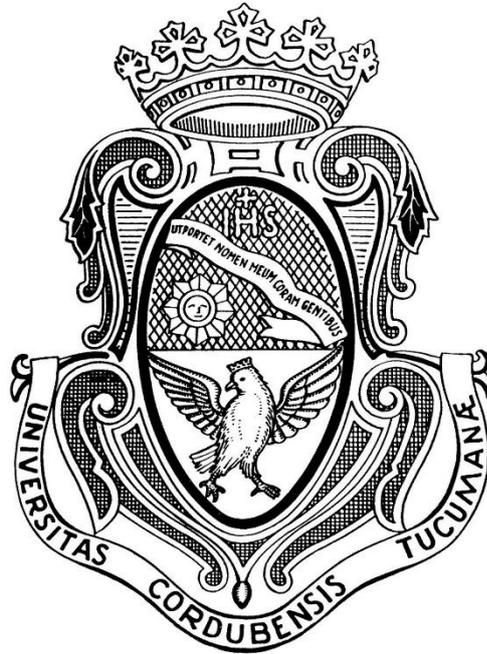


**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**ROL DE LAS PROTEÍNAS VARIABLES DE SUPERFICIE
EN LA DINÁMICA INFECTIVA DEL PARÁSITO INTESTINAL
*GIARDIA LAMBLIA***

Autor: Lic. Diego Nicolás Ríos

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

Director de tesis:

Dr. Hugo D. Luján

Miembros de comisión:

Dra. Graciela Panzetta

Dr. Carlos E. Argaraña

Dr. José L. Barra

Evaluador externo:

Dr. Antonio D. Uttaro

AGRADECIMIENTOS

A mi director de Tesis Dr. Hugo Luján, por haberme enseñado el camino de la ciencia y por confiar en mí, dándome libertad para crear y experimentar.

A los doctores Graciela Panzetta, Carlos E. Argaraña y José L. Barra, por su acompañamiento y consejos durante la realización de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio muchos de los cuales hoy considero amigos, Alicia, Marianela, Lucía, Florencia, Mariana, Julia, Cecilia, Alessandro, Román, Pablo, Sergio, Damián, Matías, Albano y Lucas, por haber hecho este camino una experiencia memorable.

A mis padres y hermanos, porque a pesar de la distancia siempre estuvieron cerca.

A mi novia, por la paciencia, compañía y amor de todos los días.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
ABREVIATURAS	2
CAPÍTULO 1	4
Introducción general y objetivos	4
GENERALIDADES	5
GIARDIASIS	12
PROCESOS DE DIFERENCIACION	14
Desenquistamiento	14
Enquistamiento	15
Variación Antigénica	16
REGULACIÓN DE LA VARIACIÓN ANTIGÉNICA.....	19
VARIACIÓN ANTIGÉNICA EN <i>GIARDIA</i> Y EL ROL DE LA RESPUESTA INMUNE.....	19
CAPÍTULO 2	22
Materiales y Métodos.....	22
Cultivo celular de <i>G. lamblia</i> y enquistamiento <i>in vitro</i>	23
Infecciones <i>in vivo</i>	23
Construcción de los vectores de expresión	23
Amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	24
Electroforesis de ADN en geles de agarosa	24
Transfección de trofozoítos	25
Microscopía de Inmunofluorescencia.....	25
Adquisición y procesamiento de imágenes	26
Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	26
Microscopía electrónica de barrido (SEM)	26
Determinación de viabilidad	26
Ensayos de proliferación	26
Fragmentación de anticuerpos	27
Evaluación de agentes estresores sobre clones de <i>Giardia</i>	27
Ensayos poblacionales de VA inducida por anticuerpos.....	27
Evaluación del recambio de VSPs en poblaciones de <i>G. lamblia</i>	28
Determinación de la concentración de proteínas	28
Electroforesis en geles de Poliacrilamida/SDS y Western Blot.....	28
CAPÍTULO 3	29

Resultados <i>in vitro</i>	29
LA VSP COMO INTERFASE ENTRE EL PARASITO Y EL HOSPEDADOR.....	30
Anticuerpos monoclonales específicos contra distintas VSPs.	30
Obtención de clones de trofozoítos que expresan una única VSP.	31
La variación antigénica en condiciones normales de cultivo <i>in vitro</i>	31
Los anticuerpos anti-VSP disparan la variación antigénica en trofozoítos individuales ..	33
Poblaciones de trofozoítos de crecimiento lento surgen esporádicamente en cultivo ..	35
Los mAbs anti-VSPs provocan la pérdida de adherencia de los trofozoítos y su aglutinación <i>in vitro</i>	36
La agregación de VSPs debida a anticuerpos en la superficie celular de <i>Giardia</i> induce la variación antigénica.....	37
Estudio de la desestabilización de la estructura de las VSPs por agentes externos como factor inductor de variación antigénica.	41
Agentes oxidantes.....	42
Agentes Reductores.....	43
Agentes Quelantes.....	44
Modificaciones temporales en el pH del medio.	45
Efecto de Proteasas.	47
Exploración de vías de señalización implicadas en el proceso de variación antigénica. .	50
Rol del tallo citoplasmático conservado de las VSPs en la variación antigénica. ..	50
CAPÍTULO 4	56
Resultados <i>in vivo</i>	56
EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE DIFERENTES CLONES DURANTE LA INFECCIÓN EN JERBOS.....	57
Fase de establecimiento y expansión.	57
Evaluación de la capacidad infectiva de diferentes clones de <i>Giardia</i>	57
Análisis de la composición poblacional en el pico de la infección.....	58
Evaluación de la infección temprana.....	59
Las poblaciones LFPC son reemplazadas gradualmente durante la fase de expansión de la población de parásitos.....	61
La categoría HFPC está conformada por una variedad de clones de aptitud variable dentro de una misma especie hospedadora.....	63
La desaparición de los parásitos de tipo LFPC en el curso de la infección no puede ser explicada por una VA celular inducida por algún factor del huésped en la fase de expansión.	63
Fase de contracción.	64
La producción de anticuerpos <i>anti-VSP</i> provoca una marcada disminución de la población de parásitos.	65

Fase de resolución o cronicidad.....	68
CAPÍTULO 5	69
Discusión	69
Rol de las VSPs en la dinámica infectiva de las poblaciones de <i>Giardia</i> en jerbos.....	72
Comentarios finales.	74
CAPÍTULO 6	75
Bibliografía	75

RESUMEN

Giardia lamblia es un protozoo intestinal que parasita a una gran variedad de mamíferos, incluidos los humanos, causando una enfermedad aguda o crónica, con presencia o no de síntomas. La giardiasis tiene un impacto significativo en la salud pública debido a su alta prevalencia y morbilidad, su propensión a causar brotes importantes, y a sus efectos negativos en el desarrollo de los niños infectados. El hecho de que *Giardia* presente características indiscutiblemente primitivas, pero a su vez elementos que reflejan funciones celulares universales de eucariotas, la convierten en un excelente modelo para abordar estudios básicos de procesos celulares e identificar mecanismos moleculares claves de patógenos unicelulares y organismos eucariotas superiores. *Giardia* manifiesta variación antigénica de sus proteínas de superficie llamadas VSPs (*Variant-specific Surface Proteins*) tanto *in vitro* como *in vivo*, y se cree que utiliza tal mecanismo de recambio para (i) confrontar variaciones del ambiente hostil que existe en la porción superior del intestino delgado del hospedador, (ii) diversificarse para poder infectar un amplio rango de hospedadores y (iii) evadir la respuesta inmune del individuo infectado. En el presente trabajo de tesis se aborda el estudio de las capacidades protectoras que le brindan las VSPs a los trofozoitos de *Giardia* y el rol que cumplen las mismas moldeando la dinámica de la población de parásitos durante la infección. Nuestros resultados indican que la relación parásito-hospedador es más compleja que la previamente informada y que *Giardia* utiliza mecanismos típicos de organismos procariontes, así como de eucariotas para su supervivencia tanto dentro como fuera del intestino del hospedador.

ABSTRACT

Giardia lamblia is an intestinal protozoan that parasitizes a wide variety of mammals, including humans, causing an acute or chronic disease, with presence or absence of symptoms. Giardiasis has a significant public health impact because of the high prevalence and morbidity, its propensity in causing major outbreaks, and its negative effects on the development of infected children. The fact that *Giardia* has indisputably primitive characteristics, but at the same time features that resemble universal eukaryotic cellular functions, make it an excellent model to address basic studies of cellular processes and identify key molecular mechanisms of unicellular pathogens and higher eukaryotic organisms. *Giardia* manifests antigenic variation of its surface antigens called VSPs (*Variant-specific Surface Proteins*) both *in vitro* and *in vivo*, and it is believed that it uses such a turnover mechanism to (i) confront variations in the hostile environment that exists in the upper portion of the host's small intestine, (ii) diversify in order to infect a wide range of hosts, and (iii) evade the immune response of the infected individual. This thesis work addresses the study of the protective capacities that VSPs provide to *Giardia* trophozoites and the role they play in shaping the dynamics of the parasite population during the infection. Our results indicate that the parasite-host relationship is more complex than previously reported and that *Giardia* uses mechanisms typical of prokaryotic organisms for its survival both inside and outside the host gut.

ABREVIATURAS

CWP: Proteína de la pared del quiste

DC: Célula dendrítica

DPP: Dipeptidil peptidasa

ESCP: Cisteín proteasa específica del enquistamiento

ESP: Productos excretorios/secretorios

ESV: Vesícula específica del enquistamiento

ESV: Vesículas secretorias específicas del enquistamiento

HCMP: Proteínas de membrana ricas en cisteína

HFPC: Clones de parásitos con buena aptitud

IEC: Célula del epitelio intestinal

IF: Inmunofluorescencia

LFPC: Clones de parásitos con mala aptitud

MV: Microvesículas

NO: Óxido nítrico

PDI: Proteína disulfuro isomerasa

PV: Vacuola periférica

RE: Retículo endoplásmico

SRE: Elementos regulados por esteroides

SREBP: Proteína de unión a elementos regulados por esteroides

TMD: Dominio transmembrana

VA: Variación antigénica

VSP: Proteína variable de superficie

CAPÍTULO 1

Introducción general y objetivos

1. GENERALIDADES

El primer registro que existe de los parásitos que hoy se conocen como *Giardia* se debe al microscopista holandés Anthony van Leeuwenhoek quien, en 1681, al examinar sus deposiciones bajo el microscopio luego de un cuadro de diarrea, los describió en una carta dirigida a la *Royal Society* como pequeños animáculos móviles similares en tamaño a un corpúsculo de sangre (glóbulo rojo), y los comparó con cochinillas de la humedad (*Oniscus asellus* y *Porcellio scaber*) (Dobell, 1920). Sin embargo, fue Vilém Dusan Lambl quien en 1859 realizó la primera descripción gráfica detallada de todas las características morfológicas que identifican a *Giardia* al analizar las deposiciones de un niño, y nombró a dicho microorganismo *Cercomonas intestinalis* (Lipoldová, 2014). En honor a Lambl, algunos científicos nombraron con su apellido al género mientras otros a la especie responsable de la infección en humanos. En 1879, Giovanni Battista Grassi encontró un parásito en roedores y lo nombró *Dimorphus muris*, ahora reconocido como otra especie perteneciente al género *Giardia*, aparentemente ignorando las descripciones de Lambl (Adam, 2001). En 1882 y 1883, Johann Kunstler describió un organismo recuperado de renacuajos al que llamó *Giardia* (probablemente *G. agilis*) en honor al zoólogo francés Alfred Mathieu Giard, siendo la primera vez que se utilizó el nombre *Giardia* para describir a dicho género (Adam, 2001). En 1888, Raphael Blanchard sugirió el nombre *Lamblia intestinalis*, el cual fue cambiado en 1902 por Charles Stiles a *G. duodenalis*. Subsecuentemente, Charles Kofoid y Elizabeth Christiansen propusieron los nombres *G. lamblia* en 1915 y *G. enterica* en 1920, respectivamente (Adam, 2001).

Durante muchos años se mantuvo la controversia acerca del número de especies que componen al género *Giardia*, ya que algunos investigadores sugerían nombres de especies basándose en el hospedador de origen, mientras que otros lo hacían en base a diferencias morfológicas (Adam, 2001).

En 1952, el profesor de biología Francis Filice publicó una descripción morfológica extremadamente detallada del género *Giardia* y propuso, basado fundamentalmente en las características estructurales de los cuerpos medianos del protozoario, que solo fueran reconocidas 3 especies del parásito: *G. duodenalis*, observada en humanos y en otros mamíferos; *G. agilis*, hallada en anfibios; y *G. muris*, encontrada en ratones (Adam, 2001). El nombre *G. lamblia* se volvió ampliamente aceptado durante los años '70, mientras que en los años '80 y '90 se alentó el uso de los nombres *G. duodenalis* y *G. intestinalis*, respectivamente. A lo largo de esta tesis, se utilizará el nombre *G. lamblia*.

En el año 2009 en una revisión taxonómica basada en la genética del parásito, se sugirió que los ensamblajes (genotipos) de *G. lamblia* son linajes que evolucionaron de manera independiente y se propusieron diferentes nombres específicos para ellos: *G. duodenalis* para el ensamblaje A, *G. enterica* para el ensamblaje B, *G. canis* para los ensamblajes C y D, *G. bovis* para el ensamblaje E, *G. cati* para el ensamblaje F y *G. simondi* para el ensamblaje G (Monis *et al.*, 2009).

Tradicionalmente se ha considerado a *Giardia* como parte del *Phylum Sarcocystophora*, *Subphylum Mastigophora (=Flagellata)*, Clase *Zoomastigophorea*, Orden *Diplomonadida* y Familia *Hexamitidae* (Morrison *et al.*, 2007). Hace más de una década, una nueva clasificación sistemática fue desarrollada en base a información genética, estructural y bioquímica (Keeling *et al.*, 2005). En base a estos nuevos criterios, *Giardia* pertenecería al Dominio *Eukaryota*, Reino *Excavata* (eucariotas unicelulares que incluye formas de vida libre y algunos importantes parásitos de humanos), *Phylum Metamonada* (gran grupo de protozoos flagelados), *Subphylum Trichozoa*, Superclase *Eopharyngia*, Clase *Trepomonadea*, Subclase *Diplozoa*, Orden *Giardiida*, Familia *Giardiidae* y Género *Giardia* (Keeling *et al.*, 2005).

Los miembros del Reino *Excavata*, un “súper grupo” divergente y controversial, están débilmente relacionados por una combinación de evidencia morfológica y molecular. La robustez filogenética del Reino *Excavata* como un todo aún debe ser determinada; sin embargo, tres sub-grupos son considerados clados: (i) *Preaxostyla* (que incluye a *Oxymonadida* y al género *Trimastix*), (ii) Fornicata (*Diplomonadida*, *Retortamonas* y *Carpediemonas*), (iii) y un clado sin nombre que consiste de *Euglenozoa*, *Heterolobosea* y *Jakobida* (Hampl *et al.*, 2009).

Aunque muchos estudios sugieren que *Giardia* pertenece al súper grupo eucariota *Excavata*, la identificación de los ácidos ribonucleicos pequeños nucleolares (ARNpno) en *Giardia* sugerirían su aparición algo más tarde o cercano a los eucariotas superiores (Luo *et al.*, 2009).

En el género *Giardia*, mediante características observadas con microscopía de campo claro (forma del trofozoíto y de su cuerpo medio) y microscopía electrónica (forma del reborde ventrolateral, disco ventral y flagelo) (Figura 1), se han podido identificar seis especies (Plutzer *et al.*, 2010; Monis & Thompson, 2003; Adam, 2001): *G. agilis* la cual infecta a anfibios; *G. ardeae* y *G. psittaci* son hallados en aves; *G. muris* y *G. microti* en roedores; y *G. lamblia* (*G. duodenalis* o *G. intestinalis*), la cual incluye cepas aisladas a partir de una gran variedad de hospedadores mamíferos (Tabla 1) (Heyworth, 2016; Caccio *et al.*, 2005; Adam, 2001).

Considerando su amplio rango de hospedadores y el pequeño número de variaciones morfológicas, *G. lamblia* puede ser considerada como un complejo de especies. Se han utilizado numerosas metodologías para subclasificar a los parásitos morfológicamente idénticos de la especie *G. lamblia*. El primero de estos en ser usado involucró el análisis de la movilidad electroforética de enzimas del parásito y permitió distinguir dos subpoblaciones de *G. lamblia* designados como ensamblajes A y B.

La heterogeneidad de la especie se hizo aún más evidente a partir de estudios de la movilidad electroforética de sus cromosomas y de ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a partir del ADN de *G. lamblia* y su posterior secuenciación. Ensayos de Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP), reforzaron aún más la existencia de heterogeneidad dentro de la especie, confirmando la existencia de los ensamblajes A y B y caracterizando seis ensamblajes adicionales (C-H) (Heyworth, 2016).

Los genes de *G. lamblia* utilizados para determinar los genotipos de la especie incluyen los genes que codifican para la β -*Giardina* (*bg*), la *Triosa Fosfato Isomerasa* (*tpi*), la *Subunidad Ribosomal Pequeña* (*ssu*), y la *Glutamato Deshidrogenasa* (*gdh*). Los ensamblajes de *G. lamblia* han mostrado que pueden ser relativamente específicos para ciertos hospedadores (ensamblajes C-H), así como también de amplio rango de hospedadores (ensamblajes A y B, Tabla 1).

Dentro de un mismo aislamiento de *G. lamblia*, diferentes loci pueden contener secuencias de ADN que son típicas de diferentes ensamblajes (por ejemplo, *ssu* típico del ensamblaje B, y *tpi* y *bg* típicos del ensamblaje A), una situación que puede hacer muy difícil intentar asignar un aislamiento en particular exclusivamente a uno u otro ensamblaje. Esto es relevante a la hora de señalar que la Tabla 1 podría representar una clasificación sobre simplificada, al no discriminar entre información obtenida a partir de un único locus y a partir de varios loci (Heyworth, 2016).

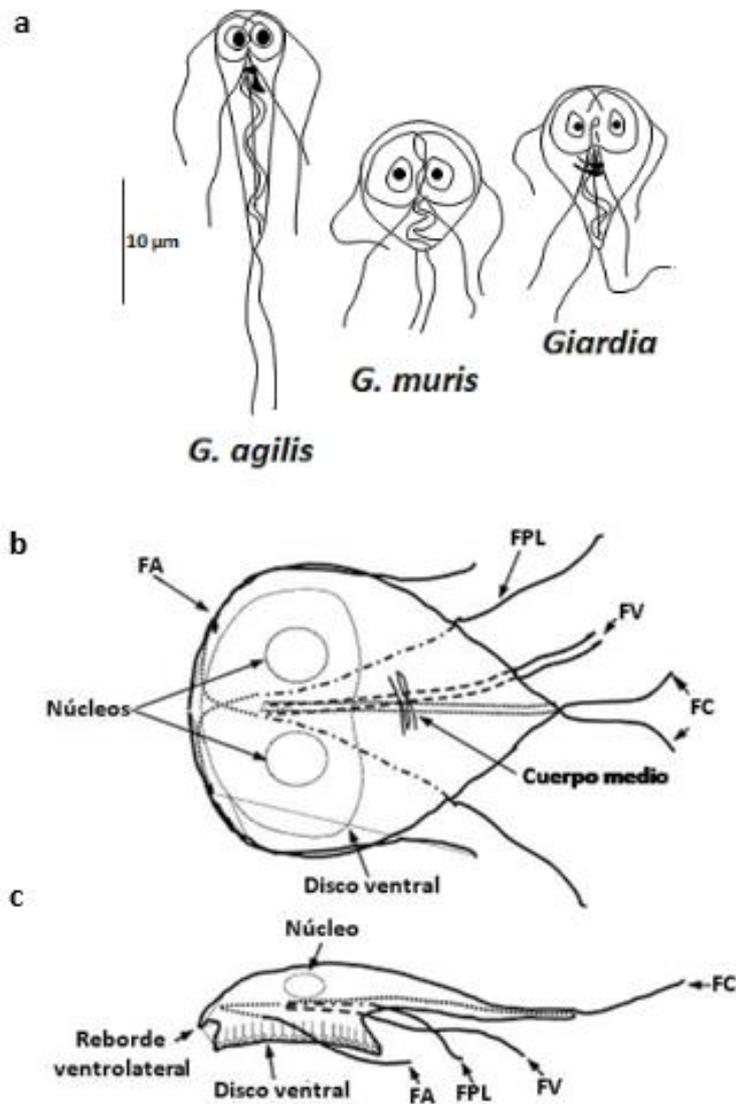


Figura 1. Características del género *Giardia*. Morfología de tres especies del género *Giardia* (a). Representación esquemática de características estructurales claves de un trofozoíto de *G. lamblia* (b y c). Trofozoíto visto dorsalmente, (b) y lateralmente (c). FA, flagelo anterior; FC, flagelo caudal; FPL, flagelo pósterolateral; FV, flagelo ventral.

Tabla 1. Ensamblajes de *G. lamblia* y sus correspondientes hospedadores.

Ensamblaje	Hospedador/es
A	Humanos, perros, gatos, ganado, alpacas, ciervos, hurones, cerdos, castores, chinchillas, jaguares, caballos, marsupiales, ovejas, cabras, buey almizclero, primates no humanos, cetáceos, focas, león marino australiano, alces, renos, pollos, gaviotas
B	Humanos, ganado, perros, gacelas, ciervos, caballos, castores, rata almizclera, chinchillas, hurones, conejos, jutia conga, marsupiales, conejillo de indias, damán de El Cabo, primates no humanos, pollos, ovejas, focas, cerdos, león marino australiano, ostras, delfines, marsopas, gaviotas
C	Perros, canguros, ganado, cerdos, cetáceos
D	Perros, chinchillas, canguros, ganado, cetáceos, zorros
E	Ganado, ovejas, cerdos, alpacas, cabras, caballos, yak, zorros, ciervos, gatos
F	Gatos, cetáceos, cerdos
G	Ratas, ratones
H	Foca gris, gaviotas

El ciclo de vida de *Giardia* es simple y no necesita huéspedes intermediarios. El mismo está constituido por dos formas que presentan diferencias tanto morfológicas como bioquímicas, el quiste y el trofozoíto (Einarsson *et al.*, 2016; Carranza & Lujan, 2010; Adam, 2001).

La infección se inicia con la ingestión de las estructuras de resistencia denominadas quistes, las cuales se encuentran en alimentos o aguas contaminadas (Figura 2). Al llegar al estómago y encontrarse con un medio ácido, los quistes se diferencian a trofozoítos, los cuales constituyen la forma vegetativa del parásito y se asocian a los síntomas de la enfermedad. A este proceso se lo denomina desenquistamiento.

Una vez en el intestino del huésped, estos trofozoítos se dividen por fisión binaria colonizando el epitelio intestinal y bloqueando de esta manera la absorción de los nutrientes por parte del huésped. 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 a esta diferenciación enquistamiento. Los quistes son luego liberados con las heces y los mismos cierran el ciclo de vida cuando son ingeridos nuevamente por hospedadores susceptibles (Einarsson *et al.*, 2016; Carranza & Lujan 2010; Adam, 2001).

La forma quística del parásito se caracteriza por ser resistente a largos periodos de exposición a un ambiente externo al del huésped. El citoplasma del quiste contiene todas las estructuras subcelulares que pueden ser observadas en los trofozoítos vegetativos (Figura 3). Los trofozoítos sufren un proceso de división celular incompleta (sin citocinesis) durante el proceso de enquistamiento, por lo que los mismos presentan 4 núcleos en su citoplasma (Adam, 2001). La pared del quiste se constituye de una capa filamentosa de 0,25 μm y de dos membranas celulares separadas por el espacio peritrópico (Chavez-Munguia *et al.*, 2004; Erlandsen *et al.*, 1996; Erlandsen *et al.*, 1989). Esta distribución estructural permite que la pared sea selectivamente permeable, controlando la entrada de las moléculas y permitiendo también ser resistente a las condiciones adversas donde esta estructura se mantiene (Adam, 2001).

Esta capa filamentosa esta formadas por un 63% de carbohidratos y un 36% de proteínas (Adam, 2001; Manning *et al.*, 1992; Jarroll *et al.*, 1989). El azúcar predominante es un polímero de β 1,3-N-acetil-D-galactosamina (Jarroll *et al.*, 1989), mientras que los componentes proteicos mayoritarios son las denominadas proteínas de la pared del quiste 1, 2 y 3 (CWP1, CWP2 y CWP3; por sus siglas en inglés, *Cyst Wall Protein*) (Sun *et al.*, 2003; Gillin *et al.*, 1996; Lujan *et al.*, 1995; Mowatt *et al.*, 1995).

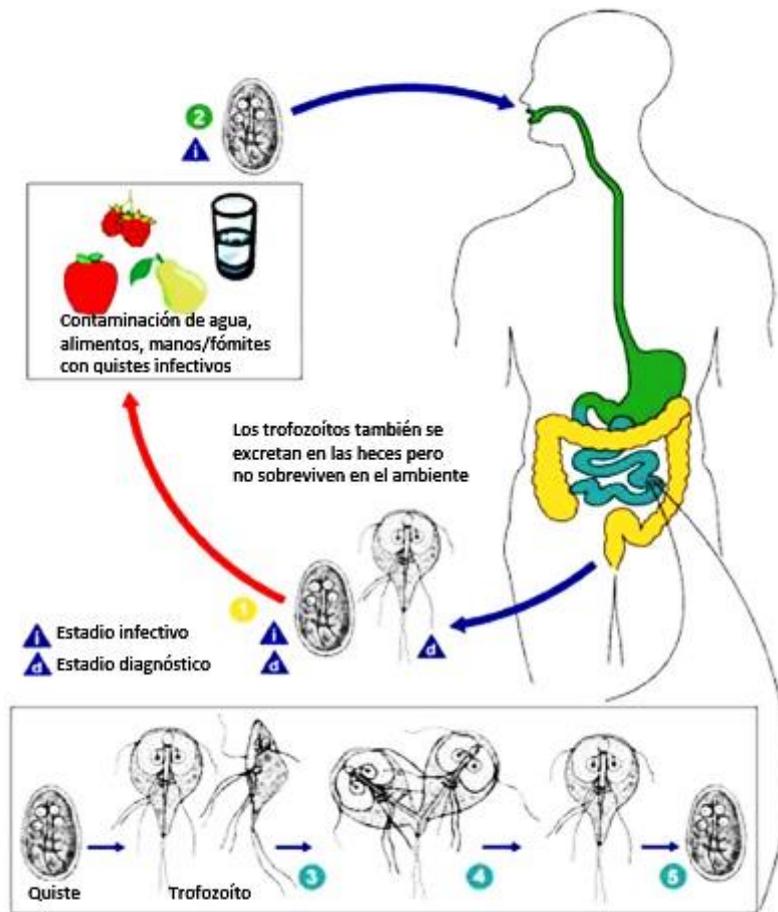


Figura 2. Ciclo de vida de *Giardia*. Los quistes son formas resistentes responsables de la transmisión de la giardiasis. Los quistes y trofozoítos se encuentran en las heces (estadio diagnóstico) (1). La infección ocurre por la ingestión de quistes en agua y alimentos contaminados, o por la ruta fecal-oral en las manos o fómites (2). En el intestino delgado, la eclosión libera a los trofozoítos (cada quiste produce dos trofozoítos) (3), los cuales se multiplican, permaneciendo en el lumen del intestino delgado proximal (4). El enquistamiento ocurre cuando el parásito transita hacia el colon (5). Puesto que los quistes al ser excretados o poco tiempo después son infectantes, es posible la transmisión entre persona a persona. A veces los animales son infectados con *Giardia*, pero no está clara su importancia como reservorio.

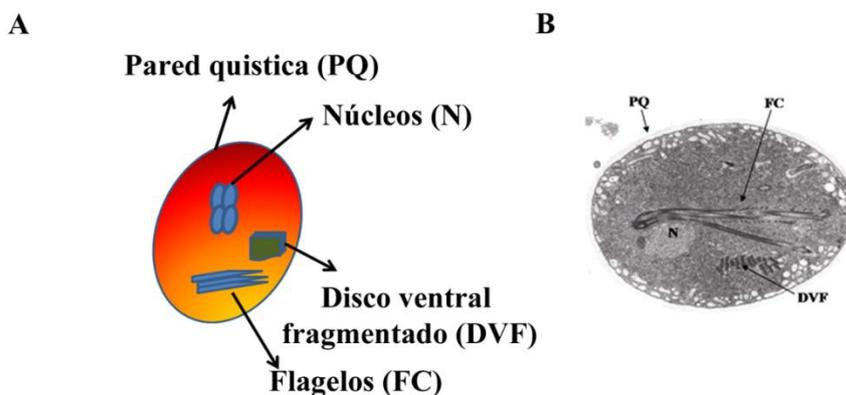


Figura 3. El quiste de *G. lamblia*. (A) Esquema con las estructuras subcelulares del quiste de *G. lamblia*. (B) Microscopía electrónica de transmisión de un quiste (B). PQ, pared quística; FC, flagelo caudal; DVF, disco ventral fragmentado.

Luego de producirse el desenquistamiento, cada quiste viable es capaz de liberar dos trofozoítos, los cuales se dividirán luego por fisión binaria para colonizar el epitelio intestinal del huésped. Esta forma del parásito se caracteriza 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.

El citoesqueleto microtubular de *Giardia* está involucrado en la virulencia del parásito, ya que es crítico para su motilidad, adhesión, mitosis y división celular, y para las transiciones entre los dos estadios de su ciclo de vida, el quiste y el trofozoíto (Elmendorf *et al.*, 2003). Los trofozoítos tienen organelas microtubulares altamente dinámicas y estables que incluyen a un disco ventral, ocho flagelos, y a un cuerpo medio y un funis cuyas funciones aún permanecen poco comprendidas (Gadelha *et al.*, 2020; Hagen *et al.*, 2020).

Los flagelos, encargados de la motilidad celular, se extienden en pares desde los gránulos basales presentes en el polo anterior entre ambos núcleos. Se localizan en posición anterior, posterior lateral, caudal y ventral (Figura 4). Estas estructuras estarían involucradas en procesos de desenquistamiento, ya que son las primeras en surgir fuera de la estructura quística (Hagen *et al.*, 2020; Buchel *et al.*, 1987).

Giardia posee dos núcleos por célula y recientemente se ha presentado evidencia de la presencia de nucléolos gracias a estudios realizados con microscopía electrónica de transmisión y confocal (Tian *et al.*, 2010).

Los dos núcleos de *Giardia* han sido considerados idénticos debido a que Kabnick & Peattie (1990) detectaron genes de ARNr en ambos núcleos. Más tarde esta idea fue reforzada cuando Yu (2002) mediante el uso de sondas contra ciertos genes seleccionados describió que cada núcleo de *Giardia* contiene un set completo de información genética. Sin embargo, una serie de trabajos más recientes sugieren que ambos núcleos podrían no ser idénticos, ya que presentan cierto nivel de diversidad, lo que haría que cada uno de ellos sea irremplazable (Tumová *et al.*, 2019; Tumová *et al.*, 2016)

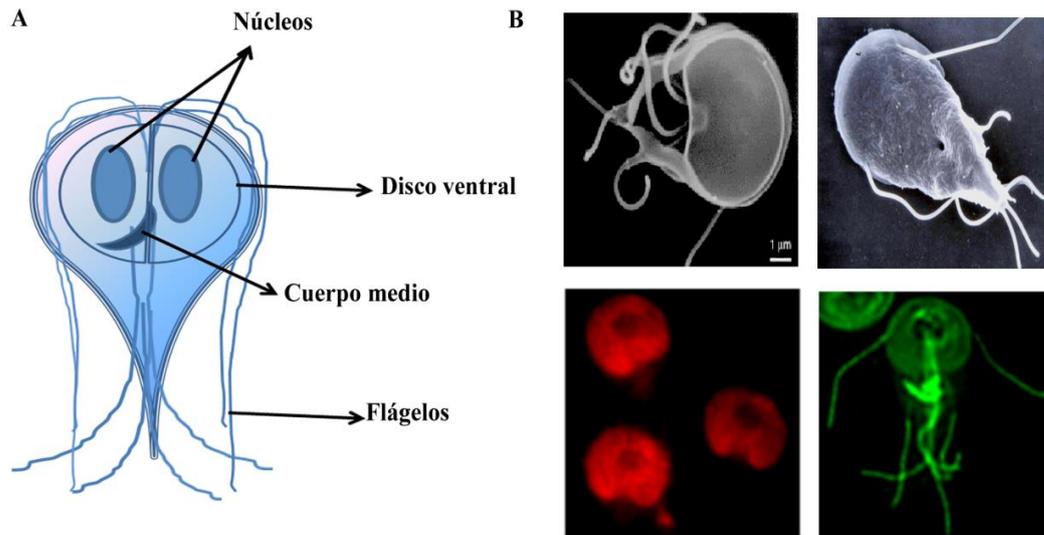


Figura 4. El trofozoíto de *G. lamblia*. (A) Diagrama general con las estructuras celulares de un trofozoíto. (B) Panel superior. Microscopía electrónica de barrido de un trofozoíto visto por su cara ventral (izquierda) y dorsal (derecha). Panel inferior. Inmunofluorescencia utilizando mAbs *anti-Giardina* (disco ventral, izquierda) y *anti-tubulina* (flagelos, derecha).

El disco ventral está constituido por estructuras fibrosas y microtubulares complejas. Está involucrado en la adhesión del parásito al epitelio intestinal y permite que *Giardia* pueda tomar los nutrientes (Figura 4). Este disco presenta una forma cóncava y está constituido por proteínas contráctiles encargadas de generar la presión negativa que permite que los parásitos se adhieran. Entre las proteínas contráctiles se encuentran: α y β tubulina, actina, α -actininina, miosina, tropomiosina (Feely *et al.*, 1982), como así también giardinas, las cuales se caracterizan por ser proteínas ácidas con presencia de α -hélices (Peattie, 1990). También cumple funciones durante la división celular participando en la división de los núcleos (Benchimol, 2004; Solari *et al.*, 2003). Durante el enquistamiento, el disco ventral se particiona en fragmentos que luego del desenquistamiento vuelven a ensamblarse para constituir nuevamente la organela.

En la parte media del trofozoíto se encuentra localizado el cuerpo medio, el cual es una estructura única perteneciente al género *Giardia*. Se ha postulado que esta organela estaría involucrada en la pro génesis del disco ventral (Piva & Benchimol, 2004; Solari *et al.*, 2003). El funis es una estructura compuesta por dos bandas de microtúbulos y axonemas que se asemeja al axostilo de otros organismos parásitos. El mismo emerge desde los axonemas de los flagelos caudales y se extiende hasta la porción posterior de la célula. Se ha propuesto que es el responsable del movimiento caudal lateral de los trofozoítos (Benchimol *et al.*, 2004).

En los trofozoítos de *Giardia*, el RE fue caracterizado a partir del descubrimiento de una chaperona residente en esta estructura subcelular, la GRP78/BiP (Lujan *et al.*, 1996; Soltys *et al.*, 1996) y de tres proteínas disulfuro isomerasas (PDIs), las cuales se encuentran en el RE de eucariotas superiores. Estas PDIs se asocian a la formación de puentes disulfuro en proteínas recientemente sintetizadas (Davids *et al.*, 2004; McArthur *et al.*, 2001; Knodler *et al.*, 1999). El RE se encuentra involucrado en los procesos de diferenciación celular del parásito ya que, en dicho estadio, la estructura se expande por la generación de proteínas que luego serán secretadas para formar la pared del quiste (Gottig *et al.*, 2006; Lujan *et al.*, 1997; Gillin *et al.*, 1996; Lujan *et al.*, 1996).

En proximidad a la membrana plasmática se encuentran unas estructuras subcelulares denominadas vesículas periféricas (PVs por sus siglas en inglés, *Peripheral Vesicles*). La principal función de las PVs es la de endocitar periódicamente material extracelular y expeler sustancias dañinas o inutilizables hacia el ambiente externo, muestreando de esta manera el ambiente (Cernikova *et al.*, 2018). Su actividad está relacionada a la acumulación y metabolismo de macromoléculas exógenas, debido a la presencia de enzimas hidrolíticas en su interior (Adam, 2001). Estos compartimientos se caracterizan por ser ácidos y constituyen el sistema lisosomal/endosomal del parásito. Diferentes estudios han evidenciado su participación en procesos de desenquistamiento (Slavin *et al.*, 2002) o formación de la pared del quiste (Touz *et al.*, 2002b).

Las vesículas específicas de enquistamiento (ESVs por sus siglas en inglés, *Encystment Specific Vesicles*) son estructuras subcelulares que se desarrollan durante el proceso de diferenciación celular a quiste (McCaffery *et al.*, 1994; McCaffery & Gillin, 1994; Faubert *et al.*, 1991; Reiner *et al.*, 1990). Estas organelas se caracterizan por ser de morfología irregular, medir aproximadamente 1 μm y por estar, la secreción de su contenido, asociada al aumento de concentración de Ca^{+2} (Touz *et al.*, 2002c), asemejándose de esta manera a los gránulos de secreción regulada característicos de eucariotas superiores.

