

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**EFFECTO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES
ANTI PROTEÍNAS VARIABLES DE SUPERFICIE
SOBRE EL PROCESO DE VARIACIÓN ANTIGÉNICA EN**
Giardia lamblia

**TESIS
DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

Autor: Licenciado Alessandro Torri

**CÁTEDRA DE QUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA**

CÓRDOBA, ARGENTINA

2016

INVENTARIO BIBLIOTECA 13541

FECHA DE INGRESO: Feb 2020

PROCEDENCIA: Donación

PRECIO:

VALOR PATRIMONIAL Y FECHA:

CLASIFICACION: LIC:

TITULO:

ENCUADERNADO:

N. DE CLASIFICACION: 574.292

UBICACION: B-T

REINVENTARIADO EN:

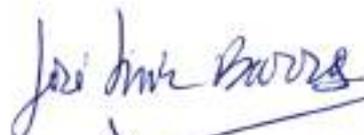
PROCESO: JML

Director de tesis:

Dr. Hugo D. Luján

Miembros de comisión:

Dr. José Luis Barra



Dra. Claudia E. Sotomayor



Dra. Virginia E. Rivero



Evaluador externo:

Dr. Luis S. Mayorga



The truth is what is, and what should be is a fantasy.
Lenny Bruce

J'y gagne, dit le renard, à cause de la couleur du blé.
Antoine de Saint-Exupéry

Índice

Resumen/Abstract	1
Glosario	3
Introducción	5
Clasificación taxonómica	7
Giardiasis	8
Biología celular de Giardia	10
El ciclo de vida.....	10
El trofozoíto.....	11
El quiste.....	15
Variación antigénica	16
Proteínas variables de superficie (VSPs)	18
Respuesta inmunológica a giardiasis	22
El mecanismo de ARN de interferencia	25
ARN de interferencia y variación antigénica en <i>G. lamblia</i>	28
Objetivos	32
Materiales y Métodos	33
Resultados	42
1. Estudios de citotoxicidad de anticuerpos monoclonales anti-proteínas variables de superficie (VSPs)	43
1.1. Obtención de poblaciones clonales de trofozoítos que sólo expresan una proteína variable de superficie (VSP).....	43
1.2. Viabilidad y proliferación celular de poblaciones clonales de <i>G. lamblia</i>	

expuestas a mAb específicos.....	44
1.2.1. <i>Viabilidad</i>	45
1.2.2. <i>Proliferación</i>	48
1.3. Actividad metabólica de clones de VSPs de <i>G. lamblia</i> expuestos a mAb específicos.....	50
2. Variación antigénica de clones de <i>G. lamblia</i> inducida por mAbs específicos.	53
2.1. Inducción de variación antigénica por mAbs específicos.....	53
2.2. Recambio de VSPs debido a la variación antigénica.....	55
2.3. Internalización de mAbs 9B10 por células de un clon de trofozoítos VSP-9B10.....	57
3. Mecanismos moleculares de inducción de variación antigénica por mAbs específicos anti-VSPs.	58
3.1. Modulación de la maquinaria de RNAi durante la variación antigénica inducida por mAb contra VSPs específicas.....	58
3.2. Modificaciones de histonas y variación antigénica.....	61
3.3. Localización de RpRd luego de la inducción de la variación antigénica.....	63
3.4. Variación antigénica de trofozoítos que co-expresan dos VSPs.....	64
3.4.1. <i>Mutagénesis del tallo citoplásmico de la VSP H7</i>	64
3.4.2. <i>Variación antigénica con trofozoítos que expresan las VSPs recombinantes</i>	65
Discusión	69
Efecto citotóxico de los mAb anti-VSPs	71
Efecto de los mAb sobre el proceso de variación antigénica en <i>Giardia</i>	73
Bibliografía	79
Anexo	97

Resumen / Abstract

Giardia lamblia es un parásito intestinal considerado como uno de los eucariotas más primitivos. Vive en el duodeno de los humanos y otros mamíferos y es el agente causante la giardiasis, una enfermedad que puede manifestarse clínicamente con diarrea aguda o crónica así como puede causar infecciones asintomáticas.

Giardia está recubierto por proteínas de superficie que constituyen una interfase entre el parásito y el medio ambiente y que pertenecen a la familia de proteínas llamadas Proteínas Variables de Superficie (Variant-specific Surface Proteins – VSPs). Su genoma contiene aproximadamente entre 150 y 200 genes codificantes para estas proteínas, pero sólo una VSP es expresada sobre la superficie de cada parásito en un dado momento y puede ser recambiada por otra mediante un mecanismo de regulación post transcripcional. Los estímulos que inducen este recambio son aún desconocidos.

Varios estudios han sugerido que anticuerpos monoclonales contra una VSP específica podrían tener efectos citotóxicos sobre *Giardia*. En el presente trabajo de tesis se demuestra no sólo que los anticuerpos monoclonales contra VSPs no tiene efecto citotóxico sobre el parásito, sino también que son un estímulo que induce variación antigénica *in vitro*, sugiriendo que la presión del sistema inmunitario podría ser la principal causa de la variación antigénica *in vivo*.

Giardia lamblia is an intestinal protozoan considered one of the most primitive eukaryotes. It lives in the small intestine of humans and other mammals and is the causative agent of giardiasis. This disorder is characterized by clinical manifestations ranging from asymptomatic infection to acute or chronic diarrhea, and closely related to malabsorption. *Giardia* is covered with a specific surface protein, which is a true interface between the parasite and the environment, and belong to a family of proteins called Variant-specific surface proteins (VSPs). Its genome contains a repertoire from 150 to 200 genes encoding these proteins, but only one VSP is expressed on the surface of each parasite at a particular time and can switches to a different VSP by unknown stimuli through a post transcriptional regulation.

Several studies have suggested that monoclonal antibodies against a specific VSP may have cytotoxic effect on *Giardia*. Through this work it is demonstrated not only that immunoglobulins do not have a cytotoxic effect but also induce antigenic variation *in vitro*, suggesting that the immune system pression can be a major cause of antigenic switching *in vivo*.

Glosario

Ago:	Argonauta
CWP:	proteína de la pared del quiste (del inglés <i>cyst wall protein</i>)
DAPI:	(4',6-diamino-2-fenilindol)
DC:	células dendríticas
FDA:	diacetato de fluoresceína
FITC:	isotiocianato de fluoresceína
HA:	péptido de la proteína hemaglutinina de <i>Influenzavirus</i>
Ig:	inmunoglobulina
mAb:	anticuerpo monoclonal
miRNA:	micro RNA
NO:	monóxido nítrico
NOS:	monóxido nítrico sintasa
ORF:	marco abierto de lectura (del inglés <i>open reading frame</i>)
PI:	Ioduro de propidio
RISC:	complejo de silenciamiento inducido por RNA
RpRd:	RNA polimerasa RNA dependiente
siRNA:	RNA pequeño de interferencia (del inglés <i>small interference RNA</i>)
TGS:	silenciamiento génico transcripcional
VSP:	proteína variable de superficie

Introducción

Giardia lamblia (también denominada *G. duodenalis* o *G. intestinalis*) es un microorganismo eucariota unicelular que se desarrolla en el intestino delgado de vertebrados y es el agente causal de la patología denominada giardiasis, una parasitosis de gran relevancia epidemiológica y clínica a nivel global (Caccio 2008; Feng 2011).

Este parásito fue descubierto por el fundador de la microscopía, Antonie van Leeuwenhoek, en el año 1681 después de analizar muestras de su propia materia fecal. Sin embargo, en el año 1859, fue Lamb quien describió detalladamente a este protozoario, siendo *Giardia* reconocida como género en el año 1882 luego del aporte realizado por Kunstlerm (Adam, 2001).

Giardia se encuentra distribuida mundialmente y es el parásito intestinal predominante en humanos y animales domésticos (Thompson y col. 2000). Esta parasitosis es más prevalente en países no desarrollados donde presenta una prevalencia que va desde el 1% hasta el 50%, mientras que en países desarrollados varía entre el 0.4% hasta el 7% (Feng 2011). La incidencia de la infección en Argentina es altamente variable, dependiendo no sólo de las condiciones económicas y sanitarias, sino también de la presencia de áreas con aguas contaminadas. Las prevalencias varían del 3,7% en la zonas rurales de la provincia de Buenos Aires o del 5,8% de la ciudad de Neuquén hasta el 26% en una población pediátrica de Rosario y el 27,7% en algunas comunidades aborígenas de la provincia de Salta (Juárez 2013; Indelman 2011; Menghi 2007; Minvielle 2004; Soriano 2001). Si bien en las zonas endémicas los niños son más susceptibles a la infección, el desarrollo de esta parasitosis afecta a individuos de diferentes grupos etarios de una población (Feng 2011). Una gran parte de los niños afectados presentan desnutrición, lo cual interfiere en su normal crecimiento y desarrollo. Aunque el principal reservorio de *G. lamblia* es el hombre, ya sea enfermo o portador asintomático, la infección de animales domésticos en los últimos años se ha visto drásticamente aumentada (Thompson y col. 2000).

Giardia constituye uno de los representantes más primitivos del linaje eucariota, presentando inclusive ciertos caracteres que lo relacionan con el linaje procariota (Sogin y col. 1989; Adam 2001). Su ciclo de vida es simple y puede ser reproducido completamente en condiciones de laboratorio por lo que constituye un modelo esencial para el estudio de los mecanismos moleculares y celulares involucrados en la diferenciación celular (Carranza

y Lujan 2009).

Clasificación taxonómica

Giardia lamblia pertenece al reino Protista y es un representante de la clase Zoomastigofora, orden Diplomonadida. Recientemente se ha sugerido la formación de un nuevo reino denominado Archezoa (“fósiles biológicos”), abarcando a organismos originados antes de la aparición de la mitocondria como *Giardia spp* y *Trichomonas ssp* (Adam 2001). Las relaciones filogenéticas relacionadas a este organismo son controversiales. Dos grandes grupos de pensamiento proponen ideas opuestas; el primero de ellos propone que *Giardia* se encuentra en la base del linaje eucariota, mientras que el segundo indica que este organismo constituye uno de los linajes eucariotas que se ha adaptado a la vida microaerofílica, mucho después del origen endosimbiótico de la mitocondria (Morrison y col. 2007).

En términos evolutivos *Giardia* posee por un lado características indiscutiblemente primitivas, pero también elementos que reflejan funciones celulares universales de eucariotas y que han sido conservadas desde *Giardia* hasta el hombre.

Inicialmente la clasificación de este género fue basada en los huéspedes que eran infectados, pero las limitaciones de esta clasificación surgieron rápidamente porque los distintos linajes presentaban idéntica morfología. Basándose en caracteres morfológicos del cuerpo medio, se pudieron definir 3 especies (Filice, 1952): *Giardia agilis* la cual infecta anfibios, *Giardia muris* que infecta principalmente ratas y ratones, y *Giardia lamblia*, la cual infecta un amplio rango de huéspedes susceptibles, entre los que se encuentran humanos, perros, gatos y castores, entre otros. Con el pasar de los años, y en conjunción con el desarrollo de nuevas técnicas de laboratorio, se describieron 3 nuevas especies: *Giardia microti* (infectiva para ratas y ratones), y dos nuevas especies asociadas a la infección en aves: *Giardia psittaci* y *Giardia ardae* (Erlysen y Bemrick 1987; Erlysen, Bemricky col. 1990; Monis, Andrews y col. 1999).

Al observar que *G. lamblia* era capaz de infectar un amplio y variado grupo de huéspedes, la clasificación realizada en una primera instancia claramente enmascaraba una diversidad aún mayor. Mediante un análisis basado en aloenzimas, se propuso un

reagrupamiento que involucra dos grandes grupos: el grupo A (también conocido como *Polish*) y el grupo B (también conocido como *Belgian*) (Mayrhofer, Andrews y col. 1995). Estos grupos infectan humanos y se los suele denominar como cepas WB y GS respectivamente. Ambos son utilizados en diversos estudios, tanto inmunológicos como bioquímicos, siendo el grupo A mayoritariamente utilizado en estudios *in vitro*, mientras que el grupo B es utilizado en estudios de infección ya que el mismo incluye organismos capaces de infectar tanto ratones como humanos. Otros cuatro grupos han sido descriptos procedentes de aislamientos en perros (grupos C y D), animales ungulados (grupo E), gatos (grupo F) y ratas (grupo G) (Monis y col. 2009). Sin embargo, evidencias genéticas diferentes dentro de los subgrupos presentes en la “especie” *Giardia lamblia* sugieren que estos subgrupos en realidad podrían constituir especies diferentes, por lo que los argumentos utilizados en la clasificación de *Giardia* aun no han sido consensuados y deberían ser considerados nuevamente (Monis y col. 2009).

Giardiasis

La patología causada por *G. lamblia* se denomina giardiasis. La misma, reviste una gran importancia clínica y epidemiológica, siendo una de las infecciones parasitarias intestinales más comunes del mundo (Adam 2001; Ankarklev 2015). La prevalencia de esta enfermedad varía entre 2-5% en países desarrollados y 20-30% en países en desarrollo (Thompson, 2000). Dentro de la estructura etaria de una población, los infantes son considerados como los individuos con más probabilidad de desarrollar la enfermedad (Adam 2001). Según la Organización Mundial de la Salud, existen alrededor de 200 millones de personas con giardiasis sintomática en Asia, África y América latina, siendo reportados 500 mil nuevos casos cada año (WHO, 1996) y se estima que sigue causando alrededor de 280 millones de infecciones por año (Lane 2002). La transmisión de la enfermedad se puede producir de múltiples maneras, siendo la ingestión de los quistes presentes en comidas o aguas contaminadas con materia fecal la principal vía de contaminación, y constituyendo el origen de brotes epidémicos. Además, la dispersión de esta parasitosis se ve favorecida gracias a la presencia de viajeros en zonas donde este parásito es endémico, ya que una persona asintomática puede desencadenar un brote

epidémico al llevar la infección hacia una población que no ha estado expuesta al parásito (Chute 1987).

Diferentes síntomas se hacen evidentes dependiendo de varios factores, tales como el estado del sistema inmune del hospedador en el momento de la infección, la virulencia de la cepa, la dosis infectante y la duración de la parasitosis. La *infección asintomática* representa la forma más común de la enfermedad y se presenta mayormente en adultos. Sin embargo, la relación hospedador-parásito que lleva a una persistencia en la infección, sin observarse los síntomas de la misma, aún no se conoce (Adam, 2001; Luján y Svärd 2011). Los síntomas predominantes de la *giardiasis* aguda son diarrea, náuseas, dolor abdominal y frecuentemente pérdida de peso, siendo éste el tipo de giardiasis que generalmente se presenta en viajeros. Aunque en la mayoría de los individuos saludables la infección es limitada, una proporción (estimada entre el 30-50%) puede contraer *giardiasis crónica*, la cual está asociada a dos o más años de diarreas intermitentes acompañadas de debilidad, dolor de cabeza, deshidratación y pérdida continua de peso (Thompson y col. 1993; Adam 2001). Una característica de la giardiasis en todas sus manifestaciones clínicas es la presencia de cuadros clínicos de mala absorción a nivel intestinal, llevando a una insuficiencia nutricional (Korman 1990). Esto puede causar un retraso en el crecimiento en niños aún en ausencia de síntomas gastrointestinales (Fraser y col. 2000).

Los síntomas clínicos mencionados son fundamentalmente debidos a que *Giardia* produce daño en la mucosa intestinal, sin invadir la misma. La fisiopatología de la giardiasis implica una pérdida difusa en la longitud de las microvellosidades del epitelio intestinal que contribuye al deterioro de las enzimas del borde del cepillo y a una disminución en la absorción de electrolitos, nutrientes y agua (Farthing, 1997; Katelaris y col 1995).

La mayoría de los casos de giardiasis pueden confirmarse y diagnosticarse por análisis microscópico de materia fecal. La forma quística es relativamente fácil de observar, sobre todo cuando el paciente no posee diarrea, mientras que la forma trofozoítica puede hallarse casi exclusivamente cuando el paciente presenta diarrea aguda (McHardy y col. 2014).

En la actualidad las infecciones de *Giardia* son controladas por medicamentos, especialmente aquellos derivados de la familia 5-nitroimidazol, tales como metronidazol

(Flagyl), mebendazol/trinidazol (TRUcompuesto), furasolidona (Furoxone) y tinidazolo (Tindamax) (Miyamoto y Eckmann 2015). Estas drogas funcionan generando radicales libres que son tóxicos para la célula. Otras drogas de uso común son las que desestabilizan el citoesqueleto del parásito, tales como benzimidazol y albendazol (Gardner y Hill, 2001). Aunque estos medicamentos son económicos y efectivos para el tratamiento de la giardiasis, la utilización de los mismos ha sido cuestionada debido a que producen varios efectos colaterales en el paciente. Por otro lado, un abuso en su utilización ha inducido la generación de cepas resistentes, cuya existencia se ha reportado en reiterados casos clínicos (Gardner y Hill, 2001; Miyamoto y Eckmann 2015).

Biología celular de *Giardia*

El ciclo de vida

El ciclo de vida de *Giardia* se caracteriza por ser simple y no necesitar huéspedes intermediarios entre los diferentes estadios. El mismo está constituido por dos formas que presentan diferencias tanto morfológicas como bioquímicas (Adam 2001; Carranza and Lujan 2009).

El ciclo de vida (Figura 1) comienza con la ingestión de quistes, que son las estructuras de resistencia. Al llegar al estómago y encontrarse con un medio ácido, estas estructuras comienzan a diferenciarse en trofozoítos que es la forma vegetativa del parásito y que se encuentra asociada a los síntomas. A este proceso se lo denomina *desenquistamiento*. Una vez en el intestino, los trofozoítos se dividen por fisión binaria colonizando el epitelio intestinal y bloqueando de esta manera la absorción de los nutrientes por parte del huésped. Al ir descendiendo por el tracto intestinal se encuentran con un ambiente carente en colesterol y en donde el pH es más alto, lo que dispara el proceso de *enquistamiento* (Lujan y col 1996). Los quistes son luego liberados con las heces y los mismos cierran el ciclo de vida cuando son ingeridos nuevamente por huéspedes susceptibles (Adam, 2001; Carranza y Lujan 2010). Estos cambios bioquímicos y morfológicos permiten al parásito sobrevivir a condiciones ambientales no favorables y de esta manera propagarse entre individuos susceptibles. Estudios moleculares han permitido determinar las condiciones bajo las cuales este ciclo de vida puede ser completamente

reproducido *in vitro* (Boucher and Gillin 1990), por lo que los cambios que se encuentran involucrados pueden ser estudiados.

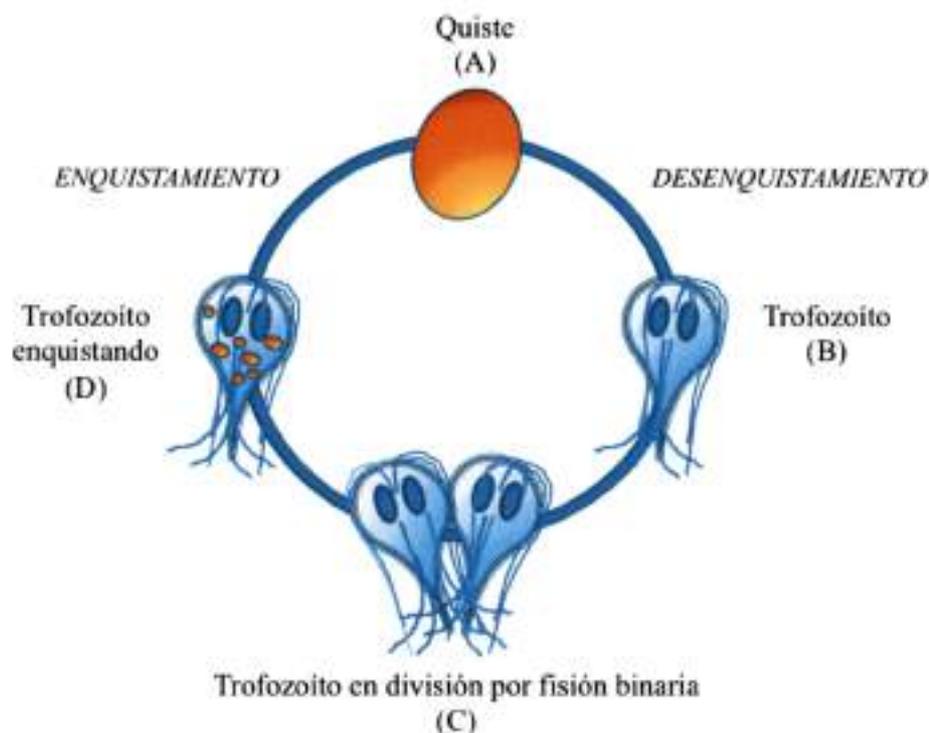


Fig.1 - Ciclo de vida de *Giardia lamblia*. La infección por *Giardia* comienza con la ingestión de los quistes del parásito (A). La exposición de los quistes al ambiente ácido del estómago induce el proceso de desenquistamiento (B), mediante el cual los quistes se diferencian a la forma vegetativa del parásito que son los trofozoitos. En el intestino, los trofozoitos se dividen por fisión binaria (C), colonizando y adheriéndose al epitelio intestinal, produciéndose de esta manera un bloqueo de la absorción de nutrientes. Al ir descendiendo por el intestino, el ambiente pobre en colesterol y con mayor pH induce el proceso de enquistamiento (D), durante el cual los trofozoitos transportan vesicularmente proteínas de enquistamiento hacia su superficie. Una vez formados los quistes (A), éstos son liberados al exterior con las heces, pudiendo luego ser transmitidos a un nuevo huésped y cerrando así el ciclo de vida del parásito.

El trofozoito

Luego de producirse el desenquistamiento, cada quiste viable es capaz de liberar 2 células vegetativas denominadas *trofozoitos*, las cuales se dividirán luego por fisión binaria para colonizar el epitelio intestinal del organismo huésped. (Figura 2)

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.

La superficie del trofozoíto está cubierta por sólo un representante de una familia de proteínas homólogas denominadas proteínas variables de superficie (VSPs por sus siglas en inglés Variant-specific Surface Proteins). Estas proteínas son reconocidas por el sistema inmunológico del huésped y constituyen una interfaz entre el parásito y el organismo hospedador (Adam 2001; Prucca y Lujan 2009).

Giardia posee dos núcleos por célula, recientemente se ha presentado evidencia de la presencia de nucléolos gracias a estudios realizados con microscopía electrónica de transmisión y confocal (Tian, Yang y col. 2010). Ambos núcleos del parásito presentan la misma cantidad de material genético, son transcripcionalmente activos y su replicación es simultánea, encontrándose ambos núcleos simétricos respecto al eje longitudinal (Yu, Birky y col. 2002). Respecto a la ploidía, algunos autores presentan resultados controversiales, proponiendo tanto que el parásito posee dos núcleos haploides (Kabnick and Peattie 1990) como que ambos núcleos son poliploides presentando al menos cuatro copias de cada cromosoma por organismo (Adam 2000). Se han identificado y caracterizado algunos genes que presentan intrones (Nixon y col. 2002; Russell y col. 2005), pero la ausencia de los mismos es una característica de este organismo unicelular (Adam 2001; Carranza y Lujan 2009). Recientemente se ha reportado que ciertos genes presentes en el genoma de *Giardia* son transcritos en forma parcial desde diferentes porciones no contiguas del genoma y luego son unidos mediante la acción del espliceosoma, proponiendo de esta forma una nueva función para este complejo de proteínas en este parásito primitivo (Kamikawa y col. 2011; Blumenthal, 2011). Tanto las regiones intergénicas, como así también las regiones no codificantes 5' y 3' de los genes de este parásito son muy cortas, comenzando la transcripción en nucleótidos muy cercanos al inicio de traducción. Esta ausencia casi total del regiones transcritas pero no traducidas (0-14 nt UTR) es otra característica de los genes de *Giardia*. Respecto a la traducción de los ARN mensajero, la maquinaria involucrada es diferente a la de otros organismos eucariotas, tal vez relacionado al hecho que existan regiones 5' y 3' no traducidas muy cortas (Yu y col. 1998; Adam 2001; Luján y Svård 2011). Sólo la presencia de un capuchón 5' y el codón de iniciación generan una estructura capaz de promover la traducción de los ARN mensajeros (Li y Wang 2004).

El citoesqueleto de *Giardia* está constituido por complejas estructuras

microtubulares, y está involucrado en la virulencia del parásito ya que está asociado a procesos de locomoción y adhesión celular. Incluye cuatro pares de flagelos, un disco ventral, un cuerpo medio y una estructura denominada funis (Elmendorf y col. 2003).

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 2). Estas estructuras estarían involucradas en procesos de desenquistamiento, ya que son las primeras en surgir fuera de la estructura quística (Buchel y col. 1987).

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 2). 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 y col. 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 (Solari y col. 2003; Benchimol 2004). 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 progénesis del disco ventral (Solari y col. 2003; Piva y Benchimol 2004).

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 trofozoitos (Benchimol y col. 2004).

En los trofozoítos de *Giardia*, el retículo endoplasmático (RE) fue caracterizado a partir del descubrimiento de una chaperona residente en esta estructura subcelular, la GRP78/BiP (Lujan y col. 1996; Soltys y col. 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 (Knodler y col. 1999; McArthur y col. 2001; Davids y col. 2004). El RE se encuentra involucrado durante 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 (Gillin y col. 1996; Lujan y col. 1996; Lujan y col. 1997; Gottig y col. 2006).

En proximidad a la membrana plasmática se encuentran unas estructuras subcelulares denominadas vesículas periféricas (PVs). 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 y col. 2002) o formación de la pared del quiste (Touz y col. 2002).

