

### III.- Respuesta Inmune contra *G. lamblia*

La respuesta inmune contra *Giardia*, depende de diversos factores, y dentro de los más importantes se encuentra el estado inmunológico del hospedero. Debido a esto 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.

#### **Inmunidad Innata contra *G. lamblia***

Los primeros mecanismos involucrados en la respuesta inmune contra *Giardia*, pertenecen a elementos de la inmunidad innata. Debido a las características biológicas de *Giardia*, es muy probable que participen factores no inmunes en la susceptibilidad a la infección o en la duración y severidad de la misma. Por ejemplo, la leche materna humana posee actividades anti-giardíacas al eliminar a los trofozoítos independientemente de la presencia de anticuerpos secretorios específicos (IgA) (Gillin *et. al* 1983). Dicha actividad es atribuída a la presencia de sales biliares conjugadas, ácidos grasos insaturados y ácidos grasos libres (Faubert, 2001).

Aley (1994), reportó la actividad anti-giardíaca de péptidos catiónicos (defensinas) producidos por neutrófilos, que tienen la capacidad de destruir a los trofozoítos de *Giardia*, cuando son adicionadas a los medios de cultivo, con esto se demuestra la importancia de mecanismos inmunológicos no específicos en el control de la infección.

Existen mecanismos efectores a nivel de mucosas como lo son productos antimicrobianos, sintetizados por células epiteliales, como lo es el Óxido Nítrico (NO) que presenta una actividad amplia contra bacterias y parásitos patógenos (Fang, 1997, Brunet, 2001). Dichas actividades están

relacionadas con la neurotransmisión y regulación de la integridad de la barrera mucosal en el intestino (Wallace *et al*, 2000), evitando el desarrollo de los trofozoítos e inhibiendo la enquistación y desenquistación del parásito, son eliminarlos (Eckmann *et al*, 2000). Uno de los mecanismos de evasión de esta respuesta es la producción de inhibidores de dicha actividad contra *Giardia*.

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. Éstas moléculas, han sido relacionadas con procesos inflamatorios y de diferenciación de linfocitos B, como lo es la interleucina 6 (IL-6), que es un homodímero cuyo tamaño es de 19-26 kDa y es considerada como una proteína multifuncional que se produce por un gran número de células, incluyendo linfocitos T y macrófagos. En ratones deficientes de IL-6 infectados con trofozoítos de *G. lamblia* no fue posible el control de la fase aguda de la infección (Akira *et al*, 1995). De igual manera se han evaluado las interleucinas IL-2, IL-4 e IL-10 (glicoproteína de 14-17kDa, 18 kDa y 34-40 kDa, respectivamente) en pacientes con giardiasis, 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 T<sub>H</sub>2 es una vía predominante en el aclaramiento de la infección, ya que la IL-2 es un factor de crecimiento para linfocitos T estimulados por el antígeno, así como la expansión clonal de los mismos y la IL-4 estimula la aparición de linfocitos T<sub>H</sub>2 (Bayraktar *et al*, 2005).

Se ha estudiado la capacidad inflamatoria de *Giardia* en el hospedero y la relación que se presenta con algunas proteínas indicadoras de procesos inflamatorios como lo es el factor de necrosis tisular (TNF). Esta proteína es un homotrímero de 51 kDa producido principalmente por linfocitos T y macrófagos. La síntesis del TNF se desencadena fuertemente por la presencia de moléculas

de bacterias gram-negativas y de otros microorganismos infecciosos. En el caso de la giardiasis, se ha encontrado que TNF juega un rol importante en el control de la enfermedad. Ratones tratados con anticuerpos neutralizantes de TNF o deficientes de TNF, fueron infectados con trofozoítos de *Giardia*, y se observó en el intestino delgado de estos ratones un gran número de parásitos, indicando que TNF es importante para el control de la infección (Zhou, *et al.* 2007).

Dentro de las diferentes estirpes celulares en la respuesta inmune innata, se ha encontrado que los mastocitos juegan un papel importante en el control de la infección en modelos murinos, donde se observan cúmulos de células de mastocitos en el intestino delgado durante el aclaramiento de la infección (Erqiu Li *et al.*, 2004, Hardin, *et al.*, 1997).