A pesar de que en *Giardia* existen mecanismos de transporte constitutivo y regulado, es controvertida la presencia del aparato de Golgi, organela responsable del procesamiento y distribución de proteínas (Marti & Hehl, 2003; Lanfredi-Rangel *et al.*, 1999; McCaffery & Gillin, 1994). Sin embargo, la presencia en ciertas proteínas de señales de retorno desde el Golgi al RE y la aparición de estructuras que cumplirían con la función del aparato de Golgi durante el proceso de diferenciación, demostrarían la presencia de esta organela, por lo menos en dicha etapa del ciclo de vida de *Giardia* (Lujan *et al.*, 1995). No obstante, un estudio realizado por Elías y colaboradores indicaría que *Giardia* no posee un aparato de Golgi típico (Elías *et al.*, 2008), por lo que estudios adicionales son necesarios para clarificar esta controversia.

La superficie del trofozoíto está cubierta principalmente por un solo tipo de proteína (aunque no la única) de entre un repertorio de aproximadamente 150 genes que codifican para una familia de proteínas homólogas denominadas proteínas variables de superficie o VSPs (por sus siglas en inglés, *Variant-specific Surface Proteins*) (Adam, 2001). La densidad de las VSPs en la membrana plasmática genera una capa protectora que actúa como barrera impidiendo que el sistema inmune del hospedador pueda acceder a otros componentes de la membrana plasmática (Prucca *et al.*, 2011) Estas proteínas constituyen una interfaz entre el parásito y el organismo hospedador y son las principales proteínas reconocidas por el sistema inmunológico del huésped (Prucca & Lujan, 2009; Adam, 2001).

2. GIARDIASIS

Giardia posee una distribución mundial y se estima que causa alrededor de 280 millones de infecciones anualmente en humanos (Einarsson *et al.*, 2016). El parásito es dispersado principalmente a través de fuentes de agua contaminada y muchos países en vías de desarrollo son considerados zonas endémicas. La giardiasis forma parte de la iniciativa de enfermedades desatendidas de la OMS desde 2004. Los síntomas son variables, pero típicamente incluyen diarrea, náusea, dolor epigástrico y pérdida de peso. Los primeros signos de la infección aparecen después de 7-12 días de haber ingerido los quistes y usualmente es tratada con nitroimidazoles (Watkins & Eckmann,

2014). El parásito no es invasivo y existe una comprensión muy limitada acerca de los mecanismos que causan la enfermedad (Bartelt & Sartor, 2015).

La infección por *Giardia* induce efectos fisiopatológicos en el intestino del hospedador a través de su adhesión a las paredes del mismo y a la excreción de productos (ESPs por sus siglas en inglés, *Excretory-Secretory Products*). Esto causa daños estructurales que comprometen la integridad del epitelio intestinal, así como también la función de las enzimas del borde en cepillo e induce apoptosis en las células intestinales. Estos cambios afectan al balance de electrolitos y causa una permeabilidad intestinal aumentada, lo que conduciría a la producción de diarrea. Los desenlaces fisiopatológicos, sin embargo, son dependientes de la virulencia del aislamiento por lo que podrían no ser vistos en todas las infecciones causadas por *Giardia* (Einarsson *et al.*, 2016).

La giardiasis es una enfermedad multifactorial, lo cual refleja la compleja interacción entre el parásito y su hospedador. Algunos pacientes experimentan una enfermedad ligera de resolución espontánea, otros una enfermedad severa de larga duración que no responde a los tratamientos habituales, pero la mayoría usualmente se ubica entre estos extremos (Bartelt & Sartor, 2015). Las infecciones crónicas pueden conducir a complicaciones tales como el Síndrome de Intestino Irritable (SII), alergias a comidas, artritis, o Síndrome de Fatiga Crónica (Bartelt & Sartor, 2015). Los pacientes infectados durante un brote de *Giardia* en áreas no endémicas han reportado síntomas de larga duración luego de que el parásito haya sido eliminado (Litleskare *et al.*, 2015).

Un meta-análisis desarrollado para comprender el rol que tiene *Giardia* en la producción de diarrea determinó que no existe evidencia estadística para poder asociar la diarrea aguda con infecciones de *Giardia* en niños mayores de cinco años en países en desarrollo, pero sí en casos de diarreas persistentes (más de 14 días), y diarrea aguda en niños de hasta un año (Muhsen & Levine, 2012). También se encontró que los habitantes de países desarrollados que se infectan por contacto con aguas contaminadas o durante viajes a zonas endémicas son propensos a desarrollar diarrea aguda (Muhsen & Levine, 2012). Diferencias en el estado nutricional, estado inmune, coinfecciones, y la composición de la flora podrían contribuir a los diferentes desenlaces de la enfermedad entre individuos de países en desarrollo y aquellos de países desarrollados. *Giardia* aparentemente también sería capaz de proteger contra otros tipos de diarreas debido al efecto antiinflamatorio que es capaz de ejercer en el intestino del huésped (Cotton *et al.*, 2015; Cotton *et al.*, 2014).

El rol de la flora normal del intestino del hospedador y las coinfecciones durante las infecciones con *Giardia* aún permanecen inciertas. Existen estudios en ratones adultos que indican que floras diferentes influyen en la susceptibilidad a la infección (Singer & Nash, 2000). Recientemente se vio que si se alimentaba al nemátodo *C. elegans* con bacterias comensales de humanos previamente co-incubadas con *Giardia* éstos morían, pero lo mismo no ocurría si las bacterias no eran previamente expuestas a *Giardia*, sugiriendo que el parásito tiene la capacidad de afectar la microbiota del hospedador y alterar las interacciones entre el hospedador y su flora normal (Gerbaba *et al.*, 2015). Además, se ha visto que *Lactobacillus sp.* puede ser usado como probiótico y que en ratones reduce las infecciones con *Giardia* tanto en severidad como duración (Goyal *et al.*, 2013).

Las diferencias existentes en el desenlace de la infección también pueden deberse al parásito. Como se mencionó anteriormente (Tabla 1), las infecciones en humanos son causadas por los ensamblajes A y B, aunque son pocos los estudios que intentan relacionar síntomas y ensamblajes de manera consistente (Ryan & Caccio, 2013). Las infecciones en humanos son causadas más comúnmente por el ensamblaje B (58% de

los casos) que por el ensamblaje A (37%). Esta proporción se mantiene tanto en países en desarrollo como desarrollados, aunque la prevalencia de infecciones mixtas es mayor en los primeros (Ryan & Caccio, 2013). La relación entre el genotipo y el desenlace de la infección aún hoy en día es escasa, por lo que no se pueden descartar que diferencias genéticas tengan efecto en el desenlace de la infección (Ryan & Caccio, 2013).

Recientemente se ha secuenciado el genoma de varios aislados clínicos que pertenecen a diferentes subtipos, y comparado con las clásicas cepas de laboratorio (Ankarklev *et al.*, 2015; Hanevik *et al.*, 2015), revelando una gran variabilidad genética dentro de los genotipos. Futuros estudios genómicos combinados con información de calidad de los pacientes podrían revelar si los genotipos tienen algún efecto sobre el desenlace de la enfermedad durante la giardiasis.

Existen varias drogas anti-giardiales, de las cuales las más usadas son los compuestos derivados del 5-Nitroimidazol tales como el metronidazol (MDZ). El MDZ es una pro-droga que debe ser reducida antes de volverse tóxica, luego de lo cual induce daños en el ADN y las proteínas en organismos microaerófilos y anaeróbicos (Watkins & Eckmann, 2014; Muller *et al.*, 2015).

Existen pocos estudios acerca del impacto que tienen los 5-Nitroimidazoles sobre la microbiota del intestino del hospedador y las consecuencias de cualquier disbiosis en enfermedades de larga duración. Además de comprometer la microbiota del hospedador, los 5-Nitroimidazoles están asociados a varios efectos secundarios (Riches *et al.*, 2020). Sin embargo, estas drogas siguen siendo usadas debido a su bajo precio y disponibilidad.

La existencia de casos de tratamientos ineficaces, así como de resistencia, ha llevado a que se intensifique la búsqueda de alternativas durante los últimos años (Einarsson *et al.*, 2016).

3. PROCESOS DE DIFERENCIACION

Los trofozoítos de *Giardia* atraviesan cambios fundamentales con el fin de sobrevivir tanto dentro como fuera del intestino de su hospedador. El inicio de la infección ocurre luego de la ingestión de quistes por parte de hospedadores susceptibles. Una vez en el intestino del huésped ocurre el *desenquistamiento*, la liberación de los trofozoítos vegetativos y la colonización del intestino delgado (Svard *et al.*, 2003). Para sobrevivir dentro del intestino *Giardia* sufre VA, un proceso por el cual el parásito cambia continuamente su principal molécula de superficie, permitiendo de esta manera que el parásito pueda evadir la respuesta inmune montada por el hospedador, y así producir infecciones crónicas y recurrentes (Luján, 2011). Cuando estos trofozoítos continúan descendiendo por el tracto intestinal se dispara el proceso de *enquistamiento* y se vuelven a generar las estructuras infectivas de resistencia, los quistes. Estos quistes luego son liberados con las heces, cerrándose el ciclo de vida del parásito cuando estos son ingeridos nuevamente por hospedadores susceptibles (Einarsson *et al.*, 2016; Carranza & Lujan 2010; Adam, 2001).

a. Desenquistamiento

Luego de que los quistes ingeridos por un huésped llegan al estómago, la presencia de jugo gástrico y el bajo pH que lo caracteriza dan lugar al comienzo del

proceso de diferenciación denominado *desenquistamiento*. Este culmina luego de que al dejar el estómago los quistes sienten un medio más alcalino con elevada actividad de enzimas proteolíticas, lo que lleva a la liberación de las estructuras vegetativas del parásito, los trofozoítos.

En una primera instancia, el contacto de los trofozoítos con el medio ácido presente en el estómago desencadena una señal mediada por calcio que induce la liberación de enzimas presentes en las PVs hacia el espacio periplásmico. Este proceso implica la acción primaria de una fosfatasa ácida que desfosforila las CWP (Slavin *et al.*, 2002), lo cual permite luego la acción de proteasas intestinales y de la cisteína proteasa 2 que también se encuentra alojada en las PVs. Esta sucesión de eventos moleculares permite el desensamblado y digestión de la pared quística (Ward *et al.*, 1997)

Para que ocurra la liberación de los trofozoítos vegetativos, se debe llevar a cabo primero la separación del espacio peritrofico de la cara pre ventral del trofozoito emergente. Luego se da lugar a la salida de los flagelos a través de uno de los polos de la estructura quística, concluyendo con la salida del trofozoito entero. Debido a que los núcleos sufren división nuclear durante el proceso de generación del quiste, el trofozoito emergente presenta cuatro núcleos. Esta estructura vegetativa sufre luego una citoquinesis generando dos trofozoítos que comenzarán a colonizar el intestino del huésped infectado (Erlandsen & Meyer, 1984).

b. Enquistamiento

El proceso mediante el cual los trofozoítos vegetativos dan lugar a estructuras quísticas se denomina *enquistamiento*. Esta diferenciación asegura que el parásito pueda sobrevivir a las condiciones adversas que se presentan en el exterior del intestino del huésped y de esta manera poder infectar nuevos hospedadores susceptibles.

Este mecanismo de diferenciación celular puede dividirse en tres etapas que involucran cambios bioquímicos y morfológicos. Una primera etapa donde se recibe el estímulo de diferenciación a quiste, seguido de la transducción de esta señal hacia el núcleo y la activación consecuente de los genes involucrados en el enquistamiento; una segunda etapa donde se lleva a cabo la síntesis de los componentes estructurales de la pared del quiste y de las estructuras celulares involucradas en el transporte de los mismos, y una etapa final donde se lleva a cabo el ensamblaje de dichos componentes constituyendo finalmente el quiste (Carranza & Lujan, 2010; Lujan *et al.*, 1997).

G. lamblia no es capaz de sintetizar ácidos grasos de cadena larga, esteroides y fosfolípidos *de novo*, razón por la cual el mismo toma estos componentes del tracto digestivo del individuo que infecta. Estas macromoléculas se encuentran tanto en la dieta como en la bilis presente en el intestino (Jarroll *et al.*, 1989 y 1981). En su movimiento a través del intestino, los trofozoítos llegan a la parte inferior del mismo y se encuentran con un ambiente pobre en colesterol, lo cual dispara la señalización que desencadena el proceso de activación de genes específicos de este proceso de diferenciación celular. Se ha postulado que la ausencia de colesterol podría afectar la fluidez de la membrana plasmática y esto disparar una señal que activaría el proceso de enquistamiento (Lujan *et al.*, 1997). Se ha demostrado que existe una enzima, Dipeptidil Peptidasa (gDPP), asociada a la membrana de los trofozoítos y que la misma es clave para la señalización y activación de genes específicos de enquistamiento desencadenada por un cambio en la fluidez de membranas (Touz *et al.*, 2002c).

Un mecanismo alternativo para explicar la activación de la transcripción de genes

específicos del enquistamiento involucra secuencias en el ADN denominadas elementos reguladores del esterol (SRE por sus siglas en inglés, *Sterol Regulatory Element*). Esta secuencia de tan solo 10 pares de bases se encuentra corriente arriba de los promotores de genes codificantes para enzimas asociadas a la síntesis del colesterol. La disminución o ausencia de colesterol promovería una cascada proteolítica que activaría a proteínas con capacidad de unirse a estas secuencias SRE, denominadas SREBPs (por sus siglas en inglés, *Sterol Regulatory Element Binding Proteins*) y culminaría con el inicio de la transcripción de los genes asociados a este proceso de diferenciación celular (Carranza & Lujan, 2010; Brown & Goldstein, 1997).

Estudios de proteómica y transcriptómica han revelado que el enquistamiento involucra una cascada de expresión génica altamente coordinada que involucra tanto cambios en los niveles de ARN como en los niveles de proteínas (Einarsson *et al.*, 2016b). Los factores reguladores implican a factores de transcripción específicos de enquistamiento (Yang *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2002), enzimas remodeladoras de la cromatina y modificaciones postranscripcionales (Einarsson *et al.*, 2016a). Varias proteínas que pertenecen a las familias multigénicas de proteínas ricas en cisteína como las VSPs y las proteínas de membrana ricas en cisteína o HCMPs (por sus siglas en inglés, *High Cysteine Membrane Proteins*) también cambian su expresión durante el enquistamiento (Einarsson *et al.*, 2016; Emery *et al.*, 2015), lo que muestra la existencia de una conexión entre los procesos de enquistamiento y variación antigénica.

El estímulo del enquistamiento conduce a la síntesis de proteínas ricas en leucina llamadas CWP (CWP1, CWP2, y CWP3) que formarán la pared del quiste (Mowatt *et al.*, 1995; Lujan *et al.*, 1995 y 1997). También se lleva a cabo la síntesis de otras proteínas involucradas en este proceso, como la proteína específica de gránulos de enquistamiento (Touz *et al.*, 2002c), sintaxinas (Gottig *et al.*, 2006), proteína C4 (Nores *et al.*, 2009) y dipeptidilpeptidasa IV (Touz *et al.*, 2002a).

Ya en el retículo endoplásmico (RE), CWP1 y CWP2 forman complejos proteicos de estructura estable y los mismos desencadenan la formación de gránulos de secreción específicos llamados *Encystation-specific Secretory Vesicles* o ESVs (Lujan & Touz, 2003; Carranza & Lujan, 2010), organelas responsables específicamente del transporte de los componentes de la pared quística. Simultáneamente, se forman estructuras membranosas que asemejan al aparato de Golgi y se inducen moléculas comprometidas en la modificación y plegamiento de proteínas específicas, como la chaperona del RE, BiP (Lujan *et al.*, 1996).

Las CWPs son transportadas hacia la membrana plasmática en las ESVs, las cuales interactúan con las PVs en una zona adyacente a la membrana celular donde se produce el procesamiento de CWP2 por una cisteína proteasa específica llamada *Encystation-specific Cysteine Protease* o ESCP (Touz *et al.*, 2002b). Este procesamiento es clave para que ambas proteínas sean liberadas al espacio extracelular y se lleve a cabo el ensamblaje de la pared filamentosa característica de la estructura quística. La formación de una pared quística protectora es esencial para la supervivencia de *G. lamblia* fuera del intestino y su transmisión a nuevos hospedadores susceptibles.

c. Variación Antigénica

Durante una infección parasitaria, la capacidad de generar células con perfiles fenotípicos diferentes aumenta notablemente la probabilidad de que al menos una pequeña población de organismos parásitos sobreviva a la acción del sistema inmune y permita perpetuar la especie. En parásitos protozoarios la capacidad de modificar el

fenotipo es generada mediante un mecanismo denominado variación antigénica (VA), el cual consiste en la expresión de un determinante antigénico en su superficie y su capacidad para, posteriormente, cambiarlo por otro antígeno distinto. En *Giardia*, estos determinantes antigénicos de superficie se denominan VSP.

Las VSPs son proteínas integrales de membrana ricas en cisteína que poseen una región extracelular amino terminal variable y un dominio carboxilo terminal conservado que incluye a una región transmembrana y a una cola citoplasmática corta de tan sólo 5 aminoácidos (Figura 5).

Si bien el mecanismo de VA manifiesta particularidades en los diferentes organismos donde se ha descrito, el mismo presenta los siguientes puntos que lo caracterizan:

- Familia de genes homólogos que codifican para antígenos de superficie.
- Mecanismo de expresión reversible de estos antígenos en células individuales para iniciar una nueva subpoblación antigénicamente diferente.
- Mecanismo que garantiza la expresión mutuamente excluyente de sólo uno de estos genes.

Un gran número de parásitos logran establecer infecciones crónicas en sus hospedadores. Un factor fundamental para lograrlo es la densidad del parásito al producir la infección: si la densidad supera el límite de patogénesis, el huésped muere y no se lleva a cabo la transmisión del parásito; mientras que si la densidad alcanza niveles extremadamente bajos será eliminado por el sistema inmune del huésped. El mecanismo de VA permite mantener la densidad del parásito entre ambos límites: mientras el sistema inmune limita la carga parasitaria, el cambio fenotípico permite a una pequeña fracción de la población evadir la respuesta inmune. Así se favorece la transmisión del parásito y se convierte en una característica que confiere al mismo una ventaja evolutiva (Hovel-Miner, 2015; Johnson *et al.*, 2012; Turner, 1999).

Sin embargo, no sólo organismos parásitos como *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei* o *G. lamblia* manifiestan variación de sus proteínas de superficie, sino también organismos de vida libre como *Paramecium* o *Tetrahymena* (Nash & Mowatt, 1992; Scherf *et al.*, 1998; Donelson, 2003; Kusch & Schmidt, 2001). A pesar de que estos organismos no deben enfrentar una respuesta inmune, este mecanismo serviría para proteger a los mismos de factores ambientales adversos. Estas proteínas variables tal vez participen en la recepción de señales celulares externas sensando los cambios ambientales y permitiendo al organismo expresar aquella molécula que favorezca su supervivencia (Kusch & Schmidt, 2001). Asimismo, es posible que la presencia de este mecanismo refleje su condición parasitaria primitiva.

En *Giardia*, la VA fue descubierta como un fenómeno espontáneo *in vitro* observándose diferencias en los patrones de marcado superficial al incubarse diferentes aislados de células con antisueros específicos (Nash *et al.*, 1988; Nash & Aggarwal, 1986; Nash & Keister, 1985) y mediante la generación de anticuerpos monoclonales (mAbs) que reconocen epítopos superficiales de sólo algunos trofozoítos en una población determinada (Nash & Aggarwal, 1986). Años más tarde, se demostró que este proceso de VA también ocurría durante el transcurso de la infección en humanos y animales de laboratorio (Muller & Gottstein, 1998; Aggarwal & Nash, 1988; Nash *et al.*, 1990). La exposición de trofozoítos a mAbs que reconocen específicamente una proteína variable de superficie (VSP) conduce a la agregación de los mismos y a una supuesta muerte celular (Touz *et al.*, 2005; Heyworth, 1992; Nash & Aggarwal, 1986). Los trofozoítos que sobreviven a este ensayo ya no son reconocidos por este mAb y por lo tanto son capaces de generar una población que expresa una VSP diferente a la

original, demostrando de esta forma el mecanismo de VA que caracteriza a este parásito (Nash *et al.*, 1988; Nash & Aggarwal, 1986).

Generalmente, sólo un tipo de VSP es expresada en la superficie del parásito en un momento determinado. Durante el recambio de esta (*switching*), los trofozoítos expresan simultáneamente al menos dos VSP antigénicamente diferentes (Nash *et al.*, 2001). De la misma manera se ha reportado que durante el proceso de enquistamiento y desenquistamiento ocurre la expresión simultánea de dos VSPs (Carranza *et al.*, 2002; Svård *et al.*, 1998).

Aunque se ha informado que el proceso de VA está asociado a la presencia de anticuerpos específicos para estas proteínas de superficie, el recambio de las mismas se da aún en ausencia de cualquier presión inmune (Nash, 2002; Bienz *et al.*, 2001). La frecuencia de recambio de una VSP por otra es dependiente no sólo del aislamiento con el que se trabaje sino también de la VSP que se estudie. Se ha reportado que la frecuencia de cambio de una VSP se encuentra entre 6,5 generaciones en el aislamiento GS (ensamblaje B) y 12-13 generaciones en el aislamiento WB (ensamblaje A) (Nash *et al.*, 1990).

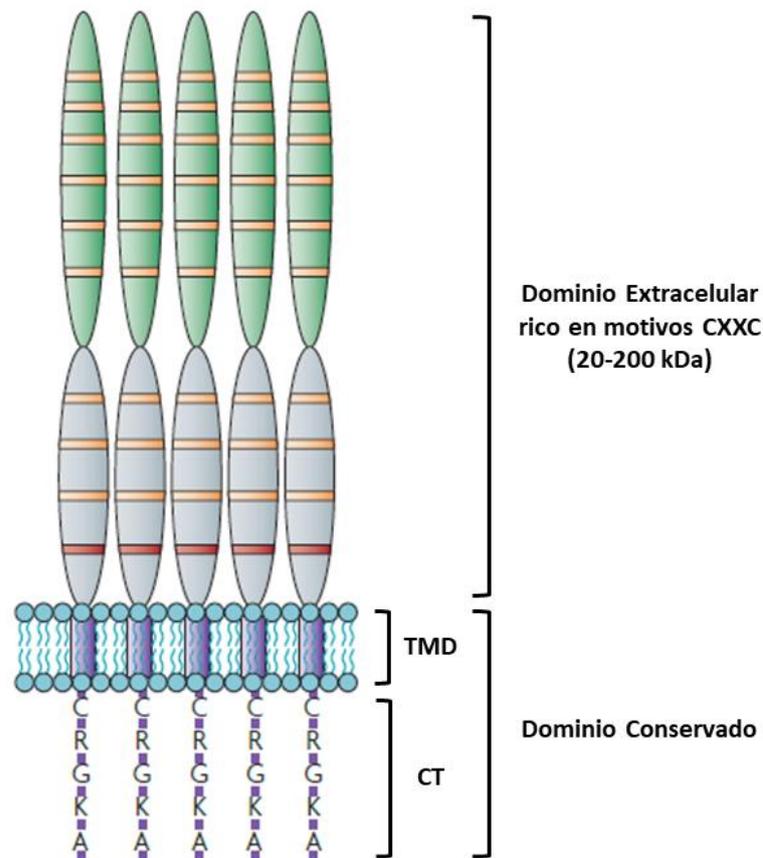


Figura 5. Esquema general de la estructura de una VSP. Las VSPs cubren la superficie entera del trofozoíto, generando una densa cubierta. El tamaño de las VSPs puede ir de 20 a 200 kDa, y su contenido de Cisteína es de entre un 11-12%, la mayoría de las cuales se hallan en numerosos motivos CXXC (naranja) que pueden formar puentes disulfuro. El dominio extracelular N-terminal de las VSPs es su región más variable, y forma la interfase entre el parásito y su ambiente. El dominio extracelular más cercano a la membrana está semi conservado y contiene uno o dos motivos GGCY (rojo). Todas las VSPs tienen un dominio conservado C-terminal, que incluye a una región transmembrana (TMD) y a una cola citoplasmática (CT) compuesta por los aminoácidos CRGKA. El motivo CRGKA puede ser

modificado por la palmitoilación del residuo de cisteína y por la citrulinación del residuo de arginina.

4. REGULACIÓN DE LA VARIACIÓN ANTIGÉNICA

Giardia es un organismo binucleado y sus dos núcleos son activos y funcionales, por lo que 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 en *Giardia* puede ser ventajoso, para lo cual dos mecanismos citoplasmáticos que involucran ARN pequeños han sido propuestos (Prucca *et al.*, 2008; Saraiya *et al.*, 2014).

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 (ARNds) a través de un proceso mediado por enzimas del tipo RNasa III (Kim, 2005). Las dos principales clases de ARN pequeños involucradas en el silenciamiento de ARN son los micro ARNs (miARN) y los ARNs pequeños interferentes (siARN), ambos descritos como importantes reguladores de procesos biológicos en eucariotas por medio de un silenciamiento génico.

El modelo de miARN sugiere que estos pequeños ARN tendrían un origen nuclear, es decir estarían codificados en el genoma (Saraiya *et al.*, 2014); por otro lado, el modelo de los siARN le proporciona un papel principal en el mecanismo de silenciamiento a la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP), la cual sería la encargada de identificar ARNs aberrantes para luego generar los pequeños ARN que dirigirían el silenciamiento de todas las VSPs excepto una (Prucca *et al.*, 2008). A pesar de que entre los modelos existen discrepancias, es claro que el control de la VA en *Giardia* ocurre post transcripcionalmente y que la disrupción de la maquinaria de ARNi permite la expresión del repertorio completo de VSPs sobre la superficie del parásito. Si bien el mecanismo que permite la expresión de una única VSP en la superficie del parásito ha sido descrito, quedan aún varios interrogantes en lo que respecta a los mecanismos moleculares que permiten el recambio de una VSP por otra durante el proceso de VA.

5. VARIACIÓN ANTIGÉNICA EN *GIARDIA* Y EL ROL DE LA RESPUESTA INMUNE

La inmunidad innata es el primer mecanismo de defensa del organismo y está constituido por una serie de sistemas físicos, bioquímicos y celulares aptos para la prevención y/o eliminación de las invasiones de agentes patógenos.

El mucus intestinal, producido por las células caliciformes, no sólo protege los enterocitos de las acciones de enzimas digestivas, sino que también impide o limita el acceso al epitelio por parte de los agentes patógenos tales como *Giardia* (Eckmann, 2003; Solaymani-Mohammadi, 2010). En las infecciones crónicas de *Giardia* los pacientes pierden una correcta funcionalidad de la barrera intestinal debido a una reducción de la secreción de mucus, fenómeno que favorece la manifestación clínica de la giardiasis (O'Hara & Buret, 2008; Halliez & Buret, 2013).

Las células del epitelio intestinal (IECs, por sus siglas en inglés *Intestinal Epithelial Cells*) y las del sistema inmunitario pueden producir óxido nítrico (NO), una molécula que tiene diferentes efectos fisiológicos sobre el organismo, entre los cuales se destacan una función inmuno-moduladora y una citotóxica. La enzima encargada de la producción del NO es llamada NO sintasa (NOS) y se encuentra en tres isoformas distintas: la

neuronal (nNOS); la inducible (iNOS) y la endotelial (eNOS). La principal isoforma que se encuentra activa en el epitelio intestinal es la iNOS (Muller & von Allmen, 2005).

Ensayos conducidos *in vitro* han demostrado que el NO puede interferir con el ciclo de vida de los parásitos inhibiendo el fenómeno del enquistamiento y disminuyendo la proliferación celular (Eckmann, 2000). A su vez, estudios en ratones deficientes en la isoforma iNOS y estudios donde se han utilizados diferentes inhibidores de las NOS han demostrado que la actividad de la nNOS es fundamental para erradicar la infección de *Giardia*, sugiriendo que el principal mecanismo de acción sea la modulación de la motilidad intestinal más que un efecto citotóxico directo sobre *Giardia* (Li, 2006; Andersen, 2006).

Unas de las células del sistema inmune innato que parecen tener una acción clave en el control de la giardiasis son los mastocitos, los cuales no solo jugarían un rol importante en la peristalsis, además de los efectos debidos al NO (Li, 2007), sino que también son fundamentales para la producción de Inmunoglobulinas A (IgA) específicas contra los parásitos, contribuyendo a la activación y diferenciación de los linfocitos B (Li, 2004; Merluzzi, 2010).

Otras células que se han demostrado protagonistas en la eliminación de *Giardia* son las células dendríticas (DCs por sus siglas en inglés *Dendritic Cells*). Por un lado, los trofozoítos son débiles activadores de las DCs, inhibiendo su capacidad de producir citoquinas pro-inflamatorias (Kamda & Singer, 2009; Obendorf, 2013); por otro lado lisados celulares de *Giardia* pueden activar las DCs causando la liberación de diferentes citoquinas como por ejemplo la interleuquina 6 (IL-6) y el TNF- α (Lee, 2014), ambas fundamentales en el control de la infección (Kamda, 2012; Jones, 2005; Zhou, 2007).

Cuando los mecanismos de la inmunidad innata no logran eliminar a los parásitos, éstos siguen reproduciéndose y colonizando el intestino hasta que los antígenos que expresan activan las células de la inmunidad adaptativa.

Se ha propuesto que la presencia de anticuerpos o suero de individuos infectados con *G. lamblia* es capaz de aglutinar y promover la muerte celular de este parásito. Se ha postulado que este proceso se debe a que la interacción de los anticuerpos con la superficie del parásito causaría la destrucción de la membrana plasmática del trofozoíto (Hemphill *et al.*, 1996).

El desarrollo de una respuesta inmune en organismos infectados con *Giardia* permite la erradicación de la infección, indicando la presencia de un mecanismo de defensa efectivo en el huésped (Nash *et al.*, 1987). Se ha demostrado que el isotipo A de inmunoglobulinas es requerido para la eliminación efectiva del parásito (Langford *et al.*, 2002), 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* (Birkhead *et al.*, 1989). Además, se mostró que la IgA inhibe la motilidad y adhesión de *Giardia* al intestino (Langford *et al.*, 2002).

Experimentos llevados a cabo en ratones carentes del receptor polimérico de las Igs, y que por ende no pueden secretar las IgA en el lumen intestinal, han demostrado que se producen infecciones crónicas sólo infectando con *G. muris* y no con *G. lamblia*, sugiriendo que *G. lamblia* podría ser más susceptible a los mecanismos de defensa anticuerpos-independientes en comparación con *G. muris* (Davids, 2006). Por otra parte, se ha observado que la secreción del isotipo M de las inmunoglobulinas (IgM) no tiene ningún efecto en la eliminación de la giardiasis, a pesar de que la misma también es secretada normalmente en el lumen intestinal (Langford *et al.*, 2002). Sin embargo, Singer y Nash (2000) han demostrado que ratones deficientes en células B son capaces

de erradicar la enfermedad, lo cual demuestra que las células T son suficientes para controlar la infección. Otros autores afirman que ambos componentes del sistema inmune jugarían un papel importante en el control de la infección (Faubert, 2000; Singer & Nash, 2000).

Por lo tanto, si bien durante las infecciones por *Giardia* se generan respuestas inmunes innatas (RII) y adaptativas (RIA) en humanos y animales, los mecanismos exactos que controlan la infección aún no se comprenden por completo. Temprano en la infección, entran en juego mecanismos independientes de células B responsables de la defensa que incluyen NO, especies reactivas del oxígeno (ROS), defensinas, lactoferrinas, células inmunes como fagocitos, mastocitos, y células dendríticas, y citoquinas. En particular, la IL-17 cumple un papel importante durante las infecciones de *Giardia* tanto en humanos como en animales (Einarsson *et al.*, 2016), y estudios en animales indican que luego de 1-2 semanas de iniciada la infección con trofozoítos de la cepa GS-M/H7 que expresan la VSP H7, solo se pueden aislar trofozoítos que no son reconocidos por el mAb específico para esta VSP, indicando la importancia de la generación de anticuerpos en el control de la enfermedad y la variación antigénica (Stager & Muller, 1997; Singer & Nash, 2000).

Estudios recientes de nuestro equipo de trabajo demostraron que los anticuerpos anti-VSPs no son citotóxicos para el parásito *in vitro* (Torri A., Tesis doctoral 2016), como estaba profusamente reportado, pero que en su lugar disparan la eliminación de la VSP mediante la liberación de microvesículas (MVs) y su reemplazo por otra VSP antigénicamente diferente (Tenaglia A., Tesis Doctoral 2020).

Por ello, el **Objetivo General** de este trabajo de tesis es el de comprender el papel que tienen las VSPs en la dinámica de las infecciones por *Giardia in vivo*.

Para esto, se han planteado una serie de **objetivos específicos**:

- Determinar como la VSP interacciona con la respuesta inmune del hospedador.
- Estudiar la dinámica de la infección por distintos clones usando al jerbo como modelo animal.
- Determinar qué factores del huésped explican dicha dinámica: establecimiento, expansión y latencia o resolución.

CAPÍTULO 2

Materiales y Métodos

Cultivo celular de *G. lamblia* y enquistamiento *in vitro*

Los trofozoítos de *G. lamblia* utilizados en este trabajo pertenecen al aislamiento WB, clones 9B10 (Carranza *et al.*, 2002), 1267 (Nash *et al.*, 1995), TSA417 (Gillin *et al.*, 1990), 2B10 y 7C9 del ensamblaje A (Mayrhofer G, 1995); y al aislamiento GS, clon H7 (Mowatt *et al.*, 1994) y 7D5 del ensamblaje B (Mayrhofer G, 1995). Periódicamente, se llevó a cabo el clonado de las poblaciones de trofozoítos por medio de la técnica de dilución límite seguido de ensayos de inmunofluorescencia (IF) utilizando anticuerpos monoclonales (mAb) para la verificación de clonalidad de las poblaciones obtenidas.

Los trofozoítos se cultivaron en medio TYI-33 (pH 6,8) suplementado con 10% de suero adulto bovino y 0,5 mg/ml bilis bovina (MCG, Medio Completo de *Giardia*) (Diamond *et al.*, 1978) a 37° C en anaerobiosis. Para inducir el enquistamiento los trofozoítos se cultivaron hasta un 70-80% de confluencia, momento en el cual fueron expuestos durante 24 h a medio de pre-enquistamiento (medio completo de crecimiento sin bilis bovina). Luego de las 24 h el medio de pre-enquistamiento fue reemplazado por medio de enquistamiento (ME), el cual es similar al anterior con la diferencia de que además posee 0,45% de bilis porcina, 0,01% de ácido láctico y un pH 7,8 (Boucher & Gillin, 1990). Los quistes en suspensión fueron recuperados por centrifugación a 800 x g por 10 min (Centrífuga *Eppendorff 5415 C*). Mientras que los trofozoítos adheridos a la pared de los tubos fueron despegados en MCG o en PBS 1X pH 7,0 mediante enfriamiento a 0° C durante 30 min y luego recuperados por centrifugación a 1000 x g por 10 min.

Infecciones *in vivo*

Cultivos de *G. lamblia* (crecidos *in vitro* y cosechados durante la fase logarítmica) fueron utilizados para infectar jerbos (*Meriones unguiculatus*) machos y hembras de cuatro semanas de edad. Las infecciones se realizaron inoculando de manera orogástrica 2×10^5 trofozoítos a menos que se especifique lo contrario. Las infecciones fueron evaluadas de la siguiente manera: los primeros 10 cm del intestino delgado de los jerbos fueron removidos y abiertos de manera longitudinal, y luego incubados en hielo durante 30 min en un tubo cónico tipo *falcon™* de 15 ml conteniendo 7 ml de PBS 1X para facilitar la liberación de los parásitos adheridos a la pared intestinal. Para evaluar el número de trofozoítos se realizó una cuantificación en cámara de Neubauer por duplicado para cada muestra. Luego se permitió que los trofozoítos recuperados se adhieran a las paredes del *falcon™* incubándolos a 37°C durante 1 h, para luego realizar varios lavados con MCG para eliminar la mayor cantidad de residuos. Posteriormente, los trofozoítos obtenidos se analizaron por IF o citometría utilizando anticuerpos monoclonales específicos anti-VSP, con el objeto de evaluar la identidad de la VSP que recubre a los parásitos y utilizar este dato para conocer el número de parásitos que expresan una determinada VSP en la población total (carga de parásitos x % de parásitos que expresan una determinada VSP/100%).

Construcción de los vectores de expresión

Para expresar las proteínas de interés en *G. lamblia*, las secuencias que codifican para el marco de lectura abierto (ORF por sus siglas en inglés, *Open Reading Frame*) de las mismas fueron clonadas en el plásmido pTubH7HApac (Touz *et al.*, 2003).

Estos plásmidos permiten la expresión constitutiva y estable de genes en trofozoítos de *G. lamblia* gracias a la presencia del promotor de tubulina y a la selección con el antibiótico puromicina, respectivamente (Touz *et al.*, 2003). Las proteínas se expresan fusionadas a 3 repeticiones en tándem del epítipo de la proteína hemaglutinina (HA) del subtipo H3 del virus influenza (YPYDVPDYA) (Touz *et al.*, 2003). El plásmido pTubH7HApac posee el gen de la Proteína Variable de Superficie H7 del aislamiento GS de *G. lamblia* que puede ser removido con las endonucleasas NcoI/ApaI y EcoRV (*Invitrogen*), posibilitando el clonado de otros genes en dicho vector.

Amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Todas las reacciones de PCR fueron realizadas utilizando ADN genómico (ADNg) de trofozoítos de *G. lamblia* del aislamiento WB y GS, aislado como fue descrito en Mowatt *et al.* (1995) y en Lujan *et al.* (1995). Los oligonucleótidos utilizados como cebadores para amplificar el gen de la VSP H7 (GenBank: AAA18202.1) mediante PCR fueron diseñados a partir de la secuencia depositada en la base de datos de *Giardia* (giardiadb.org). Se utilizó una serie de cebadores reversos mediante los cuales se introdujeron diferentes mutaciones (negrita) en la región que codifica para la cola citoplasmática CRGKA (Tabla 2).

Tabla 2. Lista de cebadores utilizados para generar las versiones mutantes de la VSP H7.

Cebador Forward (NcoI)	
VSPH7 (wt_Fw)	CATGCCATGGTTCTATTAATTAATTGCCTAATAGCAAGC
Cebador Reverse (BamHI)	
VSPH7 (wt_Rv)	CGGGATCCCCTACGCCTTCCC GCGGCAGACGAA
VSPH7 (553_557delCRGKA)	CGGGATCCCCTAGACGAACCACCAGCAGAGGAA
VSPH7 (556K>A)	CGGGATCCCCTACGC CG CCCCGCGGCAGACGAA
VSPH7 (554R>A)	CGGGATCCCCTACGCCTTCCC CG CGCAGACGAA
VSPH7 (553C>K)	CGGGATCCCCTACGCCTTCCC CG CTTGACGAA
VSPH7 (553_557CRGKA>KKKKK)	CGGGATCCCCTACTTCTTCTTCTTCTTGACGAACCACCAGCAG
VSPH7 (553_557CRGKA>AAAAA)	CGGGATCCCCTAC CGCGCGCGCGCGCG GACGAACCACCAGCAG

Los cebadores poseen sitios de restricción (subrayado) que permiten introducir la secuencia de nuestro gen de interés en el plásmido pTubH7HApac de manera tal que la proteína resultante carezca del tag-HA. En la secuencia de los diferentes cebadores se puede observar en verde el codón correspondiente a la metionina inicial (ATG), y en rojo al codón de *stop* (CTA).

Para las reacciones de amplificación de las variantes del gen *vspH7* se utilizó la enzima *AccuPrime Pfx* (*Invitrogen*).

Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Las muestras de ADN sujetas a análisis fueron sembradas, previo agregado de 0,1 volumen de buffer de siembra, en geles de agarosa 0,8-2 % en buffer TAE 1X conteniendo Bromuro de Etidio 0,5 µg/ml. La corrida electroforética se realizó aproximadamente a 2,5 voltios/cm y se visualizó mediante exposición a luz ultravioleta (Sambrook *et al.*, 1989) en un *UV Transilluminator (UVP)*, *BioSpectrum 815 Imaging System (MegaCam 815 Camera)*

Transfección de trofozoítos

La transfección de los trofozoítos se llevó a cabo mediante electroporación según se describió anteriormente (Touz *et al.*, 2002a). Trofozoítos del aislamiento WB obtenidos a partir de un tubo de 7 ml en monocapa (5×10^6 células aproximadamente) fueron resuspendidos en 0,3 ml de MCG y transferidos a cubetas de electroporación de 0,4 cm (Singer *et al.*, 1998). Luego, se adicionaron 10-20 μg de ADN plasmídico, y la mezcla se incubó durante 10 min en hielo. Luego las células fueron electroporadas con dos pulsos eléctricos (350 V, 1000 μF de capacitancia y 725 Ω de resistencia) separados por una incubación en hielo de un minuto entre uno y otro. Finalmente, se realizó una nueva incubación de 5 min en hielo, para luego transferir los trofozoítos a un tubo de 7 ml con MCG e incubarlos toda la noche a 37 °C en anaerobiosis. Al día siguiente, el medio de cultivo se suplementó con puromicina (*Sigma-Aldrich*) a una concentración final de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y los trofozoítos fueron incubados durante 7-10 días a 37 °C, para permitir la selección de las células transgénicas.

Microscopía de Inmunofluorescencia

Células fijadas

Una suspensión de trofozoítos en medio de cultivo fue sembrada en portaobjetos e incubada a 37 °C en cámara húmeda durante 1 h para permitir su adhesión al vidrio. Luego las células fueron fijadas y permeabilizadas con una solución de acetona/metanol (1:1) durante 30 min a -20 °C; o fijadas con paraformaldehído 4 % y permeabilizadas durante 5 min a temperatura ambiente en PBS/Tritón X-100 0.5 % y bloqueadas en PBS 1X/Tween20 0,05 %/albúmina 2,5 % por 30 min (modificado de Mowatt *et al.*, 1994; Lujan *et al.*, 1995). Luego fueron incubadas con anticuerpos primarios monoclonales de ratón (mAb 9B10, mAb 7F5, mAb 7C2, mAb 2B10, mAb 7C9, mAb G10/4, mAb 7D5), todos en dilución 1/1000 en PBS 1X/Tween20 0,05 %/albúmina 1 % por 1 h a temperatura ambiente y luego de ser lavadas (x3) con PBS 1X/Tween20 0,05 % se incubaron con el anticuerpo secundario polivalente anti-Igs de ratón *Alexa 488* o *Alexa 546* (1/2000) por 1 h en solución de bloqueo.

Las inmunofluorescencias directas fueron llevadas a cabo utilizando el mismo protocolo, con la diferencia de que se utilizaron directamente los anticuerpos primarios marcados con isotiocianato de fluoresceína: mAb 7F5-FITC, mAb 7C2-FITC y G10/4-FITC, en una dilución 1/500. Los núcleos se visualizaron con DAPI (*Molecular Probes*) a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Células vivas

Cultivos en monocapa de *G. lamblia* en tubos de 7 ml fueron lavados dos veces con PBS a 37 °C, luego los tubos fueron llenados con PBS frío y dejados en hielo por 30 min para permitir que los trofozoítos pierdan su adherencia. Los tubos fueron centrifugados 5 min a 1000 x g (4 °C) y las células fueron resuspendidas en 1 ml de PBS. Dichas células fueron inmediatamente incubadas con 100 μl de una solución de anticuerpo primario (1/1000) (mAb 9B10, mAb 7F5, mAb 7C2, mAb 2B10, mAb 7C9, mAb G10/4, mAb 7D5) por 1 h en heladera. Al término de la incubación fueron lavadas dos veces con PBS y se incubaron nuevamente con una solución del anticuerpo secundario marcado con moléculas fluorescentes (1/2000) (*Alexa 488* o *Alexa 546*).

Las inmunofluorescencias directas se realizaron incubando directamente las células con los anticuerpos marcados con isotiocianato de fluoresceína mAb 7F5-FITC, mAb 7C2-FITC y mAb G10/4-FITC (1/500) durante 1 h en heladera.

Adquisición y procesamiento de imágenes

Las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio de epifluorescencia *Leica IRBE* con los objetivos 20X, 40X (aire) o *HXC PLAPO* 100x (inmersión en aceite), y equipado con una cámara *Hamamatsu ORCA CCD*.

Las imágenes confocales fueron adquiridas en un microscopio confocal *Olympus FV1000* con objetivo 100X *Zeiss-Apochromat NA 1.4*, realizando rebanadas ópticas de 0,5 μm . Las imágenes fueron procesadas con el programa *ImageJ* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las células fijadas con glutaraldehído se fijaron posteriormente con OsO_4 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).

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las células fijadas con glutaraldehído se fijaron posteriormente durante 15 min en OsO_4 al 1%. Posteriormente, las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol hasta el 100%, se secaron a punto crítico con CO_2 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).

Determinación de viabilidad

Para determinar la citotoxicidad de los mAbs dirigidos contra las VSPs en *G. lamblia* se utilizaron poblaciones de trofozoítos que expresaban sólo una VSP en su superficie. La evaluación de células viables y no viables se llevó a cabo luego de 3 h de incubación con el mAb 9B10 mediante la técnica de tinción con diacetato de fluoresceína (células vivas), tal como describieron Jones & Senft (1985). El análisis se realizó manualmente mediante un barrido visual de fotografías de las células tratadas.

Ensayos de proliferación

El ensayo de proliferación se realizó como fue previamente descrito por Nash & Aggarwal (1986), aunque con una modificación: no se eliminaron las células no

adheridas, sino que se utilizó el total de las células presentes en el tubo de cultivo al momento de la cosecha. Luego de que los clones hayan sido sometidos a los tratamientos correspondientes, fueron transferidos a medio de cultivo y se los incubó durante 72 h para permitir su recuperación. A continuación, se contó el número total de células presentes en los tubos en cámara de Neubauer realizando diluciones seriadas.

Fragmentación de anticuerpos

Inicialmente se purificaron los mAbs 7F5 y 7C2 por medio de cromatografía de afinidad mediante la columna *HiTrap Protein G HP 1 ml (GE Healthcare)*. Luego, la fragmentación de ambos mAbs para obtener los fragmentos F(ab')₂ y Fab fue realizada mediante la digestión de estos con las enzimas Pepsina y Papaína, respectivamente.

Posteriormente el fragmento Fab fue purificado por cromatografía de afinidad mediante la columna *HiScreen Mabselect SuRe (GE Healthcare)* y por cromatografía de exclusión molecular mediante la columna *HiLoad 26/600 Superdex 200pg (GE Healthcare)*. Por su parte, el fragmento F(ab')₂ fue purificado por cromatografía de afinidad mediante la columna *HiTrap Protein G HP 1 ml (GE Healthcare)*. En todos los casos las purificaciones se realizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Evaluación de agentes estresores sobre clones de *Giardia*

Los reactivos utilizados para generar condiciones de stress sobre los parásitos fueron, peróxido de hidrógeno, nitroprusiato de sodio (*Sigma-Aldrich*), ditioneitol (*ThermoFisher*), EDTA (*Sigma-Aldrich*), EGTA (*Sigma-Aldrich*), diferentes concentraciones de pH, Tripsina (*Gibco*), CaCl₂ (*Sigma-Aldrich*), ionomicina (*Sigma-Aldrich*), y BAPTA-AM (*Sigma-Aldrich*).

Los ensayos consistieron en someter a un inóculo de entre 1x10⁴ y 2x10⁴ trofozoítos durante 30-60 min a los diferentes estímulos en PBS a 37 °C, y luego de un par de lavados con PBS permitir el crecimiento de estos durante 72 h, a menos que se especifique lo contrario.

Ensayos poblacionales de VA inducida por anticuerpos

Para estudiar el efecto de los anticuerpos sobre el fenómeno de variación antigénica se incubaron durante tres días tubos con 10.000 células de poblaciones clonales de *Giardia* en medio completo. Se adicionaron diferentes concentraciones de mAbs anti-VSP específicos (1:10000 para 7F5, 7C2, 7C9, 2B10, 9B10 y 7D5, y 1:4000 para G10/4) y con mAbs no relacionados (7D6, anti-CWP2) como control negativo, cada uno por triplicado. Se realizaron inmunofluorescencias para determinar el porcentaje de células positivas respecto al control (células no tratadas con mAb) para la VSP de interés luego del estímulo con un determinado mAb.

Ensayos sobre células individuales de VA inducida por anticuerpos

Para estudiar el efecto de los anticuerpos sobre el fenómeno de variación antigénica en células individuales se distribuyó un número de 50 trofozoítos de un clon dado en placas de 96 pocillos con el objeto de que en promedio en cada pocillo no exista

inicialmente más de una única célula. Las células fueron crecidas en presencia de un mAb específico contra la VSP que expresa el clon en cuestión (placa tratamiento) o en presencia de un anticuerpo no relacionado (placa control), en una concentración de 30 nM para anticuerpos purificados o 1:7000 para anticuerpos no purificados. Luego de un periodo de incubación de 7 días a 37°C en anaerobiosis, se evaluó el número de pocillos con células y la identidad de la VSP de estas mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-VSPs.

Evaluación del recambio de VSPs en poblaciones de *G. lamblia*

Los trofozoítos pertenecientes a diferentes clones utilizados en experimentos tanto *in vivo* como *in vitro* fueron analizados mediante microscopía de IF o citometría antes y después de los ensayos realizados sobre ellos con el fin de comparar la identidad y los porcentajes de las VSPs expresadas en la superficie de estos.

Para el análisis del recambio de VSPs, trofozoítos pertenecientes a los clones utilizados fueron teñidos, preferentemente vivos, con los mAbs específicos del clon que corresponda a menos que se indique lo contrario.

Determinación de la concentración de proteínas

La cuantificación de proteínas fue realizada por el método que utiliza BCA (ácido bicinconínico) mediante el kit comercial *BCA Protein Assay* (Pierce).

Electroforesis en geles de Poliacrilamida/SDS y Western Blot

Las muestras de proteínas de interés fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot si requerido, mediante el procedimiento descrito por Laemmli en 1970.

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 de 2-Mercaptoetanol 5 mM fue calentado a 100 °C durante 10 min. Más tarde, fue sembrado en un gel de poliacrilamida al 7,5-12 %/SDS 0.1% y sometido a corriente constante de 200 V durante el tiempo necesario 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 nitrocelulosa (*Hybond-C, Amersham BioSciences*), en buffer de transferencia (Tris 20 mM, glicina 150 mM, metanol 20 %) a 100 V durante 2-4 h a 4 °C; para ello se empleó un equipo de transferencia PS 1200 PC *Power Supply*, Hoefer Scientific Instruments (Towbin *et al.*, 1979). Luego, la membrana fue bloqueada con leche descremada al 3 % disuelta en solución salina tamponada con buffer fosfato 1X/Tween20 0,5 % y posteriormente fue incubada por 1 h con los anticuerpos correspondientes diluidos 1/1000 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.*) durante 1 h a temperatura ambiente, y reveladas con sustrato para fosfatasa alcalina (BCIP/NBT, *Color Development Solution*, Bio-Rad). Una vez visualizadas las bandas se detuvo la reacción al sumergir las membranas en agua destilada.

CAPÍTULO 3

Resultados *in vitro*

**LA VSP COMO INTERFASE ENTRE EL PARASITO Y
EL HOSPEDADOR**

LA VSP COMO INTERFASE ENTRE EL PARASITO Y EL HOSPEDADOR.

En una reciente publicación realizada por nuestro equipo de trabajo se demostró mediante el uso de VSPs recombinantes y de VSPs enriquecidas a partir de clones de trofozoítos, que estas son altamente resistentes a las condiciones impuestas por el tracto gastrointestinal superior de sus huéspedes (Serradell *et al.*, 2019). Por lo tanto, las VSPs de *Giardia*, u otras moléculas que comparten características similares, serían responsables de proteger las células en ambientes hostiles. Sin embargo, existen reportes en donde se describe la incapacidad de ciertos clones para prosperar en sus hospedadores, sugiriendo que no todas las VSPs serían aptas para brindar esta protección (Singer *et al.*, 2001; Udezulu *et al.*, 1992; Nash *et al.*, 1991; Aggarwal & Nash, 1987)). Por esta razón, nos propusimos a abordar el estudio de las capacidades protectivas que tienen diferentes VSPs sobre los trofozoítos *in vitro* para posteriormente analizar los fenómenos que ocurren en el curso de las infecciones *in vivo*. Para lograrlo, el primer paso fue caracterizar diferentes clones de *Giardia in vitro*.

Anticuerpos monoclonales específicos contra distintas VSPs.

Los mAbs que reconocen proteínas de la superficie celular pueden servir como herramientas muy útiles para el estudio de las funciones biológicas de las proteínas de membrana (Hamada & Tsuruo, 1987). En el presente trabajo de tesis los mAbs anti-VSPs juegan un rol central, razón por la cual es imposible avanzar sin una breve descripción de estos.

En nuestro laboratorio se desarrollaron un conjunto de mAbs anti-VSPs de los cuales en este trabajo de tesis se utilizaron los siguientes (Tabla 3): mAb 7F5, 2B10, 7C9, 7C2 y 7D5 todos ellos específicos para VSPs pertenecientes al aislamiento WB (ensamblaje A) y mAb 7D5 que reconoce una VSP del aislamiento GS (ensamblaje B). También se utilizaron los mAbs 9B10 (Carranza *et al.*, 2002) y el mAb G10/4 (Aggarwal *et al.*, 1988) que fueron amablemente cedido por el Dr. Theodore Nash (NIAID, NIH, USA).

Tabla 3. Anticuerpos monoclonales anti-VSPs.

mAb	Isotipo	Aislamiento	VSP
7F5	IgG	WB	1267
9B10	IgG	WB	9B10
2B10	IgM	WB	2B10
7C9	IgM	WB	7C9
7C2	IgG	WB	TSA417
7D5	IgM	GS	7D5
G10/4	IgG	GS	H7

El mAb 7F5, al igual que el mAb 5C1 (Nash *et al.*, 1988), es capaz de reconocer la VSP 1267. Ambos mAbs reconocen a las mismas células cuando se realizan protocolos de doble marcación para IF y a una banda del mismo peso molecular (64 kDa) mediante análisis de Western blot. Por su parte, el mAb 7C2 muestra el típico patrón que siguen los anticuerpos que reconocen VSPs, marcando la superficie de los trofozoítos, incluidos los flagelos, cuando se los analiza por IF. Reconoce a una proteína de aproximadamente 70 kDa y por ensayos de secuenciación se pudo determinar que reconoce a la VSP TSA417, la cual fue previamente identificada y nombrada por Gillin *et al.* (1990). Lo mismo ocurre con los mAbs 2B10, 7C9 y 7D5, aunque la identidad de la secuencia de las VSPs reconocidas por ellos aún no fue determinada, las VSPs reconocidas por ellos serán nombradas con el mismo nombre de sus mAbs en esta tesis. Se sabe que el mAb 9B10 reconoce a las VSP9B10-A y VSP9B10-B de 76 kDa y 68 kDa respectivamente (Carranza *et al.*, 2002), mientras que el mAb G10/4 reconoce

a la VSP H7 de 72 kDa (Aggarwal *et al.*, 1988).

Obtención de clones de trofozoítos que expresan una única VSP.

Para lograr nuestros objetivos fue necesario generar poblaciones de trofozoítos que expresen en su membrana un solo tipo de VSP. Dichas poblaciones fueron obtenidas mediante la técnica de clonado por dilución límite seguido de su validación por medio de ensayos de inmunofluorescencia (IF) utilizando anticuerpos monoclonales (mAbs) que reconocen diferentes VSPs. Es importante destacar que el uso de la técnica FACS (del inglés, *Fluorescence Activated Cell Sorting*) para aislar clones de *Giardia* expresando una única VSP, no resulta adecuada para nuestros fines, ya que nuestro grupo determinó que los anticuerpos anti-VSPs activan la VA.

Se obtuvieron poblaciones clonales (Figura 6) que expresan las VSPs 9B10, 1267, TSA417, 7C9, y 2B10 (mAbs 9B10, 7F5, 7C2, 7C9 y 2B10, respectivamente), todas ellas pertenecientes al aislamiento WB (ensamblaje A); y VSPs H7 y 2D5 (mAbs G10/4 y 7D5, respectivamente), pertenecientes al aislamiento GS (ensamblaje B). Las mismas fueron amplificadas en medio de cultivo normal y conservadas a -80 °C para su uso en los experimentos subsiguientes.

En el desarrollo de este trabajo de tesis los clones 1267 y TSA417, fueron usados para la mayoría de los experimentos por ser los clones mejor caracterizados y, por tal motivo, con más información disponible en la literatura y en nuestros ensayos previos.

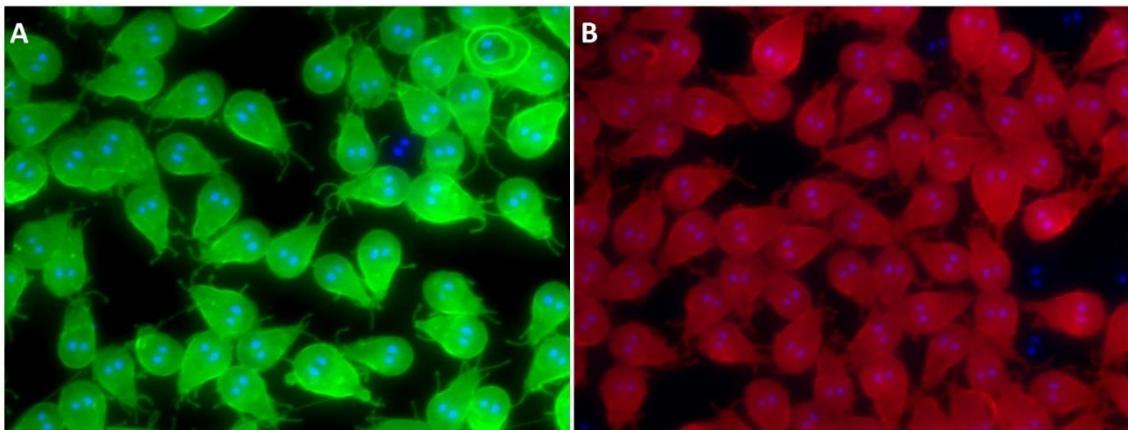


Figura 6. Poblaciones clonales de *Giardia* expresando mayoritariamente una única VSP. En el panel izquierdo se muestra una población de *Giardia* que expresa la VSP TSA417 (mAb 7C2) en un 97% de sus trofozoítos, mientras que, en el derecho la población expresa la VSP 1267 (mAb 7F5) en un 93% de sus trofozoítos.

La variación antigénica en condiciones normales de cultivo *in vitro*.

La VA de *Giardia* ha sido descrita en el pasado como un fenómeno espontáneo que se manifiesta en poblaciones de parásitos y cuya velocidad es dependiente del aislamiento y de la VSP expresada por el trofozoíto (Nash *et al.*, 1990). Por esta razón, decidimos evaluar el comportamiento en cultivo de todos nuestros clones para así poder caracterizar su comportamiento a lo largo del tiempo. Para esto, diferentes clones de trofozoítos expresando una VSP particular fueron crecidos individualmente *in vitro* durante siete semanas en condiciones estándar de cultivo (Figura 7 A). Cada tres días en promedio, se cuantificó el porcentaje de trofozoítos expresando la VSP original

mediante IF con anticuerpos anti-VSP y el cultivo se mantuvo hasta el final del experimento pasando continuamente una fracción representativa del cultivo a un nuevo tubo, manteniendo de esta manera a los trofozoítos en estado de crecimiento exponencial.

De los clones estudiados, tres de ellos (los que expresan las VSPs TSA417, 7C9 y 2B10) mostraron un patrón de VA espontánea similar, con una lenta disminución en su clonalidad durante los primeros 5 a 10 días en cultivo, manteniéndose así durante las primeras 3 semanas (hasta 30% de disminución en clonalidad). Luego de 40 días en cultivo, su clonalidad disminuyó un 50%, manteniendo una tendencia a la baja (Figura 7 A).

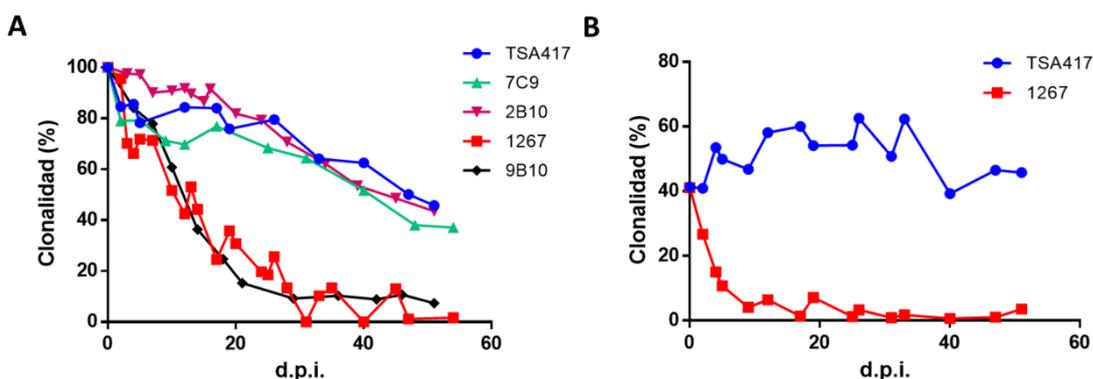


Figura 7. Variación antigénica en trofozoítos de *G. lamblia* en cultivo *in vitro*. Clones de trofozoítos expresando una VSP particular fueron crecidos individualmente *in vitro* durante siete semanas en condiciones estándar de cultivo (A). Dos clones expresando VSPs diferentes fueron co-cultivados en iguales proporciones (~40 % de cada uno) durante siete semanas en condiciones estándar de cultivo (B). Los gráficos representan la tendencia que tienen diferentes clones de *Giardia* a disminuir su representación a lo largo del tiempo en cultivo, los mismos corresponden a un ensayo único.

Los otros dos clones (aquellos que expresan las VSPs 1267 y 9B10) presentaron una disminución más pronunciada en el porcentaje de trofozoítos positivos, alcanzando un 50% del porcentaje original después de sólo diez días de cultivo. Hacia los 30 días de cultivo alcanzaron el porcentaje más bajo (alrededor del 10%) y se mantuvieron así durante los siguientes 20 días del experimento (Figura 7 A).

El mismo experimento fue realizado utilizando un cultivo mixto compuesto principalmente por los clones TSA417 y 1267 en iguales proporciones (20% del cultivo estuvo compuesto por parásitos recubiertos por VSPs no identificadas), uno de ellos de patrón de expresión más estable (TSA417) y el otro con un fenotipo de VA más rápido (1267). Como puede observarse en la Figura 7 B, el clon más estable mantuvo una clonalidad similar a la original (40%) durante todo su tiempo en cultivo, la cual fue similar a la que alcanzó dicho clon al final de su cultivo individual, aunque partiendo de una clonalidad elevada (~99%) (Figura 7 A). Por otro lado, el clon de cambio más rápido (el que expresa la VSP 1267) disminuyó su porcentaje original en un 80% después de solo 10 días de cultivo y permaneció en bajos niveles hasta el final del experimento, alcanzando una frecuencia dentro de la población idéntica a la alcanzada durante su cultivo individual (Figura 7 A).

En todos los casos, independientemente del clon que se trate, hay una disminución en la clonalidad del cultivo con el transcurso del tiempo, y la población tiende a diversificarse en cuanto a la VSP que presentan los parásitos en cultivo en ausencia de algún estímulo evidente, como fuera también descrito por Singer *et al.*

(2001).

Es importante resaltar la existencia de dos tipos de clones. Por un lado, un primer grupo que presenta un fenotipo muy estable, con una frecuencia de VA espontánea baja que le permite multiplicarse en cultivo expresando su VSP original por largos periodos y, por otro lado, un segundo grupo que posee una frecuencia de VA elevada, lo que conduce a la subrepresentación de estos clones temprano en cultivo. Ambos tipos de clones, sin embargo, disminuyen su representatividad en el cultivo, el cual se vuelve heterogéneo en cuanto a los clones presentes (Singer *et al.*, 2001). Esta diferencia en las frecuencias de VA exhibida por un grupo de clones y por el otro podría indicar la existencia de diferencias e en el mecanismo subyacente de regulación de la VA (VA espontánea) o una adaptación a las condiciones del medio de cultivo del parásito (VA inducida).

Los anticuerpos anti-VSP disparan la variación antigénica en trofozoítos individuales.

Durante mucho tiempo se ha considerado que los anticuerpos anti-VSPs generados por el huésped poseen un efecto citotóxico *per se* (independiente del complemento) sobre los parásitos cuya VSP pueden reconocer. Sin embargo, en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se demostró a nivel poblacional que los anticuerpos anti-VSP no son citotóxicos (Torri A., Tesis Doctoral 2016), sino que son capaces de inducir el fenómeno de VA *in vitro*. Por esta razón, luego de haber caracterizado la velocidad a la que sufren VA los diferentes clones con los que disponemos, decidimos volver a analizar los efectos que tienen los anticuerpos anti-VSPs, pero esta vez por medio de un enfoque de célula individual.

El cambio de enfoque que adoptamos se debe a que el abordaje poblacional suele dejar dudas acerca de su validez debido a la posibilidad de que pequeñas cantidades de trofozoítos no reconocidos por los anticuerpos (originados por la VA espontánea observada en cultivo *in vitro*, ver apartado anterior) sean los responsables de dar origen a una nueva población luego de la muerte de aquellos parásitos que fueran reconocidos inicialmente por los anticuerpos *anti-Giardia*, cambiando así la composición de la población (VA poblacional por selección).

Para trabajar con células individuales (*single cell*), distribuimos un promedio 50 trofozoítos pertenecientes a un clon determinado en placas de 96 pocillos por medio de la técnica de dilución límite y los incubamos durante 7 días en anaerobiosis en presencia del mAb que reconoce a la VSP expresada por el clon (placa tratamiento) o en presencia de un mAb no relacionado (placa control).

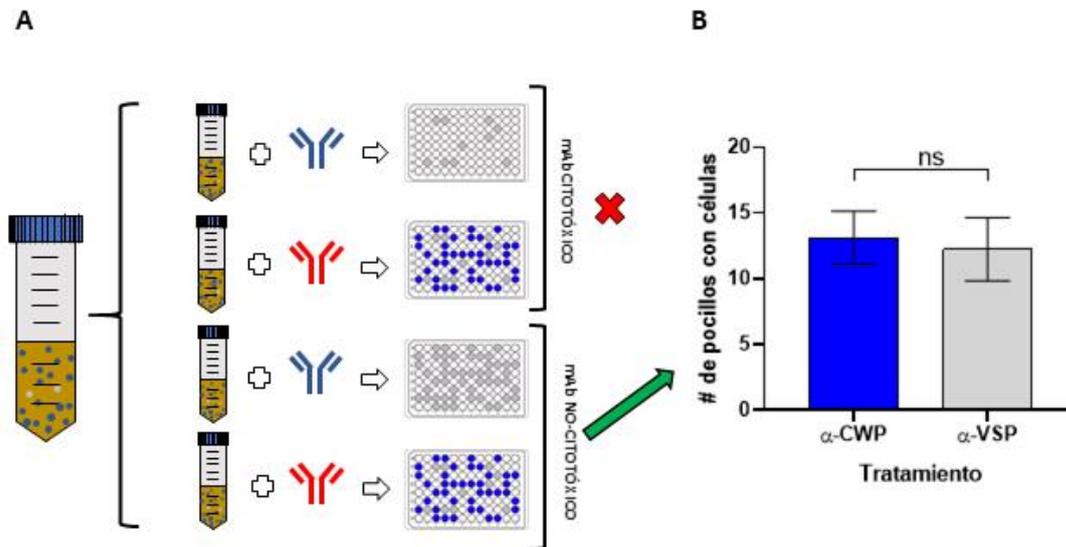


Figura 8. Ensayo de VA a nivel de célula única por medio de la técnica de dilución límite. Se distribuyeron 50 trofozoítos pertenecientes al clon TSA417 en placas de 96 pocillos en presencia del mAb 7C2, placa “tratamiento” (anti-VSP TSA417, anticuerpo azul), o en presencia del mAb 7D6, placa “control” (anti-CWP2, anticuerpo rojo) (A). El número de pocillos con células al cabo de 7 días de incubación en anaerobiosis fue el mismo en ambas placas, demostrando la no citotoxicidad de los anticuerpos anti-VSP (B). Barra de error, SEM; n=50; ns, no significativo.

Como se puede apreciar en el esquema (Figura 8 A) y sabiendo que es imposible alcanzar el 100 % de clonalidad en un cultivo de trofozoítos, dos resultados son posibles: por un lado, (i) si los anticuerpos son citotóxicos tendremos un mayor número de pocillos con células en la placa control que en la placa tratamiento, y en ésta última solo encontraremos poblaciones de parásitos que expresan una VSP diferente a la reconocida por el anticuerpo; por otro lado, (ii) si los anticuerpos no son citotóxicos, el número de pocillos con células será el mismo tanto en la placa control como en la placa tratamiento, con la diferencia de que en la primera la clonalidad conjunta de las poblaciones presentes en los diferentes pocillos se esperaría similar a la clonalidad de la población de la cual se partió, y en la segunda las poblaciones presentes estarán representadas por parásitos que no expresen la VSP original (Figura 8 B). La clonalidad de las poblaciones resultantes fue evaluada por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo que reconoce la VSP específica del clon utilizado en el experimento (ver materiales y métodos, “*Ensayos sobre células individuales de VA inducida por anticuerpos*”).

Como era de esperar basados en nuestros estudios previos, el resultado que se obtuvo se correspondió con la segunda opción, observándose la presencia de igual número de pocillos con presencia de células tanto en la placa “tratamiento” como en la placa “control” (Figura 8 B), con la diferencia que en la placa “tratamiento” las poblaciones de trofozoítos ya no expresaban la VSP original, mientras que en la placa “control” los trofozoítos continuaban expresando la misma VSP de partida (resultados no mostrados). De esta manera, se pudo observar la falta total de citotoxicidad mediada por anticuerpos, pero esta vez a nivel de células individuales, lo que refuerza nuestras observaciones previas de que los anticuerpos dirigidos contra las VSPs de *Giardia* son capaces de disparar el fenómeno de VA en los parásitos que posean en su superficie aquella VSP reconocida por el anticuerpo con el cual fueron incubados.

Poblaciones de trofozoítos de crecimiento lento surgen esporádicamente en cultivo.

Los ensayos de *single cell* realizados mediante la técnica de dilución límite (ver materiales y métodos, “*Ensayos sobre células individuales de VA inducida por anticuerpos*”) no solo nos permitieron evidenciar la no citotoxicidad de los anticuerpos sobre células individuales, sino que también nos permitió identificar la presencia de poblaciones de trofozoítos que muestran una velocidad de duplicación marcadamente inferior a la habitual (tanto en presencia como en ausencia de anticuerpos anti-VSPs). Estas células de crecimiento lento mostraban la característica de dar origen a poblaciones de parásitos que no eran capaces de alcanzar confluencia en el pocillo de la placa de 96 wells en las cuales surgían luego de 7 días en cultivo, mientras que otros pocillos presentaban poblaciones que para ese momento se encontraban en monocapa.

El descubrimiento de estas variantes de crecimiento lento nos permitió realizar una clasificación de las poblaciones de *Giardia* dividiéndolas en tres categorías (Figura 9). Partiendo del supuesto de que las poblaciones surgen de una única célula luego de realizar una dilución límite, se pueden distinguir (i) poblaciones de crecimiento estándar, que llegan a confluencia en un tubo de 7 ml alrededor del día 9 de iniciado el cultivo; (ii) poblaciones de crecimiento subestándar, que llegan a confluencia posterior al día 9; y (iii) poblaciones de crecimiento lento, que incluso al día 12 (momento en el que se detiene el experimento) no llegaron a alcanzar un 20% de confluencia.

Cuando se analizó la identidad de la VSP presente en las poblaciones pertenecientes a las diferentes categorías descritas se pudo observar que el ritmo de crecimiento es totalmente independiente de la VSP expresada en la superficie de los trofozoítos, ya que poblaciones clonales para una VSP determinada que mostraban un crecimiento estándar originaban poblaciones de crecimiento estándar, subestándar, y lento, que expresaban o no la misma VSP que la expresada por la población original.

La relevancia de la existencia de poblaciones de *Giardia* que muestran un crecimiento lento aún es incierto, aunque es tentador pensar en ellas como una posible estrategia utilizada por las poblaciones de *Giardia* para que aquellas ínfimas cantidades de parásitos que hayan sido capaces de evadir la respuesta de anticuerpos montada por el hospedador por medio de la VA de sus VSPs de superficie, puedan mantenerse debajo del sistema de vigilancia inmune del hospedador y así evadir su eliminación durante largos periodos de tiempo.

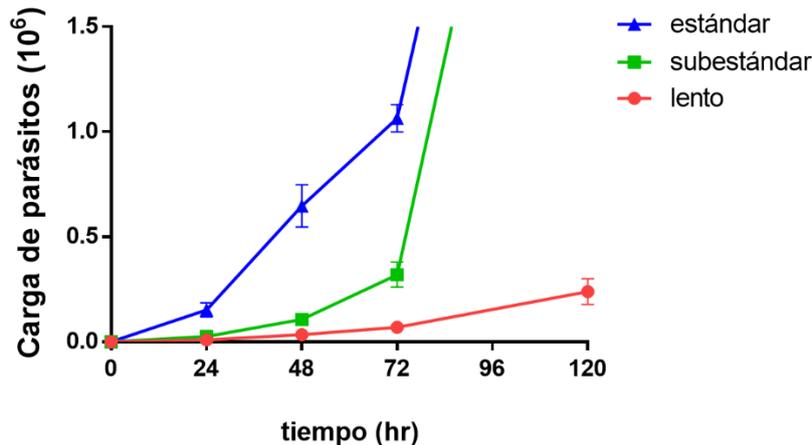


Figura 9. Categorías de poblaciones en base a su ritmo de crecimiento. Poblaciones de trofozoítos fueron clonadas por dilución límite en placas de 96 pocillos y crecidas durante 7 días para luego ser transferidas las poblaciones surgidas en cada pocillo a tubos de 7 ml y medir el tiempo que demoran en alcanzar monocapa. En el gráfico se muestra la diferencia en la velocidad de expansión de poblaciones de crecimiento estándar (azul), subestándar (verde), y lento (rojo). Barra de error, SEM; n=3.

Los mAbs anti-VSPs provocan la pérdida de adherencia de los trofozoítos y su aglutinación *in vitro*.

Una vez definida la ausencia de efecto citotóxico de los anticuerpos sobre los trofozoítos de *Giardia*, nos propusimos a evaluar los efectos citológicos que tienen estos sobre cultivos de poblaciones clonales de *Giardia*. Para esto elegimos al clon que expresa la VSP 9B10 y lo incubamos durante 24 h en medio normal de cultivo en presencia de un anticuerpo que no reconoce a la VSP 9B10 (mAb 7D6) o en presencia del mAb 9B10 en concentraciones elevadas (1:600).