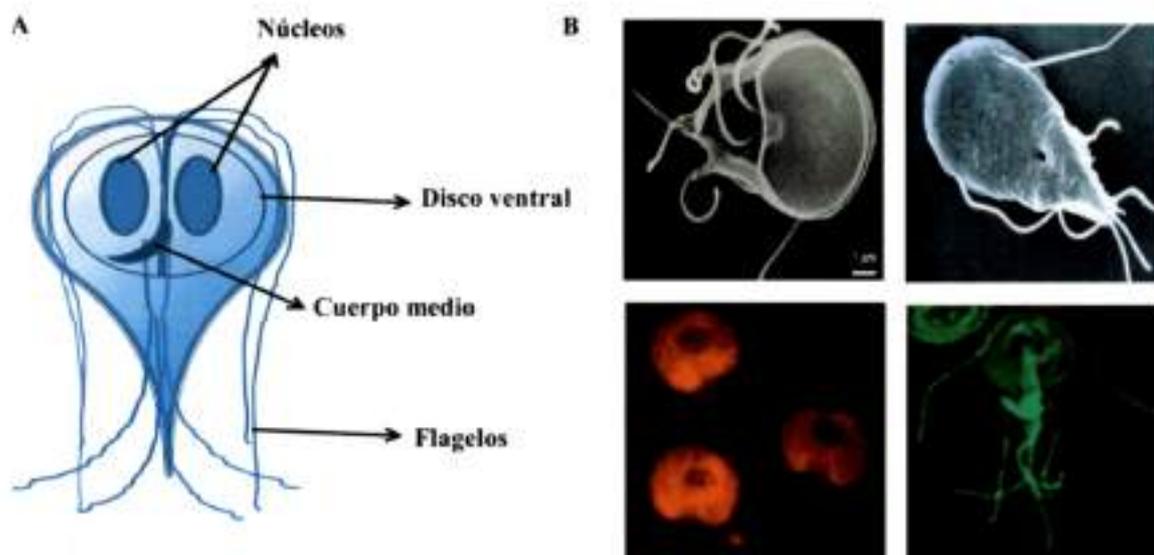


Fig. 2 - El trofozoito de *Giardia lamblia*. A. Diagrama general con las estructuras celulares de un trofozoito. B. **Panel superior**, Microscopía electrónica de barrido de un trofozoito visto por su cara ventral (izquierda) y dorsal (derecha). **Panel inferior**, Inmunofluorescencia utilizando anticuerpos monoclonales anti-giardina que permite visualizar el disco ventral (izquierda) y anti-tubulina que indica los flagelos (derecha).

Las vesículas específicas de enquistamiento (ESVs) son estructuras subcelulares que se desarrollan durante el proceso de diferenciación celular a quiste (Reiner y col. 1990; Faubert y col. 1991; McCaffery y col. 1994; McCaffery y Gillin 1994). 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 y col. 2002), asemejándose de esta manera a los gránulos de secreción regulada característicos de eucariotas superiores.

A pesar que existen en *Giardia* mecanismos de transporte constitutivo y regulado, es controvertida la presencia del aparato de Golgi, organela responsable del procesamiento y distribución de proteínas (McCaffery y Gillin 1994; Lanfredi-Rangel y col. 1999; Marti y Hehl 2003). 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* (Luján y col. 1995). No obstante, un estudio realizado por Elías y colaboradores indicaría que *Giardia* no posee un aparato de Golgi típico (Elías y col. 2008), por eso otros estudios son necesarios para clarificar esta controversia.

El quiste

Esta forma celular del parásito se caracteriza por ser resistente a largos períodos 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. 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 (Erlandsen y col. 1989; Erlandsen y col. 1996; Chavez-Munguia y col. 2004). 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) (Figura 3).

Esta capa filamentosa esta formadas por un 63% de carbohidratos y un 36% de

proteínas (Jarroll y col. 1989; Manning y col. 1992; Adam 2001). El azúcar predominante es un polímero de β 1,3-N-acetil-D-galactosamina (Jarroll y col. 1989), mientras que los componentes proteicos mayoritarios son las denominadas proteínas de la pared del quiste 1, 2 y 3 (CWP1, CWP2 y CWP3) (Lujan y col. 1995; Mowatt y col. 1995; Gillin y col. 1996; Sun y col. 2003).

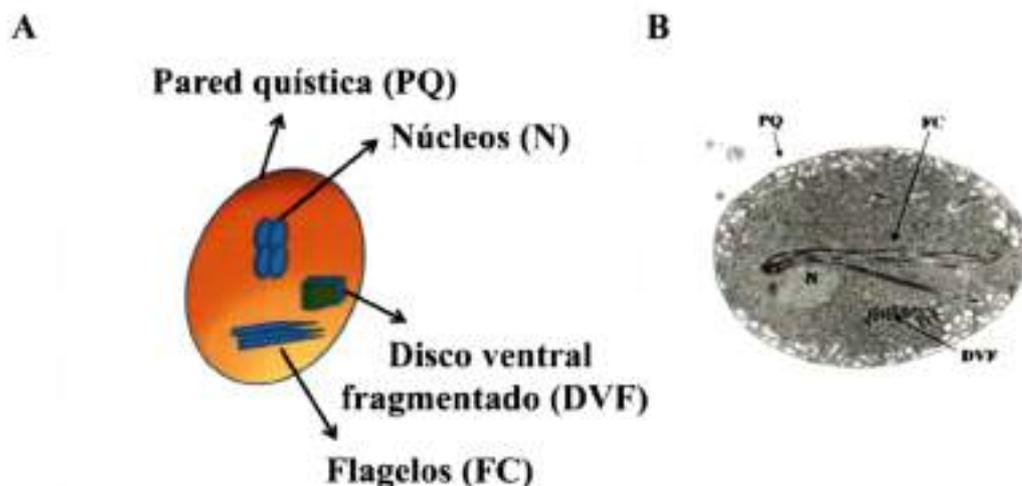


Fig. 3 - El quiste de *Giardia lamblia*. A. Esquema con las estructuras subcelulares del quiste de *Giardia lamblia*. B Microscopía electrónica de transmisión de un quiste. PQ, pared quística; FC, flagelo caudal; DVF, disco ventral fragmentado.

Variación antigénica

Durante una infección parasitaria, la capacidad de generar células con perfiles fenotípicos diferentes aumenta notablemente la probabilidad que al menos una pequeña población de organismos parásitos sobreviva a la acción del sistema inmunitario y permita perpetuar la especie. En parásitos protozoarios la capacidad de modificar el fenotipo es generada mediante un mecanismo denominado *variación antigénica*, el cual consiste en la expresión de un determinante antigénico en su superficie y su capacidad para, posteriormente, cambiarlo por otro antígeno distinto.

Si bien este mecanismo presenta particularidades en los diferentes organismos

donde se ha descrito, el mismo presenta los siguientes puntos que lo caracterizan como tal:

- Presencia de antígenos inmunogénicos y reducida reacción inmunológica cruzada.
- 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 huéspedes. 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 variación antigénica 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 (Turner, 1999; Johnson y col. 2012; Hovel-Miner 2015).

Sin embargo, no sólo organismos parásitos como *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei* o *Giardia lamblia* sufren variación de sus proteínas de superficie, sino también organismos de vida libre como *Paramecium* o *Tetrahymena* (Nash y col. 1992a; Scherf y col. 1998; Donelson, 2000; Kusch y Schmidt, 2001). A pesar que estos organismos no deben enfrentar una respuesta inmunológica, 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 censando los cambios ambientales y permitiendo al organismo expresar aquella molécula que favorezca su supervivencia (Kusch y Schmidt, 2001). Asimismo es posible que la presencia de este mecanismo refleje su condición parasitaria primitiva.

En *Giardia* la variación antigénica fue descubierta como un fenómeno espontáneo *in vitro* observándose diferencias en los patrones de marcado superficial al incubar diferentes aislados de células con antisueros específicos (Nash y col. 1988; Nash y

Aggarwal, 1986; Nash y Keister, 1985) y mediante la generación de anticuerpos monoclonales (mAb) que reconocen epitopes superficiales de sólo algunos trofozoitos en una población determinada (Nash y Aggarwal; 1986). Años más tarde, se demostró que este proceso de variación antigénica también ocurría durante el transcurso de la infección en humanos y animales de laboratorio (Muller y Gottstein, 1998; Nash y col. 1990; Aggarwal y Nash, 1998). La exposición de trofozoitos a anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente una proteína variable de superficie (VSP) conduce a la agregación de los mismos y a una supuesta muerte celular (Heyworth, 1992; Nash y Aggarwal, 1986; Touz 2005). Los trofozoitos que sobreviven a este ensayo no son reconocidos por este anticuerpo monoclonal y por lo tanto son capaces de generar una población que expresa una proteína variable de superficie diferente a la original, demostrando de esta forma el mecanismo de variación antigénica que caracteriza a este parásito (Nash y col. 1988; Nash y Aggarwal, 1986).

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

Aunque se ha informado que el proceso de variación antigénica 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 inmunológica (Nash, 2002; Bienz y col. 2001). La frecuencia de recambio de una VSP por otra es dependiente no sólo del aislamiento con el que se trabaje (WB o GS), 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 por el aislamiento GS y 12-13 generaciones por el aislamiento WB (Nash y col, 1990).

Proteínas variables de superficie (VSPs)

Las VSPs constituyen una familia de proteínas integrales de membrana tipo I (Smith y col. 1998). Estas proteínas de superficie muestran gran variabilidad en su peso molecular

(entre 30 y 200 kDa), todas poseen un pI de ~ 5 , son ricas en cisteína, y contienen generalmente un 11-12 % de estos residuos en motivos Cys-X-X-Cys (donde X representa cualquier aminoácido) dispuestos a lo largo del dominio N-terminal extracelular (Gillin y col. 1990; Nash y col. 1992a). Mediante estudios bioinformáticos, se ha determinado que todos los integrantes de la familia de VSPs que se encuentran codificados en el genoma de *Giardia* presentan un péptido señal. Su extremo C-terminal está compuesto por una región altamente conservada de 38 aminoácidos (90% homología) que incluye un dominio transmembrana apolar (23-25 aminoácidos) inmediatamente seguido por un dominio de sólo cinco aminoácidos (CRGKA) localizado en el citoplasma del parásito (Gillin y col. 1990; Mowatt y col. 1991), este dominio se encuentra conservado en todas las proteínas pertenecientes a esta familia (Figura 4).

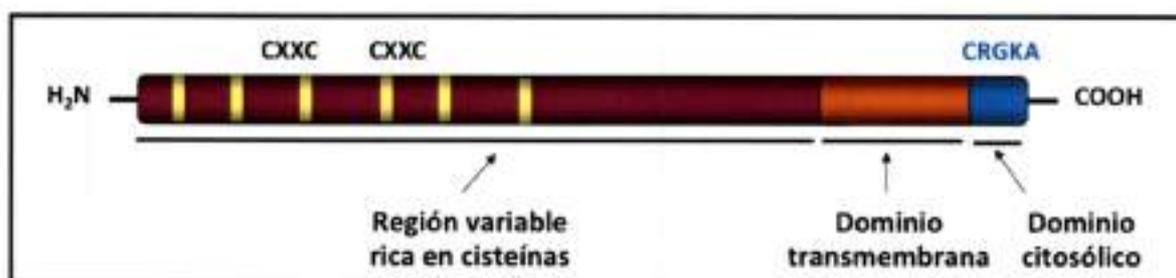


Fig. 4 – Estructura de una proteína variable de superficie (VSP). El dominio extracelular N-terminal de las VSPs varía en tamaño entre 20-200 kDa y es rico en cisteínas, presente en un 11-12% en motivos CXXC. El dominio citosólico C-terminal es pequeño (5 aminoácidos) y está altamente conservado en todas las proteínas de la familia VSP.

El grado de homología que existe entre los diferentes genes que codifican para proteínas variables de superficie varía desde la completa duplicación hasta la presencia de regiones de conservación total seguida por regiones de completa divergencia (Adam, 2010). Estas observaciones sugieren que el amplio repertorio de VSPs se originó por una combinación de eventos de duplicación, seguidos por mecanismos de divergencia y recombinación (Adam, 2000). A pesar que todos los genes VSPs parecen estar formando “clusters”, no existe en la actualidad evidencia que indique que estos genes estén ligados transcripcionalmente (Adam, 2000).

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

- Las secuencias 5' UTR de las VSPs son extremadamente cortas variando entre 0 y 14 nucleótidos (Mowatt y col. 1991; Adam, 2000).
- No poseen intrones (Adam, 2000).
- Las secuencias "promotoras" son considerablemente cortas y no poseen homología entre ellas (Adam, 2000).
- Presentan un sitio de poliadenilación 5'-AGUAAA-3' en la región 3' no codificante (Adam, 1991). Esta secuencia jugaría un papel importante en la estabilidad del ARNm (Svard y col. 1998). Esta misma secuencia se encuentra conservada en genes de tripanosomas procíclicos y está implicada en la estabilidad y regulación de la proteína de superficie PARP (Pays y col. 1994).
- Poseen en su extremo N-terminal una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido señal que facilita la translocación de estas proteínas a través del RE y su posterior transporte hacia la membrana plasmática (Nash y col. 1992a).
- Se encontrarían potencialmente modificadas a nivel post-traducciona
- La mayoría de las VSPs poseen un sitio consenso de N-Glicosilación (Luján y col. 1995; Hiltbold y col. 2000), sin embargo la presencia de esta modificación post-traducciona sigue siendo un tema en controversia (Papanastasiou y col. 1997).
- Aunque los estudios iniciales indicaban que no existían lípidos asociados a las VSPs (Das y col. 1994), la palmitoilación de VSPs fue reportada recientemente (Touz y col. 2005; Hiltbold y col. 2000; Papanastasiou y col. 1997). Se ha propuesto que la unión de palmitato se da en el extremo C-terminal de la proteína mediante un enlace tioéster, sugiriendo de esta manera que esa posición favorece el anclaje de la VSP a la membrana plasmática.
- Poseen un tetrapéptido GGCY altamente conservado. Habitualmente, esta secuencia forma parte de un motivo más extenso ($GXCX_2X_8GGCYX_{4-5}PGX_3C$) que se localiza río arriba de la zona C-terminal conservada, aunque también se han encontrado secuencias GGCY adicionales ubicadas en la porción N-terminal (Nash y col. 1995). La presencia de estos motivos conservados en diversas regiones de las VSPs refleja su importancia funcional o estructural aunque la misma no ha podido

ser dilucidada hasta el momento.

- Incluyen motivos de unión a zinc y otros metales. Las VSPs poseen motivos de unión a metales, análogos a los dominios LIM y RING hallados en eucariotas superiores (Gill, 1995; Borden, 2000). Los dominios LIM se caracterizan por su capacidad de unir metales pesados, principalmente átomos de zinc. Además, estas proteínas poseen a lo largo de su secuencia motivos adicionales (CXXCX_nCXXC) que, conjuntamente con los dominios "CXXC", intervienen en la unión de átomos de zinc (Nash y Mowatt, 1993; Nash y col. 1995; Luján y col. 1995). En células eucariotas superiores, estos motivos se encuentran formando parte de proteínas intracelulares de unión a ADN o que actúan en el control de la transcripción o en la reparación del ADN (Gill, 1995). *Giardia* es el único organismo conocido que posee un motivo de unión a zinc en proteínas de superficie (Nash y Mowatt, 1993). Cuando los trofozoítos se encuentran adheridos a la pared intestinal del huésped, el secuestro de átomos de zinc por las VSPs podría ayudar a la inhibición de enzimas dependientes de zinc como las carboxipeptidasas (Nash y Mowatt, 1993) o competir con el huésped por este metal causando la deficiencia de zinc previamente observada en pacientes con giardiasis (Udomkesmalee y col. 1992). Aunque la unión de átomos de zinc ha sido demostrada *in vitro* (Nash y Mowatt, 1993; Luján y col. 1995) y reviste importancia a nivel biológico, la participación de este motivo en la unión de zinc debe ser demostrado *in vivo*.
- Contienen un número variable de dominios CXXC. La característica distintiva de las proteínas de esta familia es la presencia de dominios de tetrapéptidos "CXXC" en su región N-terminal. No se han observado residuos cisteínas que presenten un menor espaciamiento (CXC o CC) entre los mismos. Estos dominios se encuentran formando unidades repetitivas cuyo número de copias varía de una proteína a otra, resultando en diferencias en su peso molecular y posiblemente también en la antigenicidad entre los miembros de esta familia de proteínas (Mowatt y col. 1994). Esta región extracelular de las VSPs constituye la interfaz entre el parásito y su ambiente extracelular.

A diferencia del transporte regulado de proteínas que ocurre durante el proceso de

diferenciación a quiste, las VSPs son transportadas a través del RE y secretadas constitutivamente hacia la membrana plasmática durante todo el ciclo de vida del parásito (McCaffery y col. 1994).

Se ha observado que estas proteínas son liberadas al medio de cultivo por el procesamiento proteolítico en un dominio conservado que se encuentra precediendo el dominio transmembrana. Posiblemente, el segmento transmembrana remanente sería internalizado y degradado mediante la maquinaria endocítica de la célula. Esto podría constituir un requerimiento esencial para el reciclaje o el reemplazo de VSPs que se produce en el mecanismo de variación antigénica (Papanastasiou y col. 1996). Durante el enquistamiento, estas proteínas de superficie se localizan en el compartimiento lisosomal o PVs (Svard y col. 1998) ya que la presencia de la pared de glicoproteína del quiste impide su liberación al medio extracelular (Svard y col. 1998). Sin embargo, durante el proceso de desenquistamiento, el nivel de ARNm de la VSP expresada se ve disminuido y se observa el aumento de transcritos de una nueva VSP (Svard y col. 1998). Basados en estas observaciones, se ha propuesto que el mecanismo de variación antigénica daría a lugar a la generación de un repertorio de trofozoítos expresando diferentes VSPs y proporcionaría a *Giardia* la diversidad no sólo para colonizar diversos microambientes y expandir el rango de huéspedes, sino también para producir infecciones crónicas y recurrentes en aquellos humanos donde ya existe una respuesta inmunológica (Nash, 1987).

Respuesta inmunológica a giardiasis

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 digestivo, 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 2008; Halliez 2013).

Las células del epitelio intestinal y las del sistema inmunitario pueden producir monóxido de nitrógeno (NO), un gas que tiene diferentes efectos fisiológicos sobre el organismo, entre los cuales una función inmuno-modulatoria y una citotóxica. La enzima encargada de la producción del NO es llamada NO sintasa (NOS) y se encuentra en tres distintas isoformas: la neuronal (nNOS); la inducible (iNOS) y la epitelial (eNOS). La principal isoforma que se encuentra activa en el epitelio intestinal es la iNOS (Müller 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 inmunitario innato que parecen tener una acción clave en el control de la giardiasis son los mastocitos. 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 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 la células dendríticas (DC). Por un lado los trofozoítos son débiles activadores de las DC, inhibiendo su capacidad de producir citoquinas pro-inflamatorias (Kamda 2009; Obendorf 2013); por otro lado lisados celulares de *Giardia* pueden activar las DC 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 monoclonales 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 un debilitamiento de la membrana plasmática del trofozoíto (Hemphill y col. 1996).

El desarrollo de una respuesta inmune en organismos infectados con *Giardia* permite la erradicación de la infección, indicando la presencia de un efectivo mecanismo de defensa en el huésped (Nash y col. 1987). Se ha demostrado que el isotipo A de inmunoglobulinas es requerido para la eliminación efectiva del parásito (Langford y col. 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 y col. 1989). Además, se mostró que la IgA inhibe la motilidad y adhesión de *Giardia* al intestino (Langford y col. 2002). Experimentos llevados a cabo en ratones carentes del receptor polimérico de las Ig, y que por ende no pueden secretar las IgA en el lumen intestinal, han demostrado que se producen infecciones crónicas sólo infectando con *Giardia muris* y no con *Giardia lamblia*, sugiriendo que *G. lamblia* podría ser más susceptible a los mecanismos de defensa anticuerpos-independientes en comparación con *G. muris* (Davis 2006). Por otra parte se ha observado que la secreción del isotipo M de las inmunoglobulinas no tiene ningún efecto en la eliminación de la giardiasis, a pesar que la misma también es secretada normalmente en el lumen intestinal (Langford y col. 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 indican que ambos componentes del sistema inmune juegan un papel importante en el control de la infección (Faubert, 2000; Singer 2000) y que la importancia de las células T CD4⁺, en la eliminación de la infección en ratones, sea fundamental, sugiriendo que estas células podrían participar a la activación, maduración y diferenciación de las células B para poder producir IgA más específicas y eficientes (Singer 2000).

Estudios en animales indican que luego de 1-2 semanas de llevada a cabo la infección con trofozoítos de la cepa GS-M/H7 que expresan la VSP H7, solo se pueden

aislar trofozoitos que no son reconocidos por el anticuerpo monoclonal específico para esta VSP, indicando la importancia de la generación de anticuerpos en el control de la enfermedad y la variación antigénica (Stager y Muller, 1997; Singer y Nash, 2000).

El mecanismo de ARN de interferencia

Debido a la cantidad creciente de estudios llevados a cabo en los últimos años, se postula que virtualmente casi todos los animales, plantas y hongos utilizan pequeñas moléculas de ARN para regular meticulosamente la expresión génica (Cerutti y Casas-Mollano, 2006).

Experimentos realizados en plantas indicaron que cuando se introducen copias adicionales de genes codificantes para el color de la flor, las flores de generaciones subsecuentes no presentan coloración, fenómeno que fue denominado “co-supresión” (Napoli y col. 1990). Este fenómeno fue también observado en el hongo *Neurospora crassa* y se lo denominó “quelling” (Cogoni y col. 1996). Más tarde, en ensayos realizados utilizando el nematodo *Caenorhabditis elegans* el mismo mecanismo fue observado, siendo en este caso denominado ARN de interferencia (ARNi) (Fire y col. 1998).

Con el paso de los años, un gran número de evidencia indica que las moléculas de ARN de cadena doble (ARNdc) juegan un papel muy importante en el silenciamiento de la expresión génica, interviniendo en la inhibición de la traducción de los ARN mensajeros, en la destrucción de los mismos, como así también en el remodelamiento de la cromatina y la eliminación de ADN (Hannon, 2002).

El ARNi es un mecanismo de regulación de la expresión génica que involucra pequeñas moléculas de ARN. Estas son capaces de disparar el silenciamiento específico de genes basado en la homología entre sus secuencias (Yang y Nowotny, 2009).

Básicamente, moléculas de ARNdc son cortadas en pequeños fragmentos de un tamaño restringido, las cuales son capaces de reconocer moléculas de ARNm que presentan homología de secuencia, disparando la destrucción de las mismas o la inhibición de su traducción. Aunque el propósito final del mecanismo de ARNi es el de la inhibición de la expresión génica específica, los mecanismos por los cuales estos ARN pequeños se originan presentan ciertas diferencias.

Cuando se transcriben moléculas de ARN que presentan una estructura secundaria particular de tallo y bucle, las mismas son reconocidas en el núcleo por una enzima de la familia de ARNasas III denominada Drosha. Esta produce cortes en la molécula primaria (denominada pri-microARN) y genera una segunda molécula de ARN de 70 nucleótidos denominada pre-microARN. Esta molécula es luego transportada al citoplasma a través de poros nucleares específicos que están formados por una proteína denominada Exportina-5. Ya en el citoplasma, los pre-microARNs son sustrato de la actividad de una segunda ARNasa III denominada Dicer, generando moléculas de micro ARN maduras (miRNAs, 21-26 nucleótidos de largo) que serán capaces de reconocer ARN mensajeros que presenten homología parcial con ellos e inhibir su traducción (Filipowicz y col. 2005; Tang, 2005).

Un segundo grupo de ARN pequeños son denominados ARN pequeños interferentes (siRNAs) y son generados mediante una vía metabólica diferente. En presencia de ARN aberrantes o exógenos la enzima ARN polimerasa ARN-dependiente (RdRp) puede sintetizar ARN doble hebra utilizando tales ARN sentidos como moldes (Cogoni y col. 1999; Fagard y col. 2000; Prucca y col. 2008). Una vez que se sintetizan ARNs de cadena doble en el citoplasma, los mismos son reconocidos por la ARNasa III Dicer y cortados en pequeñas moléculas de 21 a 16 nucleótidos denominados siRNAs. Estas moléculas son capaces de inhibir la expresión específica de genes ya que desencadenan la destrucción de ARNm que presentan homología de secuencia total con ellos.

Los productos de degradación son ARN pequeños de doble cadena que contienen un grupo fosfato en sus extremos 5' y dos nucleótidos simple cadena en sus extremos 3' con un grupo hidroxilo (MacRae y col, 2006). Estas características estructurales son de crucial importancia para la continuidad del proceso de silenciamiento ya que ARN pequeños con extremos romos o que carecen del grupo fosfato en su extremo 5' no son capaces de producir silenciamiento (Nowotny y Yang, 2009).

Luego de que se han generado los siRNAs o miRNAs, estos son incorporados dentro de un complejo multiproteico que contiene proteínas de la familia Argonauta (Ago) denominados Complejos de Silenciamiento Inducidos por ARN (RISC). En estos complejos, los ARN pequeños de doble cadena son separados y solo una de las cadenas (cadena guía) permanece en el complejo y servirá como molde para el reconocimiento de

secuencias homólogas; la cadena remanente es destruida (cadena pasajera) (Tomari y Zamore, 2005).

La diferencia principal entre siRNAs y miRNAs radica en que estos últimos no presentan homología total de secuencia con sus moléculas de ARNm blanco, pudiendo inhibir su expresión mediante el bloqueo de su traducción (Carthew y Sontheimer, 2009). De esta manera, los miRNAs son capaces de controlar genes que se encuentran relacionados entre ellos y presentan homología parcial entre sus secuencias, principalmente en la región 3' no traducida. Se ha propuesto que la enzima ARN polimerasa ARN-dependiente juega un papel esencial en la amplificación de la señal disparada por ARN de cadena doble, permitiendo de esta manera que la señal se propague por el organismo. Esta enzima también es encargada de mantener el silenciamiento aun en ausencia de las moléculas de miARN que desencadenaron el silenciamiento (Agrawal y col. 2003).

Se ha observado en varios organismos que el mecanismo de ARN de interferencia, además de estar involucrado en el silenciamiento génico post-trascricional, está íntimamente relacionado con las modificaciones post-traduccionales de las histonas, como las metilaciones, regulando la estructura de la cromatina y permitiendo que los complejos primarios de transcripción de genes puedan o no expresar la información (Matzke y Birchler, 2005; Buhler y col. 2006; Volpe y col. 2002; Irvine y col. 2006; Woolcock y col. 2010; Halic y col. 2010; Marker y col. 2010; Foda 2015). Este mecanismo de ARN interferencia no convencional es llamado Silenciamiento Génico Transcriptional (TGS) y opera mediante distinto mecanismo moleculares según el organismo (Burger y Gullerova 2015). Por ejemplo se ha reportado que en *Schizosaccharomyces pombe* la ARN polimerasa ARN dependiente (RpRd) sintetiza una doble hebra de ARN usando directamente como molde el ARN mensajero durante su transcripción. Como anteriormente explicado la doble hebra viene degradada por Dicer en siARN, los cuales serán luego incorporados en un complejo multiproteico que contiene la proteína Argonauta llamado RITS (Silenciamiento Transcriptional inducido por ARN) que reconocerá la secuencia de ARN homóloga en el transcripto naciente y causará el reclutamiento de enzimas encargadas de metilar la lisina 9 de la histona 3, causando silenciamiento génico de tipo epigenético (Buhler y col. 2006; Volpe y col. 2002; Irvine y col. 2006; Woolcock y col. 2010; Halic y col. 2010).

