

Centro de Investigación en Alimentación Desarrollo, A. C.

CARACTERIZACION BIOQUIMICA PARCIAL DE AISLADOS DE Giardia lamblia

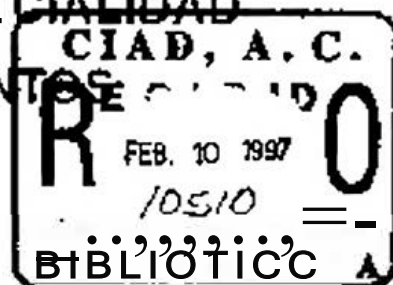
POR

RICARDO TORRES MARTINEZ

TESIS APROBADA POR LA

DIRECCION DE NUTRICION
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS ESPECIALIDAD
EN NUTRICION Y ALIMENTACION



HERMOSILLO. SONORA.

NOVIEMBRE DE 1996

CONTENIDO

	Página
APROBACION	ii
DECLARACION DEL AUTOR	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	v
CONTENIDO	vi
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMEN	xi
INTRODUCCION	1
REVISION BIBLIOGRAFICA	3
Morfología de <i>Giardia lamblia</i>	3
Trofozoito	3
Disco ventral	3
Citoesqueleto	5
Cuerpo mediano	5
Flageolos	6
Organización interna	6
Aparato de Golgi	6
Vacuolas	7
Núcleos	7
Quiste	8
Taxonomía	11
Metabolismo	14
Metabolismo energético	14
Metabolismo de lípidos	17
Metabolismo de ácidos nucleicos	18
Giardiasis	19

CONTENIDO

	Página
Técnicas de Laboratorio	25
Cultivo <i>in vitro</i>	25
Modelos animales	27
Exquistación y enquistación <i>in vitro</i>	28
Variación Intraespecífica	32
Patrones de isoenzimas	32
Variación antigénica	36
Variación genética	41
MATERIALES Y METODOS	45
Muestras Biológicas	45
Purificación de Quistes	45
Desenquistación <i>in vitro</i>	47
Mantenimiento y Cultivo de Aislados	48
Extracción de Proteínas	49
Análisis Electroforético	50
RESULTADOS Y DISCUSION	52
Análisis Coparazitoscópico	52
Obtención de Aislados Axénicos	55
Desenquistación y Cultivo <i>in vitro</i>	61
Extracción de Proteínas	65
Caracterización Electroforética de Aislados	67
CONCLUSIONES	78
BIBLIOGRAFIA	80
ANEXOS	92

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Frecuencia y tipo de parásitos protozoarios y helmintos encontrados en los análisis coproparasitológicos realizados	53
2. Relación de aislados de quistes y trofozoitos de <i>Giardia lamblia</i> , provenientes de portadores automáticos y asintomáticos de giardiasis.....	66

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Morfología general del trofozoito de <i>Giardia lamblia</i>	3
2. Rutas metabólicas intermediarias en <i>Giardia</i>	15
3. Microscopía de contraste de fase de quistes de <i>Giardia lamblia</i> aislados mediante centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa, a partir de excremento de humano....	56
4. Microscopía de contraste de fase de la suspensión fecal en la etapa posterior a las filtraciones iniciales del proceso de aislamiento ..	56
5. Microscopía óptica de la contaminación bacteriana de la suspensión fecal obtenida después de las filtraciones iniciales del aislamiento.....	57
6. Microscopía óptica del sobrenadante eliminado después de la primera centrifugación a baja velocidad (400 g) del proceso de aislamiento.....	57
7. Microscopía óptica del sobrenadante eliminado después de la tercera centrifugación a baja velocidad (200 g) del proceso de aislamiento.....	59
8. Microscopía óptica de la suspensión fecal durante la etapa posterior a las centrifugaciones a baja velocidad del proceso de aislamiento.....	59
9. Microscopía óptica de los quistes de <i>Giardia lamblia</i> en la suspensión fecal después del primer gradiente de sacarosa.....	60
10. Microscopía óptica de los quistes de <i>Giardia lamblia</i> en el aislado, después del segundo gradiente de sacarosa	60
11. Microscopía óptica de los quistes de <i>G. lamblia</i> , con daño celular debido al congelamiento, en presencia de glicerol (15%).....	62

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura	Página
12. Microscopía de contraste de fase de diferentes etapas del proceso de exquistación de <i>Giardia lamblia</i>	64
13. Electroforesis SDS-PAGE (6-18%) de aislados de <i>Giardia lamblia</i>	68
14. Electroforesis SDS-PAGE (6-18%) de aislados de quistes y trofozoitos de <i>Giardia lamblia</i> , provenientes de hospederos asintomáticos.....	70
15. Electrocresis SDS-PAGE (6-18%) de aislados de quistes y trofozoitos de <i>Giardia lamblia</i> , provenientes de hospederos asintomáticos y sintomáticos de giardiasis.....	71
16. Electroforesis SDS-PAGE (6-18%) de mezcla de aislados de quistes de <i>Giardia lamblia</i>	74

RESUMEN

Giardia lamblia es un parásito intestinal de alta prevalencia en la población infantil de esta región. Este organismo produce una enfermedad conocida como giardiasis. En cuyos casos crónicos, puede existir interferencia en el desarrollo corporal del hospedero, debido a la malabsorción de nutrimentos. El objetivo del presente trabajo fue realizar la caracterización bioquímica parcial de algunos aislados de *Giardia lamblia* obtenidos en la región de Hermosillo, a partir de portadores asintomáticos o sintomáticos de giardiasis.

La fase inicial del estudio consistió en la búsqueda de portadores del parásito. Los hospederos sintomáticos fueron localizados en centros hospitalarios y los portadores asintomáticos, en centros de desarrollo infantil. En total, se realizaron 473 análisis coproparasitológicos. El 51.1% de la población resultó positivo para uno o más parásitos. El parásito más frecuente fue *G. lamblia*, con 21.7% de portadores.

El aislamiento de quistes a partir de las heces se realizó mediante una adaptación a la técnica de centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa. Esta metodología, permitió la obtención de aislados lo suficientemente puros como para realizar la caracterización molecular de quistes provenientes de portadores humanos. A partir de estos quistes, se logró la exquistación de trofozoitos con la excelente motilidad y capacidad de adhesión. Para ello, se empleó una inducción ácida (pH 2.3) y una incubación final en medio TYI-S-33 adicionado a bilis. El proceso de obtención de subcultivos no se pudo desarrollar debido a la presencia de organismos contaminantes. El máximo período de sobrevivencia en cultivo *in vitro* fue de 96 horas. Las cepas de referencia de *G. lamblia*, WB y Portland-1, fueron subcultivadas y amplificadas en el laboratorio, empleando el medio TYI-S-33 adicionado de bilis.

ampSficadaa en el laboratoric, e:mp:eanda el medio TYC-S-;3
a:ilclcnado de bl:is .

Pos ter ,ormente, se OD!Ouvócr. los excractoa de proteir,a de
los quistes aislados y de los trofozoitos recién exquistados. La
" " ce:alar se '03r6 cor. el calencarn;enco de loa orsan,smoa a
ebulllclór. "- pre.sencia de SDS te». En la fase final del crabajo
,e realHÓ la electroforesio en geles de poliacrilanida con
gradlence contlr.so 16-18'), en ccndlcioneo deonacu allzancea y
redaéloras, aor 'l;mo, ae analizaron 11 aislados de quistes y de
,roCo,o;cos oeciér. exg.,,s,ados, e e.st.os a;s:ad s. ocho proveniar..
de püCCódoros asinconát,cos y tres, de crtadores que preser.toron
S'r.tcmatologia gast roincesc ma: .

Ieos perfiles proteícoa de loo aislados obter.,dcs ,.
ortadores aalr.tom*tlcos fueron re:acívamentece ,,-,,:ares entce e sí.
eor e: cor.t=drió, los aóaladoa proven,ences de poecildores
s,c,torrllillCOO presencia,on una rr.arc.-de heterogeneidad al co'nparaclcs
er.tre sí. Eata c',erencia también se ap,ec16 entre los t;cto,c,ccs
y qu,stes de aóslados de portador,,s ,incomátícos. n base a ello,
•• cor.cluy,a que es FCS1ble la presencia de rr,eeclas de genot lpo, de
G,ard,a iambloé, en alqur.aa ir.feccio es síncomi'it>ca,. Sin embargo,
se consódera que aur. es necesoño cealò,ar ir.vesc,gaciones m.ls
precisas acerca de eoce aspecto pa=a valldac esta ceoria .

INTRODUCCION

El término *Giardia lamblia* (sinónimos: *G. duodenalis* y *G. intestinalis*), define a un grupo morfológico de protozoarios que parasitan a humanos y otros animales (Erlandsen & Benrick, 1987). Este parásito es uno de los diez patógenos intestinales más comúnmente identificados en el mundo (Schantz, 1991). Es causante de la enfermedad conocida como giardiasis, la cual es una infección intestinal de naturaleza intermitente y sintomatología muy variada. En los casos de giardiasis crónica, se ha observado una interferencia en el desarrollo corporal del hospedero, debido a la malabsorción de nutrientes asociada con los procesos diarreicos (Farthing & cols., 1986).

La caracterización molecular de las poblaciones de *Giardia lamblia*, ha demostrado la existencia de una marcada diversidad fenotípica y genotípica. Esta variación ha sido un factor limitante para la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos y epidemiológicos relacionados con este organismo. Actualmente, se considera que esta heterogeneidad puede ser originada por mecanismos de rearrreglo genómico (mutaciones) y/o, por una estructura genética poblacional derivada del modo de reproducción asexual (divergencia clonal: (Andrews & cols., 1992b)).

En base a los estudios de caracterización genética de las poblaciones de *Giardia* se considera que algunas clonas se encuentran ampliamente distribuidas en todo el mundo y que, otras son aparentemente únicas y se localizan en un foco endémico en particular. Por ello, en la actualidad se está dando mayor importancia a la epidemiología molecular de las infecciones de *Giardia*, mediante el estudio e identificación de sus clonas, particularmente en áreas localizadas. El principal objetivo de la caracterización de este organismo es poder correlacionar el tipo

genético con sus características clínicas y epidemiológicas, tales como patogenicidad, infectividad, virulencia y sensibilidad a drogas (Tibayrenc & cols., 1990).

En vista de que no se tienen antecedentes de la naturaleza fenotípica del parásito presente en la región, se plantea el presente trabajo. El objetivo de este estudio fue lograr la caracterización bioquímica parcial de algunos aislados de *Giardia lamblia* obtenidos en la región, a partir de portadores asintomáticos o sintomáticos de giardiasis. En base al análisis de los trabajos publicados, se considera que puede existir heterogeneidad entre los patrones electroforéticos de proteína de los aislados regionales de *Giardia lamblia*.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Morfología de Giardia lamblia

Trofozoito

Giardia lamblia es un protozoario parásito que alterna en dos etapas biológicas, una vegetativa como trofozoito, la cual habita el intestino, y otra infectiva en forma de quiste (Adam, 1991). El trofozoito tiene una apariencia característica en forma de pera, dorsalmente convexo, binauculado, con ocho flagelos, un par de cuerpos medianos distintivos y una estructura única del género *Giardia*, el disco ventral o disco succionario (Figura 1).



Figura 1. Morfología general del trofozoito de *Giardia lamblia* (Thompson & Reynoldson, 1993).

Disco ventral. Una característica distintiva del género *Giardia*, es el disco ventral o disco succionario presente en la fase de trofozoito. Este disco es una superficie cóncava que ocupa las dos terceras partes anteriores de la porción ventral. Este organelo se conforma

de varios elementos del citoesqueleto que se encuentran ligeramente espaciados e interconectados entre sí. Los principales componentes son los microtúbulos, los puentes cruzados y unas estructuras únicas, conocidas como microfibras. Estas últimas, se proyectan dorsalmente dentro del citoplasma y se encuentran conectadas por los puentes cruzados y unidas ventralmente a los microtúbulos (Champion & Reynolds, 1993).

La superficie interna del disco succionario es relativamente rígida, en cambio, la porción exterior ha demostrado tener cierta flexibilidad. La parte externa es un anillo de estructura fibrosa electrodensa conocida como cresta lateral. En unión con la cresta lateral, el disco ventral se encuentra rodeado por una extensión citoplasmática superpuesta, denominada pestaña ventrolateral. Esta pestaña ventrolateral está soportada internamente por dos porciones filamentosas de composición bioquímica desconocida (Feely & cols., 1984).

El disco ventral tiene una función importante en el proceso de adherencia del organismo, debido a las propiedades contráctiles de la cresta lateral. Esta flexibilidad de la porción externa del anillo se debe a la presencia de algunas proteínas contráctiles, tales como actina, miosina, tropomiosina y vinculina (Feely & cols., 1982; Narcisi & cols., 1994). La determinación de la función del disco se apoyó en la demostración de la dependencia metabólica del proceso de adhesión. El organismo es incapaz de adherirse en presencia de concentraciones reducidas de cisteína, temperaturas bajas y alta tensión de oxígeno (Gillin & Diamond, 1981). El hecho de que algunos benzimidazoles inhiben el proceso de adhesión mediante la acción sobre la β -tubulina presente en los microtúbulos, también apoya la función del disco en este proceso (Feely & cols., 1984).

Citoesqueleto. El citoesqueleto de *Giardia* consiste de varios sistemas compuestos por microtúbulos, microfilamentos y algunas estructuras fibrosas asociadas. Los principales organelos que lo componen son el disco ventral, los cuerpos medianos, cuerpos basales, axonemas, flagelos y fibrillas asociadas con los axonemas caudales (Thompson & Reynoldson, 1993). La proteína mayoritaria del citoesqueleto de *Giardia* es la tubulina. En las microfibras del disco ventral se encuentran una serie de proteínas conocidas como giardinas (Crossley & Holberton, 1983). Las giardinas son un grupo de proteínas específicas de *Giardia* presentes en el disco ventral, con tamaño de 29 a 38 kDa. Existen dos grupos principales de giardinas, las beta-giardinas (29 kDa) y las alfa-giardinas (33.8 kDa) (Adar, 1991).

Algunas de las formas de giardinas estudiadas han demostrado gran similitud en sus porciones amino terminal y en su expresión antigénica. Por lo cual, se considera que podrían derivarse de modificaciones postraduccionales de una misma proteína (Peattie & cols., 1989). Este grupo de proteínas son buenos candidatos para el ataque quimioterapéutico, debido a su especificidad y a su posible rol en la función del disco ventral (Peattie, 1990).

Cuerpo mediano. Los cuerpos medianos son estructuras de naturaleza microtubular, específicas de *Giardia* spp. Estos organelos se localizan en la línea media de la célula y en posición dorsal al flagelo caudal (Adar, 1991). Su morfología ha sido empleada como parámetro de distinción de especies en el género (Filice, 1952). Se ha sugerido que esta estructura puede tener un papel en la formación del disco ventral, debido al reconocimiento antigénico de anti-giardinas y anti-tubulina observado en este organelo (Feely & cols., 1982; 1984).

Flagelos. El organismo tiene cuatro pares de flagelos (anterior, caudal, posterior y ventral) que emergen de cuerpos basales cercanos a la línea media anteroventral al núcleo. Los flagelos están compuestos de dos microtúbulos en la línea media y nueve pares de microtúbulos simétricamente colocados en la parte externa (Adam, 1991). Hasta la fecha, no se ha podido establecer de manera concluyente, cual es la función biológica de los flagelos en este género de organismos. La principal posibilidad incluye su asociación con la motilidad y la adherencia al epitelio intestinal. La identificación de algún inhibidor selectivo de la función flagelar, podría ser útil para evaluar su función específica (Holberton, 1974).

Organización interna. El organismo *Giardia* spp. se clasifica como un eucariota primitivo debido a la presencia de muy pocos organelos endomembranosos. La mayoría de los organelos eucariotas comunes tales como mitocondrias, retículo endoplásmico liso, nucleolo, peroxisomas, hidrogenosomas y glicosomas, no han sido identificados. Los únicos organelos endomembranosos presentes en el citoplasma son dos núcleos, vacuolas lisosomales y algunos gránulos ribosomales y de glicógeno (Feely & Dyer, 1987).

Aparato de Golgi. En fecha reciente, se encontró en *Giardia* una estructura que cumple con algunos de los criterios de un aparato de Golgi. Este organelo puede desempeñar una función en el transporte de proteínas. En la fase de enquistación, se ha demostrado que algunos antígenos localizados en estas estructuras son posteriormente trasladados en forma vesicular a la pared del quiste en formación (Gillin & cols., 1987; Reiner & cols., 1990). A pesar de que no se ha probado algo similar en trofozoitos no inducidos a enquistar, se considera que este organelo puede existir de manera natural en esta fase (Gillin & cols., 1991).

Vacuolas. Los quistes y trofozoitos de *G. lamblia* presentan una serie de vacuolas o vesículas de forma ovoide (0.1 a 0.4 μ m de diámetro), localizadas en la periferia de la célula. En los trofozoitos se encuentran cerca de las superficies dorsal y ventral, pero no en la región del disco ventral. La identificación de actividad hidrolítica (fosfata ácida, DNasa, RNasa y cistein-proteasa) dentro de estas vacuolas ha indicado su carácter lisosomal (Lindmark, 1993).

Núcleos. Otra característica única de *Giardia* spp., es la presencia de dos núcleos simétricamente colocados en la línea media celular. Ambos núcleos son morfológicamente idénticos, siendo derivado cada uno de la división de su correspondiente núcleo parental (Filice, 1952). Hasta la fecha, no se ha determinado la similitud funcional de ambos núcleos. Se desconoce si existe el mismo complemento de cromosomas o si hay algún intercambio de DNA entre ambos núcleos (Adam, 1991).

Los estudios realizados por Kabnick y Peattie (1990) y Wieseahn y colaboradores (1984), demostraron la equivalencia de ambos núcleos, respecto a la actividad transcripcional y cantidad de DNA. En estos trabajos, se empleó tinción fluorescente con 4,6diamidino-2-fenilindol (DAPI) y timidina tritiada, para estudiar la replicación nuclear del organismo. Ambos estudios mostraron que los dos núcleos se replicaban casi al mismo tiempo. Al teñir el DNA con DAPI se vio que aproximadamente 1 de cada 100 células mostraba idénticas estructuras condensadas, en ambos núcleos, propias de la replicación. Así mismo, al utilizar timidina tritiada se apreciaron marcas en ambos núcleos, indicando que eran transcripcionalmente activos. Se desconoce cual es la ventaja selectiva, si es que existe, de mantener dos núcleos que realicen un procesado equivalente del material genético.

Quiste

El organismo *Giardia lamblia* tiene un ciclo vital relativamente simple. Este ciclo inicia con la ingestión de quistes infectivos por un nuevo hospedero. Las condiciones gástricas de temperatura corporal y pH ácido inducen el proceso de exquistación, el cual ocurre en la primera porción del intestino delgado. Este proceso consiste en la salida de un organismo amorfo (cistozoito) que mediante citocinesis y fisión binaria comienza a dividirse en dos trofozoitos morfológicamente diferenciados. Estos trofozoitos se desarrollan e infectan las porciones iniciales del intestino delgado del hospedero. Algunos organismos son arrastrados por los movimientos peristálticos intestinales y son inducidos a la fase de quiste en su paso por las regiones posteriores del tracto intestinal. Finalmente, los quistes salen en las heces y pueden llegar a infectar a un nuevo hospedero, en donde se inicia el ciclo (Adam, 1991).

El proceso de enquistación de este organismo es uno de los aspectos más intrigantes y menos conocidos. A pesar de haberse desarrollado una técnica *in vitro* para la producción de quistes en el laboratorio, los factores inductores del proceso no han sido completamente aclarados. El proceso de enquistación *in vitro* es inducido por condiciones similares a las que imperan en la porción final del intestino delgado. La modificación del pH (7.2) del medio de cultivo, junto con una mayor concentración de sales biliares y la presencia de ácidos grasos son las condiciones necesarias para inducir la enquistación (Gillin & cols., 1988).

Los quistes son de una forma ovalada, miden de 8 a 12 μm de largo por 7 a 10 μm de ancho y se encuentran cubiertos por una dura pared hialina. La pared del quiste se compone de una parte filamentosa externa y otra interna, membranosa. La capa externa del quiste (0.3 a 0.5 μm) se compone de una intrincada red de filamentos

de 7 a 20 nm de diámetro. La porción membranosa interna se compone de dos membranas separadas por una delgada capa de citoplasma. La primera, es una membrana interna que rodea el espacio peritrópico (espacio entre la pared del quiste y el trofozoito interno). La segunda, es una membrana externa que sirve como medio de adhesión para la capa externa del quiste (Sheffield & Bjorvatn, 1977; Erlandsen & cols., 1989).

La mayoría de los quistes tiene cuatro núcleos, solo en los casos que aún no se ha realizado la cariocinesis se aprecian dos núcleos. En la porción citoplásmica del quiste se puede observar partes de otros organelos, tales como cuerpos basales, cuerpos medianos, segmentos cortos del retículo endoplásmico rugoso, y elementos estructurales flagelares y del disco ventral (Sheffield & Bjorvatn, 1977; Erlandsen & cols., 1989).

La pared del quiste se encuentra casi completamente unida a la superficie del organismo, excepto en algunas porciones. En estas últimas, se observa la presencia de un intrincado sistema vacuolar entre la membrana celular del organismo y la pared del quiste (Sheffield & Bjorvatn, 1977). La demostración de actividad de fosfatasa ácida en algunas vacuolas hace suponer que pueden estar involucradas en la secreción de componentes de la pared quística, o bien, tener una función digestiva (endocitosis) (Feely & cols., 1984). Sin embargo, esta cuestión solo se podrá comprobar hasta que se identifiquen los componentes específicos de la pared y se determinen las rutas intracelulares involucradas en la formación del quiste. Hasta la fecha, sólo se ha determinado la presencia de unos pocos componentes de la pared. Sin embargo, no se ha logrado un consenso en las conclusiones de las diferentes investigaciones.

Los estudios histoquímicos del quiste han determinado que la pared externa se compone principalmente de polisacáridos, los cuales se encuentran combinados de alguna manera con proteínas (Filice, 1952). En 1985, Ward y colaboradores, observaron que la unión de

aglutinina del germen de trigo (WGA) a la pared del quiste era inhibida por quitinasa. En base a esto, se consideró que el principal componente estructural de la pared externa del quiste era un polímero de N-acetilglucosamina (quitina). Estas conclusiones fueron criticadas debido a la amplia especificidad de la lectina empleada.