Lo que pudimos observar es que la presencia del anticuerpo anti-VSP provoca la pérdida de adherencia de los trofozoítos reconocidos por estos y su aglutinación en masas (Figura 10 A y B), hecho profusamente descrito previamente por otros autores e interpretado como un signo de muerte celular (Touz *et al.*, 2005; Stager *et al.*, 1997; Heyworth, 1992; Nash & Aggarwal, 1986). Sin embargo, cuando analizamos la viabilidad de los trofozoítos atrapados en los acúmulos celulares por medio del reactivo diacetato de fluoresceína (FDA por sus siglas en inglés *Fluorescein Di-Acetate*), pudimos corroborar que estos se encontraban vivos y que los trofozoítos que no formaban parte de estos acúmulos ya no expresaban más la VSP 9B10 en sus superficies (Figura 10 B).

Los acúmulos de trofozoítos aglutinados por los anticuerpos se forman al poco tiempo de agregados los mismos al cultivo (~10 min). Sin embargo, los grandes agregados causados por el anticuerpo comienzan a desaparecer y van disminuyendo con el paso del tiempo (~3 h), siempre y cuando los anticuerpos sean retirados del medio. Dicho fenómeno va acompañado con el gradual cambio en la composición de la población de parásitos hacia una población que expresa una VSP diferente a la inicial en la superficie de sus trofozoítos (resultados no mostrados).

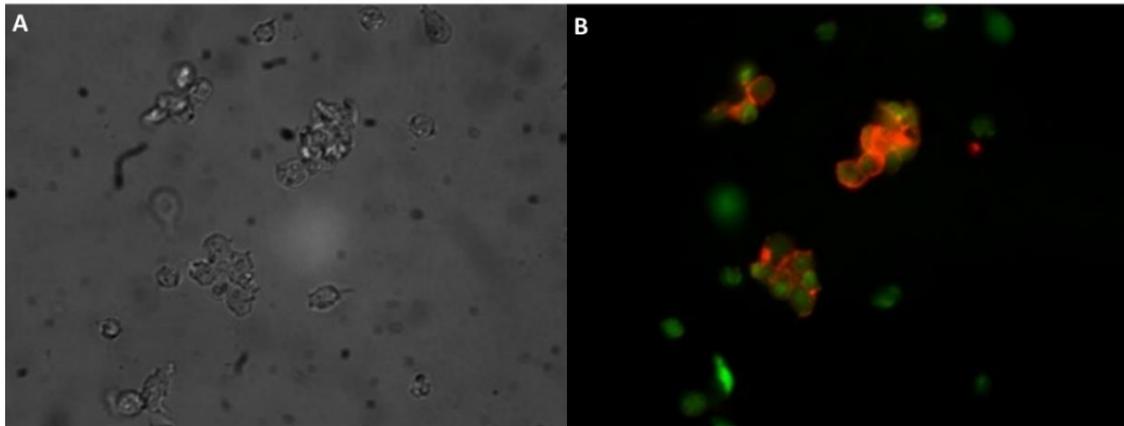


Figura 10. Los anticuerpos anti-VSPs provocan que los trofozoítos pierdan adherencia y se aglutinen entre sí. Los anticuerpos anti-VSPs afectan la adhesión de los trofozoítos a su sustrato y provocan la aglutinación de estos. Los parásitos aglutinados por el mAb anti-9B10 (rojo) se encuentran vivos (verde) luego de 3 hr en presencia del anticuerpo (dilución 1/600) como se puede ver por tinción con diacetato de fluoresceína (FDA) (A y B). Magnificación 20X.

La agregación de VSPs debida a anticuerpos en la superficie celular de *Giardia* induce la variación antigénica.

Tras haber dejado en claro que los anticuerpos que reconocen a las VSPs de *Giardia* no son capaces de destruir a los parásitos, pero sí de inducir el recambio de la VSP de superficie, decidimos profundizar en este fenómeno.

Los anticuerpos son glucoproteínas que pueden unirse a más de un antígeno al mismo tiempo y, como consecuencia, los complejos antígeno-anticuerpo pueden entrecruzarse y formar grandes entramados que conducen a la agrupación o aglutinación de las células extrañas o de sus antígenos.

Entonces, si los anticuerpos son capaces de inducir VA en *Giardia* es probable que la señal que dispare este fenómeno pueda deberse a que el parásito sensa la aglutinación de sus VSPs como una señal de recambio de estas.

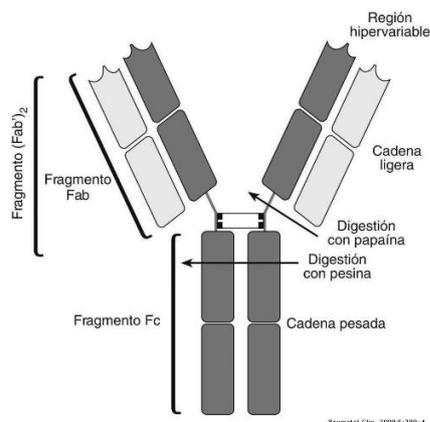


Figura 11. Estructura de un monómero de anticuerpo. El tratamiento con papaína genera dos fragmentos Fab y un fragmento Fc, mientras que el tratamiento con pepsina genera un fragmento $F(ab')_2$ y péptidos pequeños (imagen tomada de *Reumatol Clin.* 2009; 5:280-4).

Para evaluar esta posibilidad decidimos tratar al mAb 7F5 (anti VSP 1267) con las enzimas papaína y pepsina y luego usar los fragmentos resultantes para analizar su efecto sobre cultivos de *Giardia*. La papaína corta las cadenas pesadas de los

anticuerpos y genera dos fragmentos Fab (que ya no poseen capacidad aglutinante) y un fragmento Fc; mientras que la pepsina genera un fragmento F(ab')₂ (que aún retiene el poder aglutinante del anticuerpo completo) y otro fragmento Fc ligeramente diferente al generado por la papaína (Figura 11 y 12). Ambos fragmentos fueron luego purificados por medio de cromatografía de afinidad.

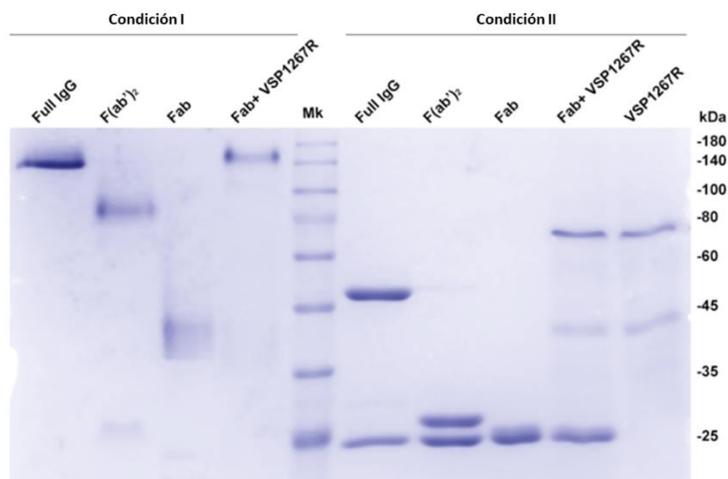


Figura 12. SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie del mAb 7F5 y de los productos de su digestión con las enzimas papaína y pepsina. El anticuerpo completo, así como también sus fragmentos Fab y F(ab')₂ fueron purificados por cromatografía de afinidad utilizando proteína A. En la condición I el buffer de siembra carece de SDS y 2-mercaptoetanol en su composición y la muestra no fue hervida previo a su siembra, mientras que en la condición II, el buffer de siembra posee SDS y 2-mercaptoetanol y la muestra fue hervida previo a su siembra. En el carril 4 se puede observar como el fragmento Fab retiene su capacidad de reconocer a su diana (la VSP 1267, en este caso una proteína recombinante producida en células de insecto).

Una vez obtenidos los diferentes fragmentos incubamos un inóculo del clon 1267 de *Giardia* durante tres días con las diferentes variantes (completo, F(ab')₂ y Fab) del mAb 7F5 por separado. Pasados tres días analizamos la clonalidad de las poblaciones resultantes por IF utilizando el mismo anticuerpo (mAb 7F5) y un anticuerpo diferente (mAb 5C1) que reconoce a la misma VSP 1267 con el objeto de descartar la posibilidad de que existiese un enmascaramiento de epítopes al utilizar dos veces el mismo anticuerpo (Figura 13 A-C).

El tratamiento con diferentes concentraciones del anticuerpo completo además de arrojar los resultados esperados, esto es la inducción de la VA en las poblaciones tratadas, evidenció una dependencia de la concentración en su efecto sobre este fenómeno. Una concentración tan baja como 0,25 nM de anticuerpo fue suficiente para inducir la VA de la población en una proporción casi tres veces más alta que la VA espontánea (0 nM). Al aumentar gradualmente la concentración de anticuerpo, la proporción de la población que respondió cambiando su antígeno de superficie fue cada vez mayor hasta que se alcanzó una concentración saturante (2 nM) de anticuerpo a partir de la cual no se observó aumento en su efecto, y en la cual existe una proporción muy baja de células que expresan la VSP original (< 2 %). Un efecto muy similar fue observado al utilizar el fragmento F(ab')₂, aunque dicho tratamiento mostró una eficacia ligeramente inferior, lo cual podría ser adjudicado a errores en la cuantificación de estos o a efectos de la manipulación durante su obtención. Como en el caso anterior, también se halló una concentración saturante de anticuerpo a la cual su efecto es máximo (4 nM) (Figura 13 A).

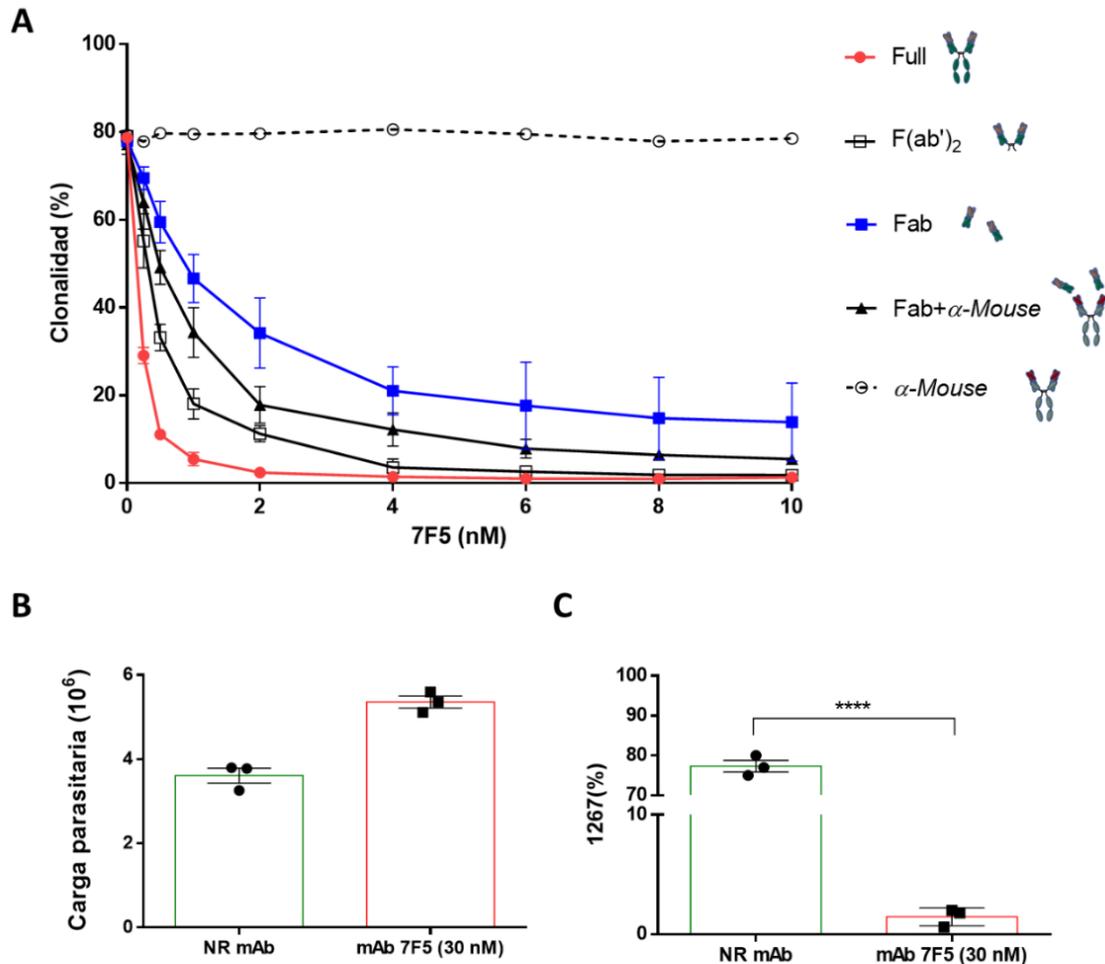


Figura 13. Efecto del mAb 7F5 y de sus fragmentos F(ab')₂ y Fab purificados sobre poblaciones clonales para la VSP 1267. El mAb 7F5 completo, al igual que sus fragmentos F(ab')₂ y Fab con capaces de inducir la VA en poblaciones clonales de *Giardia*, aunque con una eficacia diferente (A). La menor eficacia como inductor de variación antigénica mostrada por el fragmento Fab puede ser aumentada si se utiliza un anticuerpo que regenere la capacidad aglutinante del fragmento Fab (A). Concentraciones altas (30 nM) del mAb 7F5 purificado no ejercen un efecto negativo en la proliferación de las poblaciones de *Giardia* (B), pero si inducen VA (C) en los trofozoítos que son reconocidos, ya que estos dejan de expresar la VSP original. Barra de error, SEM; n=3; ns, no significativo; ****, p<0.0001.

Al utilizar los fragmentos Fab, al igual que en los casos anteriores, pudimos observar un efecto inductor sobre la población de parásitos para que estos cambien su VSP, lo cual resultó inesperado debido a la ausencia de poder aglutinante del fragmento *per se*. Su eficacia induciendo el cambio de la VSP original en la población tratada fue marcadamente inferior al mostrado por el anticuerpo entero y por el fragmento F(ab')₂, aunque significativamente mayor al debido a la VA espontánea. La eficiencia del fragmento Fab para inducir la VA pudo ser incrementada cuando se lo combinó con un anticuerpo secundario *anti-mouse* capaz de restaurar el poder aglutinante del fragmento Fab (Figura 13 A). Con el objeto de descartar la posibilidad de que el fragmento Fab estuviese contaminado con trazas del anticuerpo entero sin fragmentar que pudieran ser responsables de inducir la VA en la población de parásitos tratados, decidimos volver a purificarlo, pero esta vez mediante cromatografía de exclusión molecular (Figura 14 A) y posterior revelado de la fracción proteica recuperada mediante tinción de plata por su mayor sensibilidad (Figura 14 B).

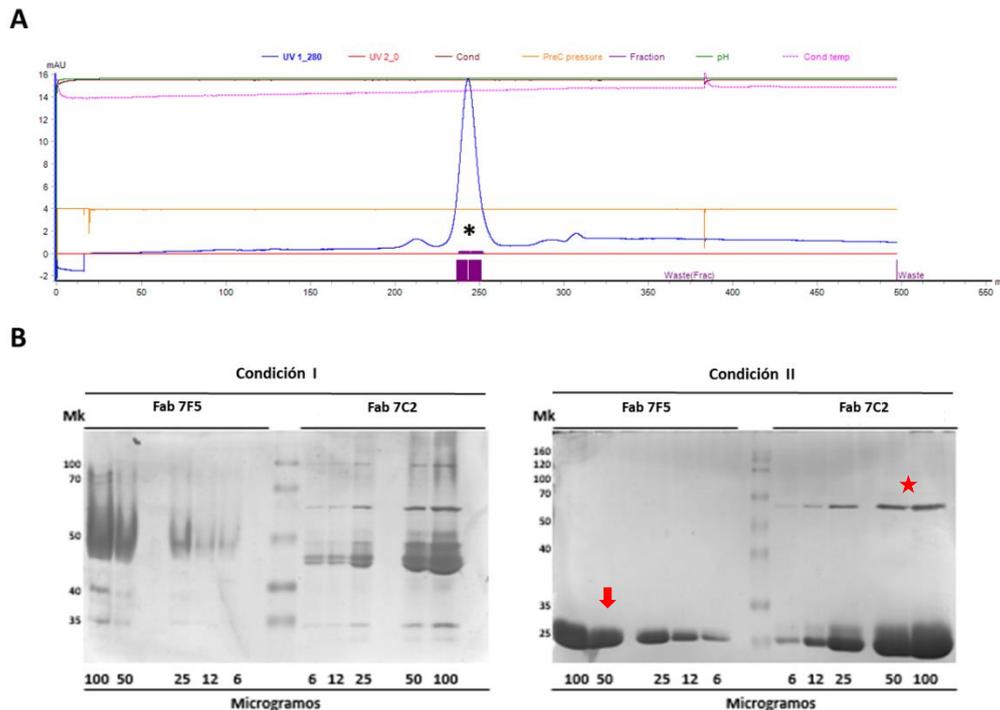


Figura 14. Purificación por cromatografía de exclusión molecular y posterior tinción de plata en SDS-PAGE de fragmentos Fab. En la imagen superior, se muestra el único pico que fue recuperado luego de la purificación del fragmento Fab del mAb 7F5 mediante cromatografía de exclusión molecular (A, asterisco). En B, se puede observar el mismo fragmento Fab purificado (flecha) junto con un fragmento Fab perteneciente al mAb 7C2 y contaminado con fracciones sin digerir del anticuerpo completo (estrella). En la condición I el buffer de siembra carece de SDS y 2-mercaptoetanol en su composición y la muestra no fue hervida previo a su siembra, mientras que en la condición II, el buffer de siembra posee SDS y 2-mercaptoetanol y la muestra fue hervida previo a su siembra.

Luego de la nueva purificación pudimos descartar la presencia de contaminantes correspondientes al anticuerpo sin fragmentar. Al reevaluar al fragmento Fab pudimos determinar que su efecto fue el mismo al observado anteriormente, confirmando su capacidad para inducir la VA de las células que portan la VSP reconocida por dicho fragmento.

Es evidente luego de estos experimentos que los anticuerpos, y el fragmento $F(ab')_2$, son capaces de inducir VA a través de la agregación (¿dimerización?) de las VSPs en la superficie del parásito. Sin embargo, es llamativo que el fragmento Fab tenga el mismo poder inductor de VA a pesar de no ser capaz por sí mismo de agregar a las VSPs en la superficie del parásito. Una posible explicación a este fenómeno es que previo a un efecto aglutinante sobre las VSPs, tenga lugar un cambio a nivel estructural en las mismas luego de ser contactadas por los anticuerpos. Este cambio conformacional podría llevarse adelante luego de que las VSPs son contactadas por el fragmento Fab, y la baja eficiencia en su poder inductor de VA radicaría en que las VSPs se agregarían solamente cuando VSPs no nativas se encuentren entre sí producto de su difusión lateral en la membrana del trofozoito.

Para poder analizar la posibilidad de que el anticuerpo induzca un cambio conformacional sobre la VSP luego de haber hecho contacto con ella incubamos una población del clon 1267 en presencia del fragmento Fab (25 nM) seguido de un tratamiento con tripsina. Una parte de la población tratada fue utilizada para extraer proteínas y evaluar el estado de la VSP 1267 (Figura 15 B), y otra parte fue puesta a crecer durante 3 días para evaluar el efecto del tratamiento sobre la VA de la población

(Figura 15 A). El razonamiento fue que si la interacción Fab-VSP genera un cambio en la estructura de la VSP, probablemente se expondrían sitios sensibles a la digestión por esta enzima, lo que conduciría a su degradación enzimática.

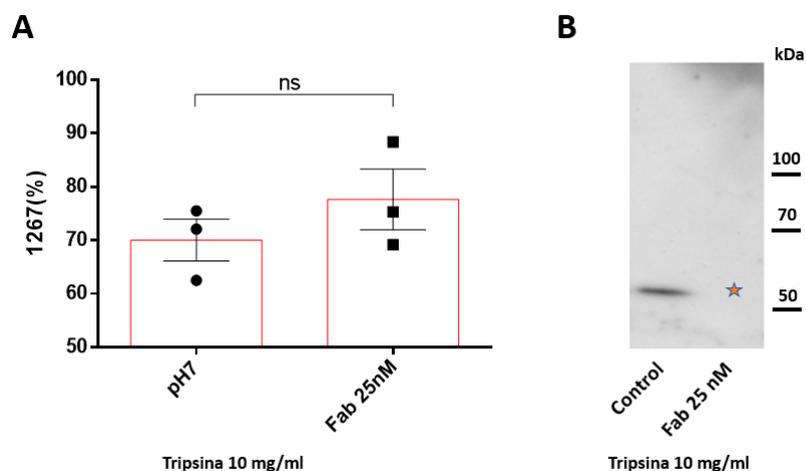


Figura 15. El contacto de las VSPs con el fragmento Fab las vuelve sensibles a la acción de la tripsina. Poblaciones del clon que expresa la VSP 1267 fueron incubadas durante 1 h con PBS (control) o con el fragmento Fab del mAb 7F5, previo a un tratamiento de 3 hr con tripsina. Se puede observar que el tratamiento no ejerció efecto sobre la clonalidad de las poblaciones tratadas luego de que a estas se las haya dejado crecer durante 3 días en medio normal de cultivo (A), pero que si fue capaz de eliminar el epítotope en la VSP 1267 reconocido por el mAb 7F5 inmediatamente luego del tratamiento (B), evidenciando el cambio en la estructura nativa de la VSP 1267 luego de ser contactada por el anticuerpo. La estrella marca la ausencia de la banda correspondiente a la VSP 1267. Barra de error, SEM; n=3; ns, no significativo; p<0.001.

Como se puede observar en la Figura 15 B, la banda correspondiente a la VSP 1267 se encuentra presente en la población control que solamente fue expuesta a tripsina sin previo tratamiento con el fragmento Fab del anticuerpo 7F5, mientras que dicha banda desapareció si a la población se la trato con el fragmento Fab previo al tratamiento enzimático. La desaparición de la banda correspondiente a la VSP 1267 luego del tratamiento sugiere que el fragmento Fab indujo un cambio en la estructura de la VSP 1267 que llevo a la destrucción del epítotope reconocido por el mAb 7F5 luego de la digestión enzimática, de la misma manera que fuera reportado por Serradell *et al.* (2019) con otros agentes desestabilizantes de la estructura de la VSP. El daño causado por la tripsina, sin embargo, no afectó la clonalidad de la población de parásitos como puede observarse en la Figura 15 A, luego de que esta haya sido expandida en medio normal de cultivo durante 3 días, lo cual también demuestra que la población de parásitos requiere de un estímulo prolongado al fragmento Fab para que este pueda inducir VA. Este resultado fortalece la hipótesis del cambio conformacional de las VSPs luego del contacto con su anticuerpo correspondiente.

Estudio de la desestabilización de la estructura de las VSPs por agentes externos como factor inductor de variación antigénica.

Luego de haber definido que la desestabilización de la estructura de la VSP es capaz de conducir a una respuesta que culmina con la VA de los trofozoítos afectados, nos resultó interesante indagar en que otros factores diferentes a anticuerpos podrían ser capaces de tener un efecto similar al Fab y conducir a la VA de la población de parásitos. La VA de poblaciones de parásitos previo a una respuesta de anticuerpos por parte del hospedador ha sido expuesta en numerosas publicaciones (Nash *et al.*, 1988; Nash, 1997; Singer *et al.*, 2001), así como también la supuesta existencia de factores

diferentes a anticuerpos capaces de desencadenarla (Emery *et al.*, 2016; Gargantini *et al.*, 2016), por lo que resulta de interés su estudio.

Debido a que las VSPs son la principal, sino la única, barrera entre el trofozoíto y su medio ambiente, nos planteamos establecer un escenario capaz de imitar el ambiente interno del hospedador en busca de estos agentes destabilizantes de la estructura nativa de las VSPs capaces de conducir al recambio antigénico de las mismas. Cambios en el pH del ambiente, la presencia de agentes oxidantes liberados por las células del sistema inmune y la presencia de proteasas son ejemplos de factores del huésped que podrían cumplir esta función. Si bien los agentes mencionados podrían no solo dañar la cubierta proteica de *Giardia*, sino también afectar su homeostasis, creemos que al trabajar con concentraciones subletales de los mismos y con clones en donde la única diferencia entre ellos radica en su VSP de superficie, seremos capaces de distinguir el efecto que tienen estos agentes de stress solamente sobre las VSPs que recubren a los trofozoítos.

Agentes oxidantes. Es conocido que los macrófagos una vez activados, se vuelven capaces de destruir diferentes tipos de patógenos por medio de la producción de un conjunto de moléculas biológicamente activas que incluyen entre ellas a agentes oxidantes como el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), y el óxido nítrico (NO). Para intentar dilucidar si el H_2O_2 es capaz de afectar a la conformación de las VSPs decidimos trabajar con concentraciones subletales de este compuesto, y evaluar la composición de la población de parásitos luego del tratamiento.

Para evaluar el comportamiento de una población del clon 1267 frente a diferentes concentraciones de H_2O_2 , el tratamiento se realizó en PBS a 37°C y por pulsos de (3 incubaciones de 30 minutos cada una) debido a la inestabilidad del H_2O_2 , posteriormente se incubaron las células en medio normal durante 72 h previo a su análisis. Luego del tratamiento se pudo observar que el mismo tuvo un efecto citotóxico sobre las poblaciones de *Giardia* al aumentar su concentración (Figura 16 A), pero que en ningún momento afectó a la clonalidad de estas de manera significativa (Figura 16 B). Por lo tanto, al menos bajo nuestras condiciones experimentales el H_2O_2 no parece ser un candidato capaz de inducir VA.

Por otro lado, cuando una mezcla en iguales proporciones de los clones que expresan las VSPs 1267 y TSA417, fue tratada con concentraciones crecientes de H_2O_2 se pudo observar un aumento en la representación de los clones que expresan la VSP TSA417 en todas las concentraciones ensayadas acompañado por una disminución del clon que expresa la VSP 1267 (Figura 16 C).

Por lo tanto, debido a que, bajo las mismas condiciones el H_2O_2 no fue capaz de inducir VA en las poblaciones tratadas del clon que expresa la VSP 1267, pero sí fue capaz de cambiar la composición de una población mixta en favor del clon que expresa la VSP TSA417, es lógico pensar en que ambas VSPs le confieren una resistencia diferencial frente a este agente a los trofozoítos que las expresan, siendo la VSP TSA417 más resistente al tratamiento comparado con la VSP 1267.

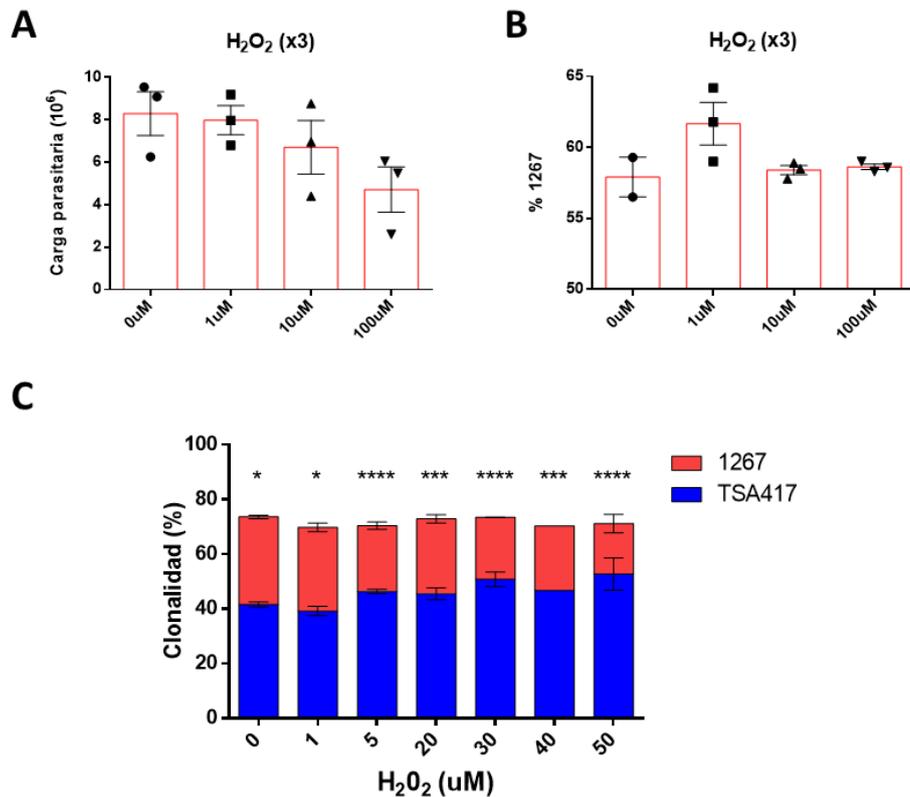


Figura 16. Efecto del H₂O₂ sobre poblaciones de trofozoítos. Luego de tratar a diferentes inóculos de *Giardia* con tres pulsos de H₂O₂ se puede observar un efecto citotóxico gradual con el incremento de la concentración (A), pero no un efecto inductor de la VA (B). Poblaciones mixtas VSP TSA417/1267 bajo el mismo tratamiento cambian su composición disminuyendo la presencia de trofozoítos VSP 1267 positivos (C). Barra de error, SEM; n=3; ns, no significativo; *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001; ****, p<0.0001.

Agentes Reductores. Otro agente ensayado para desestabilizar la estructura de la VSP fue el dithiothreitol (DTT), un poderoso agente reductor cuya capacidad de reducir puentes disulfuro en proteínas nativas es un tanto confusa, habiendo reportes que mencionan la resistencia de las proteínas en su estructura nativa a ser afectadas por dicho agente (Reiner *et al.*, 2001) como también reportes que mencionan la susceptibilidad de otras proteínas a la acción de este reactivo (Loison *et al.*, 2016).

Para evaluar el DTT como agente desestabilizante, utilizamos un rango de concentración conocido por no generar toxicidad al parásito y, sin embargo, afectar procesos de diferenciación como el enquistamiento (Reiner *et al.*, 2001). El experimento consistió en incubar a clones que expresan la VSP 1267 durante un corto periodo de tiempo (1 h) en PBS suplementado con DTT a 37° C, para luego dejar crecer a los clones durante 72 h en medio normal de cultivo antes de evaluar la composición de la población resultante.

El tratamiento con DTT no mostró ser efectivo para afectar la clonalidad de las poblaciones del clon 1267 (Figura 17), por lo que tampoco puede calificar como un agente capaz de inducir VA. Sin embargo, esto no significa que los agentes reductores no sean capaces de modificar la estructura nativa de la VSP 1267 ya que ha sido reportado previamente un aumento en la sensibilidad de esta VSP a la digestión con tripsina si la misma es tratada previamente con un agente reductor como el TCEP (Serradell *et al.*, 2019), sugiriendo que la estructura de la misma se ve afectada por dichos agentes.

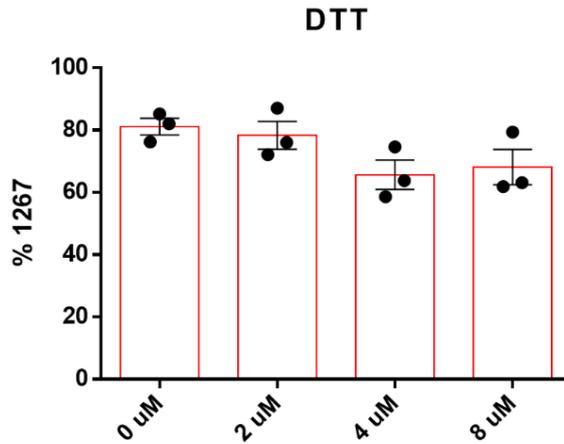


Figura 17. Efecto del DTT sobre trofozoítos clones VSP 1267. 5×10^4 trofozoítos pertenecientes al clon VSP 1267 fueron tratadas durante 1 h a 37°C con concentraciones subletales de DTT y luego crecidas por 72 h en medio normal previo a su análisis. No se observaron importantes variaciones en la clonalidad de las poblaciones tratadas frente a sus controles no tratados. Barra de error, SEM; $n=3$; ns, no significativo.

Agentes Quelantes. Los agentes quelantes son compuestos orgánicos usados para secuestrar iones metálicos, y entre ellos podemos encontrar al ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y al ácido egtazico (EGTA). El EDTA tiene la capacidad de unir y secuestrar una gran variedad de iones metálicos (excepto metales alcalinos), tales como Ca^{2+} , Mg^{2+} y Fe^{2+} . Por otro lado, el EGTA tiene una mayor afinidad por los iones Ca^{2+} y menor afinidad por los iones Mg^{2+} comparado con el EDTA.

Todas las VSPs tienen en común la presencia de múltiples motivos CXXC en su porción extracelular, los cuales son capaces de coordinar metales y formar puentes disulfuro intra e intermoleculares que podrían participar en modelar la conformación nativa de estas proteínas. El secuestro de metales divalentes mediante el uso de estos reactivos es capaz de aumentar la sensibilidad de la VSP 1267 a un tratamiento posterior con tripsina (Serradell *et al.*, 2019), por lo que su efecto sobre el estado nativo de estas proteínas es evidente. Sin embargo, nunca fue evaluado el papel de los agentes quelantes como inductores de la VA sobre poblaciones clonales de trofozoítos. Por lo tanto, para evaluar su rol en este proceso de diferenciación de *Giardia* tratamos a clones de trofozoítos que expresan la VSP 1267 tanto con EDTA como con EGTA a diferentes concentraciones por un periodo corto de tiempo en PBS a 37°C , para luego ser devueltos a medio normal por 72 h antes de analizar la composición de las poblaciones resultantes.

Luego de los diferentes tratamientos, se pudo observar una mayor sensibilidad por parte de los trofozoítos al EGTA comparado con el EDTA (Figura 18 C y A, respectivamente), lo cual podría indicar un mayor requerimiento de Ca^{2+} por parte de los trofozoítos para poder sobrevivir. Por otro lado, dentro de concentraciones de trabajo subletales de ambos reactivos, ninguno de los dos mostró tener efecto alguno sobre la clonalidad de las poblaciones tratadas comparadas con las no tratadas por lo que tampoco es capaz de calificar como un agente inductor de VA (Figura 18 B y D).

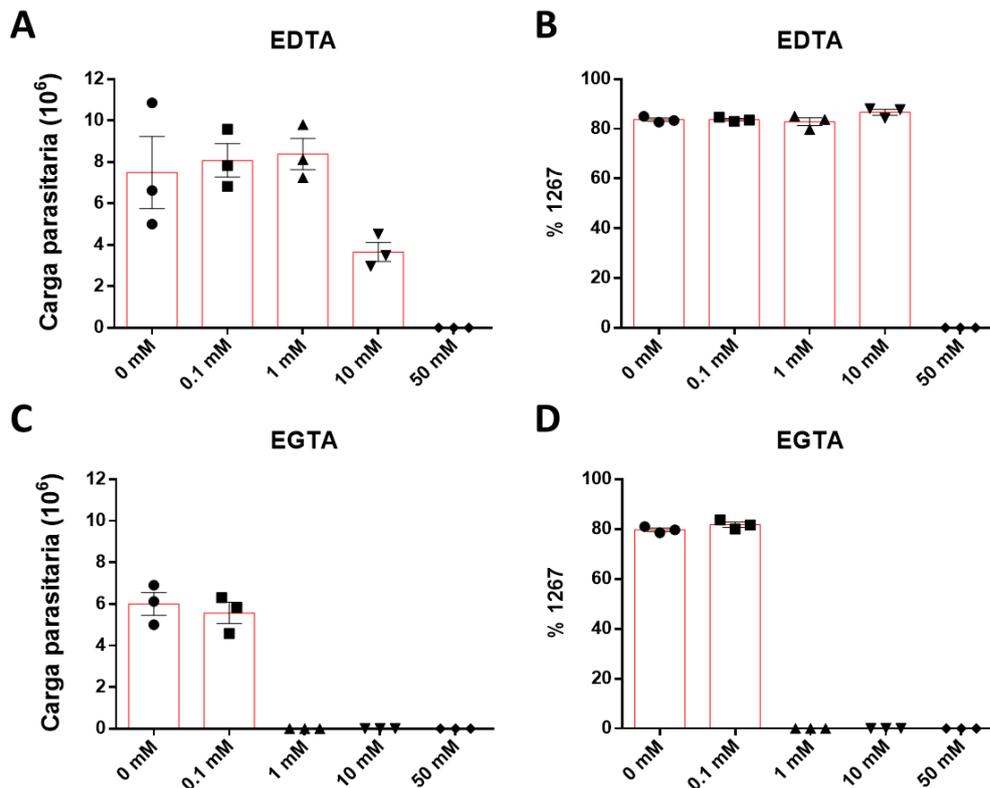


Figura 18. Efecto de agentes quelantes sobre el clon 1267. 5×10^4 trofozoítos pertenecientes al clon que expresa la VSP 1267 fueron tratados durante 1 h a 37 °C con concentraciones subletales de ambos agentes quelantes y luego crecidos por 72 h en medio normal previo a su análisis. Se observó que el EGTA es letal a concentraciones más bajas que el EDTA. Sin embargo, ninguno de los dos provocó importantes variaciones en la clonalidad de las poblaciones tratadas frente a sus controles no tratados. Barra de error, SEM; n=3; ns, no significativo.