ARN de Interferencia y Variación Antigénica en *G. lamblia*

Como previamente dicho, la variación antigénica es un sistema que permite estratégicamente la supervivencia de ciertos agentes patógenos, como es el caso de *Plasmodium falciparum* (agente causal de la Malaria), *Trypanosoma brucei* (agente causal de la enfermedad del sueño), entre otros; razón por la cual la regulación molecular del mismo es objeto de estudio de muchos laboratorios (Deitsch y col. 2009; Prucca y Luján, 2009).

Inicialmente se postuló que este mecanismo en *Giardia* era regulado a nivel transcripcional, basado en el hecho de que un trofozoíto expresaba sólo una VSP en su superficie, y que además estudios de *Northern blot* mostraban la expresión de sólo un ARN mensajero correspondiente a la VSP traducida (Adam y col. 1988; Mowatt y col. 1991). Finalmente, en el año 2008 nuestro grupo de trabajo describió cómo *Giardia* regula este proceso a nivel molecular (Prucca y col. 2008), poniendo en evidencia un mecanismo de regulación génica post-transcripcional, que utiliza elementos pertenecientes al sistema de ARN de interferencia (ARNi) (Figura 5).

Mediante estudios de *nuclear run-on* se pudo observar la expresión simultánea de varias VSPs en clones que expresaban en su superficie una única VSP (Figura 5). Por otro lado, mediante ensayos de *Northern blot* se identificaba un sólo ARN mensajero en el citoplasma, correspondiente a la VSP traducida y expresada en la superficie, acorde con lo previamente reportado en la literatura. El hecho de que se transcriban todos los mensajeros de las VSPs y que sólo se encuentre uno en el citoplasma, sugirió que los demás debían ser degradados por un mecanismo post-transcripcional. La presencia de múltiples copias de transcritos de VSPs en el citoplasma hace que la ARN-polimerasa ARN-dependiente (RdRp) tome a estas hebras simples como molde para generar una hebra complementaria a la misma, produciendo así moléculas de ARN de doble cadena.

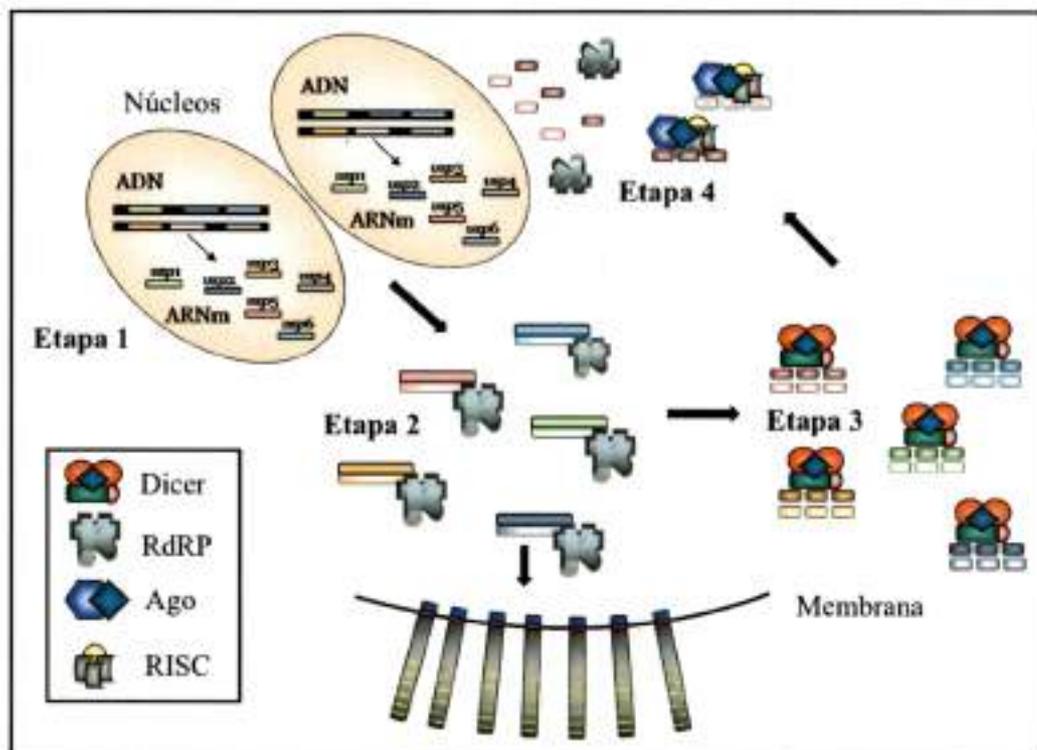


Figura 5 - Esquema general de la regulación del proceso de variación antigénica por medio de un mecanismo de ARNi. Etapa 1: En ambos núcleos de *G. lamblia* se transcriben la mayoría de los ARNm que codifican para las VSPs. Etapa 2: los transcritos, ahora en el citoplasma, son tomados por la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP) como molde para generar una hebra antisentido complementaria. Etapa 3: las dobles hebras de ARN son cortadas por la enzima Dicer en oligonucleótidos de aproximadamente 22-25 nucleótidos. Etapa 4: los oligonucleótidos son tomados por el complejo RISC (que incluye a Argonauta) que amplifica la señal de silenciamiento o colaboran con Dicer para la generación de hebras antisentido.

Experimentos de RT-PCR demostraron la amplificación de múltiples bandas correspondientes a las VSPs transcritas, como así también hebras complementarias a éstas.

Las dobles hebras de ARN son reconocidas por la enzima citoplasmática Dicer que las degrada generando fragmentos cortos de ARN (aproximadamente de 21-25 nucleótidos). Estos fragmentos cortos son tomados por un complejo llamado RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*), donde uno de los integrantes claves es la proteína Argonauta.

Cuando se disminuyó en trofozoitos la expresión (knock-down) de dos componentes (RdRP y Dicer) del sistema de ARN de interferencia de *Giardia*, se observó la expresión de más de una VSPs en la superficie de un mismo trofozoito, confirmando la importancia de

este sistema en la regulación de la expresión de las proteínas variables de superficie (Prucca y col. 2008).

Este sistema de regulación en *Giardia* está involucrado sólo en el mecanismo de variación antigénica y no en otros, como el proceso de enquistamiento (Prucca y col. 2008). Sin embargo algunas de las enzimas que pueden estar involucradas en el proceso de RNA interferencia, como las RNA-helicidas, participan también en el proceso de enquistamiento (Gargantini y col. 2012).

Estudios recientes llevados a cabo en nuestro laboratorio han demostrado que además del mecanismo de ARN interferencia previamente explicado, existirían elementos de regulación epigenética, como acetilaciones y deacetilaciones de histonas, intervinientes en los procesos de variación antigénica y enquistamiento, que de manera sinérgica o independiente colaborarían con el inicio de estos mecanismos (Carranza y col. en preparación).

Las poblaciones de *Giardia* con Dicer y RdRP silenciadas fueron empleadas en un principio para infectar jerbos libres de patógenos específicos. La infección fue iniciada por medio de inoculación de trofozoítos por vía orogástrica, y la eliminación de quistes, un claro indicador de la infección animal, fue evaluada en muestras de heces por ensayos de inmunofluorescencia empleando un mAb específico para la proteína 2 de la pared quística de *Giardia* (CWP2). Por otro lado, se cuantificó el número de quistes por gramo de heces para determinar la infectividad y la virulencia de cada población de células transgénicas y silvestres (Rivero y col. 2010).

Demostramos que todas las poblaciones fueron capaces de establecer infección en los jerbos. Durante la segunda semana de infección, los animales infectados presentaron episodios de diarrea y pérdida de peso (~5-6% comparado con animales no infectados). Para determinar si la infección primaria con trofozoítos que expresan tanto una VSP particular como todo el repertorio de VSPs confiere protección contra infecciones posteriores, los animales fueron infectados con poblaciones clonales de trofozoítos que expresaban una VSP específica 2 meses después de resuelta la infección primaria. Los resultados indicaron claramente que la mayoría de los animales infectados con trofozoítos que expresaban una sola VSP resultaron refractarios a una infección secundaria con células que expresaban la misma VSP, pero fueron fácilmente reinfectados con trofozoítos que

expresan una VSP diferente. Por otro lado, la mayoría de los animales que fueron inicialmente infectados con trofozoitos transgénicos que expresan muchas VSP simultáneamente, se encontraron protegidos de una infección posterior con poblaciones clonales. Los desafíos fueron realizados a los 2, 4 y 12 meses de la infección original, y se obtuvieron resultados similares. Además, los síntomas observados en la infección primaria desaparecieron durante los desafíos. Considerados en conjunto, estos resultados constituyen una sólida evidencia de la necesidad de una respuesta inmune contra todas las VSPs para prevenir que se produzcan nuevas infecciones (Rivero y col. 2010).

Se ha postulado también que en la regulación de la expresión de las VSPs pueda participar también un mecanismo de represión traduccional mediante la utilización de miARN (Saraiya 2008; Saraiya 2011; Li 2011), los cuales podrían silenciar la totalidad de las VSP de *Giardia* por medio de una acción combinada entre varios miARN sobre los sitios complementarios presentes en los transcritos de varias VSPs (Saraiya 2014).

El mecanismo que regula el cambio de expresión de las proteínas variables de superficie no ha sido aún dilucidado. Quizás una diferencia en la concentración de los transcritos permita que sólo uno de ellos (el que está en mayor proporción) escape al silenciamiento, lo que podría deberse a algún mecanismo epigenético que favorezca la mayor o menor expresión de los transcritos de las distintas VSPs (Kulakova y col. 2006).

El Objetivo General de este trabajo de tesis es el de comprender los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la variación antigénica en Giardia lamblia.

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

- **Determinar si los anticuerpos monoclonales anti-proteínas variables de superficie (anti-VSPs) de *G. lamblia* son citotóxicos para los trofozoítos.**
- **Determinar si los anticuerpos monoclonales anti-VSPs de *G. lamblia* pueden inducir el proceso de variación antigénica en trofozoítos.**
- **Determinar los mecanismos moleculares mediante los cuales los anticuerpos monoclonales anti-VSPs pudieran inducir variación antigénica en trofozoítos de *G. lamblia*.**

Materiales y Métodos

Cultivo celular de *Giardia lamblia* y enquistamiento *in vitro*:

Los trofozoítos de *Giardia lamblia* utilizados en este trabajo pertenecen a la cepa WB, clones 9B10 (Carranza y col., 2002), 1267 (Nash y col., 1995), C6 (Gillin y col., 1990) y A6 (Aggarwal y col., 1989) del grupo 1 de *Giardia* (Nash y col., 1985) y a la cepa GS, clon H7 (Mowatt y col., 1994) del grupo 3 de *Giardia* (Nash y col., 1985). 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 utilizando anticuerpos monoclonales para la verificación de la expresión de las proteínas variables de superficie (VSP).

Los trofozoítos se cultivaron en medio TYI-33 (pH 6,8) suplementado con suero adulto bovino 10% y bilis bovina 0,5 mg/ml (medio completo) (Diamond y col., 1978) a 37° C en anaerobiosis. Para inducir el enquistamiento, los trofozoítos se cultivaron hasta el 70-80% de confluencia, los parásitos adheridos a su pared fueron expuestos durante 24 h en medio de pre-enquistamiento (medio completo de crecimiento sin bilis bovina). Luego de las 24 horas el medio de pre-enquistamiento fue reemplazado por medio de enquistamiento, similar al anterior pero conteniendo también bilis porcina 0,45%, ácido láctico 0,01% y a pH 7,8 por diferentes períodos (Boucher and Gillin, 1990). Los quistes en suspensión fueron recuperados por centrifugación a 800 x g por 10 min (Centrifuga Eppendorff 5415 C). Por el contrario, los trofozoítos adheridos a la pared de los tubos fueron despegados en medio nuevo o PBS 1X pH 7,0 mediante enfriamiento a 0° C durante 30 min y luego recuperados por centrifugación a 800 x g por 10 min.

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* de la cepa WB9B10 y GSH7, aislados según descrito en Mowatt y col. (1995); Luján y col. (1995). Los oligonucleótidos utilizados como cebadores para amplificar los genes de interés por PCR fueron diseñados a partir de los homólogos encontrados en el genoma de *Giardia*. Con C-Term se identifican los primers necesarios para clonar la secuencia en el vector pTub-H7HApac, mientras que con N-Term los primers necesarios para clonar en el vector pTub-HApac; cuando no indicado corresponden al plásmido pTub-H7HApac. En el caso de las mutantes del gen H7 el tag-HA fue removido

del plásmido.

Primers RNA-polimerasa RNA-dependiente:

RdRP_F (C-Term): **cattGGGCCCATGCCCTCTGCGTCCGAAC** (ApaI)
 RdRP_R (C-Term): **tccCCCGGGAGAGCGTACATTCACAAAAGGG** (SmaI)

RdRP_F (N-Term): **ccATCGATATGCCCTCTGCGTCCGAAC** (ClaI)
 RdRP_R (N-Term): **gggaattcGCGGCCGCCTAAGAGCGTACATTCACAAAAGGG** (NotI)

Primers H7 y mutantes:

Forward: **catgCCATGGTTCTATTAATTAATTGCCTAATAGCAAGC** (Nco I)
 Reverses (Bam HI):
 ΔCRGKA: **cgGGATCCCCTAGACGAACCACCAGCAGAGGAA**
 ORIGINAL: **cgGGATCCCCTACGCCTTCCCGCGGCAGACGAA**
 KxA: **cgGGATCCCCTACGCCGCCCGCGGCAGACGAA**
 RxA: **cgGGATCCCCTACGCCTTCCCGCGCAGACGAA**
 CxK: **cgGGATCCCCTACGCCTTCCCGCGCTTGACGAA**
 CRGKAxKKKKK: **cgGGATCCCCTACTTCTTCTTCTTCTTGACGAACCACCAGCAG**
 CRGKAxAAAAA: **cgGGATCCCCTACGCCGCCCGCCGCGACGAACCACCAGCAG**

En negrita se indica el sitio de restricción. En color rojo se indican los codones cambiados. Para las reacciones de amplificación de las mutantes del gen H7 fue utilizada la enzima AccuPrime Pfx (Invitrogen), mientras que para el gen de las RNA-polimerasa RNA-dependiente se utilizó la enzima LA Taq (Takara).

Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Las muestras de ADN fueron analizadas en geles de agarosa 0,8-2%, en buffer TAE 1X conteniendo Bromuro de Edito 0,5 µg/ml. La corrida electroforética se realizó aproximadamente a 2,5 voltios/cm y se visualizó mediante exposición a luz UV (Sambrook y col., 1989) en un UV Transilluminator (UVP). Las fotos digitales fueron tomadas utilizando el equipo Eagle Eye de Stratagene.

Los marcadores de peso molecular utilizados fueron 1 Kb DNA ladder y 100 bp ladder (Invitrogen).

Construcción de los vectores de expresión en *Giardia lamblia*

Para expresar las proteínas de interés en *G. lamblia*, las secuencias que codifican

para el marco de lectura abierto de las mismas fueron clonadas en los plásmidos pTubH7HApac y pTubHApac (Touz y col., 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 y col., 2003). Las proteínas se expresan fusionadas a 3 repeticiones en tándem del epítipo de la proteína hemaglutinina (HA) del subtipo H3 del virus influenza (YPYDVDPYA) (Touz y col., 2003). El plásmido pTubH7HApac posee el gen de la Proteína Variable de Superficie H7 de la cepa 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. Mientras que el plásmido pTubHApac posee un sitio de clonado múltiple después de la secuencia HA, permitiendo su inserción en posición N-terminal de la proteína clonada.

Transfección de *Giardia lamblia*

Los trofozoítos fueron transfectados con los constructos por electroporación de dos distintas maneras: como se describió previamente (Yee y Nash, 1995; Singer y col., 1998) y según un nuevo protocolo desarrollado en nuestro laboratorio.

En el protocolo de electroporación clásico, trofozoítos del clon WB/1267 obtenidos de un tubo de 7 ml en monocapa (7×10^6 células aproximadamente) fueron resuspendidos en 0,3 ml de medio completo en cubetas de 0,4 cm (Singer y col., 1998). Luego, se adicionaron 10-15 μg de ADN plasmídico en un volumen final de 100 μl , y la mezcla fue incubada 10 minutos en hielo. Las células fueron electroporadas bajo las siguientes condiciones: 350mV, 1000 μF de capacitancia y 700 Ω de resistencia. Luego de una nueva incubación en hielo por 10 minutos, los trofozoítos fueron transferidos a un tubo de 7 ml con medio completo e incubados toda la noche a 37°C en anaerobiosis. Al día siguiente el medio de cultivo se suplementó con puromicina (Sigma Chemical Company) en una concentración final de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Luego de la transfección, los clones con bajo nivel de expresión de las proteínas clonadas fueron seleccionados por microscopía de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo de ratón anti-HA (Sigma-Aldrich).

En el nuevo protocolo las células son previamente lavadas con un buffer hipotónico de electroporación (Millipore), resuspendidas en 0,3ml del mismo y electroporadas bajo las siguientes condiciones: 500mV; 25 μF y resistencia 0 Ohms.

Microscopía de Inmunofluorescencia (con células fijadas o vivas)*Células fijadas*

Los trofozoítos fueron sembrados en medio de cultivo en portaobjetos e incubados a 37° C en cámara húmeda durante 1 h para permitir su adhesión al vidrio. Luego fueron fijados y permeabilizados con acetona/metanol (1:1) durante 30 min a -20°C; o fijados con paraformaldehído 4% y permeabilizados durante 5 minutos a temperatura ambiente en PBS/Tritón X-100 0.5% y bloqueados en PBS 1X/Tween20 0,05%/albúmina 2,5% por 30 min (modificado de Mowatt y col., 1994; Luján y col., 1995a). Luego fueron incubados con anticuerpos primarios monoclonales de ratón (Anti-9B10; anti-1267; anti-A6; anti-H7, desarrollados en nuestro laboratorio, o anti-HA (Sigma-Aldrich), todos en dilución 1/1000) en PBS 1X/Tween20 0,05%/albúmina 1% por 1 hora a temperatura ambiente y luego de ser lavados (x3) con PBS 1X/Tween20 0,05% se incubaron con el anticuerpo secundario polivalente anti-Igs de ratón Alexa 488 o Alexa 546 (1/500) por 1 hora en solución de bloqueo.

Para los ensayos de inmunofluorescencia sobre las modificaciones de las histonas se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios policlonales desarrollados en conejos: anti-histona 3-lisina 4 trimetilación (H3K4m3) (Abcam); anti-histona 4-lisina 5 acetilación (H4K5ac), anti-histona 4-lisina 8 acetilación (H4K8ac), anti-histona 4-lisina 12 acetilación (H4K12ac) y anti-histona 4-lisina 16 acetilación (H4K16ac) (Upstate, Millipore), todos a una dilución de 1/200. Como anticuerpo secundario se utilizaron anti-Igs de conejo Alexa 488 o Alexa 546 (1/500).

Las inmunofluorescencias directas fueron llevadas a cabo utilizando el mismo protocolo, con la diferencia de que se utilizaron directamente los anticuerpos primarios marcados con isotiocianado de fluoresceína: anti-9B10-FITC y anti-H7-FITC (o G10/4-FITC) (1/500). Los núcleos se visualizaron con DAPI (Molecular Probes) a una concentración de 1µg/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 15 minutos para permitir que los trofozoítos pierdan su adherencia. Los tubos fueron centrifugados 5 minutos a 1000xg (4°C) y las células fueron resuspendidas en 1 ml de PBS. Dichas células fueron inmediatamente incubadas con 100µl de una solución de anticuerpo primario (1/1000) (anti-9B10; anti-1267; anti-A6 y anti-H7) por una hora 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 (1/1000) (Alexa 488 o Alexa 546).

Las inmunofluorescencias directas se realizaron incubando directamente las células con los anticuerpos marcados con isotiocianato de fluoresceína anti-9B10-FITC y anti-G10/4-FITC (H7-FITC) (1/500) durante una hora 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 HCX 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/>).

PCR cuantitativa en tiempo real (q-PCR) del mRNA de las Helicasas

Para los ensayos de q-PCR se utilizó el QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Se utilizó 1 µl de cDNA en un volumen final de 25 µl para cada reacción, por triplicado. Los cebadores utilizados fueron diseñados utilizando las secuencias de las helicasas putativas en el genoma de *Giardia*. Los datos fueron analizados usando el programa REST 2009 (Relative Expression Software Tool V2.0.13 – Quiagen). El RNA fue estandarizado cuantificando la glutamato deshidrogenasa (gdh) como gen de referencia.

Ensayos de viabilidad

Para determinar el efecto citotóxico de los mAbs contra las VSPs en *G. lamblia* se utilizaron poblaciones de trofozoítos que expresaban sólo una VSP en su superficie. Estas fueron VSP-9B10 y VSP-1267 para la cepa WB, y VSP-H7 para la cepa GS. Los trofozoítos fueron cultivados de forma axénica en medio TYI-S-33, suplementado con 10% de suero adulto bovino y 0,5% de bilis bovina (Keister, 1983).

Para el ensayo se utilizaron placas de 96 pocillos. Se colocaron 50.000 trofozoítos por pocillo en seis columnas diferentes en las cuales se añadieron: los mAbs solos; mAbs con 10% de suero de ratón (S); mAbs con 10% de suero de ratón inactivado (S in.); sólo células (control); células con 10% de suero; y células con 10% de suero inactivado. Cada condición se realizó con dos clones independientes de una misma VSP. se realizaron Los mAbs fueron: mAb 9B10 para clones VSP-9B10, mAb 5C1 para VSP-1267 y mAb G10/4 para VSP-H7 en una dilución [1:600]. La evaluación de células viables y no viables se llevó a cabo luego de 24 y 48 h de incubación mediante la técnica de tinción con diacetato de fluoresceína (células vivas) e ioduro de propidio (células muertas), tal como describieron Jones and Senft (1985). El recuento se realizó manualmente analizando las fotografías y contando el número de células por campo con aumento de 20X.

Medición de la actividad metabólica

Se utilizó el kit Cell Titer 96 Aqueous (Promega), un sistema colorimétrico que permite determinar la actividad metabólica de células durante ensayos de citotoxicidad, siguiendo las instrucciones del fabricante y en condiciones de anaerobiosis. En este ensayo, un derivado del cloruro de metrazolio, el MTS ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS(a)]), es bio-reducido en presencia del metosulfato de fenazina (PMS) a formazán. La cantidad de formazán producida (medida en base a la absorbancia a 490 nm) es directamente proporcional al número de células vivas presentes en cultivo.

Unas 100.000 células (por triplicado) fueron incubadas en medio RPMI suplementado con el 10% de suero bovino adulto durante 24 horas. A estas células se les adicionó una dilución [1:50] de anticuerpo específico anti-VSP o una dilución [1:20]; como controles se adicionaron una dilución de anticuerpo contra proteínas del quiste (CWP),

puromicina [100µg/ml] o sin anticuerpo.

Ensayos de proliferación

El ensayo de proliferación se realizó como fue previamente descrito por Nash y Aggarwal (1986), aunque con una modificación: no se eliminaron las células no adheridas sino que se utilizó el total de las células tanto las adheridas como las no adheridas. Se incubaron los clones WB9B10, WB1267 y GSH7 con las condiciones anteriormente detalladas. Cada condición se realizó con dos clones independientes de una misma VSP. Luego de enfriar estos tubos para permitir que las células adheridas se despeguen, se repicaron 100 µl de células en tubos de vidrio con 7 ml de medio completo y se incubaron durante 48 y 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.

Ensayos de variación antigénica

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* (WB9B10, WB1267 y GSH7) en medio completo. Se adicionaron diferentes concentraciones de mAbs específicos (1:14000 para 9B10 y 5C1 y 1:4000 para G10/4) y sin mAbs como control negativo, cada uno por duplicado. 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.

Ensayo de internalización de la VSP-9B10

Una población clonal de trofozoítos VSP-9B10 fue incubada con el mAb (9B10) específico por 30 minutos en hielo (bloqueando de esa manera el transporte intracelular y disminuyendo el metabolismo celular). Posteriormente se lavó 3 veces con PBS frío y se incubó a 37°C en medio completo por 30 minutos, 2, 6 y 24 horas. Por cada tiempo se tomó una alícuota de células del cultivo, se lavó con PBS frío y se fijó en un portaobjetos con paraformaldehído al 4%. Al término del experimento todas las muestras de células fijadas fueron permeabilizadas e incubadas con un anticuerpo secundario polivalente anti-Igs de

ratón marcado con moléculas fluorescentes y posteriormente evaluadas por microscopía confocal.

Test estadísticos

La comparación entre los promedios de diferentes muestras fue llevado a cabo utilizando la prueba t de Student utilizando el programa estadístico Prism GraphPad.

Producción de mAb marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC)

Los anticuerpos utilizados para la evaluación de la variación antigénica por microscopía fueron los anticuerpos monoclonales 9B10 y G10/4 marcados con FITC en nuestro laboratorio. El protocolo de marcación fue el siguiente:

- Se disolvió FITC en DMSO a una concentración de 3 mg/ml.
- Se determinó la concentración de proteínas de los fluidos ascíticos con el kit comercial BCA protein assay (Pierce).
- Se alcalinizó el pH de 1 ml de fluido ascítico hasta el valor de 9.5 utilizando una solución de Na_2HPO_4 0,05 M a pH 12,4.
- Se adicionaron 2 μl de la solución de FITC cada 100 μg de proteínas presentes en los ascíticos en pequeñas alícuotas de 10 μl .
- Se dejó incubar la solución 1 hora a temperatura ambiente.
- Se dializó 3 veces con PBS frío.

Resultados

1. Estudios de citotoxicidad de anticuerpos monoclonales anti-proteínas variables de superficie (VSPs)

1.1. Obtención de poblaciones clonales de trofozoítos que sólo expresan una proteína variable de superficie (VSP)

Durante este trabajo de tesis se realizaron estudios utilizando poblaciones de trofozoítos que sólo expresan una proteína variable de superficie. A tal fin se llevaron a cabo ensayos de clonación mediante la técnica de dilución límite y la siguiente validación de poblaciones celulares obtenidas mediante ensayos de inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos monoclonales que reconocen diferentes proteínas variables de superficie (VSPs).

Se obtuvieron poblaciones clonales que presentaban reacción positiva para los anticuerpos monoclonales 9B10 (VSP-9B10 del aislamiento WB), 5C1 (VSP-1267 del aislamiento WB), 6E7 (VSP-A6 del aislamiento WB) y G10/4 (VSP-H7 del aislamiento GS). Los clones fueron amplificados en medio de cultivo normal y conservados a -80°C y nitrógeno líquido para su posterior uso en los experimentos que constituyen el presente trabajo de tesis.

