



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

PAPEL DE LOS RECEPTORES TIPO TOLL DE CÉLULAS CEBADAS EN  
EL RECONOCIMIENTO DE MOLÉCULAS DE *Giardia lamblia*.

*T e s i s*

Que para obtener el título de:

Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta:

Juan Antonio Alvarado Torres

Asesora: Dra. Samira Muñoz Cruz

Co-asesora: M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ  
Jefa del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Papel de los receptores tipo Toll de células cebadas en el reconocimiento de moléculas de Giardia lamblia

Que presenta el pasante: Juan Antonio Alvarado Torres

Con número de cuenta: 408097260 para obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 22 de agosto de 2013.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	MVZ. Gabriela Fuentes Cervantes	
<b>VOCAL</b>	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón	
<b>SECRETARIO</b>	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
<b>1er. SUPLENTE</b>	QFB. Raquel Ma. del Refugio Tapia Romero	
<b>2do. SUPLENTE</b>	QFB. Laura Gricelda Martínez Méndez	

NOTA: los sinodales supientes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HHA/iac

“...que si extraje la miel o la hiel de las cosas fue porque en ellas puse hiel o mieles sabrosas: cuando planté rosales, coseché siempre rosas.”  
Amado Nervo. “En paz”.

## **DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS**

A mi padre y mi madre: gracias a ustedes he llegado a cumplir una de mis metas: el ser un Químico Farmacéutico Biólogo, esto no lo pude haber logrado sin sus palabras de aliento en momentos difíciles y su apoyo absoluto en incontables ocasiones. Estaré por siempre en deuda con ustedes. Los admiro por toda su constancia y sus esfuerzos por darnos a mí hermano y a mí una oportunidad de ser mejores personas, tenemos el mejor ejemplo a seguir: ustedes. Los quiero.

Agradezco a la Dra. Samira Muñoz, por depositar su confianza en mí para la elaboración de este proyecto y por darme la oportunidad de desarrollar más a fondo mi carrera aprendiendo nuevas técnicas y métodos, también quiero agradecer a la M. en C. Argelia Gómez por su gran ayuda durante los primeros meses de trabajo que, junto con su amistad y sus consejos, fueron parte esencial para el desarrollo del proyecto. Gracias a la Dra. Lourdes Arriaga y a sus alumnos del Hospital de Especialidades de Centro Médico por su invaluable ayuda con la citometría de flujo. De igual forma agradezco a la Dra. Lilián Yépez por su apoyo en el aspecto bibliográfico que me ayudó a comprender más a fondo el tema de estudio. A la Bióloga Amparito, el Sr. Jorge, Jesús, Ricardo, Joel y la Sra. Luz Ma., compañeros del laboratorio, mi más sincero reconocimiento a su trabajo. A mi asesora interna, la M. en C. Ana Laura Vázquez: maestra le agradezco el tiempo que invirtió en las revisiones de mi trabajo y por apoyarme al momento de buscar un proyecto de tesis.

A mi novia: Lupita gracias por estar siempre apoyándome con palabras de aliento en esos momentos de dificultades experimentales, por ayudarme a revisar mi escrito y por estar a mi lado en toda ocasión tanto buena como mala, para ti una dedicatoria muy especial.

A la banda del labo en Centro Médico: Chío, Félix, Geras y Diego: sin duda hicieron la estancia en el laboratorio mucho más placentera y me siento afortunado de haber coincidido con ustedes durante mi tesis en Centro Médico. Gracias por su amistad.

De igual forma quiero hacer una dedicatoria especial a mis amigos “los chacales”: Sandra, Fer, Mau, “Mostro” (Alonso), “Zeta” (Hugo), Gabo, René, el Sr. Candidato Fuerza Rayos (Gerardo), el incómodo Ramírez y Adrián: esos “congresos” que tuvieron lugar me fueron muy útiles para dejar de lado aunque sea un momento todo este asunto de la tesis. Les agradezco por compartir muchas experiencias inolvidables durante la carrera en el también memorable depa-V.I.P.

# ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE CUADROS.....	IV
RESUMEN.....	V
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 <i>Giardia lamblia</i> y patogenia.....	1
1.2 Morfología y ciclo biológico.....	2
1.3 Epidemiología de la giardiosis.....	5
1.4 Manifestaciones clínicas.....	6
1.5 Respuesta inmunitaria frente a <i>Giardia lamblia</i> .....	7
1.5.1 Respuesta inmunitaria innata frente a <i>G. lamblia</i> .....	8
1.5.2 Respuesta inmunitaria humoral contra <i>G. lamblia</i> .....	10
1.5.3 Respuesta inmunitaria celular contra <i>G. lamblia</i> .....	10
1.6 Células cebadas.....	11
1.7 Participación de las células cebadas en la infección con <i>Giardia lamblia</i> .....	14
1.7.1 Células cebadas y TLR.....	15
1.8 Receptores tipo Toll: generalidades.....	16
1.9 TLR y sus ligandos.....	19
1.9.1 PAMP bacterianos reconocidos por TLR.....	19
1.9.2 PAMP virales reconocidos por TLR.....	19
1.9.3 PAMP fúngicos reconocidos por TLR.....	20
1.9.4 PAMP de protozoarios reconocidos por TLR.....	20
1.9.5 Vía de señalización de TLR.....	21
2. JUSTIFICACIÓN.....	23
3. HIPÓTESIS.....	23
4. OBJETIVO GENERAL.....	23

5.	OBJETIVOS PARTICULARES .....	24
6.	METODOLOGÍA.....	24
6.1	Cultivo axénico de <i>Giardia lamblia</i> .....	24
6.2	Obtención de Extracto Total Soluble (ETS) de <i>Giardia lamblia</i> .....	25
6.3	Fraccionamiento del ETS y obtención de la Fracción 2 (F2) .....	25
6.4	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). 26	
6.5	Cultivo de células cebadas.....	26
6.6	Estimulación de células cebadas y análisis de la expresión de TLR por citometría de flujo.....	27
7.	RESULTADOS.....	28
7.1	Cultivo de células HRMC y LAD2.....	28
7.2	Patrón proteínico del extracto total soluble y de la fracción 2 de <i>G. lamblia</i> .....	28
7.3	Identificación de las moléculas de <i>G. lamblia</i> presentes en la fracción F2 del ETS que activa a las células cebadas.....	29
7.4	Expresión de TLR2, TLR4 y TLR6 en células cebadas (HRMC) y en células cebadas de humano (LAD2), sin estímulo y estimuladas con el ETS y la F2 de <i>G. lamblia</i> . .....	30
8.	DISCUSIÓN .....	33
9.	CONCLUSIONES .....	35
10.	SUGERENCIAS Y PERSPECTIVAS .....	35
11.	REFERENCIAS .....	36

## ABREVIATURAS

ETS	Extracto Total Soluble
F2	Fracción 2
HRMC	Línea celular híbrida de células cebadas de rata
IFN	Interferón
LAM	Lipoarabinomanano
LPS	Lipopolisacárido
MC	Mast cells (Células cebadas)
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear Kappa-B
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns (Patrones moleculares asociados a patógenos)
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PRR	Pattern recognition receptor (Receptores reconocedores de patógenos)
RAG	Gen activador de recombinación
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
SFB	Suero Fetal Bovino
TLR	Toll like receptor (Receptor Tipo Toll)
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
IL	Interleucina
LC-MS	Liquid chromatography–mass spectrometry (Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas)

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de trofozoíto y quiste de <i>Giardia sp.</i> .....	3
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i> .....	4
Figura 3. Seroprevalencia de <i>Giardia lamblia</i> en México basada en la clasificación regional de desarrollo económico.....	6
Figura 4. Interacción de <i>Giardia lamblia</i> con el intestino humano.....	8
Figura 5. Micrografía electrónica de una célula cebada típica.....	11
Figura 6. Respuesta secretora de las células cebadas a ligandos de TLR.....	16
Figura 7. Vías de señalización de los TLR.....	22
Figura 8. Esquema general de trabajo.....	24
Figura 9. Líneas celulares empleadas en la estimulación con moléculas de <i>G. lamblia</i> ...	28
Figura 10. SDS-PAGE del extracto total soluble de <i>Giardia lamblia</i> y de la fracción 2 .....	29
Figura 11. Perfiles de expresión de TLR 2, 4 y 6 en la línea celular HRMC.....	31
Figura 12. Perfiles de expresión de TLR 2, 4 y 6 en la línea celular LAD2 .....	32

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Mediadores derivados de MC.....	13
Cuadro 2. Características generales de los TLR .....	18
Cuadro 3. Proteínas identificadas en la fracción proteínica 2 del ETS de <i>G. lamblia</i> , a través de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas. ....	30

## RESUMEN

*Giardia lamblia* es un parásito intestinal causante de diarrea y síndrome de mala absorción, principalmente en la población infantil. La giardiosis es de considerable importancia en México y en países en vías de desarrollo. El control de la infección se basa en el tratamiento farmacológico sin embargo, existe falla terapéutica ocasionada por un lado por el abandono del tratamiento, debido a sus efectos secundarios severos y por otro lado, por la existencia de cepas de *Giardia* resistentes. Una alternativa es el empleo de vacunas, pero se desconocen los mecanismos inmunes precisos del control de la infección, así como las moléculas del parásito que inducen una respuesta inmunitaria protectora. Diferentes estudios *in vivo* en ratones, demostraron que las células cebadas, la IL-6 y el TNF- $\alpha$  tienen un papel importante en el control temprano de la infección con *G. lamblia*. Recientemente, se demostró que las células cebadas de peritoneo de rata y de la línea celular HRMC estimuladas con *G. lamblia* o con un extracto soluble de este parásito, se activan y producen mediadores de respuesta innata como son histamina, triptasa, IL-6 y TNF- $\alpha$  (Muñoz, *et al.*, 2010). Se identificó una fracción del extracto soluble de *G. lamblia* con capacidad de estimular dichas células cebadas. Sin embargo, los receptores en las células cebadas y las moléculas del parásito involucrados en esta respuesta todavía no han sido dilucidados (Gómez, *et al.*, 2011).

En cuanto a los receptores de las células cebadas a través de los cuales interaccionan con patógenos, se encuentran los "Toll like receptors" (TLR), que tienen un papel primordial en la respuesta inmunológica innata y en la resistencia a las enfermedades, mediante el reconocimiento de un amplio grupo de moléculas características de patógenos y la activación de vías de señalización que inducen la producción de citocinas y quimiocinas necesarias para el desarrollo de una respuesta inmunitaria protectora. Por lo anterior, en este trabajo se realizó un análisis por citometría de flujo de la expresión de TLR2, 4 y 6 en una línea celular de células cebadas de rata (HRMC) y en una línea celular de células cebadas de humano (LAD2) estimuladas con la fracción proteínica que indujo la activación de las células cebadas y se comparó con la expresión de estos receptores en células cebadas sin estímulo, para determinar si los TLR tienen participación o no en el reconocimiento de moléculas de *Giardia lamblia*.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 *Giardia lamblia* y patogenia.

*Giardia lamblia*, es un protozoo patógeno intestinal de distribución mundial, que se encuentra con mayor incidencia en zonas tropicales y subtropicales (Fraser *et al.*, 2000). Se encuentra clasificado dentro de la clase *Zoomastigophorea*, es decir, tiene flagelos como medios de locomoción y está incluido dentro del orden *Diplomazoa* y familia *Hexamitidae*; rubro que caracteriza a protozoos que presentan axostilo, dos núcleos y simetría bilateral (Vázquez y Campos., 2009). Este protozoo se ubica dentro del género *Giardia*. Las especies de este protozoo han representado un problema en su clasificación. Tomando en cuenta la variación morfológica, la posición de cuerpos mediales, la forma del parásito y la relación del disco ventral con el tamaño total del trofozoíto, se ha dividido al género en tres grupos: *Giardia agilis* (anfibios), *Giardia muris* (roedores y aves), *Giardia lamblia* (mamíferos como el perro, el gato, el ganado y el ser humano). Dentro del tercer grupo, *Giardia lamblia* es de manera morfológica indistinguible de otras especies comunes a muchos mamíferos. En la naturaleza tiene la capacidad de adoptar dos formas: trofozoíto o forma móvil y quiste o forma infectante. Fue observado por primera vez en el año 1681 por el microscopista Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723), pero no fue hasta 1859 que el médico checo Vilem Lambl (1824-1895) hizo una completa caracterización del género. La nomenclatura *lamblia*, con que se designó la especie que afecta a los humanos y otros mamíferos, fue dada por Blanchard en 1888 (Faubert *et al.*, 2000).

La giardiosis causada por *Giardia lamblia* es una enfermedad parasitaria de distribución geográfica cosmopolita, frecuente en niños, que se caracteriza por cuadros enterales agudos y crónicos, de intensidad variable y que puede ocasionar síndrome de mala absorción. En los adultos la giardiosis es comúnmente asintomática (Vázquez y Campos, 2009). El hombre es el principal reservorio de *G. lamblia*, pero se conocen múltiples reservorios animales, especialmente los domésticos (perros, gatos y cerdos), que pueden funcionar como transmisores (Adam *et al.*, 2001).

La infección con este protozooario puede ocasionar un espectro de anomalías en la arquitectura de las vellosidades intestinales que van desde un acortamiento ligero de las mismas y un aumento en la profundidad de las criptas, hasta una atrofia parcial o total (Thompson *et al.*, 1994). Las anomalías morfológicas traen consigo una reducción en la actividad enzimática de la membrana de las micro-vellosidades.