Los análisis bioquímicos de quistes producidos *in vivo* han demostrado un 43 % del peso seco de la pared externa se compone de carbohidratos (Jarroll & cols., 1989; Manning & cols., 1992). El 86 % de estos carbohidratos, es galactosamina. La unión de una lectina de *Phaseolus limensis*, ha sugerido que la galactosamina se encuentra en la forma de N-acetilgalactosamina (GalNAc). Este azúcar es específico de la pared filamentosa externa del quiste (Jarroll & cols., 1989).

El otro azúcar mayoritario del quiste es la glucosa. Este carbohidrato ha sido detectado como glucosamina, en membranas tratadas con dodecil sulfato de sodio (SDS) y en glicoproteínas intracelulares de quistes y trofozoitos (Ortega-Barria & cols., 1990). La mayor cantidad de glucosa en el quiste se encuentra en forma de polímero susceptible a la acción de amiloglucosidasa. El tratamiento enzimático de la pared externa del quiste disminuye 30 veces la concentración de glucosa detectada y además, inhibe la tinción con ácido peryódico de Schiff (Jarroll & cols., 1989). Otra posibilidad es la propuesta por Paget y cols. (1989), de que ésta glucosa se encuentra en forma de un polímero, dentro del quiste, posiblemente glucógeno.

Los otros carbohidratos reportados en quistes de *Giardia*, son galactosamina, galactosa, ribosa, glucosa, manosa, fructosa y ácido N-acetilneuramínico (Jarroll & cols., 1989; Ortega-Barria & cols., 1990; Manning & cols., 1992).

La presencia de proteínas en la pared del quiste fue sugerida por los resultados de estudios histoquímicos (Filice, 1952). Sin

embargo, no fue hasta 1989, que Reiner y colaboradores corroboraron de manera indirecta esta naturaleza proteínica, mediante la identificación de dos grupos de antígenos asociados a la formación *in vitro* de la pared del quiste. Estos antígenos reaccionaron con antisuero policlonal preparado contra quistes intactos, purificados de heces humanas. Hasta la fecha, no se ha realizado una caracterización completa de esas proteínas, o no se han publicado estos resultados.

Algunos datos obtenidos mediante cromatografía líquida de alta resolución, (HPLC) han dado evidencia indirecta de que los péptidos o proteínas tienen una función estructural en la pared quística de *Giardia*. Primero, se detectó la presencia de residuos de aminoácidos en muestras enriquecidas de paredes externas (filamentosa) de quistes. Después, se probaron diferentes tratamientos proteolíticos y extractivos para remover los péptidos solubles del quiste, no pudiendo eliminar completamente esos residuos en las muestras de paredes quísticas. En base a estos resultados, se dedujo que en la pared del quistes se tenían péptidos resistentes a la acción proteolítica, o bien, que éstos se encontraban estructuralmente protegidos de la acción proteolítica (Manning & cols., 1992). Hasta la fecha, no se ha determinado la relación estructural entre los carbohidratos y las proteínas presentes en la pared del quiste.

Taxonomía

Taxonómicamente, *Giardia* ha sido colocada en el phylum Sarcocistophora y clase Zoomastigophorea, junto con otros parásitos. En base a su simetría bilateral ha sido clasificada en el orden Diplomonadida. Por ser un protozoario flagelado se considera perteneciente a la familia Octomitidae (Adam, 1991).

En la actualidad, se considera a la evaluación morfológica propuesta por Filice (1952), como la forma más realista para la

determinación de especies en el género *Giardia*. Este sistema diferencia tres grupos morfológicos en base a sus dimensiones generales y a la forma de unos organelos microtubulares intracelulares, llamados cuerpos medianos. El primer grupo, *Giardia agilis*, infecta anfibios, los trofozoitos son largos (20 a 30 μm) y delgados (4 a 5 μm), son flexibles en la parte media y tienen dos cuerpos medianos en forma de bastón. El segundo grupo, *Giardia muris*, se encuentra en roedores, aves y reptiles, los trofozoitos son aproximadamente de 10 a 12 μm por 5 a 7 μm , tienen un cuerpo mediano pequeño y redondeado. Al igual que *Giardia agilis*, *Giardia muris* no ha podido ser cultivada *in vitro*, y no se ha demostrado que cause infección en humanos.

Finalmente, el tercer grupo, *Giardia lamblia* (también llamada *Giardia duodenalis* o *Giardia intestinalis*), cuyos trofozoitos son aproximadamente de 12 a 15 μm por 6 a 8 μm , y tiene dos cuerpos medianos que asemejan a un martillo de crejas (Eriandson & Berrick, 1987). Los organismos de este grupo han sido aislados de una variedad de mamíferos, incluyendo humanos, así como de aves y reptiles. Actualmente se considera que al menos algunos de estos animales pueden actuar como reservorio para la infección en humanos (Faubert, 1988; Berrick & Eriandson 1988). Debido a su importancia médica y a que es el único que ha podido ser cultivado en el laboratorio, la mayor parte de los estudios del género se han realizado en el grupo *G. lamblia*.

El actual modelo de especie en este género (Filice, 1952), ha sido cuestionado por la gran variación genética encontrada dentro de este grupo de organismos (Thompson & Reynoldson, 1993). En 1989, Andrews y colaboradoras propusieron que el grupo morfológico *G. lamblia* debería ser considerado como una especie compleja. La base de esto, fue la gran heterogeneidad genética que encontraron en el análisis electroforético de 26 locus enzimáticos de aislados australianos. En base a esas diferencias se conformaron varios

grupos que fueron asignados, mediante análisis estadístico multivariado, a tres o cuatro especies genéticas distintas (pero morfológicamente semejantes).

El concepto de especie biológica fue diseñado únicamente para progenitores con reproducción sexual (Mayr, 1940). En el caso de *Giardia*, siempre se ha considerado un modelo clonal de reproducción asexual, mediante fisión binaria. Recientemente se ha propuesto que la diversidad genética encontrada en este parásito tiene un origen clonal o mutacional. La correlación encontrada entre dos grupos independientes de marcadores genéticos ha soportado la teoría de una heterogeneidad genética interclonal.

Meloni y colaboradores (1989), encontraron que la agrupación de zimodemas (análisis de isoenzimas) y de esquizodemas (análisis de DNA) de los mismos aislados, exhibían una fuerte correlación entre sí. No obstante, no se ha descartado una fase sexual en el organismo, ya que algunos aislados de *Giardia lamblia* han demostrado un cierto grado de homocigotidad de ciertos locus enzimáticos. Ello sugiere que pueden existir brotes raros u ocasionales de recombinación sexual, en este grupo de organismos (Meloni & cols., 1988; 1989).

El reconocimiento taxonómico del concepto de especie para este género de parásitos solo será posible hasta que se realice un detallado estudio genético de las poblaciones naturales de *Giardia*. De esta manera, si su reproducción es solamente asexual, la designación de especie requeriría evidencia de que un grupo de clones forma una línea y, que esta línea es distinta de otras. Esto solo se lograría con el estudio de líneas clonadas de laboratorio, empleando procedimientos de caracterización molecular de alta resolución (Thompson & Reynolds, 1993).

La elucidación de un modo de reproducción clonal en este organismo ayudaría en la determinación de la fuente y mantenimiento de la diversidad genética. Además, tendría importantes implicaciones

en la comprensión de los mecanismos epidemiológicos y fisiopatológicos de la giardiasis, así como en la diagnosis y tratamiento terapéutico (Tibayrenc & cols., 1990).

Metabolismo

Metabolismo Energético

El parásito protozoario *Giardia* es considerado como un eucariota excepcional, debido a sus peculiares características metabólicas. Es un organismo anaerobio aerotolerante que carece de mitocondrias y de enzimas mitocondriales. Por lo tanto, depende predominantemente de rutas metabólicas anaerobias para la producción de energía y la manutención de su homeostasis óxido-reductora (Miller, 1988). La producción energética de naturaleza fermentativa la realiza por la oxidación incompleta de glucosa endógena y exógena hasta etanol, acetato y CO_2 , empleando las rutas metabólicas de Embden-Meyerhof y de la hexosa monofosfato (Figura 2) (Jarroll & cols., 1989). No se ha demostrado la presencia de ciclo de Krebs, transporte de electrones mediado por citocromos, ni fosforilación oxidativa (Lindmark & Jarroll, 1980; Weinbach & cols., 1980).

Los estudios metabólicos iniciales de este género de parásitos fueron realizados exclusivamente en los trofozoitos de *Giardia lamblia*. Lindmark & Miller (1988), realizaron los análisis bioquímicos básicos de quistes y trofozoitos de dos especies (*G. muris* y *G. lamblia*). Para estos análisis, se purificaron los quistes de *G. lamblia* y *G. muris* provenientes de heces fecales de gerbos y ratones, respectivamente. Las dos especies de *Giardia* exhibieron similares actividades enzimáticas del metabolismo de carbohidratos, en ambas fases biológicas.

Los estudios realizados en las especies *G. lamblia* y *G. muris* han detectado la mayoría de las enzimas del metabolismo de

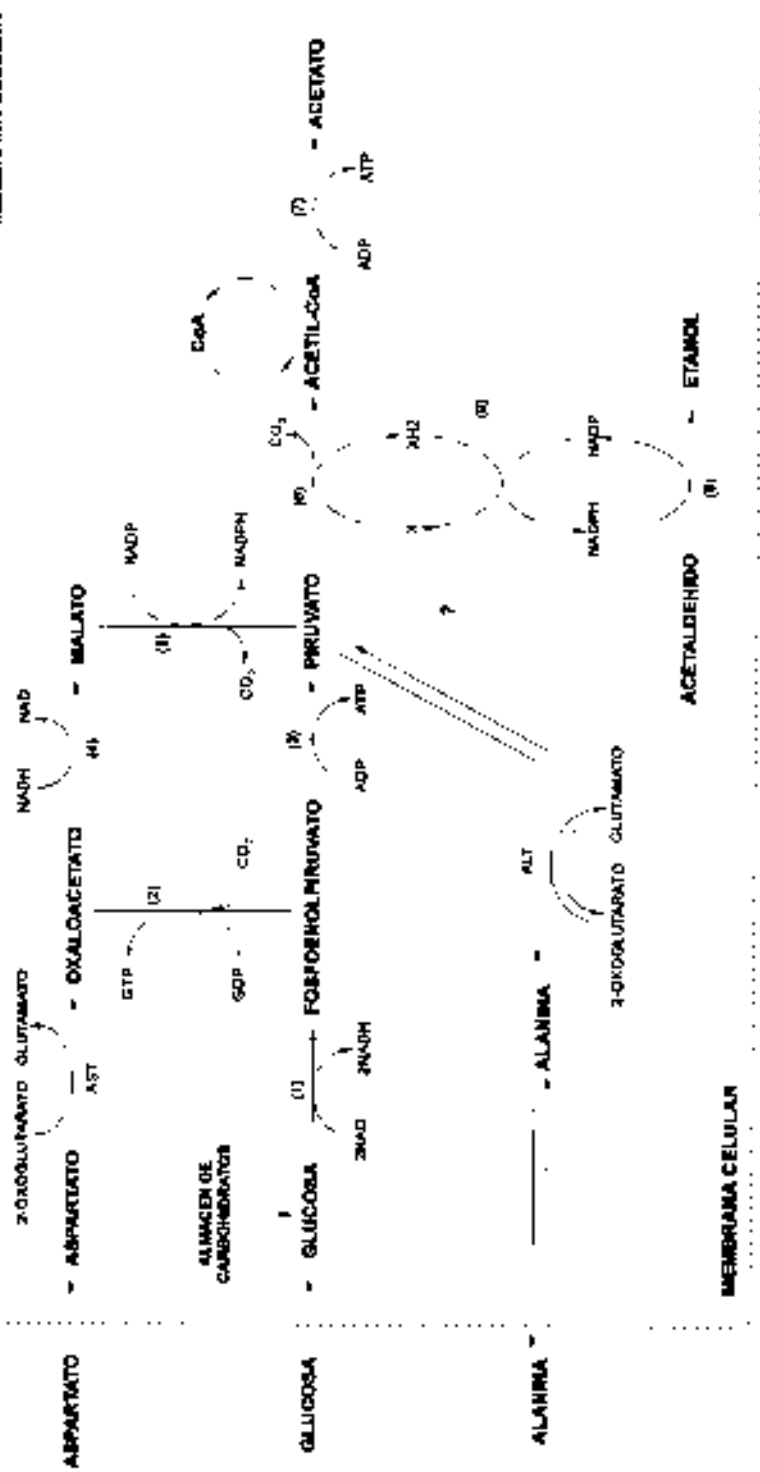


Figura 2. Rutas metabólicas intermediarias en Giardia. (1) Enzimas de la ruta de Embden-Meyerhof; (2) Fosfoenol piruvato carboxiquinasa (GPP), (3) Piruvato quinasa (ADP), (4) Malato deshidrogenasa (NAD), (5) Malato deshidrogenasa (decarboxilando) (NADP), (6) Piruvato sintasa, (7) Acetil-CoA sintetasa (ADP), (8) Alcohol deshidrogenasa (NADP), (9) NADPH oxidoreductasa. AST: Aspartato-2-oxoglutarato aminotransferasa, ALT: alanina-2-oxoglutarato aminotransferasa. (Thompson & Reynoldson, 1993).

carbohidratos, excepto la lactato deshidrogenasa (LDH) y la fosfofructoquinasa dependiente de ATP (Lindmark & Jarroll, 1980; Weinbach & cols., 1980; Lindmark & Miller, 1988). Esta última enzima es fundamental en el metabolismo de carbohidratos de la mayoría de los organismos aerobios y anaerobio. Esta enzima interviene en el principal paso regulador de la glucólisis, de conversión de fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-difosfato. Hasta 1990, Mertens, demostró la presencia de una actividad de fructosa-6-fosfato 1-fosfotransferasa dependiente de pirofosfato en la cepa Portland-1 (P-1) de *G. lamblia*. Los extractos de *Giardia* catalizaron la formación de fructosa-1,6-difosfato en presencia de pirofosfato como donador de fosfato, detectándose un 3 % de esta actividad al tener ATP como donador de fosfato. Finalmente, no se encontró evidencia de regulación metabólica determinada por esta enzima. Esta diferencia metabólica es interesante, debido a la ventaja potencial que confiere esta enzima en la producción de ATP por glucólisis fermentativa, ya que emplea un subproducto metabólico como el pirofosfato.

Los azúcares simples, principalmente glucosa, son la principal fuente de energía de *Giardia* (Lindmark & Jarroll, 1980). Sin embargo, los trofozoitos pueden emplear fuentes alternativas de energía (Schofield & cols., 1991). Además del empleo de otros azúcares, deben considerarse las implicaciones de la utilización de otros compuestos (por ejemplo, aminoácidos) para la obtención de energía. A este respecto, Mendis y colaboradores (1992) observaron que los trofozoitos intactos de *Giardia* pueden emplear L-[U-¹⁴C] aspartato y L-[U-¹⁴C] alanina para metabolizarlas hasta ¹⁴CO₂ (Figura 2). En base a esos hechos, se determinó que *Giardia* es un oportunista metabólico, capaz de suplementar sus requerimientos energéticos mediante la utilización de aminoácidos exógenos. Aun se requiere de estudios más detallados del flujo metabólico de carbono bajo condiciones estrictamente definidas, para investigar la

importancia de sustratos como arginina y alanina como fuente energética alterna (Schofield & cols., 1991).

Metabolismo de Lípidos

Los estudios del metabolismo de lípidos en trofozoitos de *Giardia lamblia* han demostrado que existe poca, o casi nula síntesis de novo de fosfolípidos y esteroides (Jarroll & cols., 1981). Esto se demuestra por la incapacidad de incorporar precursores radiomarcados, tales como glucosa, treonina, acetato y glicerol, en los lípidos celulares de trofozoitos. En cambio, el colesterol radiomarcado sí se asimila a colesterol en los esteroides celulares. Además, los ácidos palmítico y araquidónico son incorporados en las fracciones de lípidos neutros y fosfolípidos (Blair & Weller, 1987). En vista de ello, se considera que el organismo requiere de lípidos exógenos presentes en el medio de crecimiento (Jarroll & cols., 1981).

Los perfiles de lípidos neutros y fosfolípidos de trofozoitos y quistes han demostrado ser similares. El perfil de lípidos neutros consiste principalmente de esteroides libres y esterificados, además de mono, di y triacilglicéridos. Los fosfolípidos identificados en *G. lamblia* son fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol y esfingomielina (Jarroll & cols., 1981; Blair & Weller, 1987; Kaneča & Goutsu, 1988).

La comparación de diferentes aislados de *G. lamblia* ha demostrado un aspecto interesante de su metabolismo de lípidos. Mohareb y colaboradores (1991), observaron diferencias en la actividad metabólica y la utilización de moléculas lipídicas entre aislados de *G. lamblia*, sugiriendo una variación en la habilidad para incorporar y seleccionar lípidos.

La localización infectiva de *Giardia* en la región proximal del intestino delgado ha sugerido que la bilis y las sales biliares pueden ser factores importantes para su desarrollo. Esto ha sido comprobado en condiciones *in vitro* e *in vivo*. Primeramente, se evidenció que la adición de bilis al medio de cultivo *in vitro* mejora la capacidad de desarrollo de los trofozoitos (Farthing & cols., 1983; Keister, 1983). Después, se vió que los componentes biliares eran fuente importante de lípidos (Farthing & cols., 1985).

La importancia de los componentes biliares para el desarrollo de *Giardia* se ha reafirmado por la demostración de que este parásito es capaz de asimilar sales biliares conjugadas (Halliday & cols., 1980). Además, se ha demostrado que la cepa WB de *Giardia* puede ser cultivada en medio sin suero, suplementándolo con sales biliares, fosfatidilcolina y colesterol (Gillin & cols., 1986).

Metabolismo de Acidos Nucleicos

La mayoría de los organismos eucariotas son capaces de realizar síntesis *de novo* de purinas y pirimidinas. Sin embargo, todos los protozoarios parásitos investigados hasta la fecha han demostrado la incapacidad de síntesis *de novo* de purinas, por lo cual dependen de fuentes externas de nucleótidos púricos. Aparte de ello, *G. lamblia* carece de síntesis de pirimidinas. Por esa razón, es completamente dependiente de la captación de bases púricas y pirimidínicas exógenas (Adam, 1991).

Los estudios del metabolismo de purinas de *Giardia lamblia* han revelado la incorporación de adenina, adenosina, guanina y guanosina, pero no de los precursores, formiato, glicina, hipoxantina, inosina o xantina (Wang & Aldritt, 1983). De la misma manera, no se ha demostrado la incorporación de algún precursor como orotato, aspartato, ni bicarbonato en los nucleótidos de pirimidinas (Lindmark & Jarroll, 1982; Aldritt & cols., 1985).

Giardiasis

Giardia lamblia fue descubierta en las heces fecales del ser humano hace más de trescientos años. Pero no es sino hasta mediados de éste siglo que dejó de ser considerada como un huésped intestinal no patógeno. Los estudios pioneros de Rentdorff (1954), demostraron la posibilidad de infección por *Giardia lamblia*, a humanos. Este autor, monitoreó la excreción fecal de quistes, en infecciones experimentales con voluntarios. El 36% de los casos se infectó con una dosis de 10 a 25 quistes del parásito. Las dosis de 100 o más quistes fueron suficientes para lograr la infección en el 100% de los sujetos. El inicio de expulsión de quistes en las heces (periodo prepatente) fue 9 a 14 días después de la inoculación, variando según la dosis infectante y la respuesta del hospedero.

Hasta hace poco, los datos más confiables acerca del periodo de incubación de la infección en humanos provenían de las investigaciones retrospectivas realizadas en personas con síntomas de diarrea del viajero. El periodo promedio desde la entrada a una región endémica y la aparición de síntomas había sido estimado entre 12 y 15 días, con un rango de 1 a 75 días (Waltzer & cols., 1971; Brodsky & cols., 1974). Sin embargo, mediante la infección experimental en humanos se estimó más precisamente el periodo prepatente (7.5 ± 0.97 días) y el de presentación de síntomas clínicos (7.25 ± 2.99 días, rango de 3 a 10 días) (Nash & cols., 1987). En este estudio, no solo se probó, por primera ocasión, los postulados de Koch, confirmándose la patogenicidad del organismo, sino que también se demostró la variación del potencial patogénico de distintas cepas de *Giardia*.

Las principales formas clínicas de giardiasis, son la aguda y la crónica, además de una forma clínica subaguda. Esta última incluye síntomas similares a los descritos en la forma aguda, pero persisten con menor intensidad durante meses (Amir, 1979).

En el estadio agudo, la primera señal de infección puede ser náusea, dolor abdominal, malestar general y quizá, fiebre ligera y escalofríos. Después puede ocurrir una repentina diarrea, asociada con flatulencias y distensión abdominal. Este conjunto de síntomas conduce a un cuadro general de anorexia y debilidad, que se asemeja a una infección bacteriana o viral. Sin embargo, se diferencia de los síndromes disenteriformes por la ausencia de pus y sangre en las heces, además de la marcada flatulencia y distensión abdominal propias de la giardiasis. La etapa aguda se resuelve espontáneamente, desapareciendo los organismos de las heces. Generalmente, la corta duración de esta fase evita que se reconozca la presencia de giardiasis (Brandborg & cols., 1980).

En la etapa crónica de la enfermedad pueden presentarse episodios de diarreas pastosas y fétidas, alternadas por períodos de constipación. Esta fase también se asocia a los casos en que la etapa aguda dura meses, presentándose esteatorrea, laxitud, malestar general, anorexia y pérdida de peso (Wolfe, 1992).

Algunos pacientes llegan a ser portadores asintomáticos de este organismo, sin presentar manifestaciones clínicas por un período de tiempo indeterminado. En algunos casos se observan períodos breves y recurrentes de presentación de síntomas agudos. Esta última situación es más común en niños, debido a eso se llegó a considerar a la giardiasis como una enfermedad infantil. Los resultados a largo plazo de esta fase en niños, son los propios de una desnutrición crónica moderada, con pérdida de peso y retraso en el desarrollo (Farthing & cols., 1986).