El efecto anti-giardia de sueros provenientes de individuos infectados, aparenta ser también dependiente de la presencia de la vía clásica del complemento. Ésto se demostró al observar que el suero de un paciente con giardiasis puede eliminar más del 98% de trofozoítos en ensayos *in vitro*. Este efecto fué eliminado al calentar el suero a 56°C por 30 minutos, condiciones conocidas que inactivan el sistema de complemento (Hill, *et al.*, 1984).

Otros mecanismos innatos que contribuyen al aclaramiento de la infección es el movimiento peristáltico del intestino (Falk PG, 1998 y Cebra JJ, 1999). Existen muchas especies patógenas que compiten por espacios libres en la mucosa del intestino y que gracias a los comensales, su patogénia no puede llevarse a cabo. La flora normal puede inhibir la infección por *G. lamblia* a través diferentes mecanismos que incluyen la competencia por recursos alimenticios, toxicidad e inducción de respuestas inmunes cruzadas. Dichos efectos son observados en ratones deficientes de RAG, los cuales carecen de respuestas inmunes adaptativas (Nash y Singer, 2000)

## **Respuesta Inmune Humoral contra *G. lamblia***

En contraparte, existen mecanismos inmunológicos capaces de aclarar la infección como lo es la respuesta inmune humoral (mediada por anticuerpos). *G. lamblia* se duplica y se adhiere 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 and 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 (primariamente). Esta característica ha sido el motivo por el cual la mayoría de los estudios de la respuesta inmune contra *Giardia* se han avocado en la respuesta inmune humoral.

Diversos reportes de investigación describen a los linfocitos B como células infalibles para la erradicación de la giardiasis (Singer, 2000), 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. En pacientes hipogammaglobulinémicos, la importancia de la respuesta inmune humoral es crítica, debido a que por la ausencia de inmunoglobulinas, desarrollan cuadros clínicos prolongados de giardiasis, e incluso una giardiasis crónica. (Faubert, 2000; Palm y col, 2003).

En estudios *in vitro* se ha demostrado la actividad anti-giardia de anticuerpos contra trofozoítos, utilizando sueros de pacientes con giardiasis, que en su mayoría contenían IgA, y que es responsable de la actividad (Faubert, 2000). Por otra parte ciertos anticuerpos específicos anti-*giardia* como IgM e IgG, presentan actividades tóxicas para el trofozoíto a través de mecanismos dependiente o independientes del sistema del complemento (Nash, 1986). En ratones carentes de linfocitos B, así como animales

deficientes de IgM, IgG e IgA, se ha reportado el desarrollo de giardiasis crónica (Adam, 1991; Faubert 2000).

### **Respuesta Inmune Celular contra *G. lamblia***

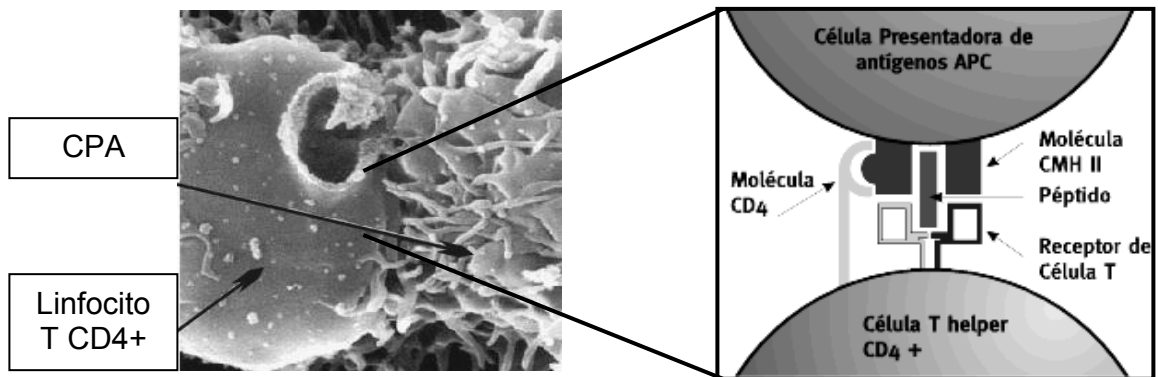
En la actualidad, son muy pocos los estudios enfocados en la respuesta inmune celular durante la giardiasis. El papel desempeñado por las células B y T durante la giardiasis ha sido bien documentado, pero la identificación y caracterización de antígenos de *Giardia* que estimulan una respuesta inmune celular son muy limitados o nulos. Se ha reportado 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 INF- $\gamma$  (Ebert, 2000). En infecciones experimentales con *Giardia ssp.* en ratones, se ha ilustrado la importancia de INF- $\gamma$  en la eliminación de la infección, así como se demostró que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> producen esta citocina después de la estimulación con *Giardia* (Ebert, 1999).