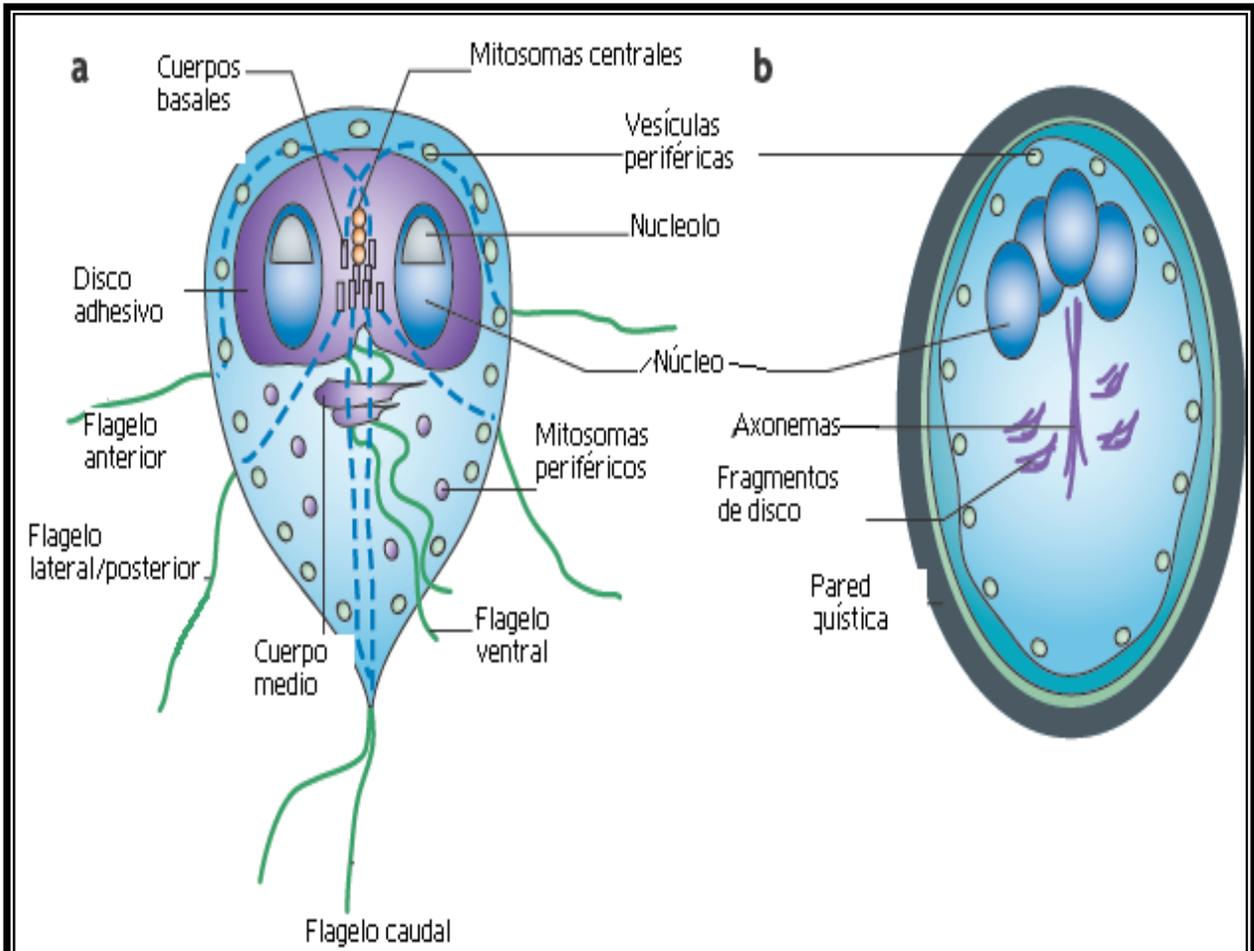
## **1.2 Morfología y ciclo biológico.**

Su ciclo de vida se caracteriza por la existencia de dos formas, el trofozoíto y el quiste (Figura 1). El trofozoíto mide 12-15  $\mu\text{m}$  de longitud por 5-9  $\mu\text{m}$  de ancho, posee una superficie dorsal convexa y una superficie ventral plana en la que se encuentra el disco ventral que le facilita la adhesión a la mucosa del intestino delgado. Cuenta con 2 núcleos y 4 pares de flagelos. El quiste es de forma ovalada, mide aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  de largo y su superficie es lisa y su pared es doble y altamente resistente (Adam *et al.*, 2001).

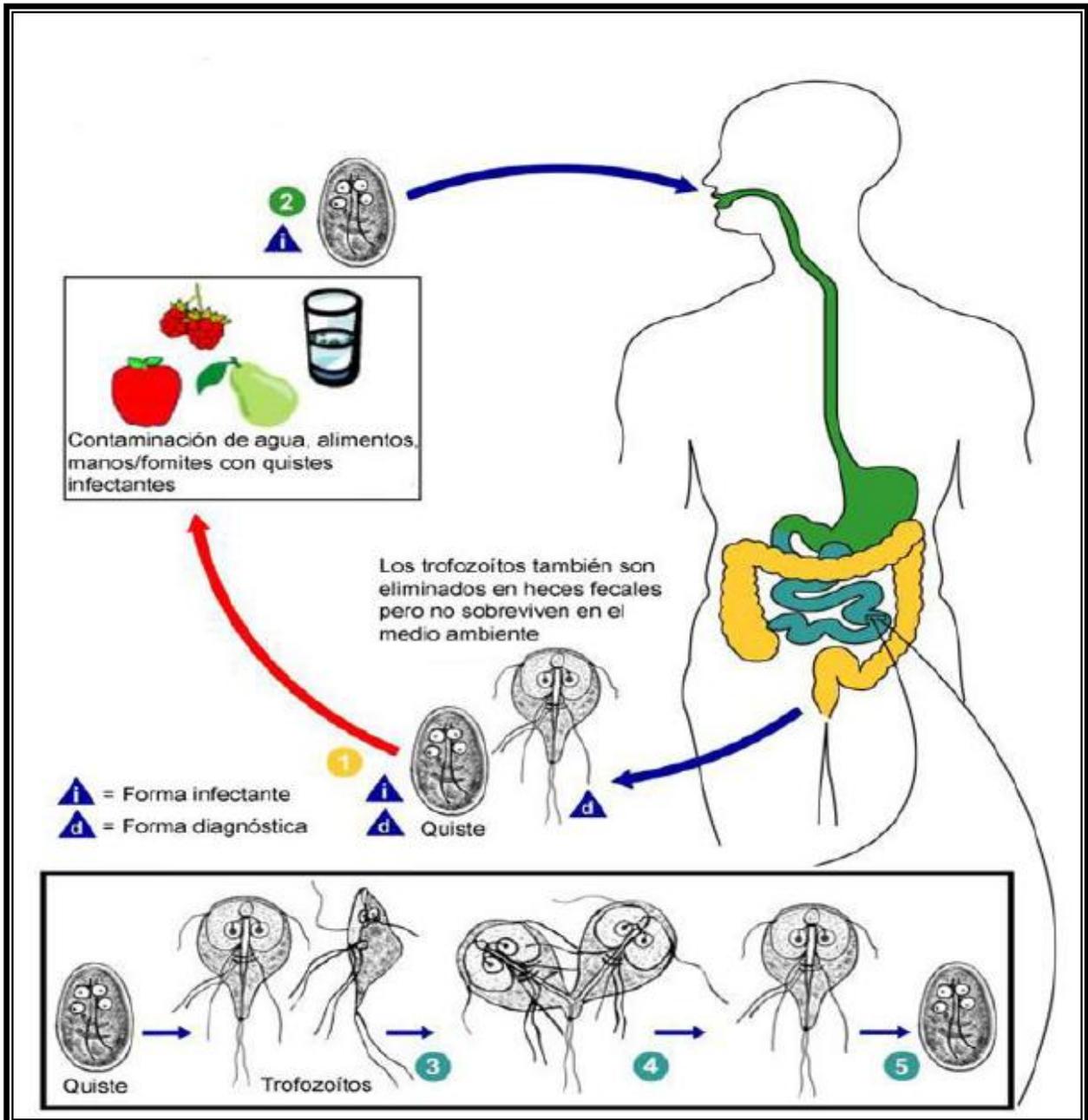
Los quistes constituyen la forma infectante de este protozooario. Acceden a los hospederos al ser ingeridos con el agua de consumo, los alimentos, o directamente de persona a persona por prácticas sexuales oro-anales. Una vez ingeridos los quistes, el proceso de desenquistamiento se inicia en las primeras porciones del intestino delgado con la liberación de los trofozoítos. La influencia del cambio de pH entre el estómago unido a la participación de enzimas digestivas son elementos favorecedores para este proceso (Lauwaet *et al.*, 2007). Como resultado aparecen dos nuevos trofozoítos que viven y se multiplican asexualmente en la superficie de la mucosa del intestino delgado (Figura 2).

Por otro lado, el enquistamiento es un proceso de diferenciación que resulta de la transformación del trofozoíto móvil a un quiste infectivo inmóvil (Ankarklev *et al.*, 2010). Éste es inducido en respuesta a ciertos factores específicos del hospedero tales como altos niveles de bilis, bajos niveles de colesterol y un pH básico. Los quistes son eliminados al exterior y pueden, potencialmente, infectar un nuevo hospedero inmediatamente después de haber sido excretados. Esta forma de resistencia en el medio exterior tiene la capacidad de mantenerse

con vida varios meses a bajas temperaturas. Experimentalmente se ha desarrollado la infección con la ingestión de 10 quistes del parásito, pero diferentes autores refieren que uno sólo es suficiente para desencadenar el proceso infeccioso (Thompson *et al.*, 2000).



**Figura 1. Esquema de trofozoíto y quiste de *Giardia sp.*** a) El trofozoíto de *Giardia* mide de 12-15  $\mu\text{m}$  de longitud y de 5 a 9  $\mu\text{m}$  de ancho. El trofozoíto es mostrado aquí dorsalmente. Tiene 8 flagelos distribuidos en 4 pares: los flagelos anteriores, flagelos ventrales, flagelos laterales/posteriores y flagelos caudales, las líneas punteadas indican su ubicación interna. Los cuerpos basales son los sitios en donde cada flagelo tiene su origen. El cuerpo medio es una estructura microtubular de la cual no se sabe su función. El disco adhesivo es largo, y anclado a una estructura rígida compuesta por microtúbulos. Existen muchos mitocondrios en la periferia y el centro de la célula. b) Los quistes de *Giardia* son inmóviles y ovalados, mide de 8-12  $\mu\text{m}$  de longitud por 7 a 10  $\mu\text{m}$  de ancho. La pared exterior del quiste es de 0.3 a 0.5  $\mu\text{m}$  y está compuesta por una red de filamentos que miden entre 7 y 20 nm de diámetro. Esta pared está compuesta mayoritariamente de *N*-acetilgalactosamina y tres diferentes proteínas de la pared (CWP1, CWP2 y CWP3). El disco adhesivo y los flagelos son desensamblados y almacenados en el quiste. Los quistes tienen cuatro núcleos tetraploides (Ankarklev *et al.*, 2010).

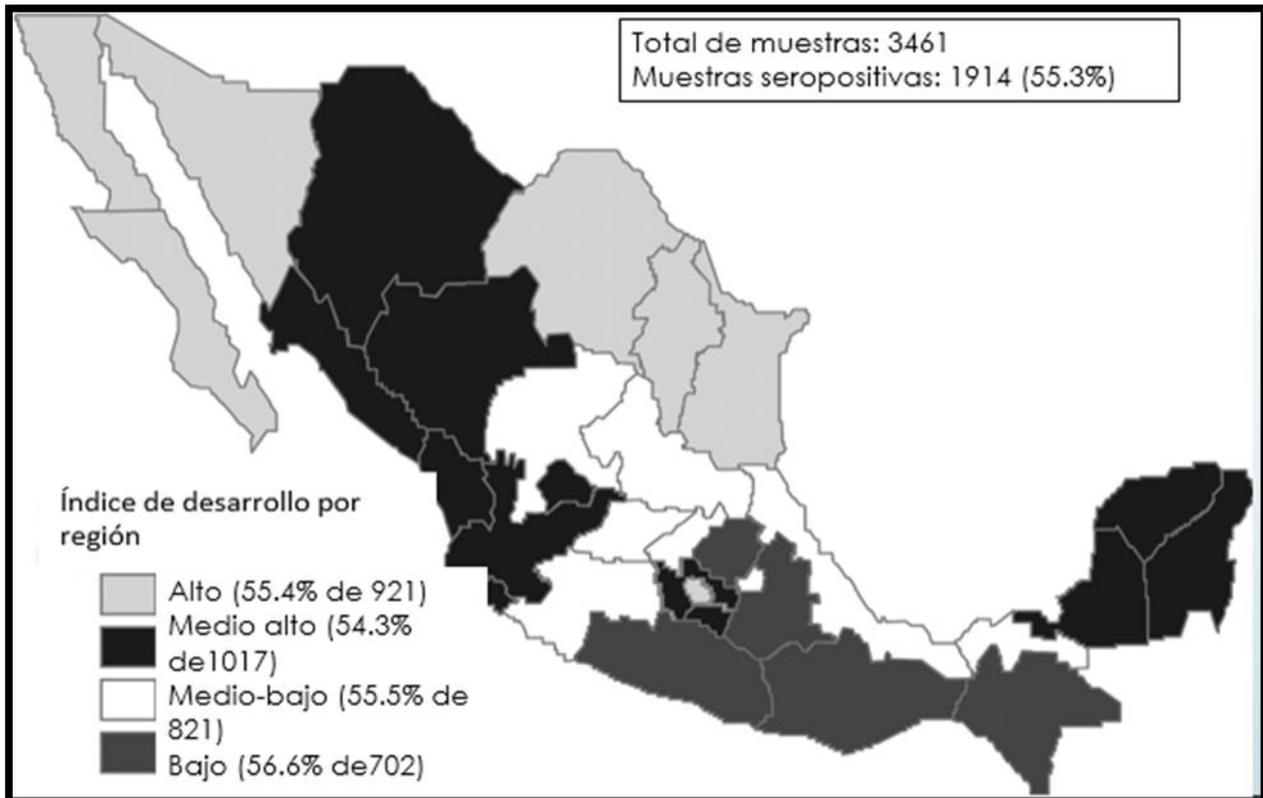


**Figura 2. Ciclo de vida de *Giardia lamblia*.** ①.- Los quistes son responsables de la transmisión de la giardiosis y pueden sobrevivir varios meses en el ambiente. ②.- La infección se inicia con la ingestión de quistes presentes en el agua contaminada, los alimentos, o por contaminación de manos o fomites. ③.- En el intestino delgado, se presenta el desenquistamiento y se liberan los trofozoítos (cada quiste produce dos trofozoítos). ④.- Los trofozoítos se multiplican por fisión longitudinal binaria en el lumen del intestino delgado donde pueden estar libres o adheridos a la mucosa. El enquistamiento ocurre durante el tránsito de los parásitos hacia el colon. ⑤.- Los quistes son excretados en las heces y son infecciosos, por lo que la transmisión de persona a persona es posible. (Tomado de: <http://www.cdc.gov/parasites/giardia/biology.html>).

### 1.3 Epidemiología de la giardiosis.

Las enfermedades parasitarias continúan ocasionando importantes problemas de salud pública en todo el mundo. Las infecciones parasitarias están ampliamente difundidas y en la actualidad su prevalencia en muchas regiones del mundo es similar a la que existía hace 50 años o más (Botero 2003). Las razones para esto se derivan de la complejidad de los factores que las condicionan y de la dificultad para controlar o eliminar estos factores. En la literatura se han propuesto numerosos factores relacionados con las parasitosis intestinales, entre los cuales cabe citar: deficiencia en higiene (Faubert., 2000), bajo nivel educativo, contaminación de alimentos y agua (Adam, 2001;), desnutrición (Newman et al., 2001), la vivienda y el medio residencial (presencia de roedores y/o vectores, inadecuada disposición de aguas para el consumo humano, inadecuada disposición de basura, saneamiento ambiental insuficiente y falta de servicios sanitarios, así como las condiciones socioeconómicas (Thompson, 2000). También son considerados la ausencia de conocimiento sobre transmisión y prevención de las enfermedades parasitarias y los antecedentes de parasitosis en familiares (Fraser, 2000). *G. lamblia* es el protozoo más común en el humano, presentando una distribución mundial que va desde los trópicos hasta el Ártico. Es el protozoo que con mayor frecuencia se encuentra en exámenes coproparasitológicos y a nivel mundial se ha estimado una frecuencia de 200,000,000 de individuos infectados, de los cuales 500,000 presentan síntomas (Vázquez y Campos, 2009).

La tasa de seroprevalencia en México fue estimada en 55 % a través de un estudio en el que se tomó como base el índice de desarrollo regional del país (en éste se incluyen factores como nivel de educación, características del hogar, tasa de mortalidad infantil y maternal, tasa de mortalidad asociada a enfermedades transmisibles y no transmisibles, número de médicos en la población y proporción de la población económicamente activa en comunidades urbanas comparada con las comunidades rurales) (ver figura 3) (Cedillo *et al.*, 2009). En el 2010 la Secretaría de Salud (SSA) reportó 12,563 casos nuevos de giardiosis, con mayor incidencia en estados con climas cálidos y templados como Sinaloa, Estado de México, Chiapas, Veracruz y Distrito Federal (Boletín Vigilancia Epidemiológica 2010).



**Figura 3. Seroprevalencia de *Giardia lamblia* en México basada en la clasificación regional de desarrollo económico.** El porcentaje en cada caso representa las muestras seropositivas para *Giardia lamblia* de acuerdo al total de la población perteneciente a cada región según el índice de desarrollo. Tomado y editado de Cedillo *et al.*, 2009.