En general, se puede decir que en los casos infantiles predominan dos síntomas clínicos, diarrea y dolor abdominal recurrente. En la población adulta se distribuyen en frecuencia casi similar, el diarreico, el ulceroso y algunas formas que asemejan afecciones biliares. Estas dos últimas formas clínicas han sido descritas en menor proporción que la primera, debido a que no se realiza una búsqueda sistemática del parásito en pacientes con estos síndromes (Sotto, 1990). Las manifestaciones

intestinales de la giardiasis han sido las más ampliamente estudiadas, debido a su frecuencia en niños y a los trastornos que puede acarrear sobre la absorción intestinal, la nutrición y el desarrollo del hospedero.

Un buen número de investigaciones clínicas han demostrado la existencia de procesos de malabsorción y/o deficiencias de algunos nutrimentos en humanos con giardiasis. Los principales nutrientes que se ven afectados en su absorción son: grasas, proteínas, carbohidratos (D-xilosa, almidón y lactosa) y vitaminas (vitamina A, ácido fólico y vitamina B₁₂). (Morecki & cols., 1967; Hoskins & cols., 1967; Barbieri & cols., 1970; Notis, 1972; Cowen & Campbell, 1973; Wright & cols., 1977; Mahalanabis & cols., 1979; Cwen & cols., 1979). La malabsorción de carbohidratos, grasas y vitaminas desaparece después de la erradicación del parásito (Ament & Rubin 1972).

Hartong y cols. (1979) evaluaron los trastornos funcionales debidos a cambios estructurales de la mucosa intestinal en pacientes (17 adultos y 11 niños) con giardiasis. El parasitismo se asoció a la presentación de hipogamaglobulinemia e hiperplasia linfóide intestinal. El 64 % de los pacientes presentaron esteatorrea. Además, se observaron procesos de malabsorción de D-xilosa (55%) y de vitamina B₁₂ (60%). El 36% de los casos tuvo bajos niveles séricos de folato y carotenos. La cuantificación de las enzimas de la mucosa intestinal demostró que el 80% de los pacientes presentaban una reducción en los niveles de lactasa, sacarasa, leucil-naftilamidas, maltasa e isomaltasa. Las anomalías desaparecieron después del tratamiento antiparasitario.

Una de las consecuencias más críticas de la giardiasis es la posible contribución *per se* al retardo en el desarrollo corporal del hospedero. Hasta la fecha, las investigaciones realizadas en humanos no han logrado conclusiones determinantes de este aspecto. Los principales enfoques utilizados para investigar este aspecto se han basado en el seguimiento y el análisis retrospectivo de poblaciones infectadas con *Giardia*.

Kay y colaboradores (1977), en Australia, realizaron el seguimiento de una población hospitalaria de 154 niños diagnosticados con *G. lamblia*. La mayoría de los niños tenía entre 1 y 4 años de edad y presentaba los síntomas de diarrea y "retardo en el crecimiento". Se realizó el seguimiento en 24 niños durante periodos de dos a diez semanas posteriores al tratamiento antiparasitario. En 19 de los sujetos se apreció una mayor ganancia de peso que el valor ideal esperado, ajustado para la edad. Esta ganancia de peso extra varió de 200 gramos a 3.2 kilogramos. Lo anterior, se consideró evidencia suficiente del impacto negativo de la giardiasis en la nutrición proteico calórica del hospedero.

Farthing y cols. (1986) analizaron los datos de un estudio parasitológico realizado en la población infantil de una villa rural de Guatemala. El objetivo fue evaluar el impacto de los estados parasitarios sobre el hospedero. El principal parásito detectado durante los primeros tres años de vida fue *G. lamblia*. La duración de los periodos de infección con *Giardia* y su asociación con episodios diarreicos fueron los principales factores contribuyentes para un menor desarrollo corporal. Entre las variables analizadas solo la talla demostró significancia estadística. Sin embargo, la importancia biológica de diferencias mínimas en este parámetro, a pesar de su significancia estadística, no puede ser evidenciada en un plazo corto. Debido a ello, aun se encuentra como una posibilidad no comprobada el posible impacto de la giardiasis en el desarrollo corporal de humanos (Farthing & cols., 1986).

La anomalía presentada con mayor frecuencia en este parasitismo es la atrofia parcial de la mucosa. Se han informado prevalencias en 88% (Ridley & Ridley, 1976) y hasta 100% de los casos estudiados (Knight, 1980). En Cuba, Grá (1982) encontró atrofia subtotal de la mucosa intestinal en el 92.8% de los pacientes giardiásicos con síndrome de malabsorción y, en 52.5% de aquellos que no presentaron diarrea.

Las alteraciones morfológicas de la mucosa intestinal en sujetos infectados por *G. lamblia* varían desde la ausencia de lesiones, hasta la atrofia total de las vellosidades. En personas sintomáticas se puede presentar atrofia de la vellosidad intestinal, hiperplasia de las criptas, daño celular epitelial e infiltración de la lámina propia por células plasmáticas, linfocitos y leucocitos polinucleares. Las personas asintomáticas usualmente no muestran anomalías en los estudios histológicos duodenales (Ramírez-Mayans & cols., 1983).

Hasta la fecha, no se ha podido establecer una correlación clara entre las manifestaciones clínicas, las pruebas de absorción intestinal y las lesiones detectadas en biopsias intestinales humanas. Solo se ha demostrado que estas últimas son más intensas en las partes altas del tracto intestinal y prácticamente no se observan en el ileon. Las lesiones no son idénticas en todo el tracto digestivo, pudiendo existir en zonas localizadas a las que se denomina como lesiones en "parche". Este tipo de comportamiento podría explicar, en parte, la variabilidad en los resultados reportados en distintos estudios (Sotto, 1990).

La elucidación de los mecanismos fisiopatológicos propios de la giardiasis ha sido uno de los aspectos más ampliamente debatidos sobre este parasitismo. El estudio del curso de la infección con *G. muris* y *G. lamblia* en modelos murinos ha hecho posible la apreciación detallada de las manifestaciones clínicas. Esto ha ayudado a la postulación de una teoría que explica el mecanismo patogénico debido a este parasitismo. Esta es la primera ocasión que se logra una imagen que coordina todos los factores involucrados en la enfermedad.

Primero, mediante estudios de microfotografía se demostró que la deformación del microvello superficial de las células epiteliales era causada por la adhesión de los trofozoitos (Chávez & cols., 1986). Posteriormente, en infecciones experimentales realizadas con ratones infectados con *G. muris* y en gerbos infectados con *G. lamblia* se comprobó que el daño causado por el

disco ventral del parásito sobre la mucosa podía producir un efecto irritante, alterando las funciones digestiva y absorptiva realizadas en las vellosidades intestinales. En estos estudios se observó una disminución de la actividad de disacaridasas directamente relacionada con la pérdida del grosor del borde en cepillo (Buret & cols., 1990b, 1991). El grado de daño al borde en cepillo y la pérdida de área superficial absorptiva fueron los factores limitantes para la actividad de disacaridasas. Además, se encontró que durante el curso de la infección existía una correlación entre los cambios estructurales y funcionales observados con una menor ganancia de peso. Este mecanismo patogénico explica los principales aspectos clínicos de la giardiasis: diarrea y retardo en el desarrollo. No obstante, aún falta por establecer las influencias relativas del parásito y del hospedero en la inducción de esos cambios.

El que la giardiasis sintomática ocurra más comúnmente en pacientes inmunocomprometidos, malnutridos o muy jóvenes, es una clara indicación de que los factores del hospedero son importantes para el desarrollo de la enfermedad. Los estudios realizados acerca de los mecanismos de defensa del hospedero indican que los individuos con bajos niveles de gammaglobulinas tienen mayor prevalencia de infección por *Giardia*. Sin embargo, no siempre se ha demostrado tales diferencias entre individuos infectados y controles sanos.

La influencia del parásito per se también se considera importante, debido al mayor potencial de algunas cepas de *Giardia* de causar enfermedad en un hospedero. Actualmente, se considera que la pronunciada variabilidad sintomatológica de la giardiasis es resultado de la combinación de muchos factores, tanto endógenos, como exógenos. Entre los primeros, está la respuesta inmune y el estado nutricional del hospedero. Entre los exógenos, se considera a la heterogeneidad en la infectividad, virulencia y patogenicidad de las cepas de *Giardia* (Wolfe, 1992).

Técnicas de Laboratorio

Cultivo in vitro

Karapetyan (1962), desarrolló el primer método de cultivo in vitro de *Giardia lamblia* que pudo ser reproducido por otros investigadores. Los trofozoitos fueron aislados del contenido duodenal de humano y se mantuvieron durante 7 meses en un medio complejo que contenía levaduras (*Candida* spp.) y fibroblastos de pollo. Diariamente se reemplazaba una tercera parte con medio fresco. La presencia de *Candida* spp. probó ser indispensable para la supervivencia de los trofozoitos de *Giardia*.

Meyer (1970), reportó el primer cultivo axénico in vitro de *Giardia lamblia* a partir de conejo, chinchilla y gato. Los organismos fueron mantenidos en cultivo durante un año. Primero, se logró el cultivo monoxénico (*Sacharomices cerevisiae*) en el medio de Karapetyan y, posteriormente fueron transferidos al medio M-3 que contenía extracto de levadura. Los componentes del medio incluyeron solución balanceada de Hank, extracto de levadura, hidrocloreuro de cisteína, medio de cultivo de tejidos (NCTC 109) y suero humano inactivado. Una vez establecidos los cultivos axénicos, se mantuvieron con el reemplazo diario de una cuarta parte del medio por medio nuevo. La separación de *Giardia* de la levadura se logró cultivando los organismos en un tubo en forma de J. En este sistema, las levaduras se quedaban en el fondo de un brazo y los trofozoitos se recuperaban de la base del otro brazo del tubo. Los trofozoitos libres de levadura no pudieron desarrollarse en medio con puro extracto de levadura, por lo cual, fueron cultivados axénicamente en un recipiente de cultivo con levaduras viables dentro de una bolsa de diálisis.

Finalmente, Meyer (1976), logró el primer aislado y cultivo axénico de *Giardia lamblia* a partir del aspirado duodenal de un humano con giardiasis. Se empleó medio HSP-1, cuyo contenido incluía solución balanceada de Hank, suero humano inactivado,

peptona (BBL), glucosa, medio NCTC 135 (Gibco) y agentes reductores (cisteína). No fue necesario adicionar levadura, ya que existían hongos tipo levadura en el aspirado (*Sacharomices cerevisiae*). La axenización se logró finalmente con el método del tubo en forma de U. El aislado logrado en este estudio se conoce como cepa Portland-1 (P-1), por haber sido axenizado de un paciente en Portland, Oregon. Este aislado, junto con la cepa WB (Smith & cols., 1982a) axenizada de un paciente (WB) con giardiasis crónica, son las cepas en las que se ha realizado la mayoría de los estudios de *G. lamblia*.

La mayoría de los aislados de *Giardia* que han sido exitosamente establecidos *in vitro* pertenecen al grupo morfológico de *G. lamblia*. Existe un solo reporte de cultivo de *Giardia muris* (González-Castro & cols., 1986), y uno solo de *Giardia ardeae* (Erlandsen & cols., 1990b). Sin embargo, estos reportes aún no han sido confirmados.

Un hecho notable acerca del cultivo de este organismo es la carencia de un medio de cultivo totalmente definido que soporte de manera constante su crecimiento. Todos los medios de cultivo desarrollados han sido complejos e indefinidos, demostrando fallas e inconsistencias en el soporte de cultivos. La causa principal de esto, ha sido la heterogeneidad de los lotes de componentes.

En la actualidad, el medio empleado más comúnmente es el medio TYI-S-33, modificado por Keister (1983). El medio TYI-S-33 fue desarrollado originalmente para el cultivo de *Entamoeba histolytica* (Diamond & cols., 1978). Poco después, fue utilizado por Visvesvara (1980) para adaptar gradualmente a la cepa P-1 de *Giardia*. Finalmente, fue Keister (1983) quien lo mejoró para el cultivo de *Giardia*, mediante la adición de extracto de bilis y el aumento de la concentración de cisteína. La composición de la modificación final que realizó Keister (1983) incluyó suero bovino descomplementado, extracto de bilis, caseína digerida (triptícase), extracto de levadura, cisteína, dextrosa, ácido

ascórbico, cloruro de sodio, fosfatos monobásico y dibásico de potasio y citrato férrico de amonio.

La principal limitación del medio de cultivo TYI-S-33 es la complejidad de su composición, la cual se debe principalmente a la presencia de suero animal. Wieder y colaboradores (1983), lograron producir grandes cantidades de organismos en medio TYI-S-33 libre de suero, al cual le añadieron dos componentes nuevos, una solución de colesterol-lipoproteína (Miles) y la fracción Cohn V de albúmina sérica bovina. Mediante esta variación del medio se logró un 70 % de eficiencia de crecimiento, en relación al control con suero. De la misma manera, Lujan y colaboradores (1994) encontraron que la fracción Cohn IV-1 podía reemplazar al suero total, en un medio suplementado con aminoácidos, lípidos séricos bovinos, vitaminas y elementos traza. Estos hallazgos son de importancia potencial para que en el futuro se logre desarrollar un medio definido que soporte el cultivo de este organismo.

Modelos Animales

El ratón ha sido el hospedero más empleado en el estudio de las infecciones experimentales de *G. lamblia* y de *G. muris*. Este animal ha sido utilizado en la investigación de la inmunobiología y patogénesis de las infecciones, así como en la amplificación de aislados que no pueden ser establecidos en cultivo axénico *in vitro* (Roberts-Thomson, 1976; Hill & cols., 1983). Sin embargo, este modelo murino tiene serias limitaciones que impiden su empleo para el estudio de algunos aspectos biológicos. Primeramente, las infecciones solo pueden ser establecidas en ratones muy jóvenes, de forma que tienen que ser trabajos de corta duración (Hill & cols., 1983; Heyworth, 1996). Esta susceptibilidad dependiente de la edad reduce la utilidad de los ratones para investigar aspectos de inmunidad y patogénesis. Sin embargo, el ratón con defectos inmunes específicos ha sido de valor en la investigación de infecciones prolongadas y de aspectos específicos de la respuesta

innune (den Hollander & cols., 1988; Gottstein & cols., 1990; Byrd & cols., 1994). La segunda desventaja proviene de la distinta fisiología intestinal de este animal, con respecto a la del humano. El ratón tiene un tránsito intestinal rápido, lo cual limita su utilidad en los estudios de evaluación de eficacia de drogas. En este aspecto, la rata ha sido considerada como un hospedero más eficiente para la evaluación de agentes giardicidas, debido a que su tránsito intestinal refleja más cercanamente la situación que ocurre en humanos (Reynoldson & cols., 1992).

El modelo animal más prometedor para el estudio de las infecciones de *Giardia* es el gerbo mongólico (*Meriones unguiculatus*) (Belosevic & cols., 1983). Los gerbos adultos son alta y reproduciblemente susceptibles a la inoculación de quistes y trofozoitos de *G. lamblia* y *G. muris*. Por ello, son considerados como el ideal para el estudio de la respuesta inmune del hospedero y de los cambios fisiopatológicos ocurridos durante el curso de la infección (Belosevic & cols., 1983).

Exquistación y Enquistación *in vitro*

El proceso de exquistación es una de las facetas del ciclo biológico de *Giardia lamblia* que logrado avances más rápidos. A la fecha, se han reportado diferentes técnicas sencillas y reproducibles por medio de las cuales se puede lograr la exquistación experimental de *Giardia*, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Hegner (1927) indujo la exquistación experimental de varios aislados mediante la inyección intragástrica de quistes en ratas de laboratorio. De esta manera, se concluyó que la humedad, la temperatura y los jugos digestivos fueron los principales factores implicados en el proceso de exquistación. Sin embargo, no fue sino hasta cinco décadas después que se logró definir con precisión los requerimientos involucrados en el proceso. Esto fue realizado por Bingham y cols. (1979), quienes indujeron la exquistación *in vitro* de *G. lamblia* mediante la incubación de los quistes en una

solución acuosa ácida (pH 2.0), seguida de un lavado en agua destilada e incubación en un medio de cultivo.

El método de Bingham y cols. (1979) ha sido modificado por algunos investigadores para lograr exquistar tanto a *G. lamblia* como a *G. muris*. Schaefer y cols. (1984), reportaron un protocolo para la exquistación de *G. muris* en el que se empleaba una inducción ácida (pH 2.0) en presencia de bicarbonato de sodio y agentes reductores. Después de la inducción, los quistes se incuban en un medio con solución tiroidea y tripsina cruda. Sauch (1988), reportó una modificación metodológica que utilizaba un medio de incubación similar al de Schaefer y cols. (1984), pero con una acidez moderada. En esta última técnica, se empleaba un lavado posterior a la inducción y una incubación en un caldo mínimo de proteosa-peptona en solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Finalmente, Peely y cols. (1991) reportaron la inducción de exquistación de *G. muris* en un medio acuoso con fosfato de potasio (0.1 M) y bicarbonato de sodio (0.3 M) con incubación posterior en medio TYI-S-33 o en PBS (pH 7.5). Todas estas modificaciones metodológicas han reportado buenos valores de exquistación (>90%).

La secuencia de eventos que ocurre durante el proceso de exquistación ha sido determinada por observación del proceso *in vitro* de exquistación de *G. muris* (Coggins & Schaefer, 1984; 1986) y de *G. lamblia* (Buchel & cols., 1987). En ambas especies se ha apreciado el mismo comportamiento. Poco tiempo después (5 a 10 minutos) de colocar los quistes en condiciones inductoras a exquistación, se comienza a apreciar movimiento dentro del quiste. Posteriormente, al colocar al quiste en condiciones apropiadas, comienza a salir a través de una apertura lateral de la pared quística un organismo tetranucleado conocido como cistozoito, el cual no tiene la morfología característica de *Giardia*. La citocinesis posterior comienza en un periodo máximo de 30 minutos, produciéndose finalmente dos trofozoitos binucleados. Durante la exquistación se ha visto que existe liberación del contenido de las vacuolas presentes en el quiste, lo cual ha dirigido a la

especulación de que las enzimas vacuolares realizan una función importante en el proceso (Coggins & Schaefer, 1986).

Otro de los acontecimientos importantes en el estudio de *Giardia lamblia* ha sido el desarrollo de una técnica de enquistación *in vitro*, mediante la cual se ha logrado completar su ciclo vital en condiciones de laboratorio. Primeramente, Gillin y cols. (1987) lograron inducir la enquistación *in vitro*, empleando condiciones similares a las que ocurren *in vivo* en la porción final del yeyuno. Poco tiempo después, se determinó un nivel de enquistación óptimo *in vitro* a pH 7.8 y en presencia de sales biliares primarias y ácidos grasos (glicocolato y ácido mirístico) (Gillin & cols., 1988). Posteriormente, se probó que la adición de bilis porcina y lactato al medio de cultivo también inducía la enquistación *in vitro* (Gillin & cols., 1989).

Estos quistes derivados *in vitro* han probado ser similares a los producidos en condiciones biológicas. Una buena proporción (aproximadamente 50%) de los quistes derivados *in vitro*, pueden ser inducidos a exquistar hasta la formación de trofozoitos. Sin embargo, las condiciones precisas para lograr la exquistación de estos quistes producidos *in vitro* son distintas a las que se requieren para los quistes derivados *in vivo*. La inducción de la exquistación fue máxima a un pH de 4.0, disminuyendo drásticamente a pH 2.0. Además, fue necesario adicionar quimotripsina, tripsina y fluido pancreático para estimular la salida de los organismos (Boucher & Gillin, 1990). En vista de ello, se considera que aún es necesario realizar más pruebas que indiquen el grado de similitud de ambos tipos de quistes.

El estudio del proceso biológico implicado en la enquistación *in vitro* ha determinado la aparición inicial de un grupo de antígenos de bajo peso molecular (21 a 39 kDa), específicos de la enquistación (Gillin & cols., 1987). Estos antígenos son inicialmente detectados (5 horas después de la inducción) en un organelo semejante a un aparato de Golgi. Al poco tiempo, aparecen empaquetados en vesículas específicas de enquistación, las cuales se

observan entre 6 y 18 horas después de iniciado el proceso. Estos antígenos son transportados en forma vesicular a la pared del quiste en formación (Reiner & cols., 1990). En una fase posterior (24 horas después de la inducción), aparecen cuatro antígenos de mayor peso molecular (65 a 103 kDa), los cuales son de naturaleza glicoproteica (Gillin & cols., 1987). Se considera posible que algunos de estos últimos antígenos sean los mismos que se localizan en los filamentos de la pared quística (Erlandsen & cols., 1990). La formación de la pared del quiste es completada en un periodo de aproximadamente 44 a 70 horas (Reiner & cols., 1990).

Haciendo un estudio retrospectivo de los logros obtenidos en el estudio de laboratorio del organismo *Giardia lamblia*, se aprecia un avance sorprendente desde que se logró su cultivo *in vitro* (Meyer, 1976). A través del desarrollo del medio TYI-S-33 suplementado con bilis para el cultivo de *Giardia* (Keister, 1983) y de las técnicas para la exquistación *in vitro* de trofozoitos de quistes (Bingham & Meyer, 1979), se ha posibilitado el aislamiento, amplificación y mantenimiento de distintos aislados en el laboratorio. Otro importante avance fue la posibilidad de completar el ciclo biológico en cultivo axénico, mediante la enquistación *in vitro* (Gillin & cols., 1987) y su posterior exquistación (Boucher & Gillin, 1990). Otro desarrollo que aumentó el valor del cultivo *in vitro* fue el desarrollo de un método para el establecimiento de líneas clonadas de *G. lamblia*, tanto de un único trofozoito como de un quiste (Baum & cols., 1988; Binz & cols., 1991). En un futuro próximo se podrán desarrollar estudios más precisos acerca de las dinámicas de crecimiento, el comportamiento reproductivo y las interacciones competitivas entre clonas de *Giardia* y esto redundará en una mejor comprensión de la biología de este parásito (Thompson & Reynoldson, 1993).

Finalmente, se debe enfatizar que una proporción de aislados de *G. lamblia* ha demostrado ser refractarios al establecimiento *in vitro* y a su subsecuente amplificación (Meloni & Thompson, 1987).

Por lo cual, gran parte del conocimiento de su bioquímica y genética se basa en las pocas variedades que han podido ser cultivadas. De manera que no se puede descartar la posibilidad de que alguna de estas cepas sea resultado de un tipo de selección artificial inducida en el laboratorio (Nash & cols., 1985).

