cell Sci.* **127**, 4995–5005 (2014).
105. De Chatterjee, A., Mendez, T. L., Roychowdhury, S. & Das, S. The assembly of GM1 glycolipid- and cholesterol-enriched raft-like membrane microdomains is important for giardial encystation. *Infect. Immun.* **83**, 2030–2042 (2015).
106. Mendez, T. L. *et al.* Sphingolipids, Lipid Rafts, and Giardial Encystation: The Show Must Go On. *Curr. Trop. Med. reports* **2**, 136–143 (2015).
107. Fantini, J., Di Scala, C., Evans, L. S., Williamson, P. T. F. & Barrantes, F. J. A mirror code for protein-cholesterol interactions in the two leaflets of biological membranes. *Sci. Rep.* **6**, 21907 (2016).
108. Lorent, J. H. & Levental, I. Structural determinants of protein partitioning into ordered membrane domains and lipid rafts. *Chem. Phys. Lipids* **192**, 23–32 (2015).
109. Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E. L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**, 567–580 (2001).
110. Bugge, K., Lindorff-Larsen, K. & Kragelund, B. B. Understanding single-pass transmembrane receptor signaling from a structural viewpoint-what are we missing?

- FEBS J.* **283**, 4424–4451 (2016).
111. Brown, D. A. Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology (Bethesda)*. **21**, 430–439 (2006).
 112. Gombos, I. *et al.* Cholesterol sensitivity of detergent resistance: a rapid flow cytometric test for detecting constitutive or induced raft association of membrane proteins. *Cytometry. A* **61**, 117–126 (2004).
 113. Zidovetzki, R. & Levitan, I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 1311–1324 (2007).
 114. Head, B. P., Patel, H. H. & Insel, P. A. Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **1838**, 532–545 (2014).
 115. Suzuki, K. G. N. New insights into the organization of plasma membrane and its role in signal transduction. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **317**, 67–96 (2015).
 116. Płóciennikowska, A., Zdioruk, M. I., Traczyk, G., Świątkowska, A. & Kwiatkowska, K. LPS-induced clustering of CD14 triggers generation of PI(4,5)P₂. *J. Cell Sci.* **128**, 4096–4111 (2015).
 117. Koushik, A. B., Powell, R. R. & Temesvari, L. A. Localization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate to lipid rafts and uroids in the human protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* **81**, 2145–2155 (2013).
 118. Schink, K. O., Tan, K.-W. & Stenmark, H. Phosphoinositides in Control of Membrane Dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **32**, 143–171 (2016).
 119. Voges, M., Bachmann, V., Naujoks, J., Kopp, K. & Hauck, C. R. Extracellular IgC2 constant domains of CEACAMs mediate PI3K sensitivity during uptake of pathogens. *PLoS One* **7**, e39908 (2012).
 120. Jacobson, R. L. & Doyle, R. J. Lectin-parasite interactions. *Parasitol. Today* **12**, 55–61 (1996).
 121. Espinosa-Cantellano, M. & Martínez-Palomo, A. *Entamoeba histolytica*: mechanism of surface receptor capping. *Exp. Parasitol.* **79**, 424–435 (1994).
 122. Hill, D. R., Hewlett, E. L. & Pearson, R. D. Lectin binding by *Giardia lamblia*. *Infect. Immun.* **34**, 733–738 (1981).
 123. Ratner, D. M. *et al.* Changes in the N-glycome, glycoproteins with Asn-linked glycans, of *Giardia lamblia* with differentiation from trophozoites to cysts. *Eukaryot. Cell* **7**, 1930–1940 (2008).
 124. Lloyd, D. *et al.* The microaerophilic flagellate *Giardia intestinalis*: oxygen and its reaction products collapse membrane potential and cause cytotoxicity. *Microbiology* **146 Pt 12**, 3109–3118 (2000).
 125. Gillin, F. D. & Diamond, L. S. *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: effects of cysteine and oxygen tension on trophozoite attachment to glass and survival in culture media. *Exp. Parasitol.* **52**, 9–17 (1981).
 126. Gillin, F. D. & Diamond, L. S. *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: growth responses to reducing agents. *Exp. Parasitol.* **51**, 382–391 (1981).
 127. Ma'ayeh, S. Y., Knörr, L. & Svärd, S. G. Transcriptional profiling of *Giardia intestinalis*