La hipoacididad, la gastrectomía, la pancreatitis crónica, así como las dietas ricas en carbohidratos, hierro y colesterol, constituyen factores predisponentes a la infección (Adam *et al.*, 2001).

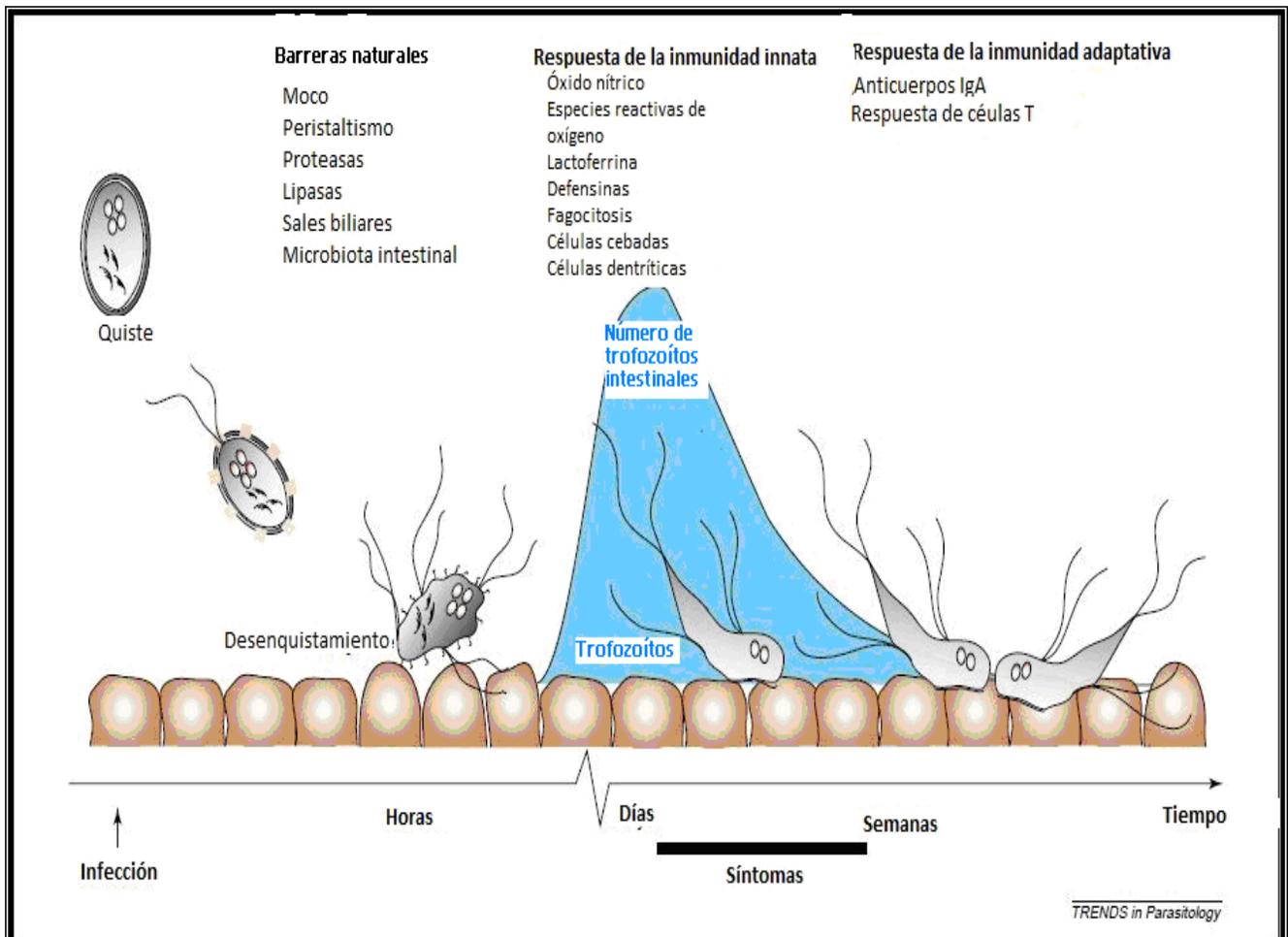
#### 1.4 Manifestaciones clínicas.

Las manifestaciones clínicas varían desde cuadros asintomáticos hasta casos graves que en raras ocasiones causan la muerte (Fraser *et al.*, 2000). El espectro clínico de la infección por *G. lamblia* varía de acuerdo a la intensidad de la infección, la cepa del parásito y el estado inmunológico del paciente. Oscila desde casos asintomáticos hasta casos con diarrea severa y persistente asociada con mala absorción (Buret *et al.*, 2011). La forma aguda se caracteriza por tener un inicio brusco, con diarreas malolientes y acuosas que tienden a flotar en el agua. Es frecuente la aparición de náuseas, vómitos y distensión abdominal, así como dolor en región epigástrica. No aparecen signos de invasión de la mucosa como sangre en las heces o fiebre. La presencia de moco en las heces no suele reportarse, a no ser por la existencia de otras

parasitosis o enfermedades que así lo justifiquen. La giardiosis aguda suele ser autolimitada en un periodo de 2 a 7 días; sin embargo, puede prolongarse y desarrollar cuadros diarreicos subagudos o crónicos (Goldsmith, 2000). La forma crónica de la infección se caracteriza por periodos diarreicos con heces pastosas y espumosas acompañadas de flatulencia y meteorismo que alternan con periodos en que las deposiciones son aparentemente normales.

### **1.5 Respuesta inmunitaria frente a *Giardia lamblia*.**

La respuesta inmunológica contra *Giardia*, depende de diversos factores, y dentro de los más importantes se encuentra el estado inmunológico del hospedero. Debido a lo anterior, se ha investigado la participación de la respuesta innata y adaptativa en los mecanismos de eliminación de la infección, tanto en humanos como en modelos animales de experimentación. La respuesta inmunitaria frente a *G. lamblia* está relacionada con la localización del parásito en el lumen del intestino delgado y la carencia de procesos inflamatorios de la mucosa después de la infección (Eckman, 2003). Diversos estudios han demostrado que la inmunidad a *Giardia* en el modelo experimental en ratones se da en dos fases distintas: una primera fase que tiene lugar durante las dos primeras semanas después de la infección y es independiente de células B, seguido de una fase que se correlaciona con la presencia de inmunoglobulina A (IgA), específica anti-parásito (Li *et al.*, 2004) (Ver Figura 4).



**Figura 4. Interacción de *Giardia lamblia* con el intestino humano.** La infección del intestino comienza con la ingestión de quistes del parásito. La dosis infectiva es baja, y son suficientes de 10 a 100 quistes de *Giardia* para establecer una infección. Se muestran los diferentes mecanismos del sistema inmunario que participan en la infección con *Giardia*. El número de trofozoitos en el intestino durante la infección está representada por la zona en azul. A nivel local, el número de trofozoitos puede ser alto y un paciente con giardiasis puede arrojar  $1 \times 10^8$  quistes viables por gramo de materia fecal (Roxström-Lindquist *et al.*, 2006).

### 1.5.1 Respuesta inmunitaria innata frente a *G. lamblia*

Los primeros mecanismos involucrados en la respuesta inmunitaria contra *Giardia*, pertenecen a elementos de la inmunidad innata. Sin embargo, debido a las características biológicas de *Giardia*, es muy probable que también participen factores no inmunológicos en la susceptibilidad a la infección, o en la duración y severidad de la misma. En el intestino humano, el parásito interacciona con la primera línea de defensa que se inicia a través de barreras naturales que incluyen: la secreción de moco intestinal que dificulta la adhesividad del parásito,

la secreción de enzimas digestivas pancreáticas y el peristaltismo intestinal (Roxström y Lindquist, 2006). Adicionalmente, en ratones se ha observado que las células de Paneth eliminan a *Giardia*, probablemente mediante la producción de defensinas, ya que éstas han demostrado tener actividad anti-*Giardia* "in vitro" (Shewy y Eid, 2005). Se demostró que las especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO) son citotóxicos para *G. lamblia* "in vitro", el NO inhibe el crecimiento, el enquistamiento y desenquistamiento de *G. lamblia*; pero no tiene efecto sobre la viabilidad (Eckmann, 2003). Además, la microbiota normal puede inhibir la infección por *G. lamblia* a través diferentes mecanismos que incluyen la competencia por recursos alimenticios, toxicidad e inducción de respuestas inmunológicas cruzadas. Dichos efectos son observados en ratones carentes de respuestas inmunitarias adaptativas (Singer y Nash, 2000).

Los mecanismos celulares inespecíficos relacionados con el control de la giardiasis están gobernados por la secreción de moléculas relacionadas con procesos inflamatorios y de hipersensibilidad llamadas interleucinas. Estas moléculas, han sido relacionadas con procesos inflamatorios y de diferenciación de linfocitos B, como lo es la interleucina 6 (IL-6), que es una proteína multifuncional producida por un gran número de células, incluyendo linfocitos T, macrófagos y células cebadas. En ratones deficientes de IL-6 infectados con trofozoítos de *G. lamblia* no fue posible el control de la fase aguda de la infección (Bienz, 2003). De igual manera se han evaluado las interleucinas IL-2, IL-4 e IL-10 en pacientes con giardiosis, observándose que la interleucina con mayor título fue la IL-2, seguida de la IL-4, mientras que la IL-10 no mostró elevación. Por lo cual, los autores concluyen que la respuesta inmunológica Th1 es una vía predominante en la eliminación de la infección, la IL-2 es un factor de crecimiento para linfocitos T estimulados por el antígeno, así como la expansión clonal de los mismos (Bayraktar *et al.*, 2005).

Se ha estudiado la respuesta inflamatoria de *Giardia* en el hospedero y la relación que presenta con algunas proteínas indicadoras de procesos inflamatorios como lo es el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). El TNF- $\alpha$  juega un papel importante en el control de la giardiosis, ya que ratones tratados con anticuerpos neutralizantes de TNF- $\alpha$  o deficientes de TNF- $\alpha$ , e infectados

con trofozoítos de *Giardia*, presentan un gran número de parásitos en el intestino delgado, comparados con ratones normales, indicando que el TNF- $\alpha$  es importante para el control de la infección (Zhou *et al.*, 2007).

### **1.5.2 Respuesta inmunitaria humoral contra *G. lamblia*.**

En contraparte, existen mecanismos inmunológicos adaptativos capaces de eliminar la infección como lo es la respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos. *G. lamblia* se adhiere y duplica en la parte superior del intestino delgado, en donde el Tejido Linfoide Asociado a Mucosas (MALT) se encuentra involucrado en los procesos de eliminación de la infección (Fagarasan y Honjo, 2003). La importancia funcional de este tejido se debe a la presencia de un gran número de células plasmáticas, reconocidas por ser grandes productoras y secretoras de anticuerpos IgA.

Diversos reportes de investigación describen a los linfocitos B como células infalibles para la erradicación de la giardiosis, ya que durante esta infección se observa una elevación en los títulos de anticuerpos (IgA en mucosas, IgM e IgE en suero) relacionados con respuestas contra agentes infecciosos que afectan el tracto intestinal. Sin embargo, en estudios recientes se ha dilucidado que los anticuerpos no son eficientes para la eliminación del protozoario, se sabe por ejemplo que los trofozoítos de *Giardia lamblia* pueden evadir este tipo de respuesta inmune a través de la secreción de tiol-proteasas que tienen la capacidad de unirse a la IgA humana e inactivarla (Buret *et al.*, 2011).

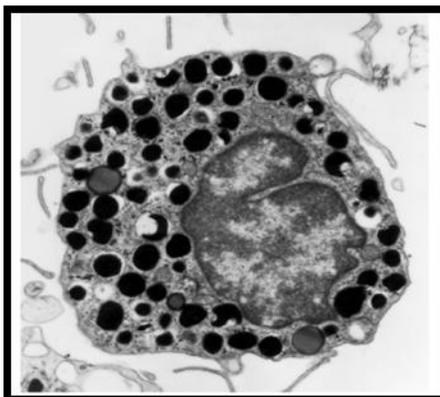
### **1.5.3 Respuesta inmunitaria celular contra *G. lamblia*.**

Se sabe que la inmunidad mediada por células (linfocitos T) juega un papel importante en la eliminación de la infección. Se ha reportado la proliferación de linfocitos T a nivel de mucosas y sangre periférica en individuos infectados con *Giardia*, observándose títulos altos de moléculas como IFN- $\gamma$  (Ebert, 1999). En contraparte se ha estudiado que las atrofiaciones en el intestino del hospedero son desarrolladas por la acción de los Linfocitos T CD8+ (citotóxicos) (Scott *et al.*, 2004).

En individuos con giardiasis sintomática se observaron grandes infiltrados linfocíticos (CD8+), especialmente en aquellos que presentaban diarrea y flatulencia. Los autores sugieren que los linfocitos T CD8+ están relacionados con las patologías desarrolladas durante la infección. A este respecto, se ha encontrado que ratones atímicos (carentes de linfocitos T) infectados presentaron disminución en daños a nivel de microvellosidades y en la reducción de la actividad de ciertas enzimas disacaridasas (El- Shazly *et al.*, 2003).

### 1.6 Células cebadas.

Las células cebadas (referidas en general como MC por su nombre en inglés: mast cells), fueron descritas por primera vez por Paul Ehrlich en 1872. Este tipo celular es el responsable de las reacciones de hipersensibilidad tipo I, más comúnmente conocidas como reacciones alérgicas. Las MC se originan de progenitores hematopoyéticos multipotenciales en la médula ósea, y migran a través de la sangre hacia virtualmente todos los tejidos vascularizados, donde completan su maduración (Metcalf *et al.*, 1997). Las MC maduras residen normalmente cerca de los epitelios, los vasos sanguíneos, los nervios, las vías respiratorias y tracto gastrointestinal, cerca de células de músculo liso y de las glándulas productoras de moco.



**Figura 5. Micrografía electrónica de una célula cebada típica.** Se aprecia su citoplasma con los gránulos donde se almacena histamina, proteasas y diversos mediadores químicos.

Microscópicamente se identifican fácilmente, porque presentan en su citosol un número grande de gránulos electrodensos (ver Figura 5) que contienen diversos mediadores como la histamina, la heparina, diversas proteasas y citocinas como el factor de necrosis tumoral tipo  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Las MC están localizadas en los tejidos vascularizados y cavidades serosas donde constituyen una de las primeras líneas de defensa del sistema inmunológico habilitadas para interactuar con alérgenos y antígenos (Galli *et al.*, 2008). Dentro de los tejidos del cuerpo, el microambiente

estimula el control del perfil fenotípico de las MC, de esta forma se da una subdiferenciación a partir de un progenitor en común (Moon *et al.*, 2010). Históricamente la clasificación de MC en roedores ha sido basada en las diferencias fenotípicas de ellas, así pues se tienen a las células cebadas de tejido conectivo (CTMC), encontradas en la piel y la cavidad peritoneal y a las MC de mucosas (MMC) que están presentes en la lámina propia del intestino. Sin embargo, además de las diferentes características fenotípicas entre estas dos poblaciones hay también diferencias funcionales, tales como el contenido de proteasas, propiedades histoquímicas y la reactividad para liberar agentes anti-alérgicos. De esta forma las MMC expresan las proteasas de MC (MMCP) 1 y 2, en cambio CTMC son positivas para MMCP-4, -5, -6 y carboxipeptidasa A. Las MMC se expresan notablemente durante las respuestas inmunológicas dependientes de células T dirigidas a ciertos parásitos, por otro lado las CTMC exhiben poca o ninguna dependencia con células T (Moon *et al.*, 2010).