Variación Intraespecífica

En los últimos 20 años se ha obtenido una gran cantidad de información acerca del parásito intestinal *G. lamblia*. La introducción del cultivo *in vitro* y el desarrollo en el laboratorio de todas las fases del ciclo vital, así como el establecimiento de líneas clonadas a partir de células únicas, han permitido un avance impresionante en el grado de conocimiento del organismo. Sin embargo, aún existen muchos aspectos que permanecen desconocidos. Un factor limitante para la elucidación de muchos aspectos ha sido la gran heterogeneidad, tanto fenotípica como genotípica, demostrada en este género de parásitos, particularmente dentro del grupo morfológico *Giardia lamblia*. La determinación del origen y la significancia de tal variación ha sido el principal interés en la investigación de este organismo.

Patrones de Isoenzimas

El método de caracterización más ampliamente utilizado ha sido el análisis electroforético de isoenzimas. Este estudio comparativo es relativamente sencillo y tiene la capacidad de examinar un gran grupo de genes estructurales, proporcionando evidencia genética para distinguir polimorfismo inter e intra específico. La técnica involucra una separación electroforética de las proteínas y la posterior visualización de actividades enzimáticas específicas mediante reacciones de tinción. Empleando estas técnicas se han estudiado aislados con idénticos patrones de

bandas pero, también se han visto diferencias sustanciales aun entre clones derivadas de un mismo aislado.

La terminología bioquímica define a las isoenzimas como a las diferentes formas moleculares de una enzima que producen bandas con distinta movilidad electroforética. El arreglo de una o más bandas en un sistema enzimático se conoce como patrón enzimático, y a su vez, el conjunto de patrones producido por un aislado se denomina perfil enzimático. Un zimodema, es un grupo de uno o más aislados que tienen el mismo perfil enzimático. (Meloni & cols., 1988).

En 1983, Bertram y colaboradores fueron los primeros que aplicaron este análisis en varias cepas de trofozoitos de *Giardia*. Ellos lo emplearon como una alternativa bioquímica para la determinación de especies del género, la cual pudiera distinguir entre aislados provenientes de distintos hospederos. Utilizando seis sistemas enzimáticos, se logró dividir en tres grupos distintos a cinco aislados provenientes de humano, gato y cobayo, pero no se encontró una correlación entre el zimodema y el hospedero de origen.

La heterogeneidad de zimodemas entre aislados ha sido corroborada por otros investigadores. Por ejemplo, Meloni & cols. (1988), empleando 10 sistemas enzimáticos lograron diferenciar la existencia de 13 zimodemas en el estudio de 30 aislados de *G. lamblia* provenientes de humanos y felinos. De la misma manera, Andrews y cols. (1989) demostraron la heterogeneidad existente entre 29 aislados australianos analizados en 26 locus enzimáticos. En base a los datos electroforéticos obtenidos, estos investigadores propusieron que la heterogeneidad genética encontrada se debía a la presencia de una especie compleja. De acuerdo a esto, el parásito *Giardia lamblia* comprendería a una mezcla de tres o cuatro especies genéticamente distintas, pero morfológicamente semejantes.

El enfoque más común de este tipo de investigaciones ha sido la búsqueda de una correlación entre los perfiles de isoenzimas y

ciertas características clínicas y epidemiológicas del parásito. Abaza y colaboradores (1991), compararon cuatro perfiles de isoenzimas de cuatro aislados de *G. lamblia* obtenidos de hospederos sintomáticos y asintomáticos, de distintas áreas geográficas. Se investigó el grado de correlación de los datos electroforéticos obtenidos y las características conocidas de cada aislado, con respecto a la infectividad y el patrón de excreción de quistes en gerbos (*Meriones unguiculatus*). No se encontró una relación entre los zimodemas y la sintomatología del hospedero de origen del aislado, ni tampoco con el origen geográfico del mismo. En cambio, los tres zimodemas en que se dividieron los cuatro aislados sí compartieron similares patrones de excreción de quistes y grado de infectividad en gerbos. La posible correlación entre el grupo genético y estos factores de virulencia se consideró interesante, no obstante el reducido número de aislados comparados y sistemas enzimáticos probados.

De igual manera, Moss y colaboradores (1992), obtuvieron los patrones de isoenzimas de los trofozoitos de 11 cepas axénicas de *G. lamblia*. Las cepas fueron aisladas de animales y humanos (tanto sintomáticos y asintomáticos) de distintas regiones geográficas. Se probaron doce sistemas enzimáticos, pero solo ocho exhibieron patrones de isoenzimas reproducibles y bien definidos. Las cepas analizadas fueron agrupadas en cuatro zimodemas. Al no encontrar una correlación del zimodema con ninguna de las variables conocidas de las cepas estudiadas se concluyó que podía existir un alto grado de similitud entre cepas genéticamente distintas.

En contraste a estos hallazgos, en otros trabajos se ha encontrado un alto grado de homogeneidad entre los zimodemas de distintos aislados. Por ejemplo, Cedillo-Rivera y cols. (1989) y Stranden y cols. (1990), examinaron 19 aislados de humanos (México) y nueve aislados de humanos y animales (Suiza), respectivamente, encontrando similitud en todos los patrones enzimáticos, considerando que los aislados eran genéticamente similares. Los mismos aislados suizos (Stranden & cols., 1990) que

demonstraron ser genéticamente homogéneas fueron incluidos en otro análisis de comparación de aislados de distintos orígenes geográficos (Meloni & cols., 1992). En esta investigación, se probaron 13 sistemas enzimáticos, realizando los análisis electroforéticos de 31 aislados australianos, 7 aislados suizos y a la cepa de referencia Portland 1. Los 39 aislados fueron divididos en 22 zimodemas. Los aislados australianos fueron divididos en 19 zimodemas junto con el P-1, en cambio, los 3 zimodemas restantes se conformaron únicamente de aislados suizos. Mediante la distancia euclidiana de las diferencias entre zimodemas, se encontró una mayor variación genética entre los aislados australianos que entre los aislados Suizos. De esta manera, se demostró la existencia de un posible efecto del origen geográfico de los aislados, sobre el grado de variación genética encontrado.

La caracterización genética de aislados de *G. lamblia* por medio del análisis de isoenzimas ha sido utilizado en el estudio de aspectos tales como estructura poblacional, biología reproductiva y epidemiología (Meloni & cols., 1995). Andrews y cols. (1992b), compararon los perfiles alélicos de tres aislados de *Giardia* cultivadas *in vivo* e *in vitro*, para probar el efecto de las condiciones de cultivo sobre estos perfiles. La hipótesis nula del estudio fue que las muestras del mismo aislado clínico, pero desarrolladas en diferentes condiciones de cultivo, tenían idénticos perfiles alélicos. Primero se estableció a los aislados clínicos en ratones lactantes y luego fueron adaptados al cultivo *in vitro*. Se analizaron 11 locus enzimáticos de una muestra cultivada *in vitro* y otra derivada *in vivo* de cada aislado. En todos los casos se encontraron marcadas diferencias alélicas de las muestras cultivadas axénicamente, con respecto a su correspondiente muestra cultivada *in vivo*. Esta variación fue adjudicada a la existencia de una expresión regulada de genes alternativos (interrupción genética) o, a un proceso de selección

de genotipos presentes en el aislado clínico original, por las diferentes condiciones del cultivo *in vitro*.

Estas hipótesis fueron examinadas en otro estudio de los mismos autores (Andrews & cols., 1992a). Para ello, se siguió el mismo procedimiento del estudio anterior, pero realizando clonaciones en las diferentes etapas de cada muestra (*in vivo* e *in vitro*). La comparación de 20 locus enzimáticos de los cultivos sin clonación previa detectó marcadas diferencias alélicas entre los aislados clínicos, tanto del cultivo *in vitro* como *in vivo*. En contraste, todos los clones producidos de cada aislado retuvieron idénticos perfiles alélicos en todas las condiciones de cultivo. Interesantemente, cuando el muestreo fue después del establecimiento *in vitro*, las diferencias genéticas encontradas entre aislados fueron muy limitadas. Estos hallazgos soportaron la teoría del proceso de selección preferencial de organismos con genotipos específicos por las condiciones de cultivo. De esta manera, se estimó la presencia de al menos dos y posiblemente hasta cuatro genotipos distintos dentro de cada aislado clínico.

Variación Antigénica

El estudio inmunológico de *Giardia* se ha enfocado principalmente en las proteínas superficiales y en los elementos del citoesqueleto (Adam, 1991). El trabajo de Smith y cols. (1982) fue el primero que demostró la variación antigénica existente entre trofozoitos de *G. lamblia* provenientes de diferentes regiones geográficas. Poco tiempo después, Nash y Keister (1983), prosiguieron con la caracterización de las dos cepas de referencia (WB y Portland-1), confirmando su heterogeneidad antigénica. Además, estos investigadores demostraron la localización antigénica superficial en los trofozoitos y su posterior liberación hacia el medio externo.

Nash y cols. (1985) evaluaron las diferencias antigénicas de 15 aislados de *G. lamblia*, por medio de ensayos de reactividad y

electroforesis de proteínas superficiales de trofozoitos. En este estudio, se encontró una correlación entre la expresión antigénica superficial y los patrones de bandeo del análisis de productos de restricción de DNA de diferentes aislados. En base a eso, se dedujo que las diferencias antigénicas apreciadas entre aislados tenían un origen genético.

En 1988, Nash y colaboradores, demostraron que la marcada variación antigénica detectada era debida a la capacidad de un solo organismo para generar individuos con distintos antígenos superficiales. En este estudio se expuso una clona de la cepa WB a la acción de un antígeno monoclonal citotóxico, destruyendo a la mayoría de los organismos. La población sobreviviente demostró la aparición de nuevos epítopes, los cuales no reaccionaron con el anticuerpo citotóxico inicial. Al realizar el mismo procedimiento con los anticuerpos citotóxicos contra los nuevos epítopes aparecidos en la progenie resistente, se observó que los pocos sobrevivientes variaron su expresión antigénica. Esto indicó que se había tenido una pérdida y un subsecuente reemplazo de dos epítopes distintos dentro de las clonas individuales de un mismo aislado. Esta variabilidad antigénica ocurre también en condiciones *in vivo*. La inoculación de gerbos con clonas definidas de *Giardia*, sirven para el posterior estudio de los antígenos superficiales presentes en los trofozoitos. En estas condiciones, solo se demostró un recambio antigénico posterior a la inoculación (Aggarwal & Nash, 1988).

Pimenta y colaboradores (1991), determinaron la localización celular de los antígenos variantes en un grupo de clonas de *G. lamblia* mediante pruebas inmunocitoquímicas. Primeramente, se reconoció el antígeno predominante en una clona, por medio de su anticuerpo monoclonal. En todos los trofozoitos que presentaron el antígeno se observó la superficie cubierta por una capa glicoproteica, densa y uniformemente marcada por el anticuerpo monoclonal. Algunos trofozoitos no reaccionaron con el anticuerpo debido a la carencia de esta capa superficial, lo cual fue

corroborado mediante el estudio de criofractura. Estos descubrimientos localizaron a los antígenos variables en una capa superficial del parásito e identificaron a una minoría de la población que carecía de esa capa superficial. Esta variabilidad subpoblacional de epítopes superficiales (*in vivo* e *in vitro*) ha sido demostrada tanto en aislados parentales como en clones de un mismo aislado (Nash & cols., 1990).

Los antígenos variantes de superficie comprenden una familia multigénica. Esto ha sido corroborado por la presencia de múltiples bandas de hibridación en el análisis de DNA, de varias clones del aislado WB. Este hecho, ha evidenciado la existencia de múltiples arreglos en el gen de la variante antigénica CRP-170. La secuencia de aminoácidos y el marcaje radiactivo de estas proteínas con [³⁵S]cisteína demuestra la presencia de un 12 % de cisteína, en la forma de tetrapéptidos CXXC (Adam & cols., 1988). Esta variación antigénica superficial ha sido corroborada en otros dos aislados de *Giardia lamblia*, GS y N y sus respectivas clones (Aggarwal & cols., 1989).

Además del antígeno superficial CRP-170 encontrado en la cepa WB (Adam & cols., 1988), se ha encontrado otras proteínas superficiales ricas en cisteína. Las principales son: TSA-417 (Gillin & cols., 1990), VSP-1267 (Mowatt & cols., 1991), VSP-H7 (Mowatt & Nash, 1992), CRP 72 (Adam & cols., 1992), TSP-11 (Ey & cols., 1993). Todas estas proteínas han demostrado ser variables dentro de un mismo aislado, además de un alto contenido de cisteína (11 a 12%) en forma de tetrapéptidos CXXC distribuidos al azar y una región carboxi-terminal altamente conservada.

El repertorio antigénico de estas proteínas superficiales ha sido estimado entre 20 y 184 variantes, para el gen CRP-170 del aislado WB (Nash & cols., 1990) y, entre 133 y 151 para el gen VSPH7 del aislado GS (Mowatt & cols., 1992). El rápido recambio antigénico de este grupo de proteínas se ha estudiado en las cepas GS y WB, en donde se requieren de 6.5 a 12 generaciones para detectar una nueva variante específica (Nash & cols., 1990).

La importancia de la variación de esta familia de proteínas ricas en cisteína es sugerida por su gran repertorio antigénico y su rápido cambio en expresión. Sin embargo, hasta la fecha no se ha determinado su papel específico en la biología del parásito. El hecho de que los trofozoitos presenten susceptibilidad a los anticuerpos dirigidos contra estas proteínas sugiere que la función de esta variación pueda ser una forma de evasión a la respuesta inmune del hospedero (Nash, 1992).

Hasta la fecha, no se ha podido definir con precisión la función que desempeña el sistema inmune del hospedero en los casos de giardiasis. En la infección experimental de ratones neonatales con una línea clonada del aislado GS, se demostró la presencia del epítipo original durante los primeros 22 días. No obstante, la recuperación espontánea del ratón se apreció hasta 42 días después de la inoculación. Debido a que no se encontró evidencia de una respuesta inmune dependiente de linfocitos T, se concluyó que el antígeno superficial original no evocó una respuesta inmune, o bien, que se produjo una respuesta no dependiente de células T (Gottstein & cols., 1990).

En los estudios experimentales realizados en humanos sí se ha evidenciado la importancia de una respuesta inmune en la eliminación de este organismo. En la infección experimental de voluntarios con una clona del aislado GS se detectaron anticuerpos específicos durante un periodo de 22 días posteriores a la inoculación (Nash & cols., 1990b). Este patrón temporal de respuesta de anticuerpos en humanos es consistente con la hipótesis de que la variación antigénica es un medio de evasión de la respuesta inmune del hospedero. Sin embargo, es interesante el hecho de que en el modelo gerbo se ha encontrado que existe solamente un cambio del antígeno superficial en los 7 días posteriores a la inoculación, permaneciendo sin variación posterior hasta los 28 días (Aggarwal & Nash, 1990). Este patrón temporal de variación antigénica resulta más consistente con una

adaptación inicial a las condiciones *in vivo*, después del cultivo axénico, que a una evasión de la respuesta inmune del hospedero.

Udezulu y colaboradores (1992), encontraron una posible relación entre los perfiles antigénicos y la patogenicidad de clones de *G. lamblia* (cepa WB). Primero, se determinó el fenotipo de cada clona por una prueba indirecta de inmunofluorescencia, usando un suero policlonal de conejo anti trofozoitos de *G. lamblia* de la cepa parental. Luego, se escogieron dos clones, una altamente fluorescente, F+, en la cual más del 95% de los trofozoitos fluorescieron, y una clona de baja fluorescencia, F-, en la cual fluorescieron menos del 5%. Se realizaron estudios electroforéticos e inmunotransferencia ligada a enzima de las fracciones proteicas de membrana de ambas clones y de la cepa parental, revelándose diferencias en los perfiles de proteína total y en los perfiles antigénicos. Una prueba de citotoxicidad sérica con el suero policlonal demostró la susceptibilidad de las clones F- y la resistencia de la mayoría de las células de la F-. La evaluación de la infectividad *in vivo* (gerbo) de ambas clones, indicó que la clona F- inició infecciones más fácilmente, produjo más quistes, tuvo una mayor carga intestinal de trofozoitos y produjo un síndrome clínico más severo. En cambio, la clona F+ fue fenotípicamente menos estable y en algunos casos tomó mayor tiempo en ser aclarada. Estos hechos demostraron la importancia de los antígenos de superficie en el desarrollo de la patología.

Una razón alternativa para la variación de las proteínas ricas en cisteína puede ser la protección contra las proteasas intestinales conferida por la expresión de un antígeno superficial mayoritario. Tres clones de *Giardia* (WB-2X, GS/MH-7, B6) que expresaban distintos antígenos superficiales fueron sometidas a la acción de tripsina y quimiotripsina en el medio de cultivo. La clona GS/MH-7 fue resistente a la acción de ambas enzimas. Las otras dos clones fueron susceptibles al efecto citotóxico de ambas proteasas, presentándose lisis celular dependiente del tiempo de acción y la concentración de la enzima. Los trofozoitos

sobrevivientes a la exposición proteolítica se reprodujeron, expresando diferentes antígenos superficiales y demostrando resistencia a las proteasas intestinales. Esto se consideró indicativo de la importancia biológica de la expresión de diferentes antígenos superficiales. Debido a que su asociación con la susceptibilidad a proteasas podía permitir al trofozoito sobrevivir en distintos medios intestinales (Nash & cols., 1991).

Hasta la fecha, no se ha determinado con precisión la función biológica de los antígenos superficiales. Las principales causas de esto han sido el alto grado de variabilidad antigénica, la presencia de una inmunidad protectora parcial y la dificultad de comparación de resultados de distintos laboratorios, debido al uso de diferentes aislados y técnicas de estudio.

Variación Genética

En la actualidad, el principal enfoque de estudio de *Giardia lamblia* es el análisis de su material genético (DNA y RNA). La ventaja de este tipo de investigación es la independencia de influencias medioambientales y la obtención de información acerca de las secuencias genéticas no expresadas.

El análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) detecta diferencias genéticas por medio de la comparación de los distintos patrones de bandas de DNA. Estos patrones son producidos por las variaciones en el tamaño de los fragmentos del material genético que han sido sometidos al proceso de restricción y, electroforesis o hibridación con pruebas genéticas específicas de ácidos nucleicos. Bioquímicamente, se denomina como esquizodema a los aislados con distintos patrones polimórficos de DNA (Le Blancq, 1994).

La primera aplicación de este tipo de técnicas en el estudio de *Giardia* fue la comparación de 15 aislados provenientes de una variedad de hospederos (Nash & cols., 1985). La comparación de los patrones polimórficos de restricción pudo distinguir nueve grupos

de cepas con distintos patrones de bandedo. Los aislados de un gato, un castor y de cuatro humanos tenían el mismo patrón de bandedo, en cambio, los de un cobayo, un castor y otros seis aislados de humanos, produjeron patrones únicos. Posteriormente, Meloni y colaboradores (1989), emplearon una técnica similar para analizar 48 aislados de *Giardia* provenientes de gatos y humanos, de distintas áreas geográficas. Los aislados se dividieron en siete grupos en base al patrón de bandedo. Los aislados de felinos produjeron patrones idénticos o muy similares a los de seis aislados de humanos. En este estudio se apreció que las agrupaciones basadas en los patrones de bandedo de DNA, mostraron una fuerte correlación con las agrupaciones del análisis electroforético de isoenzimas. De igual manera, De Jonckheere y colaboradores (1990), compararon aislados de primates y roedores mediante varias técnicas electroforéticas. Detectaron dos perfiles de fragmentos polimórficos de restricción tanto por la tinción con bromuro de etidio como por hibridización con una porción de DNA ribosomal. Estas dos agrupaciones fueron corroboradas mediante los zimodemas y los patrones de punto isoeléctrico. En este estudio, los zimodemas de aislados provenientes de animales resultaron ser idénticos a otros previamente encontrados en aislados de humanos.

La amplificación de productos genéticos mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR), ha sido empleada para detectar polimorfismo en cadenas sencillas de regiones del gen codificador para la parte 18S del rRNA (Weiss & cols., 1992). En este estudio, se compararon 35 aislados de *G. lamblia* provenientes de hospederos humanos y animales, de diversas regiones geográficas. En base a las sustituciones detectadas dentro del fragmento de DNA amplificado se pudo conformar a los 35 aislados dentro de tres grupos. Esta agrupación demostró ser análoga a las otras divisiones realizadas previamente por medio de los patrones antigénicos y del análisis del polimorfismo de restricción.

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa también ha sido empleada para la amplificación *in vitro* de una región

semiconservada de dos genes homólogos (*tsp11* y *tsp417*), que codifican para antígenos superficiales de trofozoitos de *G. lamblia* (Ey & cols., 1993a). Los fragmentos de DNA resultantes distinguieron la presencia de dos grupos principales, los cuales correlacionaron con los grupos genéticos identificados previamente por Andrews y cols. (1989) mediante la electroforesis de isoenzimas. Esa correlación entre las dos técnicas fue sustentada por el análisis de restricción de los productos de la amplificación de aislados clonales, pertenecientes al grupo genético II (Ey & cols., 1993b).

El empleo de una técnica de tipificación de DNA (DNA fingerprinting) que utiliza algunas enzimas de restricción y una porción genética definida, ha demostrado ser un método más específico para la identificación de cepas genéticamente idénticas de *Giardia*. Archibald y cols. (1991) encontraron patrones polimórficos únicos en cinco aislados que previamente habían demostrado ser idénticos por el análisis de restricción de su DNA genómico. Otra investigación realizada por medio de esta técnica es la de Carnaby y cols. (1994), quienes estudiaron la variación genotípica de 19 aislados cultivados *in vitro* e *in vivo*. Se demostró la presencia de heterogeneidad genotípica entre todos los aislados clínicos y clonados iniciales cultivados en condiciones estándar y, sus respectivos cultivos 4 meses después. Se encontraron diferencias entre los aislados secuenciales y sus clones, tomadas antes y después del tratamiento con metronidazol de un paciente con giardiasis crónica. Finalmente se concluyó que la aparente heterogeneidad genotípica demostrada por *G. lamblia* era debida a la plasticidad del genoma y no a la presencia de subpoblaciones dentro de la misma infección.