En estudios con ratones deficientes de ciertas poblaciones celulares, han demostrado que los linfocitos T CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  son requeridos para la eliminación de la infección (Singer y Nash, 2000), mientras que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y linfocitos NK (Natural Killer) no juegan un papel importante (Heyworth *et al*). En ratones atímicos infectados (carentes de linfocitos T) se han detectado disminución en daños a nivel de microvellosidades y en la reducción de la actividad de ciertas enzimas (disacaridasas). La reconstitución del timo con células T de un ratón infectado con *Giardia* disminuyó la carga parasítica en intestino, pero aumentó la atrofia de las microvellosidades intestinales (Thomson y Mitchell, 1988). El flujo creciente de linfocitos intraepiteliales durante la infección por *Giardia* (Von Allmen, *et al*, 2004) en ratones es regulado por células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (Scott, *et al* 2004).

En contraparte se ha estudiado que las atrofas en el intestino del hospedero son desarrolladas por la acción de los Linfocitos T CD8<sup>+</sup> (citotóxicos) (Scout *et al*, 2004). En individuos con giardiasis sintomática se observaron grandes infiltrados linfocíticos (CD8<sup>+</sup>), especialmente en aquellos que presentaban diarrea y flatulencia. Los autores sugieren que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> están relacionados con las patologías desarrolladas durante la infección (El-Shazly, 2003).

## **Reconocimiento Antigénico por parte de Linfocitos T**

Los mecanismos de defensa del organismo se activan al ingresar al hospedero microorganismos extraños. En la respuesta inmunológica celular los linfocitos B y T están profundamente involucrados. Las células B se activan al tener un contacto directo con el microorganismo y desencadena una respuesta inmunológica humoral, mientras que las células T no tienen contacto directo, sino que necesitan el apoyo de células especializadas en el procesamiento y presentación de antígeno, llamadas células presentadoras de antígeno profesionales (CPA). Las CPA reconocen moléculas antigénicas (péptidos) del microorganismo e inician el procesamiento las mismas hasta exponerlas en su superficie con la ayuda de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (clase I ó II), para el posterior reconocimiento por parte de los linfocitos T a través de su receptor de células T (RCT). Este reconocimiento de péptidos, es un evento esencial que da inicio a una respuesta inmune celular. Los linfocitos T  $CD8^+$  reconocen antígenos en una forma relativamente corta (8-11 aminoácidos), en fragmentos de proteínas (péptidos) unidos al complejo principal de histocompatibilidad I (MHC clase I), mientras que los linfocitos T  $CD4^+$  reconocen antígenos de mayores longitudes unidos al MHC clase II (12-25 aminoácidos) (Fig. 4). Gracias a la cristalografía de rayos X se conocen las estructuras de las moléculas del MHC (clase I y II), así como la forma en que éstos interaccionan con los péptidos presentados (Fremont, and Unanue, 1998).



**Figura 4.- Interacción célula presentadora de antígeno y linfocito T CD4<sup>+</sup>.** Las células presentadoras de antígeno profesionales, presentan pequeñas fracciones de proteínas con la ayuda de moléculas del complejo de histocompatibilidad clase II, a receptores de células T de linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