Las células cebadas de humanos también exhiben heterogenicidad y ellas se clasifican de acuerdo a su contenido de serina-proteasas:

- MC productoras de triptasa (MC<sub>T</sub>), las cuales predominan en los alvéolos y en la mucosa del intestino delgado.
- MC productoras de quimasa (MC<sub>C</sub>), presentes en tejido sinovial.
- MC productoras de quimasa y de triptasa (MC<sub>TC</sub>), que se localizan en la piel, amígdalas y en la mucosa del intestino delgado (Irani y Schwartz., 1994).

Los mediadores producidos por las MC pueden dividirse en dos grupos:

- a) Mediadores preformados y almacenados en sus gránulos, como histamina, proteoglicanos, proteasas neutrales, ciertas citocinas, particularmente el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) que son rápida e instantáneamente liberados tras la activación de las MC.
- b) Productos sintetizados de *novo*, como mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas, factores angiogénicos, entre otros.

Todos estos productos (Cuadro 1), son importantes tanto en la inmunidad innata como en la adquirida, la liberación rápida de estos mediadores de MC es crucial para la iniciación de la respuesta inmunitaria en el sitio de la infección ya que ellos modulan el tráfico inmune-celular y proveen de señales co-estimuladoras para la activación celular. Particularmente, la histamina es el mediador más abundante almacenado en las MC y tiene receptores específicos en varios tipos de células como células del músculo liso y células gastrointestinales, induciendo contracción y vasoespasmos. Adicionalmente, se sabe que la histamina puede mediar la activación y migración de células dendríticas (Caron *et al.*, 2001). Otro de los productos liberados tempranamente después de la activación de MC es el TNF- $\alpha$ , una citocina preformada que induce el flujo de neutrófilos lo cual promueve la eliminación de los patógenos (Henz *et al.*, 2001).

<b>Cuadro 1. Mediadores derivados de MC.</b>		
Clase	Mediador	Efectos fisiológicos
<b>PREFORMADOS</b>		
Aminas biogénicas	Histamina	Vasodilatación
	5-Hidroxitriptamina	Regulación leucocitaria, dolor, vasoconstricción.
Proteoglicanos	Heparina, sulfato de heparina	Angiogénesis, coagulación.
	Sulfato de condroitina	Remodelado tisular.
Proteasas	Triptasa	Inflamación, dolor, daño tisular
	Quimasa	Inflamación, dolor, daño tisular.
	MC-CPA-/Carboxipeptidasa A	Degradación enzimática.
	Catepsina B, C, D, E, G, L, Sb	Muerte de patógeno, remodelado tisular.
	MCP5/6	Patogénesis del asma y otros desórdenes alérgicos.
Enzimas lisosomales	$\beta$ -hexosaminidasa, $\beta$ -glucuronidasa, $\beta$ -galactosidasa, aril-sulfatasa A	Remodelado de matriz extracelular.
Otros	Óxido nítrico sintasa	Producción de NO
	Endotelina	Sepsis
	Quininas	Inflamación, dolor, vasodilatación, efectos anti-inflamatorios.

SINTETIZADOS DE <i>nov</i>		
Derivados lipídicos	LTB <sub>4</sub> , LTC <sub>4</sub> , PGD <sub>2</sub> , PAF	Inflamación, reclutamiento de leucocitos, adhesión endotelial, contracciones del músculo liso, permeabilidad vascular.
Citocinas	IL-1 $\alpha^a$ , IL-1 $\beta^a$ , IL-2 $^b$ , IL-3,IL-4,IL-5,IL-6,IL8 $^a$ , IL-9,IL-10,IL-11 $^a$ , IL-12,IL-13,IL-14 $^a$ , IL-15 $^a$ , IL 16,IL-17,IL-18 $^a$ , IL-22 $^b$ , IL-25 $^b$ , IL-33 $^b$ , MIF,TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\beta^b$ , IFN $\gamma^b$	Inflamación, proliferación leucocitaria y activación, inmunoregulación.
Quimiocinas	CCL1, CCL2, CCL3 $^{a,b}$ , CCL4 $^a$ , CCL5 $^a$ , CCL7 $^{a,b}$ , CCL8 $^a$ , CCL11 $^a$ , CCL13 $^a$ , CCL16 $^a$ , CCL17, CCL19 $^a$ , CCL20 $^a$ , CCL22 $^{a,b}$ , CCL25 $^b$ , CXCL1 $^a$ , CXCL2, CXCL3 $^a$ , CXCL4, CXCL5, CXCL8 $^a$ , CXCL10 $^a$ , CX3CL	Quimiotaxis de leucocitos.
Factores de crecimiento	TGF $\beta$ , SCF $^a$ , G-CSF, M-CSF, GM-CSF, VEGF, NGF $\beta$ , LIF $^{a,b}$ FGF	Factores de crecimiento de varios tipos de células.
Especies antimicrobianas	Péptidos antimicrobianos, NO, Superóxido, ROS.	Muerte de los patógenos.

Algunos mediadores han sido detectados en MC sólo en estudios en humanos<sup>a</sup> o en ratones<sup>b</sup> o no se ha dilucidado si existen en ambas especies<sup>m</sup>. Referencias generales: Chen *et al.*, 2005.

### 1.7 Participación de las células cebadas en la infección con *Giardia lamblia*.

Diversos estudios han demostrado que las células cebadas juegan un papel importante en el control de la infección con *Giardia sp.*, es este rubro se han utilizado modelos murinos y se ha observado un aumento y acumulación de células cebadas en el intestino delgado de animales infectados con *G. lamblia* y *G. muris* (Erlich *et al.*, 1983; Hardin *et al.*, 1997), adicionalmente se ha determinado que ratones deficientes en células cebadas son incapaces de controlar la infección por *Giardia sp* (Li *et al.*, 2004). Así mismo, se ha sugerido que la histamina el mediador químico preformado presente en mayor cantidad de las células cebadas (Gri *et al.*, 2012), puede estar involucrado en la inmunidad contra *Giardia* (Venkatesan, 1997). A este respecto se observó que la liberación de histamina por parte de células cebadas de peritoneo de rata estimuladas con *G. lamblia* ocurre a través de una vía independiente de IgE. Por otro lado, se ha documentado que un extracto de proteínas solubles de *Giardia lamblia* (que incluyen proteínas

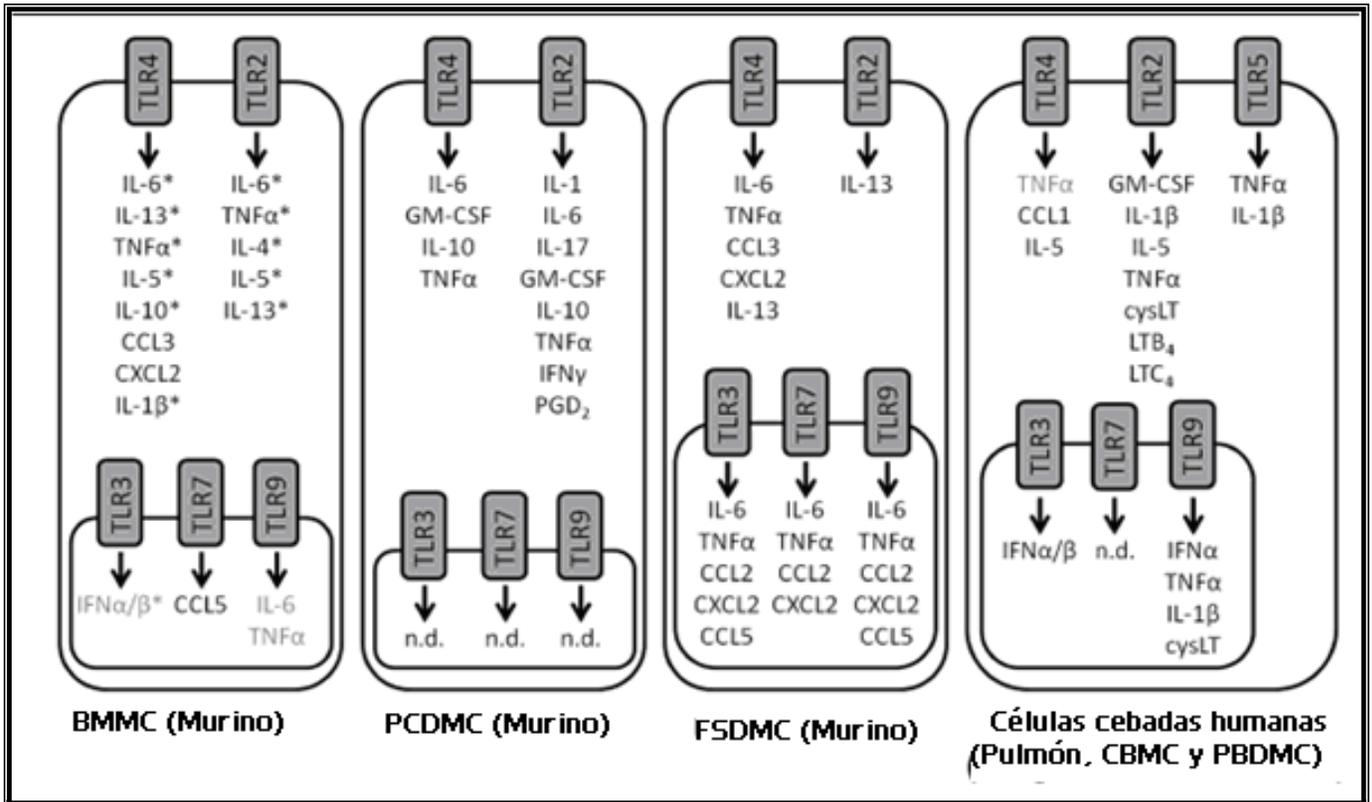
de citosol, citoesqueleto y membrana celular) induce la liberación de histamina y citocinas proinflamatorias en células cebadas de peritoneo de rata (Muñoz *et al.*, 2010).

De igual forma se ha determinado que la IL-6 y el TNF- $\alpha$  tienen un papel importante en el control temprano de la infección con *Giardia sp.* en ratones, (Li *et al.*, 2004). Aunado a esto se ha sugerido que las células cebadas pueden ser una fuente importante de IL-6 y de TNF- $\alpha$ , ya que se ha observado un aumento en el mRNA de ambas citocinas en células cebadas después de 6 horas de estimulación con un extracto soluble de trofozoítos *G. lamblia* (Muñoz *et al.*, 2010), y la liberación máxima de estas citocinas ocurrió a las 24 horas, por lo que se sugiere una relación directa entre la producción de estas citocinas por las células cebadas y la eliminación temprana de la infección con *G. lamblia*.

Adicionalmente, se ha identificado una fracción del extracto total soluble de *G. lamblia* (denominada F2) con mayor capacidad de activar a las células cebadas (Gómez, 2011).

### **1.7.1 Células cebadas y TLR.**

Como uno de los protagonistas del sistema inmunitario innato, las células cebadas juegan un papel “pivote” en la acción anti-infección. Se sabe que los TLR son expresados ampliamente en células cebadas de ratón a través de la medición de los niveles de mRNA (Li *et al.*, 2009), sin embargo la expresión de TLR5 no ha sido demostrada en células cebadas de modelos murinos (Matsushima *et al.*, 2004). La expresión de TLR1-10 con excepción de TLR8 ha sido demostrada en células cebadas de humano (Yoshioka *et al.*, 2007). La señalización vía TLR involucra tanto a la molécula ITAM y a la fosforilación de DAP12, lo que activa a syk, molécula crítica relacionada en la activación de las células cebadas (Smrz *et al.*, 2010) (Ver figura 6).



**Figura 6. Respuesta secretora de las células cebadas a ligandos de TLR:** el diagrama muestra las moléculas secretadas tras la activación de las células cebadas por un ligando de TLR. Las citocinas, quimiocinas y mediadores lipídicos liberados tras la estimulación de TLR han sido resumidos para ratones en células cebadas derivadas de médula ósea (BMMC), células derivadas de peritoneo (PCDMC), células derivadas de piel fetal (FSDMC) y en humanos, en células cebadas de pulmón, células derivadas de cordón umbilical (CBMC) y derivadas de sangre periférica (PBDMC). \*Indica instancias en las que ha sido demostrado con el uso de células deficientes en TLR o con anticuerpos bloqueadores que el ligando es activado a través del receptor indicado. Tomado de Sanding y Bulfone, 2012.

### 1.8 Receptores tipo Toll: generalidades.

La invasión al hospedero por parte de agentes infecciosos patógenos activa una batería de respuestas inmunitarias a través de interacciones entre factores de virulencia del patógeno y los mecanismos inmunológicos del hospedero, dichas interacciones son generalmente iniciadas a través del reconocimiento de moléculas asociadas a patógenos (PAMP: pathogen-associated molecular patterns) (Janeway, 2001) que son esenciales para el ciclo de vida del patógeno, estas moléculas son reconocidas a través de receptores reconocedores de patógenos (PRR). Los PRR se expresan fundamentalmente en la superficie de las células que primero entran en

contacto con el patógeno de infección y en células presentadoras de antígeno, como células dendríticas, monocitos y macrófagos; también se encuentran presentes en compartimentos intracelulares, en el torrente circulatorio y en fluidos tisulares (Zhang, 2001).

Entre los principales PAMP que actúan como blanco para la activación del sistema inmunitario innato se encuentran el lipopolisacárido, ácidos teicoicos, secuencias de DNA CpG no metiladas, manosa y RNA bicatenario característico de virus (Moreno, 2003). Estos patrones moleculares presentes en los microorganismos patógenos muestran una serie de propiedades comunes:

1. Son característicos de los microorganismos y no se encuentran presentes en las células del hospedero, característica que permite al sistema inmune innato distinguir entre antígenos propios y extraños (Moreno, 2003).
2. Son invariables, lo que permite que con un número limitado de PRR se detecte la presencia de cualquier patógeno (Moreno, 2003).
3. Son esenciales para la supervivencia o patogenicidad del patógeno por lo que sus mutaciones son letales para el microorganismo y por tanto permanecen invariables pudiendo ser reconocidos por los PRR (Moreno, 2003).

Hay distintos tipos de proteínas que presentan características de PRR capaces de reconocer los patrones moleculares asociados a patógenos. En los mamíferos, incluyendo al ser humano, existe un sistema de receptores de reconocimiento de PAMP que por su semejanza en estructura y función con el sistema Toll de *Drosophila* se denominan receptores semejantes a Toll (TLRs: Toll like Receptors). Los macrófagos y las células dendríticas pueden usar sus TLR para clasificar al patógeno invasor y responder de forma personalizada. La activación de los TLR a través de los PAMP conlleva una doble función:

1. Activar distintos procesos característicos del sistema inmunitario innato, como puede ser la fagocitosis, opsonización, producción de mediadores de la inflamación, entre otros, con el fin de impedir la diseminación del patógeno antes de que se desarrolle la inmunidad adquirida (Moreno, 2003).
2. Establecer una conexión entre la inmunidad innata y la adquirida (Moreno, 2003).

En 1996 se describió el primer TLR en humanos, al que se denominó TIL y que corresponde a TLR1 (Tagushi *et al.*, 1996). En 1997 se identificó la segunda molécula, que se denominó hToll (actualmente TLR4) y se demostró que inducía la activación del factor nuclear kappa B (NF-κB) y la cascada de síntesis de citocinas proinflamatorias (West, 2006). La importancia de este descubrimiento fue que se confirmó que los TLR están involucrados en la respuesta inmunitaria innata en el humano. A la fecha, se han descrito 10 TLR en humanos (TLR1-10), los cuales son proteínas transmembranales con un dominio extracelular de segmentos repetidos ricos en leucina (N- terminal), un dominio transmembranal y uno intracelular denominado TIR (C-terminal), el cual es similar al dominio intracelular receptor de interleucina 1 (Akira, 2001).