Sin embargo, poco tiempo después se reportaron dos estudios que apoyaban la teoría de subpoblaciones genéticas, sugiriendo la presencia de infecciones mezcladas de *Giardia* en pacientes humanos con giardiasis crónica (Butcher & cols., 1994; Upcroft & Upcroft, 1994). Primero, Butcher y colaboradores (1994), obtuvieron dos

aislados clínicos por aspiración duodenal de un paciente con giardiasis crónica e hipogamaglobulinemia, antes y después de tres cursos quimioterapéuticos con metronidazol. Los dos aislados demostraron diferente sensibilidad al metronidazol, siendo 20 veces más resistente el aislado posterior al tratamiento. La presencia de mezclas de organismos se corroboró mediante el análisis de los perfiles antigénicos superficiales, los patrones de marcaje metabólico con ³⁵S-metionina, patrones isoenzimáticos y tipificación (fingerprinting) de DNA.

Posteriormente, Upcroft y Upcroft (1994) obtuvieron 25 cultivos de *Giardia lamblia* a partir de la exquistación *in vivo* y el subsecuente cultivo *in vitro* de una muestra de materia fecal de humano. Las técnicas bioquímicas empleadas fueron el análisis polimórfico de restricción e hibridización con dos regiones genéticas, el cariotipo electroforético y la tipificación de DNA (fingerprinting). Finalmente, se determinó la existencia de dos variedades genéticas distintas dentro de la población total original. Estos resultados apoyaron la teoría de un proceso de selección debido a las condiciones de cultivo.

La diversidad genotípica demostrada por este organismo podría tener importantes implicaciones biológicas. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha podido probar si esta heterogeneidad genotípica se expresa de manera programada o fortuita. Sólo se ha reportado la existencia de posibles influencias genotípicas en la expresión de antígenos de superficie y en la resistencia a algunos agentes quimioterapéuticos.

MATERIALES Y METODOS

Muestras Biológicas

El aislamiento de quistes de *Giardia lamblia* se realizó a partir de muestras de excremento de personas infectadas por el parásito, las cuales habitaban en la ciudad de Hermosillo. Los individuos sintomáticos de giardiasis fueron reclutados en el departamento de consulta externa del Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES), del Centro de Salud "Dr. Domingo Olivares" y, del Centro Médico ISSSTE-SON "Dr. Ignacio Chávez". Los principales síntomas gastrointestinales presentados fueron diarrea, dolor abdominal y/o vómito. Estos síntomas desaparecieron después del tratamiento con drogas giardicidas. Los portadores asintomáticos de giardiasis fueron reclutados en jardines de niños.

El diagnóstico de la parasitosis se realizó mediante exámenes coproparasitológicos, empleando la técnica de flotación en sulfato de zinc (Faust & cols., 1939) (Anexo 2). Las muestras positivas fueron procesadas para la separación de quistes de *Giardia lamblia*, de acuerdo al método que se describe en la siguiente sección.

Purificación de quistes

La técnica para el aislamiento de los quistes consistió en una combinación de los métodos de Roberts-Thomson y cols. (1976), Sheffield y Bjorvatn (1977), Bingham y cols. (1979) y Suelna y Medrano (1995). El proceso de aislamiento se realizó a partir de la materia fecal total conseguida de cada portador (1 a 3 muestras). Primero se resuspendió la materia fecal en 500 mL de agua destilada y se filtró a través de cuatro capas de gasa. La suspensión resultante fue filtrada a través de tres mallas de nylon (106, 63 y 38 μ m; DUAL MFG Co.), respectivamente. El filtrado final se centrifugó (IEC/Centra GP8R) a baja velocidad,

tres veces (400, 300 y 200 g por 5 minutos, a 4°C). En estas centrifugaciones se emplearon recipientes de 500 mL (LRC) para los primeros dos lavados y, de 250 mL (Walgenc) para el último. El sedimento fue resuspendido en 500 mL de agua destilada. A continuación se realizaron dos centrifugaciones en gradiente discontinuo de sacarosa.

Las soluciones de sacarosa empleadas en las centrifugaciones fueron preparadas a partir de una solución concentrada de azúcar blanca (500 g/L). La solución concentrada de azúcar había sido sometida a un tratamiento previo para la eliminación de contaminantes. El tratamiento consistió en dos filtraciones sucesivas en papel Whatman # 1 y # 3, respectivamente y, en un calentamiento a ebullición por 10 minutos. La densidad relativa de la solución de sacarosa utilizada en los gradientes, fue ajustada por aproximación a partir de la solución concentrada con la ayuda de un densitómetro para líquidos pesados (Rohsan).

La centrifugación inicial empleó una solución de sacarosa con densidad relativa igual a 1.13 (aproximadamente 1 M). Para ello, se colocaron 25 mL de suspensión fecal fría sobre 25 mL de solución de sacarosa (4°C), en tubos cónicos de polipropileno de 50 mL (Corning). Los tubos con las dos fases de suspensión fecal-solución de sacarosa, fueron centrifugados a 1000 g por 6 minutos, a 4°C. La interfase agua-sacarosa de cada uno de los tubos fue extraída con pipetas serológicas y una bomba de vacío (Drummond Scientific Co.). El volumen total de las interfases recogidas fue resuspendido en agua destilada (1:1). El exceso de sacarosa fue eliminado por medio de dos lavados por centrifugación a 1000 g por 5 minutos, a 4°C. Finalmente, los sedimentos de esta primera fase de centrifugación en gradiente de densidad fueron llevados hasta un volumen de 500 mL con agua destilada, enfriándose a 4°C.

El segundo gradiente discontinuo de sacarosa fue realizado con una solución de sacarosa con densidad relativa de 1.105 (aprox. 0.85 M). Se colocaron 25 mL de la suspensión obtenida del primer gradiente sobre una capa de 25 mL de solución de sacarosa

(4 °C), en tubos cónicos de polipropileno de 50 mL (Corning). Los tubos fueron centrifugados a 600 g durante 20 minutos, a 4°C. El volumen obtenido de las interfases se resuspendió en agua destilada (una proporción de 1:1) y se lavó dos veces, centrifugando a 1000 g por 5 minutos y 4°C. Las pastillas de quistes aislados se resuspendieron en 5 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS), pH 7.2 (Anexo 1) y se contaron en una cámara de Neubauer (Superior, W. Germany).

La axenización del aislado de quistes en PBS fue obtenida por adición de Gentamicina (800 µg/mL) y Anfotericina B (1 µg/mL) e incubación a 10°C, durante tres días (Suelna & Medrano, 1995). Los aislados axénicos fueron almacenados a 4°C hasta su empleo.

Desenquistación *in vitro*

La desenquistación de *G. lamblia* se realizó con una modificación de la metodología descrita por Sauch (1986). La técnica empleada consistió en una fase de inducción ácida y una fase de exquistación. La fase de inducción consistió en una incubación de los quistes en presencia de una solución ácida. Primero, una porción de 0.5 mL del aislado conteniendo 1×10^6 quistes fue ambientada a 37°C. Por otra parte, se preparó una solución de inducción constituida por 5 mL de solución acuosa de HCl (pH 1.5), más 3 mL de solución reductora (Solución de Hank con L-cisteína-HCl 57 mM y ácido ascórbico 11 mM) y, 3 mL de NaHCO₃ 0.1 M. Posteriormente, se adicionó la solución ácida a la porción de quistes y se incubó a 37°C en un baño de agua (VWR Scientific), durante 45 minutos. Al finalizar la fase de inducción se centrifugó (600 g por 5 minutos) y se eliminó la solución ácida por decantación. El sedimento de quistes se lavó con PBS (pH 7.2) y se centrifugó a 600 g por 3 minutos, a temperatura ambiente. A continuación se prosiguió con la fase de exquistación, mediante la incubación en un medio nutritivo. Se empleó medio de cultivo TYI-

S-33 modificado por Keister (1983), complementado con 10 % (v/v) de suero fetal bovino inactivado (Sigma Chem. Co.), gentamicina (800 µg/ml) y anfotericina B (2.5 µg/ml) [anexo 1]. La exquistación fue desarrollada en tubos de poliestireno con tapón de rosca de 15 mL, estériles (Falcon Sector, Dickinson Labware). El cultivo se incubó a 37°C y se observó cada 2 horas, empleando un microscopio invertido (World Precision Instruments Inc.). Cuando los tubos presentaron trofozoitos adheridos a sus paredes, se centrifugó (600 g, 3 min) y se eliminó el medio, resuspendiendo en medio nuevo. En los casos que se deseaba extraer las proteínas de los trofozoitos, se incubó 4 horas después de la inducción ácida. Luego se colocó el cultivo en un baño de hielo agua (20 minutos) y se lavó dos veces con PBS (pH 7.2) (5 minutos a 1000 g).

Mantenimiento y Cultivo de Aislados

Las cepas de referencia empleadas fueron trofozoitos de *Giardia lamblia* de los aislados Portland-1 (P-1) y WB. Estos cultivos fueron amablemente proporcionados por la Dra. Guadalupe Ortega Pierres, del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV). La cepa P-1 (American Type Culture Collection # 30388) se aisló originalmente de una paciente sintomática de 36 años de edad, en Portland, Oregon (Meyer, 1976). La cepa WB (ATCC # 30957), fue aislada de un individuo de 27 años de edad con 3 años de giardiasis crónica, la cual se cree que fue adquirida en Afganistán (Smith & cols., 1982a).

Ambas cepas de parásitos fueron cultivadas axénicamente en medio TYI-S-33 (Anexo 1), incubando a 37°C (Barnstead/Thermolyne, modelo 142325) en viales de vidrio con tapón de rosca. Los organismos se cosecharon en fase logarítmica de crecimiento (aproximadamente 72 horas de incubación). La separación de los trofozoitos de la pared del tubo fue realizada mediante el enfriamiento de los recipientes en un baño de hielo-agua durante 30 minutos. Los viales se agitaron suavemente de 5 a 10 veces y se

vertió su contenido (medio con trofozoitos no adheridos), en tubos Falcon estériles, de 15 mL. Posteriormente, se realizaron dos lavados con centrifugación (IEC/Centra GPR) a 500 g. por 5 minutos a 4°C. Los trofozoitos se contaron en un hematómetro (Superior, W. Germany) y se ajustó su concentración de acuerdo al ensayo en que se emplearon.

El aislado se mantuvo con subcultivo cada tercer día, mediante la dilución 1:10 con medio TYI-S-33 nuevo, del cultivo en fase logarítmica. El almacenamiento posterior de trofozoitos viables se realizó con congelamiento a -70°C, en presencia de dimetil sulfoxido al 10 % (Phillips & cols., 1984) (anexo 2).

Extracción de Proteínas

Las proteínas de los aislados de quistes y de trofozoitos se obtuvieron según el procedimiento de Carroll y cols. (1989) modificado en nuestro laboratorio. Para ello, un paquete celular de aproximadamente 3×10^6 quistes o trofozoitos de *Giardia* fue concentrado con 5 minutos de centrifugación a 1000 g. Los aislados con menos de 3×10^6 organismos fueron utilizados en su totalidad. La pastilla celular se resuspendió en 2 mL de PBS adicionado con 1 % de SDS, en tubos (17 x 10 mm) de polipropileno con tapa (Baxter, Healthcare Corp.). La lisis celular de los organismos se realizó por calentamiento en un baño de agua hirviendo. Los trofozoitos fueron sometidos a 5 minutos de calentamiento. Los quistes requirieron hasta 90 minutos de tratamiento para lograr la lisis celular. Posteriormente, los componentes insolubles fueron sedimentados con una centrifugación de 30 minutos a 18 000 RPM (rotor JA-20.1, Beckman, USA) y 15°C. El sobrenadante con las proteínas solubilizadas se colectó por aspiración con pipetas Pasteur. Las proteínas fueron precipitadas por adición de 10 % de ácido tricloroacético (TCA) (Aldrich), lavándose dos veces con acetona y dos veces con etanol absoluto. Finalmente, fueron resuspendidas en 1 mL de PBS (pH 7.2) y se determinó la

concentración obtenida en los diferentes extractos de acuerdo al micrométodo del ácido bicinconínico (micro BCA) (Smith & cols., 1985; (anexo 2).

Un método alternativo para la extracción de proteínas fue la sonicación de los aislados de quistes en un disruptor celular Branson 250. Para ello, se colocó en un tubo (Corex) de 15 mL a una muestra de 10×10^6 quistes en 5 mL de PBS (1 % SDS). El tubo se mantuvo dentro de un baño de hielo para evitar el sobrecalentamiento. El 98 % de los quistes fueron lisados aplicando un tratamiento de 65 Watts durante 12 minutos, con pulsos de 50%. Los componentes insolubles fueron sedimentados con una 30 minutos de centrifugación a 18 000 RPM (rotor JA-20.1, Beckman, USA) y 15°C. El sobrenadante que contenía las proteínas solubilizadas se colectó por aspiración con pipetas Pasteur. Las proteínas fueron precipitadas con adición de acetona (1:5 v/v) a -20°C y, sedimentadas por 5 minutos de centrifugación a 5000 RPM (IEC/Centra 4B). Después, se realizaron dos lavados con etanol absoluto y centrifugación a 5000 RPM (IEC/Centra 4B) durante 5 minutos y, finalmente fueron resuspendidas en PBS. La concentración de proteínas se determinó por el micrométodo del ácido bicinconínico (micro BCA) (Smith & cols., 1985; (anexo 2).

Análisis Electroforético

La caracterización parcial del perfil de proteínas de los extractos de trofozoitos y quistes de *Giardia lamblia*, se hizo por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (PAGE-SDS) (Anexo 2), según Laemmli (1970). Para esto, se prepararon geles (14 x 16 cm x 1.5 mm) con un gradiente continuo del 6 al 18% (p/v) (pH 8.8) en el gel separador (Anexo 2) y de 5% (pH 6.8) en el gel concentrador. Se empleó una cámara de electroforesis vertical (Gibco BRL, modelo V-16) conectada a una fuente de poder (BRL Life Technologies, Inc.,

modelo 500). El amortiguador de cámara contenía Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0.1 % (p/v), y un pH de 8.3 (Anexo 2).

Las muestras se solubilizaron en amortiguador de muestra, 2X, pH 6.8 (anexo 2), calentando en baño de agua a ebullición durante 8 minutos y se aplicaron a los geles. La electroforesis se efectuó con el siguiente patrón: 150 voltios durante 20 minutos y 100 voltios durante 10 horas, o hasta que el estándar preteñido de menor masa molecular (Lisozima 14.3 kDa) migró al borde inferior del gel separador. Para obtener la movilidad electroforética relativa (MR) de las bandas proteínicas separadas, se utilizó un grupo de marcadores de masa molecular preteñidos (Gibco BRL Life Technologies, Inc.). Las proteínas del estándar fueron: miosina (cadena-H, 200 kDa), fosforilasa B (97.4 kDa), albúmina sérica bovina (BSA, 66 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), E-lactoglobulina (18.4 kDa) y lisozima (14.3 kDa). La masa molecular de las bandas de interés se calculó mediante un análisis de regresión lineal al obtener el logaritmo en base 10 de la masa molecular de los estándares y graficarlo contra el R_f calculado para las diferentes bandas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Análisis Coproparasitológico

Durante el periodo de enero de 1995 a marzo de 1996 se visitaron 7 Centros de Desarrollo Infantil (CDI) en donde se buscaron portadores del parásito. La búsqueda se realizó mediante análisis coproparasitológicos de los niños que asistían a estos centros. Para ello, se solicitó la cooperación del personal docente y de los padres de familia, para que llevaran el excremento de los niños. Las muestras de heces tenían que ser la totalidad de la evacuación e ir en frascos limpios, cerrados y marcados con los datos del niño. No solo se muestreó a los niños que asistían al CDI, sino que también se pidió que llevaran muestras de familiares, vecinos o conocidos que quisieran participar en el estudio. De esta manera, se logró analizar las muestras de 473 niños, cuyas edades fluctuaron entre dos semanas y 12 años. El 42% de los participantes logró obtener 3 muestras durante el periodo de recolección. El 58% restante únicamente consiguió una o dos porciones de materia fecal.

El estudio coproparasitológico mostró que el 49.9% de la población analizada se encontró libre de parásitos. El 51.1% restante resultó positivo para uno o más parásitos. En el 35.1% de la población se encontró un solo parásito, en el 12.9% dos parásitos y tres o más organismos en el 2.1% (Tabla 1). El parásito más frecuente fue *G. lamblia* con 21.7% de portadores. El 10.7% presentó a *Giardia* como único parásito y en el 11% restante, se encontró acompañada de otros parásitos (Tabla 1). La frecuencia de aparición y el tipo de parásito encontrados en el estudio se muestra en la tabla 1. La alta incidencia de parasitosis es reflejo de las malas condiciones ambientales y de los deficientes hábitos higiénicos de la población estudiada. La convivencia en los CDI y la incipiente educación salubre fomentan la transmisión de parásitos entre los preescolares.

Tabla 1. Frecuencia y tipo de parásitos protozoarios y helmintos encontrados en los análisis coproparasitológicos realizados.

	Número de Sujetos (n)
Total	473
Casos Negativos	236
Parasitados	237
Un solo parásito	166
Dos parásitos	61
Tres o más parásitos	10
PROTOZOARIOS	
<i>Giardia lamblia</i>	103
Únicamente <i>Giardia</i>	51
<i>Giardia</i> + otro parásito	52
<i>Entamoeba coli</i>	63
<i>Endolimax nana</i>	38
<i>Entamoeba histolytica</i>	8
<i>Retortamona intestinalis</i>	4
<i>Retortamona sinensis</i>	3
<i>Enteromona hominis</i>	1
<i>Blastocystis hominis</i>	1
HELMINTOS	
<i>Hymenolepis nana</i>	50
<i>Strongiloides stercoraris</i>	2
<i>Taenia</i> spp.	1
<i>Trichuris trichuria</i>	1

Aunque en este estudio se encontró que el 21.7% de los niños participantes estaban infectados con *Giardia lamblia*, la falta de seriación del 58% de las muestras analizadas sugiere una subestimación de esta incidencia (Eliatt & cols., 1995). En una investigación realizada en preescolares de zonas urbanas marginadas de Hermosillo, *Giardia* fue el parásito más frecuente (42.2%) (Dávalos, 1989). Así mismo, en otros estudios realizados en zonas serranas y urbanas marginadas del estado de Sonora se detectaron niveles de 32.4% y 30.2% de *Giardia*, respectivamente (Valencia & cols., 1980; 1981). Las prevalencias de parasitosis por *Giardia* detectadas en estos estudios son considerablemente más altas que el 21.7% encontrado en nuestro trabajo. Esta mayor incidencia pueda deberse a las diferencias en el nivel socioeconómico de la población estudiada. Las personas analizadas en nuestro estudio no provienen de poblaciones marginadas. En cambio, Cuamea (1996), realizó una serie de 211 análisis coproparasitológicos seriados en una población similar (jardines de niños), y detectó un 21.4% de parasitosis por *Giardia*. La seriación de los análisis desarrollados por Cuamea (1996), aunado a la semejanza poblacional y la similitud de los niveles de parasitosis, apoyan la validez de la estimación del nivel de parasitismo por *Giardia* detectado en nuestro estudio. Las implicaciones fisiológicas y nutricias de esta infección en una población en pleno crecimiento son considerables.

La mayoría de los portadores en que se detectó a *Giardia* sola (10.7%) presentaron una infección ligera. En estos casos, se apreciaron menos de tres quistes por campo del microscopio (10X), aún después del proceso de concentración. La utilidad de esas muestras fue limitada, debido al reducido número de quistes que se podían recuperar de las heces. En vista de que el parásito presenta distintos patrones de excreción (Rentdorff, 1954), se solicitó muestra a todas las personas con *Giardia* sola (51). Al final, solamente 10 sujetos llegaron a estar fuertemente infectados (>2 quistes en 10X) durante el periodo de recolección.

Obtención de Aislados Axénicos

La metodología de aislamiento se quistes utilizada fue una combinación de los métodos de Roberts-Thomson y cols. (1976), Sheffield y Bjorvatn (1977), Bingham y cols. (1979) y de la tesis de licenciatura de Buelna y Medrano (1995). Mediante la técnica mostrada en la sección de materiales y métodos, se logró separar a los quistes de los otros componentes fecales, en base a sus diferencias de densidad. Los aislados de quistes obtenidos estuvieron libres de contaminantes y en cantidad suficiente para el estudio experimental. En la figura 3 se muestra el grado de limpieza de un aislado obtenido mediante esta técnica.

La primera fase del proceso de aislamiento consistió en una serie de cuatro filtraciones, por medio de la cual se eliminaron los componentes de mayor tamaño. Las partículas filtradas eran principalmente bacterias y residuos alimenticios y, en menor proporción, los quistes y restos epiteliales (Figura 4). El tamaño máximo de las partículas filtradas fue de aproximadamente 50 μm , debido a que algunas formas alargadas, mayores de 38 μm , pasaron a través de los poros pequeños.

La mayor parte de los componentes presentes en la suspensión fecal filtrada eran bacterias (Figura 5). Por lo cual, se incorporó una fase de eliminación de componentes ligeros, consistente en 3 centrifugaciones a baja velocidad. Esta separación, se realizó antes de la primera centrifugación en gradiente de sacarosa, para evitar el posible efecto de la contaminación bacteriana sobre la eficiencia del proceso de aislamiento. Este procedimiento de eliminación fue reportado anteriormente por Douglas y colaboradores (1987), quienes redujeron más de 10^5 veces a la contaminación bacteriana, por medio de 4-5 lavados de 5 minutos a 1000 RPM (IEC-4000).