Modificaciones temporales en el pH del medio. En su camino hacia el intestino, los quistes (vía normal de infección) o los trofozoítos (vía artificial de infección) deben atravesar las condiciones ácidas presentes en el ambiente gástrico del hospedador, por lo que consideramos apropiado evaluar el efecto que tienen las fluctuaciones de pH del medio al que son expuestos los parásitos. Para esto decidimos enfrentar una serie de clones de *Giardia* a un amplio rango de pH durante un corto periodo de tiempo y luego evaluar la capacidad de éstos de recuperarse en medio normal. Para esto incubamos un inóculo de diferentes clones de *Giardia* durante 30 minutos a 37 °C en PBS a distintos pH (1-13), luego de lo cual se les permitió a las células recuperarse por tres días previo a un análisis de proliferación.

Del experimento se desprende que diferentes clones de *Giardia* poseen una gran resistencia frente a variaciones temporales en el pH de su medio. Los clones son particularmente resistentes dentro de un rango de pH entre 3-9, sin ser perjudicados en su capacidad de proliferar. Dentro de este rango, solamente el clon 9B10 vio significativamente afectada su capacidad proliferativa cuando fue enfrentado a un pH de 9 (Figura 19).

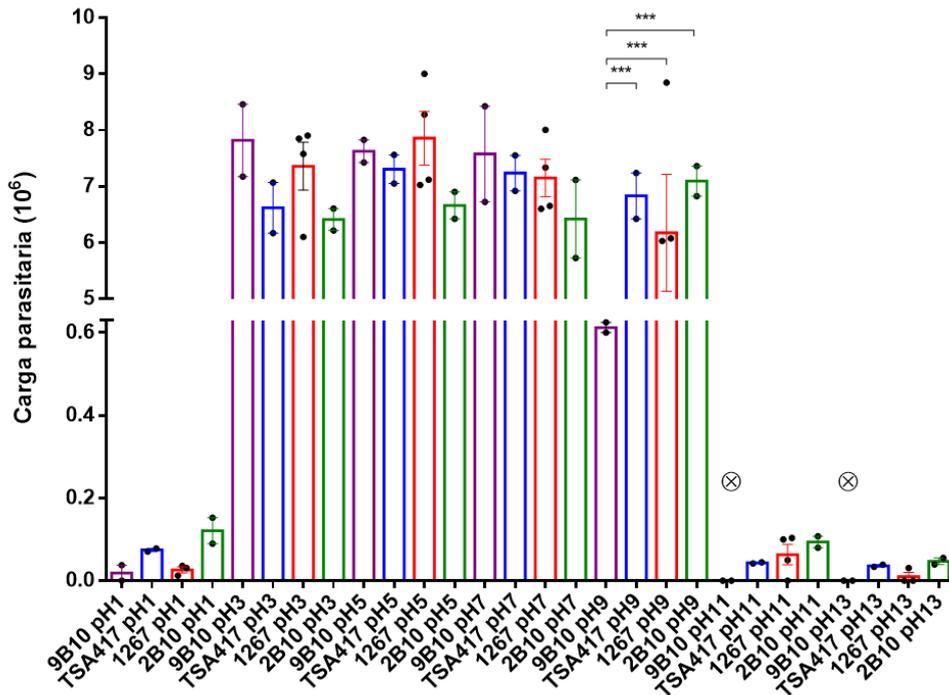


Figura 19. Resistencia de diferentes clones de *Giardia* frente a cambios temporales en el pH del medio. Todos los clones evaluados fueron resistentes a variaciones en el pH de su medio que van de pH 3-9. El único clon de los ensayos que vio severamente perjudicada su capacidad proliferativa luego del tratamiento fue el clon que expresa la VSP 9B10 incubado a pH 9. Barra de error, SEM; n=4; ns, no significativo; ***, p<0.001; x, ausencia de crecimiento.

Debido a que el clon 1267 presenta una frecuencia de VA espontánea elevada y por ende probablemente es más propenso a responder ante estímulos desestabilizadores, decidimos utilizarlo para profundizar en los efectos del pH sobre el fenómeno de VA. Para ello evaluamos el efecto sobre la clonalidad de la población 1267 a tiempos crecientes de incubación en un medio de pH bajo.

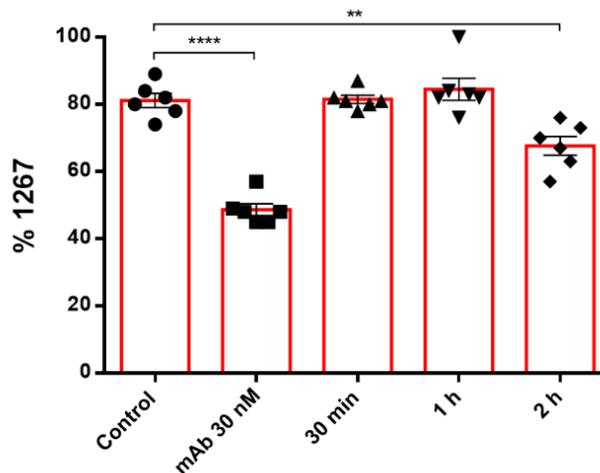


Figura 20. Clones que expresan la VSP 1267 tratados a pH ácido. Inóculos (1×10^4 trofozoítos) fueron incubados durante diferentes tiempos en PBS pH=3, y luego crecidos durante 72 h en medio de crecimiento normal previo al análisis de la composición de la población resultante. Barra de error, SEM; n=6; ns, no significativo; **, p<0.01; ****, p<0.0001.

Se trató un clon que expresa la VSP 1267 durante diferentes periodos en PBS pH 3 a 37 °C y luego se permitió que los parásitos se recuperen cultivándolos en medio normal por 72 h. En el ensayo utilizamos como control de inducción de VA al mAb 7F5, bajo las mismas condiciones (PBS pH 7 a 37 °C suplementado con el mAb 7F5).

Luego de los tratamientos se pudo observar una pequeña disminución, aunque significativa, en la clonalidad de la población VSP 1267 positiva cuando fueron tratados durante 2 h a pH 3, pero ningún efecto en las poblaciones que fueron tratadas por menos tiempo (Figura 20). Es posible que diferentes VSPs puedan tener diferente susceptibilidad a ser estructuralmente inestables a pH ácido. La pérdida de estabilidad de las VSPs debida a cambios en el pH del medio (muy probablemente debido a su protonación) podría tener un efecto similar al ejercido por el fragmento Fab, conduciendo a la auto asociación y agregación de VSPs que perdieron su estructura nativa, y a su posterior recambio.

Efecto de Proteasas. El efecto de las proteasas intestinales sobre poblaciones de *Giardia* ha sido investigado en el pasado y evidenciado que los trofozoítos poseen una resistencia diferencial frente a ellas, y que esta diferencia radica en la identidad de la VSP que expresan (Nash, 2002; Papanastasiou *et al.*, 1997; Nash *et al.*, 1991).

Para determinar el efecto de la tripsina sobre nuestros cultivos decidimos tomar como punto de partida el trabajo de Nash *et al.* realizado en 1991 acerca de la susceptibilidad de diferentes clones de *Giardia* frente a proteasas intestinales. Para este experimento decidimos utilizar al clon 1267. Luego de tratar este clon con diferentes concentraciones de tripsina en PBS a 37°C por un intervalo corto de tiempo (1 h), se pudo observar que los mismos son particularmente resistentes al tratamiento y que el mismo no afecta de manera significativa ni la capacidad proliferativa de la población (Figura 21), ni su clonalidad, descartándolo como un agente capaz de inducir VA (Figura 22 A, VSP1267 pH7).

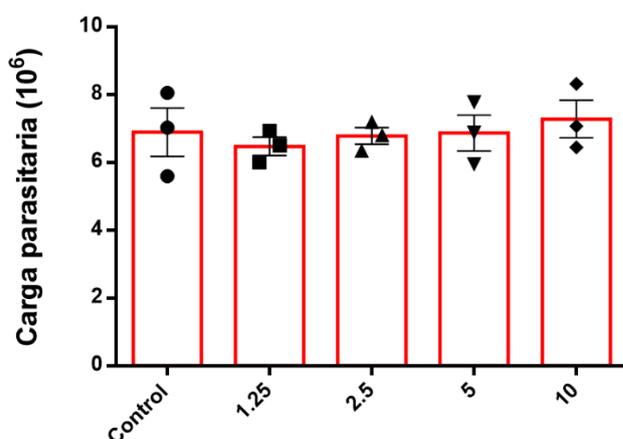


Figura 21. Efecto de la tripsina sobre la capacidad proliferativa del clon 1267. 1×10^4 trofozoítos del clon que expresa la VSP 1267 fueron incubados en presencia de tripsina (mg/ml) y luego crecidos durante 72 h en medio normal, previo a su análisis. Concentraciones tan altas como 10 mg/ml no afectaron la capacidad replicativa del clon 1267. Barra de error, SEM; n=3; ns, no significativo; $p < 0.05$.

Luego de observar que los clones que expresan la VSP 1267 son resistentes a un tratamiento con un rango bastante amplio de tripsina, nos propusimos a investigar si un pretratamiento con un pH ácido generaba algún efecto sobre la resistencia de los parásitos al ser enfrentados a la misma proteasa. Para esto decidimos realizar un ensayo piloto sobre los clones que expresan las VSP TSA417 y 1267, utilizando una combinación de diferentes niveles de acidez, seguido de un tratamiento con diferentes

concentraciones de proteasa (Figura 22 A).

Al combinar ambos factores de estrés (acidez y proteasa), pudimos observar que las poblaciones de parásitos recubiertos por la VSP TSA417 no mostraron una tendencia al cambio en su clonalidad, mientras que aquellos parásitos recubiertos por la VSP 1267, disminuían su representatividad en la población luego del tratamiento cuando ambos clones eran tratados por separado (Figura 22 A). Esta diferencia en el comportamiento de ambos clones frente al tratamiento se hizo máxima cuando la acidez del medio y la concentración de proteasa eran elevados (pH 3 y 10 mg/ml de tripsina, respectivamente) (Figura 22 B). La diferencia observada podría indicar una menor resistencia estructural por parte de la VSP 1267 (y una mayor resistencia estructural por parte de la VSP TSA417) a alteraciones inducidas por un pH ácido, el cual podría desestabilizarla y exponer sitios sensibles a la proteólisis por parte de la tripsina de igual manera que lo hizo el fragmento Fab en un ensayo similar (Figura 15 B).

Cuando el mismo tratamiento se realizó sobre un inóculo de trofozoítos compuestos en partes iguales por los clones que expresan las VSPs TSA417 y 1267, se pudo observar un cambio en la composición de la población resultante, con una significativa disminución del clon 1267 al ser comparado con el clon TSA417. Las figuras 22 C y D, ilustran la composición de esta población mixta antes del tratamiento (inóculo) y posterior a este, utilizando dos grados de acidez diferentes (pH 7 y pH3) previo al tratamiento con la proteasa, haciendo énfasis en la composición total de la población en cuanto a las VSPs que expresan los diferentes parásitos (Figura 22 C), o solo en los clones TSA417 (azul) y 1267 (rojo) (Figura 22 D).

Tras comparar el efecto del tratamiento sobre poblaciones que expresan la VSP TSA417 o la VSP 1267, o sobre poblaciones mixtas compuestas por parásitos recubiertos por la VSP TSA417 y por parásitos recubiertos por la VSP 1267, parece claro que el cambio en la composición de la población mixta se debió principalmente a la mayor sensibilidad de los clones 1267 al tratamiento, como lo demuestra la susceptibilidad de dicho clon al ser tratado individualmente (Figura 22 B), permitiendo la expansión del clon que expresa la VSP TSA417.

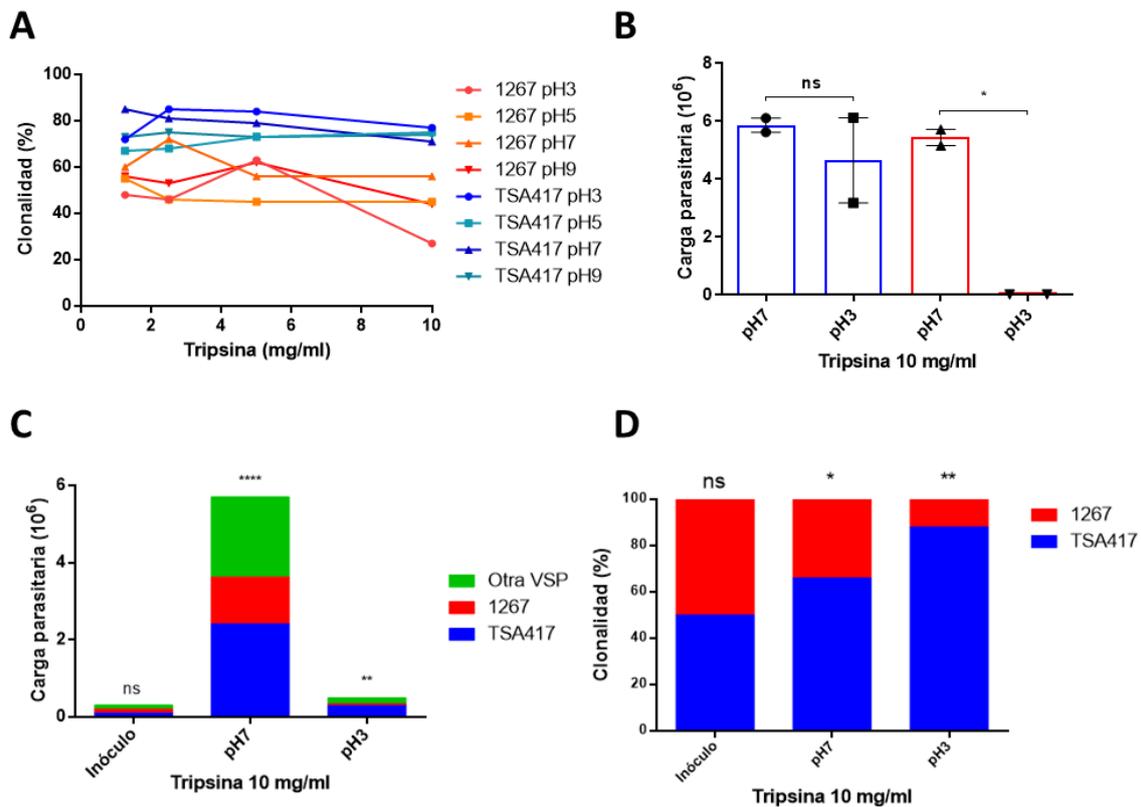


Figura 22. Efecto de la tripsina sobre parásitos pre incubados a pH bajo. Poblaciones de trofozoítos clones que expresan las VSP TSA417 y VSP 1267 fueron pre-tratados de manera individual (A, B) o conjunta (C, D) a diferentes concentraciones de pH y luego enfrentados a tripsina. En el gráfico A se puede observar un ensayo único que permite observar una tendencia del clon 1267 a disminuir su clonalidad ante un tratamiento con tripsina previa incubación a pH ácido (pH 3), pero una mayor estabilidad por parte del clon TSA417 ante el mismo tratamiento. Dicho tratamiento resulta letal para una población de parásitos compuesta mayoritariamente por el clon 1267, mientras que las poblaciones TSA417 son capaces de resistir las mismas condiciones (B). Si el mismo tratamiento de acidez elevada seguida por incubación con tripsina se realiza sobre una población que posee a los clones 1267 (~30%) y TSA417 (~30%) en iguales proporciones se puede observar que el clon 1267 disminuye su presencia en la misma, mientras que el clon TSA417 aumenta su representación en la población (C y D). La figura C muestra la composición total de las poblaciones antes del tratamiento (inóculo) y luego de éste (pH7 y pH3), mientras que en la figura D se grafica el porcentaje de clones 1267 y TSA417 antes y después del mismo tratamiento. Los clones que expresan la VSP TSA417 mostraron ser significativamente más resistentes a dichos tratamientos que los clones que expresan la VSP 1267 (B-D), lo cual podría explicar la dinámica temprana de las infecciones en jerbos. Barra de error, SEM; n=2; ns, no significativo; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$.

Luego de haber completado los ensayos con los diferentes agentes estresantes (H_2O_2 , DTT, agentes quelantes, fluctuaciones de pH) en un intento por imitar las posibles condiciones capaces de alterar la estructura de las VSPs con las que se podrían encontrar los parásitos en el interior de su huésped, podemos concluir que a pesar de que todos ellos son capaces de afectar a la estructura de VSPs susceptibles, conduciendo a la desestabilización de estas y probablemente inducir VA por la agregación de las VSPs que perdieron su estructura nativa, parece improbable que esto ocurra en condiciones fisiológicas, ya que la combinación de la acción de los mismos junto con la acción de las proteasas intestinales conduciría a la muerte de los trofozoítos precedida por la destrucción de su cubierta proteica protectora, dejándolos vulnerables

a las severas condiciones reinantes en el ambiente proporcionado por el hospedador. Por lo tanto, cuando todas las variables en juego intentan mantenerse constantes y la única diferencia radica en cual VSP se encuentra en la superficie de distintas poblaciones de parásitos, parece evidente que la estructura propia de cada VSPs dictada por su secuencia de aminoácidos parece vital a la hora de hacer frente a las condiciones impuestas por el ambiente de su hospedador.

EXPLORACIÓN DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EL PROCESO DE VARIACIÓN ANTIGÉNICA.

Rol del tallo citoplasmático conservado de las VSPs en la variación antigénica.

Nuestro novedoso hallazgo de que los anticuerpos dirigidos contra la superficie del parásito, más específicamente contra sus VSPs, sean capaces de inducir VA en el trofozoíto (ver "*La agregación de VSPs debida a anticuerpos en la superficie celular de Giardia induce la variación antigénica*", página 37), los convierte en herramientas imprescindibles para poder estudiar este novedoso fenómeno. Nuestra hipótesis es que las VSPs podrían funcionar como una molécula capaz de transducir una señal hacia el interior de la célula luego del contacto con el anticuerpo, generando el reseteo del sistema de control de la expresión de la VSP conduciendo a la VA. Por tal razón, la región conservada de las VSPs que incluye el TMD y el tallo citoplasmático podrían jugar un papel crucial en la transducción de la señal que dispare el mecanismo de recambio. En este trabajo decidimos centrarnos en el dominio citosólico CRGKA altamente conservado en todas las VSPs.

El dominio citoplasmático CRGKA ha sido presentado en la literatura como blanco de modificaciones post traduccionales, tales como la citrulinación de la arginina y la palmitoilación de la cisteína (Ropolo & Touz, 2010; Touz *et al.*, 2008; Touz *et al.*, 2005), que estarían involucradas directamente en el proceso de citotoxicidad mediada por anticuerpos anti-VSPs. Debido a que en el presente trabajo de tesis demostramos que los anticuerpos anti-VSPs no son citotóxicos sino que desencadenan el fenómeno de VA, decidimos evaluar el rol potencial de las modificaciones post traduccionales del dominio CRGKA en este proceso.

Para evaluar la participación del tallo citoplasmático conservado CRGKA, realizamos diferentes mutaciones en sus aminoácidos constituyentes y evaluamos si tales cambios tienen algún efecto en la inducción de la VA mediada por anticuerpos (Figura 23). La estrategia implicó expresar constitutivamente en un clon del aislamiento WB una VSP perteneciente a otro aislamiento que no estuviese codificada en su genoma (y para la que contamos con un mAAb específico) para así "evitar" el mecanismo de silenciamiento mediado por ARN de interferencia (ARNi) y poder expresar dos VSPs en simultáneo (Prucca *et al.*, 2008). Una vez conseguida una población que expresa las dos VSPs, utilizamos a la proteína endógena (codificada en el genoma del aislamiento WB) como reportera del efecto de un anticuerpo dirigido contra la VSP exógena (no codificada en el genoma del aislamiento WB). De esta manera, si la maquinaria subcelular sólo es capaz de "ver" la porción citoplasmática de las VSPs, tanto la VSP endógena como la exógena serían indistintas para ella. Por lo tanto, si el tallo citoplasmático tuviese implicancia en la transducción de una señal deberían ocurrir dos cosas: (i) el contacto de un anticuerpo dirigido contra la VSP exógena sin modificaciones en su tallo citoplasmático (*wild type*), se vería reflejado en el recambio de la VSP endógena (reportera) no contactada por anticuerpos y (ii) mutaciones en los aminoácidos que forman parte del tallo citoplasmático deberían afectar al proceso de VA (siempre que los aminoácidos afectados tuviesen un papel

esencial en este proceso), impidiendo que ocurra el recambio de una VSP por otra cuando es estimulado con un anticuerpo contra la VSP exógena (Figura 23).

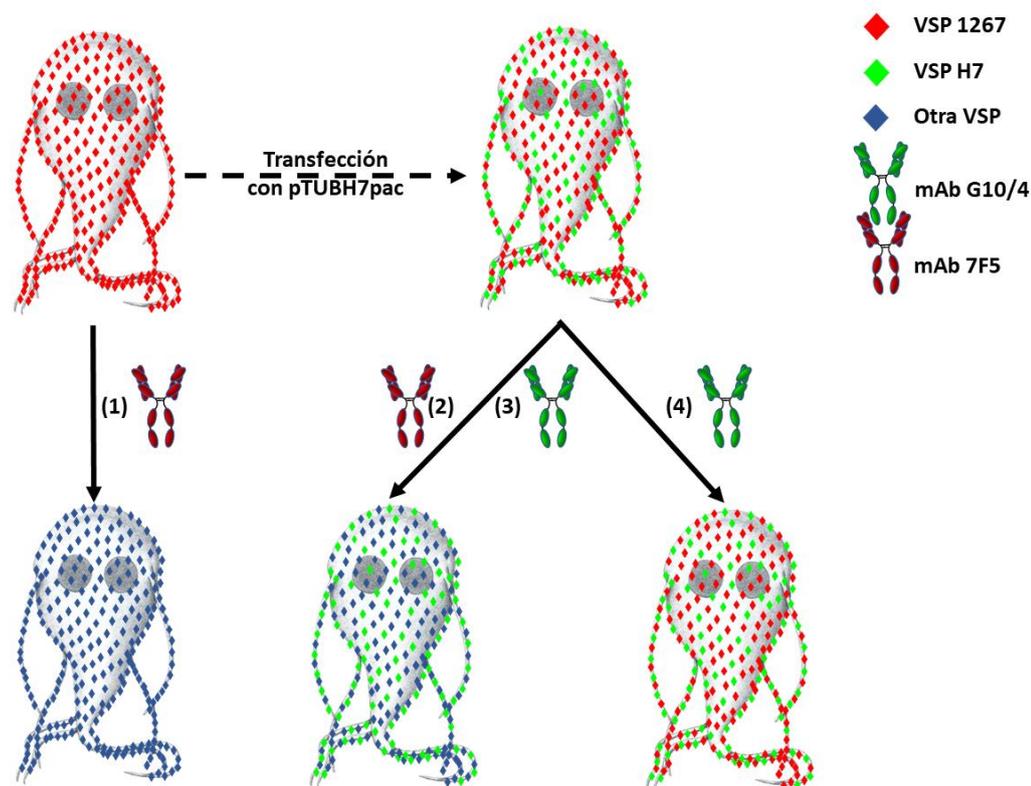


Figura 23. Diseño experimental para evaluar la participación del tallo citoplasmático CRGKA en la VA inducida por anticuerpos. Una población clonal para la VSP 1267 fue transfectada con el vector de expresión pTUBH7pac con el objeto de obtener parásitos que co-expresen tanto la VSP 1267 (endógena) como la VSP H7 (exógena). Cuando se incubaba una población clonal de trofozoítos que expresa un solo tipo de VSP junto a un anticuerpo específico contra dicha VSP, la población recambia su VSP por otra antigénicamente diferente (1). De esta manera, esperamos que, si los parásitos que expresan dos VSPs en simultáneo son incubados con un anticuerpo dirigido contra la VSP endógena, se producirá el recambio de ésta (2) como es habitual. Por otra parte, si incubamos a los mismos parásitos con un anticuerpo dirigido contra la VSP exógena sin modificaciones en su dominio citoplasmático (*wild type*), podría esto inducir el recambio de la VSP endógena (3) o no tener efecto sobre la misma (4). La opción 3, implicaría que el tallo citoplasmático estaría involucrado en mediar una señal de VA, mientras que la opción 4, implicaría la no participación del tallo citoplasmático en una señalización para la VA. Solamente si la opción 3 tiene lugar utilizando la VSP exógena *wild type*, se podría avanzar y evaluar la participación en el proceso de VA de los diferentes aminoácidos constituyentes del dominio citoplasmático CRGKA, realizando mutaciones en ellos.

La VSP utilizada como exógena fue la VSP H7, perteneciente al aislamiento GS, y la endógena la VSP 1267, perteneciente al aislamiento WB. Por lo tanto, lo primero que analizamos fue el efecto del anticuerpo G10/4 (anti-VSP H7) sobre poblaciones de clones que expresan la VSP 1267. Para esto expandimos un inóculo del dicho clon durante tres días en ausencia y en presencia del mAb G10/4. Al cabo del experimento, no observamos diferencias en la clonalidad de la VSP 1267 entre las poblaciones que crecieron en ausencia y las que lo hicieron en presencia del anticuerpo anti-VSP H7 (Figura 24 A y B, respectivamente). Lo que nos permite afirmar que el mAb G10/4 no dispara la VA en trofozoítos del clon que expresa la VSP 1267, al no unirse a esta VSP.

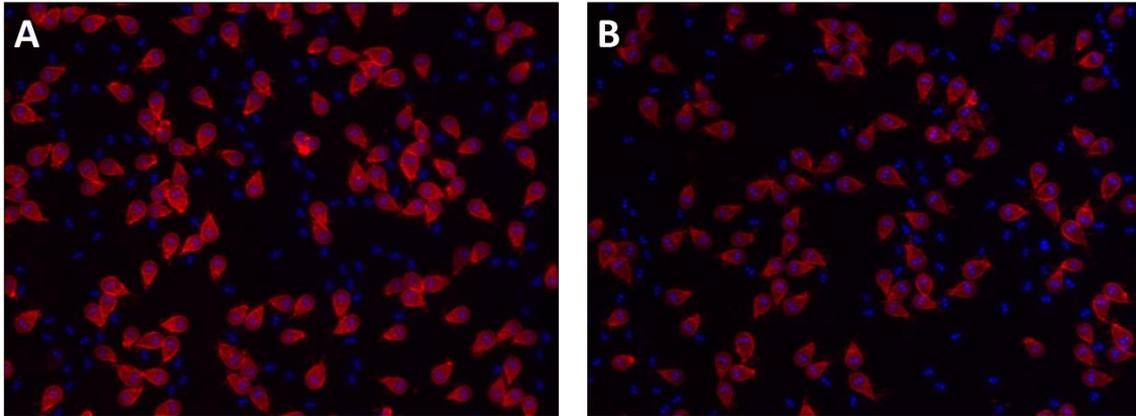


Figura 24. Ausencia de efecto del mAb G10/4 (anti-VSP H7) sobre los clones que expresan la VSP 1267. La clonalidad de una población de los clones no se vio afectada al expandirse durante 72 h en ausencia (A) ni en presencia del mAb G10/4 (B), dilución 1/7000.

Las modificaciones introducidas en la secuencia CRGKA incluyeron: (i) la mutación de la Cisteína (blanco de palmitoilación) por una Lisina (*C553K; K>C*), (ii) la Arginina (blanco de citrulinación) por una Alanina (*R554A; A>R*), (iii) la Lisina (blanco de Ubiquitinación) por una Alanina (*K556A; A>K*), (iv) la modificación de todos los aminoácidos por Lisinas para generar un tallo de carga positiva (*CRGKA553_557KKKKK*), (v) la modificación de todos los aminoácidos para generar un tallo de carga neutra (*CRGKA553_557AAAAA*), (vi) la eliminación del tallo citoplasmático (*553_557delCRGKA*), y (vii) el tallo sin modificar como control (*wt*) (Figura 25).

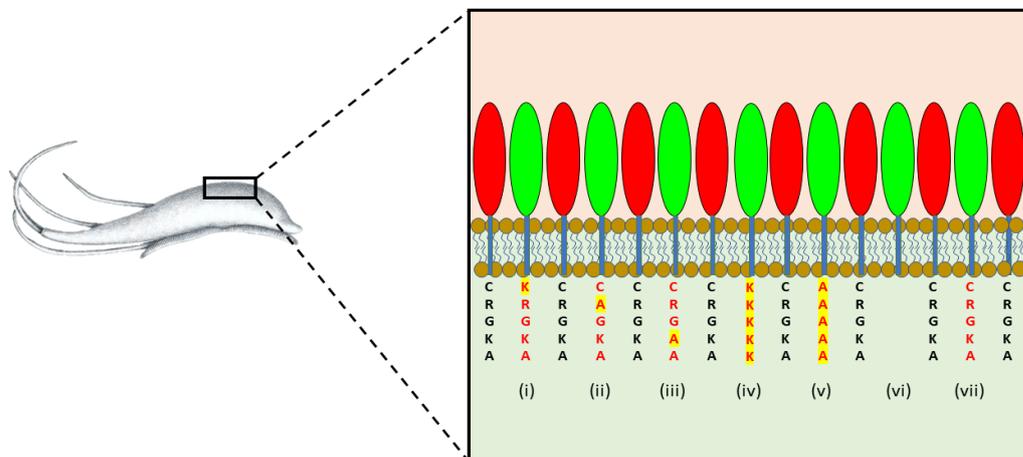


Figura 25. Esquema de las diferentes variantes propuestas de la VSP H7 mutada. Los parásitos generados co-expresan la VSP 1267 endógena (rojo) y una de las diferentes variantes de la VSP H7 (verde) con su cola citoplasmática mutada (i-vii).

De todas las variantes de la VSP H7 generadas solamente cuatro de ellas (*K>C*, *A>R*, *A>K*, y *wt*) localizaron en la superficie del parásito (Figura 26) en una proporción lo suficientemente alta en las poblaciones como para poder llevar a cabo el experimento, mientras que las tres restantes (*KKKKK*, *AAAAA*, y *delCRGKA*) fueron encontradas en superficie en una proporción demasiado baja impidiendo su uso y sugiriendo su importancia en el transporte de estas proteínas a membrana plasmática. La variante *KKKKK* en la que el dominio citoplasmático fue reemplazado por 5 aminoácidos consecutivos de Lisina puede haber sido interpretada por la célula como una señal de

retención en RE (Shin *et al.*, 1991), impidiendo su correcta localización en membrana plasmática. Mientras que la falla en alcanzar la membrana plasmática por parte de las variantes *AAAAA* y *delCRGKA* (las cuales poseen un dominio citosólico apolar y la ausencia del mismo, respectivamente), sugiere que es necesario un anclaje citoplasmático polar para la correcta localización de las VSPs en superficie. Curiosamente, fue reportado que una VSP recombinante carente del dominio citoplasmático al ser expresada en *Giardia*, se localizaba sin problemas en superficie (Touz *et al.*, 2003). Esto pudo haberse debido a que, en la construcción de dicha proteína por esos autores, la misma se encontraba unida a un tag de 3xHA en su extremo C-terminal, lo que podría estar aportando este anclaje polar necesario para mantener a la VSP en superficie celular.

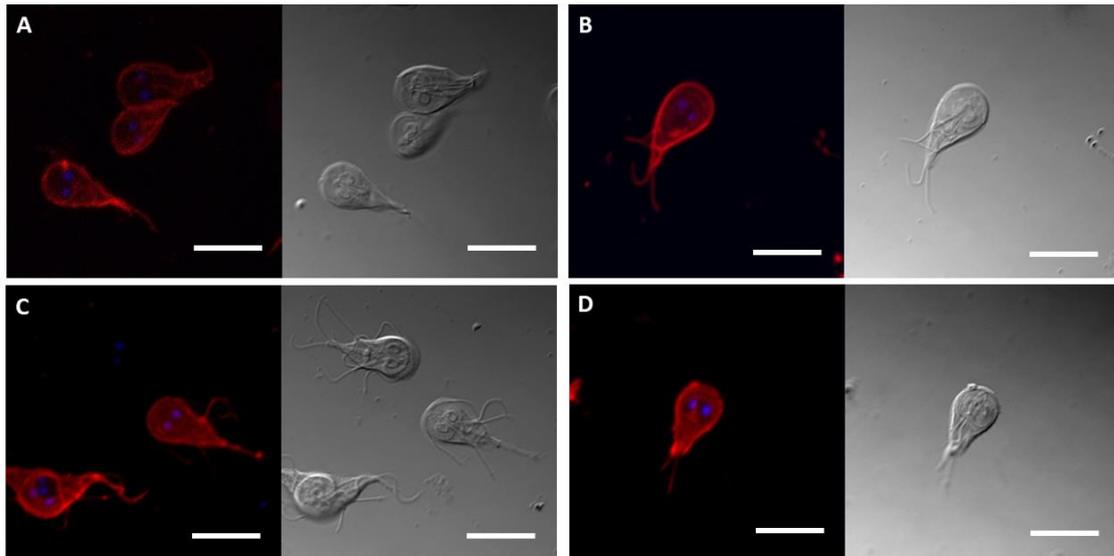


Figura 26. Localización celular de las variantes mutantes de la VSP H7. Trofozoítos teñidos *in vivo* utilizando el anticuerpo G10/4 dirigido contra la VSP exógena muestra la localización en membrana plasmática de la misma. Se pueden observar las variantes VSP H7 *wt* (A), VSP H7 *K>A* (B), VSP H7 *A>R* (C) y VSP H7 *C>K* (D) (barra de escala, 10 μ m).

La variante *wild type* (Control) de la VSP H7 fue evaluada en los clones que expresan las VSPs 9B10, 1267 y TSA417. Esto fue necesario para poder validar cualquier resultado obtenido con las demás variantes en las cuales se reemplazó algún aminoácido del tallo citoplasmático. Cuando se indujo VA en los clones que expresan las VSPs 1267 y TSA417 (Figura 27 A y B), ambos co-expresando la VSP H7 *wt*, con el mAb G10/4 (anti-VSP H7) se pudo observar el recambio de ambas VSPs endógenas (VSP 1267 y VSP TSA417), por lo cual el estímulo fue receptado de manera efectiva por la célula a través de la VSP exógena (Figura 23, opción 3).

Cuando se utilizó el clon que expresa la VSP 9B10 como VSP reportera durante la VA inducida a través de la VSP H7 *wt* (Figura 26 C), no pudo ser observado el recambio de la VSP endógena de manera consistente en diferentes experimentos (Figura 23, opción 3 y 4). Más tarde pudimos revelar que estos resultados en apariencia confusos se debían a la promiscuidad del mAb 9B10 que resultó ser capaz de reconocer a más de una VSP expresada por el aislamiento WB (Figura 27 D), lo cual había sido reportado previamente por Carranza *et al.* (2002). Por lo tanto, el recambio de la VSP original resultaba retrasado por la aparición de poblaciones que expresaban otras VSPs antigénicamente similares a la original, es decir que el proceso de VA estaba teniendo lugar, pero no podía ser detectado de manera adecuada.

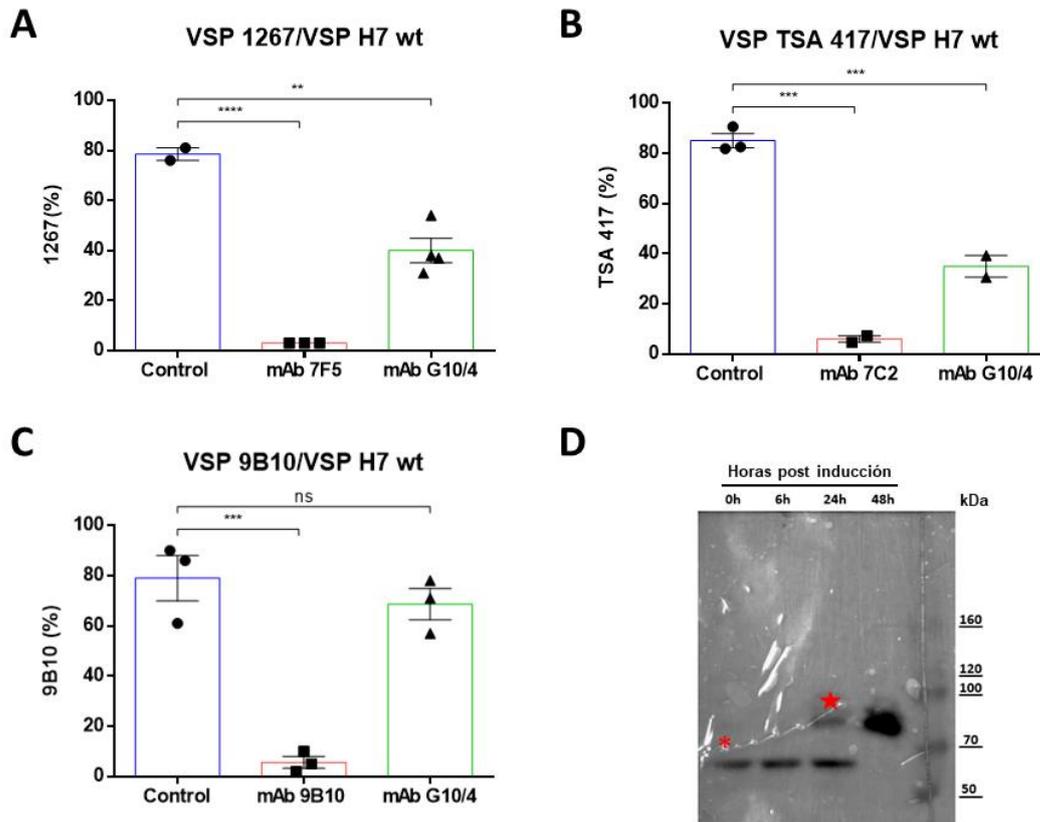


Figura 27. Inducción de la VA a través de la variante *wild type* de la VSP H7. Cuando se indujo la VA de diferentes clones de *Giardia* a través de la VSP H7 variante *wild type*, solamente los clones que expresan las VSPs 1267 y TSA417 (A y B, respectivamente) respondieron recambiando la VSP reportera, mientras que no hubo resultados concluyentes con los clones que expresan la VSP 9B10 (C). La falta de una respuesta consistente por parte del clon VSP 9B10 podría deberse a que más de una VSP es reconocida por el mAb 9B10, lo cual se vería reflejado en una inconsistencia en las poblaciones resultantes luego del tratamiento para inducir el recambio de su VSP. El *Western blot* de un clon 9B10 tratado con el mAb 9B10 evidencia la aparición de otras VSPs reconocidas por el mismo mAb (D; *asterisco*, banda de ~68 kDa consistente con el PM de la VSP 9B10B; *estrella*, banda de 72 kDa consistente con el PM de la VSP 9B10A). Barra de error, SEM; n=3; ns, no significativo; **, p<0.01; ***, p<0.001; ****, p<0.0001.