<b>Cuadro 2. Características generales de los TLR</b>				
<b>TLR</b>	<b>Expresión en células inmunológicas</b>	<b>PAMP</b>	<b>Molécula adaptadora</b>	<b>Producción</b>
<b>TLR1+ TLR2</b>	Superficie celular Mo, MΦ, DC, B	Lipoproteínas triacetiladas. Peptidoglicanos, Lipopolisacáridos	TIRAP, MyD88, Mal	CI
<b>TLR2+ TLR6</b>	Superficie celular Mo, MΦ, MC, B	Lipoproteínas diacetiladas (FSL-1)	TIRAP, MyD88, Mal	CI
<b>TLR3</b>	Endosomas B, T, NK, DC	dsRNA (poly (I:C))	TRIF	CI, IFN Tipo 1
<b>TLR4</b>	Superficie celular/ endosomas Mo, MΦ, DC, MC, EI	Lipopolisacárido(LPS) Paclitaxel	TRAM, TRIF TIRAP, MyD88 Mal	CI, IFN Tipo 1
<b>TLR5</b>	Superficie celular Mo, MΦ, DC, IE	Flagelina	MyD88	CI
<b>TLR7</b>	Endosomas Mo, MΦ, DC. B	ssRNA Imidazoquinolinas (R848) Análogos de Guanosina (Loxoribine)	MyD88	CI, IFN Tipo 1
<b>TLR8</b>	Endosomas Mo, MΦ, DC, MC	ssRNA, Imidazoquinolinas (R848)	MyD88	CI, IFN Tipo 1
<b>TLR9</b>	Endosomas Mo, MΦ, DC, B,T	CpG DNA CpGODNs	MyD88	CI, IFN Tipo 1
<b>TLR10</b>	Endosomas Mo, MΦ, DC	Proteínas parecidas a porfilina	MyD88	CI

Acotaciones: Mo: Monocitos; MΦ: Macrófagos; DC: células dendríticas; MC: Células cebadas; B: Células B; T: Células T; EI: Epitelio Intestinal; CI: Citocinas inflamatorias. (Tomado de <http://www.invivogen.com/review-trlr>)

## **1.9 TLR y sus ligandos.**

### **1.9.1 PAMP bacterianos reconocidos por TLR.**

De los TLR, el TLR1, 2, 4, 5, 6, son dedicados primariamente al reconocimiento de componentes bacterianos. El LPS (Lipopolisacárido) es el mayor componente de las paredes celulares de las bacterias gram-negativas y es reconocido primordialmente por el TLR4 asociado con una molécula conocida como MD2. Por otro lado, TLR2 reconoce al peptidoglicano de la pared celular de las bacterias Gram-positivas. Las micobacterias, ricas en lipoarabinomano (LAM) son, de igual forma, reconocidas por TLR2. TLR2 en conjunto con TLR1 o TLR6, detectan diacil o triacilipopéptidos respectivamente en micobacterias y micoplasmas (Kumar *et al.*, 2009). TLR5 reconoce la flagelina, proteína expresada por bacterias flageladas y TLR9 DNA genómico bacteriano o viral rico en CpG desmetiladas (Kumar *et al.*, 2009).

El RNA de los estreptococos del grupo B, que residen dentro del fagosoma, son reconocidos por TLR7, de igual forma TLR7 se ve involucrado en el reconocimiento de RNA bacteriano producido en los compartimentos lisosomales. El reconocimiento de PAMP por TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6 induce principalmente la producción de citocinas inflamatorias, por otro lado, TLR7 y TLR9 inducen Interferones Tipo 1 (Kumar, 2011).

### **1.9.2 PAMP virales reconocidos por TLR.**

Los ácidos nucleicos de cadena sencilla (ss) o de doble cadena (ds) de RNA o ss/ds DNA) derivados de virus son reconocidos por varios TLR. El DNA de Virus Herpes simple (HSV), citomegalovirus murino (MCMV) así como islas CpG y oligonucleótidos sintéticos que contienen DNA CpGdesmetiladas son reconocidas por TLR9, induciendo la producción de interferones tipo 1, probablemente por células dentríticas plasmáticas (Kumar *et al.*, 2009). El RNA de virus es detectado por TLR7 y TLR8 (la función del TLR8 murino no es conocida). Adicionalmente, compuestos sintéticos antivirales como R848, imiquimod y loxoribina son reconocidos por TLR7 y TLR8. Además, el análogo sintético de dsRNA, conocido como poly IC, es detectado por TLR3 y también activa la inmunidad adaptativa cuando es usado como adyuvante de vacuna. Otro

PAMP derivado de virus es la proteína de cubierta del virus respiratorio sincicial (RSV) y el virus del tumor mamario de ratones (MMTV) los cuales son reconocidos por TLR4, sin embargo, estudios *in vivo* muestran que TLR2 y TLR6 juegan un papel esencial en el control de la infección por RSV. Las proteínas de cubierta de otros virus, como la proteína hemaglutinina del sarampión son también reconocidas por TLR2. Notablemente, el reconocimiento induce la producción de Interferón tipo 1 por monocitos inflamatorios (Kumar, 2011).

### **1.9.3 PAMP fúngicos reconocidos por TLR.**

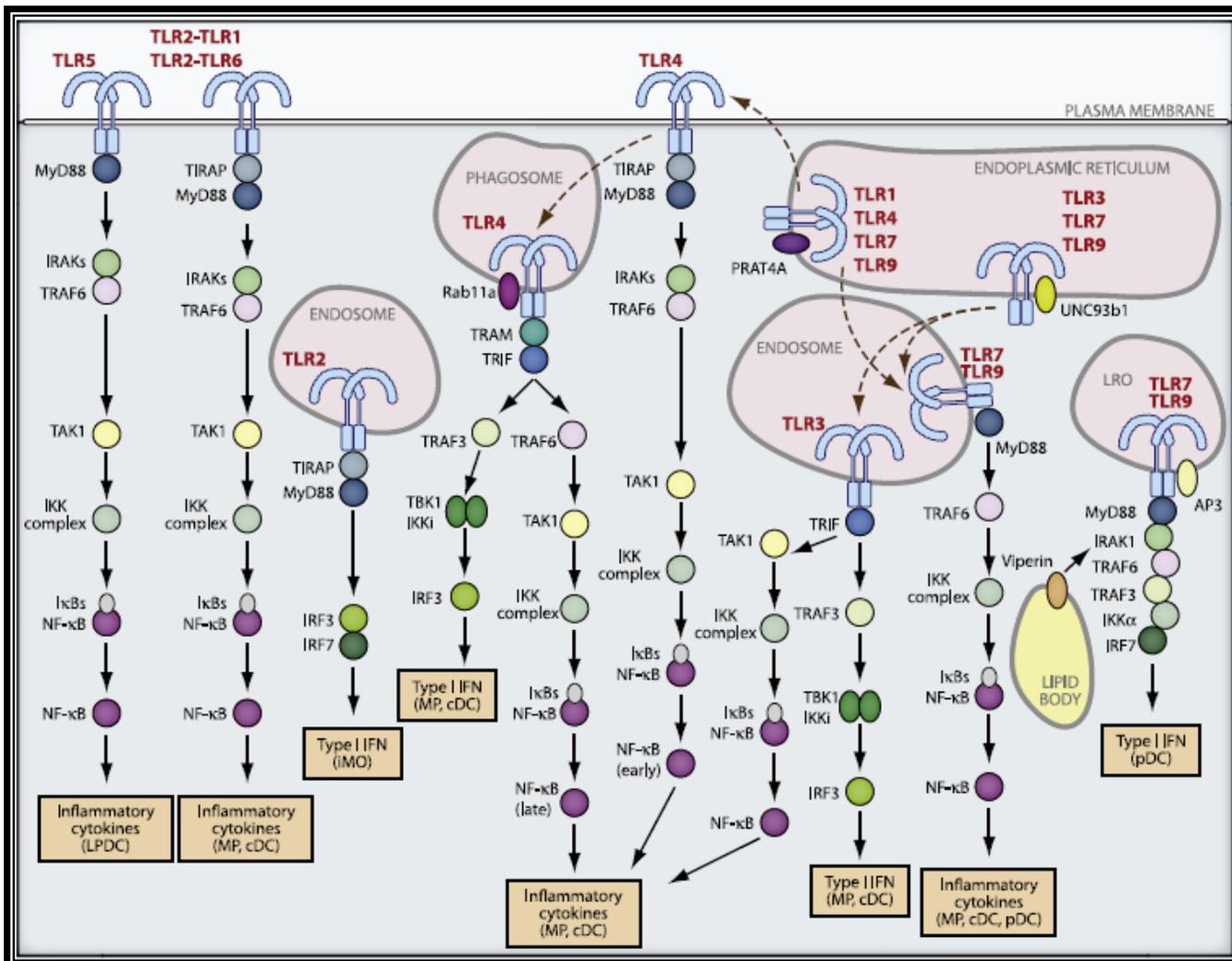
Muchos hongos, como *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus*, son reconocidos por varios TLRs induciendo respuestas inflamatorias. Sin embargo, este reconocimiento requiere de receptores adicionales tales como dectinas, CD14, receptores de manosa, y DC-SIGN. Los  $\beta$ -glucanos son el componente principal de la mayoría de las paredes celulares de los hongos, estos  $\beta$ -glucanos son reconocidos por TLR2 en asociación con dectina-1. Los glucuronoxylomananos, otros componentes fúngicos son detectados por CD14 y TLR4, induciendo respuestas inflamatorias (Kumar, 2011).

### **1.9.4 PAMP de protozoarios reconocidos por TLR.**

Las infecciones por protozoarios son un grave problema en muchos países y causan enfermedades como Toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*), malaria (especies de *Plasmodium*), leishmaniasis (especies de *Leishmania*), y la enfermedad del sueño (*Trypanosoma brucei*). A la fecha, se han descrito diferentes PAMP de protozoarios que son reconocidos por los TLRs. El alquilacilglicerol insaturado y el lipofosfoglicano (LPG) de especies de *Trypanosoma* y de *Leishmania* respectivamente, son reconocidos por TLR2, los glicoinositolfosfolípidos y los anclajes de glicosilfosfatidilinositol de especies de *Tripanosoma*, *P. falciparum* y *T. gondii* son reconocidos a través de TLR2 junto con TLR4. La proteína parecida a profilina de *T. gondii* es detectada por TLR11 murino. El DNA genómico y los cristales de hematina de especies de *Trypanosoma* y *Plasmodium* respectivamente son detectados por TLR9 (Kumar, 2011).

### 1.9.5 Vía de señalización de TLR.

La vía de señalización de TLR consiste en dos distintas vías: una dependiente de MyD88 que se relaciona con la producción de citocinas inflamatorias y una vía independiente de MyD88 asociada con la estimulación de IFN- $\beta$  y la maduración de las células dendríticas. La vía MyD88 dependiente es común en todos los TLR exceptuando al TLR 13. Después de la activación con PAMP o ligandos endógenos, los heterodímeros y homodímeros de TLR inducen el reclutamiento de proteínas adaptadoras vía el dominio citoplasmático TIR. Entre estos adaptadores se incluyen: MyD88, TIRAP, Mal, TRIF y TRAM. El reclutamiento de MyD88 se da a través de IRAK1 e IRAK4. IRAK 4 subsecuentemente activa a IRAK1 por fosforilación. Tanto IRAK 1 e IRAK4 dejan el complejo TLR-MyD88 y se asocian temporalmente con TRAF6 conduciendo a su ubiquitinación. Se demostró que IRAK 2 juega un papel central en la ubiquitinación de TRAF6. Después de su ubiquitinación, TRAF6 forma un complejo con TAB2/TAB3/TAK1 induciendo la activación de TAK1. TAK1 se acopla al complejo IKK que incluye a la proteína NEMO, conduciendo a la fosforilación del complejo IKB y la subsecuente translocación al núcleo de NF-KB. La activación de NF-KB activa la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-12 (Kumar, 2011). Algunos TLR inducen diferentes vías de señalización a través del uso de diferentes adaptadores moleculares. TLR4 y TLR2 en su vía de señalización requieren el adaptador TIRAP/Mal, que se ve involucrado en la vía dependiente de MyD88. TLR3 activa la producción de IFN- $\beta$  en respuesta a ds-RNA en una vía independiente a MyD88 a través del adaptador TRIF/TICAM-1. TRAM/TICAM es otro adaptador molecular relacionado en la vía independiente de MyD88 cuya función está restringida sólo a la vía de TLR4. TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 reconocen ácidos nucleicos virales e inducen la producción de IFN tipo 1. Los mecanismos de señalización que conducen a la inducción de IFN tipo 1 difieren dependiendo del TLR activado. Entre dichos mecanismos se encuentran factores de regulación de interferón, IRF, una familia de factores de transcripción conocidos por tomar un papel crítico en la actividad de defensa antiviral, proliferación celular y regulación inmunitaria. Tres IRF (IRF3, IRF5 e IRF7) funcionan como transductores de vías de señalización mediadas por TLR contra virus. TLR3 y TLR4 activan IRF3 e IRF7, por otro lado, TLR7 y TLR8 activan IRF5 e IRF7 (Kumar *et al.*, 2011).



**Figura 7. Vías de señalización de los TLR.** Los TLR inician una serie de distintas vías de señalización en varios tipos de células tales como macrófagos (MP), células dendríticas convencionales (cDC), plasmáticas (pDC), de lámina propia DC (LPDC) y monocitos inflamatorios (iMO). Los PAMP inducen cambios conformacionales en los TLR lo que los incita a formar interacciones homo-heterofílicas y se reclutan adaptadores moleculares tales como MyD88, TIRAP, TRIF, y TRAM. TLR5, que es altamente expresado en la superficie celular de LPDC, usa MyD88 y activa NF-κB a través de IRAK, TRAF6, TAK1 Y el complejo IKK resultando en la inducción de citocinas inflamatorias. Los heterodímeros de TLR1-TLR2 y TLR2-TLR6 son expresados en la superficie celular e inducen la activación de NF-κB a través del reclutamiento de TIRAP y MyD88 en macrófagos y cDCs. En iMO, TLR2 se ha encontrado que se expresa dentro de endosomas e induce IFN tipo 1 vía IRF3 e IRF7 en respuesta a virus. TLR4, que es expresado en la superficie celular inicialmente transmite señales para la fase temprana de la activación de NF-κB por el reclutamiento de TIRAP y MyD88. TLR4 es entonces transportado dentro de fagosomas positivos a Rab11 que contienen a las bacterias donde es reclutado TRAM y TRIF y se activa el eje TRAF3-TBK1-IRF3 en la fase tardía activando a NF-κB y la subsecuente inducción de IFN tipo 1. TLR3, TLR7 y TLR9 se encuentran localizados principalmente en el Retículo Endoplásmico (ER) y son transportados al compartimento endosomal donde son unidos con sus ligandos. La molécula UNC93B2 que interacciona con estos TLR en el ER se encarga de regular esta migración. La translocación de TLR7 y TLR9 desde el RE hacia los endosomas está regulada por PRAT4A que también ayuda en la translocación de TLR4 y TLR1 a la superficie celular. TLR3 activa por la vía dependiente de TRIF la inducción de IFN tipo 1 y citocinas inflamatorias en macrófagos y cDCs. En pDCs, TLR7 y TLR9 activan NF-κB e IRF7 a través de la vía MyD88 para inducir citocinas inflamatorias e IFN tipo 1 respectivamente. Tomado de Kawai *et al.*, 2011.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Un estudio previo demostró que la interacción de células cebadas con trofozoítos de *Giardia lamblia*, así como un extracto total soluble y una fracción de este extracto (F2), induce la activación de estas células por una vía independiente de anticuerpos. Sin embargo, los receptores de células cebadas involucrados en el reconocimiento de este parásito no han sido dilucidados. Las células cebadas expresan receptores tipo Toll (TLR), los cuales reconocen un amplio grupo de moléculas características y constantes en patógenos. Los TLR juegan un papel primordial en la activación de diferentes células del sistema inmunológico por parásitos protozoarios. Por lo anterior se propone investigar la participación de estos receptores en la activación de células cebadas por moléculas de *G. lamblia*.