El proceso de lavado de la suspensión fecal proveniente de las filtraciones fue estandarizado con muestras fecales de personas multiparasitadas (*G. lamblia* y *E. Nana* o *E. coli*). Para

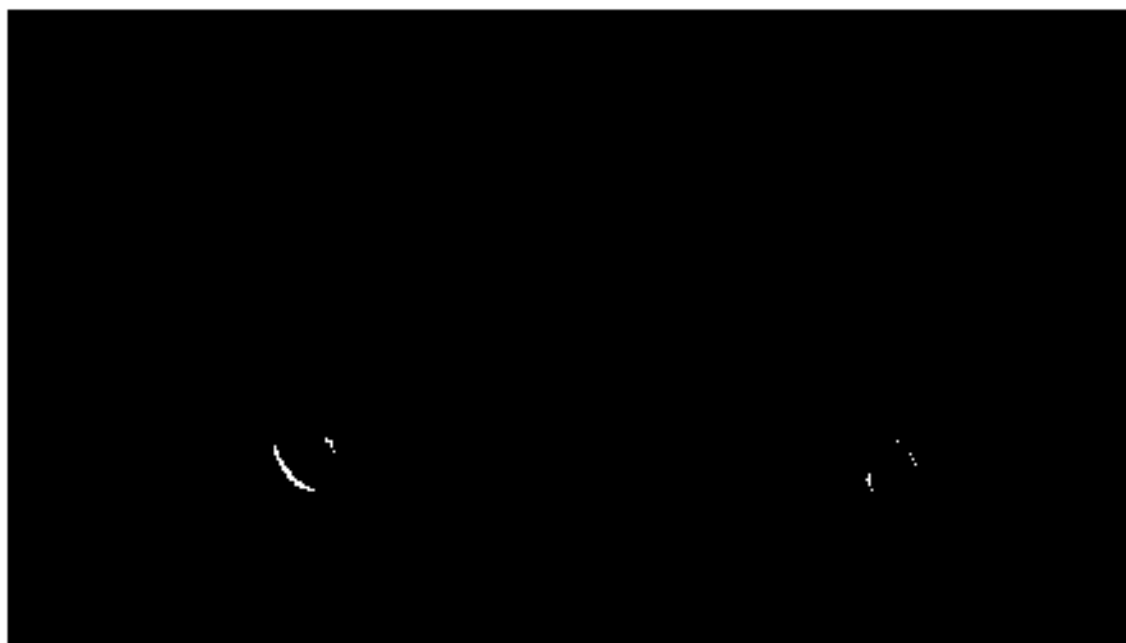


Figura 3. Microscopía de contraste de fase de quistes de *Giardia lamblia* aislados mediante centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa, a partir de excremento de humano (400X).



Figura 4. Microscopía de contraste de fase de la suspensión fecal en la etapa posterior a las filtraciones iniciales del proceso de aislamiento (400X).

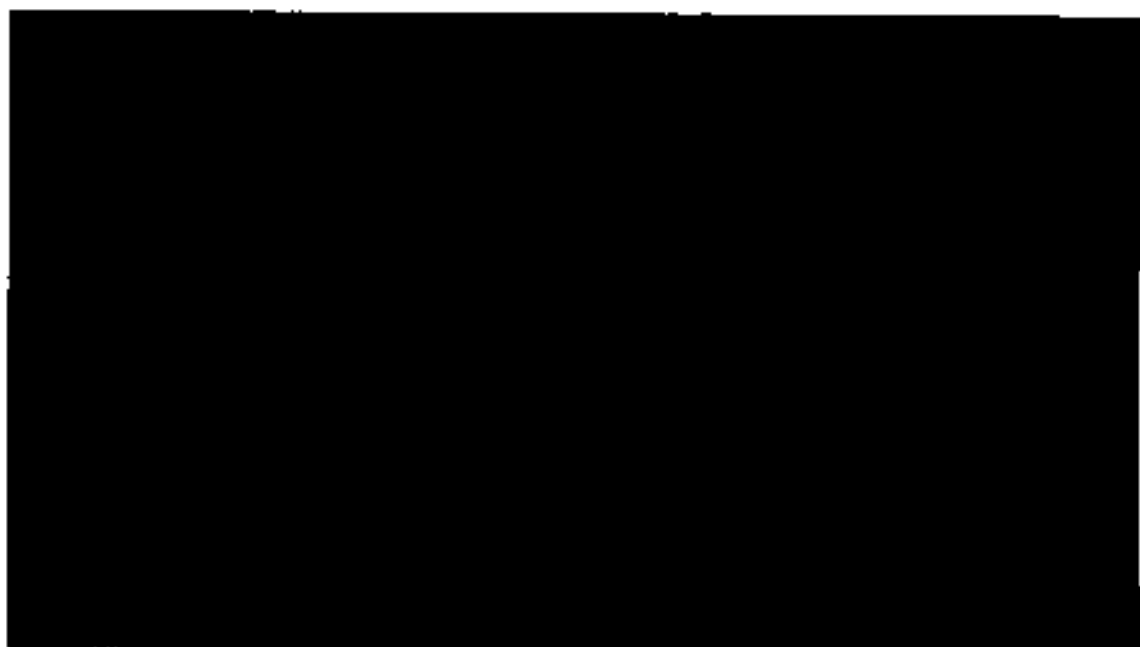


Figura 5. Microscopía óptica de la contaminación bacteriana de la suspensión fecal obtenida después de las filtraciones iniciales del aislamiento. Tinción con lugol (1000X)



Figura 6. Microscopía óptica del sobrenadante eliminado después de la primera centrifugación a baja velocidad (400 g) del proceso de aislamiento. Tinción con lugol (100X).

ello, se mantuvo fijo el tiempo y el número de lavados, variando solo la fuerza centrífuga aplicada. En la Figura 6 se muestra el sobrenadante eliminado después de la primera centrifugación a baja velocidad. En esta figura se aprecia una gran cantidad de bacterias y algunos restos alimenticios. El proceso de limpieza se consideró finalizado cuando se obtuvo un sobrenadante claro y transparente (Figura 7), corroborándose por microscopía óptica que no había pérdida de quistes en el agua de lavado. Las centrifugaciones a baja velocidad disminuyeron notablemente la cantidad de bacterias presentes en la suspensión fecal (Figura 8).

El siguiente paso del aislamiento de los quistes fue la centrifugación de la suspensión fecal sobre una capa de solución de sacarosa con densidad relativa 1.13 (sección de materiales y métodos). En este paso, se disminuyó la cantidad de contaminantes, con respecto a la fase anterior de centrifugaciones a baja velocidad (Figura 8). En la Figura 9 se muestra la suspensión fecal posterior a la primera centrifugación en gradiente de sacarosa. En ésta, se observan algunos quistes de *G. lamblia* acompañados de pocas bacterias y restos epiteliales.

La etapa final del aislado fue una segunda centrifugación en gradiente de sacarosa (materiales y métodos). La figura 10 muestra un aislado obtenido después de la segunda centrifugación en gradiente. Finalmente, solo quedan quistes de *Giardia* y bacterias, las cuales son eliminadas en el paso de axenización.

Una vez logrado un aislado, el siguiente paso consistió en realizar su axenización. Para ello, se emplearon diferentes combinaciones de antibióticos para lograr la eliminación de los organismos contaminantes, tales como bacterias, levaduras y hongos. Además, se realizaron antibiogramas para determinar las combinaciones y concentraciones de antibióticos adecuadas para la axenización. Los resultados y la metodología empleada en la axenización, ya ha sido publicada por Buelna y Medrano (1995), quienes cooperaron en este proyecto de investigación. Los

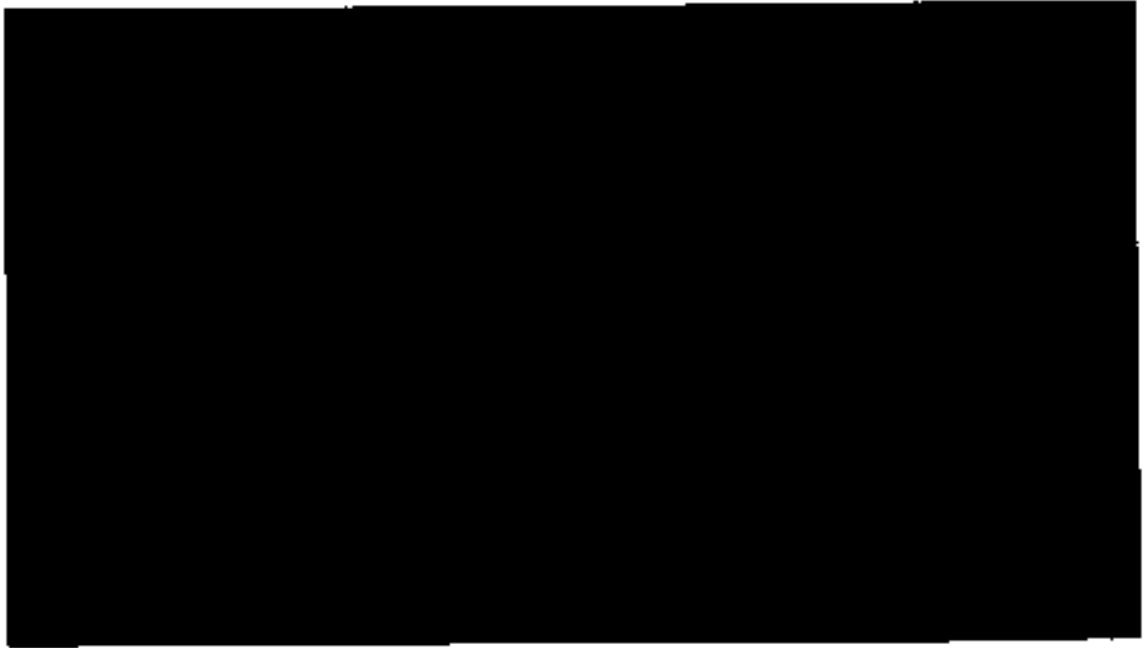


Figura 7. Microscopía óptica del sobrenadante eliminado después de la tercera centrifugación a baja velocidad (200 g) del proceso de aislamiento. Tinción con lugol (100X).

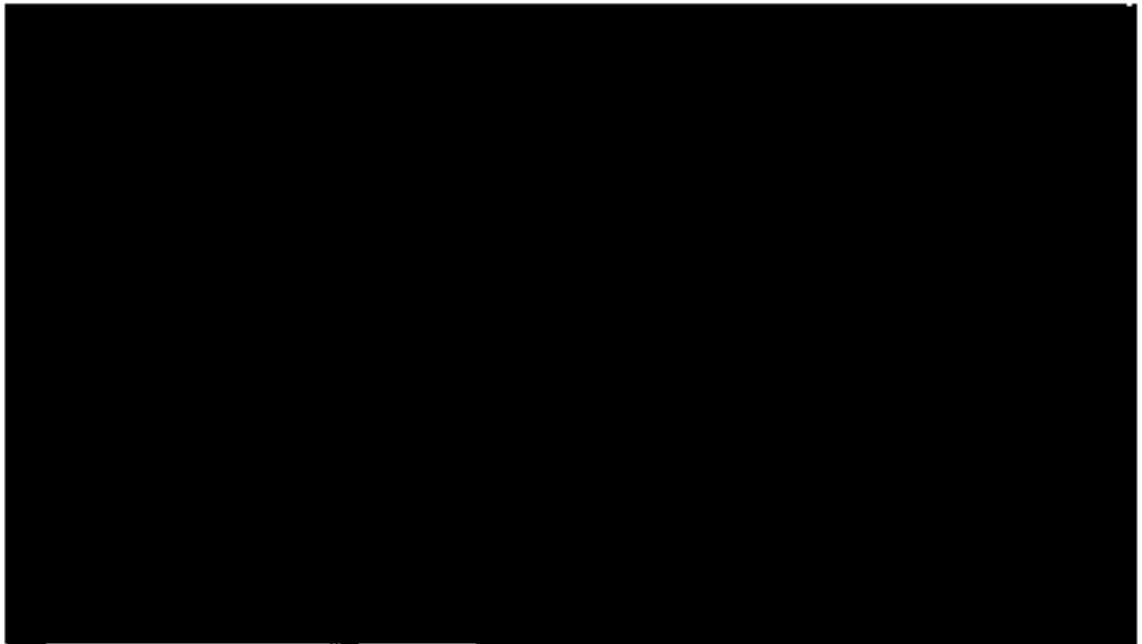


Figura 8. Microscopía óptica de la suspensión fecal durante la etapa posterior a las centrifugaciones a baja velocidad del proceso de aislamiento. Tinción con lugol (100X).



Figura 9. Microscopía óptica de los quistes de *Giardia lamblia* en la suspensión fecal, después del primer gradiente de sacarosa. Tinción con lugol (400X).



Figura 10. Microscopía óptica de los quistes de *Giardia lamblia* en el aislado, después del segundo gradiente de sacarosa. Sin lavados, ni axenización. Tinción con lugol (400X).

antibióticos que dieron mejor resultado fueron gentamicina (500 µg/mL), anfotericina B (100 µg/mL) y ceftriaxona (500 µg/mL).

Una vez obtenidos los aislados axénicos, el siguiente paso era la criopreservación de los quistes. Sin embargo, a pesar de los intentos realizados, no se pudo lograr una técnica que permitiera la conservación por tiempos prolongados, de estos quistes. Hasta la fecha, no se ha reportado algún método de criopreservación de quistes de *G. lamblia*. Por ello, se realizaron pruebas para evaluar el efecto de la congelación sobre los aislados. Se evaluaron distintas concentraciones de agentes crioprotectores, tales como dimetilsulfóxido (DMSO) (7 y 10%) y glicerol (10, 15, 40 y 50%). Al mismo tiempo, se probaron diferentes velocidades de congelamiento, a -20°C, -70°C y -180°C (nitrógeno líquido). Los resultados de estas pruebas fueron evaluados mediante microscopía óptica. La Figura 11 muestra el estado de algunos quistes de *Giardia*, después de un proceso de congelación-descongelación en presencia de glicerol (15%). En las condiciones de congelación evaluadas, no se observó algún efecto protector sobre los quistes de *G. lamblia*, de ninguna de las sustancias crioprotectoras. En todos los tratamientos se observó daño celular debido al congelamiento (Figura 11), en más del 98% de quistes. Al parecer, ninguna de las sustancias crioprotectoras pudo penetrar al interior de los quistes y por ello, no se evitó la formación de cristales de hielo en su interior.

La criopreservación de la etapa de trofozoito ya ha sido obtenida, con buenos resultados (Warhurst & Wright, 1979; Lyman & Marchin, 1984). Los cultivos de trofozoitos de las cepas WB y Portland-1 sí pudieron ser criopreservados mediante la técnica descrita en el anexo 2.

Desenquistación y Cultivo in vitro

La metodología de desenquistación in vitro utilizada fue desarrollada a partir de una combinación de los métodos de Rice y



Figura 11. Microscopía Óptica de quistes de *Giardia lamblia*, con daño celular debido al congelamiento en presencia de glicerol (15%). Tinción con lugol (400X).

Schaefer (1981) y Sauch (1988), con algunas modificaciones establecidas en nuestro laboratorio. La técnica incluyó una incubación ácida en presencia de solución balanceada de Hank, bicarbonato de sodio (0.1 M), cisteína (57 mM) y ácido ascórbico (11 µM) y, una incubación en medio TYI-S-33 modificado (Keister, 1983). El procedimiento detallado se muestra en la sección de materiales y métodos. Todos los aislados que se obtuvieron con esta técnica presentaron porcentajes de exquistación mayores del 90%.

En las figuras 12(a-f) se muestran distintas fases del proceso de exquistación. En 12a se observa un quiste al inicio de la fase de incubación ácida (10 minutos), en donde se comienza a desprender la pared celular de la pared del quiste. La figura 12b muestra un quiste al final de la incubación ácida, justo antes de ser transferido al medio TYI-S-33. En esta fase se ve que la membrana celular interna está completamente separada de la pared del quiste. Al poco tiempo (5 a 10 min) de la incubación en el medio nutritivo (TYI-S-33) se inicia la salida del organismo del quiste. En 12c se alcanza a apreciar el momento anterior a la separación de un cistozoito (amortig) de la pared del quiste, por medio del movimiento flagelar. El cistozoito recién liberado carece de la forma característica del organismo, pero al momento de la separación comienza el proceso de citocinesis que finaliza con la formación de dos trofozoitos. En 12d se ve la silueta de dos trofozoitos en el momento de la separación, posterior a la citocinesis. El rápido movimiento de los organismos hace difícil captar claramente su forma típica. En 12e se muestran dos quistes vacíos, después de la separación del cistozoito. En la figura 12e no se puede captar el quiste vacío debido a la transparencia de éstos y al rápido movimiento del organismo. Finalmente, en 12f se observan algunos trofozoitos con su forma característica, adheridos a la pared del tubo de cultivo.

El cultivo *in vitro* posterior a la exquistación no se pudo desarrollar exitosamente debido a la presencia de organismos contaminantes. El rápido desarrollo de bacterias, levaduras y/o

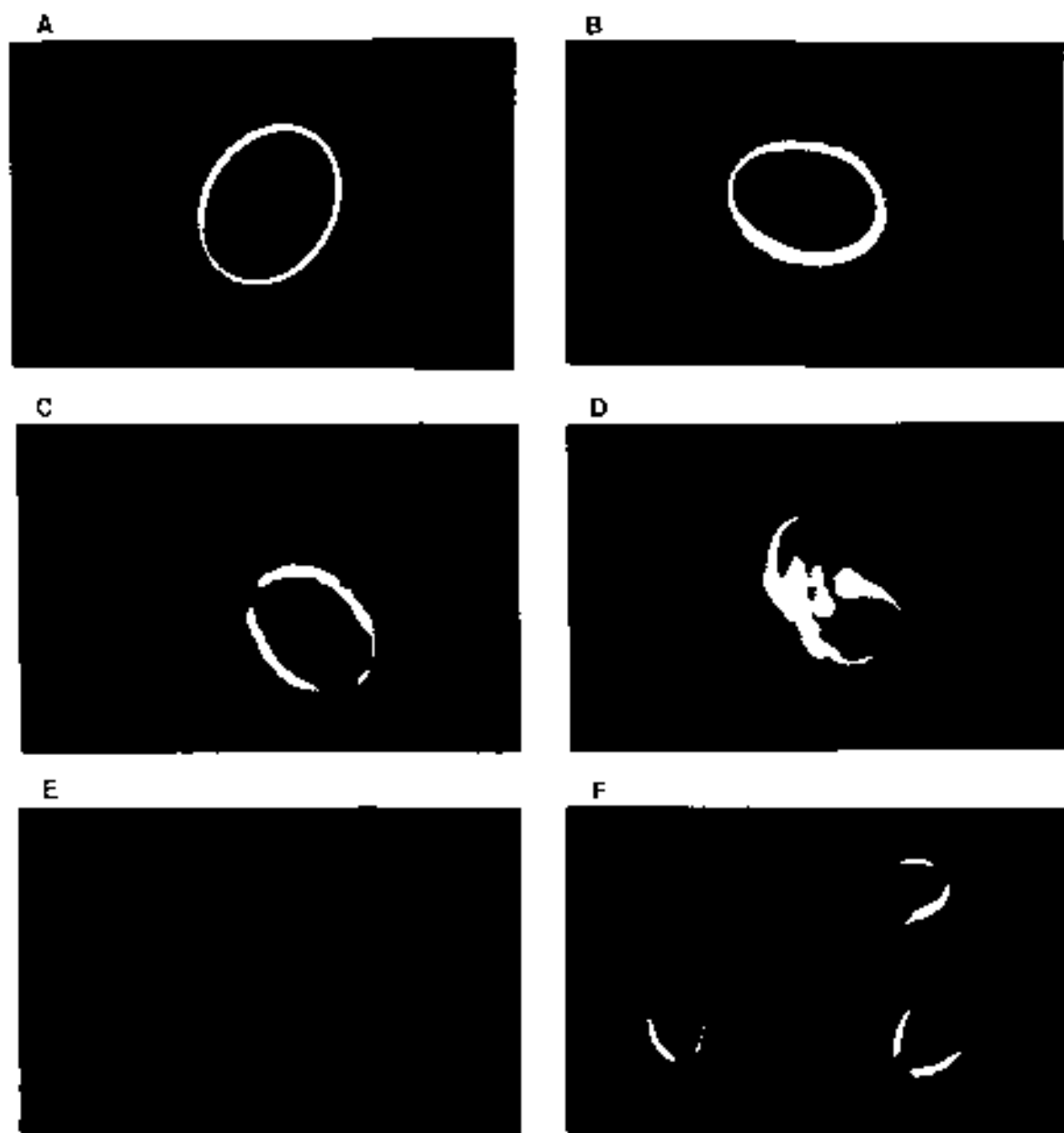


Figura 12. Microscopía de contraste de fase de diferentes etapas del proceso de exquistación de *Giardia lamblia*. (a): apariencia morfológica de un quiste, al inicio de la fase de incubación ácida (10 min); (b): al final de la inducción ácida, justo antes de inocular en medio TYI-S-33; (c): cistozoito con movimiento flagelar, liberándose de la pared quística; (d): trofozoitos de *G. lamblia* durante el proceso de fisión binaria posterior a la exquistación; (e): restos vacíos de los quistes, después de la salida del organismo; (f): trofozoitos adheridos a la pared del tubo, fase posterior a la división celular (400X).

hongos imposibilitó la supervivencia de los trofozoitos recién exquistados, por periodos mayores de 96 horas. Los microorganismos extraños no pudieron ser eliminados mediante el incremento de las concentraciones de antibióticos empleados en la axenización de aislados (gentamicina 1000 µg/mL y anfotericina B 200 µg/mL). Tampoco se tuvo éxito al aumentar el número de recambios del medio de cultivo adicionado con antibióticos. Estos problemas técnicos causaron la pérdida de 10 aislados de quistes. Debido a lo anterior, finalmente se decidió realizar el estudio electroforético de los trofozoitos recién exquistados y de sus respectivos aislados de quistes. Para ello, solo se sometería una porción del aislado de quistes al proceso de exquistación, con un periodo de incubación de 4 horas en medio TYI-S-33.

Extracción de Proteínas

La extracción de proteínas de los quistes y trofozoitos de *G. lamblia* se realizó según la técnica propuesta por Jarroli y cols. (1989a). La concentración de los extractos proteínicos fue realizada por precipitación con 10% de ácido tricloroacético (Harris, 1989) y resuspensión en 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS, pH 7.2).

Las cantidades de proteína obtenida de los aislados de quistes y de trofozoitos se muestran en la Tabla 1. En varios extractos (T1A, T2A, Q2A, T3A, Q3A, T4A, T5A, Q5A) se encontraron concentraciones proteínicas menores al límite de detección del micrométodo del ácido bicinónico (1 µg/mL). Las bajas concentraciones de estos extractos se debieron al reducido número de organismos obtenidos y a fallas técnicas ocurridas durante el proceso de lisis, extracción y concentración.