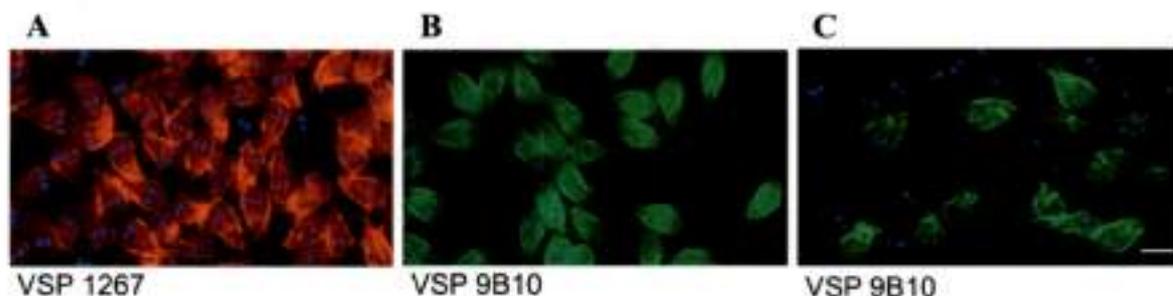


Fig.1 – Inmunofluorescencia de poblaciones clonales y no clonales de *G. lamblia*

A: Población clonal expresando VSP 1267 reconocida por anticuerpo monoclonal (mAb) 5C1 (rojo).

B: Población clonal expresando VSP 9B10 reconocida por el mAb anti-9B10 (verde).

C: Población no clonal de *G. lamblia* marcada con el mAb anti-9B10 (verde).

Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). Escala: 10 μm .

En la Figura 1 podemos observar poblaciones clonales de las VSPs 1267 (Fig. 1.A) y 9B10 (Fig. 1.B), donde la totalidad de los trofozoítos expresan en su superficie la VSP correspondiente. Por el contrario, en una población no clonal de *Giardia* sólo algunos trofozoítos expresan la VSP 9B10 en un momento dado, indicando la heterogeneidad en la expresión de VSPs (Fig. 1.C).

1.2. Viabilidad y proliferación celular de poblaciones clonales de *G. lamblia* expuestas a mAb específicos

Basados en reportes previos que describen una presunta citotoxicidad de los anticuerpos monoclonales específicos anti VSPs (Heyworth, 1992; Nash y Aggarwal, 1986; Touz y col 2005), y para poder determinar si dichos anticuerpos pueden ser capaces de estimular una variación antigénica o seleccionar una población clonal de *G. lamblia*, fueron llevado a cabo diferentes experimentos con el fin de encontrar una concentración de los mismos que no resultara letal para los trofozoítos.

Para optimizar las cantidades de anticuerpos monoclonales a utilizar, se decidió llevar a cabo los experimentos utilizando placas de cultivo de 96 pocillos (máximo volumen por pocillo: 200 μ l) bajo condiciones anaeróbicas y utilizando una dilución [1:600] de cada anticuerpo monoclonal correspondiente.

De acuerdo al esquema de la Figura 2, alícuotas de trofozoítos (50.000 células por pocillo) de poblaciones clonales de *G. lamblia* VSP-9B10 y VSP-1267 (cepa WB), y VSP-H7 (cepa GS), fueron incubadas por 24 o 48 horas en anaerobiosis bajo seis diferentes condiciones: (1) presencia de anticuerpo monoclonal específico: anti-9B10 (mAb 9B10), anti-1267 (mAb 5C1) o anti-H7 (mAb G10/4); (2) presencia de anticuerpo monoclonal específico y suero de ratón; (3) presencia de anticuerpo monoclonal específico y suero de ratón inactivado mediante temperatura; (4) ausencia de anticuerpo monoclonal específico; (5) ausencia de anticuerpo monoclonal específico y presencia de suero de ratón; (6) ausencia de anticuerpo monoclonal específico y presencia de suero de ratón inactivado mediante temperatura. En la Figura 2 se presenta el esquema del experimento realizado con una población clonal de *G. lamblia* VSP-1267 y el mAc anti-1267 (mAb 5C1); un esquema idéntico fue utilizado para las otras poblaciones clonales ensayadas.



Fig. 2 – Esquema de los experimentos de viabilidad y proliferación celular utilizando el anticuerpo anti VSP 1267 (mAb 5C1).

Los trofozoitos fueron distribuidos en los pocillos de dos placas, una de la cuales fue incubada 24 horas y la otra 48 horas a 37°C en anaerobiosis. Cada pocillo contenía 50.000 trofozoitos en 200 µl de medio completo, al cual se le adicionó: **Rojo:** mAb anti-VSP-1267 (mAb 5C1); **Naranja:** mAb anti-VSP-1267 (mAb 5C1) + suero de ratón; **Amarillo:** mAb anti-VSP-1267 (mAb 5C1)+ suero de ratón inactivado; **Azul:** control (sin mAb); **Celeste:** control + suero de ratón; **Verde:** control + suero de ratón inactivado. Luego del tiempo de incubación correspondiente, se realizó el ensayo de viabilidad (tinción con FDA y PI) o se transfirieron los trofozoitos a tubos de 7 ml incubando 48h más para determinar la proliferación (recuento celular) frente a los diferentes estímulos. Los duplicados de cada condición corresponden a dos clones independientes de una misma VSP.

Después de 24 o 48 horas de incubación las placas fueron enfriadas para lograr que las células pierdan su adherencia. Una parte de estos parásitos fue inmediatamente transferida a tubos "ependorf" para ser utilizados en los ensayos de viabilidad, y el resto de las células se transfirieron a tubos de 7ml con medio de cultivo para ser utilizados 48 horas más tarde en ensayos de proliferación, como se esquematiza en la Figura 2.

1.2.1. Viabilidad

Al término de la incubación con anticuerpos monoclonales o en condiciones control los trofozoitos fueron teñidos con diacetato de fluoresceína (FDA) e ioduro de propidio (PI) como fue descrito en *Materiales y Métodos*. El FDA posee la capacidad de ser absorbido y retenido en el citosol de las células vivas, mientras que el PI puede penetrar y marcar los

núcleos de las células muertas, tal como se muestra en la Figura 3 para caso de la VSP 9B10 incubada con el mAb anti-9B10.

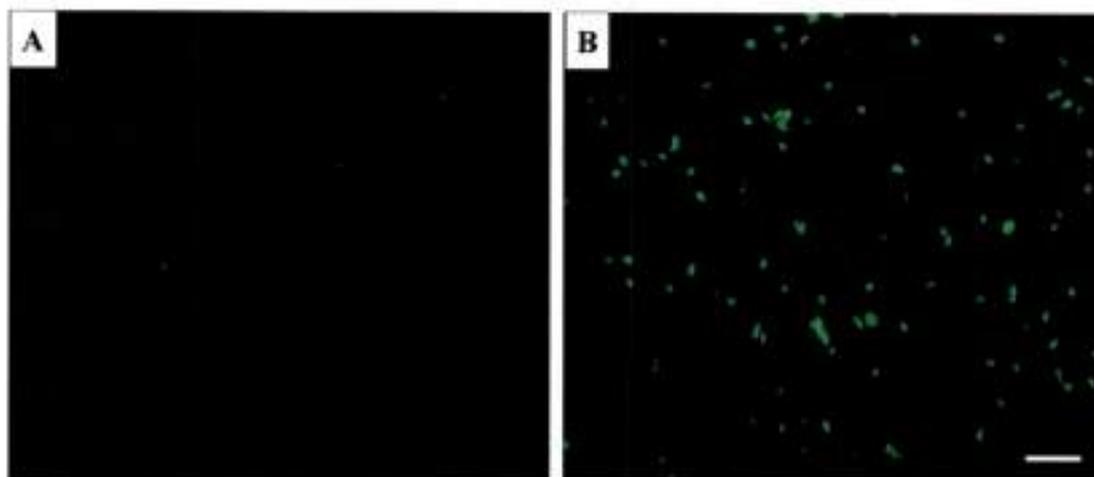


Fig. 3 – Viabilidad celular de un clon de trofozoítos VSP-9B10 incubados con mAb 9B10

Luego de 24 o 48 horas de incubación con mAb 9B10, las células fueron teñidas con PI y FDA e inmediatamente se registraron las imágenes de las células no fijadas con un microscopio de fluorescencia. **A:** Núcleos teñidos con PI (rojo) indicando la presencia de células muertas. **B:** Citosol de células vivas teñidos con FDA (verde). Escala: 50 μ m.

Después de la incubación de los trofozoitos con estos colorantes, pudimos calcular los porcentajes de células vivas y muertas a partir de las imágenes tomadas en el microscopio de fluorescencia. Los resultados cuantitativos de estos ensayos se muestran en la Fig. 4.

Podemos observar que los clones VSP-9B10 (Fig.4A), VSP-1267 (Fig.4B) y VSP-H7 (Fig.4C) no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$) en su viabilidad al ser tratados con el mAb específico, si se compara con los controles de células no tratadas con mAbs (Fig. 4 A-B-C, barras blancas). Esto es cierto tanto a las 24 horas como a las 48 horas luego de la estimulación con los mAbs, indicando que a las concentraciones utilizadas los mAbs no presentan ningún efecto citotóxico sobre los trofozoitos.

Por otro lado, al estimular los clones con los mAbs específicos más suero de ratón (Fig. 4 A-B-C, barras grises), observamos una diferencia significativa ($p < 0.05$) en la viabilidad solamente de los clones VSP-9B10 48 horas luego del estímulo (Fig. 4A, 48 h). Cuando se realizó la incubación de los clones con los mAbs más suero de ratón previamente inactivado (Fig. 4 A-B-C, barras negras), no observamos ninguna diferencia en

la viabilidad celular de los diferentes clones. El leve efecto citotóxico de los mAb 9B10 sobre los clones VSP-9B10 en presencia de los factores del complemento (suero de ratón no inactivado) (Fig. 4A, barras grises) luego de 48 horas de estímulo sugieren una participación del complemento en este efecto, no observándose sin embargo para los mAb 5C1 (Fig. 4B) o G10/4 (Fig. 4C). Este efecto de los mAb 9B10 se correlaciona con una disminución de la proliferación celular en las mismas condiciones, como se discutirá más adelante (Fig. 5A).

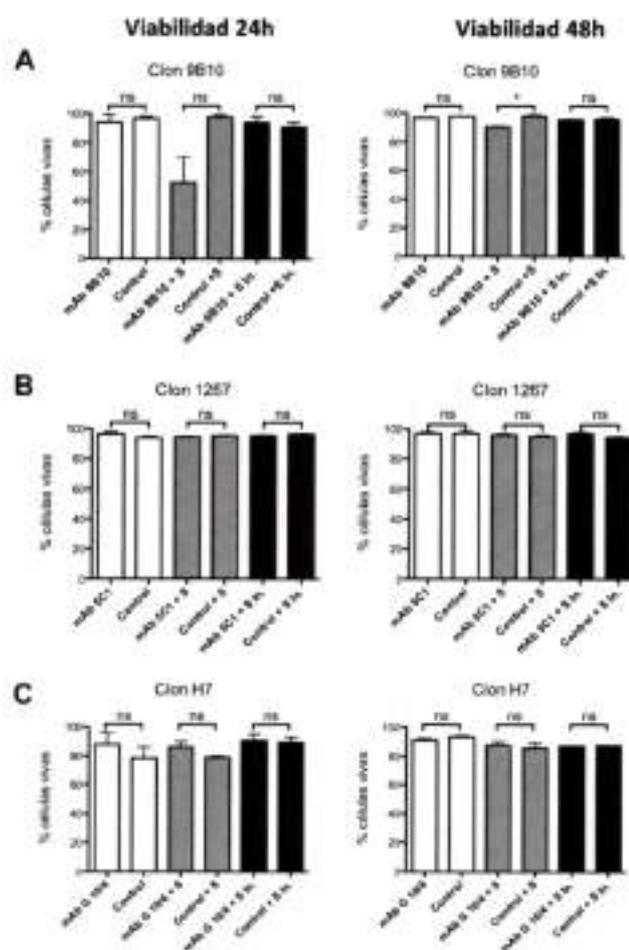


Fig. 4 – Viabilidad de clones *G. lamblia* después de 24 y 48 horas de incubación con anticuerpos monoclonales específicos.

Clones de *G. lamblia* expresando las VSPs 9B10 (A), 1267 (B) o H7 (C) fueron incubados por 24 horas (panel izquierda) o 48 horas (panel derecha) en presencia de: mAb específicos (barras blancas); mAb específicos y suero de ratón (+S) (barras grises); o mAb específico y suero de ratón inactivado (+S In.) (barras negras). Al final de la incubación se contabilizó el porcentaje de células viables respecto al total. Para cada condición se muestra el control correspondiente sin mAb (ver esquema experimental Fig. 2).

Los valores de p se obtuvieron utilizando el test t de Student comparando cada estímulo con mAb con su condición control correspondiente. Barras: error estándar. ns, diferencia no significativa ($p > 0,05$).

* $p < 0,05$. $n=2$.

Los resultados de este experimento demuestran que no existe una citotoxicidad complemento-independiente por parte de los anticuerpos monoclonales anti-VSPs, sustentando el diseño experimental del resto de los experimentos presentados en este trabajo de tesis, los cuales se realizaron utilizando solamente los mAbs como estímulo de los clones de VSPs de *G. lamblia*.

1.2.2. Proliferación

Para determinar si los anticuerpos monoclonales podrían interferir con la replicación normal de las células de *G. lamblia*, se llevaron a cabo experimentos de proliferación según el protocolo de Nash y col. (1986) con modificaciones, como se detalló en *Materiales y Métodos* y se esquematizó en la Fig. 2. Los resultados se muestran gráficamente en la Figura 5.

Cuando los clones VSP-9B10 (Fig. 5A), VSP-1267 (Fig. 5B) o VSP-H7 (Fig. 5C) fueron estimulados con los mAb correspondientes en ausencia de suero (barras blancas) como en presencia de suero inactivado (barras negras), no se observaron diferencias significativas respecto a los controles correspondientes ($p > 0,05$). Resultados similares se obtuvieron tanto para los cultivos estimulados por 24 horas como por 48 horas.

Por el contrario, al estimular los clones VSP-9B10 con los mAb en presencia de suero no inactivado (Fig. 5A, barras grises) pudimos observar una disminución significativa de la proliferación celular, tanto a las 24 horas ($p < 0,001$) como a las 48 horas ($p < 0,05$) de estimulación de los cultivos, que se correlacionan con la menor viabilidad celular presentado previamente en la Fig. 4A. Un comportamiento similar se observó con los clones VSP-H7 estimulados por 48 horas ($p < 0,05$) (Fig. 5C, barras grises). Llamativamente, en los clones VSP-1267 tratados bajo las mismas condiciones no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de los cultivos estimulados tanto por 24 horas como por 48 horas (Fig 5B, barras grises). No es claro si la interferencia en la replicación de los clones VSP-9B10 y VSP-H7 en presencia de suero no inactivado se debe a la presencia de las proteínas del complemento, o si se debe a razones metabólicas, aunque parece ser independiente de un efecto citotóxico, al menos para el clon VSP-H7, tal como se mostró en la Fig. 4.

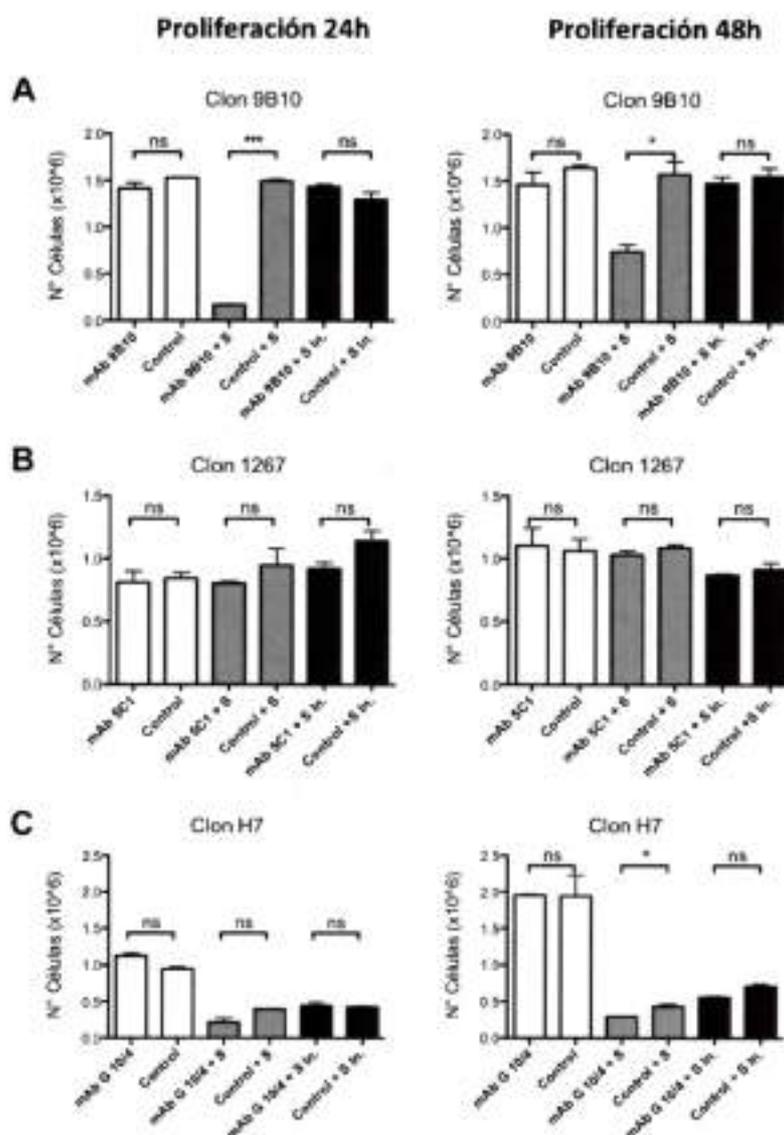


Fig. 5 –Proliferación de clones de *G. Lambli* luego de 24 o 48 horas de estimulación con anticuerpos monoclonales específicos

Clones de *G. lambli* expresando las VSPs 9B10 (A), 1267 (B) o H7 (C) fueron estimulados por 24 horas (panel izquierda) o 48 horas (panel derecha) en presencia de: mAb específicos (barras blancas); mAb específicos y suero de ratón (+S) (barras grises); o mAb específico y suero de ratón inactivado (+S In.) (barras negras). Al final de la estimulación se amplificaron las células por 48 horas más y se contabilizó el porcentaje de células viables respecto al total. Para cada condición se muestra el control correspondiente sin mAb (ver esquema experimental Fig. 2).

Los valores de p se obtuvieron utilizando el test t de Student comparando cada estímulo con mAb con su condición control correspondiente. Barras: error estándar. ns, diferencia no significativa ($p > 0,05$), * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. n=2.

Con los resultados obtenidos mediante este ensayo pudimos concluir que, a las concentraciones utilizadas, los anticuerpos monoclonales anti-VSPs no interfieren *per se* con la proliferación de los trofozoítos de *G. lamblia*.

1.3. Actividad metabólica de clones de VSPs de *G. lamblia* expuestos a mAb específicos

Para confirmar los resultados anteriores que muestran que los anticuerpos monoclonales *per se* no tienen un efecto citotóxico sobre los trofozoítos de *G. Lamblia* (Figs. 4 y 5, barras blancas), se realizaron ensayos de actividad metabólica de las células pero a concentraciones de anticuerpos monoclonales más elevadas (diluciones 1:20 y 1:50) que en los ensayos anteriores (dilución 1/600).

El ensayo fue llevado a cabo usando el kit Cell Titer 96 Aqueous (Promega) tal como se describe en *Materiales y Métodos*, utilizando los clones VSP-9B10 y VSP-1267. Este ensayo permite medir la aparición de un producto de reducción coloreado en el medio (formazán) al cual se le puede medir su absorbancia a 490 nm, y que se correlaciona con la actividad metabólica celular. Para ello, las células fueron incubadas en medio RPMI por 24 horas con los siguientes estímulos: (1) mAb específicos diluidos [1:50]: 9B10 para los clones VSP-9B10, y mAb 5C1 para los clones VSP-1267; (2) mAb específicos a una dilución [1:20]; (3) sin mAb; (4) con un mAb contra proteínas de la pared del quiste (CWP), como control de anticuerpo no específico con VSPs; y (5) con puromicina, que es un antibiótico con comprobada actividad citotóxica sobre *Giardia*.

Los resultados se exponen en la Figura 6, indicándose la absorbancia del medio celular como una medida de la actividad metabólica de las células y por ende del número de células viables. En concordancia con los resultados presentados previamente, y contra lo previamente publicado al respecto (Heyworth, 1992; Nash y Aggarwal, 1986; Touz y col 2005), no se pudo detectar actividad citotóxica debida a los mAb. Sorprendentemente, la actividad metabólica de los clones, tanto VSP-9B10 (Fig. 6A) como VSP-1267 (Fig. 6B), tratados con los mAbs específicos fueron significativamente mayores respecto tanto al control sin presencia de mAbs como al control con mAbs no específicos anti-CWP. Las absorbancias de los controles no variaron entre ellas, mientras que las absorbancias de los clones tratados con puromicina fueron significativamente más bajas que el resto de las

condiciones, como era esperado debido a la citotoxicidad de la droga. A causa de la escasa cantidad de mAb G10/4 anti-VSP-H7 presente en el laboratorio no se pudieron hacer los mismos experimentos con la cepa de *G. lamblia* GS.

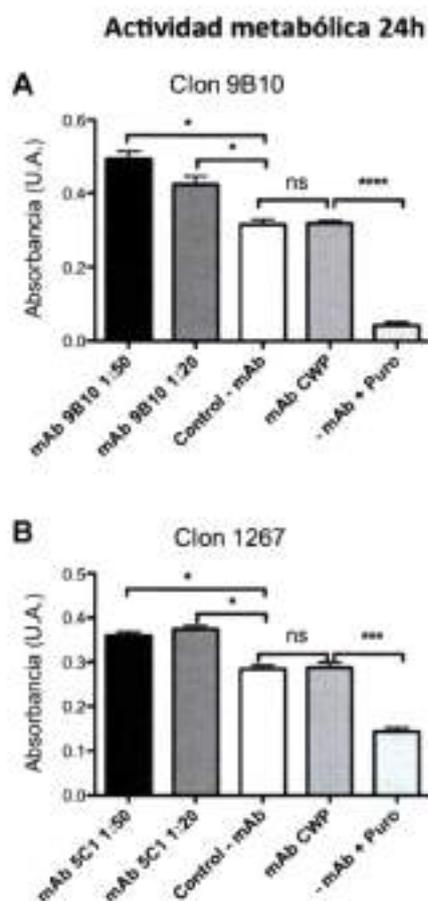


Fig.6 – Actividad metabólica de clones de VSPs de *G. lamblia* luego de la estimulación con mAbs específicos.

Luego de 24 horas de estimulación con: mAbs específicos en dilución 1:50; dilución 1:20; en ausencia de mAbs; en presencia de mAbs inespecíficos contra la pared del quiste de *Giardia* (mAb-CWP); o en presencia del antibiótico puromicina (Puro), se determinó la actividad metabólica de los trofozoítos utilizando el kit Cell Titer 96 Aqueous, midiendo la absorbancia en el medio del cultivo del producto de reducción formazán a 490nm.

A: Actividad metabólica del clon VSP-9B10 expuesto a diferentes estímulos. **B:** Actividad metabólica del clon VSP-1267 expuesto a diferentes estímulos.

Barras: error estándar. Valores de p determinados con el test t de Student. ns, no significativo ($p > 0,05$).

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. $n = 3$.

Para determinar si el resultado obtenido era debido a un aumento de la actividad reductora de los trofozoítos o a un aumento de la proliferación celular, se midieron nuevamente la viabilidad y la proliferación celular frente al estímulo de mAbs específicos o en ausencia de mAbs (Fig. 7). Para ello, se incubaron clones VSP-9B10 (Fig. 7A) o VSP-1267 (Fig. 7B) con los mAbs específicos esta vez a una dilución 1:20 y durante 48 horas, luego de las cuales se midieron la proliferación (número de células totales) y la viabilidad celular (tinción con FDA y PI).

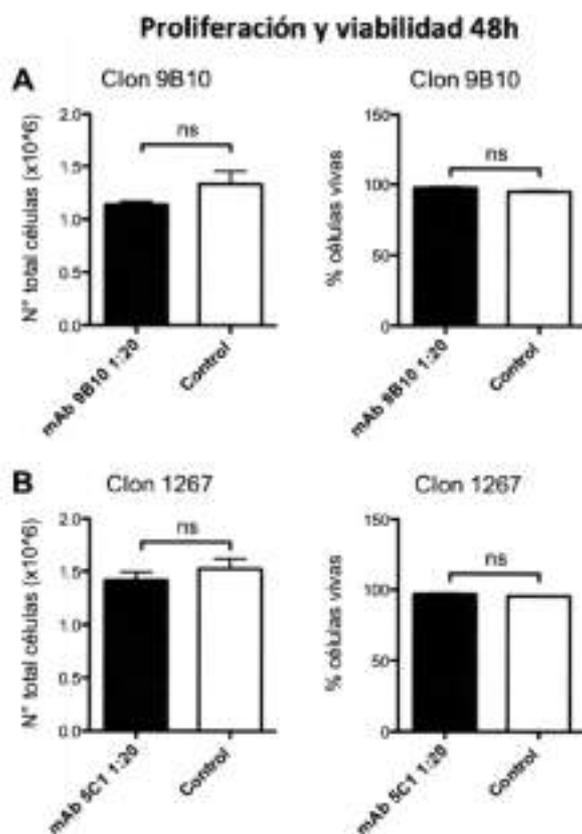


Fig. 7 – Proliferación y viabilidad de clones de VSPs de *G. lamblia* estimulados con mAbs específicos en alta concentración (dilución 1/20).

Clones de VSP-9B10 (A) y VSP-1267 (B) fueron incubados por 48 horas en presencia de mAbs específicos (dilución 1/20) o en ausencia de los mismos (Control), luego de las cuales se contó el número de células recuperadas para determinar la proliferación celular (paneles izquierda) o se marcaron los trofozoitos recuperados con FDA y PI para determinar la viabilidad celular (paneles derecha). No se observaron diferencias significativas ni en la proliferación ni en la viabilidad celular entre las células estimuladas con los mAbs específicos y las condición control. Barras, error estándar. Valores de p determinados con el test t de Student. ns, no significativo ($p > 0,05$). $n = 3$.

Como se puede observar, no hay diferencias significativas de proliferación o viabilidad entre los clones incubados con alta concentración de mAb específicos (dilución 1/20) durante 48 horas y sus relativos controles.

Por lo tanto, concluimos que el aumento de la actividad metabólica observada en la Fig. 6 al estimular clones de *G. lamblia* con mAbs específicos no es debido a un aumento de la proliferación o de la viabilidad celular, si no a un aumento de la actividad reductora de los trofozoitos. Estos resultados sugieren que la interacción entre *G. lamblia* y anticuerpos anti-VSPs podría activar fenómenos metabólicos en las células que no están asociados a la proliferación celular.