La identificación de las moléculas presentes en la fracción 2, en conjunto con la identificación de los receptores que participan en el reconocimiento de este parásito, contribuirán a generar un mejor conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares de la respuesta inmunitaria contra este parásito.

## **3. HIPÓTESIS**

El Extracto Total soluble de trofozoítos de *G. lamblia* y la fracción proteínica 2 (F2) obtenida a partir de este extracto, activará a las células cebadas provocando un cambio en la expresión de los receptores tipo Toll.

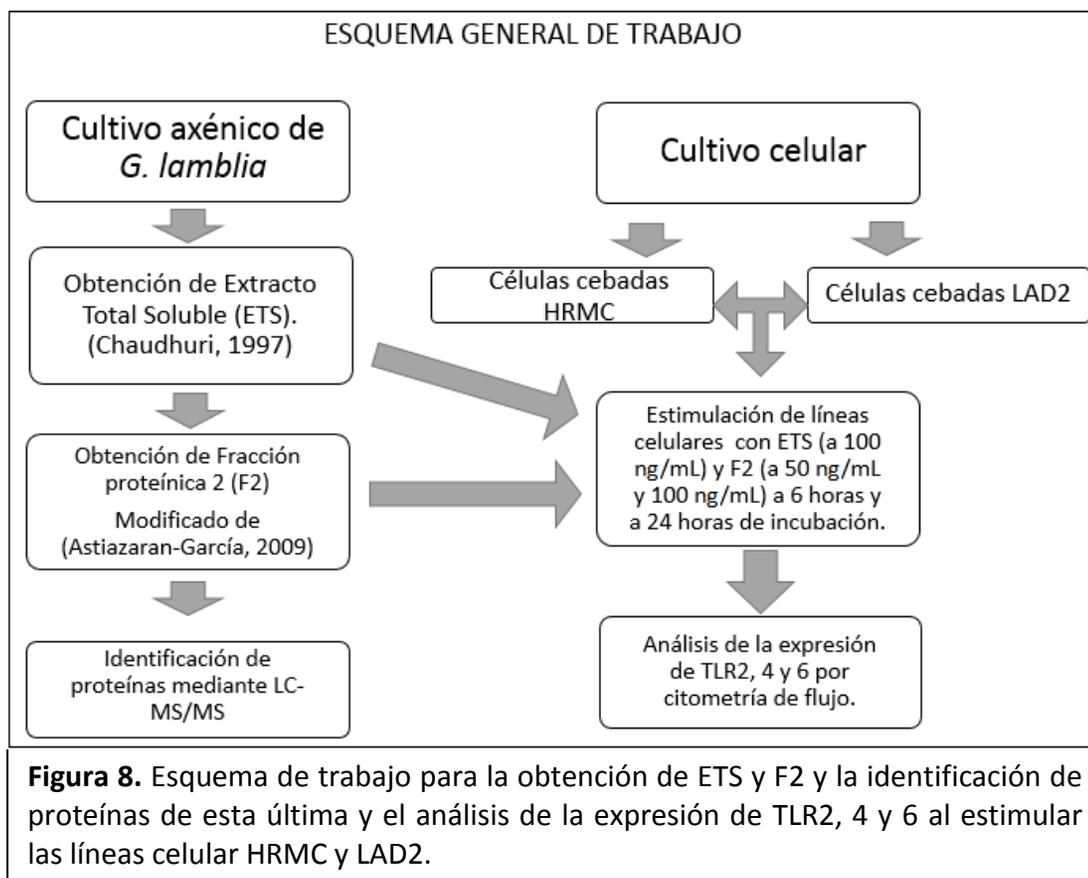
## **4. OBJETIVO GENERAL**

- ✧ Determinar la participación de TLR en la activación de células cebadas por moléculas de *G. lamblia*.

## 5. OBJETIVOS PARTICULARES

- ✧ Realizar un fraccionamiento de las proteínas de *G. lamblia* contenidas en el extracto total soluble para obtener la fracción 2.
- ✧ Identificar por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) las proteínas presentes en la fracción 2.
- ✧ Determinar mediante citometría de flujo la expresión de TLR2, TLR4 y TLR6 en células cebadas HRMC y LAD2 sin estímulo y estimuladas con un Extracto total soluble de *G. lamblia* así como con la fracción 2.

## 6. METODOLOGÍA



### **6.1 Cultivo axénico de *Giardia lamblia*.**

En este trabajo se usaron trofozoítos de *G. lamblia*, de la cepa de referencia WB (ATCC 30957), que se cultivaron axénicamente a 37 °C en medio TYI-S-33 modificado, suplementado con 10% de suero fetal de ternera descomplementado y una mezcla de antibiótico-antimicótico (penicilina/estreptomina 10000U/ g/mL), efectuando subcultivos tres veces por semana.

### **6.2 Obtención de Extracto Total Soluble (ETS) de *Giardia lamblia*.**

La obtención del extracto total soluble se realizó haciendo un lisado de cultivo de trofozoítos en fase logarítmica. Se colocaron los tubos con los trofozoítos de *Giardia lamblia* en un baño de hielo por 40 minutos con el fin de despegarlos de las paredes del tubo. Se obtuvo un paquete celular por centrifugación a 4000 rpm por 20 minutos y se lavó 6 veces con PBS. El paquete celular de trofozoítos fue lisado mediante 7 ciclos de congelamiento (Nitrógeno líquido, 5 min)-descongelamiento (37°C, 5 min), además de 5 ciclos de sonicación de 5 min cada uno, con frecuencia de pulsación de 99 kHz. Se realizó otra centrifugación a 8000 rpm, 20 min a 4°C y el sobrenadante obtenido se congeló a -70°C para su análisis (Astiazaran, 2009). La fracción proteica soluble se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y la concentración de proteínas se determinó de acuerdo al método modificado de Lowry descrito en el Kit Bio-Rad DC ASSAY Reagents Package.

### **6.3 Fraccionamiento del ETS y obtención de la Fracción 2 (F2).**

Para obtener la Fracción 2 el ETS se separó por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE (tamaño del gel: 10cm x 6cm x 1.5mm) en condiciones no desnaturizantes (nativas) y posteriormente se cortaron los geles resultantes en 3 partes iguales. La parte intermedia de los geles fue la que se dividió en pequeños cuadros con ayuda de pinzas y navajas estériles y se maceró en jeringas sin aguja en 6 ocasiones, se colocó en tubos de 1.5 mL para dejar eluir 24 horas en 1 mL de agua desionizada estéril. Después se centrifugaron dichos tubos a 12,000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante obtenido se concentró utilizando tubos centricon 10 y

nuevamente se centrifugaron 1 minuto a impulso para eliminar posibles rastros de acrilamida, se congeló el sobrenadante resultante a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su análisis (Aztiazaran, 2009). Posteriormente se realizó la cuantificación proteínica de la  $F_2$  por el método de Lowry descrito en el Kit Bio-Rad DC ASSAY Reagents Package y se realizó un corrimiento electroforético en SDS-PAGE al 12%.

#### **6.4 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).**

Las bandas de interés fueron cortadas del gel y llevadas para su identificación por LC-MS/MS a la unidad de proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Ahí, las muestras fueron previamente reducidas con ditioneitol (DTT), alquiladas con iodo acetamida y digerida *“in gel”* con tripsina. Los péptidos resultantes fueron aplicados en un sistema LC-MS constituido de un cromatógrafo líquido de micro-flujo Accela (Thermo-Fischer Co. San Jose, CA) y un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fischer Co., San Jose, CA) con sistema de ionización tipo nano-electrospray (ESI). Objective Inc., Woburn, MA). Para la fragmentación de los péptidos se utilizaron los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation) y HCD (High energy Collision Dissociation). Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. Los datos espectrométricos fueron sometidos a la búsqueda contra la base de datos del NCBI a través del programa Matrixscience (Mascot Search Result) y Protein Prospector (Batch-Tag Web).

#### **6.5 Cultivo de células cebadas.**

Se usaron células cebadas de la línea HRMC (Hybrid Rat Mast Cells) que provienen de una línea celular derivada de células cebadas de rata, que presentan fenotipo de mucosa y que han sido ampliamente usadas para estudiar la biología de las células cebadas. Esta línea celular representa el mejor modelo de células cebadas de mucosa, que asemeja al fenotipo de la población presente en el intestino. Éstas células fueron cultivadas en medio RPMI adicionado con 10% de suero fetal bovino (Gibco) y se les suplementó con  $1\ \mu\text{l}$  de antibiótico-antimicótico

100x por cada 10 mL de medio RPMI, fueron incubadas a 37° C y a 5% de CO<sub>2</sub>. Además, se utilizaron células cebadas de humano (LAD2) cultivadas en medio libre de suero (StemPro-34 SFM; Life Technologies) y fueron suplementadas con 2mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina y 100 ng/mL de factor de crecimiento celular (SCF). La suspensión celular fue mantenida a una densidad de 10<sup>5</sup> células/mL a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Las células cebadas se estimularon con el ETS y con la F<sub>2</sub> para posteriormente analizar, mediante citometría de flujo, la expresión de TLR.

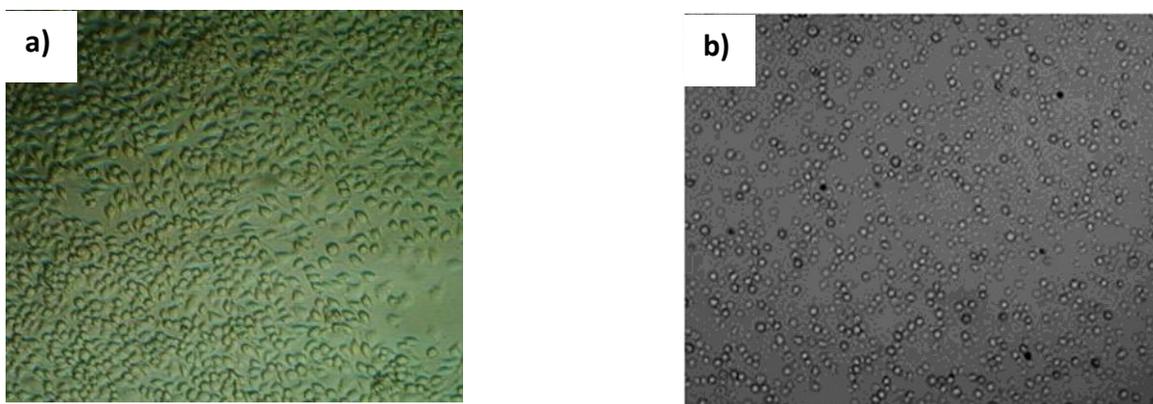
#### **6.6 Estimulación de células cebadas y análisis de la expresión de TLR por citometría de flujo.**

La estimulación de las células de la línea HRMC se llevó a cabo colocando 50,000 células en cada pozo de una placa de 24 pozos. Las células se dividieron en dos grupos (6 y 24 horas de activación) en cada uno de ellos se usaron las siguientes condiciones: Control negativo células sin tratamiento incubadas en medio RPMI. Células tratadas con el extracto total soluble a una concentración de 100 ng/mL y células tratadas con la F<sub>2</sub> a dos concentraciones distintas: 50 ng/mL y 100 ng/mL. Transcurridos los tiempos de incubación, a cada una de estas condiciones se les adicionaron los anticuerpos anti-TLR2 (Mouse Anti-Human mAb-APC Life technologies<sup>®</sup>), anti-TLR4 (mouse, anti-human TLR4, FITC invivogen<sup>®</sup>) y anti-TLR6 (PE anti-human, anti-mouse CD286 Biolegend<sup>®</sup>) a las concentraciones recomendadas según los insertos de los reactivos (estas concentraciones fueron corroboradas a través de la titulación de los anticuerpos con el fin de dilucidar la concentración a la cual éstos muestran una señal de actividad óptima), llevando a cabo una incubación de 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, se lavaron las células con 0.1% de BSA en PBS e inmediatamente se analizaron en el citómetro FACScanto II (Becton, Dickinson). Así mismo se hicieron duplicados de cada una de las condiciones anteriormente mencionadas omitiendo la adición de los anticuerpos anti-TLR, con el fin de utilizar estos sistemas como testigos de autofluorescencia. Para las células LAD2 se siguió el esquema de trabajo anteriormente descrito pero se colocaron en cada pozo 80,000 células para asegurar su supervivencia al momento de analizarlas en el citómetro. Los datos obtenidos fueron analizados con el software Infinicyt<sup>®</sup> Versión 1.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Cultivo de células HRMC y LAD2

Las células cebadas de la línea HRMC presentan en su punto de confluencia (que se alcanza, bajo las condiciones descritas en la metodología, al tercer o cuarto día de incubación) forma de hoz y tienden a formar conglomerados una vez que se alcanza la sobrepoblación en el cultivo, además son adherentes y tienden a formar una monocapa, es necesario la acción de tripsina/EDTA al 0.25% para realizar el pase celular. Por otro lado las células de la línea celular LAD2 son semiadherentes, ovaladas y refringentes y su punto óptimo para la utilización de ellas en los experimentos se realiza mediante una prueba de viabilidad celular adicionando a una alícuota de éstas azul de tripano. La confluencia del cultivo se alcanza a las dos o tres semanas de incubación siendo necesaria la adición de factor de crecimiento celular.

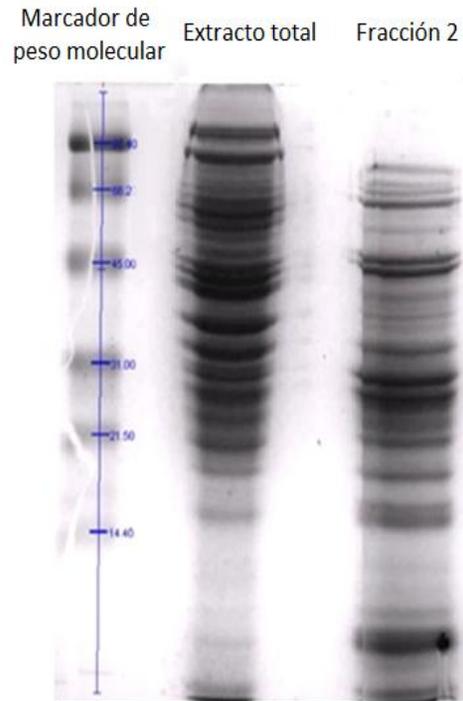


**Figura 9. Líneas celulares empleadas en la estimulación con moléculas de *G. lamblia*.** a) Células de la línea HRMC observadas a 10x. b) Células de la línea LAD2 observadas a 40x.