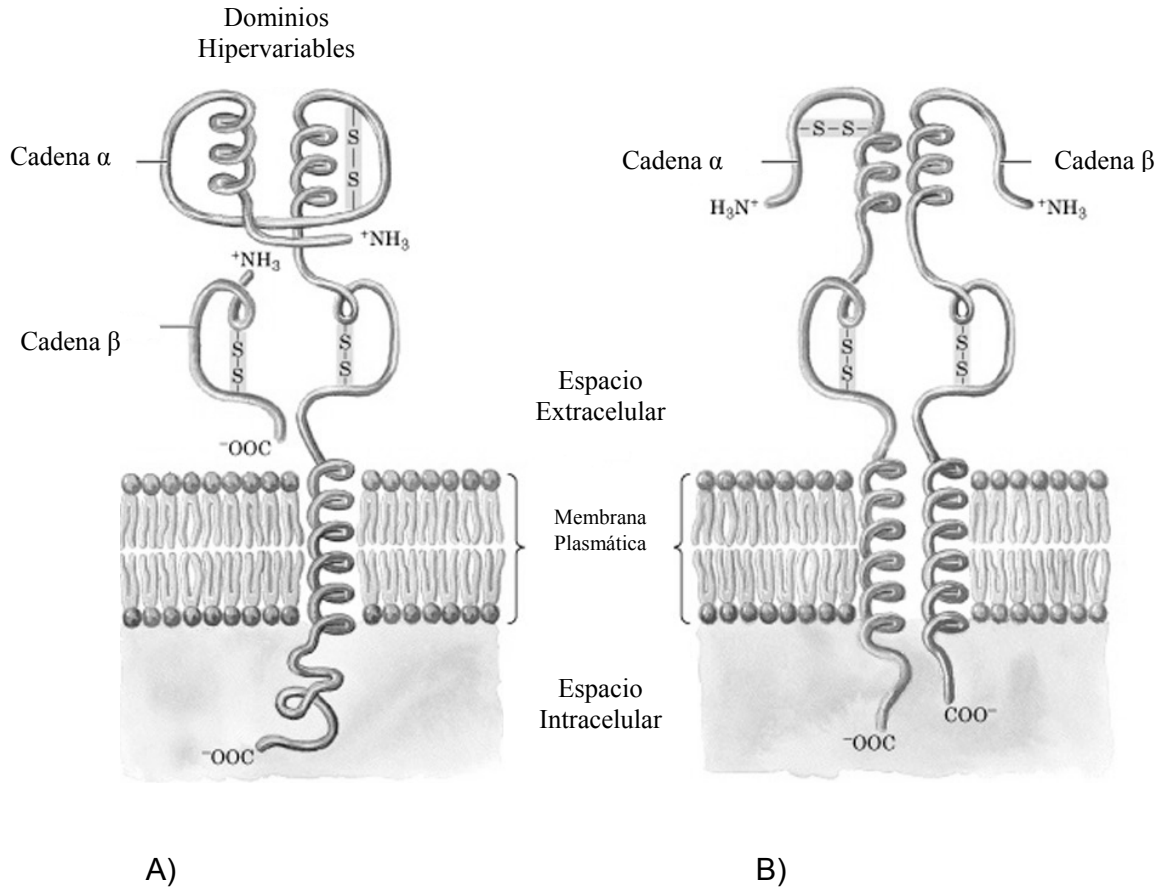
Las moléculas del MHC clase I son expresadas ubicuamente en las estirpes celulares nucleadas. En contraste, las MHC clase II son expresadas en CPA como Linfocitos B, células dendríticas (CD) y macrófagos, y en menor proporción en otros tipos celulares como: fibroblastos, células endoteliales de intestino, mastocitos, etc. (van Bergen J, 1999).

Las moléculas del MHC clase I y II son proteínas de membrana integrales de tipo I. Presentan tres regiones, una citoplasmática (cola carboxílica), otra transmembranal (25 aminoácidos hidrófobos transmembranosos) y por último la región extracelular, en la cual se localiza una hendidura de unión a péptidos y presenta residuos polimorfos, que son aminoácidos que varían entre los diferentes alelos del MHC.