2. Variación antigénica de clones de *G. lamblia* inducida por anticuerpos monoclonales específicos

Una vez establecido que los mAbs específicos contra diferentes VSPs no poseen efectos citotóxicos y no alteran la proliferación de los trofozoítos, nos planteamos la posibilidad de que los mAbs quizás pudieran ser un estímulo para acelerar el fenómeno de variación antigénica *in vitro* de *G. lamblia*.

2.1 Inducción de variación antigénica por mAbs específicos

Con el fin de comprobar esta hipótesis, se incubaron clones de *Giardia* VSP-9B10, VSP-1267 y VSP-H7 por 3 días en presencia de una pequeña concentración (dilución [1:14.000] para 9B10 y 5C1 y [1:4.000] para G 10/4) de mAb específicos. Luego de ese tiempo, se recuperaron los trofozoítos y se marcaron con un anticuerpo anti-VSP correspondiente, para evidenciar cuántas células del clon de partida expresaban aún la VSP correspondiente. En la Figura 8 se muestran las imágenes representativas de un clon VSP-H7 no tratado (Fig. 8A) y tratado (Fig. 8B) con el mAb G10/4 (anti-H7). Sorprendentemente, se observó que las células tratadas con los mAbs específicos dejan de expresar la VSP-H7, mientras que la mayor parte de las células control aún lo hacen.

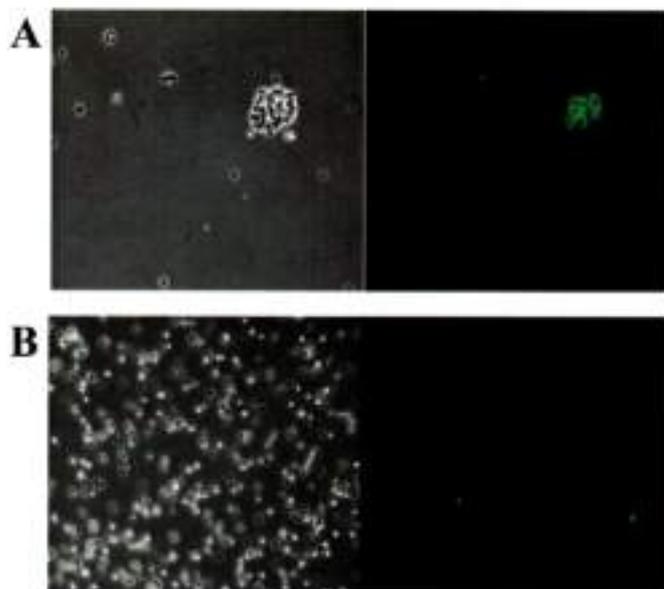


Fig. 8 Ensayo de variación antigénica de clones VSP-H7 estimulados con el mAb G10/4 (anti-VSP-H7)

Un clon de *Giardia* expresando la VSP-H7 fue incubado por 3 días en ausencia (A) o presencia (B) del mAb G10/4 (anti-VSP-H7) (dil: 1:4.000). Los trofozoítos recuperados luego del estímulo fueron marcados con otro mAb G10/4 fluorescente e inmediatamente se registraron las imágenes por microscopía de contraste de fase (paneles izquierda) y de fluorescencia (paneles derecha). Magnificación 20X.

El mismo experimento se realizó luego con los clones VSP-9B10 y VSP-1267, cuantificando el porcentaje de células respecto al total que seguían expresando la VSP de partida luego de los 3 días de estímulo, o variación antigénica. En paralelo se cuantificó la proliferación celular en esas condiciones experimentales. Como se puede notar en la Figura 9, los 3 clones: VSP-9B10 (Fig. 9A); VSP-1267 (Fig. 9B); y VSP-H7 (Fig. 9C) crecidos en presencia de mAb específico mostraron un aumento significativo ($p < 0,001$) de la variación antigénica en comparación con sus controles. Paralelamente se realizó un ensayo de proliferación con el fin de monitorear el número total de células tanto en los controles como en las células incubadas con mAbs. Como se observa en el panel de la izquierda de la Figura 9, no hay diferencias significativas entre los clones estimulados con los mAbs y los controles, excluyendo eventuales diferencias en la proliferación en ambas condiciones.

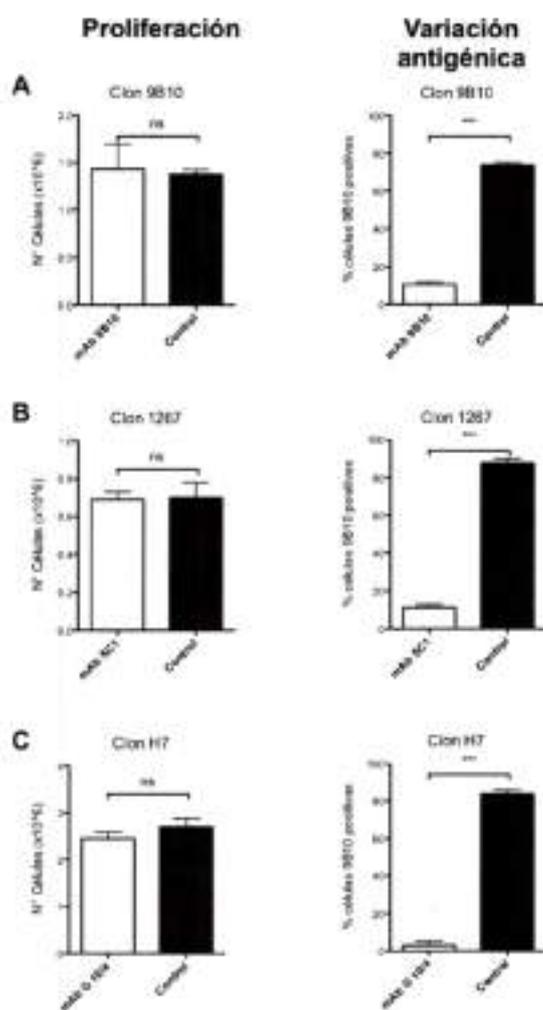


Fig. 9 – Ensayos de proliferación y variación antigénica

Los clones de *G. lamblia* VSP-9B10, VSP-1267 y VSP-H7 fueron crecidos en presencia y ausencia de los mAb específicos (respectivamente: 9B10; 5C1 y G10/4) por 3 días a 37 °C para determinar la proliferación celular y la variación antigénica. Como se puede observar, mientras que se mantuvo una proliferación comparable entre las distintas condiciones, las células crecidas en presencia de mAb mostraron un marcado y significativo aumento de la variación antigénica. Barras: error estándar. ns, no significativo ($p > 0,05$) *** $p < 0,001$, $n = 3$.

En base a los resultados obtenidos en el presente ensayo, y en los precedentes, concluimos que los mAbs no solo no tienen ningún efecto citotóxico sobre las células sino que además son un estímulo suficiente para disparar la variación antigénica de *G. lamblia* *in vitro*.

2.2. Recambio de VSPs debido a la variación antigénica

Ya demostrado que los mAbs inducen un cambio en la expresión de las proteínas variables de superficie, nos propusimos elucidar si este cambio resulta totalmente aleatorio o es regulado hacia la expresión de una determinada VSP.

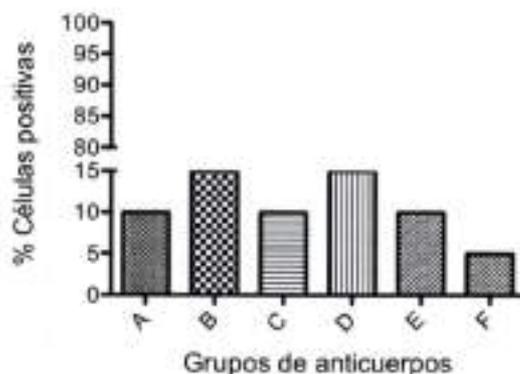
Para ello, una población clonal de trofozoitos expresando la VSP-9B10 fue crecida en presencia del mAb específico por 3 días, induciendo la variación antigénica como fue demostrado en la sección anterior. Posteriormente se evaluó hacia cuál o cuáles nuevas VSPs cambiaba la VSP-9B10 de partida mediante inmunofluorescencia usando como anticuerpos primarios paneles de anticuerpos constituidos por diferentes fluidos ascíticos o sobrenadantes de hibridomas capaces de reconocer diferentes VSPs. Los paneles se detallan en la Tabla 1.

A	B	C	D	E	F
9B10	5C1	2B10	7C9	3B8	7H2
	6E7	2G10	7C10	4A2	7H5
	2D5	7A9	7D4	5E5	2D10
	2C4	7C2	2D4		

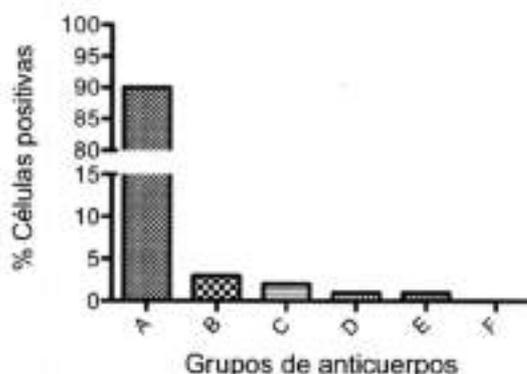
Tabla 1– Paneles de mAbs contra diferentes VSPs

En la Tabla se detalla la composición de cada panel de mAbs utilizados para identificar la/s nueva/s VSPs que comienzan a expresarse luego del recambio inducido por la variación antigénica. Ésta fue disparada sobre un clon de VSP-9B10 incubado por 3 días con mAbs 9B10. El panel A sólo está compuesto por el mAb 9B10 (control). Los restantes 5 paneles (B, C, D, E y F) se componen de mezclas de ascíticos y sobrenadantes de hibridomas anti-VSPs.

El recambio de la VSP-9B10 por nuevas VSPs luego del estímulo de 3 días con el mAb 9B10 fue cuantificado por microscopía de fluorescencia determinando el porcentaje respecto al total de células expresando la/s VSP/s de cada panel (Figura 10).

A Clon 9B10 estimulado con mAb 9B10**Fig. 10 – Recambio de VSPs debido a la variación antigénica**

Un clon de VSP-9B10 fue estimulado con mAb 9B10 (A) o no fue estimulado (B, control) por 3 días. Los trofozoítos recuperados luego de este tiempo fueron incubados con los distintos paneles de mAbs detallados en la Tabla 1, realizando luego una inmunofluorescencia para contabilizar el porcentaje de células positivas para cada uno de los paneles ensayados.

B Clon 9B10 sin estímulo de mAb

Como se puede ver en los resultados expuestos en la Figura 10A, luego del estímulo de variación antigénica el recambio de la VSP-9B10 de superficie es totalmente aleatorio, sin manifestarse la expresión de ninguna VSP específica presente en los paneles descriptos en la Tabla 1. En efecto, cada panel de anticuerpos reconoció entre un 10-15 % de las células luego de los 3 días de estímulo con mAb 9B10 (a excepción del grupo F que marcó sólo un 5% de células), indicando no sólo que hubo variación antigénica si no que el recambio de VSP-9B10 fue aleatorio hacia diferentes nuevas VSPs.

Al analizar las células control sin ningún estímulo de mAb (Fig. 10B), se pueden arribar a conclusiones similares. Luego de 3 días de variación antigénica espontánea, el 90% de las células aún expresaban la VSP-9B10 en su superficie. El 10% restante de las células comenzaban a expresar diferentes nuevas VSPs y no una en particular.

2.3. Internalización de mAbs 9B10 por células de un clon de trofozoítos VSP-9B10

Con el fin de estudiar el mecanismo de recambio de las VSPs, se realizó un ensayo para evaluar si los mAbs específicos hacia una VSP son internalizados por los trofozoítos. Para ello se incubaron células de un clon VSP-9B10 con el mAb 9B10 en frío, permitiendo así la adherencia del mAb a la superficie celular pero bloqueando los mecanismos de transporte intracelular y disminuyendo el metabolismo celular. Después se incubaron las células a 37°C por distintos tiempos para inducir sincronizadamente el transporte intracelular, luego de los cuales las células se fijaron, se marcaron con un anticuerpo secundario fluorescente y se observaron en un microscopio confocal (Figura 11).

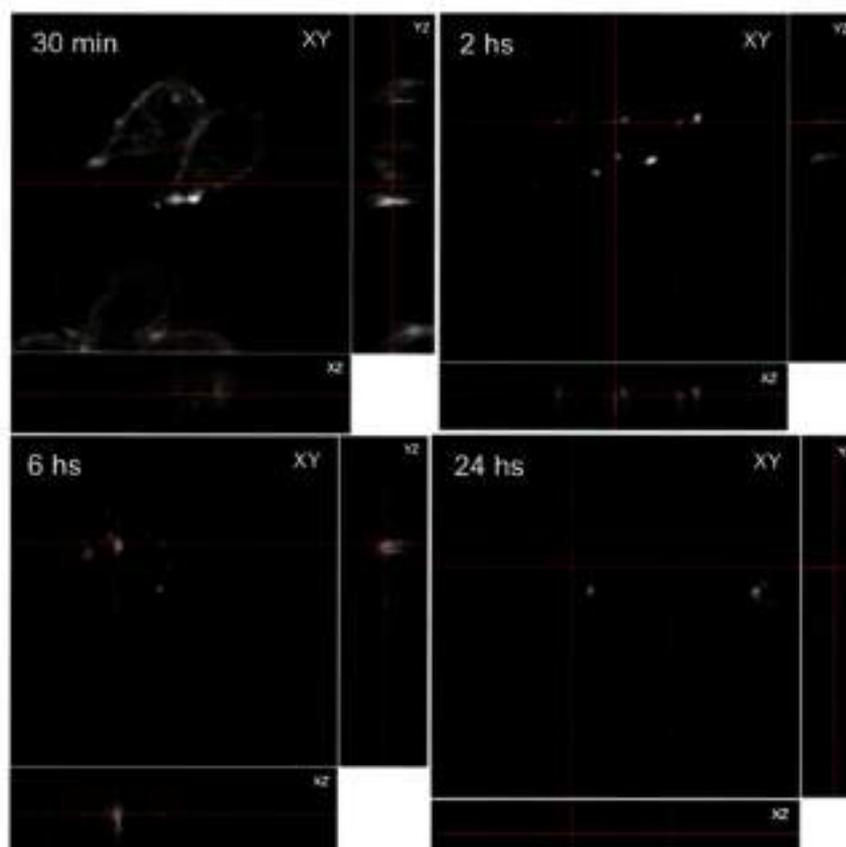


Fig. 11 – Internalización de mAb 9B10 por células de un clon VSP-9B10

Células de un clon VSP-9B10 fueron incubadas por distintos tiempos (30 minutos, 2, 6 o 24 horas) con mAb 9B10, luego de los cuales fueron fijadas y marcadas con un anticuerpo secundario fluorescente. Las imágenes fueron tomadas con microscopio confocal equipado con un objetivo 100X, realizando secciones ópticas de 0,5 μ m. Se muestra la internalización de las proteínas variables de superficie a distintos tiempos en el plano XY y en las secciones ortogonales YZ y XZ.

Los mAbs adheridos en frío a las VSPs de la superficie de los trofozoitos siguieron el destino de estas proteínas cuando las células fueron reincubadas en condiciones normales de crecimiento. Como se puede observar en la Figura 11, el mAb 9B10 empieza a ser internalizado a los 30 minutos de incubación con los trofozoitos, hasta ser degradados casi completamente en 24 horas, posiblemente en las vesículas periféricas de los parásitos. De esta manera, la internalización de los mAbs indica indirectamente la internalización de la VSP a la que reconocen en la superficie

Nuestros resultados sugieren que el recambio de VSPs se lleva a cabo mediante internalización de las proteínas y no por medio de un corte proteolítico de la porción extracelular y posterior secreción, como previamente fue publicado (Papanastasiou y col. 1996).

3. Mecanismos moleculares de inducción de variación antigénica por mAbs específicos anti-VSPs

3.1. Modulación de la maquinaria de RNA de interferencia (RNAi) durante la variación antigénica inducida por mAb contra VSPs específicas

Parte de los resultados presentados en esta sección se realizaron en colaboración con el Dr. Pablo Gargantini y fueron publicados en el año 2012 (Gargantini y col 2012).

Siendo el proceso de variación antigénica de *G. lamblia* dependiente de una regulación génica post transcripcional mediada por las enzimas que forman parte del mecanismo de RNAi, nos propusimos estudiar cómo es modulada la maquinaria de RNAi al inducir la variación antigénica con mAbs anti-VSPs tal como se estableció en las secciones anteriores.

Las enzimas seleccionadas fueron Dicer, Argonauta y todas las RNA helicasas putativas con dominio DexD/H-box presentes en el genoma de *Giardia* (Tabla 2). La inclusión de estas helicasas, que fueron descritas por primera vez por nuestro grupo (Gargantini y col. 2012), se debe a la ausencia en la enzima Dicer de *Giardia* de un dominio helicasa característico que está presente en eucariotas superiores, conservando sin embargo esta actividad (Gargantini y col 2012).

Tabla 2 – ORFs de helicasas putativas con dominio DexD/H-box presentes en el genoma de *G. lamblia* aislado WB

En la tabla se presenta la lista de las 3 familias de helicasas putativas de *G. lamblia*: DEAD, DEAH y Ski2 con sus correspondientes números de gen en la base de datos Giardia DB. Los supercontigs indican la localización de las helicasas putativas en el genoma de *G. lamblia* WB. En la columna de la derecha se indican los tamaños de los genes en pares de bases (bp) y los tamaños de las proteínas putativas (kDa).

Familia	GiardiaDB número de gen (GL50803)	Supercontig [Localización]	Tamaño bp/kDa
DEAD	2098	CH991763 [864345 - 865637 (+)]	1293/48.4
	6283	CH991768 [1188803 - 1190233 (+)]	1431/53.9
	9119	CH991768 [203089 - 204441 (+)]	1353/49.2
	10255	CH991762 [138060 - 139235 (+)]	1176/43.2
	13156	CH991767 [109383 - 110669 (-)]	1287/47.9
	13220	CH991814 [366102 - 368372 (+)]	2271/84.4
	13791	CH991779 [1197337 - 1199214 (-)]	1878/70.8
	14098	CH991767 [1214669 - 1216984 (+)]	2316/86.1
	14451	CH991762 [365588 - 367252 (+)]	1665/62.1
	15048	CH991768 [1297275 - 1299245 (-)]	1971/73.3
	15555	CH991767 [1097784 - 1099976 (+)]	2193/82.6
	16042	CH991767 [664969 - 666867 (-)]	1899/70
	16376	CH991776 [20394 - 21944 (+)]	1551/56.9
	16806	CH991779 [1405408 - 1407234 (+)]	1827/67.2
	16887	CH991763 [909549 - 911192 (+)]	1644/60.6
	17239	CH991782 [136732 - 138450 (+)]	1719/63.4
	17497	CH991814 [428694 - 430940 (-)]	2247/82.4
	34684*	CH991776 [21991 - 23994 (+)]	2004/74.4
	90950	CH991768 [1257745 - 1260447 (-)]	2703/100.2
	95898	CH991771 [72852 - 74534 (-)]	1683/62.6
96537	CH991767 [1627234 - 1629084 (+)]	1851/68.9	
113655	CH991782 [323813 - 325498 (+)]	1686/62.9	
DEAH	6616	CH991767 [577536 - 579914 (+)]	2379/87.8
	13200*	CH991767 [234403 - 237803 (-)]	1911/70.5
	15930	CH991763 [922033 - 924174 (+)]	2142/79.3
	17387	CH991763 [700216 - 704652 (-)]	4437/166.2
	17539	CH991768 [189279 - 191339 (+)]	2061/76.6
	92739	CH991768 [688757 - 692506 (+)]	3750/140.7
Ski2	9352	CH991767 [517145 - 521929 (-)]	4785/177.3
	11384	CH991769 [155212 - 157911 (-)]	2700/98.9
	17146	CH991779 [91546 - 95631 (-)]	4086/151.9
	87022	CH991779 [996103 - 1003368 (-)]	7266/273.6

Para determinar si la inducción de la variación antigénica por mAbs modula la maquinaria de RNAi, se incubaron clones de VSP-1267 de *G. lamblia* con los mAbs específicos (mAb 5C1) durante dos rangos de tiempo: 30 minutos – 1 hora (temprano) o 3 – 4 horas (tardío), luego de los cuales se midió la expresión relativa de los RNA mensajeros de las enzimas previamente mencionadas por Real time PCR (Fig. 12).

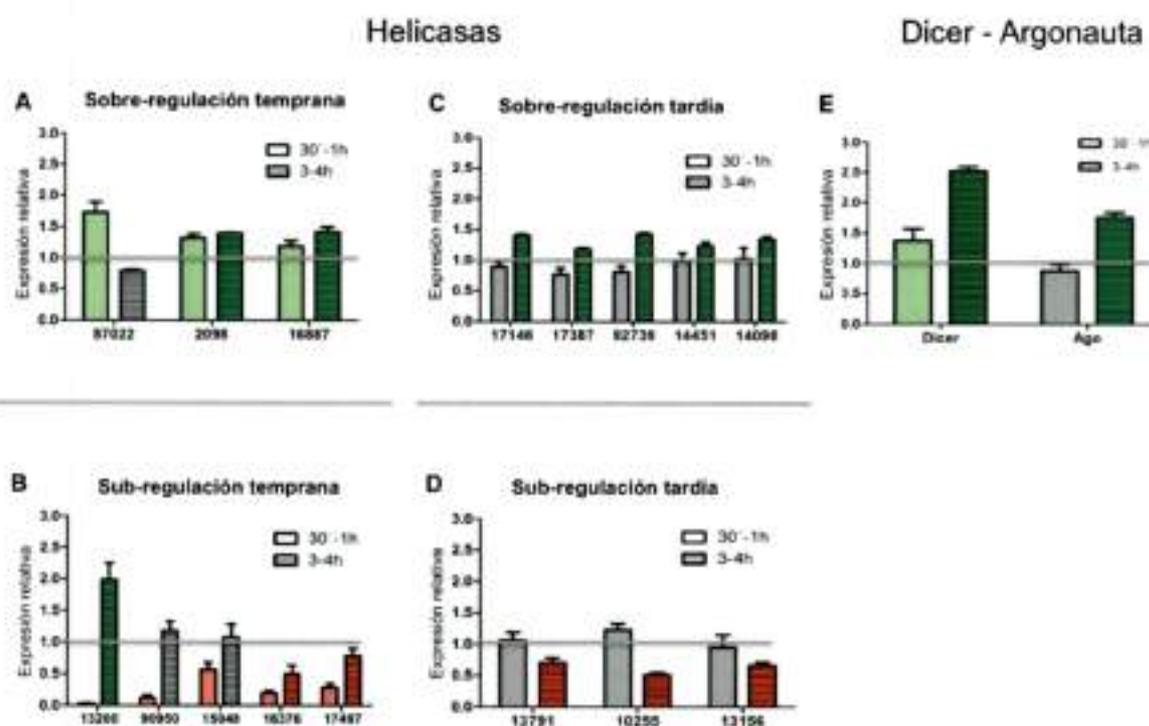


Fig. 12 - Expresión relativa de diferentes enzimas involucradas en el mecanismo de RNAi después del estímulo de variación antigénica

La expresión relativa fue calculada después de inducir la variación antigénica de un clon VSP-1267 con el mAb 1267 (5C1) por 30 min – 1 hora (barras vacías) o por 3-4 horas (barras llenas). **A-D:** Expresión relativa de diferentes helicasas (indicadas por sus números de genes en el genoma de *G. lamblia* WB), que se agruparon en sobre-reguladas (**A** y **C**) y sub-reguladas (**B** y **D**). Las barras verdes representan una sobre-regulación significativa, las barras rojas una sub-regulación significativa, las barras grises indican que no se encontraron modificaciones de la expresión relativa. **A:** Helicasas sobre-reguladas luego de 30 min – 1 hora de estímulo. **B:** Helicasas sobre-reguladas después a 3-4 horas de estímulo. **C:** Helicasas sub-reguladas luego de 30 min – 1 hora de estímulo. **D:** Helicasas sub-reguladas luego de 3-4 horas de estímulo. **E:** expresión relativa temprana y tardía de los mensajeros de Dicer y Argonauta.

Como se observa en la Figura 12, la expresión relativa de 8 helicasas putativas es sobre-regulada frente al estímulo de variación antigénica (Fig. 12A y 12C), mientras que 8 helicasas putativas fueron sub-reguladas (Fig. 12B y 12D). Esto ocurrió a tiempos tempranos y tardíos luego de la estimulación con mAbs. Por otro lado, Dicer fue sobre-regulada a tiempo temprano y tardío luego del estímulo de variación antigénica, mientras que Argonauta fue también sobre-regulada pero solamente a tiempos tardíos (Fig. 12E).

Con estos resultados concluimos que el estímulo de variación antigénica se transmite desde las VSPs en la superficie celular hacia el interior de las células, a través de un mecanismo todavía no dilucidado, y que afecta la expresión de enzimas involucradas con el mecanismo de RNAi de *G. lamblia*, como Dicer, Argonauta y al menos 16 helicasas putativas.

3.2. Modificaciones de histonas y variación antigénica

Parte de los resultados presentados en esta sección se realizaron en conjunto con los Drs. Pedro Carranza y Pablo Gargantini (Carranza y col, en preparación).

Recientemente en nuestro laboratorio se descubrió que diferentes enzimas que participan en el proceso de modificación post transduccional de las histonas pueden estar involucradas en los mecanismos de regulación de la expresión de genes relacionados con la variación antigénica y el enquistamiento (Carranza y col. en preparación).

Para estudiar si la inducción de la variación antigénica por mAbs dispara mecanismos de regulación epigenéticos, se analizaron diferentes modificaciones post traduccionales de histonas luego de estimular clones de VSPs de *Giardia* con mAbs específicos. En estos ensayos se utilizaron anticuerpos contra diferentes modificaciones post traduccionales de histonas humanas (ver *Materiales y Métodos*), los cuales presentan reactividad cruzada con las mismas modificaciones en *G. lamblia* (Carranza y col. en preparación). Luego del estímulo con los mAbs anti-VSPs, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con los anticuerpos anti-modificaciones de histonas para determinar la localización específica de estas modificaciones en los núcleos de *Giardia*. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 13.