Una vez observado que la variante *wt* de la VSP H7 era capaz de transmitir la señal de VA, decidimos realizar el mismo ensayo con las variantes de la VSP H7 que presentan aminoácidos mutados en su cola citoplasmática. Lo que se pudo observar fue que el reemplazo individual de los aminoácidos Arginina (A>R), Lisina (A>K), y Cisteína (K>C) (Figura 28 A, B y C, respectivamente), no impidió la transmisión de la señal para el recambio de la VSP reportera.

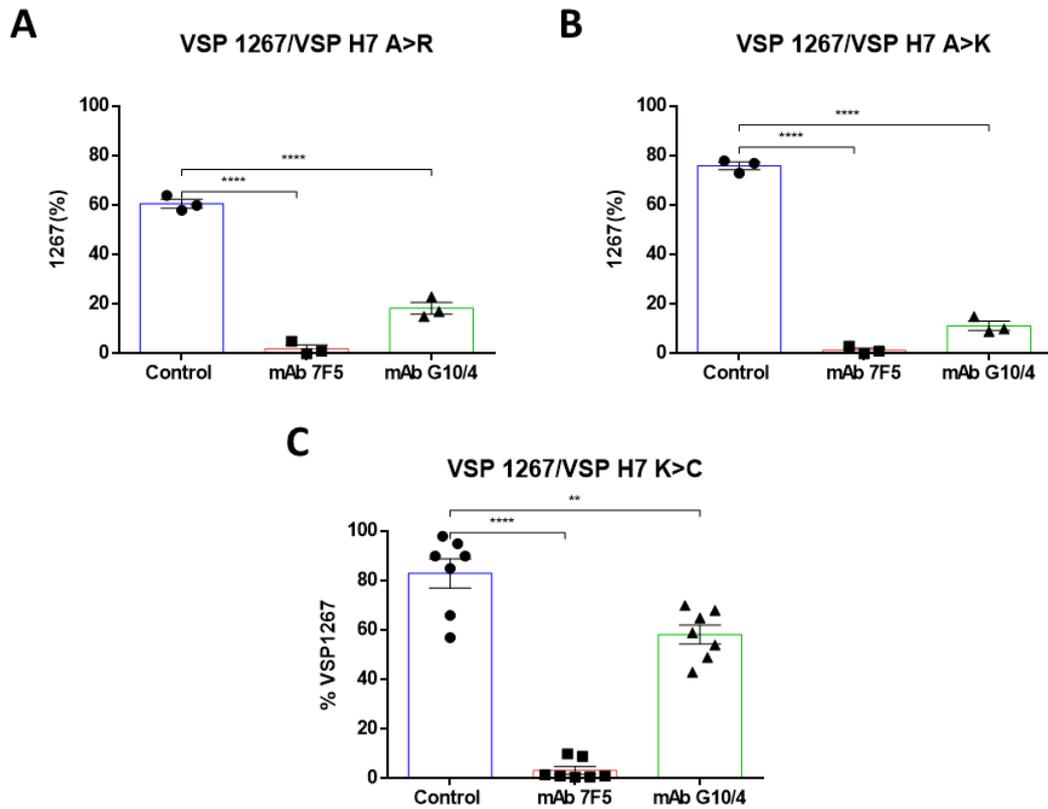


Figura 28. Inducción de la VA a través de variantes de la VSP H7 con mutaciones en su tallo citoplasmático. El recambio de VSPs inducido por anticuerpos a través de las variantes con el tallo CRGKA mutado no impidieron que dicho proceso se lleve a cabo, indicando la no participación en la transmisión de la señal de los aminoácidos analizados. Se realizaron 2 experimentos independientes con un n=3 (A y B) o n=7 (C). Barra de error, SEM; n=3 (A y B) o n=7 (C); ns, no significativo; **, p<0.01; ****, p<0.0001.

Se puede observar que el reemplazo de un residuo de Cisteína por uno de Lisina ($K>C$), a pesar de mostrar una capacidad de sentir el estímulo de anticuerpos y disparar la VA en la población de trofozoítos, no presenta la misma eficacia cuando se lo compara con las variantes *wild type* y con aquellas en donde se mutaron la $A>R$ y la $A>K$.

Dado a que el tallo citoplasmático CRGKA no parecería tener un rol esencial en la transducción del estímulo de recambio de VSPs mediado por anticuerpos ya que la eliminación de los aminoácidos Cisteína, Lisina y Arginina (principales blancos de modificaciones post traduccionales) no afectan el correcto recambio de la VSP endógena cuando el estímulo de VA es receptado por la VSP exógena, queda por determinar el papel de la otra región conservada de las VSPs, como lo es su dominio transmembrana (ver Tesis Doctoral Tenaglia A., 2020). Si el TMD fuese importante, puede entonces que la Cisteína más cercana a este dominio participe, aunque sea parcialmente en el proceso de VA.

CAPÍTULO 4

Resultados *in vivo*

COMPORTAMIENTO DE DIFERENTES CLONES DURANTE LA INFECCIÓN

EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE DIFERENTES CLONES DURANTE LA INFECCIÓN EN JERBOS.

Luego de haber caracterizado el comportamiento de diferentes clones de *Giardia* *in vitro*, nos propusimos a evaluar el rol de las VSPs durante las infecciones causadas por *Giardia*, utilizando como organismo modelo al jерbo (*Meriones unguiculatus*), debido a su alta susceptibilidad a la infección con *Giardia*, la abundante liberación de quistes y porque los signos de la enfermedad que presenta son muy similares a los que se observan en humanos (Serradell *et al.*, 2018).

FASE DE ESTABLECIMIENTO Y EXPANSIÓN.

Evaluación de la capacidad infectiva de diferentes clones de *Giardia*.

Las VSPs recubren exteriormente a los trofozoítos de *Giardia* generando una densa interfase entre el parásito y su ambiente. Se cree que la principal función de estas proteínas es la de proteger al parásito de las desafiantes condiciones encontradas dentro de la porción superior del intestino delgado de su hospedador.

Estudios previos realizados *in vivo* con poblaciones clonales de *Giardia* han demostrado que luego de establecerse la infección, la composición de la población de parásitos es modificada y sólo persisten trofozoítos que portan determinadas VSPs y no otras, sugiriendo que no todas ellas son capaces de otorgarle a su portador la misma ventaja selectiva dentro de su hospedador (Singer & Nash, 2000).

Para evaluar el éxito que tienen diferentes clones de *Giardia* en establecer infecciones en los jerbos, realizamos una serie de infecciones inoculado a estos animales con diferentes clones del aislamiento WB expresando las VSPs 9B10, 1267, TSA417, 7C9 y 2B10. Todos los clones utilizados en los experimentos tuvieron una clonalidad de entre 90-99%, por lo cual debemos considerar que siempre existen contaminaciones con trofozoítos pertenecientes a otros clones que expresan VSPs diferentes debido a que *Giardia* cambia espontáneamente su VSP en cultivo (Nash, 2002). Esto fue tenido en cuenta para la interpretación de los diferentes resultados obtenidos a lo largo de este trabajo de tesis.

La evolución de las infecciones fue evaluada a través del muestreo de quistes en materia fecal y del análisis cuantitativo y cualitativo de los parásitos recuperados del intestino delgado de los jerbos a diferentes tiempos (Figura 29, A y B).

Las infecciones en jerbos fueron realizadas mediante inoculación orogástrica con inóculos de 2×10^5 trofozoítos de diferentes clones de VSP. Se pudo determinar que todos los clones ensayados fueron capaces de iniciar infecciones en los jerbos. Cuando analizamos la dinámica de la infección de los diferentes clones utilizados, considerando únicamente la carga parasitaria a lo largo del tiempo, no pudimos encontrar diferencias importantes entre ellos. La carga parasitaria de las diferentes poblaciones infectivas aumento progresivamente hasta el día 7 post infección (p.i.), con tan sólo pequeñas diferencias entre los clones utilizados. Esto está íntimamente relacionado con el aumento paulatino de los anticuerpos anti-*Giardia*, cuya aparición y aumento gradual en el intestino del huésped inicia alrededor del día 7 p.i. (Serradell *et al.*, 2018), se observó una constante disminución en el número de parásitos sin importar la identidad del clon inicial, lo cual concluyó con la aparente resolución de la infección por parte del huésped alrededor de los 21-28 días post infección (d.p.i.) (Figura 29 B).

A partir del perfil infectivo observado con todos los clones ensayados, dividimos el curso de la infección en tres fases, como en Byrd *et al.* (1994), para su estudio individualizado: (a) una fase inicial que involucra factores propios del hospedador (es decir, la resistencia natural o innata) y del parásito del cual depende el *establecimiento* de la infección y su posterior *expansión*; (b) una segunda fase de *contracción* caracterizada por una marcada disminución en el número de trofozoítos debido a factores de la respuesta inmune adaptativa; y (c) una tercera fase, *crónica* o *resolutiva*, que puede desembocar en una infección persistente o en la finalización de la misma.

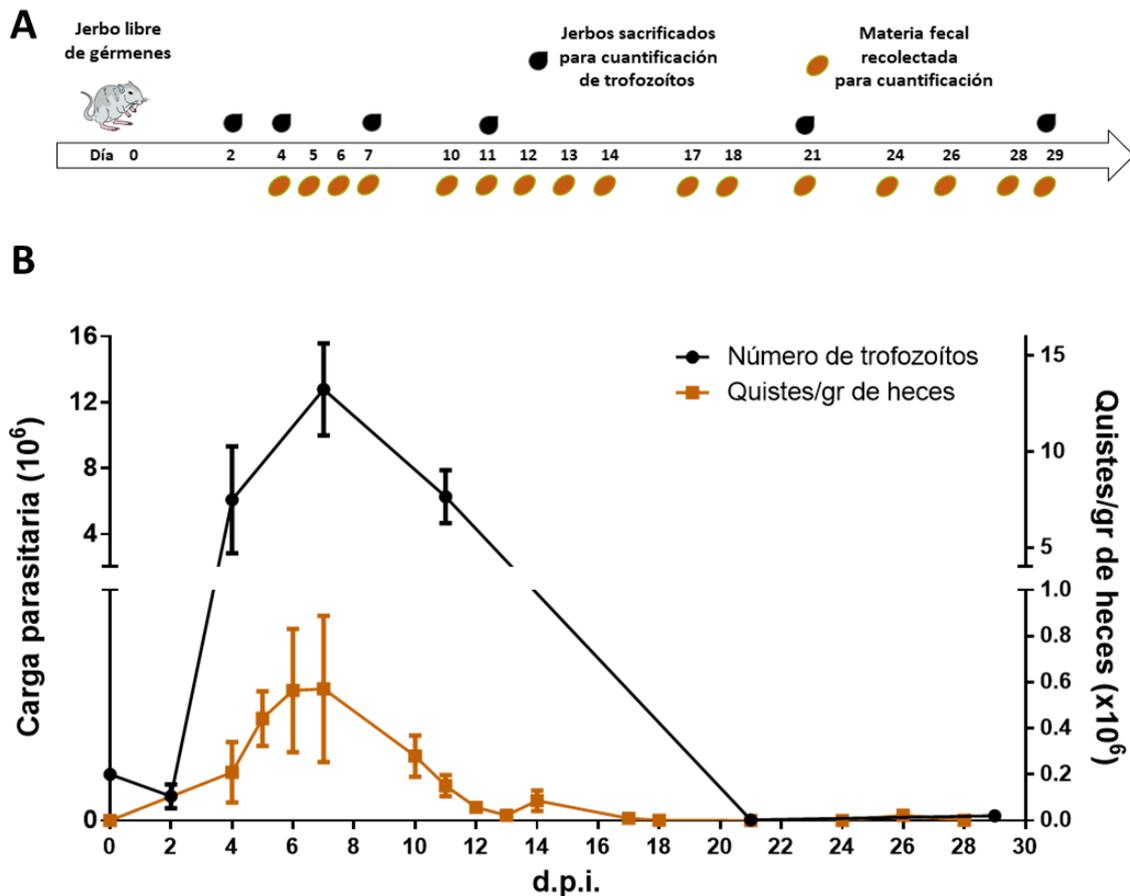


Figura 29. Esquema de infección y muestreo. Los jerbos fueron infectados con poblaciones clonales de *Giardia* y se realizó un muestreo de materia fecal y contenido intestinal para analizar presencia de quistes y trofozoítos, respectivamente (A). En la imagen inferior se puede observar un perfil típico de infección por *Giardia* independiente del clon utilizado con el jervo como modelo (B). Barra de error, SEM; n=3.

Análisis de la composición poblacional en el pico de la infección.

Una vez establecido que cualquier clon de *Giardia* es capaz de iniciar una infección en jerbos, nos propusimos evaluar la composición de la población de parásitos por medio de ensayos de IF al momento de alcanzar su pico máximo a 7 d.p.i.

Pudimos identificar dos categorías de clones: (1) Clones de Parásitos de Alta Aptitud Biológica o *Fitness* (HFPC por sus siglas en inglés, *High Fitness Parasite Clones*; Figura 30, A), los cuales expresan en su superficie una VSP que permite la selección de ésta población durante los primeros estadios de la infección y prácticamente es el único clon presente entre los trofozoítos que colonizan el intestino del hospedador; y (2)

Clones de Parásitos de Bajo Fitness (LFPC por sus siglas en inglés, *Low Fitness Parasite Clones*; Figura 30, B), los cuales tienden a desaparecer de la población infectiva original antes del día 7 p.i., siendo reemplazadas por clones que expresan una VSP no identificada, pero diferente a la original en su superficie.

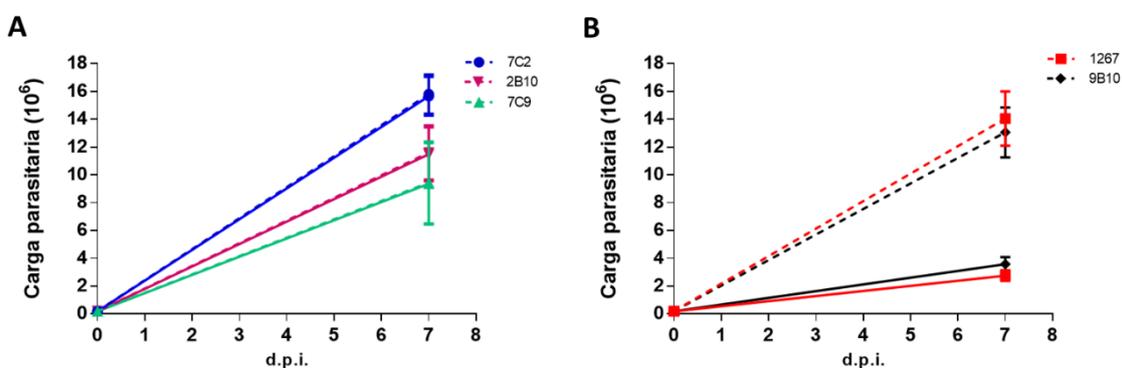


Figura 30. Las poblaciones de *Giardia* pueden clasificarse en base al tipo de clon que predomina en ellas al alcanzar el pico de la infección. Las poblaciones HFPC están constituidas por clones que representan prácticamente a la totalidad de la población a lo largo de la infección (A), mientras que las poblaciones LFPC están constituidas por clones que tienden a desaparecer de la población al avanzar la infección (B), cambiando la composición de la población que inició la infección. Las líneas discontinuas representan a la carga parasitaria total, mientras que las líneas sólidas a la carga de parásitos pertenecientes al clon que inicia la infección. Barra de error, SEM; n=3.

La primera categoría incluye a los clones TSA417, 7C9 y 2B10 (y H7 en el ensamblaje B, resultados no mostrados), los cuales representan a poblaciones de parásitos que son capaces de proliferar dentro de su hospedador sin sufrir cambios en la VSP que expresan durante el avance de la infección y antes de la aparición de la respuesta inmune adaptativa del hospedador. La segunda categoría, representada por los clones 9B10 y 1267 (y 7D5 en el ensamblaje B, resultados no mostrados), a pesar de incluir trofozoítos que no son preferidos en las condiciones impuestas por el intestino del jerbo, ya que disminuyen su representación en la población de parásitos con el avance de la infección (Figura 30 B, línea sólida), son aún capaces de iniciar una infección efectiva de la misma manera que lo hacen los parásitos pertenecientes a la categoría HFPC ya que del seno de la población surgen otros clones que son aptos para el ambiente proporcionado por su hospedador (Figura 30 B, línea discontinua).

Evaluación de la infección temprana.

Como mostramos anteriormente, cuando las infecciones son iniciadas con poblaciones de trofozoítos de tipo LFPC, al momento de alcanzar la carga parasitaria máxima dentro de su hospedador la población presenta una composición muy diferente a la que tenía el inóculo infectivo original (ver, Figura 30 B). Este cambio en la composición de la población podría deberse a la muerte diferencial de aquellos trofozoítos que expresan VSPs características de la categoría LFPC, temprano en la infección, y a la consiguiente expansión de trofozoítos que expresan VSPs propias de la categoría HFPC. Para evaluar esta posibilidad decidimos analizar en detalle la composición de la población infectiva durante las primeras 48 h post inoculación (h.p.i.) de los trofozoítos en el jerbo, debido a que este espacio de tiempo sería el más sensible para los parásitos ya que implicaría para éstos adaptarse a un nuevo ambiente (*in vitro* vs *in vivo*).

Para evaluar la posibilidad de que el éxito de los clones LFPC en producir infecciones se deba a la presencia de clones HFPC contaminantes en el inóculo infectivo

que se expandiesen luego de una selección negativa de los primeros por el hospedador, decidimos administrar a un grupo de jerbos con clones que expresan la VSP TSA417, por un lado, y a otro grupo de jerbos con clones que expresan la VSP 1267, por otro. Posteriormente, se sacrificaron animales a diferentes tiempos cortos (3, 24 y 48 h.p.i) para evaluar a la población de *Giardia* que se encuentra presente en el intestino del hospedador, tanto cuantitativamente como cualitativamente.

En el primer tiempo evaluado (3 h.p.i.), menos de un decimo de los trofozoítos inoculados lograron persistir en el intestino del jervo sin importar si se tratase de una población HFPC o de una LFPC. La marcada disminución inicial en el número de trofozoítos pudo deberse a que muchos de ellos no soportaron el cambio de ambiente (*in vitro* vs *in vivo*) o que simplemente no lograron adherirse a las células epiteliales y fueron arrastrados por los movimientos peristálticos del intestino y expulsados del organismo. Aquellos trofozoítos que lograron permanecer en el intestino del jervo mostraron una lenta adaptación a su nuevo ambiente durante las primeras 24 h.p.i., en donde el número de parásitos permaneció prácticamente invariable, para luego exhibir una importante recuperación a las 48 h.p.i., aumentando más de 10 veces el tamaño de sus poblaciones (Figura 31, A).

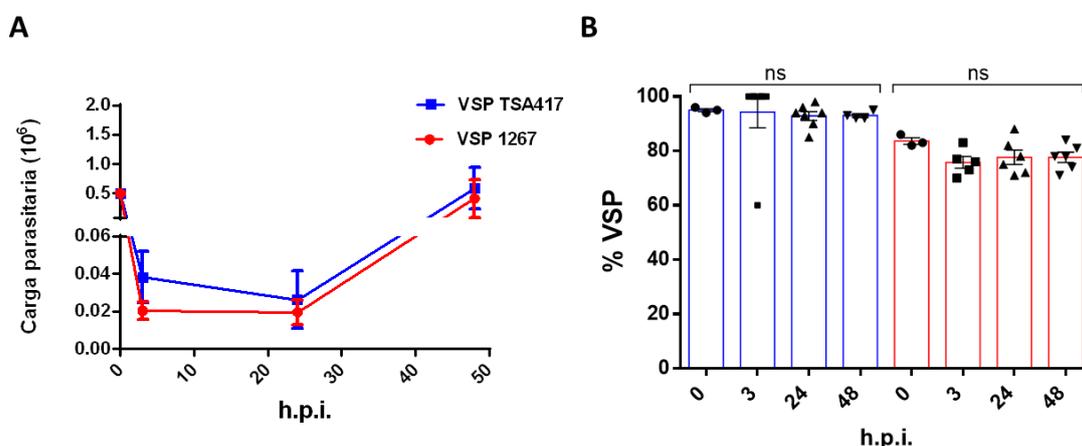


Figura 31. Las poblaciones HFPC y LFPC no muestran diferencias durante el establecimiento de la infección. Durante las primeras horas luego de la infección, tanto las poblaciones HFPC (azul) como las LFPC (rojo) se comportan de manera casi idéntica tanto cuantitativamente (A), como cualitativamente (B). Ambas poblaciones (HFPC y LFPC) son diezmaradas inicialmente, para luego recuperarse y expandirse sin que esto afecte la clonalidad de las poblaciones. Barra de error, SEM; n=6; ns, no significativo.

A pesar de observarse importantes variaciones en las poblaciones HFPC y LFPC presentes en el intestino de los jerbos durante las primeras 48 h.p.i., éstas se limitaron a ser meramente cuantitativas, ya que la composición de la población en cuanto a la clonalidad de la misma se mantuvo sin modificaciones significativas durante el tiempo considerado (Figura 31, B).

Este resultado indica que temprano en la infección ambas poblaciones son afectadas por igual ante el cambio de ambiente y que sus VSPs le aportan la misma protección al parásito frente a las condiciones impuestas por el hospedador en el espacio de tiempo considerado, tanto gástricas como intestinales, permitiéndoles iniciar una infección con la misma eficiencia.

Las poblaciones LFPC son reemplazadas gradualmente durante la fase de expansión de la población de parásitos.

El cambio en la composición de la población de parásitos del tipo LFPC que proliferan dentro del huésped no ocurre durante las primeras 48 h.p.i., sino que se da en algún momento entre las 48 h.p.i. y los 7 d.p.i. (cercano al pico de carga parasitaria), por lo que decidimos volver a evaluar la composición de la población de parásitos, pero esta vez a los 4 d.p.i. (Figura 32).

Para el día 4 p.i., podemos observar que la expansión parasitaria que se inició a las 24 h.p.i. (Figura 31), se ha consolidado luego de la adaptación al nuevo ambiente. Sin embargo, la dinámica de los clones en el seno de la población HFPC es muy diferente a la encontrada en las poblaciones LFPC. En el caso de la primera, representada por el clon TSA417, el crecimiento de la población total de parásitos (Figura 32 A, línea discontinua) es la misma que el crecimiento de la población perteneciente al clon TSA417 (Figura 32 A, línea sólida azul), es decir, la población total está representada casi exclusivamente por trofozoítos expresando la VSP TSA417 (Figura 32, azul). Mientras que, en el caso de la segunda categoría representada por el clon 1267, el crecimiento de la población de dicho clon (Figura 32 B, línea sólida roja) acompaña al crecimiento de la población total (Figura 33 2, línea discontinua), aunque con una pequeña demora, hasta que en algún momento próximo al día 4 p.i. existe un punto de inflexión a partir del cual el clon 1267 comienza a disminuir su representación en la población total hasta su virtual desaparición para cuando se alcanza la carga máxima (Figura 33 2, línea sólida).

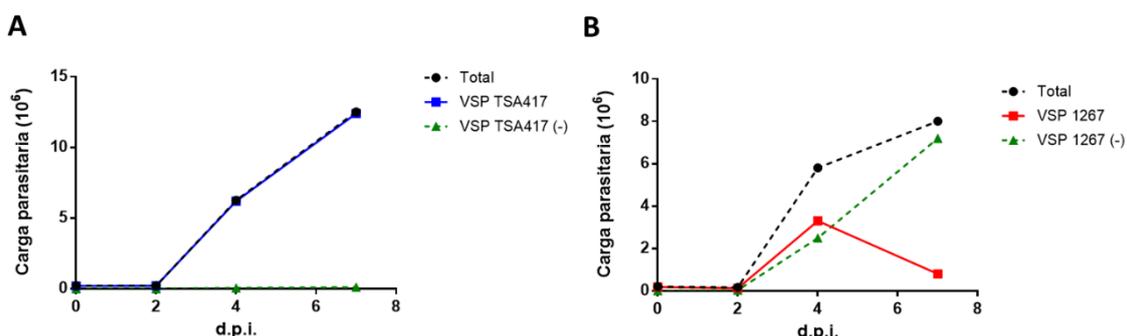


Figura 32. Dinámica de las poblaciones HFPC y LFPC durante la infección en jerbos. Las infecciones iniciadas por poblaciones HFPC no sufren cambios en su composición hasta alcanzar la carga parasitaria máxima (A), mientras que lo opuesto ocurre en aquellas infecciones iniciadas por poblaciones LFPC (B). Las líneas discontinuas representan a la carga parasitaria total, mientras que las líneas sólidas muestran la carga de parásitos pertenecientes al clon que inicia la infección. Las líneas azules, rojas, y verdes representan parásitos recubiertos por las VSPs TSA417, 1267, y por otras diferentes, respectivamente. La línea negra representa a la población total. Barra de error, SEM; n=3.

Cuando se analiza la dinámica de la población de parásitos durante infecciones realizadas con inóculos que contienen ambos tipos de clones en iguales proporciones (Figura 33), la situación se repite. El clon representante de la categoría HFPC domina la infección (Figura 33, línea azul) para el momento en el que se alcanza la carga máxima de parásitos, mientras que el clon representante de la categoría LFPC (Figura 33, línea roja) prácticamente desaparece de la población llegado ese momento.

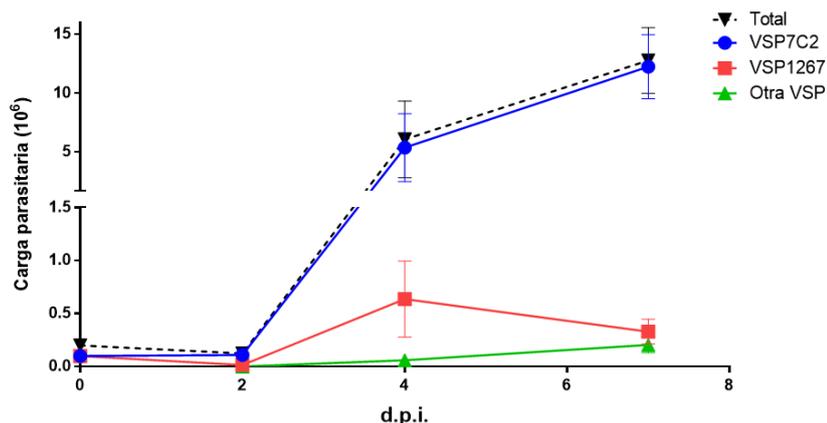


Figura 33. Infección mixta con poblaciones HFPC y LFPC. Durante las infecciones mixtas con clones que expresan las VSP TSA417 (azul) y VSP 1267 (rojo), se puede observar el papel dominante que ejerce la primera durante la fase de expansión de la infección, sin que pueda evidenciarse el surgimiento de alguna otra variante que compita con ella. Barra de error, SEM; n=3.

Una observación llamativa durante las infecciones mixtas es la ausencia de algún otro clon HFPC surgido a partir de la población LFPC, que compita con el clon TSA417 durante la expansión de la infección.

Aunque parezca improbable que ocurra un cambio preferente hacia la VSP TSA417 a partir de trofozoítos que expresan la VSP 1267 durante las infecciones *in vivo*, evaluamos esa posibilidad (Figura 34), tras lo cual pudimos comprobar que el cambio en la composición de la población LFPC durante la fase de expansión de la infección no es dirigido hacia clones que expresen la VSP TSA417. La misma situación se repitió al evaluar el clon que expresa la VSP 7D5 del aislamiento GS.

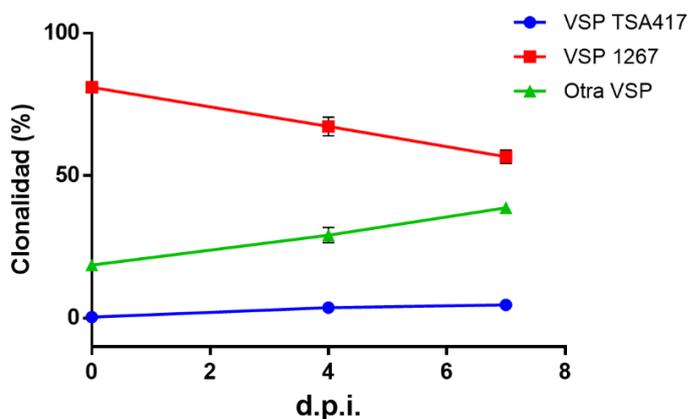


Figura 34. Infección iniciada por una población LFPC. Durante una infección iniciada por el clon VSP 1267, se puede observar que el cambio en la composición de la población infectiva no está sesgado hacia el reemplazo por clones que expresen la VSP TSA417. Barra de error, SEM; n=3.

La ausencia de clones que compitan con el clon TSA417 durante las infecciones mixtas podrían sugerir la existencia de alguna forma de coordinación entre los trofozoítos en el interior del huésped que fuese útil para limitar el repertorio de VSPs que son expuestas al huésped durante la infección aguda, o alternatively a la muerte diferencial de los clones LFPC.

La categoría HFPC está conformada por una variedad de clones de aptitud variable dentro de una misma especie hospedadora.

Luego de haber determinado que las infecciones iniciadas con inóculos compuestos por clones HFPC y LFPC terminan con el dominio de los primeros por sobre los segundos, decidimos evaluar la dinámica de una infección llevada a cabo con una mezcla de dos clones HFPC. Para esto infectamos jerbos con inóculos compuestos por una mezcla de clones TSA417 y 7C9 en una relación de aproximadamente 1:1. El resultado que obtuvimos luego de analizar la composición de las poblaciones infectivas el día 7 p.i., cuando la población de parásitos se encuentra cerca de su carga máxima, fue inesperado. A pesar de que ambos clones son capaces de dominar fácilmente las infecciones cuando son inoculados individualmente, o en combinación con clones LFPC; al inocular una mezcla de dos clones HFPC, el dominio de la infección por uno u otro se volvió muy variable (Tabla 4). En algunos animales infectados (Tabla 4, animales 3 y 4) se observó el resultado esperado, es decir la presencia de ambos clones en proporciones similares, mientras que en otros animales se observó el dominio de uno u otro clon (Tabla 4, animales 1 y 2), o incluso la subrepresentación de ambos (Tabla 4, animal 5).

Esta variabilidad en el comportamiento de clones aptos para el jervo demuestra que es difícil asignar clones a una u otra categoría incluso dentro de una misma especie hospedadora, y que la diversidad de secuencia entre VSPs podría brindarles aptitudes para cubrir un amplio rango de hospedadores o de ambientes variables dentro del mismo hospedador. Una alternativa podría implicar que las VSPs no son las únicas proteínas de superficie responsables del *fitness* del parásito durante las infecciones, un candidato alternativo a estudiar en un futuro son las HCMPs las cuales han sido reportadas recientemente como proteínas que localizan en membrana plasmática (Peirasmaki *et al.*, 2020).

Tabla 4. Composición de poblaciones mixtas HFPC a los 7 d.p.i.

Clon	Inóculo	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5
TSA417	48,5 %	16 %	99 %	49 %	45 %	14 %
7C9	46,5 %	74 %	0 %	32 %	49 %	3 %
No identificado	5 %	10 %	1 %	19 %	6 %	83 %
Total	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

La desaparición de los parásitos de tipo LFPC en el curso de la infección no puede ser explicada por una VA celular inducida por algún factor del huésped en la fase de expansión.

Parece claro que existe algún factor que lleva a que los parásitos pertenecientes a la categoría LFPC sean reemplazados por otros más aptos para el ambiente aportado por el huésped. Consideramos que tres posibilidades podrían explicar este cambio en la composición de la población de parásitos que se encuentra en plena expansión: (1) que existan factores que comienzan a ser liberados por el huésped en respuesta a un aumento en la carga de parásitos y que provocan una *muerte diferencial* de un tipo de clon con respecto al otro, (2) que alguno de estos factores sean responsables de inducir el recambio de una VSP por otra en los trofozoítos (*variación antigénica celular*) o, (3) que exista una *disminución de la tasa de duplicación* de los trofozoítos portadores de VSPs características de la categoría LFPC.

Con el objeto de intentar distinguir entre las diferentes posibilidades que pudiesen explicar la razón detrás del cambio que ocurre en la composición de la población

infectiva en su fase de expansión y que conduce a la virtual desaparición de los parásitos LFPC, decidimos evaluar si era posible encontrar células que estuviesen coexpresando dos VSPs en simultáneo como evidencia de una VA celular.

Para esto se realizó un muestreo de los parásitos en el intestino del jerbo durante los días 4, 5, y 6 p.i., debido a que en esta ventana de tiempo se observa una disminución continua de los parásitos de tipo LFPC. Los parásitos recuperados fueron teñidos vivos con el suero policlonal anti-1267(-), que reconoce a una gran cantidad de VSPs excepto a la VSP 1267, y con el mAb 7F5. Si existiese algún factor del hospedador que estuviese induciendo VA de los parásitos del clon VSP 1267 en esta fase de la infección, se esperaría encontrar una proporción alta de parásitos que fuesen reconocidos por ambos anticuerpos.

Tras analizar a los parásitos recuperados en los puntos muestreados no pudimos encontrar un porcentaje alto de parásitos que expresen dos VSPs en simultáneo (Figura 35 A y B), poniendo en duda la existencia de factores tempranos que induzcan VA celular. Por lo tanto, en esta fase de la infección, una muerte diferencial de los clones 1267 es la opción que mejor explica el cambio observado en la población de parásitos.

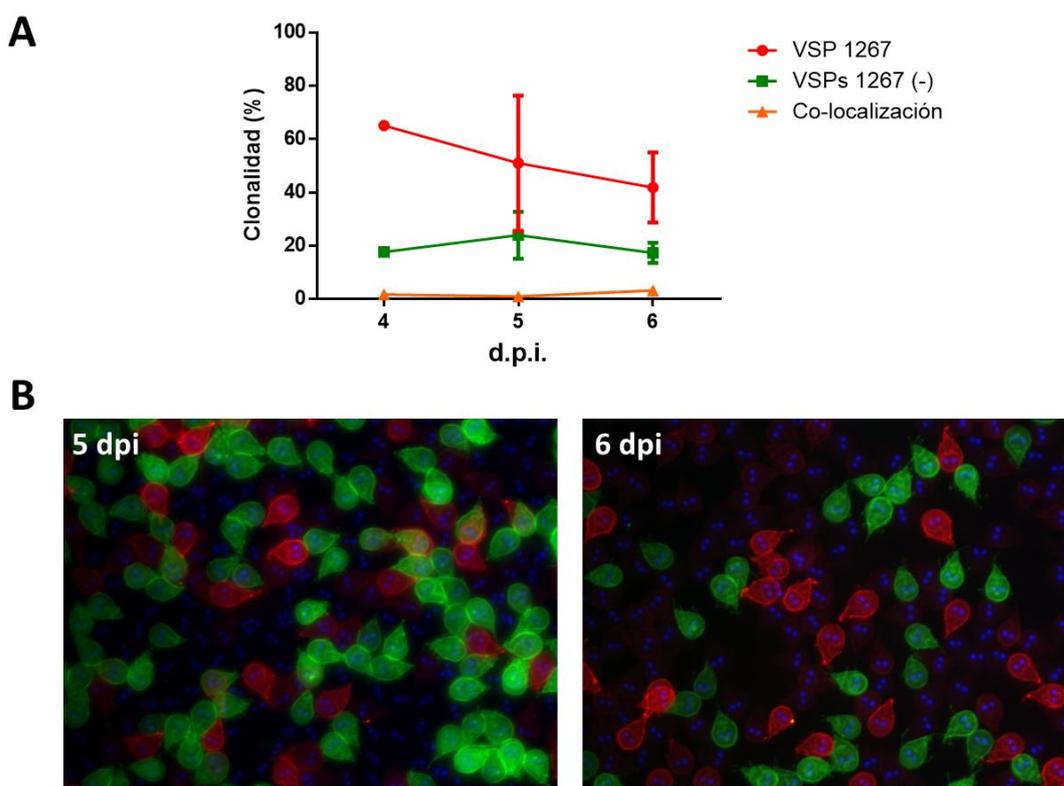


Figura 35. Análisis de co-expresión de VSPs en infecciones iniciadas por clones VSP 1267 durante la fase de expansión. Trofozoítos recuperados del intestino de jerbos durante la fase de expansión de la infección fueron marcados vivos con el pAb 1267 (-) (verde) y con el mAb 7F5 (rojo) y analizados por citometría. No se pudo observar una coexpresión de VSPs trofozoítos 1267, por citometría (A) o ensayos de IF (B) que pudiese demostrar la existencia de un estímulo de variación antigénica diferencial sobre poblaciones LFPC.