- in response to oxidative stress. *Int. J. Parasitol.* **45**, 925–938 (2015).
128. Mastronicola, D. *et al.* Giardia intestinalis escapes oxidative stress by colonizing the small intestine: A molecular hypothesis. *IUBMB Life* **63**, 21–25 (2011).
 129. Brown, D. M., Upcroft, J. A., Edwards, M. R. & Upcroft, P. Anaerobic bacterial metabolism in the ancient eukaryote Giardia duodenalis. *Int. J. Parasitol.* **28**, 149–164 (1998).
 130. Nash, T. E., Merritt, J. W. J. & Conrad, J. T. Isolate and epitope variability in susceptibility of Giardia lamblia to intestinal proteases. *Infect. Immun.* **59**, 1334–1340 (1991).
 131. Onyilagha, C. & Uzonna, J. E. Host Immune Responses and Immune Evasion Strategies in African Trypanosomiasis. *Front. Immunol.* **10**, 2738 (2019).
 132. Ponte-Sucre, A. An Overview of Trypanosoma brucei Infections: An Intense Host-Parasite Interaction. *Front. Microbiol.* **7**, 2126 (2016).
 133. Engstler, M. *et al.* Hydrodynamic flow-mediated protein sorting on the cell surface of trypanosomes. *Cell* **131**, 505–515 (2007).
 134. Papanastasiou, P., Hiltbold, A., Bommeli, C. & Kohler, P. The release of the variant surface protein of Giardia to its soluble isoform is mediated by the selective cleavage of the conserved carboxy-terminal domain. *Biochemistry* **35**, 10143–10148 (1996).
 135. Lundgren, D. H., Hwang, S.-I., Wu, L. & Han, D. K. Role of spectral counting in quantitative proteomics. *Expert Rev. Proteomics* **7**, 39–53 (2010).
 136. Hurley, J. H. ESCRTs are everywhere. *EMBO J.* **34**, 2398–2407 (2015).
 137. Weiland, M. E.-L., McArthur, A. G., Morrison, H. G., Sogin, M. L. & Svärd, S. G. Annexin-like alpha giardins: a new cytoskeletal gene family in Giardia lamblia. *Int. J. Parasitol.* **35**, 617–626 (2005).
 138. Gerke, V., Creutz, C. E. & Moss, S. E. Annexins: Linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 449–461 (2005).
 139. Weeratunga, S. K. *et al.* Alpha-1 giardin is an annexin with highly unusual calcium-regulated mechanisms. *J. Mol. Biol.* **423**, 169–181 (2012).
 140. Evans-Osses, I. *et al.* Microvesicles released from Giardia intestinalis disturb host-pathogen response in vitro. *Eur. J. Cell Biol.* **96**, 131–142 (2017).
 141. Nieves, Y. R. *et al.* Membrane-shed vesicles from the parasite Trichomonas vaginalis: characterization and their association with cell interaction. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 2211–2226 (2018).
 142. Wise, K. S. Adaptive surface variation in mycoplasmas. *Trends Microbiol.* **1**, 59–63 (1993).
 143. Perry, B. W., Schield, D. R. & Castoe, T. A. Evolution: Plasticity versus Selection, or Plasticity and Selection? *Curr. Biol.* **28**, R1104–R1106 (2018).
 144. Rosenberg, S. M. Evolving responsively: adaptive mutation. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 504–515 (2001).
 145. Nash, T. E. Antigenic variation in Giardia lamblia and the host's immune response. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **352**, 1369–1375 (1997).
 146. Barry, J. D. Capping of variable antigen on Trypanosoma brucei, and its immunological and biological significance. *J. Cell Sci.* **37**, 287–302 (1979).

147. Pinger, J., Chowdhury, S. & Papavasiliou, F. N. Variant surface glycoprotein density defines an immune evasion threshold for African trypanosomes undergoing antigenic variation. *Nat. Commun.* **8**, 828 (2017).
148. Brown, K. N. Antibody induced variation in malaria parasites. *Nature* **242**, 49–50 (1973).
149. Deitsch, K. W. & Dzikowski, R. Variant Gene Expression and Antigenic Variation by Malaria Parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* **71**, 625–641 (2017).
150. Recker, M. *et al.* Antigenic variation in Plasmodium falciparum malaria involves a highly structured switching pattern. *PLoS Pathog.* **7**, e1001306 (2011).
151. Le Grand, D., Solsona, M., Rosengarten, R. & Poumarat, F. Adaptive surface antigen variation in Mycoplasma bovis to the host immune response. *FEMS Microbiol. Lett.* **144**, 267–275 (1996).
152. Citti, C., Nouvel, L.-X. & Baranowski, E. Phase and antigenic variation in mycoplasmas. *Future Microbiol.* **5**, 1073–1085 (2010).
153. Levental, I., Lingwood, D., Grzybek, M., Coskun, U. & Simons, K. Palmitoylation regulates raft affinity for the majority of integral raft proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 22050–22054 (2010).
154. Török, Z. *et al.* Plasma membranes as heat stress sensors: from lipid-controlled molecular switches to therapeutic applications. *Biochim. Biophys. Acta* **1838**, 1594–1618 (2014).
155. Cairns, J., Overbaugh, J. & Miller, S. The origin of mutants. *Nature* **335**, 142–145 (1988).
156. Shapiro, J. A. Observations on the formation of clones containing araB-lacZ cistron fusions. *Mol. Gen. Genet.* **194**, 79–90 (1984).
157. Carranza, P. G. *et al.* Specific histone modifications play critical roles in the control of encystation and antigenic variation in the early-branching eukaryote Giardia lamblia. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **81**, 32–43 (2016).
158. Efremov, R. G. *et al.* Molecular lipophilicity in protein modeling and drug design. *Curr. Med. Chem.* **14**, 393–415 (2007).