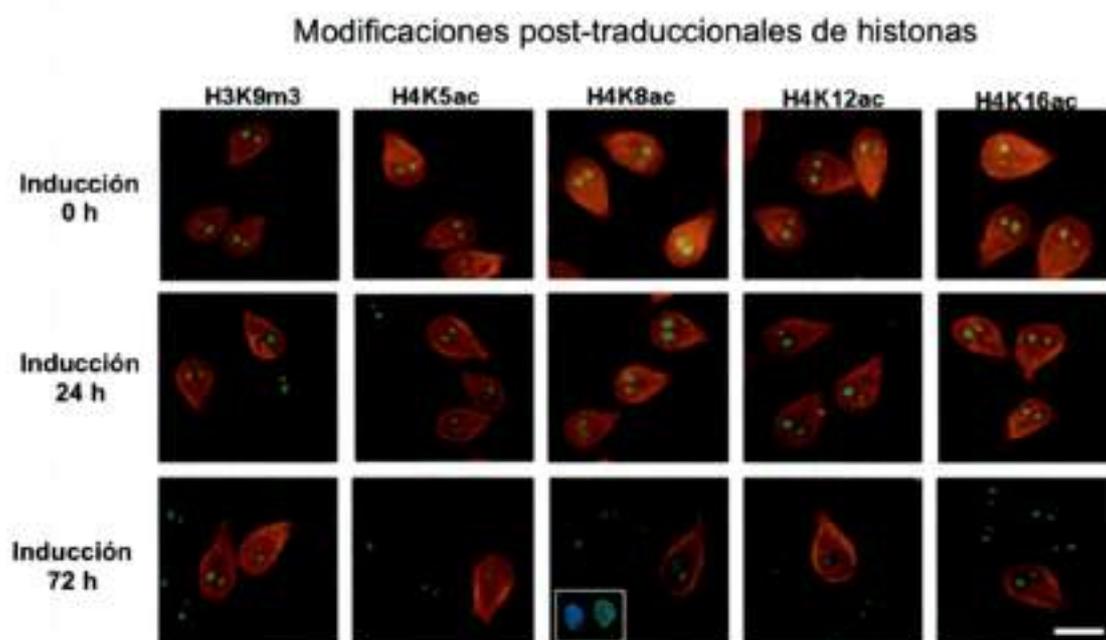


Fig. 13 – Localización de modificaciones post traduccionales de histonas luego de la inducción de la variación antigénica por mAbs anti-VSPs

Una población clonal de trofozoítos expresando la VSP 9B10 fue incubada con el mAb 9B10 por 24 y 72 horas para inducir la variación antigénica, luego de las cuales se marcaron las células con distintos anticuerpos anti-modificaciones post-traduccionales de histonas (verde), con el mAb 9B10 fluorescente (rojo) y con DAPI (azul) para evidenciar los núcleos. Las distintas modificaciones estudiadas están detalladas sobre cada panel. Se muestran las micrografías de las mismas sin estímulo de variación antigénica (Inducción 0 h) o inducidas por 24 horas o 72 horas con los mAbs 9B10. En la magnificación del panel correspondiente a la modificación H4K8ac luego de 72 horas de estímulo se observan dos núcleos de una célula que tuvo variación antigénica (no expresando más la VSP 9B10), evidenciándose una localización perinuclear de la modificación, a diferencia del resto de las modificaciones las cuales no cambian de localización. Escala: 10 μ m.

Como se puede notar, la mayoría de las modificaciones de histonas no cambian durante el proceso de variación antigénica, a excepción de la acetilación de la lisina 8 en la histona 4 (panel H4K8ac), que cambia su localización difundida en el núcleo a una localización perinuclear (magnificación a las 72 horas de estimulación). Este resultado sugiere que el estímulo de variación antigénica producido por los mAb anti-VSPs puede ser traducido en el interior de las células como un cambio en la conformación de la cromatina, modificando así la expresión de ciertos genes.

3.3. Localización de la enzima RNA polimerasa RNA-dependiente (RpRd) luego de la inducción de la variación antigénica

La RpRd es una enzima involucrada en la producción de RNA doble hebra durante el mecanismo de RNAi y es un elemento clave para el correcto funcionamiento del mecanismo de variación antigénica de *G. lamblia*. La misma se encuentra normalmente localizada en el citosol y en posición perinuclear de los trofozoitos (Prucca y col. 2008).

Debido a su rol clave en el mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional en *Giardia*, así como en las modificaciones de la cromatina en *Schizosaccharomyces pombe* (Buhler y col. 2006; Volpe y col. 2002; Irvine y col. 2006; Woolcock y col. 2010; Halic y col. 2010), nos propusimos averiguar si durante el estímulo de variación antigénica inducido por mAbs anti-VSPs se producía una translocación de esta enzima a los núcleos de los trofozoitos.

Como no disponíamos de anticuerpos contra la RpRd para estudiar la proteína endógena, se clonó en un plásmido de expresión la RpRd de *Giardia* fusionada al epitope HA y luego se transfectaron trofozoitos con este constructo. Una vez seleccionados los trofozoitos que expresaban la fusión RpRd-HA por inmunofluorescencia con anticuerpos anti-HA, se obtuvieron poblaciones clonales por dilución límite para la VSP 9B10. Estos clones de VSP 9B10 que a su vez expresaban RpRd-HA fueron estimulados con mAbs 9B10 para inducir la variación antigénica.

Como se puede observar en la Figura 14 y contrariamente a lo que se esperaba, la estimulación con el mAb anti-VSP específico de una población clonal de trofozoitos produce una deslocalización de la enzima RpRd-HA desde la región perinuclear al citosol en las primeras fases de la estimulación (50 minutos), para volver a su localización mayormente perinuclear 80 minutos después del primer estímulo.

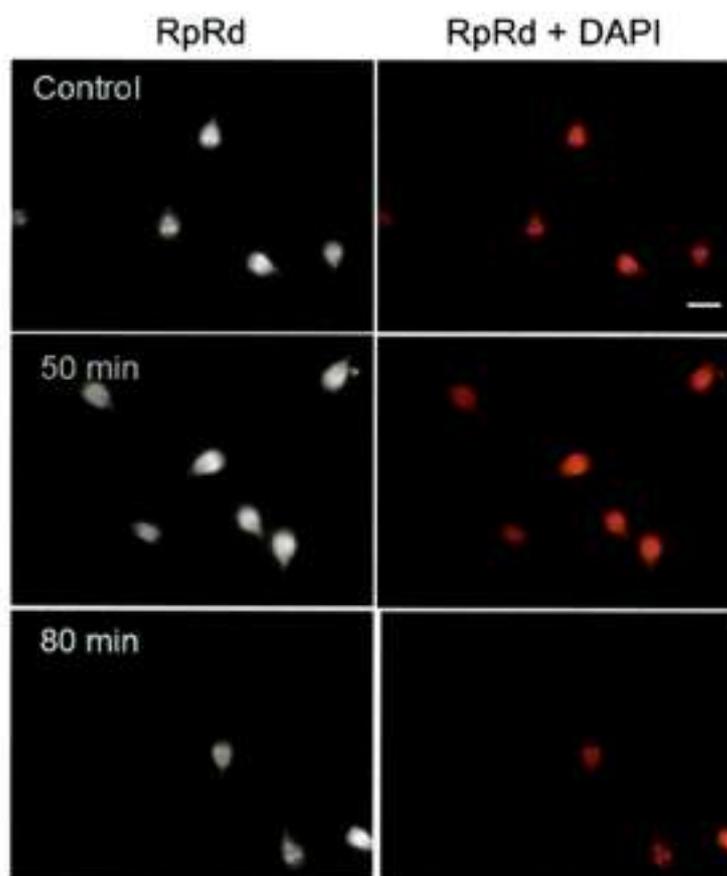


Fig. 14 – Localización de la RpRd-HA mediante inmunofluorescencia antes del estímulo (control) con mAb 9B10 y luego de 50 y 80 minutos post estímulo.

Izq.: trofozoitos marcados con anticuerpo de ratón anti-HA y anti ratón-FITC (gris).

Der.: combinación de imágenes de RpRd-HA (rojo) y núcleos marcados con DAPI (azul).

Escala: 20 μ m.

3.4. Variación antigénica de trofozoitos que co-expresan dos VSPs

3.4.1. Mutagénesis del tallo citoplásmico de la VSP H7

El genoma de *G. lamblia* posee alrededor de 200 genes codificantes para proteínas variables de superficie putativas. A pesar de la alta homología presente entre algunas de ellas (sobre todo en la región transmembrana), la única secuencia invariable entre las distintas VSPs es la representada por el tallo proteico citoplasmático C-terminal constituido por 5 aminoácidos: CRGKA. Hasta la fecha sigue siendo poco clara la funcionalidad de esta secuencia.

Para estudiar el rol de la misma y determinar si puede estar involucrada en la

transmisión de la señal de variación antigénica inducida por los mAb, realizamos mutagénesis sitio dirigida del tallo citoplásmico de la VSP H7, la cual tomamos como modelo. Desarrollamos 6 mutantes de la proteína H7: una mutante delecionada de tu tallo citoplásmico y 5 mutantes puntuales en la secuencia del mismo: KxA, siendo la lisina un blanco de varias modificaciones post-traduccionales (Zhang y col. 2011); RxA, siendo la arginina un hipotético blanco de la arginina deiminasa (Touz y col. 2008); CxK, siendo la cisteína un hipotético sitio de palmitoilación (Papanastasiou y col. 1997, Touz y col. 2005); CRGKAxKKKKK, para modificar radicalmente la carga del tallo citosólico y CRGKAxAAAAA, para obtener un tallo citosólico apolar.

Tales mutantes más la secuencia del gen salvaje (WT), pertenecientes a la cepa de *Giardia* GS, fueron sucesivamente transfectadas en la cepa WB que naturalmente no posee homólogos de esta VSP, produciendo así 7 clones de *Giardia* capaces de expresar 2 VSPs en la superficie al mismo tiempo: la VSP nativa (9B10) y la VSP recombinante H7 sobre-expresada.

3.4.2. Variación antigénica con trofozoítos que expresan las VSPs H7 recombinantes

Para estudiar cómo el estímulo del mAb genera como respuesta una variación antigénica en el trofozoíto, y si la secuencia citoplasmática de las VSPs está involucrada en ese proceso, realizamos los ensayos de variación antigénica en poblaciones clonales de *Giardia* que expresaban dos VSPs al mismo tiempo, la nativa VSP-9B10 y la recombinante H7. La hipótesis en la que se basa el ensayo es que, si estimulada con el mAb G10/4 (anti H7), la proteína recombinante es capaz de transmitir al interior de la célula la señal de variación antigénica y permitir el cambio de la proteína de superficie nativa, en este caso VSP-9B10.

Lamentablemente, la producción de células capaces de expresar las dos VSPs al mismo tiempo con la técnica de la dilución límite resultó particularmente difícil, por lo que sólo se logró coexpresar VSP 9B10 con las versiones de H7: H7WT; H7polyK o H7KxA. Hasta la fecha no fue posible clonar poblaciones celulares capaces de expresar en gran número la VSP 9B10 con la otras VSPs recombinantes.

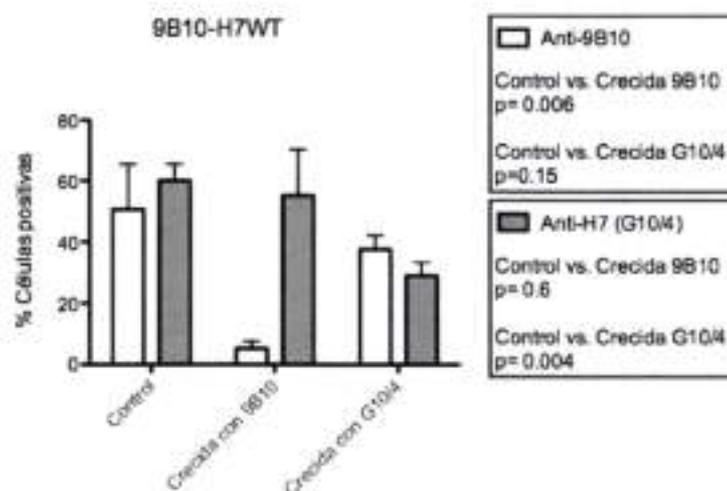


Fig. 15 – Ensayo de variación antigénica con trofozoítos que coexpresan VSP-9B10 y VSP-H7WT

Clones de trofozoítos co-expresando VSP-9B10 y VSP-H7WT fueron estimulados durante 3 días sin mAb (Control); con mAb 9B10 o con mAb G10/4 (anti H7), luego de los cuales los trofozoítos fueron marcados sin fijación con mAb 9B10-FITC (barras blancas) o con G10/4-FITC (barras grises) y fueron inmediatamente tomadas imágenes en un microscopio de fluorescencia. Se contabilizó el porcentaje de células positivas para cada una de las VSPs. Barras: error estándar. Los valores de p se determinaron con el test t de Student. $n=2$.

Como se puede observar en Figura 15, una población de trofozoítos que expresan en grandes cantidades las VSPs 9B10 y H7WT (la proteína H7 sin mutaciones), crecida en presencia del anticuerpo anti VSP-9B10, muestran una variación antigénica significativa de la VSP 9B10 ($p= 0.006$) pero no una variación antigénica significativa de la proteína H7 ($p= 0.15$). Sin embargo, se puede notar una reducción del porcentaje de células positivas para el mAb G10/4 (anti-H7), por lo cual no se puede excluir que el estímulo del anti-9B10 haya causado una disminución de la expresión de la proteína recombinante aunque esté sobre-expresada.

La misma población, crecida en presencia de mAb G10/4 (anti-H7) no mostró una significativa variación antigénica de la VSP-9B10, pero sí una significativa disminución de la expresión de la proteína H7 recombinante.

El mismo experimento fue repetido con las células 9B10-H7polyK, que expresaban tanto la proteína 9B10 como la mutante H7 con 5 lisinas en lugar de los 5 aminoácidos

CRGKA. Como se puede observar en Figura 16, cuando las células se cultivaron con el mAb 9B10 se indujo la variación antigénica de la VSP-9B10, pero no hubo ninguna variación de la expresión de la proteína recombinante H7polyK. Sorprendentemente, las células que crecieron en presencia del mAb G10/4 no mostraron ninguna disminución de la expresión de la VSP-9B10 y una ausencia total de la expresión de la VSP-H7polyK.

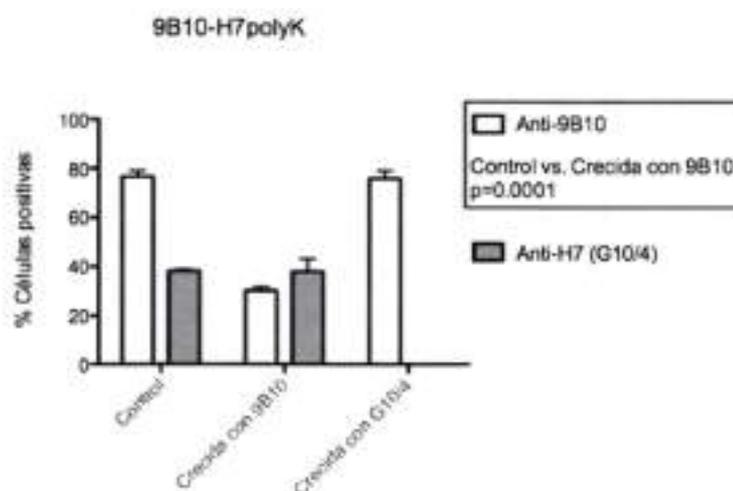


Fig.16 - Ensayo de variación antigénica con trofozoítos que co-expresan 9B10 y H7polyK
Clones de trofozoítos co-expresando VSP-9B10 y VSP-H7polyK fueron estimulados durante 3 días sin mAb (Control); con mAb 9B10 o con mAb G10/4 (anti H7), luego de los cuales los trofozoítos fueron marcados sin fijación con mAb 9B10-FITC (barras blancas) o con G10/4-FITC (barras grises) y fueron inmediatamente tomadas imágenes en un microscopio de fluorescencia. Se contabilizó el porcentaje de células positivas para cada una de las VSPs. Barras: error estándar. Los valores de p se determinaron con el test t de Student, $n=2$.

A continuación, se estimuló la variación antigénica de las células co-expresando 9B10-H7KxA, tal como se muestran en la Figura 17. Se puede observar la variación antigénica normal de la VSP-9B10 producida por el mAb específico y una significativa disminución de la expresión de la proteína recombinante H7 KxA debido a una variación antigénica inducida por el mAb anti-9B10. Una tendencia similar puede observarse también en Figura 15, solo que, en ese caso, la disminución de la expresión no fue significativa. También en este ensayo las células que crecieron en presencia del mAb G10/4 mostraron una desaparición total de la expresión de la proteína mutante H7.

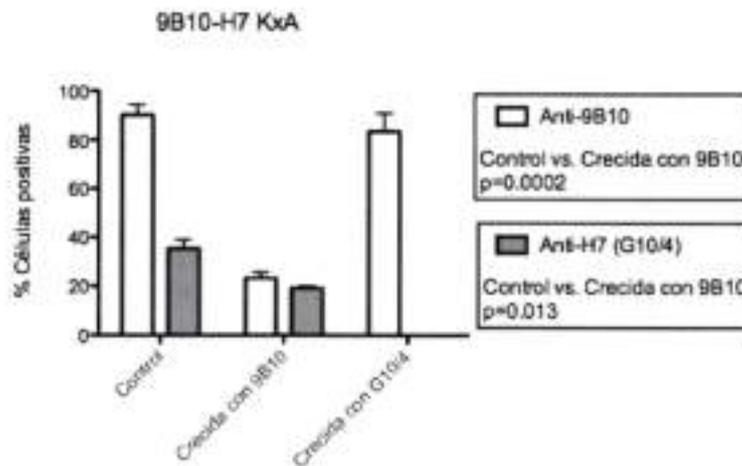


Fig.17 - Ensayo de variación antigénica con trofozoitos que co-expresan 9B10 - H7 KxA
 Clones de trofozoitos co-expresando VSP-9B10 y VSP-H7 KxA fueron estimulados durante 3 días sin mAb (Control); con mAb 9B10 o con mAb G10/4 (anti H7), luego de los cuales los trofozoitos fueron marcados sin fijación con mAb 9B10-FITC (barras blancas) o con G10/4-FITC (barras grises) y fueron inmediatamente tomadas imágenes en un microscopio de fluorescencia. Se contabilizó el porcentaje de células positivas para cada una de las VSPs. Barras: error estándar. Los valores de p se determinaron con el test t de Student. n=2.

Estudios sucesivos de inmunofluorescencia utilizando sólo un anticuerpo secundario anti-ratón marcado fluorescente sobre las células 9B10-H7polyK y 9B10-H7KxA han demostrado la permanencia en la superficie de los mAbs G10/4 utilizados para inducir la variación antigénica (no mostrado). La aparente desaparición de las proteínas recombinantes observada en las Figuras 16 y 17 podría explicarse si tenemos en cuenta que los trofozoitos que expresaban las VSP H7 mutantes crecieron en presencia del anticuerpo G10/4 y por eso todos los epitopes podrían estar cubiertos por dicho anticuerpo. Cuando fue utilizado el mAb G10/4-FITC para relevar la expresión de las mutantes de VSP H7, ningún epitope fue reconocido, dando como resultado una aparente variación antigénica.

No es claro cómo este fenómeno sólo pudo observarse en el caso de las dos mutantes de VSP H7 y no con células 9B10-H7WT. Nuestra hipótesis es que las mutaciones presentes en la porción citoplasmática de la VSP H7 interfieren con el normal recambio de las proteínas variable de superficie, impidiendo la internalización de las proteínas.

Discusión

Los seres humanos, como otros mamíferos y organismos pluricelulares, son el resultado de un proceso de co-evolución entre organismos comensales y huésped que se produce desde hace millones de años. No obstante esta relación entre organismos “huéspedes” y organismos “residentes” tenga principalmente un carácter de tipo simbiótico, como se puede observar en relación a la microflora que coloniza los intestinos, algunos organismos han desarrollado mecanismo dañinos hacia los huéspedes con el fin de poder aprovechar de las condiciones ambientales óptimas para su reproducción y propagación. Al mismo tiempo, bajo esta presión evolutiva, se han seleccionado en los organismos huéspedes mecanismos de defensa capaces de contrarrestar esta invasión (Deitsch y col. 2009; Hovel-Miner y col. 2015).

A lo largo de su evolución, varios protistas han desarrollado complejos mecanismos moleculares para poder invadir organismos huésped y eludir los sistemas de defensa. Uno de ellos consiste en el variar la expresión de las proteínas de superficie para poder camuflarse del sistema inmunitario. Dicho mecanismo es conocido como Variación Antigénica y es utilizado por varios organismos como por ejemplo *Giardia lamblia*, *Trypanosoma brucei* y *Plasmodium falciparum* (Prucca y col. 2008; Hovel-Miner y col. 2015; Guizetti y col. 2013).

Hasta la fecha no queda claro si hay una interacción directa entre el sistema inmunitario de los organismos parasitados y los mecanismos que regulan la variación antigénica de los parásitos, es decir si la inmunidad adaptativa de los organismos huéspedes seleccionen o induzcan la variación antigénica en dichos protistas (Ankarklev y col. 2010; Matthews y col. 2015; Guizetti y col. 2013).

En el presente trabajo de tesis nos propusimos estudiar el rol de los mAbs contra VSPs en el proceso de variación antigénica del parásito intestinal *Giardia lamblia*.

A tal propósito se abordaron en detalle los siguientes puntos:

- El efecto citotóxico de los mAb anti-VSPs
- El efecto de los mAb sobre el proceso de variación antigénica en *Giardia*

Efecto citotóxico de los mAb anti-VSPs

En las últimas décadas se publicaron varios reportes donde se describió el efecto citotóxico complemento-independiente de los mAb anti-VSP de *Giardia* (Heyworth y col. 1992; Nash y col. 1986; Stager y col. 1997; Touz y col. 2005). Estos resultados postulan que el sistema inmunitario podría limitarse a la selección de las células que cambian los antígenos de superficie en vez de tener una relación molecular más estrecha y compleja con los parásitos, tal como un antibiótico selecciona las bacterias mutantes que casualmente se generan.

Puesto que no se publicaron estudios concluyentes relacionado a este tema de investigación, para clarificar la relación exacta entre sistema inmunitario humoral y la variación antigénica de *Giardia*, desarrollamos diferentes ensayos de citotoxicidad para corroborar los efectos previamente descritos y evidenciar eventuales concentraciones de mAb no citotóxicas que nos permitieran seguir nuestros estudios.

En el primer ensayo llevado a cabo fue utilizada una elevada dilución de los mAb, treinta veces mayor a la descrita como citotóxica (Nash y col. 1986), con el fin de asegurarnos que no hubiera muerte celular, dato necesario para los ensayos que venían a continuación. Como esperado, no se detectó ningún efecto citotóxico (Figura 4 – Barras blancas).

Un dato interesante es que no obstante la elevada dilución utilizada, cuando analizamos las células al microscopio pudimos notar los mismo efectos de inmovilización, falta de adhesión y aglutinación que fueron indicadores de citotoxicidad (Nash y col. 1986; Touz y col. 2005) pero el sistema de discriminación entre células vivas o muertas utilizado indicó que los trofozoítos eran viables (Figura 3).

Debido a esta evidencia, en el ensayo de proliferación pusimos a incubar todas las células y no sólo los trofozoítos adheridos a la placa de cultivo, como había sido especificado en los protocolos originales (Nash y col. 1986; Touz y col. 2005) y como esperado no notamos ninguna diferencia en la proliferación celular entre *Giardia* incubada con mAb y control (Figura 5 – Barras blancas).

El paso siguiente fue confirmar la citotoxicidad de los mAbs a las concentraciones previamente reportadas. Para este fin realizamos ensayos de citotoxicidad llevados a cabo con el kit comercial Cell Titer 96 Aqueous, un sistema colorimétrico que permite determinar la actividad metabólica de las células y correlacionarla con las células viables en

el medio de cultivo. Los dos resultados obtenidos con estos experimentos fueron inesperados. Por un lado no pudimos detectar ninguna actividad citotóxica con diluciones de los mAb críticas de 1:50 y 1:20 y, por otro lado, vimos un aumento significativo de la actividad reductora de los trofozoítos (Figura 6).

Muy interesantemente, este aumento de la actividad metabólica no fue debido a un aumento de la proliferación celular (Figura 7), lo cual evidencia que los mAb no sólo no son citotóxicos, sino que también pueden inducir un aumento de la actividad reductora de los trofozoítos. Esto sugiere que la interacción entre mAb y VSP de *Giardia* puede disparar una señalización intracelular, como ha sido descrito para *Paramecium* y *Tetrahymena*, dos protistas de vida libre (Juergensmeyer 1969; Preer 1986; Simon 2007).

Estos resultados, contrastantes con lo previamente publicado, se pueden explicar por las diferencias metodológicas utilizadas respecto a los primeros ensayos de proliferación. Los mAbs, probablemente afectando la adhesión celular y favoreciendo la aglutinación de los parásitos (Langford y col. 2002), disminuyen el número de células que se mantienen adheridas a la placa de cultivo. Por esta razón en los ensayos previamente publicados y en los cuales se descartaban las células no adheridas, se excluía del análisis la mayoría de los trofozoítos vivos, sobreestimando la citotoxicidad de los mAbs.

No se sabe hasta la fecha cuál es la importancia de la acción de los factores del complemento en la eliminación de los trofozoítos *in vivo* y se hipotetiza que no sea de gran relevancia en la erradicación de la infección de *Giardia*, debido a la localización en la que ocurre (Singer 2011). Igualmente en los ensayos de citotoxicidad quisimos estudiar el rol de las proteínas del complemento incubando los parásitos con mAb y suero de ratón.

Los resultados obtenidos (Figuras 4 y 5 – barras grises) son de difícil interpretación. Por un lado tenemos un pequeño efecto citotóxico complemento-dependiente evidente para los clones VSP-9B10 pero no para los clones VSP-1267 y VSP-H7; por otro lado, existe una clara evidencia que la incubación de células con suero de ratón puede interferir con la proliferación normal de los trofozoítos dependiendo del anticuerpo utilizado. Las células incubadas con mAb anti-9B10 (isotipo IgG) y suero de ratón, además de sufrir un leve efecto citotóxico, demostraron una proliferación significativamente menor en comparación con el control. El mismo efecto no se pudo detectar en las células incubadas con el mAb 5C1 (anti-VSP1267) (isotipo IgM), indicando que el fenómeno podría ser dependiente ya sea de la clase de inmunoglobulinas utilizadas así como de la VSP expresada (Nash y col,

1990; Nash y col. 1991). Los resultados relativos a la cepa de *Giardia* GS incubada con mAb G10/4 (anti-VSPH7) son aún diferentes mostrando cómo, para esta cepa de parásitos, un exceso de suero de ratón (inactivado y no inactivado) en el medio de cultivo puede comprometer la proliferación celular normal. También en este caso los resultados son acordes a lo previamente reportado en cuanto a las diferentes respuestas de *Giardia* frente a distintos estímulos dependiendo de la cepa estudiada y de la VSP que expresa (Nash y col, 1990; Nash y col. 1991), fenómeno demostrado también en otros protistas como los *Paramecium* (Simón 2007). Sin embargo, son necesarios experimentos adicionales para confirmar estos resultados.