FASE DE CONTRACCIÓN.

La producción de anticuerpos *anti-VSP* provoca una marcada disminución de la población de parásitos.

Habiendo definido que tanto los clones HFPC como así también los clones LFPC son capaces de establecer una infección, pero que solamente son los clones HFPC son quienes terminan dominando la misma cuando la población de parásitos alcanza su carga máxima en el interior del huésped, decidimos continuar con la caracterización de la dinámica de la infección en los días subsiguientes.

Como fue previamente reportado, la aparición y aumento gradual de anticuerpos *anti-Giardia* en las secreciones intestinales del hospedador coincide con el pico de la infección (Serradell *et al.*, 2018), lo cual conduce a una gradual eliminación de los parásitos hasta su virtual erradicación pasados entre 21-28 d.p.i. (Figura 29 B). Estos anticuerpos generados por el huésped contra los parásitos desencadenan el proceso de VA en los trofozoítos de *Giardia* en el interior de este, lo cual se puede evidenciar en un análisis por citometría realizado sobre los trofozoítos del clon que expresa la VSP TSA417 recuperados del intestino de jerbos durante los días de mayor carga parasitaria (Figura 36 A). Dicho análisis fue realizado por medio de una doble marcación de los trofozoítos con el mAb 7C2 (anti VSP TSA417) y con el pAb TSA417(-) que reconoce varias VSPs menos a la VSP TSA417. El estudio por microscopía electrónica de los trofozoítos en el día 12 p.i., el cual se corresponde con una respuesta masiva de VA por parte de la población de parásitos a la presencia de anticuerpos (Figura 37 A), permite observar a los mismos liberando cantidades importantes de microvesículas (MVs) (Figura 36 B-E) como un mecanismo adicional de evasión de la respuesta inmune, lo cual se demostró es una respuesta típica por parte *Giardia* al enfrentarse con anticuerpos *in vitro* (Tenaglia A., Tesis Doctoral 2020).

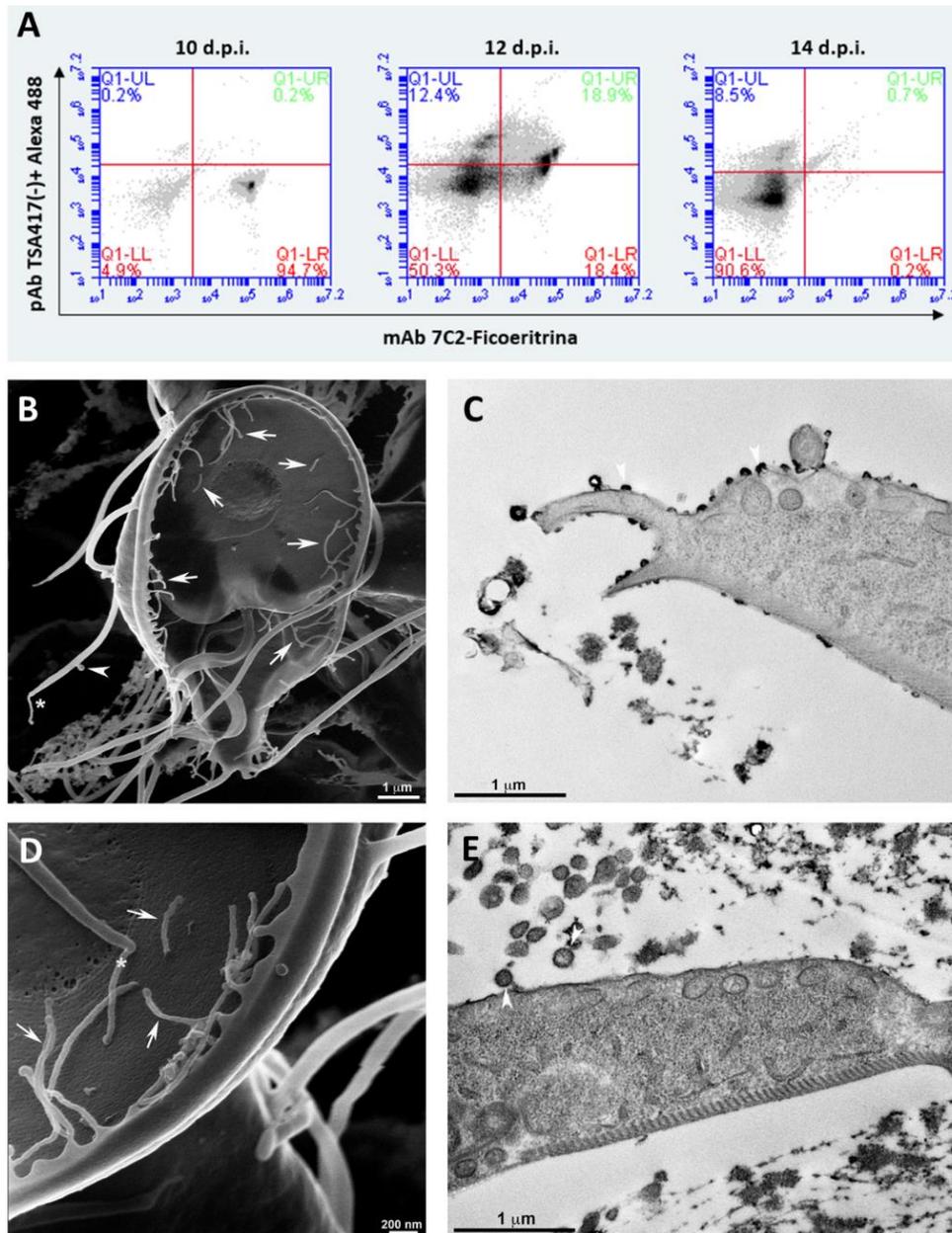


Figura 36. Los anticuerpos generados por el hospedador inducen VA y liberación de MVs en los trofozoítos de *Giardia*. Análisis de la población de trofozoítos presentes en el intestino de jerbos infectados con el clon TSA417 (HFPC) durante la respuesta inmune humoral. El estudio por citometría de los trofozoítos recuperados del intestino del jervo mediante el uso del mAb 7C2 que reconoce al clon TSA417 (HFPC) y del pAb TSA417 (-), evidencia la VA que experimenta la población al día 12 p.i. (A). Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) (B y D) y de microscopía electrónica de transmisión (TEM) (C y E) de trofozoítos sin marcar al día 12 p.i., muestran la aparición de MVs así como fue visto *in vitro* como respuesta a la presencia de anticuerpos anti-VSP, como fue reportado por Tenaglia A. (Tesis Doctoral 2020). Se pueden observar extensas proyecciones de membrana (nanotubos) emergiendo de los laterales de los trofozoítos (flechas), MVs gemando de la membrana plasmática (punta de flecha) y proyecciones de membrana emergiendo de los flagelos (asterisco).

Como se mencionó anteriormente (ver página 61, “Las poblaciones LFPC son reemplazadas gradualmente durante la fase de expansión de la población de parásitos”), al momento en que la infección alcanza su carga máxima de parásitos, tanto en las infecciones iniciadas con el clon TSA417 (HFPC) o con mezclas del clon TSA417 (HFPC) y 1267 (LFPC) (Figura 37 A y C, respectivamente), las mismas terminan siendo dominadas por el clon perteneciente a la categoría HFPC inicial, sin competencia de

otros. Por otro lado, en las infecciones iniciadas con el clon 1267 (LFPC) es de suponer, que la población existente en el pico de la infección podría estar compuesta por una por una mezcla heterogénea de clones (Figura 37 B y C, línea verde), lo cual parece ser ventajoso para la población de parásitos debido al retraso en la eliminación de la infección que puede observarse en la Figura 37 B.

Este retraso en la eliminación de la infección podría deberse a que al sistema inmune del hospedador le resulta más fácil eliminar a una población de parásitos representada por un único clon que a una compuesta por una mezcla de ellos. Esta observación plantea la posibilidad de que la VA desencadenada por *Giardia* si bien no logra generar oleadas de infección, si le otorga a la especie una ventaja al brindarle la posibilidad de prolongar la infección, aunque sea por un corto periodo de tiempo. Para un organismo como *Giardia* que no requiere de hospedadores intermediarios para completar su ciclo de vida, este pequeño retraso en la eliminación de la infección por parte del hospedador supondría un aumento en su eficacia biológica al prolongar el tiempo en el que el hospedador es un potencial agente infeccioso.

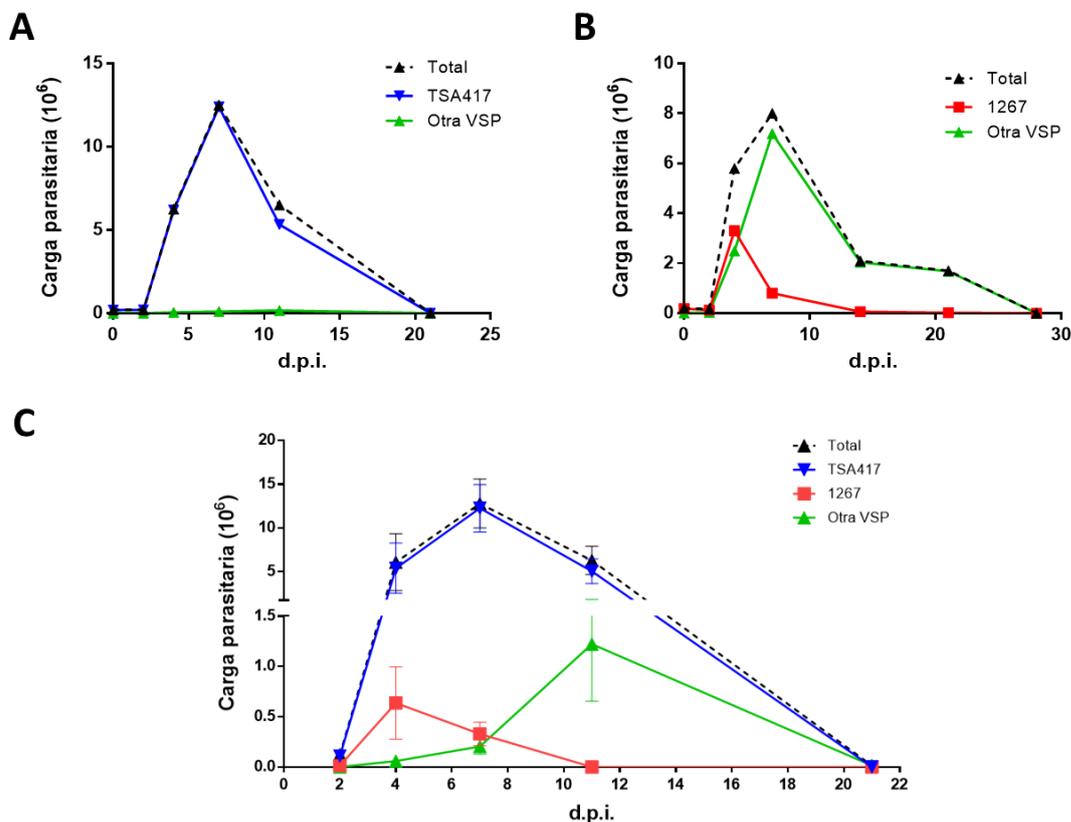


Figura 37. Seguimiento de la dinámica infectiva de poblaciones HFPC, LFPC, o mezclas de ambas. Durante las infecciones iniciadas por poblaciones HFPC, durante gran parte de la infección el clon infectivo es predominante por sobre cualquier otro clon (A, línea azul). En el caso de infecciones iniciadas por poblaciones LFPC, el clon infectivo inicial es mayoritario por sobre los otros clones presentes solo durante un corto tiempo (~4 d.p.i.), para luego disminuir bruscamente su representación en la población infectiva y prácticamente desaparecer pocos días después (B, línea roja). En las infecciones con poblaciones mixtas, la dinámica es similar, con la prevalencia de trofozoítos HFPC durante todo el curso de la infección (C, línea azul) y la pronta desaparición de los representantes LFPC (C, línea roja). Las líneas discontinuas representan a la carga parasitaria total, mientras que las líneas sólidas a la carga de parásitos pertenecientes al clon que inicia la infección. Barra de error, SEM; n=3.

FASE DE RESOLUCIÓN O CRONICIDAD.

La tercera fase se caracteriza tanto por la eliminación de la infección como por la cronicidad de esta en algunos individuos. Durante los experimentos que implicaron la infección de jerbos durante el desarrollo de este trabajo de tesis, se pudieron observar jerbos que lograron resolver definitivamente la infección, lo cual fue definido por la ausencia de trofozoítos luego de analizar el contenido intestinal de los mismos cuando el animal ya llevaba varios días sin liberar quistes por materia fecal. De la misma manera, se pudieron detectar jerbos que presentaban una infección crónica cuando al analizar su contenido intestinal se encontraban trofozoítos, más allá de que el animal llevase varios días sin liberar quistes por materia fecal, muy probablemente por estar por debajo del umbral de detección de la metodología usada (cámara de Neubauer).

Las infecciones crónicas detectadas durante el tiempo que duraron los experimentos nunca evidenciaron segundas oleadas masivas de trofozoítos en el intestino (Figura 29 B), al menos durante el tiempo que duraron los experimentos de infección de jerbos. Sin embargo, parecería ser evidente que bajo las condiciones adecuadas (estado nutricional o inmunológico del hospedador) el parásito es capaz de persistir en el hospedador en bajo número (quistes indetectables) y sin provocar signos de la enfermedad (diarrea).

CAPÍTULO 5

Discusión

Las complejas relaciones entre los organismos infecciosos y sus hospedadores a menudo son el reflejo del continuo esfuerzo por parte del patógeno por proliferar y esparcirse a nuevos hospedadores, y de la necesidad de los individuos infectados de controlar y potencialmente erradicar la población infectiva (Deitsch *et al*, 2009). Los patógenos deben evitar ser eliminados para poder colonizar su nicho, para lo cual deben evitar ser reconocidos por el sistema inmune a través del uso de moléculas de superficie hipervariables que les permitan multiplicarse sin ser detectados (al menos temporalmente) o, una vez reconocidos, deben ser capaces de evitar su destrucción durante las respuestas inmunes innatas o adaptativas (Deitsch *et al*, 2009). Una de tales estrategias es la variación antigénica (VA), es decir la capacidad del patógeno de alterar de manera sistemática las proteínas desplegadas ante el sistema inmune del hospedador, de manera que este sea confrontado con una población continuamente cambiante que es difícil o imposible de eliminar (Deitsch *et al*, 2009).

Giardia lamblia sufre VA tanto *in vitro* como *in vivo*, y se cree que utiliza tal mecanismo para (i) confrontar el ambiente hostil que le proporciona la porción superior del intestino delgado, (ii) diversificarse para poder infectar un amplio rango de hospedadores, y (iii) evadir la respuesta inmune del hospedador. Este proceso le permite cambiar continuamente sus antígenos de superficie (VSPs), los cuales son altamente inmunogénicos.

Desde el descubrimiento de la VA en *Giardia*, como un fenómeno que ocurría *in vitro* y verificado posteriormente *in vivo* tanto en humanos como en animales de experimentación, los estudios sobre este parásito avanzaron bajo el paradigma de que el hospedador era capaz de seleccionar temprano en la infección a aquellas variantes aptas para proliferar en su interior por medio de mecanismos no inmunes (Nash *et al.*, 1988; Nash, 1997), y que más tarde la inmunidad humoral se encargaba de arrasar con las variantes que habían logrado establecer la infección mediante un efecto citotóxico de los anticuerpos sin que fuese necesario ningún otro mecanismo efector adicional más que la unión de estos con su antígeno (VSP) (Singer, 2016; Singer & Nash, 2000; Gottstein & Nash, 1991). En el presente trabajo de tesis nos propusimos a estudiar cómo las VSPs características de los diversos clones de *Giardia* son capaces de brindarles a los parásitos que las portan, diferentes niveles de protección frente a su medioambiente, moldeando la composición de la población de *Giardia* tanto *in vitro* como *in vivo*. Para los ensayos *in vitro*, se utilizaron diferentes agentes de estrés con el objeto de simular las condiciones aportadas por el huésped, mientras que para los ensayos *in vivo* se utilizó al jerbo (*Meriones unguiculatus*) como modelo animal debido a sus bondades para la infección con *Giardia* (Serradell *et al.*, 2018), las cuales fueron realizadas por medio de un sistema artificial de inoculación orogástrica, debido a que el mismo nos permite controlar la composición de la población infectiva de parásitos en cuanto a la VSP que expresa, lo cual sería imposible de lograr mediante el uso de quistes.

En nuestro grupo de trabajo se pudo demostrar en el pasado, mediante abordajes poblacionales (Torri A., Tesis Doctoral 2016), que los anticuerpos anti-VSPs no tienen efecto citotóxico sobre los clones de *Giardia* que reconocen. Sin embargo, el abordaje de poblaciones clonales genera dudas acerca de su validez debido a la posibilidad de la existencia de parásitos que expresen una VSP diferente dentro de la población que sean capaces de expandirse luego de la eliminación de los trofozoítos contactados por el anticuerpo, hecho que adquiere relevancia por la existencia de clones que presentan una frecuencia elevada en recambiar su VSP por otra antigénicamente diferente de manera espontánea en condiciones normales de cultivo. Esto nos llevó a abordar el problema de la citotoxicidad mediada por anticuerpos a nivel de células individuales (*single cell*). Dicho abordaje nos permitió reafirmar la ausencia de efecto citotóxico de los anticuerpos sobre los trofozoítos de *Giardia*, y además demostrar que los anticuerpos anti-VSP tienen la capacidad de inducir VA en los parásitos que reconocen, los cuales a su vez responden a la presencia de estos eliminándolos a través

de MVs (Tenaglia A., Tesis Doctoral 2020). También se presenta el hallazgo de que en el seno de una población de parásitos pueden surgir trofozoítos capaces de generar poblaciones con diferentes tasas de duplicación (estándar, subestándar y lenta) independientemente de la VSP que expresan, lo cual podría significar un novedoso factor de virulencia en este parásito.

Al profundizar sobre el mecanismo por el cual los anticuerpos podrían inducir VA en los trofozoítos, pudimos definir que la agregación de las VSPs en la superficie del parásito parecería ser un requisito importante para inducir dicho fenómeno, ya que los fragmentos Fab de los anticuerpos si bien son capaces de desencadenar la VA lo hacen con menor eficiencia que los fragmentos $F(ab)_2$ o que el anticuerpo entero. Esta menor eficacia en disparar la VA pudo ser revertida si se les devuelve a los fragmentos Fab la capacidad entrecruzante mediante el uso de un anticuerpo secundario. Cuando indagamos más en la capacidad inductora de VA del fragmento Fab, se pudo determinar que los mismos eran capaces de provocar una desestabilización en la estructura nativa de las VSPs ya que estas se volvían sensibles a la digestión enzimática con tripsina si eran incubadas previamente con el fragmento Fab del anticuerpo. La desestabilización en la estructura de las VSP probablemente podría exponer regiones de la proteína que normalmente se encuentran ocultas del medio y posteriormente llevado a la agregación de estas por efecto hidrofóbico, aunque dicha hipótesis aún debe ser puesta a prueba. Alternativamente, existe la posibilidad de que las VSPs sean proteínas que poseen una propensión natural a la agregación que depende de las características únicas de cada una de ellas (Weids *et al.*, 2016), lo cual también podría explicar la existencia de clones con diferentes frecuencias de VA en *Giardia*.

Nuestros hallazgos hasta este punto nos permitieron esclarecer la capacidad que tiene *Giardia* para responder ante la presencia de anticuerpos cambiando su antígeno de superficie. Sin embargo, la VA en este parásito también ocurre temprano en la infección antes de que una respuesta de anticuerpos por parte del huésped sea evidente, por lo que para abordar este tema decidimos imitar las condiciones con las cuales el parásito podría encontrarse en el interior del hospedador y que podrían desestabilizar la estructura de sus VSPs conduciendo probablemente a la agregación de estas. Para esto se enfrentaron diferentes clones de *Giardia* a la acción de factores de estrés tales como agentes reductores y oxidantes, agentes quelantes de metales y variaciones de pH. Aunque todos ellos tienen la potencialidad de producir disturbios en la estructura de la VSP (Serradell *et al.*, 2018), pudimos determinar que es necesario una exposición prolongada a los mismos para poder notar un efecto inductor de VA, como fue el caso del tratamiento de los parásitos del clon 1267 a un ambiente de pH extremo (pH 3). Este efecto desestabilizante de las VSPs por estrés, sin embargo, no tuvo el mismo impacto sobre los parásitos cuando se utilizó el clon TSA417. La mayor propensión a la desestabilización la presentó el clon 1267, mientras que el clon TSA417 exhibió mayor resistencia a los mismos. Estos resultados nuevamente nos dan la pauta para pensar que la frecuencia de VA espontánea exhibida por el clon 1267 en realidad podría indicar una mayor propensión de sus VSPs a la desestabilización de su estructura y quizá auto agregación, y que ciertos factores de estrés simplemente aceleran este proceso (Weids *et al.*, 2016). Si bien las VSPs de los clones TSA417 también podrían ser propensas a la desestabilización por factores del medio, su mayor resistencia estructural ante disturbios generados por factores externos prolongaría su expresión en la superficie del parásito. Debido a la enorme dificultad para cristalizar VSPs, para confirmar esta hipótesis se requerirán en el futuro estudios dirigidos a modelar *in silico* la estructura de las VSPs propias de clones de elevada frecuencia de VA y compararlas con aquellos de baja frecuencia.

Debido a que los anticuerpos anti-VSPs son un estímulo altamente reproducible capaz de inducir VA en los trofozoítos de *Giardia*, nos propusimos a evaluar si las VSPs pudieran estar funcionando como un receptor de membrana capaz de transducir la señal

y conducir a la expresión de una nueva VSP diferente a la original, reseteando el sistema de ARNi del parásito responsable de seleccionar la VSP que se expresa en superficie (Prucca *et al.*, 2008). Para lo cual seleccionamos al dominio citoplasmático CRGKA por ser una de las regiones más conservadas de estas proteínas. Para esto, realizamos mutaciones en el dominio CRGKA de la VSP H7 (aislamiento GS) con el objeto de utilizarla como proteína receptora del estímulo de anticuerpos una vez sobre expresada en un clon del aislamiento WB cuya expresión de VSP en la superficie del parásito fue evaluada como reportera del estímulo receptado por la VSP H7. La introducción de diferentes mutaciones en este dominio citoplasmático nos permitió determinar: (1) que la correcta localización en superficie de la proteína requiere de una extensión intracelular polar, ya que proteínas carentes del dominio (553_557 de CRGKA), o aquellos variantes mutantes en las que se lo cambio por un dominio neutro (CRGKA553_557AAAA) fallaron en localizar en superficie; (2) que la conversión del residuo de arginina, presente en este dominio, en un aminoácido neutro podría tener una función durante la VA en *Giardia* ya que aquellos parásitos que expresan VSPs en donde se cambió la arginina por una alanina (A>R) exhibieron una mayor velocidad de VA en ausencia de algún estímulo evidente, pero que sin embargo, no tiene influencia sobre la VA inducida por anticuerpos; (3) que tanto el residuo de Lisina como el de Cisteína no tienen implicancia en el proceso de VA inducida por anticuerpos ya que sus reemplazos no interfieren con dicho fenómeno, pero que probablemente la Cisteína juegue un papel en generar las plataformas necesarias para la correcta eliminación de la VSP original, ya que si bien durante su reemplazo el proceso de VA se llevó a cabo de manera significativa en presencia de anticuerpos, este se vio considerablemente enlentecido. Por lo tanto, parece claro que el dominio citoplasmático CRGKA puede ser necesario para la eficiente eliminación de la VSP original y su posterior recambio por una nueva luego de la inducción de VA por el anticuerpo, más que estar involucrado directamente en una señal capaz de resetear el sistema que controla la expresión de las VSPs. Parece lógico pensar a la luz de estos resultados, que el proceso de VA inducido por anticuerpos es complejo, y que requiere de una maquinaria capaz de llevar a cabo el intercambio de la VSP original por una nueva, que es independiente de la señal responsable de dirigir el cambio antigénico de la VSP que se va a expresar en superficie. Probablemente la constante pérdida de membrana requerida para eliminar a la VSP original en MVs luego del contacto con el anticuerpo sea responsable de provocar una disminución en los niveles energéticos del parásito, y que sea este desbalance energético lo que conduce a modificaciones transcripcionales y/o epigenéticos capaces inducir el cambio de la VSP original por otra antigénicamente diferente (Gargantini *et al.*, 2016).

Rol de las VSPs en la dinámica infectiva de las poblaciones de *Giardia* en jerbos.

El estudio de las infecciones seguidas por diferentes clones de *Giardia* en animales de experimentación y humanos, ha llevado en el pasado a la distinción entre clones aptos y no aptos para prosperar en el interior de su huésped (Nash *et al.*, 1991; Aggarwal & Nash, 1988). Como clones aptos fueron considerados aquellos que se enriquecían en la población de parásitos en el transcurso de la infección, mientras que los no aptos eran aquellos que tendían a desaparecer de la población para el mismo momento. La aptitud diferencial de los clones fue atribuida a las capacidades protectivas diferenciales que le brindan las VSPs a los trofozoítos en el ambiente hostil del intestino del huésped, siendo el clon H7 del aislamiento GS, y el clon TSA417 del aislamiento WB ejemplos de clones que exhiben buena aptitud durante las infecciones.

Cuando analizamos el comportamiento de nuestros clones durante la infección en jerbos, pudimos clasificarlos en HFPC y LFPC, en base a su capacidad para persistir o no como la población infectiva con el transcurso de la infección, respectivamente.

Curiosamente, esta clasificación en clones HFPC y LFPC resultó coincidente con la clasificación de clones de baja y elevada frecuencia de VA espontánea en cultivo *in vitro*. Mediante el análisis de las diferentes infecciones realizadas pudimos determinar que, durante la fase de establecimiento de la infección, correspondiente a las primeras 24 h.p.i., las poblaciones de ambos clones no proliferan ni sufren cambios en su clonalidad. La falta de proliferación de la población probablemente se deba a la adaptación de estas a las nuevas condiciones brindadas por el cambio de ambiente, mientras que la ausencia de cambios en su clonalidad demuestra que al menos durante esta fase, ambos tipos de clones son igualmente resistentes a los mecanismos de defensa del hospedador. Es en la fase de expansión de la población de parásitos donde se hace evidente la diferencia entre los clones aptos (HFPC) y los clones no aptos (LFPC), ya que los primeros no ven afectada su clonalidad a medida que la población crece, mientras que los segundos inician un declive en su representatividad dentro de la población hasta su completo reemplazo por clones diferentes, incluso antes de la aparición de una respuesta de anticuerpos. Esta diferencia entre ambos tipos de clones podría ser explicada por dos mecanismos actuando en concierto: (1) La diferencia inherente en la estabilidad de las VSPs de uno u otro tipo de clon podría conducirlos a su agregación y estimular así la VA más velozmente en los clones LFPC, y (2) los mecanismos de estrés inducidos por el hospedador (H_2O_2 , quelantes de metales, fluctuaciones de pH) podrían no solo aumentar la desestabilización y consecuente agregación de las mismas en los clones susceptibles (Weids *et al.*, 2016), sino además provocar la muerte de estos al volverlos sensibles a las proteasas intestinales. El hecho de que las infecciones conjuntas con clones LFPC y HFPC, culminen con la desaparición de los primeros de la población infectiva, también puede ser explicado por el mecanismo anterior. Es muy interesante que, durante las infecciones mixtas realizadas, no haya surgido ningún clon HFPC a partir de la población LFPC que sea capaz de competir con el dominio que tiene el clon HFPC que dio inicio a la infección. Esta falta de diversidad cuando un clon HFPC se hace dominante en la infección podría ocultar una estrategia del parásito para no exponer variantes al sistema inmune del hospedador y así asegurarse el éxito en reinfecciones. Sin embargo, para que una estrategia de este tipo tenga lugar es un requisito fundamental la comunicación entre los parásitos para así poder coordinar que VSP expresen en su superficie. Es tentador pensar en las vesículas extracelulares como mensajeros entre trofozoítos ya que es un mecanismo utilizado para este fin en algunos protozoos parásitos (Coakley *et al.*, 2015), y la capacidad de producir estructuras de este tipo como mecanismo de defensa ha sido confirmado por nuestro grupo (Tenaglia A., Tesis Doctoral 2020).

Las poblaciones de parásitos que son capaces de alcanzar el pico de infección se encuentran representadas casi exclusivamente por clones del tipo HFPC cuyas VSPs fueron capaces de resistir la desestabilización estructural por los factores de estrés del huésped, y a la muerte en caso de no haber cambiado a tiempo su VSP de superficie. El tiempo al cual la población de parásitos alcanza su carga máxima es casual, ya que coincide con la aparición de anticuerpos en las secreciones intestinales. A pesar de que *Giardia* es capaz de responder ante la presencia de anticuerpos en su entorno mediante la activación de la VA por efecto de los mismos, y que dicho fenómeno se ve precedido por la liberación de MVs arrastrando consigo los anticuerpos que se unieron al parásito como mecanismo de defensa (Tenaglia A., Tesis Doctoral 2020), la inminente eliminación de los trofozoítos tiene lugar. La incapacidad de la población de parásitos en evadir la respuesta humoral del hospedador y generar nuevas oleadas de infección, podría tener varias explicaciones: (1) la similitud estructural entre VSPs podría conducir a que un anticuerpo reconozca a más de una VSP, lo cual reduciría el repertorio efectivo de VSPs con el que cuenta la población; (2) la asincronía que muestran los parásitos dentro de una población para sufrir VA (Tenaglia A., Tesis Doctoral 2020), haría que aquellos que no sean lo suficientemente rápidos como para cambiar su VSP por otra antigénicamente diferente puedan ser eliminados por la peristalsis intestinal luego de

que los anticuerpos hayan inhibido su adherencia al epitelio intestinal seguido por la agregación de parásitos en masas; (3) estos mismos parásitos que responden lentamente a recambiar su VSP de superficie podrían también ser eliminados por mecanismos efectores dependientes de anticuerpos (complemento por ejemplo).

Finalmente, el hallazgo de poblaciones de *Giardia* que presentan tasas de crecimiento lentas en cultivo independientemente de la VSP que expresan las convierten en variantes con potencial para mantenerse bajo el umbral de detección del sistema inmune luego de que la población infectiva haya sido eliminada, convirtiendo al hospedador en un reservorio con potencial infectivo por más tiempo.

Comentarios finales.

- Las VSPs que recubren al parásito no solamente son capaces de protegerlo frente a las condiciones hostiles del intestino del huésped, sino que su comportamiento frente a los estímulos del ambiente le permitiría a *Giardia* tener la oportunidad de responder a estos mediante cambios (VA) que le permitan sobrevivir.
- El hecho de que los clones que pertenecen a la categoría HFPC resulten ser los mismos que presentan baja frecuencia de VA, y los de la categoría LFPC sean los mismos que presentan alta tasa de VA, y que esto parece estar relacionado con la estabilidad de las VSPs, podría sugerir que el fenómeno de VA es un proceso inducido por el ambiente, más que uno espontáneo.
- La existencia de parásitos con tasas de VA tan diferentes podrían proporcionar a la especie una estrategia dual para tener éxito en las infecciones. Por un lado, diversificarse rápidamente por medio de las poblaciones LFPC y por otro, expandirse eficazmente mediante las poblaciones HFPC.
- Aunque *Giardia* es capaz de responder a la presencia de los anticuerpos generados por el sistema inmune del hospedador por medio de la VA de sus antígenos de superficie, y de desprenderse de los anticuerpos unidos a sus VSPs por medio de la liberación de MVs al medio, no es capaz de generar posteriores oleadas de parásitos que expresen VSPs antigénicamente diferentes. Por lo que el mecanismo de VA parece estar adaptado a asegurar el éxito de las infecciones adecuando la población al ambiente que encuentra luego de invadir a un hospedador, más que para evadir la respuesta inmune humoral desencadenada por este.

CAPÍTULO 6

Bibliografía

- Adam R. D. (2000).** The Giardia lamblia genome. *International journal for parasitology*, 30(4), 475–484. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(99\)00191-5](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00191-5)
- Adam R. D. (2001).** Biology of Giardia lamblia. *Clinical microbiology reviews*, 14(3), 447–475. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.447-475.2001>
- Aggarwal, A., & Nash, T. E. (1987).** Comparison of two antigenically distinct Giardia lamblia isolates in gerbils. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 36(2), 325–332. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1987.36.325>
- Aggarwal, A., & Nash, T. E. (1988).** Antigenic variation of Giardia lamblia in vivo. *Infection and immunity*, 56(6), 1420–1423. <https://doi.org/10.1128/IAI.56.6.1420-1423.1988>
- Andersen, Y. S., Gillin, F. D., & Eckmann, L. (2006).** Adaptive immunity-dependent intestinal hypermotility contributes to host defense against Giardia spp. *Infection and immunity*, 74(4), 2473–2476. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.4.2473-2476.2006>
- Ankarklev, J., Franzén, O., Peirasmaki, D., Jerlström-Hultqvist, J., Lebbad, M., Andersson, J., Andersson, B., & Svärd, S. G. (2015).** Comparative genomic analyses of freshly isolated Giardia intestinalis assemblage A isolates. *BMC genomics*, 16(1), 697. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1893-6>
- Bartelt, L. A., & Sartor, R. B. (2015).** Advances in understanding Giardia: determinants and mechanisms of chronic sequelae. *F1000prime reports*, 7, 62. <https://doi.org/10.12703/P7-62>
- Benchimol, M., Piva, B., Campanati, L., & de Souza, W. (2004).** Visualization of the funis of Giardia lamblia by high-resolution field emission scanning electron microscopy--new insights. *Journal of structural biology*, 147(2), 102–115. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2004.01.017>
- Bienz, M., Siles-Lucas, M., Wittwer, P., & Müller, N. (2001).** vsp gene expression by Giardia lamblia clone GS/M-83-H7 during antigenic variation in vivo and in vitro. *Infection and immunity*, 69(9), 5278–5285. <https://doi.org/10.1128/iai.69.9.5278-5285.2001>
- Birkhead, G., Janoff, E. N., Vogt, R. L., & Smith, P. D. (1989).** Elevated levels of immunoglobulin A to Giardia lamblia during a waterborne outbreak of gastroenteritis. *Journal of clinical microbiology*, 27(8), 1707–1710. <https://doi.org/10.1128/JCM.27.8.1707-1710.1989>
- Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1997).** The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, 89(3), 331–340. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80213-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80213-5)
- Buchel, L. A., Gorenflot, A., Chochillon, C., Savel, J., & Gobert, J. G. (1987).** In vitro excystation of Giardia from humans: a scanning electron microscopy study. *The Journal of parasitology*, 73(3), 487–493.
- Byrd, L. G., Conrad, J. T., & Nash, T. E. (1994).** Giardia lamblia infections in adult mice. *Infection and immunity*, 62(8), 3583–3585. <https://doi.org/10.1128/IAI.62.8.3583-3585.1994>
- Cacciò, S. M., Thompson, R. C., McLauchlin, J., & Smith, H. V. (2005).** Unravelling Cryptosporidium and Giardia epidemiology. *Trends in parasitology*, 21(9), 430–437. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.06.013>
- Carranza, P. G., & Lujan, H. D. (2010).** New insights regarding the biology of Giardia lamblia. *Microbes and infection*, 12(1), 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.09.008>
- Carranza, P. G., Feltes, G., Ropolo, A., Quintana, S. M., Touz, M. C., & Luján, H. D. (2002).** Simultaneous expression of different variant-specific surface proteins in single Giardia lamblia trophozoites during encystation. *Infection and immunity*, 70(9), 5265–5268. <https://doi.org/10.1128/iai.70.9.5265-5268.2002>
- Cernikova, L., Faso, C., & Hehl, A. B. (2018).** Five facts about Giardia lamblia. *PLoS pathogens*, 14(9), e1007250. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007250>

- Chávez-Munguía, B., Cedillo-Rivera, R., & Martínez-Palomo, A. (2004).** The ultrastructure of the cyst wall of *Giardia lamblia*. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 51(2), 220–226. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2004.tb00549.x>
- Coakley, G., Maizels, R. M., & Buck, A. H. (2015).** Exosomes and Other Extracellular Vesicles: The New Communicators in Parasite Infections. *Trends in parasitology*, 31(10), 477–489. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.06.009>
- Cotton, J. A., Motta, J. P., Schenck, L. P., Hirota, S. A., Beck, P. L., & Buret, A. G. (2014).** *Giardia duodenalis* infection reduces granulocyte infiltration in an in vivo model of bacterial toxin-induced colitis and attenuates inflammation in human intestinal tissue. *PloS one*, 9(10), e109087. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109087>
- Cotton, J. A., Amat, C. B., & Buret, A. G. (2015).** Disruptions of Host Immunity and Inflammation by *Giardia Duodenalis*: Potential Consequences for Co-Infections in the Gastro-Intestinal Tract. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 4(4), 764–792. <https://doi.org/10.3390/pathogens4040764>
- Dauids, B. J., Mehta, K., Fesus, L., McCaffery, J. M., & Gillin, F. D. (2004).** Dependence of *Giardia lamblia* encystation on novel transglutaminase activity. *Molecular and biochemical parasitology*, 136(2), 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2004.03.011>
- Dauids, B. J., Reiner, D. S., Birkeland, S. R., Preheim, S. P., Cipriano, M. J., McArthur, A. G., & Gillin, F. D. (2006).** A new family of giardial cysteine-rich non-VSP protein genes and a novel cyst protein. *PloS one*, 1(1), e44. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000044>
- Deitsch, K. W., Lukehart, S. A., & Stringer, J. R. (2009).** Common strategies for antigenic variation by bacterial, fungal and protozoan pathogens. *Nature reviews. Microbiology*, 7(7), 493–503. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2145>
- Diamond, L. S., Harlow, D. R., & Cunnick, C. C. (1978).** A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 72(4), 431–432. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(78\)90144-x](https://doi.org/10.1016/0035-9203(78)90144-x)
- Dobell C. (1920).** The Discovery of the Intestinal Protozoa of Man. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 13(Sect Hist Med), 1–15.
- Donelson J. E. (2003).** Antigenic variation and the African trypanosome genome. *Acta tropica*, 85(3), 391–404. [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(02\)00237-1](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(02)00237-1)
- Eckmann, L., Laurent, F., Langford, T. D., Hetsko, M. L., Smith, J. R., Kagnoff, M. F., & Gillin, F. D. (2000).** Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 164(3), 1478–1487. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.3.1478>
- Eckmann L. (2003).** Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite immunology*, 25(5), 259–270. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2003.00634.x>
- Einarsson, E., Ma'ayeh, S., & Svärd, S. G. (2016).** An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Current opinion in microbiology*, 34, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.07.019>
- Einarsson, E., Troell, K., Hoepfner, M. P., Grabherr, M., Ribacke, U., & Svärd, S. G. (2016).** Coordinated Changes in Gene Expression Throughout Encystation of *Giardia intestinalis*. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(3), e0004571. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004571>
- Elias, E. V., Quiroga, R., Gottig, N., Nakanishi, H., Nash, T. E., Neiman, A., & Lujan, H. D. (2008).** Characterization of SNAREs determines the absence of a typical Golgi apparatus in the ancient eukaryote *Giardia lamblia*. *The Journal of biological chemistry*, 283(51), 35996–36010. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806545200>
- Elmendorf, H. G., Dawson, S. C., & McCaffery, J. M. (2003).** The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *International journal for parasitology*, 33(1), 3–28. <https://doi.org/10.1016/s0020->

[7519\(02\)00228-x](https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.08.003)

Emery, S. J., Lacey, E., & Haynes, P. A. (2015). Data from a proteomic baseline study of Assemblage A in *Giardia duodenalis*. *Data in brief*, 5, 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.08.003>

Emery, S. J., Mirzaei, M., Vuong, D., Pascovici, D., Chick, J. M., Lacey, E., & Haynes, P. A. (2016). Induction of virulence factors in *Giardia duodenalis* independent of host attachment. *Scientific reports*, 6, 20765. <https://doi.org/10.1038/srep20765>

Erlandsen, S. L., and Meyer, E. A. (1984). “*Giardia* and Giardiasis,” p. 407. Plenum, New York.