Durante el primer estudio electroforético (Figura 13) y el último (Figura 16), se empleó como unidad de carga al número de organismos lisados. En esos análisis, se utilizó toda la proteína obtenida de cada aislado, sin estimar la cantidad total extraída.

Tabla 2. Relación de aislados de quistes y trofozoitos de *Giardia lamblia* provenientes de portadores sintomáticos y asintomáticos de giardiasis.

Número de Aislado	Fase biológica	Hospedero de origen	Proteína extraída ($\mu\text{g/mL}$)
T _{1A}	Trofozoitos	Asintomático	0.97 *
Q _{1A}	Quistes	Asintomático	1.73
T _{2A}	Trofozoitos	Asintomático	0.33 *
Q _{2A}	Quistes	Asintomático	0.90 *
T _{3A}	Trofozoitos	Asintomático	0.70 *
Q _{3A}	Quistes	Asintomático	0.85 *
T _{4A}	Trofozoitos	Asintomático	0.65 *
Q _{4A}	Quistes	Asintomático	1.25
T _{5A}	Trofozoitos	Asintomático	0.79 *
Q _{5A}	Quistes	Asintomático	0.85 *
T _{6S}	Trofozoitos	Sintomático	3.06
Q _{6S}	Quistes	Sintomático	2.95
T _{7S}	Trofozoitos	Sintomático	3.77
Q _{7S}	Quistes	Sintomático	2.57
T _{8A}	Trofozoitos	Asintomático	1.05
Q _{8A}	Quistes	Asintomático	4.86
T _{9A}	Trofozoitos	Asintomático	1.01
Q _{9A}	Quistes	Asintomático	1.26
T _{10A}	Trofozoitos	Asintomático	1.05
Q _{10A}	Quistes	Asintomático	1.35
T _{11S}	Trofozoitos	Sintomático	1.08
Q _{11S}	Quistes	Sintomático	2.52
Q _M	Quistes	Mezcla	3.85

La cantidad de proteína extraída es el total obtenido por cada aislado, después del proceso de concentración.

* Aislados con concentración de proteína por debajo del límite de detección del método micro BCA ($1\mu\text{g/mL}$).

Caracterización Electroforética de Aislados

La fase final del estudio consistió en la obtención de los patrones electroforéticos de la proteína obtenida de quistes provenientes de hospederos humanos y de los respectivos trofozoitos de cada aislado. La investigación se centró en los aislados provenientes de portadores de la región (Hermosillo). Es el primer estudio de naturaleza bioquímica de las cepas locales de *G. lamblia*. Se empleó la técnica de electroforesis en gels de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras (Laemmli, 1970), para estimar las masas moleculares de las proteínas extraídas de los organismos.

La figura 13 muestra el análisis electroforético de dos aislados de quistes de *G. lamblia* y de la cepa de trofozoitos WB. En éste, se cargó la proteína obtenida a partir de 3×10^6 trofozoitos (cepa WB) y dos aislados axénicos provenientes de portadores asintomáticos, cada uno con 2.5×10^6 quistes. La única diferencia apreciada en los patrones electroforéticos de estas cepas fue la expresión mayoritaria de un polipéptido de aproximadamente 60 kDa en el aislado de trofozoitos. En esta corrida electroforética se observó homogeneidad, entre las cepas locales de *G. lamblia* y la cepa WB. No obstante, se consideró necesario comparar un mayor número de aislados para obtener una conclusión firme al respecto. La diferente intensidad en los patrones de las dos muestras de quistes, se debió a problemas técnicos ocurridos durante la extracción y/o concentración.

El estudio electroforético de las cepas locales continuó con el análisis de 11 aislados, tres de los cuales provenían de portadores con sintomatología gastrointestinal y, ocho de personas asintomáticas (Tabla 1). Estos aislados fueron divididos en dos corridas electroforéticas. El aislado Qm es una mezcla de quistes provenientes de varias muestras fecales, las cuales tenían pequeñas cantidades de quistes.

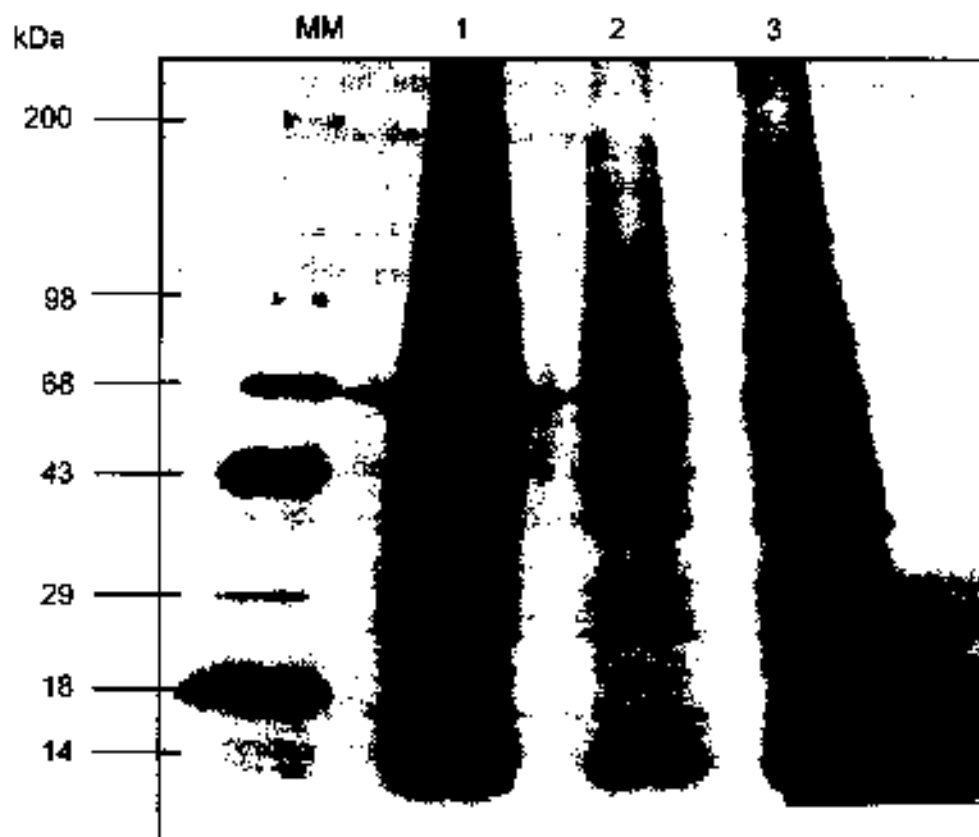


Figura 13. Electroforesis SDS-PAGE (6-18%) de aislados de *Giardia lamblia*. Extracción proteínica a 100°C, en presencia de SDS (14). Concentración por precipitación con acetona y reuspensión en PBS (pH 7.2). Tinción con nitrato de plata. (1) trofozoitos cepa WB 13×10^6 , (2) quistes axénicos A (2.5×10^6) y (3) quistes axénicos B (2.5×10^6).

En la Figura 14 se muestra la corrida electroforética de algunos extractos con cantidades de proteína menores a 1 $\mu\text{g/mL}$ (T1A, Q1A, T2A, Q2A, T3A, Q3A, T4A, Q4A, T5A y Q5A) (Tabla 1). Todos los aislados analizados en este gel provenían de portadores asintomáticos. Los patrones electroforéticos de las muestras no presentaron diferencias visibles. Este análisis indicó la homogeneidad presente entre las proteínas mayoritarias (aproximadamente 50 y 60 kDa), de algunos aislados provenientes de portadores asintomáticos de giardiasis.

Posteriormente, se realizó la electroforesis de los aislados restantes, los cuales provenían tanto de portadores sintomáticos como asintomáticos. Los resultados de la estimación de proteína de los extractos de estos aislados demostraron que se había logrado una baja cantidad final (Tabla 1). Los valores se encontraban próximos al nivel mínimo de detección de la técnica (1 $\mu\text{g/mL}$). En vista de ello, se consideró mínima la diferencia entre los valores de proteína estimados y se cargó el total del extracto de cada muestra. Los resultados de esta corrida electroforética se muestran en la Figura 15. Los aislados provenientes de portadores asintomáticos (T8A, Q8A, T9A, Q9A, T10A y Q10A) exhiben similitud en las bandas de polipéptidos mayoritarios. En estas muestras aparecen dos polipéptidos de aproximadamente 60 y 50 kDa y uno menor, de 30 kDa. Este último polipéptido (30 kDa) también fue visualizado en la muestra Q3A (Figura 14). Estos hechos demuestran que es posible la existencia de homogeneidad bioquímica entre las cepas regionales provenientes de portadores asintomáticos. El comportamiento de los aislados provenientes de portadores sintomáticos (T6S, Q6S, T7S, Q7S, T11S y Q11S) es interesante, debido a las variaciones mostradas en sus patrones de masa molecular. La muestra Q11S muestra un patrón similar a los de portadores asintomáticos (T8A, Q8A, T9A, Q9A, T10A y Q10A), variando solamente por la presencia franca de una banda de aproximadamente 80 kDa en esta muestra de portador sintomático. Esta misma banda de 80 kDa se presenta en los aislados T6S, Q6S y T7S, provenientes

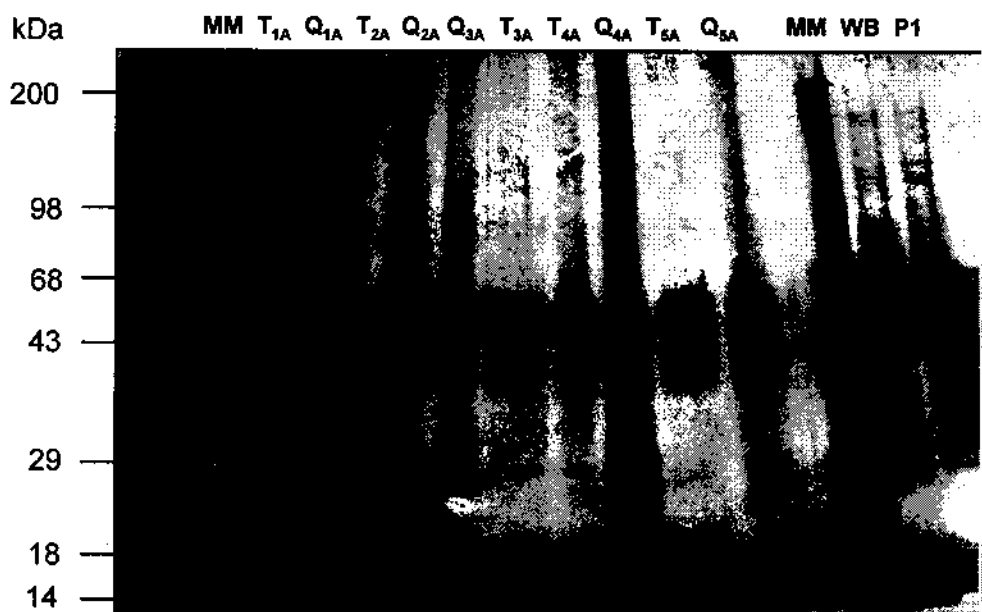


Figura 14. Electroforesis SDS-PAGE (6-18%) de aislados de quistes y trofozoitos de *Giardia lamblia* provenientes de hospederos asintomáticos. Extracción proteínica a 100°C en presencia de SDS (1%). Concentración por precipitación con ácido tricloroacético (TCA) al 10% y resuspensión en PBS (pH 7.2). Tinción con nitrato de plata. Las muestras son denominadas según las claves siguientes, Q:quistes, T:trofozoitos, #:número de aislado, A:asintomático, WB:cepa de referencia WB, P1:cepa de referencia Portland-1 y MM:estándares de masa molecular.

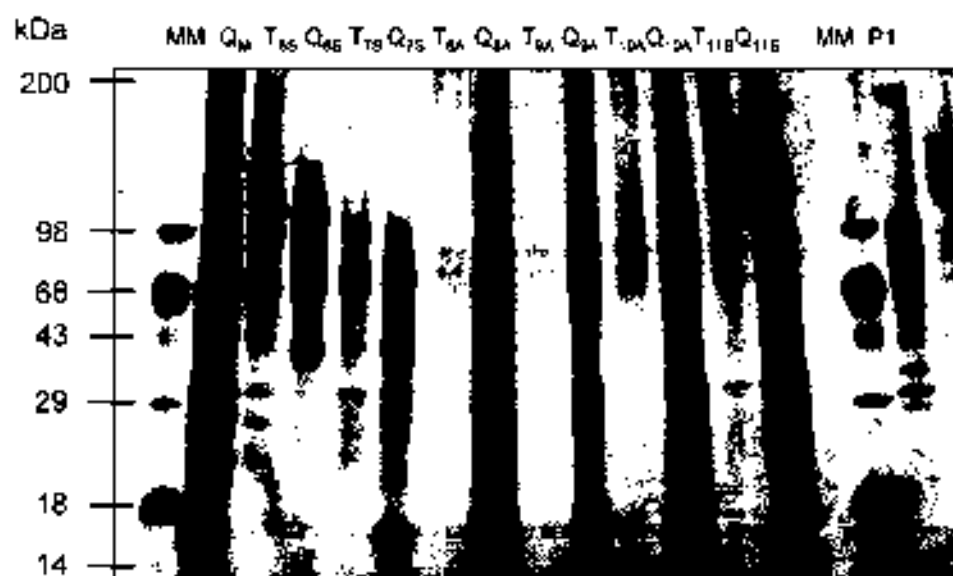


Figura 15. Electroforesis SDS-PAGE (6-16%) de aislados de quistes y trofozoitos de *Giardia lamblia* provenientes de hospederos asintomáticos y sintomáticos de giardiasis. Extracción proteínica a 100°C, en presencia de SDS (1%). Concentración por precipitación con ácido tricloroacético (TCA) al 10% y resuspensión en PBS (pH 7.2). Tinción con nitrato de plata. Las muestras son denominadas según las claves siguientes, Q:quistes, T:trofozoitos, #:número de aislado, S:sintomático A:asintomático, P1:cepa de referencia Portland-1 y MM:estándares de masa molecular.

de hospederos sintomáticos y, también en la mezcla de cepas Q_M. La presencia de esta misma banda (80 kDa) en el aislado Q_{9A}, es muy débil. En el aislado Q_{6S} se ven tres bandas mayoritarias (80, 72 y 35 kDa), también se aprecian ligeramente los polipéptidos de 50 y 60 kDa. El aislado de quistes Q_{7S} proveniente de un portador sintomático, exhibió características distintas a todos los demás patrones, debido a la presencia de dos bandas únicas (15 y 40 kDa) y a la banda de 35 kDa que comparte con el aislado Q_{6S}. La fase de trofozoito del aislado de sintomático, T_{6S}, comparte la presencia de una banda de aproximadamente 44 kDa, con la mezcla de aislados Q_M. Esta banda de 44 kDa no se expresa en ningún otro aislado. La muestra T_{6S} exhibe similitud con la fase de quiste del otro aislado de sintomático, Q_{7S}, en una banda de aproximadamente 70 kDa. El patrón proteico del aislado compuesto (Q_M) muestra la mayoría de los polipéptidos encontrados en los demás aislados. Una banda de 32 kDa, parece ser única del patrón de Q_M.

Los resultados muestran gran cantidad de diferencias y similitudes entre todos los aislados. La variación no solo se exhibió entre un aislado y otro, sino que también se observó entre las dos fases biológicas de un mismo aislado. Una posible explicación de estos resultados sería la existencia de mezclas de genotipos en algunas infecciones. Sin embargo, en la mayoría de los aislados estudiados se presenta una relativa homogeneidad bioquímica. Interesantemente, fueron los aislados provenientes de portadores asintomáticos, los que presentaron mayor similitud entre sus patrones proteicos. En cambio, los aislados de hospederos sintomáticos fueron los que presentaron una marcada heterogeneidad intra e interaislado. La presencia de la mezcla de aislados (Q_M) resultó de gran utilidad como un parámetro de referencia, debido a la presencia de una mayoría de las características de los demás aislados.

Posteriormente, se realizó una última prueba electroforética para investigar los motivos de los inconvenientes técnicos de baja resolución de bandas y diferente cantidad de muestra. Los puntos

críticos del proceso de obtención de los extractos considerados, fueron la extracción y concentración de proteína, así como la posible acción proteolítica residual del extracto. Para ello, se mezclaron varios aislados de quistes tanto viejos como recientes con los residuos de la mezcla de quistes QM analizada anteriormente, y se trataron de la siguiente manera.

Una porción de 10×10^6 quistes fueron sonicados en presencia de inhibidores de proteasas (Pepstatina 0.5 mM, PMSF 1 mM y Iodoacetamida 1 mM), bajo las condiciones del método alternativo mostrado en la sección de extracción de proteínas. Los restos de quistes de esta muestra fueron sedimentados y al residuo se le dió 90 minutos de calentamiento (1% de SDS). Este calentamiento también se le dió, de manera separada, a una muestra de 5×10^6 quistes. Posteriormente, estos extractos fueron centrifugados y tratados con acetona 1:5 (v/v) para concentrar la proteína (Materiales y Métodos).

El análisis electroforético se muestra en la figura 15. En esta corrida se observó una mejor definición y mayor cantidad de bandas en los carriles de las muestras 2 y 3. En base a esto, se consideró que el proceso de sonicación utilizado en la muestra 1 no fue suficiente para extraer toda la proteína de los quistes. Los restos sedimentados después de la sonicación (muestra 1), fueron nuevamente tratados con calentamiento por 90 minutos. El carril 3 muestra los resultados de esta segunda extracción de un mismo conjunto de quistes. El uso de inhibidores de proteólisis enzimática se incluyó para minimizar la acción de estas enzimas (si estaban presentes), durante la sonicación. Finalmente, se pudo inferir que las diferentes intensidades de los dos patrones proteicos de quistes mostrados en la figura 13, fueron debidas a fallas técnicas en el proceso de extracción y concentración. Posiblemente, las muestras de quistes presenten distinta resistencia al rompimiento, debido al grado de madurez de los quistes (diferente tiempo de tránsito intestinal en el portador).

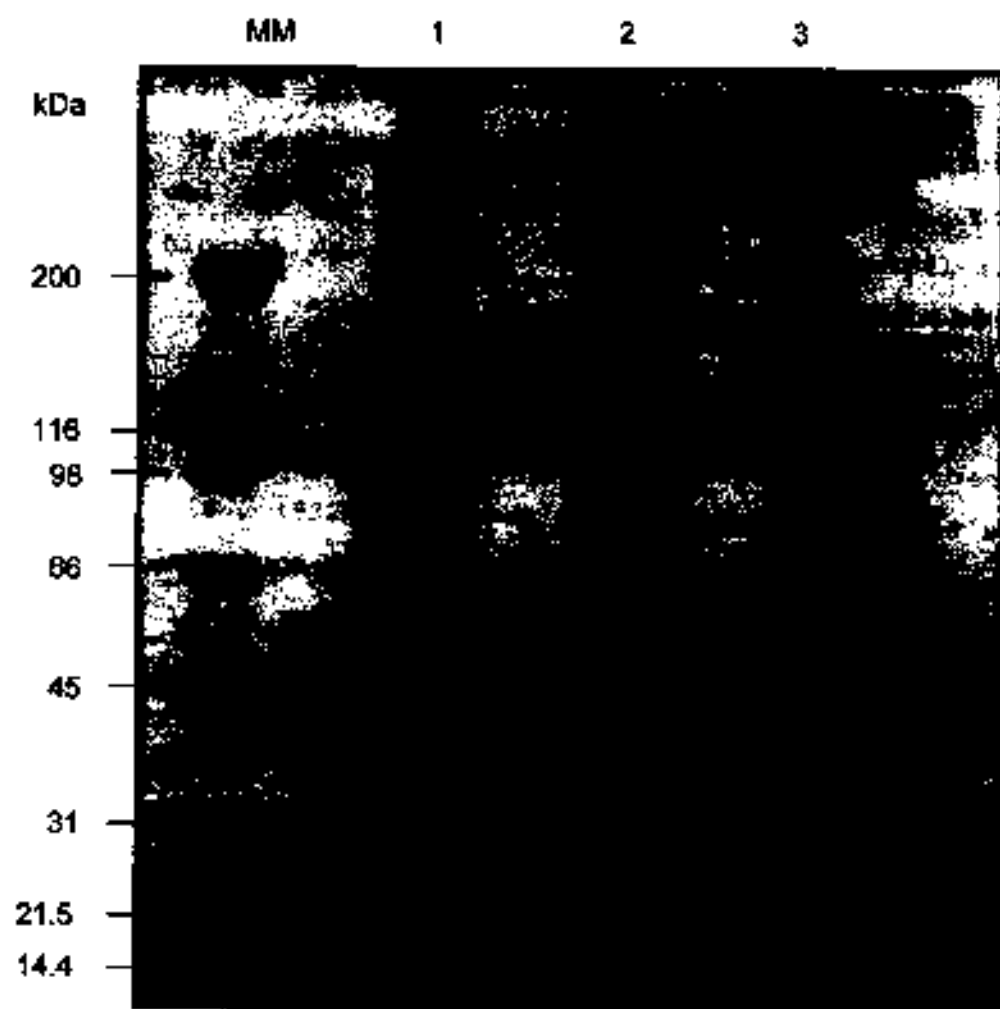


Figura 16. Electroforesis SDS-PAGE (6-18%) de mezclas de aislados de quistes de *Giardia lamblia*. Proteína obtenida por distintos métodos. Concentración por precipitación con acetona y resuspensión en PBS (pH 7.2). (1) quistes (10×10^6) con extracción por sonicación (PMSF 1mM + Iodoacetamida 1 mM + Pepstatina 0.5 mM), (2) quistes (6×10^6) extracción por lisis a 100°C y 1% SDS, (3) restos de los quistes sonicados de muestras 1 (10×10^6) con extracción por lisis a 100°C y 1% SDS.

El estudio de laboratorio del parásito *Giardia lamblia* es relativamente reciente. El primer reporte del cultivo *in vitro* de este organismo (Meyer, 1976), inició el rápido avance del estudio y caracterización de este parásito. El principal objetivo de la caracterización de diferentes cepas de *Giardia lamblia* ha sido la correlación de algún parámetro bioquímico con las características biológicas del parásito. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha encontrado ninguna relación de este tipo. La principal causa de esto último ha sido la marcada heterogeneidad bioquímica demostrada por las cepas estudiadas. Se ha encontrado variación en aislados de *G. lamblia* provenientes de diferentes regiones y, aún entre clonas de los mismos aislados, de una misma área geográfica (Andrews & cols., 1992b). En base a estos estudios, se ha sugerido que dentro del grupo morfológico *Giardia lamblia* puede existir más de una especie (o subespecie). Debido a ello, se considera que la giardiasis es una infección producida por mezclas de cepas o subgrupos genéticos (Upcroft & Upcroft, 1994).