Efecto de los mAb sobre el proceso de variación antigénica en *Giardia*

Luego de haber demostrado la ausencia de un efecto citotóxico complemento-independiente o una disminución de la proliferación celular causados por los mAb, hemos estudiado el rol de tales anticuerpos en el proceso de variación antigénica, demostrando su capacidad de inducir el fenómeno *in vitro* con un recambio aleatorio de VSPs (Figuras 8, 9 y 10).

El fenómeno fue postulado en el pasado, pero nunca fueron llevados a cabo ensayos concluyentes para poderlo demostrar. En un estudio publicado en el 2008 por Touz y colaboradores, clones de *Giardia* VSP-9B10 fueron estimulados con el mAb específico por 24 horas sin que se pudiera detectar un cambio en la expresión de la VSP (datos conforme con los obtenidos por nosotros, ya que el cambio fenotípico puede ser detectado sólo después de 72 horas). En el mismo estudio, clones VSP-9B10 transfectados que sobreexpresaban la enzima arginina deiminasa, después de 24 horas de estímulo con mAb 9B10, disminuyeron levemente la expresión de la VSP-9B10, pasando del 95% de trofozoitos que la expresaban en el control al 85% en las células estimuladas con el mAb 9B10. Los autores concluyeron que la sobreexpresión de tal enzima estaría relacionada con un aumento de la variación antigénica al citrulinar la arginina del penta péptido citosólico de las VSP (CRGKA). Sin embargo, la disminución en la expresión de la VSP-9B10 al estimular con el mAb 9B10 era de menos del 10%, no quedando claro si esta pequeña disminución es estadísticamente significativa.

En el presente trabajo fue demostrado por primera vez y en manera reproducible que los mAb pueden disparar la variación antigénica sin tener efectos citotóxicos. Este

descubrimiento es muy importante, ya que ahora disponemos de un estímulo particular para inducir la variación antigénica *in vitro* y de esa manera podemos estudiar este fenómeno en condiciones controladas y sincronizadas en *Giardia lamblia*. Esto mismo aún no ha sido descrito para otros protistas patógenos que tienen variación antigénica, como *T. brucei* y *P. falciparum* (Matthews y col. 2015; Guizetti 2013).

Durante el proceso de variación antigénica, en diferentes protistas se han descrito grandes y variados cambios del estado de la cromatina, que van desde las metilaciones y deacetilaciones de histonas en *Plasmodium falciparum* (Chookajorn 2007; Freitas-Junior 2005; Lopez-Rubio 2007; Lopez-Rubio 2009) y en *Trypanosoma brucei* (Figueiredo 2008; Wang 2010), hasta el mecanismo de ARN interferencia transcriptional en *Paramecium tetraurelia* (Marker 2010; Barnasic 2014) que suele estar relacionado a mecanismos de regulación epigenéticos (Burger y Gullerova 2015).

Recientemente en nuestro laboratorio se ha demostrado que las histonas de *Giardia* pueden presentar modificaciones post-traduccionales como metilaciones y acetilaciones y que la inhibición de las enzimas deacetilasas interfieren en los procesos biológicos normales del parásito, inhibiendo el enquistamiento y acelerando el fenómeno de variación antigénica (Carranza y col. en preparación).

Ahora que tenemos esta herramienta de poder disparar la variación antigénica de manera controlada y regulada, podemos estudiar en más detalle cuáles son las interacciones entre las modificaciones de cromatina y el mecanismo de ARN interferencia que regula la variación antigénica de *Giardia* (Prucca y col. 2008).

Un resultado preliminar de estos estudios es presentado en la Figura 13, donde se pueden observar imágenes de microscopía de fluorescencia que muestran la localización nuclear de diferentes modificaciones de las histonas de *Giardia*. Después del estímulo con mAb se pudo notar solamente un cambio en las modificaciones de histonas relativo a la acetilación de la lisina 8 de la histona 4 (H4K8ac) que aparece con una nueva localización perinuclear, demostrando que el estímulo de variación antigénica puede modificar la conformación de la cromatina y entonces activar o inhibir la expresión de diferentes genes. Esta hipótesis fue corroborada por los resultados obtenidos en el estudio de expresión de los ARN mensajeros de las ARN helicasas, de Dicer y de Argonauta, donde se pudo demostrar un cambio en la expresión de varias enzimas involucradas en el mecanismo de ARN interferencia, el que regula la variación antigénica del parásito (Prucca y col. 2008) (Figura

12).

Los ensayos de citotoxicidad que demostraron un aumento de la actividad metabólica de las células, junto con los estudios de la expresión génica de Dicer, Argonauta y varias RNA-Helicinas (Gargantini y col. 2012), los estudios de inmunofluorescencia de las modificaciones de las histonas (Carranza y col. en preparación) y de la localización de la enzima RpRd (Figura 14), han demostrado que existen diferencias fenotípicas rápidas en la bioquímica de los trofozoitos luego de que son expuestos a períodos breves con los mAb anti-VSPs. Por el contrario, el fenómeno de variación antigénica puede ser detectado de manera confiable mediante microscopía sólo después de 3 días de la inducción inicial.

Una hipótesis que podría explicar estos resultados es asumir el cambio de la expresión de las proteínas VSPs como un fenómeno rápido cuando se producen nuevas VSPs, pero lento cuando se trata de la eliminación de la vieja VSP.

Esta hipótesis explicaría el fenómeno de coexistencia de dos VSP presentes en la superficie del mismo parásito al mismo tiempo durante la variación antigénica, lo cual fue previamente descrito y caracterizado (Nash y col. 2001).

El estímulo disparado por los mAb anti-VSP causa un recambio en la expresión de la proteína presente en la superficie de *Giardia*, pero poco se sabe de cómo ocurre este recambio. No obstante, algunos autores hipotetizan que pueden ser cortadas proteolíticamente y secretadas en el medio ambiente (Papanastasiou y col. 1996; Touz y col. 2005). En *Trypanosoma brucei*, las glicoproteínas variables de superficie (VSG) recubren la superficie de la forma infectiva del parásito y son constantemente endo- y exocitadas a nivel del bolsillo flagelar. Cuando están acomplejadas a IgG específicas son rápidamente internalizadas y degradadas (Engstler 2007; Hovel-Miner 2015).

A diferencia de lo que previamente se encuentra publicado (Papanastasiou y col. 1996; Touz y col. 2005) y de lo que ocurre en *T. brucei*, nuestro ensayo diseñado para estudiar el proceso de recambio de las VSPs ha demostrado que las proteínas de superficie no son escindidas proteolíticamente y luego secretadas en el medio ambiente, sino que son internalizadas y degradadas en algún compartimento intracelular aun no determinado. Este modelo concuerda con la hipótesis previamente enunciada sobre el recambio de las VSPs: debido al estímulo causado por los mAb, los trofozoitos comienzan a producir una VSP diferente y silencian la producción de la precedente. Mientras esto ocurre, el recambio de las proteínas de superficie no varía y sigue normalmente, con la diferencia que la proteína

que se expresaba precedentemente no es más producida y entonces disminuye progresivamente su concentración en la superficie celular. Por el contrario la nueva VSP empieza a aumentar su concentración en la membrana plasmática, porque a pesar del recambio proteico, su producción es constante. Nuestro modelo prevé una situación en donde una célula expresa dos VSP al mismo tiempo, una disminuyendo progresivamente su concentración y la otra aumentándola progresivamente, hasta poder ser detectada mediante inmunofluorescencia después de 3 días de la inducción inicial. Esta hipótesis concuerda con lo que ha sido publicado previamente (Nash y col. 2001). Sin embargo, para poder demostrar esta hipótesis sería necesario realizar ensayos complementarios.

Como fue previamente mencionado, las proteínas variables de superficie poseen un dominio citosólico formado por 5 aminoácidos (CRGKA) cuya función todavía no está dilucidada. Por los resultados discutidos previamente y por estudios publicados sobre la variación antigénica de *Paramecium* y *Tetrahymena*, donde se propuso que los anticuerpos puedan estimular una señalización intracelular (Juergensmeyer 1969; Preer 1986; Simon 2007), hipotetizamos que este dominio podría estar involucrado en la transmisión intracelular de la señal de variación antigénica.

Durante este trabajo de tesis desarrollamos diversos trofozoitos recombinantes capaces de expresar dos VSPs al mismo tiempo, una nativa (VSP-9B10) y la otra una VSP-H7 con mutaciones en la porción citosólica. La hipótesis en la que se basó nuestro ensayo es que, al ser estimulada con el mAb específico, la proteína recombinante con secuencia salvaje es capaz de transmitir al interior de la célula la señal de variación antigénica y permitir el cambio de la proteína de superficie nativa, mientras que las proteínas mutadas no deberían poder hacerlo.

Lamentablemente estos ensayos no han dado los resultados esperados, probablemente la razón se debe al sistema de sobre-expresión de las proteínas recombinantes utilizado. En los ensayos realizados con células 9B10-H7WT crecidas con mAb G10/4 (anti-VSPH7) se pudo observar una pequeña disminución de la expresión de la VSP-9B10 (no significativa pero de tendencia reproducible en otros experimentos) y una significativa disminución de la expresión de la VSP recombinante H7WT. La disminución de la VSP-9B10 no se detectó en los otros ensayos con las proteínas recombinantes, mientras que los niveles de expresión de la mutante VSPH7 KxA estimulada con mAb 9B10 fueron significativamente inferiores en comparación con el control, resultado que no se obtuvo con la mutante VSPH7 polyK en

los clones 9B10-VSPH7 polyK.

Llamativamente, los resultados de expresión de las proteínas H7 mutadas en los clones estimulados con mAb G10/4 no se pudieron determinar a causa de un fenómeno inesperado. Como fue explicado en el capítulo *Resultados* (Figuras 16 y 17), en el ensayo de inmunofluorescencia llevado a cabo con anticuerpo G10/4-FITC (un mAb marcado directamente con fluoresceína) no se pudieron detectar células positivas, mientras que un control negativo de inmunofluorescencia efectuado con trofozoítos fijados y usando sólo un anticuerpo secundario-FITC ha demostrado la presencia tanto de las VSPs mutadas, como del mAb G10/4 utilizado para inducir la variación antigénica. Este resultado fue sorprendente no solo porque no se presentó con las células 9B10-H7WT sino porque, como fue demostrado con el ensayo de internalización de mAb 9B10 (Figura 11), el complejo VSP-anticuerpo habría sido internalizado a las 24 horas.

Para poder llegar a conclusiones definitivas son necesarios ensayos complementarios de variación antigénica, también con las poblaciones de trofozoítos recombinantes que no se pudieron clonar, como la mutante VSPH7 RxA, ya que la citrulinación de la arginina podría estar asociada a un aumento de la variación antigénica (Touz y col. 2008). Sin embargo, los resultados hasta ahora obtenidos resultan alentadores ya que nos indican que la porción citosólica de las VSPs podría estar involucrada en el proceso de transmisión de la señal en el mecanismo de variación antigénica y estar participando activamente en el proceso de recambio de las proteínas variables de superficie.

No sabemos si el mecanismo de variación antigénica inducido por los anticuerpos anti-VSPs es fundamental para la supervivencia de los parásitos *in vivo*. En *T. brucei* y *P. falciparum* no están descriptos mecanismos de regulación análogos (Guizetti 2013; Matthews 2015). Al contrario, en *T. brucei* parece haberse desarrollado un sistema de eliminación rápido de los anticuerpos específicos contra las VSG (Engstler 2007). Organismos con sistemas de regulación génica muy similar a lo de *Giardia* son los *Paramecium*, protistas de vida libre con una variación génica regulada por un mecanismo de ARN interferencia (Marker 2010) y cuyo cambio de la expresión de antígenos de superficie puede ser inducido por anticuerpos (Simon 2007; Preer 1986). En este caso el sistema de variación antigénica inducido por interacciones entre proteínas (antígenos – anticuerpos) puede tener una ventaja selectiva, en cuanto fue demostrado que los predadores como *Didinium nasutum* pueden reconocer los *Paramecium* específicamente a

través de sus antígenos de superficie (Harumoto y Miyake 1992).

Sin embargo este mecanismo de inducción controlada de la variación antigénica puede tener gran relevancia para la investigación y nos confiere la posibilidad de mejorar nuestros conocimientos abriendo un amplio campo de estudios que nos permitirá en un futuro dilucidar completamente estos mecanismos utilizados por los protozoos parásitos.

Bibliografía

- Adam R D. 1991.** The biology of *Giardia* spp. *Microbiol Rev*, **55**:706-732.
- Adam R D. 2000.** The *Giardia lamblia* genome. *Int J Parasitol*, **30**:475-484.
- Adam R D. 2001.** Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev*, **14**:447-475.
- Adam R D, Aggarwal A, Lal A A, de La Cruz V F, McCutchan T y Nash T E. 1988.** Antigenic variation of a cysteine-rich protein in *Giardia lamblia*. *J Exp Med*, **167**:109-118.
- Adam R D, Nigam A, Seshadri V, Martens C A, Farneth G A, Morrison H G, Nash T E, Porcella S F y Patel R. 2010.** The *Giardia lamblia* vsp gene repertoire: characteristics, genomic organization, y evolution. *BMC Genomics*, **11**:424.
- Aggarwal A, Merritt J W, Jr. y Nash T E. 1989.** Cysteine-rich variant surface proteins of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol*, **32**:39-47.
- Alberts B. J A, Lewis J., Raff M., Roberts K. y Walter P. 2002.** Molecular Biology of the cell. *Garly Science*.
- Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, Zhang J, Zhang Z, Miller W y Lipman D.J. 1997.** Gapped BLAST y PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **25**:3389-3402.
- Andersen YS, Gillin FD & Eckmann L. 2006.** Adaptive immunity-dependent intestinal hy- permotility contributes to host defense against *Giardia* spp. *Infect Immun*; **74**: 2473–2476.
- Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG. 2015.** Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat Rev Microbiol.*; **8**: 413–422.
- Baranasic D., Oppermann T., Cheaib M., Cullum J., Schmidt H., Simon M. 2014.** Genomic characterization of variable surface antigens reveals a telomere position effect as a prerequisite for RNA interference-mediated silencing in *Paramecium tetraurelia*. *mBio.*, **5**, e01328–14
- Benchimol M. 2004.** Participation of the adhesive disc during karyokinesis in *Giardia lamblia*. *Biol Cell*, **96**:291-301.
- Benchimol M, Piva B, Campanati L y de Souza W. 2004.** Visualization of the funis of *Giardia lamblia* by high-resolution field emission scanning electron microscopy- -new insights. *J Struct Biol*, **147**:102-115.
- Biens M, Siles-Lucas M, Wittwer P y Muller N. 2001.** vsp gene expression by *Giardia lamblia* clone GS/M-83-H7 during antigenic variation in vivo y in vitro. *Infect Immun*, **69**:5278-5285.

- Birkhead G, Janoff E N, Vogt R L y Smith P D. 1989.** Elevated levels of immunoglobulin A to *Giardia lamblia* during a waterborne outbreak of gastroenteritis. *J Clin Microbiol*, **27**:1707-1710.
- Blumenthal T. 2011** Split genes: another surprise from *Giardia*. *Curr Biol*, **21**:R162-163.
- Borden K L. 2000.** RING domains: master builders of molecular scaffolds? *J Mol Biol*, **295**:1103-1112.
- Boucher S E y Gillin F D. 1990.** Excystation of in vitro-derived *Giardia lamblia* cysts. *Infect Immun*, **58**:3516-3522.
- Buchel L A, Gorenflot A, Chochillon C, Savel J y Gobert J G. 1987.** In vitro excystation of *Giardia* from humans: a scanning electron microscopy study. *J.Parasitol*, **73**:487-493.
- Bühler M, Verdel A, Moazed D. 2006.** Tethering RITS to a nascent transcript initiates RNAi- and heterochromatin-dependent gene silencing. *Cell*, **125**(5):873-86.
- Burger K, Gullerova M. 2015.** Swiss army knives: non-canonical functions of nuclear Drosha and Dicer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Jul;16(7):417-30.
- Caccio SM & Ryan U. 2008.** Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol Biochem Parasitol*; **160**: 75–80.
- Carranza P G, Feltes G, Ropolo A, Quintana S M, Touz M C y Lujan H D. 2002.** Simultaneous expression of different variant-specific surface proteins in single *Giardia lamblia* trophozoites during encystation. *Infect Immun*, **70**:5265-5268.
- Carranza P G y Lujan H D. 2010.** New insights regarding the biology of *Giardia lamblia*. *Microbes Infect*, **12**:71-80.
- Carranza PG, Gargantini PR, Prucca CG, Torri A, Saura A, and Lujan HD.** Specific histone modifications play critical roles in the control of encystation and antigenic variation in the early-branching protozoan *Giardia lamblia*.
- Carthew R W y Sontheimer E J. 2009.** Origins y Mechanisms of miRNAs y siRNAs. *Cell*, **136**:642-655.
- Cerutti H y Casas-Mollano J A. 2006.** On the origin y functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr Genet*, **50**:81-99.
- Cogoni C, Irelan J T, Schumacher M, Schmidhauser T J, Selker E U y Macino G. 1996.** Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector y does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *EMBO J*, **15**:3153-3163.
- Cogoni C y Macino G. 1999.** Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature*, **399**:166-169.

- Chakravarthy S, Sternberg S H, Kellenberger C A y Doudna J A. 2010** Substrate-specific kinetics of Dicer-catalyzed RNA processing. *J Mol Biol*, **404**:392-402.
- Chavez-Munguia B, Cedillo-Rivera R y Martinez-Palomo A. 2004.** The ultrastructure of the cyst wall of *Giardia lamblia*. *J Eukaryot Microbiol*, **51**:220-226.
- Chen Q, Barragan A, Fernyez V, Sundstrom A, Schlichtherle M, Sahlen A, Carlson J, Datta S y Wahlgren M. 1998.** Identification of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) as the rosetting ligand of the malaria parasite *P. falciparum*. *J Exp Med*, **187**:15-23.
- Chen X S, Collins L J, Biggs P J y Penny D. 2009.** High Throughput Genome-Wide Survey of Small RNAs from the Parasitic Protists *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis*. *Genome Biol Evol*, **2009**:165-175.
- Chookajorn T, Dzikowski R, Frank M, Li F, Jiwani AZ, Hartl DL, Deitsch KW. 2007.** Epigenetic memory at malaria virulence genes. *Proc Natl Acad Sci USA*;104:899-902
- Chute CG, Smith RP, Baron JA. 1987.** Risk factors for endemic giardiasis. *Am J Public Health*. May;77(5):585-7.
- Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, Angell S y Baulcombe D C. 2000.** An RNA- dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell*, **101**:543-553.
- Deitsch KW, Lukehart SA, Stringer JR. 2009.** Common strategies for antigenic variation by bacterial, fungal and protozoan pathogens. *Nat Rev Microbiol*;7(7):493-503.
- Diamond L S, Harlow D R y Cunnick C C. 1978.** A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* y other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **72**:431-432.
- Das S, Traynor-Kaplan A, Kachintorn U, Aley S B y Gillin F D. 1994.** GP49, an invariant GPI-anchored antigen of *Giardia lamblia*. *Braz J Med Biol Res*, **27**:463- 469.
- Davids B J, Mehta K, Fesus L, McCaffery J M y Gillin F D. 2004.** Dependence of *Giardia lamblia* encystation on novel transglutaminase activity. *Mol Biochem Parasitol*, **136**:173-180.
- Davids BJ, Palm JE, Housley MP, Smith JR, Andersen YS, Martin MG, Hendrickson BA, Johansen FE, Svärd SG, Gillin FD, Eckmann L. 2006.** Polymeric immunoglobulin receptor in intestinal immune defense against the lumen-dwelling protozoan parasite *Giardia*. *J Immunol*; **177**: 6281-6290.
- Deitsch K W, Calderwood M S y Wellems T E. 2001.** Malaria. Cooperative silencing elements in var genes. *Nature*, **412**:875-876.

Deitsch K W, Lukehart S A y Stringer J R. 2009. Common strategies for antigenic variation by bacterial, fungal y protozoan pathogens. *Nat Rev Microbiol*, **7**:493-503.

de Ruijter A J, van Gennip A H, Caron H N, Kemp S y van Kuilenburg A B. 2003. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J*, **370**:737-749.

Eckmann L. 2003. Mucosal defences against Giardia. *Parasite Immunol*, **25**: 259–270.

Eckmann L, Laurent F, Langford TD, Hetsko ML, Smith JR, Kagnoff MF, Gillin FD. 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. *J Immunol*; **164**: 1478–1487.

Elias E V, Quiroga R, Gottig N, Nakanishi H, Nash T E, Neiman A y Lujan H D. 2008. Characterization of SNAREs determines the absence of a typical Golgi apparatus in the ancient eukaryote Giardia lamblia. *J Biol Chem*, **283**:35996-36010.

Elmendorf H G, Dawson S C y McCaffery J M. 2003. The cytoskeleton of Giardia lamblia. *Int J Parasitol*, **33**:3-28.

Elmendorf H G, Singer S M y Nash T E. 2001. The abundance of sterile transcripts in Giardia lamblia. *Nucleic Acids Res*, **29**:4674-4683.

Engstler M, Pfohl T, Herminghaus S et al. 2007. Hydrodynamic flow-mediated protein sorting on the cell surface of trypanosomes. *Cell* **131**:505–515.

Erlaysen S L y Bemrick W J. 1987. SEM evidence for a new species, Giardia psittaci. *J Parasitol*, **73**:623-629.

Erlaysen S L, Bemrick W J y Pawley J. 1989. High-resolution electron microscopic evidence for the filamentous structure of the cyst wall in Giardia muris y Giardia duodenalis. *J Parasitol*, **75**:787-797.

Erlaysen S L, Bemrick W J, Wells C L, Feely D E, Knudson L, Campbell S R, van Keulen H y Jarroll E L. 1990. Axenic culture y characterization of Giardia ardeae from the great blue heron (Ardea herodias). *J Parasitol*, **76**:717-724.

Erlaysen S L, Macechko P T, van Keulen H y Jarroll E L. 1996. Formation of the Giardia cyst wall: studies on extracellular assembly using immunogold labeling y high resolution field emission SEM. *J Eukaryot Microbiol*, **43**:416-429.

Fagard M y Vaucheret H. 2000. (TRANS)GENE SILENCING IN PLANTS: How Many Mechanisms? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **51**:167-194.

Farthing M J. 1997. The molecular pathogenesis of giardiasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **24**:79-88.

Faubert G. 2000. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev*, **13**:35-54, table of contents.

Faubert G, Reiner D S y Gillin F D. 1991. *Giardia lamblia*: regulation of secretory vesicle formation y loss of ability to reattach during encystation in vitro. *Exp Parasitol*, **72**:345-354.

Feng Y & Xiao L. 2011. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev*; **24**: 110–140.

Feely D E, Schollmeyer J V y Erlysen S L. 1982. *Giardia* spp.: distribution of contractile proteins in the attachment organelle. *Exp Parasitol*, **53**:145-154.

Figueiredo LM, Janzen CJ, Cross GAM. 2008. A histone methyltransferase modulates antigenic variation in African trypanosomes. *PLoS Biol* **6**, e161.

Filice FP. 1952. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. *Univ. California Publns Zool* **57**:53-146.

Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb F A y Pillai R S. 2005. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs y miRNAs. *Curr Opin Struct Biol*, **15**:331-341.

Fire A, Xu S, Montgomery M K, Kostas S A, Driver S E y Mello C C. 1998. Potent y specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**:806-811.

Foda BM, Singh U. 2015. Dimethylated H3K27 Is a Repressive Epigenetic Histone Mark in the Protist *Entamoeba histolytica* and Is Significantly Enriched in Genes Silenced via the RNAi Pathway. *J Biol Chem*. Aug 21;290(34):21114-30.

Fraser D, Bilenko N, Deckelbaum R J, Dagan R, El-On J y Naggan L. 2000. *Giardia lamblia* carriage in Israeli Bedouin infants: risk factors y consequences. *Clin Infect Dis*, **30**:419-424.

Freitas-Junior LH, Hernandez-Rivas R, Ralph SA, Montiel-Condado D, Ruvalcaba-Salazar OK, Rojas-Meza AP, et al. 2005. Telomeric heterochromatin propagation and histone acetylation control mutually exclusive expression of antigenic variation genes in malaria parasites. *Cell*;121:25–36.

Gardner T B y Hill D R. 2001. Treatment of giardiasis. *Clin Microbiol Rev*, **14**:114-128.

Gargantini PR, Serradell MC, Torri A, Lujan HD. 2012. Putative SF2 helicases of the early-branching eukaryote *Giardia lamblia* are involved in antigenic variation and parasite differentiation into cysts. *BMC Microbiol*. **28**;12:284. doi: 10.1186/1471-2180-12-284.

Gill G N. 1995. The enigma of LIM domains. *Structure*, **3**:1285-1289.

Gillin F D, Hagblom P, Harwood J, Aley S B, Reiner D S, McCaffery M, So M y Guiney D G. 1990. Isolation y expression of the gene for a major surface protein of *Giardia lamblia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**:4463-4467.

Gillin F D, Reiner D S y McCaffery J M. 1996. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annu Rev Microbiol*, **50**:679-705.

Gottig N, Elias E V, Quiroga R, Nores M J, Solari A J, Touz M C y Lujan H D. 2006. Active y passive mechanisms drive secretory granule biogenesis during differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *J Biol Chem*, **281**:18156- 18166.

Guizetti J, Scherf A. 2013. Silence, activate, poise and switch! Mechanisms of antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Cell Microbiol*. May;15(5):718-26.

Halic M, Moazed D. 2010. Dicer-independent primal RNAs trigger RNAi and heterochromatin formation. *Cell*; **140**(4):504-16. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.019.

Halliez MC & Buret AG. 2013. Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World J Gastroenterol*; **19**: 8974–8985.

Hannon G J. 2002. RNA interference. *Nature*, **418**:244-251.

Harumoto, T. & Miyake, A. 1992. Possible participation of surface antigens of *Paramecium* in predator-prey interaction. *J. Protozool.*, **39**:47A.

Hemphill A, Stager S, Gottstein B y Muller N. 1996. Electron microscopical investigation of surface alterations on *Giardia lamblia* trophozoites after exposure to a cytotoxic monoclonal antibody. *Parasitol Res*, **82**:206-210.

Heyworth M F. 1992. Relative susceptibility of *Giardia muris* trophozoites to killing by mouse antibodies of different isotypes. *J Parasitol*, **78**:73-76.

Hiltbold A, Frey M, Hulsmeier A y Kohler P. 2000. Glycosylation y palmitoylation are common modifications of giardia variant surface proteins. *Mol Biochem Parasitol*, **109**:61-65.

Holberton D V y Marshall J. 1995. Analysis of consensus sequence patterns in *Giardia* cytoskeleton gene promoters. *Nucleic Acids Res*, **23**:2945-2953.