### 7.2 Patrón proteínico del extracto total soluble y de la fracción 2 de *G. lamblia*

Se obtuvo el ETS y la fracción 2 a través de la metodología descrita en el correspondiente apartado. En el perfil electroforético del ETS usando tinción de azul de Coomassie se observaron más de 25 bandas proteínicas de intensidad variable, con pesos moleculares de entre 10 y 120 kDa. Mientras que en la fracción 2 se observaron aproximadamente 20 bandas, quince de ellas

de mayor intensidad y el rango de pesos moleculares observado con esta tinción fue de 10 a 70 kDa (Figura 10). Se observó la presencia de algunas bandas en común en los dos sistemas, aunque la intensidad de las bandas tuvo variación entre cada uno.



**Figura 10. SDS-PAGE del extracto total soluble de *Giardia lamblia* y de la fracción 2.** Patrones electroforéticos observados en un gel de poliacrilamida al 12%, la imagen fue obtenida con el fotodocumentador de Chemidoc XRS, el marcador de peso molecular utilizado fue Bio-Rad SDS-PAGE lowrange.

### **7.3 Identificación de las moléculas de *G. lamblia* presentes en la fracción F2 del ETS que activa a las células cebadas.**

Se identificaron por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas 16 moléculas de *G. lamblia*, presentes en la fracción 2, que probablemente estén participando en la activación de las células cebadas. Entre estas, se encontraron proteínas del citosol, proteínas de superficie y enzimas (Ver cuadro 3).

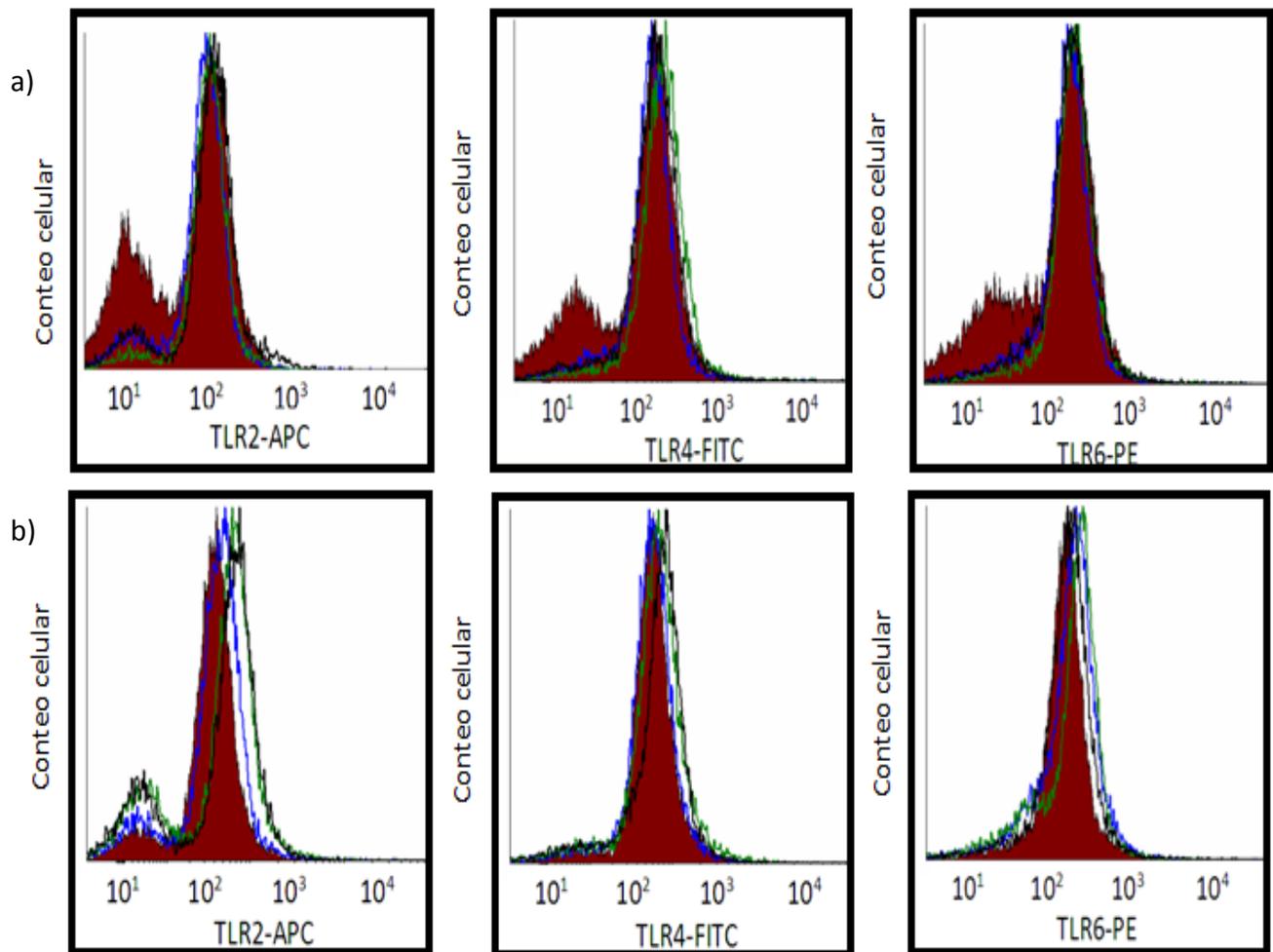
**Cuadro 3. Proteínas identificadas en la fracción proteínica 2 del ETS de *G. lamblia*, a través de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas.**

Proteína identificada (Número NCBI)	Masa molecular (kDa)
Dipeptidil-aminopeptidasa (AAK97082)	87.64
Proteína 21.1 (XP_001709481)	87.61
Proteína hipotética (XP_001707722)	74.59
BIP (XP_001709475)	74.36
Proteína 21.1 (XP_001708927)	66.23
Proteína híbrida lateral (XP_001706319)	62.54
Cinasa NEK (XP_001707030)	57
Xaa-Pro dipeptidasa (XP_001706477)	49.67
Enolasa (AAL73509)	48.22
Alfa-2 giardina (AAA29150)	34.37
Alfa-1 giardina (P17063)	33.9
Proteína 14-3-3 (AAZ91664)	28.67
Peroxirredoxina 1 (XP_001704199)	22.54
Antígeno de trofozoíto de <i>Giardia</i> GTA-1 (AAN73278)	20.73
FixW proteína putativa (XP_001707531)	15
Proteína disulfito isomerasa 5 (PDI5) (XP_001709021)	14.59

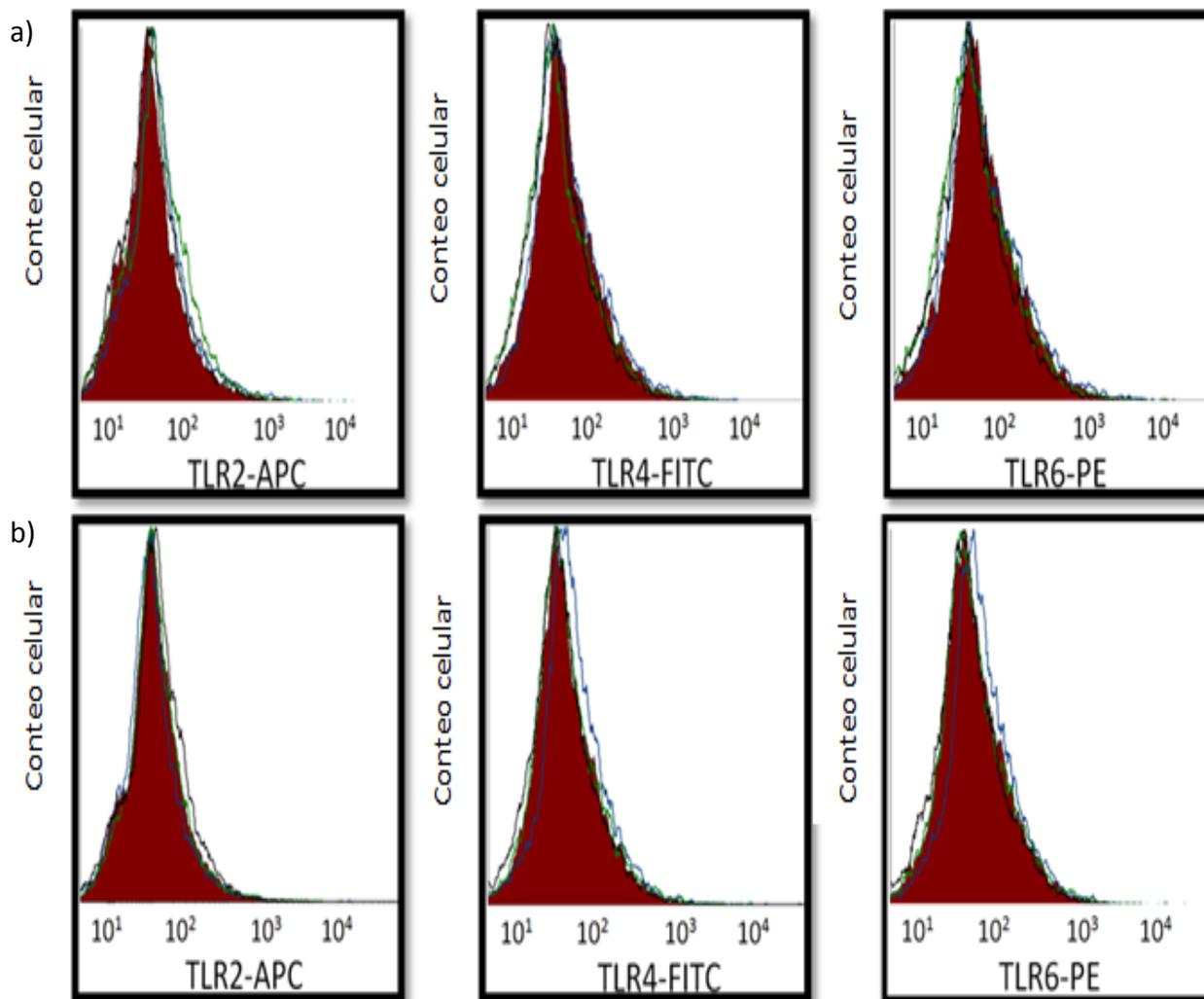
#### **7.4 Expresión de TLR2, TLR4 y TLR6 en células cebadas (HRMC) y en células cebadas de humano (LAD2), sin estímulo y estimuladas con el ETS y la F2 de *G. lamblia*.**

Se realizó el análisis por citometría de flujo de las células estimuladas con el extracto total soluble y la fracción 2 en la línea celular HRMC (proveniente de peritoneo de ratas) y la línea LAD 2 (células cebadas humanas) a 6 horas y 24 horas con el fin de dilucidar la participación de los TLRs 2, 4 y 6 en el probable reconocimiento de moléculas de *Giardia lamblia* por parte de las líneas celulares de células cebadas. En el caso de la línea HRMC (ver figura 11) se observó que a las 6 horas de estímulo no hubo cambio en la expresión de los receptores con respecto a la expresión basal, en cambio a las 24 horas de incubación se observó un aumento aproximadamente del 20% en la intensidad media de fluorescencia (IMF) para la expresión de TLR2 y TLR4 en las células estimuladas con la fracción 2 a 50 ng/mL y a 100 ng/mL, y, en menor medida en las células estimuladas con el extracto total.

Además, se realizaron ensayos con células cebadas de humano (LAD2) con el fin de comparar resultados con respecto a la expresión de TLR observada con las HRMC. De esta forma se obtuvieron los histogramas presentes en la figura 12, donde se observó que tanto a las 6 horas de incubación como a las 24 horas con el ETS y la F2 no hubo cambios en la expresión de ninguno de los tres TLR estudiados.



**Figura 11. Perfiles de expresión de TLR 2, 4 y 6 en la línea celular HRMC.** Histogramas que muestran de manera comparativa la expresión de TLR a las distintas condiciones de estudio. Área roja: Células cebadas sin estimular, línea azul: células cebadas estimuladas con Extracto total a 100 ng/mL; línea verde: células cebadas estimuladas con Fracción 2 a 50 ng/mL; línea negra: células cebadas estimuladas con Fracción 2 a 100 ng/mL. En el inciso a) se muestran los histogramas obtenidos a las 6 horas de estimulación, en el inciso b) se observan los histogramas de las condiciones analizadas a las 24 horas de incubación (histogramas representativos de 3 experimentos independientes).



**Figura 12. Perfiles de expresión de TLR 2, 4 y 6 en la línea celular LAD2.** Histogramas que muestran de manera comparativa la expresión de TLR a las distintas condiciones de estudio (área roja; Células cebadas sin estimular, línea azul; células cebadas estimuladas con Extracto total a 100 ng/mL, línea verde; células cebadas estimuladas con Fracción 2 a 50 ng/mL, línea negra; células cebadas estimuladas con Fracción 2 a 100 ng/mL). En el inciso a) se muestran los histogramas obtenidos a las 6 horas de estimulación, en el inciso b) se observan los histogramas de las condiciones analizadas a las 24 horas de incubación (histogramas representativos de 3 experimentos independientes).

## 8. DISCUSIÓN

Se ha documentado en diversos estudios que las células cebadas participan en el control de infecciones tempranas con *Giardia lamblia* (Li *et al.*, 2004; Muñoz *et al.*, 2010; Buret *et al.*, 2011) a través de la inducción de la liberación de mediadores presentes en éstas tales como histamina y las citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6. Sin embargo, no se han identificado las moléculas del parásito involucradas en la activación de las células cebadas ni el mecanismo de reconocimiento por parte del hospedero de las moléculas del parásito.

Por lo anterior en el presente trabajo de investigación se llevó a cabo la identificación de las proteínas de *G. lamblia* presentes en la fracción (F2) con capacidad de activar a las células cebadas y el análisis de la expresión de receptores tipo Toll (2, 4 y 6) en células cebadas de rata HRMC y de humano LAD2 estimuladas con un extracto total soluble de *G. lamblia* y con la fracción proteica F2, la cual en estudios previos, se ha observado que provoca la liberación de mediadores de células cebadas (Muñoz *et al.*, 2010).

El análisis electroforético del ETS y de la F2 demostró diferencias en la presencia de ciertas bandas lo cual, tomando como referencia los estudios previos realizados con respecto a la actividad de esta fracción, hace pensar que en la fracción 2 se encuentran enriquecidas ciertas moléculas que aumentan su capacidad activadora de las células cebadas. Para discernir la identidad de dichas bandas en la F2 se recurrió a la cromatografía líquida acoplada a masas (realizada en el Instituto de Biotecnología de la UNAM) obteniéndose un perfil de 16 proteínas identificadas con pesos moleculares que van desde los 14 KDa hasta los 87 KDa, de las cuales cabe resaltar a la enolasa, relacionada con el metabolismo del parásito y que es secretada *in vivo* e *in vitro*, cuando el parásito está en contacto con células del hospedador (Ringqvist *et al.*, 2008); a la  $\alpha$ -1 Giardina y  $\alpha$ -2 Giardina, proteínas específicas de *Giardia*; y al antígeno de trofozoíto de *G. lamblia* (GTA-1), ya que todas estas proteínas han sido previamente reportadas con actividad inmunogénica en pacientes durante giardiosis aguda (Palm y Svard., 2003). Interesantemente, la  $\alpha$ -1 Giardina tiene el potencial de unirse a glicosilaminoglicanos (GAG) presentes en las células intestinales, particularmente las del epitelio intestinal, pero también se

sabe que se une a otras células ricas en GAG, como las células cebadas (Weiland *et al.*, 2003). Dado que la  $\alpha$ -1 Giardina se localiza en la superficie de los trofozoítos recién desenquistados y tiene la habilidad de unirse al epitelio intestinal, donde la acumulación de células cebadas es común durante la giardiosis y dado que previamente se ha reportado que esta proteína se une a los GAG presentes en las células cebadas (Weiland *et al.*, 2003), es muy probable que esta proteína sea una de las moléculas que actúa como activadora de las células cebadas durante la infección con *Giardia sp.*

Del resto de las proteínas identificadas en la F2, seis son proteínas de función desconocida y que no han sido caracterizadas, como la proteína hipotética, las proteínas 21.1, la proteína híbrida lateral, FixW y el antígeno GTA1. Cuatro fueron enzimas, como la Xaa-Pro dipeptidasa, la PDI5 (Proteína bisulfito isomerasa 5), la cinasa NEK y la peroxirredoxina, involucradas en la hidrólisis de péptidos, el transporte de proteínas y en resistencia a estrés oxidativo, respectivamente (Mc Arthur *et al.*, 2001; Vicente *et al.*, 2009). También se identificaron proteínas con funciones importantes en el ciclo celular y en el proceso de diferenciación del parásito, como son la proteína BIP, proteína 14-3-3 y la Dipeptidil-aminopeptidasa (Lujan *et al.*, 1996; Lalle *et al.*, 2009; Touz *et al.*, 2002).