Erlandsen, S. L., Bemrick, W. J., & Pawley, J. (1989). High-resolution electron microscopic evidence for the filamentous structure of the cyst wall in *Giardia muris* and *Giardia duodenalis*. *The Journal of parasitology*, 75(5), 787–797.

Erlandsen, S. L., Macechko, P. T., van Keulen, H., & Jarroll, E. L. (1996). Formation of the *Giardia* cyst wall: studies on extracellular assembly using immunogold labeling and high resolution field emission SEM. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 43(5), 416–429. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1996.tb05053.x>

Evans-Osses, I., Mojoli, A., Monguió-Tortajada, M., Marcilla, A., Aran, V., Amorim, M., Inal, J., Borràs, F. E., & Ramirez, M. I. (2017). Microvesicles released from *Giardia intestinalis* disturb host-pathogen response in vitro. *European journal of cell biology*, 96(2), 131–142. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2017.01.005>

Faubert, G., Reiner, D. S., & Gillin, F. D. (1991). *Giardia lamblia*: regulation of secretory vesicle formation and loss of ability to reattach during encystation in vitro. *Experimental parasitology*, 72(4), 345–354. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(91\)90080-g](https://doi.org/10.1016/0014-4894(91)90080-g)

Faubert G. (2000). Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clinical microbiology reviews*, 13(1), 35–54. <https://doi.org/10.1128/cmr.13.1.35-54.2000>

Feely, D. E., Schollmeyer, J. V., & Erlandsen, S. L. (1982). *Giardia* spp.: distribution of contractile proteins in the attachment organelle. *Experimental parasitology*, 53(1), 145–154. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(82\)90100-x](https://doi.org/10.1016/0014-4894(82)90100-x)

Gadelha, A., Benchimol, M., & de Souza, W. (2020). The structural organization of *Giardia intestinalis* cytoskeleton. *Advances in parasitology*, 107, 1–23. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2019.08.003>

Gargantini, P. R., Serradell, M., Ríos, D. N., Tenaglia, A. H., & Luján, H. D. (2016). Antigenic variation in the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Current opinion in microbiology*, 32, 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.04.017>

Gerbaba, T. K., Gupta, P., Rioux, K., Hansen, D., & Buret, A. G. (2015). *Giardia duodenalis*-induced alterations of commensal bacteria kill *Caenorhabditis elegans*: a new model to study microbial-microbial interactions in the gut. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 308(6), G550–G561. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00335.2014>

Gillin, F. D., Hagblom, P., Harwood, J., Aley, S. B., Reiner, D. S., McCaffery, M., So, M., & Guiney, D. G. (1990). Isolation and expression of the gene for a major surface protein of *Giardia lamblia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(12), 4463–4467. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4463>

Gillin, F. D., Reiner, D. S., & McCaffery, J. M. (1996). Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annual review of microbiology*, 50, 679–705. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.679>

Gottig, N., Elías, E. V., Quiroga, R., Nores, M. J., Solari, A. J., Touz, M. C., & Luján, H. D. (2006). Active and passive mechanisms drive secretory granule biogenesis during differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *The Journal of biological chemistry*, 281(26), 18156–18166. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602081200>

- Goyal, N., Rishi, P., & Shukla, G. (2013).** Lactobacillus rhamnosus GG antagonizes Giardia intestinalis induced oxidative stress and intestinal disaccharidases: an experimental study. *World journal of microbiology & biotechnology*, 29(6), 1049–1057. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1268-6>
- Hagen, K. D., McInally, S. G., Hilton, N. D., & Dawson, S. C. (2020).** Microtubule organelles in Giardia. *Advances in parasitology*, 107, 25–96. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2019.11.001>
- Halliez, M. C., & Buret, A. G. (2013).** Extra-intestinal and long term consequences of Giardia duodenalis infections. *World journal of gastroenterology*, 19(47), 8974–8985. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i47.8974>
- Hanevik, K., Bakken, R., Brattbakk, H. R., Saghaug, C. S., & Langeland, N. (2015).** Whole genome sequencing of clinical isolates of Giardia lamblia. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 21(2), 192.e1–192.e1923. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.08.014>
- Hemphill, A., Stäger, S., Gottstein, B., & Müller, N. (1996).** Electron microscopical investigation of surface alterations on Giardia lamblia trophozoites after exposure to a cytotoxic monoclonal antibody. *Parasitology research*, 82(3), 206–210. <https://doi.org/10.1007/s004360050096>
- Heyworth M. F. (1992).** Relative susceptibility of Giardia muris trophozoites to killing by mouse antibodies of different isotypes. *The Journal of parasitology*, 78(1), 73–76.
- Heyworth M. F. (1992).** Immunology of Giardia and Cryptosporidium infections. *The Journal of infectious diseases*, 166(3), 465–472. <https://doi.org/10.1093/infdis/166.3.465>
- Heyworth M. F. (2016).** Giardia duodenalis genetic assemblages and hosts. *Parasite (Paris, France)*, 23, 13. <https://doi.org/10.1051/parasite/2016013>
- Hovel-Miner, G., Mugnier, M., Papavasiliou, F. N., Pinger, J., & Schulz, D. (2015).** A Host-Pathogen Interaction Reduced to First Principles: Antigenic Variation in T. brucei. *Results and problems in cell differentiation*, 57, 23–46. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20819-0_2
- Jarroll, E. L., Bingham, A. K., & Meyer, E. A. (1981).** Effect of chlorine on Giardia lamblia cyst viability. *Applied and environmental microbiology*, 41(2), 483–487. <https://doi.org/10.1128/AEM.41.2.483-487.1981>
- Jarroll, E. L., Manning, P., Lindmark, D. G., Coggins, J. R., & Erlandsen, S. L. (1989).** Giardia cyst wall-specific carbohydrate: evidence for the presence of galactosamine. *Molecular and biochemical parasitology*, 32(2-3), 121–131. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(89\)90063-7](https://doi.org/10.1016/0166-6851(89)90063-7)
- Johnson, P. L., Kochin, B. F., Ahmed, R., & Antia, R. (2012).** How do antigenically varying pathogens avoid cross-reactive responses to invariant antigens?. *Proceedings. Biological sciences*, 279(1739), 2777–2785. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.0005>
- Jones, K. H., & Senft, J. A. (1985).** An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 33(1), 77–79. <https://doi.org/10.1177/33.1.2578146>
- Jones S. A. (2005).** Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 175(6), 3463–3468. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.6.3463>
- Kabnick, K. S., & Peattie, D. A. (1990).** In situ analyses reveal that the two nuclei of Giardia lamblia are equivalent. *Journal of cell science*, 95 (Pt 3), 353–360.
- Kamda, J. D., & Singer, S. M. (2009).** Phosphoinositide 3-kinase-dependent inhibition of dendritic cell interleukin-12 production by Giardia lamblia. *Infection and immunity*, 77(2), 685–693. <https://doi.org/10.1128/IAI.00718-08>
- Kamda, J. D., Nash, T. E., & Singer, S. M. (2012).** Giardia duodenalis: dendritic cell defects in IL-6 deficient mice contribute to susceptibility to intestinal infection. *Experimental*

parasitology, 130(3), 288–291. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.01.003>

Keeling, P. J., Burger, G., Durnford, D. G., Lang, B. F., Lee, R. W., Pearlman, R. E., Roger, A. J., & Gray, M. W. (2005). The tree of eukaryotes. *Trends in ecology & evolution*, 20(12), 670–676. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.09.005>

Kim V. N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(5), 376–385. <https://doi.org/10.1038/nrm1644>

Knodler, L. A., Noiva, R., Mehta, K., McCaffery, J. M., Aley, S. B., Svärd, S. G., Nystul, T. G., Reiner, D. S., Silberman, J. D., & Gillin, F. D. (1999). Novel protein-disulfide isomerases from the early-diverging protist *Giardia lamblia*. *The Journal of biological chemistry*, 274(42), 29805–29811. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.42.29805>

Kusch, J., & Schmidt, H. J. (2001). Genetically controlled expression of surface variant antigens in free-living protozoa. *The Journal of membrane biology*, 180(2), 101–109. <https://doi.org/10.1007/s002320010062>

Lacy, M. M., Ma, R., Ravindra, N. G., & Berro, J. (2018). Molecular mechanisms of force production in clathrin-mediated endocytosis. *FEBS letters*, 592(21), 3586–3605. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13192>

Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

Lanfredi-Rangel, A., Kattenbach, W. M., Diniz, J. A., Jr, & de Souza, W. (1999). Trophozoites of *Giardia lamblia* may have a Golgi-like structure. *FEMS microbiology letters*, 181(2), 245–251. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08851.x>

Langford, T. D., Housley, M. P., Boes, M., Chen, J., Kagnoff, M. F., Gillin, F. D., & Eckmann, L. (2002). Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia* spp. *Infection and immunity*, 70(1), 11–18. <https://doi.org/10.1128/iai.70.1.11-18.2002>

Lee, H. Y., Kim, J., Noh, H. J., Kim, H. P., & Park, S. J. (2014). *Giardia lamblia* binding immunoglobulin protein triggers maturation of dendritic cells via activation of TLR4-MyD88-p38 and ERK1/2 MAPKs. *Parasite immunology*, 36(12), 627–646. <https://doi.org/10.1111/pim.12119>

Li, E., Zhou, P., Petrin, Z., & Singer, S. M. (2004). Mast cell-dependent control of *Giardia lamblia* infections in mice. *Infection and immunity*, 72(11), 6642–6649. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.11.6642-6649.2004>

Li, E., Zhou, P., & Singer, S. M. (2006). Neuronal nitric oxide synthase is necessary for elimination of *Giardia lamblia* infections in mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 176(1), 516–521. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.1.516>

Li, E., Zhao, A., Shea-Donohue, T., & Singer, S. M. (2007). Mast cell-mediated changes in smooth muscle contractility during mouse giardiasis. *Infection and immunity*, 75(9), 4514–4518. <https://doi.org/10.1128/IAI.00596-07>

Lipoldová M. (2014). *Giardia* and Vilém Dušan Lambl. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(5), e2686. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002686>

Litleskare, S., Wensaas, K. A., Eide, G. E., Hanevik, K., Kahrs, G. E., Langeland, N., & Rortveit, G. (2015). Perceived food intolerance and irritable bowel syndrome in a population 3 years after a giardiasis-outbreak: a historical cohort study. *BMC gastroenterology*, 15, 164. <https://doi.org/10.1186/s12876-015-0393-0>

Loison, P., Majou, D., Gelhaye, E., Boudaud, N., & Gantzer, C. (2016). Impact of reducing and oxidizing agents on the infectivity of Q β phage and the overall structure of its capsid. *FEMS microbiology ecology*, 92(11), fiw153. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw153>

Lujan, H. D., & Touz, M. C. (2003). Protein trafficking in *Giardia lamblia*. *Cellular microbiology*, 5(7), 427–434. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00284.x>

Lujan, H. D., Mowatt, M. R., Conrad, J. T., Bowers, B., & Nash, T. E. (1995). Identification of

a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich repeats. Implications for secretory granule formation and protein assembly into the cyst wall. *The Journal of biological chemistry*, 270(49), 29307–29313. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.49.29307>

Lujan, H. D., Mowatt, M. R., Conrad, J. T., & Nash, T. E. (1996). Increased expression of the molecular chaperone BiP/GRP78 during the differentiation of a primitive eukaryote. *Biology of the cell*, 86(1), 11–18. <https://doi.org/10.1111/j.1768-322x.1996.tb00950.x>

Lujan, H. D., Mowatt, M. R., & Nash, T. E. (1997). Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 61(3), 294–304.

Lujan H. D. (2011). Mechanisms of adaptation in the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Essays in biochemistry*, 51, 177–191. <https://doi.org/10.1042/bse0510177>

Luo, J., Teng, M., Zhang, G. P., Lun, Z. R., Zhou, H., & Qu, L. H. (2009). Evaluating the evolution of *G. lamblia* based on the small nucleolar RNAs identified from Archaea and unicellular eukaryotes. *Parasitology research*, 104(6), 1543–1546. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1403-3>

Manning, P., Erlandsen, S. L., & Jarroll, E. L. (1992). Carbohydrate and amino acid analyses of *Giardia muris* cysts. *The Journal of protozoology*, 39(2), 290–296. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1992.tb01317.x>

Marti, M., & Hehl, A. B. (2003). Encystation-specific vesicles in *Giardia*: a primordial Golgi or just another secretory compartment?. *Trends in parasitology*, 19(10), 440–446. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(03\)00201-0](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(03)00201-0)

Mayrhofer, G., Andrews, R. H., Ey, P. L., & Chilton, N. B. (1995). Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. *Parasitology*, 111 (Pt 1), 11–17. <https://doi.org/10.1017/s0031182000064556>

McArthur, A. G., Knodler, L. A., Silberman, J. D., Davids, B. J., Gillin, F. D., & Sogin, M. L. (2001). The evolutionary origins of eukaryotic protein disulfide isomerase domains: new evidence from the Amitochondriate protist *Giardia lamblia*. *Molecular biology and evolution*, 18(8), 1455–1463. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003931>

McCaffery, J. M., & Gillin, F. D. (1994). *Giardia lamblia*: ultrastructural basis of protein transport during growth and encystation. *Experimental parasitology*, 79(3), 220–235. <https://doi.org/10.1006/expr.1994.1086>

McCaffery, J. M., Faubert, G. M., & Gillin, F. D. (1994). *Giardia lamblia*: traffic of a trophozoite variant surface protein and a major cyst wall epitope during growth, encystation, and antigenic switching. *Experimental parasitology*, 79(3), 236–249. <https://doi.org/10.1006/expr.1994.1087>

Merluzzi, S., Frossi, B., Gri, G., Parusso, S., Tripodo, C., & Pucillo, C. (2010). Mast cells enhance proliferation of B lymphocytes and drive their differentiation toward IgA-secreting plasma cells. *Blood*, 115(14), 2810–2817. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-10-250126>

Monis, P. T., & Thompson, R. C. (2003). Cryptosporidium and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 3(4), 233–244. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2003.08.003>

Monis, P. T., Caccio, S. M., & Thompson, R. C. (2009). Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends in parasitology*, 25(2), 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.11.006>

Morrison, H. G., McArthur, A. G., Gillin, F. D., Aley, S. B., Adam, R. D., Olsen, G. J., Best, A. A., Cande, W. Z., Chen, F., Cipriano, M. J., Davids, B. J., Dawson, S. C., Elmendorf, H. G., Hehl, A. B., Holder, M. E., Huse, S. M., Kim, U. U., Lasek-Nesselquist, E., Manning, G., Nigam, A., ... Sogin, M. L. (2007). Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5846), 1921–1926. <https://doi.org/10.1126/science.1143837>

Mowatt, M. R., Luján, H. D., Cotten, D. B., Bowers, B., Yee, J., Nash, T. E., & Stibbs, H. H.

- (1995). Developmentally regulated expression of a *Giardia lamblia* cyst wall protein gene. *Molecular microbiology*, 15(5), 955–963. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02364.x>
- Mowatt, M. R., Nguyen, B. Y., Conrad, J. T., Adam, R. D., & Nash, T. E. (1994). Size heterogeneity among antigenically related *Giardia lamblia* variant-specific surface proteins is due to differences in tandem repeat copy number. *Infection and immunity*, 62(4), 1213–1218. <https://doi.org/10.1128/IAI.62.4.1213-1218.1994>
- Moyano, S., Musso, J., Feliziani, C., Zamponi, N., Frontera, L. S., Ropolo, A. S., Lanfredi-Rangel, A., Lalle, M., & Touz, M. (2019). Exosome Biogenesis in the Protozoa Parasite *Giardia lamblia*: A Model of Reduced Interorganellar Crosstalk. *Cells*, 8(12), 1600. <https://doi.org/10.3390/cells8121600>
- Muhsen, K., & Levine, M. M. (2012). A systematic review and meta-analysis of the association between *Giardia lamblia* and endemic pediatric diarrhea in developing countries. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 55 Suppl 4(Suppl 4), S271–S293. <https://doi.org/10.1093/cid/cis762>
- Müller, N., & Gottstein, B. (1998). Antigenic variation and the murine immune response to *Giardia lamblia*. *International journal for parasitology*, 28(12), 1829–1839. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(98\)00137-4](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(98)00137-4)
- Müller, J., Rout, S., Leitsch, D., Vaithilingam, J., Hehl, A., & Müller, N. (2015). Comparative characterisation of two nitroreductases from *Giardia lamblia* as potential activators of nitro compounds. *International journal for parasitology. Drugs and drug resistance*, 5(2), 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.ijpdr.2015.03.001>
- Müller, N., & von Allmen, N. (2005). Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *International journal for parasitology*, 35(13), 1339–1347. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.07.008>
- Nash, T. E., & Aggarwal, A. (1986). Cytotoxicity of monoclonal antibodies to a subset of *Giardia* isolates. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 136(7), 2628–2632.
- Nash, T. E., & Keister, D. B. (1985). Differences in excretory-secretory products and surface antigens among 19 isolates of *Giardia*. *The Journal of infectious diseases*, 152(6), 1166–1171. <https://doi.org/10.1093/infdis/152.6.1166>
- Nash, T. E., Herrington, D. A., Losonsky, G. A., & Levine, M. M. (1987). Experimental human infections with *Giardia lamblia*. *The Journal of infectious diseases*, 156(6), 974–984. <https://doi.org/10.1093/infdis/156.6.974>
- Nash, T. E., Aggarwal, A., Adam, R. D., Conrad, J. T., & Merritt, J. W., Jr (1988). Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 141(2), 636–641.
- Nash, T. E., Banks, S. M., Alling, D. W., Merritt, J. W., Jr, & Conrad, J. T. (1990). Frequency of variant antigens in *Giardia lamblia*. *Experimental parasitology*, 71(4), 415–421. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(90\)90067-m](https://doi.org/10.1016/0014-4894(90)90067-m)
- Nash, T. E., Herrington, D. A., Levine, M. M., Conrad, J. T., & Merritt, J. W., Jr (1990). Antigenic variation of *Giardia lamblia* in experimental human infections. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 144(11), 4362–4369.
- Nash, T. E., & Mowatt, M. R. (1992). Characterization of a *Giardia lamblia* variant-specific surface protein (VSP) gene from isolate GS/M and estimation of the VSP gene repertoire size. *Molecular and biochemical parasitology*, 51(2), 219–227. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(92\)90072-r](https://doi.org/10.1016/0166-6851(92)90072-r)
- Nash, T. E., Conrad, J. T., & Mowatt, M. R. (1995). *Giardia lamblia*: identification and characterization of a variant-specific surface protein gene family. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 42(5), 604–609. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1995.tb05914.x>
- Nash, T. E., Luján, H. T., Mowatt, M. R., & Conrad, J. T. (2001). Variant-specific surface protein switching in *Giardia lamblia*. *Infection and immunity*, 69(3), 1922–1923.

<https://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1922-1923.2001>

Nash, T. E., Merritt, J. W., Jr, & Conrad, J. T. (1991). Isolate and epitope variability in susceptibility of *Giardia lamblia* to intestinal proteases. *Infection and immunity*, 59(4), 1334–1340. <https://doi.org/10.1128/IAI.59.4.1334-1340.1991>

Nash T. E. (1997). Antigenic variation in *Giardia lamblia* and the host's immune response. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 352(1359), 1369–1375. <https://doi.org/10.1098/rstb.1997.0122>

Nash T. E. (2002). Surface antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Molecular microbiology*, 45(3), 585–590. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03029.x>

Nores, M. J., Prucca, C. G., Quiroga, R., Elías, E. V., Cavallín, L., Price, A. M., Saura, A., Carranza, P. G., Gottig, N., Solari, A. J., & Lujan, H. D. (2009). ORF-C4 from the early branching eukaryote *Giardia lamblia* displays characteristics of alpha-crystallin small heat-shock proteins. *Bioscience reports*, 29(1), 25–34. <https://doi.org/10.1042/BSR20080101>

Obendorf, J., Renner Viveros, P., Fehlings, M., Klotz, C., Aebischer, T., & Ignatius, R. (2013). Increased expression of CD25, CD83, and CD86, and secretion of IL-12, IL-23, and IL-10 by human dendritic cells incubated in the presence of Toll-like receptor 2 ligands and *Giardia duodenalis*. *Parasites & vectors*, 6(1), 317. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-317>

O'Hara, J. R., & Buret, A. G. (2008). Mechanisms of intestinal tight junctional disruption during infection. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 13, 7008–7021.

Papanastasiou, P., Hiltbold, A., Bommeli, C., & Köhler, P. (1996). 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(31), 10143–10148. <https://doi.org/10.1021/bi960473b>

Peattie D. A. (1990). The giardins of *Giardia lamblia*: genes and proteins with promise. *Parasitology today (Personal ed.)*, 6(2), 52–56. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(90\)90070-k](https://doi.org/10.1016/0169-4758(90)90070-k)

Peirasmaki, D., Ma'ayeh, S. Y., Xu, F., Ferella, M., Campos, S., Liu, J., & Svärd, S. G. (2020). High Cysteine Membrane Proteins (HCMPs) Are Up-Regulated During *Giardia*-Host Cell Interactions. *Frontiers in genetics*, 11, 913. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00913>

Piva, B., & Benchimol, M. (2004). The median body of *Giardia lamblia*: an ultrastructural study. *Biology of the cell*, 96(9), 735–746. <https://doi.org/10.1016/j.biolcel.2004.05.006>

Plutzer, J., Ongerth, J., & Karanis, P. (2010). *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *International journal of hygiene and environmental health*, 213(5), 321–333. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.06.005>

Prucca, C. G., Rivero, F. D., & Luján, H. D. (2011). Regulation of antigenic variation in *Giardia lamblia*. Annual review of microbiology, 65, 611–630. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102940>

Prucca, C. G., & Lujan, H. D. (2009). Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Cellular microbiology*, 11(12), 1706–1715. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01367.x>

Prucca, C. G., Slavin, I., Quiroga, R., Elías, E. V., Rivero, F. D., Saura, A., Carranza, P. G., & Luján, H. D. (2008). Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. *Nature*, 456(7223), 750–754. <https://doi.org/10.1038/nature07585>

Reiner, D. S., McCaffery, M., & Gillin, F. D. (1990). Sorting of cyst wall proteins to a regulated secretory pathway during differentiation of the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. *European journal of cell biology*, 53(1), 142–153.

Reiner, D. S., McCaffery, J. M., & Gillin, F. D. (2001). Reversible interruption of *Giardia lamblia* cyst wall protein transport in a novel regulated secretory pathway. *Cellular microbiology*, 3(7), 459–472. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2001.00129.x>

Riches, A., Hart, C., Trenholme, K. R., & Skinner-Adams, T. S. (2020). Anti-*Giardia* Drug

Discovery: Current Status and Gut Feelings. *Journal of medicinal chemistry*, 63(22), 13330–13354. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00910>

Rópolo, A. S., & Touz, M. C. (2010). A lesson in survival, by Giardia lamblia. *TheScientificWorldJournal*, 10, 2019–2031. <https://doi.org/10.1100/tsw.2010.200>

Ryan, U., & Cacciò, S. M. (2013). Zoonotic potential of Giardia. *International journal for parasitology*, 43(12-13), 943–956. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.06.001>

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Saraiya, A. A., Li, W., Wu, J., Chang, C. H., & Wang, C. C. (2014). The microRNAs in an ancient protist repress the variant-specific surface protein expression by targeting the entire coding sequence. *PLoS pathogens*, 10(2), e1003791. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003791>

Scherf, A., Hernandez-Rivas, R., Buffet, P., Bottius, E., Benatar, C., Pouvelle, B., Gysin, J., & Lanzer, M. (1998). Antigenic variation in malaria: in situ switching, relaxed and mutually exclusive transcription of var genes during intra-erythrocytic development in *Plasmodium falciparum*. *The EMBO journal*, 17(18), 5418–5426. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.18.5418>

Serradell, M. C., Rupil, L. L., Martino, R. A., Prucca, C. G., Carranza, P. G., Saura, A., Fernández, E. A., Gargantini, P. R., Tenaglia, A. H., Petiti, J. P., Tonelli, R. R., Reinoso-Vizcaino, N., Echenique, J., Berod, L., Piaggio, E., Bellier, B., Sparwasser, T., Klatzmann, D., & Luján, H. D. (2019). Efficient oral vaccination by bioengineering virus-like particles with protozoan surface proteins. *Nature communications*, 10(1), 361. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08265-9>

Serradell, M. C., Gargantini, P. R., Saura, A., Oms, S. R., Rupil, L. L., Berod, L., Sparwasser, T., & Luján, H. D. (2018). Cytokines, Antibodies, and Histopathological Profiles during Giardia Infection and Variant-Specific Surface Protein-Based Vaccination. *Infection and immunity*, 86(6), e00773-17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00773-17>

Shin, J., Dunbrack, R. L., Jr, Lee, S., & Strominger, J. L. (1991). Signals for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum studied with CD4 truncation mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(5), 1918–1922. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.5.1918>

Singer, S. M., & Nash, T. E. (2000). T-cell-dependent control of acute Giardia lamblia infections in mice. *Infection and immunity*, 68(1), 170–175. <https://doi.org/10.1128/iai.68.1.170-175.2000>

Singer, S. M., Yee, J., & Nash, T. E. (1998). Episomal and integrated maintenance of foreign DNA in Giardia lamblia. *Molecular and biochemical parasitology*, 92(1), 59–69. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(97\)00225-9](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(97)00225-9)

Singer, S. M., Elmendorf, H. G., Conrad, J. T., & Nash, T. E. (2001). Biological selection of variant-specific surface proteins in Giardia lamblia. *The Journal of infectious diseases*, 183(1), 119–124. <https://doi.org/10.1086/317659>

Slavin, I., Saura, A., Carranza, P. G., Touz, M. C., Nores, M. J., & Luján, H. D. (2002). Dephosphorylation of cyst wall proteins by a secreted lysosomal acid phosphatase is essential for excystation of Giardia lamblia. *Molecular and biochemical parasitology*, 122(1), 95–98. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(02\)00065-8](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(02)00065-8)

Solari, A. J., Rahn, M. I., Saura, A., & Lujan, H. D. (2003). A unique mechanism of nuclear division in Giardia lamblia involves components of the ventral disk and the nuclear envelope. *Biocell: official journal of the Sociedades Latinoamericanas de Microscopia Electronica ... et. al*, 27(3), 329–346.

Solaymani-Mohammadi, S., & Singer, S. M. (2010). Giardia duodenalis: the double-edged sword of immune responses in giardiasis. *Experimental parasitology*, 126(3), 292–297. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.06.014>

Soltys, B. J., Falah, M., & Gupta, R. S. (1996). Identification of endoplasmic reticulum in the primitive eukaryote *Giardia lamblia* using cryoelectron microscopy and antibody to Bip. *Journal of cell science*, 109 (Pt 7), 1909–1917.

Stager, S., & Muller, N. (1997). *Giardia lamblia* infections in B-cell-deficient transgenic mice. *Infection and immunity*, 65(9), 3944–3946. <https://doi.org/10.1128/IAI.65.9.3944-3946.1997>

Stäger, S., Felleisen, R., Gottstein, B., & Müller, N. (1997). *Giardia lamblia* variant surface protein H7 stimulates a heterogeneous repertoire of antibodies displaying differential cytological effects on the parasite. *Molecular and biochemical parasitology*, 85(1), 113–124. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(96\)02818-6](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(96)02818-6)

Sudnitsyna, J., Skverchinskaya, E., Dobrylko, I., Nikitina, E., Gambaryan, S., & Mindukshev, I. (2020). Microvesicle Formation Induced by Oxidative Stress in Human Erythrocytes. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(10), 929. <https://doi.org/10.3390/antiox9100929>

Sun, C. H., Palm, D., McArthur, A. G., Svärd, S. G., & Gillin, F. D. (2002). A novel Myb-related protein involved in transcriptional activation of encystation genes in *Giardia lamblia*. *Molecular microbiology*, 46(4), 971–984. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03233.x>

Sun, C. H., McCaffery, J. M., Reiner, D. S., & Gillin, F. D. (2003). Mining the *Giardia lamblia* genome for new cyst wall proteins. *The Journal of biological chemistry*, 278(24), 21701–21708. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302023200>

Svärd, S. G., Meng, T. C., Hetsko, M. L., McCaffery, J. M., & Gillin, F. D. (1998). Differentiation-associated surface antigen variation in the ancient eukaryote *Giardia lamblia*. *Molecular microbiology*, 30(5), 979–989. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01125.x>

Svärd, S. G., Hagblom, P., & Palm, J. E. (2003). *Giardia lamblia* -- a model organism for eukaryotic cell differentiation. *FEMS microbiology letters*, 218(1), 3–7. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2003.tb11490.x>

Taylor, J., Azimi, I., Monteith, G., & Bebawy, M. (2020). Ca²⁺ mediates extracellular vesicle biogenesis through alternate pathways in malignancy. *Journal of extracellular vesicles*, 9(1), 1734326. <https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1734326>

Tian, X. F., Yang, Z. H., Shen, H., Adam, R. D., & Lu, S. Q. (2010). Identification of the nucleoli of *Giardia lamblia* with TEM and CFM. *Parasitology research*, 106(4), 789–793. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1715-3>

Touz, M. C., Nores, M. J., Slavin, I., Piacenza, L., Acosta, D., Carmona, C., & Luján, H. D. (2002). Membrane-associated dipeptidyl peptidase IV is involved in encystation-specific gene expression during *Giardia* differentiation. *The Biochemical journal*, 364(Pt 3), 703–710. <https://doi.org/10.1042/BJ20020025>

Touz, M. C., Nores, M. J., Slavin, I., Carmona, C., Conrad, J. T., Mowatt, M. R., Nash, T. E., Coronel, C. E., & Luján, H. D. (2002). The activity of a developmentally regulated cysteine proteinase is required for cyst wall formation in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *The Journal of biological chemistry*, 277(10), 8474–8481. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110250200>

Touz, M. C., Gottig, N., Nash, T. E., & Lujan, H. D. (2002). Identification and characterization of a novel secretory granule calcium-binding protein from the early branching eukaryote *Giardia lamblia*. *The Journal of biological chemistry*, 277(52), 50557–50563. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202558200>

Touz, M. C., Lujan, H. D., Hayes, S. F., & Nash, T. E. (2003). Sorting of encystation-specific cysteine protease to lysosome-like peripheral vacuoles in *Giardia lamblia* requires a conserved tyrosine-based motif. *The Journal of biological chemistry*, 278(8), 6420–6426. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208354200>

Touz, M. C., Conrad, J. T., & Nash, T. E. (2005). A novel palmitoyl acyl transferase controls

surface protein palmitoylation and cytotoxicity in *Giardia lamblia*. *Molecular microbiology*, 58(4), 999–1011. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04891.x>

Touz, M. C., Rópolo, A. S., Rivero, M. R., Vranych, C. V., Conrad, J. T., Svard, S. G., & Nash, T. E. (2008). Arginine deiminase has multiple regulatory roles in the biology of *Giardia lamblia*. *Journal of cell science*, 121(Pt 17), 2930–2938. <https://doi.org/10.1242/jcs.026963>

Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350–4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>

Tůmová, P., Uzlíková, M., Jurczyk, T., & Nohýnková, E. (2016). Constitutive aneuploidy and genomic instability in the single-celled eukaryote *Giardia intestinalis*. *MicrobiologyOpen*, 5(4), 560–574. <https://doi.org/10.1002/mbo3.351>

Tůmová, P., Dluhošová, J., Weisz, F., & Nohýnková, E. (2019). Unequal distribution of genes and chromosomes refers to nuclear diversification in the binucleated *Giardia intestinalis*. *International journal for parasitology*, 49(6), 463–470. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.01.003>

Turner C. M. (1999). Antigenic variation in *Trypanosoma brucei* infections: an holistic view. *Journal of cell science*, 112 (Pt 19), 3187–3192.

Udezulu, I. A., Visvesvara, G. S., Moss, D. M., & Leitch, G. J. (1992). Isolation of two *Giardia lamblia* (WB strain) clones with distinct surface protein and antigenic profiles and differing infectivity and virulence. *Infection and immunity*, 60(6), 2274–2280. <https://doi.org/10.1128/IAI.60.6.2274-2280.1992>

Ward, W., Alvarado, L., Rawlings, N. D., Engel, J. C., Franklin, C., & McKerrow, J. H. (1997). A primitive enzyme for a primitive cell: the protease required for excystation of *Giardia*. *Cell*, 89(3), 437–444. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80224-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80224-x)

Watkins, R. R., & Eckmann, L. (2014). Treatment of giardiasis: current status and future directions. *Current infectious disease reports*, 16(2), 396. <https://doi.org/10.1007/s11908-014-0396-y>

Weids, A. J., Ibstedt, S., Tamás, M. J., & Grant, C. M. (2016). Distinct stress conditions result in aggregation of proteins with similar properties. *Scientific reports*, 6, 24554. <https://doi.org/10.1038/srep24554>

Yang, H., Chung, H. J., Yong, T., Lee, B. H., & Park, S. (2003). Identification of an encystation-specific transcription factor, Myb protein in *Giardia lamblia*. *Molecular and biochemical parasitology*, 128(2), 167–174. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(03\)00072-0](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(03)00072-0)

Yu, L. Z., Birky, C. W., Jr, & Adam, R. D. (2002). The two nuclei of *Giardia* each have complete copies of the genome and are partitioned equationally at cytokinesis. *Eukaryotic cell*, 1(2), 191–199. <https://doi.org/10.1128/ec.1.2.191-199.2002>

Zhou, P., Li, E., Shea-Donohue, T., & Singer, S. M. (2007). Tumour necrosis factor alpha contributes to protection against *Giardia lamblia* infection in mice. *Parasite immunology*, 29(7), 367–374. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.00953.x>