Las moléculas del complejo MHC clase I (Fig. 5A) son glicoproteínas de membrana que presentan una cadena  $\alpha$  pesada (44 kDa) de tres subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ . A dicha cadena se le asocia un segundo polipéptido denominado  $\beta$ -2 microglobulina (de peso molecular de 12 kDa) el cual es codificado por un



cromosoma distinto al de las moléculas del MHC. Este dímero se estabiliza al asociarse un péptido antigénico y son reconocidas por su RCT (Receptor de Células T) por los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Las moléculas del MHC clase II (Fig. 5B) son también glicoproteínas de membrana de tipo I, que consisten de dos cadenas, la cadenas  $\alpha$  (de 32-34 kDa) y la  $\beta$  (de 28-29 kDa), unidas entre si covalentemente por puentes disulfuro, son reconocidas por los RCT de los linfocitos CD4<sup>+</sup>. Los segmentos aminotermiales  $\alpha$ 1 y  $\beta$ 1 (así como los segmentos  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 del MHC I) de las cadenas interactúan para formar la hendidura de unión a péptidos, ya que es el área donde se localizan residuos polimórficos, tanto en su interior como en su alrededor. Los segmentos  $\alpha$ 2 y  $\beta$ 2, están plegados en dominios de inmunoglobulina y no son polimórficos.



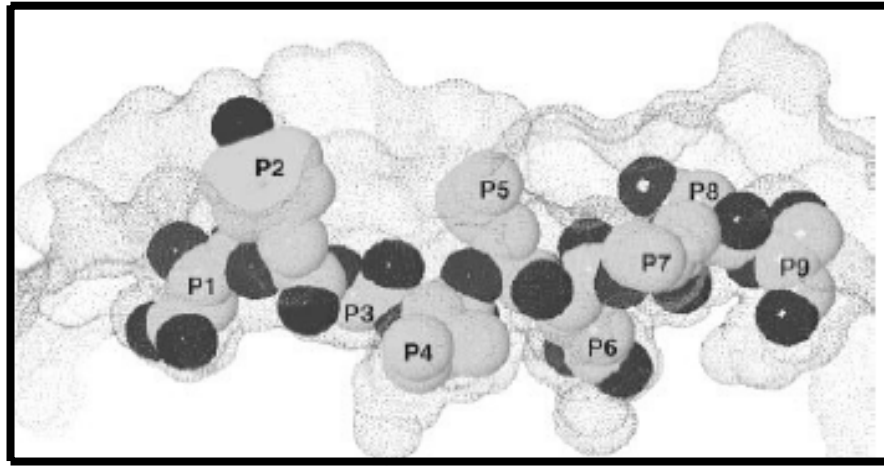
**Figura 5.- Representación Esquemática del Complejo Principal de Histocompatibilidad.** A) MHC clase I, B) MHC clase II. Las moléculas del MHC son glicoproteínas de membrana que presentan tres regiones, la extracelular donde se encuentra el sitio de unión a péptidos, la transmembranal y la intracelular. Las principales diferencias entre las moléculas de clase I y II radican en su estructura y presentación de péptidos.

En estudios cristalográficos y de interacción MHC-péptido se ha demostrado similitud en las conformaciones de la unión peptídica a las moléculas de MHC clase I y II. Las moléculas de clase I interactúan con las terminales amino y carboxílicas del péptido unido. Estas terminaciones, junto con el péptido unido a la molécula de MHC, restringen la longitud de los péptidos de 8 a 10 aminoácidos. Sin embargo, el sitio de unión a péptidos de las moléculas de clase II es abierto en las dos terminaciones y las interacciones de los péptidos son más difusas debido a que es permitido que exista mayor variabilidad en la longitud (de 10-28 aminoácidos). Las moléculas de MHC han sido caracterizadas en términos a su funcionalidad en mecanismos inmunológicos, debido a que se unen a fragmentos de antígenos. Esta interacción activa a células T específicas a antígenos para generar una respuesta inmunológica en contra del antígeno patrón, de tal forma que un pequeño fragmento de antígeno induce una respuesta inmunológica en contra de un antígeno completo. Esta idea es implementada en el desarrollo de vacunas en base a los péptidos antigénicos que responsables de generar una respuesta inmunológica.