Por otro lado, se realizó un análisis por citometría de flujo con el fin de dilucidar la participación de los receptores tipo Toll 2, 4 y 6 en el reconocimiento de las moléculas presentes en la fracción 2 y en el extracto total soluble por parte de células cebadas de peritoneo de rata (HRMC) y una línea celular de células cebadas de humano (LAD2); se ha determinado la participación significativa de las células cebadas en el reconocimiento de moléculas de patógenos a través de TLR dando lugar a la liberación de mediadores químicos importantes en la respuesta inflamatoria del hospedero lo que conlleva a un mejor control de la enfermedad en cuestión (Gri *et al.*, 2012), tomando como base este hecho se analizó la expresión de los receptores TLR2, 4 y 6 bajo las condiciones planteadas en la metodología, de esta forma se obtuvo un ligero aumento en la expresión de TLR2 a las 24 horas y en menor medida TLR4 y TLR6 a este mismo tiempo de estimulación con la F2 en células HRMC, sin embargo en las células cebadas humanas LAD2 no se observó cambio en la expresión para ninguno de los TLR,

esto puede ser explicado a través del hecho de que estos TLR, al igual que otros más, presentan diferencias en humanos y roedores en la expresión, transcripción, concentración tisular y regulación (Rheli, 2002), lo anterior sugiere que éstos TLR no están involucrados en el reconocimiento de las moléculas de *G. lamblia* o que además de estos receptores otros más de la inmunidad innata pudieran estar actuando de manera sinérgica en el reconocimiento de las moléculas de *G. lamblia*, como ocurre en el reconocimiento de moléculas de otros microorganismos (Kawai *et al.*, 2011).

## 9. CONCLUSIONES

- Fue posible identificar las moléculas de *G. lamblia* presentes en la Fracción 2 mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas, se observó la presencia de moléculas importantes en el metabolismo de *G. lamblia* (tales como la enolasa) y otras más reportadas previamente como inmunogénicas ( $\alpha$ -1 Giardina,  $\alpha$ -2 Giardina y GAT-1 (antígeno de trofozoíto de *G. lamblia*)).
- La fracción proteica 2 de *G. lamblia* indujo un ligero incremento en la expresión de los TLR en células HRMC, mientras que en células LAD2 no se observó ningún cambio en la expresión de estos receptores. Por lo tanto es probable que el reconocimiento de las moléculas presentes en la F2 de *G. lamblia* ocurra a través de otros receptores de células cebadas.

## 10. SUGERENCIAS Y PERSPECTIVAS

Analizar la actividad específica de las proteínas presentes en la F2 con potencial para activar a las células cebadas, para definir cuál o cuáles son las responsables de la inducción de una respuesta protectora.

## 11. REFERENCIAS

1. Adam R., Biology of *Giardia lamblia*. Clin. Microbiol. Rev. 2001; 14: 447-475.
2. Akira, S., Takeda, K., Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat. Immunol. 2001; 2:675-680.
3. Ankarklev J., Jerlstrom-Hultqvist J., Ringqvist E.t, Troell K. and Svärd G., Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. Nature Microbiology Rev. 2010; 8: 413-422.
4. Bayraktar M. Refik, Mehmet Nihayet, Durmaz Rıza. Role of IL-2, IL-4 and IL-10 in Patients Infected with *Giardia lamblia*. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 2005; 29 (2): 160-162.
5. Bienz, M.& Dai, W.J.& Welle, M.& Gottstein, B.& Müller, N., "Interleukin-6-deficient mice are highly susceptible to *Giardia lamblia* infection but exhibit normal intestinal immunoglobulin A responses against the parasite", Infection and Immunity, vol. 71, 2003, p. 1569-1573.
6. Botero D, Restrepo M. Parasitosis Humanas. 4ta. Ed. Colombia. Corporación para investigaciones biológicas, 2003.
7. Buret, A. Cotton J, Beatty J, Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. International Journal for Parasitology. 2011; 41: 925–933.
8. Caron, G., Delneste, Y., Roelandts, E., Duez, C., Bonnefoy, J. Y., Pestel, J., Jeannin, P. Histamine polarizes human dendritic cells into Th2 cell promoting effector dendritic cells. *J. Immunol.* 2001; 167: 3682–3686.
9. Cedillo R., Yépez L., Gómez-Delgado A., Ortega-Pierres G., Tapia R., Muñoz O. Seroepidemiology of Giardiasis in Mexico *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 80(1), 2009, pp. 6–10.
10. Chen, C. C., Grimbaldston, M. A., Tsai, M., Weissman, I.L., and Galli, S.J. Identification of mast cell progenitors in adult mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2005; 102: 11408–11413.
11. Ebert E.C. *Giardia* induces proliferation and interferon gamma production by intestinal lymphocytes. *Gut* 1999; 44: 342-346.
12. Eckmann L. Mucosal defences against *Giardia*. Parasite Immunol. 2003; 25 (5): 259-70.
13. El-Shazly AM, El-Bendary M, Saker T, Rifaat MM, Saleh WA, El Nemr HI. Cellular immune response in giardiasis. J Egypt Soc. Parasitol. 2003; Dec; 33(3):887-904.

14. Fagarasan, S. y Honjo, T. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Natural Immunology*. 2003; 3: 63-72.
15. Faubert G. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13(1): 35-54.
16. Fraser D, Bilenco N, Deckelbaum RJ, Dagan R, EL-On J, Naggan L. *Giardia lamblia* carriage in Israeli bedouin infants: risk factors and consequences. *ClinInfect Dis* 2000; 30:419-24.
17. Galli, S.J., Grimaldeston, M., and Tsai, M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat. Rev. Immunol.*2008; 8:478–486.
18. Goldsmith RS. Enfermedades infecciosas: protozoos y helmintos. En: Tierney LM, MacPhee SJ, Papadakis MA, editores. Diagnóstico clínico y tratamiento. 35ª ed. México: El Manual Moderno; 2000. 1367-1432.
19. Gómez G. Argelia. Análisis de la respuesta de células cebadas a la estimulación con *Giardia lamblia* (Tesis de Maestría) México D.F.: Instituto Nacional de Ciencias Biológicas- Unidad de Investigación de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, IMSS; 2011.
20. Gómez M, Orihuela de la Cal JL, Orihuela de la Cal ME. Parasitismo intestinal en círculos infantiles. *Rev Cubana Med Gen Integr* 1999; 15:266-9.
21. Gri, G., Frossi, B., D’Inca, F., Danelli, Luca., Betto, E., Mion, F., Sibilano R.,and Pucillo C., Mast cell: an emerging partner in immune interaction. *Frontiers in immunology*. 2012; 3:1-11.
22. Henz B.M., Maurer M., Lippert U., Worm M., Babina M.: Mast cells as initiators of immunity and host defense. *Exp. Dermatol.*, 2001; 10: 1–10.
23. Heyworth MF,. Immunology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *J Infect Dis*,1992; 166(3): 465-472.
24. Irani, A.M., and Schwartz, L.B. Human mast cell heterogeneity. *Allergy Proc.*1994; 15: 303–308.
25. Janeway Jr. CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 2002; 20:197 -216.
26. Kawai T. and Akira S. Toll-like Receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 2011; 34: 637-650.

27. Kubo Y., Fukuishi N., Yoshioka M., Kawasoe Y., Iriguchi S., Imajo N., Yasui Y., Matsui N., Akagi M.: Bacterial components regulate the expression of Toll-like receptor 4 on human mast cells. *Inflamm. Res.*, 2007; 56: 70–75.
28. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J* 2009; 420:1–16.
29. Kumar, H., Kawai, T., Akira, S., Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*, 2011; 30:16–34.
30. Lalle M, Bavassano C, Fratini F, Cecchetti S, Boisguerin P, Crescenzi M, et al. Involvement of 14-3-3 protein post-translational modifications in *Giardia duodenalis* encystation. *Int J Parasitol* 2010 Feb; 40(2):201-13.
31. Lauwaet, T., Davids, B. J., Reiner, D. S. & Gillin, F. D. Encystation of *Giardia lamblia*: a model for other parasites. *Curr. Opin. Microbiol.* 2007; 10, 554–559.
32. Li E., Zhou P., Petrin Z., and Singer M., Mast Cell-Dependent Control of *Giardia lamblia* Infections in Mice. *Infection and immunity*. 2004; 72: 6642-6649.
33. Li G., Domenico J., Jia Y., Lucas J.J., Gelfand E.W.: NF- $\kappa$ B-dependent induction of cathelicidin-related antimicrobial peptide in murine mast cells by lipopolysaccharide. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2009; 150: 122–132.
34. Lujan HD, Mowatt MR, Conrad JT, Nash TE. Increased expression of the molecular chaperone BiP/GRP78 during the differentiation of a primitive eukaryote. *Biol Cell* 1996;86(1):11-8.
35. Mancuso G, Gambuzza M, Midiri A, et al. Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nat. Immunol.* 2009; 10:587–594.
36. Matsushima H., Yamada N., Matsue H., Shimada S.: TLR3-, TLR7-, and TLR9-mediated production of proinflammatory cytokines and chemokines from murine connective tissue type skin-derived mast cells but not from bone marrow-derived mast cells. *J. Immunol.*, 2004; 173: 531–541.
37. McArthur AG, Knodler LA, Silberman JD, Davids BJ, Gillin FD, Sogin ML. The evolutionary origins of eukaryotic protein disulfide isomerase domains: new evidence from the Amitochondriate protist *Giardia lamblia*. *Mol Biol Evol* 2001 Aug;18(8):1455-63.

38. Metcalfe .D, Baram D., and Mekori Y. Mast cell. *Physiological*. 1997; *Reviews* 77: 1033–1079.
39. Moon, T.C., St Laurent, C. D., Morris, K. E., Marcet, C., Yoshimura, T., Sekar, Y., and Befus, A.D. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Mucosal Immunol*. 2010; 3: 111–128.
40. Moreno, A. Sánchez-Ibarrola. Receptores tipo Toll: bases moleculares de la relación entre respuestas innatas y adaptativas del sistema inmunitario. *Navarra*. 2003; 47:29-33.
41. Muñoz S., Gómez, A., Millán, J. Giono, S., Yépez L., *Giardia lamblia*: Interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha release from mast cells induced through an Ig-independent pathway. *Experimental Parasitology* 2010; 126: 298–303.
42. Newman RD, Moore SR, Lima AM, Nataro JP, Guerrant RL, Sears CL. A longitudinal study of *Giardia lamblia* infection in north-east Brazilian children. *Trop Med Int Health* 2001; 6(8): 624-34.
43. Palm JE, Weiland ME, Griffiths WJ, Ljungström I, Svärd SG. Identification of immunoreactive proteins during acute human giardiasis. *J. Infect. Dis.* 2003; Jun 15; 187(12):1849-59.
44. Rheli M. Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. *Trends Immunol* 2002; 23:375-378.
45. Roxström-Lindquist K, Palm D, Reiner D, Ringqvist E, Svärd SG. *Giardia* immunity-an update. *Trends Parasitol.*, 2006; 22: 26-31.
46. Sandig, H. and Bulfone-Paus, S. TLR signaling in mast cells: common and unique features. *Frontiers in immunology*. 2012; 3: 1-13.
47. Scott K.G. Role of CD8+ and CD4+ lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. *Infection and Immunity* 2004; 72: 3536-3542.
48. Shewy, K.A. and Eid, R.A. In vivo killing of *Giardia* trophozoites harbouring bacterial endosymbionts by intestinal Paneth cells: an ultrastructural study. *Parasitology*. 2005; 130: 269–274.
49. Singer M. and Nash TE. The Role of Normal Flora in *Giardia lamblia* Infections in Mice. *Journal of Infectious Diseases* 2000; 181.

50. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 2010. Boletín Epidemiología. Secretaria de Salud. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/infoepi/index.htm>
51. Smrz, D., Iwaki, S., Mcvicar, D.W., Metcalfe, D.D., and Gilfillan, A.M. TLR mediated signaling pathways circumvent the requirement for DAP12 in mast cells for the induction of inflammatory mediator release. *Eur. J. Immunol.* 2010; 40: 3557–3569.
52. Thompson RCA. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and it's zoonotic potential. *Int J Parasitol* 2000; 30:1259-67.
53. Thompson SC. *Giardia lamblia* in children and child care setting; a review of the literature. *J PaediatrChil Health* 1994; 30:202-209.
54. Touz MC, Nores MJ, Slavin I, Piacenza L, Acosta D, Carmona C, et al. Membrane-associated dipeptidyl peptidase IV is involved in encystation-specific gene expression during *Giardia* differentiation. *Biochem J* 2002 Jun 15; 364(Pt 3):703-10.
55. Vázquez Tsuji, Oscar; Campos Rivera, Teresita. Giardiasis. La parasitosis más frecuente a nivel mundial. *Revista del Centro de Investigación. Universidad La Salle*, Vol. 8, Núm. 31, enero-junio, 2009, pp. 75-90.
56. Venkatesan, P. et al. A comparison of mucosal inflammatory responses to *Giardia muris* in resistant B10 and susceptible BALB/c mice. *Parasite Immunol.* 1997; 19: 137–143.
57. Vicente JB, Testa F, Mastronicola D, Forte E, Sarti P, Teixeira M, et al. Redox properties of the oxygen-detoxifying flavodiiron protein from the human parasite *Giardia intestinalis*. *Arch Biochem Biophys* 2009 Aug 1; 488(1):9-13.
58. Von Allmen, N. Experimental infections of neonatal mice with cyst of *Giardia lamblia* clone GS/M-83-H7 are associated with an antigenic reset of the parasite. *Infection and Immunity* 2004; 72: 4705-4771.
59. Weiland ME, Palm JE, Griffiths WJ, McCaffery JM, Svard SG. Characterisation of alpha-1 giardin: an immunodominant *Giardia lamblia* annexin with glycosaminoglycan-binding activity. *Int J Parasitol* 2003 Oct;33(12):1341-51
60. West A.P., Koblansky A., Ghosh S. Recognition and signaling by Toll-Like receptors. *Ann. Biol.* 2006; 22:409-437.
61. Zhang G., Ghosh S. Toll-like receptor– activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest.* 2001; 107(1):13–19.

62. Zhou, E. Li, T. Shea-Donohue & S. M. Singer (2007) Tumour necrosis factor  $\alpha$  contributes to protection against *Giardia lamblia* infection in mice. *Parasite Immunology*, 2007; 29: 367–374.