Hovel-Miner G, Mugnier M, Papavasiliou FN, Pinger J, Schulz D. 2015. A Host-Pathogen Interaction Reduced to First Principles: Antigenic Variation in *T. brucei*. *Results Probl Cell Differ.*; **57**:23-46.

Hutvagner G y Simard M J. 2008. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat*

Rev Mol Cell Biol, **9**:22-32.

Indelman P, Echenique C, Bertorini G, Racca L, Gomez C, Luque A, Magaró H. 2011. Parasitosis intestinales en una población pediátrica de la ciudad de Rosario, Santa Fe, Argentina. *Acta Bioquím Clín Latinoam*;45:329-34.

Irvine DV, Zaratiegui M, Tolia NH, Goto DB, Chitwood DH, Vaughn MW, Joshua-Tor L, Martienssen RA. 2006. Argonaute slicing is required for heterochromatic silencing and spreading.

Science. **25**:313(5790):1134-7.

Jarroll E L, Manning P, Lindmark D G, Coggins J R y Erlysen S L. 1989. *Giardia* cyst wall-specific carbohydrate: evidence for the presence of galactosamine. *Mol Biochem Parasitol*, **32**:121-131.

Johnson PL, Kochin BF, Ahmed R, Antia R. 2012. How do antigenically varying pathogens avoid cross-reactive responses to invariant antigens? *Proc Biol Sci*. Jul 22;279(1739):2777-85.

Jones KH Senft JA. 1985. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J Histochem Cytochem*. **33**: 77-79

Jones SA. 2005. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol*; 175: 3463–3468.

Juergensmeyer, E. B. 1969. Serotype expression and transformation in *Tetrahymena pyriformis*. *J. Protozool.*, 16:344–352.

Juárez MM, Rajal VB. 2013. Intestinal parasitoses in Argentina: major causal agents found in the population and in the environment. *Rev Argent Microbiol*. Jul-Sep;45(3):191-204. Review. Spanish.

Juven-Gershon T, Hsu J Y, Theisen J W y Kadonaga J T. 2008. The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription. *Curr Opin Cell Biol*, **20**:253-259.

Kabnick K S y Peattie D A. 1990. In situ analyses reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent. *J Cell Sci*, **95 (Pt 3)**:353-360.

Kamda JD & Singer SM. 2009. Phosphoinositide 3-kinase-dependent inhibition of dendritic cell interleukin-12 production by *Giardia lamblia*. *Infect Immun*; **77**: 685–693.

Kamda JD, Nash TE & Singer SM. 2012. *Giardia duodenalis*: dendritic cell defects in IL-6 deficient mice contribute to susceptibility to intestinal infection. *Exp Parasitol*; **130**: 288–291.

Kamikawa R, Inagaki Y, Tokoro M, Roger A J y Hashimoto T. 2011 Split introns in the genome of *Giardia intestinalis* are excised by spliceosome-mediated trans-splicing. *Curr Biol*, **21**:311-315.

Katellaris P H, Naeem A y Farthing M J. 1995. Attachment of *Giardia lamblia* trophozoites to a cultured human intestinal cell line. *Gut*, **37**:512-518.

Knodler L A, Noiva R, Mehta K, McCaffery J M, Aley S B, Svard S G, Nystul T G, Reiner D S, Silberman J D y Gillin F D. 1999. Novel protein-disulfide isomerases from the early-diverging protist *Giardia lamblia*. *J Biol Chem*, **274**:29805-29811.

Korman S H y Granot E. 1990. [*Giardia lamblia* infection: laboratory y clinical aspects]. *Harefuah*, **118**:719-722.

Kulakova L, Singer S M, Conrad J y Nash T E. 2006. Epigenetic mechanisms are involved in the control of *Giardia lamblia* antigenic variation. *Mol Microbiol*, **61**:1533-1542.

Kusch J y Schmidt H J. 2001. Genetically controlled expression of surface variant antigens in free-living protozoa. *J Membr Biol*, **180**:101-109.

Lane S., Lloyd D. 2002. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit. Rev. Microbiol.*; **28**:123-147.

Lanfredi-Rangel A, Kattenbach W M, Diniz J A, Jr. y de Souza W. 1999. Trophozoites of *Giardia lamblia* may have a Golgi-like structure. *FEMS Microbiol Lett*, **181**:245-251.

Langford T D, Housley M P, Boes M, Chen J, Kagnoff M F, Gillin F D y Eckmann L. 2002. Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia* spp. *Infect Immun*, **70**:11-18.

Lee HY, Kim J, Noh HJ, Kim HP & Park SJ. 2014. *Giardia lamblia* binding immunoglobulin protein triggers maturation of dendritic cells via activation of TLR4-MyD88-p38, and ERK1/2 MAPKs. *Parasite Immunol*; **36**: 627-646.

Li E, Zhou P, Petrin Z & Singer SM. 2004. Mast cell-dependent control of *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect Immun*; **72**: 6642-6649.

Li E, Zhou P & Singer SM. 2006. Neuronal nitric oxide synthase is necessary for elimination of *Giardia lamblia* infections in mice. *J Immunol*; **176**: 516-521.

Li E, Zhao A, Shea-Donohue T & Singer SM. 2007. Mast cell-mediated changes in smooth muscle contractility during mouse giardiasis. *Infect Immun*; **75**: 4514-4518.

Li L y Wang C C. 2004. Capped mRNA with a single nucleotide leader is optimally translated in a primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. *J Biol Chem*, **279**:14656- 14664.

Li W, Saraiya AA, Wang CC. 2012. The profile of snoRNA-derived microRNAs that

regulate expression of variant surface proteins in *Giardia lamblia*. *Cell Microbiol* 14: 1455–73

Lopez-Rubio JJ, Gontijo AM, Nunes MC, Issar N, Hernandez Rivas R, Scherf A. 2007. 5' flanking region of var genes nucleate histone modification patterns linked to phenotypic inheritance of virulence traits in malaria parasites. *Mol Microbiol.*;66:1296–1305.

Lopez-Rubio JJ, Mancio-Silva L, Scherf A. 2009. Genome-wide analysis of heterochromatin associates clonally variant gene regulation with perinuclear repressive centers in malaria parasites. *Cell Host Microbe.*;5:179–190.

Lujan H D, Mowatt M R, Conrad J T, Bowers B y Nash T E. 1995. Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich repeats. Implications for secretory granule formation y protein assembly into the cyst wall. *J Biol Chem*, **270**:29307-29313.

Lujan H D, Mowatt M R, Conrad J T y Nash T E. 1996. Increased expression of the molecular chaperone BiP/GRP78 during the differentiation of a primitive eukaryote. *Biol Cell*, **86**:11-18.

Lujan H D, Mowatt M R y Nash T E. 1997. Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. *Microbiol Mol Biol Rev*, **61**:294-304.

Lujan H D, Mowatt M R, Wu J J, Lu Y, Lees A, Chance M R y Nash T E. 1995. Purification of a variant-specific surface protein of *Giardia lamblia* y characterization of its metal-binding properties. *J Biol Chem*, **270**:13807-13813.

Lujan H D y Touz M C. 2003. Protein trafficking in *Giardia lamblia*. *Cell Microbiol*, **5**:427-434.

Luján HD, Mowatt MR, Byrd LG, Nash TE. 1996. Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **23**:93(15):7628-33.

Luján HD & Svärd S. 2011. *Giardia* A Model Organism. Austria, *Springer Wein New-York*.: 1–417.

Macrae I J, Zhou K, Li F, Repic A, Brooks A N, Cyte W Z, Adams P D y Doudna J A. 2006. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science*, **311**:195-198.

Manning P, Erllysen S L y Jarroll E L. 1992. Carbohydrate y amino acid analyses of *Giardia muris* cysts. *J Protozool*, **39**:290-296.

Marker S, Le Mouél A, Meyer E, Simon M. 2010. Distinct RNA-dependent RNA polymerases are required for RNAi triggered by double-stranded RNA versus truncated

transgenes in *Paramecium tetraurelia*. *Nucleic Acids Res.* Jul;38(12):4092-107.

Marks P A, Richon V M y Rifkind R A. 2000. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J Natl Cancer Inst*, **92**:1210-1216.

Marti M y Hehl A B. 2003. Encystation-specific vesicles in *Giardia*: a primordial Golgi or just another secretory compartment? *Trends Parasitol*, **19**:440-446.

Matzke M A y Birchler J A. 2005. RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat Rev Genet*, **6**:24-35.

Matthews KR, McCulloch R, Morrison LJ. 2015. The within-host dynamics of African trypanosome infections. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. Aug 19;370(1675)

Mayrhofer G, Yreus R H, Ey P L y Chilton N B. 1995. Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci y comparison with *Giardia muris*. *Parasitology*, **111 (Pt 1)**:11-17.

McArthur A G, Knodler L A, Silberman J D, Davids B J, Gillin F D y Sogin M L. 2001. The evolutionary origins of eukaryotic protein disulfide isomerase domains: new evidence from the Amitochondriate protist *Giardia lamblia*. *Mol Biol Evol*, **18**:1455-1463.

McCaffery J M, Faubert G M y Gillin F D. 1994. *Giardia lamblia*: traffic of a trophozoite variant surface protein y a major cyst wall epitope during growth, encystation, y antigenic switching. *Exp Parasitol*, **79**:236-249.

McCaffery J M y Gillin F D. 1994. *Giardia lamblia*: ultrastructural basis of protein transport during growth y encystation. *Exp Parasitol*, **79**:220-235.

McHardy IH, Wu M, Shimizu-Cohen R, Couturier MR, Humphries RM. 2014. Detection of intestinal protozoa in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*. Mar;52(3):712-20. doi: 10.1128/JCM.02877-13

Menghi CI, Iuvaro FR, Dellacasa MA, Gatta CL. 2007. Investigación de parásitos intestinales en una comunidad aborigen de la provincia de Salta. *Medicina (B Aires)*;67:705-8.

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: 2810-2817.

Minvielle MC, Pezzani BC, Cordoba MA, De Luca MM, Apezteguia MC, Basualdo JA. 2004. Epidemiological survey of *Giardia* spp. and *Blastocystis hominis* in an Argentinian rural community. *Korean J Parasitol*;42:121-7.

Miyamoto Y, Eckmann L. 2015. Drug Development Against the Major Diarrhea-Causing Parasites of the Small Intestine, *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Front Microbiol*. Nov

19;6:1208.

Monis P T, Yreus R H, Mayrhofer G y Ey P L. 1999. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol Biol Evol*, **16**:1135-1144.

Monis P T, Caccio S M y Thompson R C. 2009. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol*, **25**:93-100.

Morrison H G, McArthur A G, Gillin F D, Aley S B, Adam R D, Olsen G J, Best A A, Cye 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, Nixon J E, Palm D, Passamanek N E, Prabhu A, Reich C I, Reiner D S, Samuelson J, Svard S G y Sogin M L. 2007. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science*, **317**:1921-1926.

Mowatt M R, Aggarwal A y Nash T E. 1991. Carboxy-terminal sequence conservation among variant-specific surface proteins of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol*, **49**:215-227.

Mowatt M R, Lujan H D, Cotten D B, Bowers B, Yee J, Nash T E y Stibbs H H. 1995. Developmentally regulated expression of a *Giardia lamblia* cyst wall protein gene. *Mol Microbiol*, **15**:955-963.

Mowatt M R, Nguyen B Y, Conrad J T, Adam R D y Nash T E. 1994. Size heterogeneity among antigenically related *Giardia lamblia* variant-specific surface proteins is due to differences in tyem repeat copy number. *Infect Immun*, **62**:1213- 1218.

Müller N y Gottstein B. 1998. Antigenic variation y the murine immune response to *Giardia lamblia*. *Int J Parasitol*, **28**:1829-1839.

Müller N & von Allmen N. 2005. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *Int J Parasitol*; **35**: 1339–1347.

Napoli C, Lemieux C y Jorgensen R. 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*, **2**:279-289.

Nash TE, Merritt JW Jr, Conrad JT. 1991. Isolate and epitope variability in susceptibility of *Giardia lamblia* to intestinal proteases. *Infect Immun*. Apr;59(4):1334-40.

Nash T. 1992. Surface antigen variability y variation in *Giardia lamblia*. *Parasitol Today*, **8**:229-234.

Nash T E. 2002. Surface antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Mol Microbiol*, **45**:585-590.

Nash T E y Aggarwal A. 1986. Cytotoxicity of monoclonal antibodies to a subset of

Giardia isolates. *J Immunol*, **136**:2628-2632.

Nash T E, Aggarwal A, Adam R D, Conrad J T y Merritt J W, Jr. 1988. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *J Immunol*, **141**:636-641.

Nash T E, Banks S M, Alling D W, Merritt J W, Jr. y Conrad J T. 1990. Frequency of variant antigens in *Giardia lamblia*. *Exp Parasitol*, **71**:415-421.

Nash T E, Conrad J T y Mowatt M R. 1995. *Giardia lamblia*: identification y characterization of a variant-specific surface protein gene family. *J Eukaryot Microbiol*, **42**:604-609.

Nash T E, Herrington D A, Levine M M, Conrad J T y Merritt J W, Jr. 1990. Antigenic variation of *Giardia lamblia* in experimental human infections. *J Immunol*, **144**:4362-4369.

Nash T E, Herrington D A, Losonsky G A y Levine M M. 1987. Experimental human infections with *Giardia lamblia*. *J Infect Dis*, **156**:974-984.

Nash T E y Keister D B. 1985. Differences in excretory-secretory products y surface antigens among 19 isolates of *Giardia*. *J Infect Dis*, **152**:1166-1171.

Nash T E, Lujan H T, Mowatt M R y Conrad J T. 2001. Variant-specific surface protein switching in *Giardia lamblia*. *Infect Immun*, **69**:1922-1923.

Nash T E y Mowatt M R. 1992. Characterization of a *Giardia lamblia* variant-specific surface protein (VSP) gene from isolate GS/M y estimation of the VSP gene repertoire size. *Mol Biochem Parasitol*, **51**:219-227.

Nash T E y Mowatt M R. 1993. Variant-specific surface proteins of *Giardia lamblia* are zinc-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**:5489-5493.

Nixon J E, Wang A, Morrison H G, McArthur A G, Sogin M L, Loftus B J y Samuelson J. 2002. A spliceosomal intron in *Giardia lamblia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**:3701-3705.

Nowotny M y Yang W. 2009. Structural y functional modules in RNA interference. *Curr Opin Struct Biol*, **19**:286-293.

O'Hara JR & Buret AG. 2008. Mechanisms of intestinal tight junctional disruption during infection. *Front Biosci*; **13**: 7008-7021.

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*. *Parasit Vectors*; **6**: 317.

Papanastasiou P, Hiltbold A, Bommeli C y Kohler 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**:10143- 10148.

Papanastasiou P, McConville M J, Ralton J y Kohler P. 1997. The variant-specific surface protein of *Giardia*, VSP4A1, is a glycosylated y palmitoylated protein. *Biochem J*, **322 (Pt 1)**:49-56.

Pays E, Vanhamme L y Berberof M. 1994. Genetic controls for the expression of surface antigens in African trypanosomes. *Annu Rev Microbiol*, **48**:25-52.

Peattie D A. 1990. The giardins of *Giardia lamblia*: genes y proteins with promise. *Parasitol Today*, **6**:52-56.

Peterson C L y Laniel M A. 2004. Histones y histone modifications. *Curr Biol*, **14**:R546-551.

Piva B y Benchimol M. 2004. The median body of *Giardia lamblia*: an ultrastructural study. *Biol Cell*, **96**:735-746.

Preer, J. R. 1986. Surface antigens of *Paramecium*. In: Gall, J. G. (ed.), *The Molecular Biology of Ciliated Protozoa*. Academic Press, New York. p. 301–339.

Prucca C G y Lujan H D. 2009. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Cell Microbiol*, **11**:1706-1715.

Prucca C G, Slavin I, Quiroga R, Elias E V, Rivero F D, Saura A, Carranza P G y Lujan H D. 2008. Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. *Nature*, **456**:750-754.

Reiner D S, McCaffery M y Gillin F D. 1990. Sorting of cyst wall proteins to a regulated secretory pathway during differentiation of the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. *Eur J Cell Biol*, **53**:142-153.

Rivero FD, Saura A, Prucca CG, Carranza PG, Torri A, Lujan HD. 2010. Disruption of antigenic variation is crucial for effective parasite vaccine. *Nat Med*; **16**(5):551-7.

Robinson N P, Burman N, Melville S E y Barry J D. 1999. Predominance of duplicative VSG gene conversion in antigenic variation in African trypanosomes. *Mol Cell Biol*, **19**:5839-5846.

Russell A G, Shutt T E, Watkins R F y Gray M W. 2005. An ancient spliceosomal intron in the ribosomal protein L7a gene (Rpl7a) of *Giardia lamblia*. *BMC Evol Biol*, **5**:45.

Saraiya A A y Wang C C. 2008. snoRNA, a novel precursor of microRNA in *Giardia lamblia*. *PLoS Pathog*, **4**:e1000224.

Saraiya AA, Li W, Wang CC. 2011. A microRNA derived from an apparent canonical biogenesis pathway regulates variant surface protein gene expression in *Giardia lamblia*.

RNA 17: 2152–2164

Saraiya AA, Li W, Wu J, Chang CH, Wang CC. 2014. The microRNAs in an ancient protist repress the variant-specific surface protein expression by targeting the entire coding sequence. *PLoS Pathog.* 2014 Feb 27;10(2):e1003791.

Scherf A, Hernyez-Rivas R, Buffet P, Bottius E, Benatar C, Pouvelle B, Gysin J y Lanzer M. 1998. Antigenic variation in malaria: in situ switching, relaxed y mutually exclusive transcription of var genes during intra-erythrocytic development in *Plasmodium falciparum*. *EMBO J*, 17:5418-5426.

Seshadri V, McArthur AG, Sogin ML y Adam RD. 2003. *Giardia lamblia* RNA Polymerase II: amanitin-resistant transcription. *J Biol Chem*, 278: 27804-10

Simon MC, Schmidt HJ. 2007. Antigenic variation in ciliates: antigen structure, function, expression. *J Eukaryot Microbiol.* Jan-Feb;54(1):1-7.

Singer S M y Nash T E. 2000. T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect Immun*, 68:170-175.

Singer S M, Yee J y Nash T E. 1998. Episomal y integrated maintenance of foreign DNA in *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol*, 92:59-69.

Singer S. M. 2011. Immunology of giardiasis. In "Giardia: A Model Organism". Eds. Luján HD & Svård S. Austria, *Springer Wein New- York*,: 1–417.

Slavin I, Saura A, Carranza P G, Touz M C, Nores M J y Lujan H D. 2002. Dephosphorylation of cyst wall proteins by a secreted lysosomal acid phosphatase is essential for excystation of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol*, 122:95-98.

Smith M W, Aley S B, Sogin M, Gillin F D y Evans G A. 1998. Sequence survey of the *Giardia lamblia* genome. *Mol Biochem Parasitol*, 95:267-280.

Sogin M L, Gunderson J H, Elwood H J, Alonso R A y Peattie D A. 1989. Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science*, 243:75-77.

Solari A J, Rahn M I, Saura A y Lujan H D. 2003. A unique mechanism of nuclear division in *Giardia lamblia* involves components of the ventral disk y the nuclear envelope. *Biocell*, 27:329-346.

Solaymani-Mohammadi S & Singer SM. 2010. *Giardia duodenalis*: the double-edged sword of immune responses in giardiasis. *Exp Parasitol* ; 126: 292–297.

Soltys B J, Falah M y Gupta R S. 1996. Identification of endoplasmic reticulum in the primitive eukaryote *Giardia lamblia* using cryoelectron microscopy y antibody to Bip. *J Cell Sci*, 109 (Pt 7):1909-1917.

- Soriano SV, Barbieri LM, Pierangeli NB, Giayetto AL, Manacorda AM, Castronovo E, Pezzani BC, Minvielle M, Basualdo JA. 2001.** Intestinal parasites and the environment: frequency of intestinal parasites in children of Neuquen, Patagonia, Argentina. *Rev Latinoam Microbiol.*;43:96-101.
- Stager S, Felleisen R, Gottstein B y Muller N. 1997.** *Giardia lamblia* variant surface protein H7 stimulates a heterogeneous repertoire of antibodies displaying differential cytological effects on the parasite. *Mol Biochem Parasitol*, **85**:113-124.
- Stager S y Muller N. 1997.** *Giardia lamblia* infections in B-cell-deficient transgenic mice. *Infect Immun*, **65**:3944-3946.
- Sun C H, McCaffery J M, Reiner D S y Gillin F D. 2003.** Mining the *Giardia lamblia* genome for new cyst wall proteins. *J Biol Chem*, **278**:21701-21708.
- Svard S G, Meng T C, Hetsko M L, McCaffery J M y Gillin F D. 1998.** Differentiation-associated surface antigen variation in the ancient eukaryote *Giardia lamblia*. *Mol Microbiol*, **30**:979-989.
- Tang Y, Ge Y Z y Yin Q W. 2005.** [RNAi y its application for treatment of cardiovascular diseases]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*, **33**:1058-1060.
- Teodorovic S, Walls C D y Elmendorf H G. 2007.** Bidirectional transcription is an inherent feature of *Giardia lamblia* promoters y contributes to an abundance of sterile antisense transcripts throughout the genome. *Nucleic Acids Res*, **35**:2544- 2553.
- Thompson R C, Hopkins R M y Homan W L. 2000.** Nomenclature y genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitol Today*, **16**:210-213.
- Thompson R C, Reynoldson J A y Mendis A H. 1993.** *Giardia* y giardiasis. *Adv Parasitol*, **32**:71-160.
- Tian X F, Yang Z H, Shen H, Adam R D y Lu S Q. 2010.** Identification of the nucleoli of *Giardia lamblia* with TEM y CFM. *Parasitol Res*, **106**:789-793.
- Tomari Y y Zamore P D. 2005.** MicroRNA biogenesis: drosha can't cut it without a partner. *Curr Biol*, **15**:R61-64.
- Tomari Y y Zamore P D. 2005.** Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev*, **19**:517-529.
- Touz M C, Conrad J T y Nash T E. 2005.** A novel palmitoyl acyl transferase controls surface protein palmitoylation y cytotoxicity in *Giardia lamblia*. *Mol Microbiol*, **58**:999-1011.
- Touz M C, Gottig N, Nash T E y Lujan H D. 2002.** Identification y characterization of a novel secretory granule calcium-binding protein from the early branching eukaryote

Giardia lamblia. *J Biol Chem*, **277**:50557-50563.

Touz M C, Nores M J, Slavin I, Carmona C, Conrad J T, Mowatt M R, Nash T E, Coronel C E y Lujan H D. 2002. The activity of a developmentally regulated cysteine proteinase is required for cyst wall formation in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *J Biol Chem*, **277**:8474-8481.

Touz MC, Rópolo AS, Rivero MR, Vranych CV, Conrad JT, Svard SG, Nash TE. 2008. Arginine deiminase has multiple regulatory roles in the biology of *Giardia lamblia*. *J Cell Sci*. Sep 1;121

Turner C M. 1999. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei* infections: an holistic view. *J Cell Sci*, **112** (Pt 19):3187-3192.

Udomkesmalee E, Dhanamitta S, Sirisinha S, Charoenkiatkul S, Tuntipopipat S, Banjong O, Rojroongwasinkul N, Kramer T R y Smith J C, Jr. 1992. Effect of vitamin A y zinc supplementation on the nutriture of children in Northeast Thailly. *Am J Clin Nutr*, **56**:50-57.

Ullu E, Lujan H D y Tschudi C. 2005. Small sense y antisense RNAs derived from a telomeric retroposon family in *Giardia intestinalis*. *Eukaryot Cell*, **4**:1155-1157.

Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SI, Martienssen RA. 2002. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science*. **13**:297(5588):1833-7.

Voss T S, Kaestli M, Vogel D, Bopp S y Beck H P. 2003. Identification of nuclear proteins that interact differentially with *Plasmodium falciparum* var gene promoters. *Mol Microbiol*, **48**:1593-1607.

Wang Q-P, Kawahara T, Horn D. 2010. Histone deacetylases play distinct roles in telomeric VSG expression site silencing in African trypanosomes. *Mol Microbiol* **77**:1237-1245.

Woolcock KJ, Gaidatzis D, Punga T, Bühler M. 2011. Dicer associates with chromatin to repress genome activity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Struct Mol Biol*; **18**(1):94-9.

Xu W S, Parmigiani R B y Marks P A. 2007. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*, **26**:5541-5552.

Yee J, Mowatt M R, Dennis P P y Nash T E. 2000. Transcriptional analysis of the glutamate dehydrogenase gene in the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. Identification of a primordial gene promoter. *J Biol Chem*, **275**:11432-11439.

Yu D C, Wang A L, Botka C W y Wang C C. 1998. Protein synthesis in *Giardia lamblia* may involve interaction between a downstream box (DB) in mRNA y an anti-DB in the 16S-like ribosomal RNA. *Mol Biochem Parasitol*, **96**:151-165.

Yu L Z, Birky C W, Jr. y Adam R D. 2002. The two nuclei of *Giardia* each have complete copies of the genome y are partitioned equationally at cytokinesis. *Eukaryot Cell*, 1:191-199.

Zhang Z, Tan M, Xie Z, Dai L, Chen Y, Zhao Y. 2011. Identification of lysine succinylation as a new post-translational modification. *Nat Chem Biol*. 2011 Jan;7(1):58-63.

Zhou P, Li E, Shea-Donohue T & Singer SM. 2007. Tumour necrosis factor alpha contributes to protection against *Giardia lamblia* infection in mice. *Parasite Immunol*; 29: 367-374.

Anexo

Parte de los resultados de este trabajo de Tesis fueron publicados en el siguiente artículo:

Gargantini PR, Serradell MC, Torri A, Lujan HD. 2012. Putative SF2 helicases of the early-branching eukaryote *Giardia lamblia* are involved in antigenic variation and parasite differentiation into cysts. *BMC Microbiol.* **28**;12:284. doi: 10.1186/1471-2180-12-284.

Parte de los resultados fueron enviados para su publicación bajo el título:

Carranza PG, Gargantini PR, Puceca CG, Torri A, Saura A, and Lujan HD. Specific histone modifications play critical roles in the control of encystation and antigenic variation in the early-branching protozoan *Giardia lamblia*.

La mayor parte de los resultados serán incluidos en un artículo en preparación:

Torri A, Goy C, Gargantini PR, Saura A, Ferrari ML, Baroni M, Lujan HD. Monoclonal antibodies against Variable Surface Proteins induce Antigenic Variation in *Giardia lamblia*.

Además, durante mi Tesis participé en el desarrollo experimental del artículo:

Rivero FD, Saura A, Puceca CG, Carranza PG, Torri A, Lujan HD. 2010. Disruption of antigenic variation is crucial for effective parasite vaccine. *Nat Med.* **16**(5):551-7.