La afinidad con la cual se une el MHC clase II con los péptidos depende de las interacciones entre los residuos de las cadenas laterales de los aminoácidos con ciertos sitios específicos del surco de unión a péptidos de la molécula del MHC. Las interacciones químicas gobernadas en estas uniones son de tipo reversible debido a la naturaleza del comportamiento de asociación y disociación del complejo RCT-pMHC, y los principales tipos de unión son: puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals y en menor proporción los puentes salinos (García, KC, *et al* 1998). Gracias al estudio cristalográfico se ha determinado la estructura química del MHC y se ha encontrado un sitio de gran polimorfismo el cual interacciona con los péptidos que le son presentados a las células T, este surco de unión a péptidos está conformado por cinco

bolsillos o pockets esenciales para la asociación de los péptidos (P1, P3, P4, P6, P7 y P9), los cuales preferencialmente aceptan residuos con características particulares como lo son el tamaño apropiado, hidrofobicidad y cargas eléctricas. Esto trae como resultado la unión de la molécula de MHC y del péptido con la combinación satisfactoria de la preferencia de cada bolsillo de unión. Los bolsillos P1, P4, P6, P7 y P9 interactúan con los aminoácidos de las cadenas residuales de los péptidos, mientras que los bolsillos P2, P5 y P8 interactúan con el RCT (Fig. 6) (Fremont DH *et al*, 1998). El primer aminoácido de la zona *core*, es el P1 y se localiza en el extremo N-terminal del motivo, es el más importante para la interacción y se denomina ancla.

El pocket 1 (P1) presenta una fuerte preferencia por el ácido aspártico. Según estudios cristalográficos se ha observado que este ácido embona perfectamente en el sitio P1 del MHC haplotipo I-A<sup>K</sup> (Fremont DH *et al*, 1998). El P1 es el de mayor relevancia en la interacción MHC-péptido, debido a que al inducir sustituciones del ácido aspártico en P1 por asparagina causa cambios desfavorables en la unión peptídica. El pocket 4 (P4) no está tan restringido como P1 e indistintamente prefiere residuos hidrofóbicos (Isoleucina, valina y leucina) y tolera un gran número de sustituciones, sin interferir en la unión peptídica. El pocket 6 (P6) es el segundo sitio con mayor restricción en cuanto a preferencias de residuos, la cual consiste predominantemente en ácido glutámico y residuos de glutamina. El pocket 7 (P7) presenta poca restricción, y gran diversidad de residuos se han encontrado en este sitio. Finalmente, el pocket 9 (P9) preferentemente acepta residuos pequeños, comúnmente serina o treonina (Fig. 6) (Fremont DH *et al*, 1998).



**Figura 6.- Representación Esquemática de los pockets de las moléculas de MHC Clase II (haplotipo I-A<sup>K</sup>).** Superficie de la hendidura de unión a péptidos del complejo pMHC. (Tomado de Fermont DH, D Monnale, CA Nelson, WA Hendrickson y ER Unanue. Crystal Structure of I-A<sup>K</sup> in Complex with a Dominant Epitope of Lysozyme. Immunity 8:305-317,1998)

### **Procesamiento y Presentación de Antígeno**

Los péptidos reconocidos por los linfocitos CD4<sup>+</sup> son en su mayoría derivados de proteínas exógenas que requieren cierta forma de procesamiento antes de ser accesibles a unirse a las moléculas de MHC clase II (Harding 1997; Riese y Chapman, 2000; Villadangos, Ploegh 2000). El antígeno soluble es internalizado a las CPA por diferentes vías como endocitosis mediada por receptores, macropinocitosis, entre otras. En la región citosólica se forman vacuolas que contienen el antígeno soluble capturado, el cual sufre un desdoblamiento debido a la reducción de los puentes disulfuro presentes en las diferentes proteínas (Jensen, 1995). De manera consecutiva

se presenta una degradación del antígeno por la acción de proteasas (principalmente cisteinil, asparatinil) a pH bajo (Watts, 2001).

Las moléculas del MHC son sintetizadas *de novo* en el retículo endoplásmico (RE), en donde son ensambladas y transportadas al aparato de Golgi, bajo la regulación de moléculas accesorias incluyendo la cadena invariante (Ii) (Busch *et al*, 2000). El complejo MHC-Ii son transportados en endosomas, incluyendo compartimentos multilamelares y multivesiculares, o en fagolisosomas (Ramachandra y Harding, 2000). Este complejo junto con moléculas accesorias como el HLA-DM y HLA-DO regulan la carga de los péptidos a las moléculas MHC clase II (Busch *et al*, 2000). Dentro de la hendidura de unión a péptidos del MHC clase II, se encuentra asociado un péptido derivado de la cadena invariante llamado CLIP, el cual es disociado por las moléculas HLA-DM y permite la unión de péptidos provenientes de antígenos solubles procesados. Esta unión es llevada a cabo en endosomas que son excitados en la superficie celular para la presentación a linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Robinson y Delvig, 2002).

### **Espectrometría de Masas y Proteínas**

Actualmente, la secuenciación peptídica mediante EM es uno de los procedimientos más utilizados en proteómica para la identificación de proteínas. La identificación se lleva a cabo mediante la secuenciación de uno o más péptidos obtenidos por digestión enzimática de la proteína de interés. La digestión se lleva a cabo comúnmente con una enzima específica como la tripsina, que produce péptidos de digestión con unas características de secuencia que producen espectros de fragmentación muy informativos y que facilitan la determinación de la secuencia. Así, la tripsina produce péptidos de un tamaño medio (entre 500 y 1800 Da) muy adecuado para la secuenciación.

EM es una herramienta analítica que ha sido utilizada para identificar moléculas pequeñas, como péptidos. Para que se induzca una respuesta inmunológica celular es esencial que los péptidos antigénicos sean expuestos en las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad y sean reconocidos por los RCT. Las moléculas de MHC se unen a péptidos reconociendo solamente una pequeña secuencia de aminoácidos (core peptides) de nueve residuos. Las dos clases de moléculas difieren en el tamaño de los bolsillos de unión a péptidos. El sitio de unión a péptidos de las moléculas MHC clase II, permite tener una heterogeneidad de longitudes de péptidos, complicando así la localización de los motivos de unión, ya que no presentan una posición común respecto a las terminaciones de péptido (Rudensky, *et al*, 1991). En la secuencia de aminoácidos de 9 residuos, las posiciones 1, 4, 6, 7 y 9 son las de mayor importancia.

Espectrometría de masas permite también la estimación individual de los péptidos así como su complejidad respecto a todo el repertorio de péptidos (Hunt *et al*, 1992). De tal modo que como resultado final del procesamiento y presentación de proteínas antigénicas, las CPA exponen una gran cantidad de diferentes péptidos de los cuales unos cuantos serán reconocidos y estimularán una respuesta inmunológica. Por lo cual, la cantidad de complejos p-MHC requeridas para el reconocimiento por parte de los linfocitos T varía de miles a uno solo (Crotzer *et al*, 2000).

El predecir la afinidad de un péptido es importante para el desarrollo racional de vacunas (Godkin *et al*, 2001). Teniendo el conocimiento sobre las preferencias de aminoácidos que presenta la molécula de MHC, es posible predecir los epitopes responsables de la unión de una proteína en específico. Utilizando algoritmos (tal como SYFPEITHI) que nos provean de información acerca de los péptidos formados para conocer su afinidad para interaccionar con las moléculas del MHC.

El objetivo principal del presente estudio es el identificar y caracterizar proteínas inmunogénicas de *G. lamblia* que estimulan a células T, con el fin de evaluar la respuesta inmune celular durante la giardiasis. El análisis de la respuesta inmunológica durante la giardiasis se ha avocado principalmente al estudio de la respuesta inmune humoral, pero son pocos los reportes que han asociado a los mecanismos celulares y moleculares que intervengan en la erradicación de la infección. Estos estudios se respaldarán con la utilización de metodologías inmunológicas como la producción de hibridomas específicos contra *Giardia*, así como de espectroscopía de masas para poder elucidar la secuencia de aminoácidos de dichos péptidos, apoyándonos en bases de datos que provean información a cerca de la secuenciación del genoma de *G. lamblia* para una mejor caracterización química y molecular de las proteínas. La identificación de moléculas del parásito relevantes para el sistema inmune favorecerá nuestro entendimiento de la interacción *G. lamblia*–hospedero, y sentará las bases moleculares que ampliarán nuestro conocimiento acerca de los mecanismos inmunológicos relacionados durante una infección con *G. lamblia*.