El análisis electroforético realizado en nuestro estudio demostró que algunos aislados tenían una relativa homogeneidad entre sí (Figuras 13 y 14). No obstante, algunos aislados presentaron heterogeneidad entre sí, además de presentar diferencias entre las dos fases biológicas (trofozoito y quiste) de un mismo aislado (Figura 15). Para la identificación de la posible heterogeneidad genética entre distintos aislados, se empleó como marcador bioquímico a los patrones de masa molecular, de las proteínas extraídas de los organismos. De esta manera, se comparó de forma indirecta el contenido genético de los aislados. Esta técnica de caracterización de cepas de *Giardia* no ha sido reportada anteriormente. Al parecer, se considera que este tipo de análisis no puede visualizar las diferencias genéticas existentes entre poblaciones. Por lo cual, generalmente se han empleado otros

marcadores bioquímicos más precisos, tales como los patrones antigénicos, los patrones de isoenzimas y el análisis directo del material genético.

Sin embargo, la comparación de los patrones de punto isoeléctrico de proteína celular, ha demostrado ser eficaz para apreciar la heterogeneidad genética existente entre varios aislados del grupo morfológico *G. lamblia* (Isaac-Renton & cols., 1989). Los resultados obtenidos en el estudio de este organismo por medio de ésta metodología, han sido validados mediante otras técnicas bioquímicas más sensibles, tales como los patrones de isoenzimas y el estudio del polimorfismo de los fragmentos de restricción de DNA e hibridización con una prueba de DNA ribosomal (De Jonckheere & cols., 1989; 1990; Strandén & cols., 1990). En vista de que no se encontró reporte de los patrones de masa molecular de aislados de *Giardia* y de la sencillez de ésta técnica electroforética, fue elegida para la caracterización bioquímica parcial de los aislados obtenidos en nuestro estudio.

El estudio bioquímico de *G. lamblia* siempre ha tenido como requisito la amplificación inicial del número de parásitos, por medio de subcultivos en animales de laboratorio y/o por cultivo *in vitro* (Adam, 1991). Sin embargo, no todas las muestras de *Giardia* generan cultivos viables (Nash & cols., 1985). Algunos aislados son resistentes al cultivo *in vitro*, requiriéndose algunos pases subsecuentes a través de animales de laboratorio. No obstante, es frecuente que se pierdan aislados, debido a la incapacidad para lograr el establecimiento de un cultivo.

Andrews y colaboradores (1989), demostraron la existencia de un genotipo predominante en las cepas de *Giardia lamblia* mantenidas en condiciones de cultivo en el laboratorio. Es decir, condiciones experimentales *in vivo*, predomina una población distinta a la del mismo aislado en cultivo *in vitro*.

La existencia de una variación poblacional influenciada por las condiciones de cultivo, ha hecho cuestionar la relevancia de las conclusiones basadas en los cultivos de *Giardia* previamente logrados en el laboratorio. Algunos de los cultivos tales como el Portland-1 (Meyer, 1976) y el WB (Smith & cols., 1982), tienen varios años de estarse manteniendo en cultivo. Estas cepas son las más utilizadas para el estudio del organismo. De manera que, no se puede descartar la posibilidad de que algunas de estas cepas sean resultado de una selección artificial inducida en el laboratorio (Nash & cols., 1985).

El presente estudio se enfocó en la caracterización de aislados de quistes y trofozoitos, provenientes de un hospedero humano, sin amplificación, ni subcultivo previo de los organismos. Para ello, se analizaron los quistes axénicos, provenientes de un portador, junto con los trofozoitos exquistados directamente de este aislado. De esta manera, se disminuyó la posibilidad de una selección de genotipos. A la misma vez, se logró una mejor representación de la población existente en la infección original mediante la comparación de las dos fases biológicas del organismo.

Otro hecho interesante del estudio bioquímico de este parásito es el de que, hasta la fecha, no se ha realizado la caracterización bioquímica de los quistes provenientes de hospederos humanos. La principal limitante ha sido la obtención de aislados en cantidad suficiente y con la pureza adecuada, para realizar los estudios bioquímicos. Uno de los principales resultados de este estudio es el de haber logrado aislar hasta 60×10^6 quistes de un mismo portador, con muy baja cantidad de contaminantes. Sin embargo, es importante recalcar el hecho de que la mayoría de los quistes aislados se fueron empleando durante la estandarización de otras pruebas, tales como la exquistación, lisis y electroforesis.

CONCLUSIONES

Los resultados del estudio coproparasitológico demostraron ser congruentes con trabajos similares realizados en la región. En el total de 473 niños analizados (la mayoría, en edad preescolar) se encontró una prevalencia de parasitosis del 51.1%. El parásito más frecuente fue *Giardia lamblia*, con 21.7% de portadores, de los cuales, el 10.7% presentó a *Giardia* sola y el 11% restante, acompañada de otro parásito.

En base a la combinación de algunos métodos publicados, se estandarizó una técnica para el aislamiento de quistes de *Giardia lamblia* provenientes de heces diarreicas o consistentes. Por medio de la cual, se logró obtener aislados axénicos con la pureza necesaria para realizar la caracterización molecular de quistes, a partir de hospederos humanos.

El proceso de desenquistación de los aislados obtenidos se realizó de una manera adecuada, logrando la producción de trofozoitos con buena movilidad y capacidad de adhesión. La técnica incluyó una inducción ácida (pH 2.3) en presencia de sales (solución balanceada de Hank), bicarbonato de sodio (0.1 M) y sustancias reductoras (cisteína 5.7 mM y ácido ascórbico 11 mM), y una incubación en medio TYI-S-33 adicionado de bilis.

El proceso de obtención de subcultivos de los aislados regionales no se pudo desarrollar, debido a la presencia de organismos contaminantes. El máximo periodo de sobrevivencia en cultivo fue de 96 horas. Las cepas de referencia de *Giardia lamblia*, W3 y Portland-1, si fueron subcultivadas y amplificadas en medio de cultivo TYI S-33.

Los quistes obtenidos demostraron poseer una gran resistencia al rompimiento. Debido a lo cual, se necesitaron 90 minutos de calentamiento en presencia de SDS (1%) para poder extraer la proteína

celular. El método de concentración proteínica más adecuado para el análisis electroforético fue la precipitación con acetona (1:5, v/v) y la resuspensión posterior en PBS (pH 7.2).

Finalmente, se realizaron los análisis electroforéticos de las proteínas solubilizadas de los quistes aislados y de los trofozoitos recién exquistados. Los resultados confirmaron la heterogeneidad existente entre distintos aislados clínicos. En las muestras provenientes de portadores asintomáticos se observó una relativa homogeneidad en sus patrones proteínicos. En cambio, los aislados de hospederos sintomáticos presentaron una marcada heterogeneidad entre sí. Esta variación se demostró también entre los quistes y trofozoitos de un mismo aislado. Las diferencias presentadas por los aislados provenientes de portadores sintomáticos, podrían ser debidas a la presencia de mezclas de genotipos de *G. lamblia*. No obstante, se considera necesario realizar estudios de caracterización bioquímica más sensibles para la corroboración de esta heterogeneidad.

BIBLIOGRAFIA

- Abaza SM, Sullivan JJ & Visvesvara GS. 1991. Isoenzyme profiles of four strains of *Giardia lamblia* and their infectivity to birds. *Am J Trop Med Hyg.* 44(1):63-8.
- Adam RD. 1991. The biology of *Giardia* spp. *Microbiol Rev.* 55:706-32.
- Adam R, Aggarwal A, Lal AA, De la Cruz VF, McCutchan T & Nash TE. 1988. Antigenic variation of a cysteine-rich protein in *Giardia lamblia*. *J Exp Med.* 167:109-18.
- Adam RD, Yang YM & Nash TE. 1992. The cysteine-rich protein gene family of *Giardia lamblia*. loss of the CRP170 gene in an antigenic variant. *Mol Cell Biol.* 12(3):1194-201.
- Aggarwal A & Nash TE. 1988. Antigenic variation of *Giardia lamblia* in vivo. *Infect Immun.* 56(6):1420-3.
- Aggarwal A, Merritt JW & Nash TE. 1989. Cysteine-rich variant surface proteins of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasit.* 32:39-48.
- Aldritt SM, Tien P & Wang CC. 1985. Pyrimidine salvage in *Giardia lamblia*. *J Exp Med.* 161:437-45.
- Ament ME & Rubin CE. 1972. Relation of giardiasis to abnormal intestinal structure and function in gastrointestinal immunodeficiency syndromes. *Gastroenterology.* 62:216-26.
- Amin N. 1979. *Giardiasis: a common cause of diarrheal disease.* *Postgrad Med.* 66:151-7.
- Andrews RH, Adams M, Boreham PFL, Mayrhofer G & Meloni BP. 1989. *Giardia intestinalis*: Electrophoretic evidence for a species complex. *Int J Parasitol* 19, 183-190.
- Andrews RH, Chilton NB & Mayrhofer G. 1992a. Selection of specific genotypes of *Giardia intestinalis* by growth in vitro and in vivo. *Parasitology* 105(3): 375-386.
- Andrews RH, Mayrhofer G, Chilton NB, Boreham PFL & Grimmond TR. 1992b. Changes in allozyme pattern of the protozoan parasite *Giardia intestinalis*. *Int J Parasitol* 22(3): 403-406.
- Archibald SC, Mitchell RW, Upcroft JA, Boreham PFL & Upcroft P. 1991. Variation between human and animal isolates of *Giardia* as demonstrated by DNA fingerprinting. *Int J Parasitol.* 21(1):123-4.
- Baum KF, Berens RL, Jones RH & Marr JJ. 1988. A new method for cloning *Giardia lamblia*, with a discussion of the statistical considerations of limiting dilution. *J. Parasitol.* 74(2):267-9.

- Balosevic M, Faubert GM, MacLean JD, Law C & Croll NA. 1983. *Giardia lamblia* infections in mongolian gerbils: an animal model. *J. Infect. Dis.* 147(2):222-6.
- Bemrick WJ & Erlandsen SL. (1988). Giardiasis-is it really a zoonosis?. *Parasitol Today.* 4:69-71.
- Bertram MA, Meyer EA, Lile JD & Morse SA. 1983. A comparison of isoenzymes of five axenic *Giardia* isolates. *J. Parasitol.* 69:793-801.
- Bingham AK & Meyer EA. 1979. *Giardia* excystation can be induced *in vitro* in acidic solutions. *Nature (London).* 277:301-2.
- Bingham AK, Jarroli EL, Meyer EA & Radulescu S. 1979 *Giardia* spp.: physical factors of excystation *in vitro*, and excystation vs eosin exclusion as determinants of viability. *Exp Parasitol.* 47,284-291.
- Binz N, Thompson RCA, Meloni BP & Lymbery AJ. 1991. A simple method for cloning *Giardia duodenalis* from cultures and faecal samples. *J. Parasitol.* 77:627-31.
- Binz N, Thompson RCA, Lymbery AJ & Hobbs RP. 1992. Comparative studies on the growth dynamics of two genetically distinct isolates of *Giardia duodenalis in vitro*. *Int J Parasitol.* 22(2):195-202.
- Blair RJ & Weller PF. 1987. Uptake and esterification of arachidonic acid by trophozoites of *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 25:11-8.
- Boucher SEM & Gillin FD. 1990. Excystation of *in vitro*-derived *Giardia lamblia* cysts. *Infect Immun.* 58:3516-22.
- Brandborg L.L, Owen R, Goldberg H, Garvie J & Grossman S. 1980. *Giardiasis* and traveler's diarrhea. *Gastroenterology.* 78:1602-14.
- Brodsky RE, Spencer HC & Schultz M. 1974 *Giardiasis* in american travelers to the Soviet Union. *J Infect Dis.* 130:319-23.
- Buchel LA, Gorenflot A, Chochillon C, Savel J & Gobert JG. 1987. *In vitro* excystation of *Giardia* from humans: a scanning electron microscopy study. *J Parasitol.* 73:487-93.
- Buelna RAG & Medrano MAI. 1995. Obtención de aislados axénicos y viables de *Giardia lamblia*. Tesis de licenciatura. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora.
- Buret A, Gall DG & Olson ME. 1980. Effects of murine giardiasis on growth, intestinal morphology and disaccharidase activity. *J Parasitol.* 75:403-9.
- Buret A, Gall DG & Olson ME. 1991. Growth activities of enzymes in the small intestine, and ultrastructure of microvillous border in gerbils infected with *Giardia duodenalis*. *Parasitol Res.* 77:109-14.

- Butcher PD, Cevallos AM, Carnaby S, Alstead EM, Swarbrick ET & Farthing MJG. 1994. Phenotypic and genotypic variation in *Giardia lamblia* isolates during chronic infection. *Gut*. 35:51-4.
- Byrd LG, Conrad JT & Nash TE. 1994. *Giardia lamblia* Infections in adult mice. *Infect Immun*. 62(8):3583-5.
- Carnaby S, Katelaris PH, Naeem A & Farthing MJG. 1994. Genotypic heterogeneity within *Giardia lamblia* isolates demonstrated by M13 DNA fingerprinting. *Infect Immun*. 62(5):1875-80.
- Cedillo-Rivera R, Enciso-Moreno JA, Martinez-Palomo A & Ortega-Pierres G. 1989. *Giardia lamblia*: isoenzyme analysis of 19 strains isolates from symptomatic and asymptomatic patients in México. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 83:644-6.
- Centro de Estudios en Salud. Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala. 1991. Instructivo para la tinción de geles con nitrato de plata.
- Chávez B, Knaippe F, González LM & Martínez AP. 1986. *Giardia lamblia*: Electrophysiology in culture epithelial cells. *Exp Parasitol*. 61:379-89.
- Coggins JR & Schaeffer FW. 1984. *Giardia muris*: scanning electron microscopy of *in vitro* excystation. *Exp Parasitol*. 57:62-7.
- Coggins JR & Schaeffer FW. 1986. *Giardia muris*: ultrastructural analysis of *in vitro* excystation. *Exp Parasitol*. 61:219-28.
- Crossley R & Holberton DV. 1983. Characterization of the proteins from the cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *J Cell Sci*. 59:81-103.
- Cuamea NF. 1996. Efecto de *Giardia intestinalis* sobre la absorción de carbohidratos en niños. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora.
- Dávalos RJ. 1989. Impacto de la giardiasis en el estado nutricional de vitamina A, en pre-escolares de zonas urbanas marginadas en la ciudad de Hermosillo, Sonora. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora.
- De Jonckheere JF, Majewska AC, Kasprzak W. 1990. *Giardia* isolates from primates and rodents display the same molecular polymorphisms as human isolates. *Mol Biochem Parasitol*. 39:23-8.
- Den Hollander N, Riley D & Befus D. 1988. Immunology of giardiasis. *Parasitol Today*. 4:124-31.
- Diamond LS, Harlow DR & Cunnick CC. 1978. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 72:431-2.

- Douglas H, Reiner DS & Gillin FD. 1987. A new method for purification of *Giardia lamblia* cysts. *Trans R. Soc Trop Med Hyg.* 81:315-16.
- Enciso MJA. 1990. Obtención y caracterización de aislados de *Giardia lamblia* de individuos sintomáticos y asintomáticos. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigación y Estudios de Posgrado, IPN, México.
- Erlandsen SL & Bemrick WJ. (1987). SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. *J Parasitol.* 73:623-9.
- Erlandsen SL, Bemrick WJ & Pawley J. 1989. High-resolution electron microscopic evidence for the filamentous structure of the cyst wall in *Giardia muris* and *Giardia duodenalis*. *J Parasitol.* 75:787-97.
- Erlandsen SL, Bemrick WJ, Schupp DE, Shields JM, Jarroll EL, Sauch JF & Pawley JB. 1990. High resolution immunogold localization of *Giardia* cyst wall antigens using field emission SEM with secondary and backscatter electron imaging. *J Histochem Cytochem.* 38:625-32.
- Erlandsen SL, Bemrick WJ, Wells CL, Feely DE, Knudsen L, Campbell SR, Van Keulen H & Jarroll EL. 1990b. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). *J Parasitol.* 76:717-24.
- Ey PL, Khana KK, Manning PA & Mayrhofer G. 1993. A gene encoding a 69-kilodalton major surface protein of *Giardia intestinalis* trophozoites. *Mol Biochem Parasitol.* 58:247-58.
- Ey PL, Andrews RH & Mayrhofer G. 1993a. Differentiation of major genotypes of *Giardia intestinalis* by polymerase chain reaction of a gene encoding a trophozoite surface antigen. *Parasitology.* 108:347-56.
- Ey PL, Darby JM, Andrews RH & Mayrhofer G. 1993b. *Giardia intestinalis*: detection of major genotypes by restriction analysis of gene amplification products. *Int J Parasitol.* 1993. 23(5):591-600.
- Farthing MJG, Keusch GT, Carey MC. 1985. Effect of bile and bile salts on growth and membrane lipid uptake by *Giardia lamblia*: possible implications for pathogenesis of intestinal disease. *J Clin Invest.* 76:1727-32.
- Farthing MJG, Mata L, Urrutia JJ & Kronmal RA. 1986. Natural history of *Giardia* infection of infants and children in rural Guatemala and its impact on physical growth. *Am J Clin Clin Nutr.* 43:395-405.
- Farthing MJG, Varon SR & Keusch GT. 1983. Mammalian bile promotes growth of *Giardia lamblia* in axenic culture. *Trans R. Soc Trop Med Hyg* 77:467-9.
- Faubert GM. 1988. Evidence that giardiasis is a zoonosis. *Parasitol Today.* 4:66-8.

- Faust EC, Sawitz W, Tobie J, Odom U, Peres C & Lincicome DR. 1939. Comparative efficiency of various techniques for the diagnosis of protozoa and helminths in faeces. *J Parasitol.* 25:241-262.
- Feely DE & Dyer JK. 1987. Localization of acid phosphatase activity in *Giardia lamblia* and *Giardia muris* trophozoites. *J Protozool.* 34:80-3.
- Feely DE, Erlandsen SL & Chase DG. 1984. Structure of the trophozoite and cyst in "Giardia and Giardiasis" (Erlandsen, S.L. & Meyer, E.A., eds.) pp. 3-31. Plenum Press, USA.
- Feely DF, Gardner MD & Hardin E. 1991. Excystation of *Giardia muris* induced by a phosphate-bicarbonate medium: localization of acid phosphatase. *J Parasitol.* 77(3):441-8.
- Feely DE, Schollmeyer JV & Erlandsen SL. 1982. *Giardia*: distribution of contractile proteins in the attachment organelle. *Exp Parasitol.* 53:145-54.
- Filice FP. 1952. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. *Univ Calif Publ Zool.* 57:53-146.
- Gillin FD & Diamond LS. 1981. *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: effects of cysteine and oxygen tension on trophozoite attachment to glass and survival in culture media. *Exp Parasitol.* 52:9-17.
- Gillin FD, Gault MJ, Hofmann AF, Gurantz, D. & Sauch, JF. 1986. Biliary lipids support serum-free growth of *Giardia lamblia*. *Infect Immun.* 53:641-5.
- Gillin FD, Reiner DS, Gault MJ, Douglas H, Das S, Wunderlich A & Sauch JF 1987. Encystation and expression of cyst antigens by *Giardia lamblia* *in vitro*. *Science.* 235:1040-3.
- Gillin FD, Reiner DS & Boucher SE. 1988. Small intestinal factors promote encystation of *Giardia lamblia* *in vitro*. *Infect Immun.* 56:705-7.
- Gillin FD, Boucher SE & Reiner DS. 1989. *Giardia lamblia*: the roles of bile, lactic acid, and pH in completion of the life cycle *in vitro*. *Exp Parasitol.* 69:164-74.
- Gillin FD, Hagblom P, Harwood J, Aley SB, Reiner DS, McCaffery M, So M & Guiney DG. 1990. Isolation and expression of the gene for a major surface protein of *Giardia lamblia*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87:4463-7.
- Gillin FD, Reiner DS & McCaffery M. 1991. Organelles of protein transport in *Giardia lamblia*. *Parasitol Today.* 7:113-6.
- González-Castro J, Bermejo-Vicedo MT & Palacios-González F. 1986. Desenquistamiento y cultivo de *Giardia muris*. *Rev Iberica Parasitol.* 46:21-5.

- Gottstein B, Harriman GR, Conrad JT & Nash TE. 1990. Antigenic variation in *Giardia lamblia*: cellular and humoral immune response in a mouse model. *Parasite Immunol.* 12:659-73.
- Grà B. 1982. Diagnóstico de la *Giardia lamblia* en biopsias. Resúmenes Simposio Nacional sobre giardiasis. En Sotto EA. 1990. Giardiasis. Editorial Científico-Técnica. La habana. Cuba.
- Halliday CEW, Clark C, Farthing MJG. 1988. *Giardia*-bile salt interactions *in vitro* and *in vivo*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 82:428-32.
- Harris ELV. 1989. Concentration of the extract protein purification methods - a practical approach - (ed. Harris ELV & Angal S.). IRL Press (Oxford University Press). pp 125-74.
- Hartong WA, Gourley WK & Arvanitakis C. 1979. Giardiasis: clinical spectrum and functional-structural abnormalities of the small intestinal mucosa. *Gastroenterology.* 77:61-9.
- Hegner RW. 1927. Excystation and infection in the rat with *Giardia lamblia* from man. *Am J Hyg.* 7:433-47.
- Heyworth MF. 1986. Antibody response to *Giardia muris* trophozoites in mouse intestine. *Infect Immun.* 52:569-71.
- Hiatt RA, Markell EK & Ernest NG. 1995. How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa?. *Am J Trop Med Hyg.* 53(1):36-39.
- Hill DR, Guerrant RL, Pearson RD & Hewlett EL. 1983. *Giardia lamblia* infection of suckling mice. *J Inf Dis.* 147(2):217-21.
- Holberton DV. 1974. Attachment of *Giardia*- a hydrodynamic model based on flagellar activity. *J Exp Biol.* 60:207-21.
- Isaac-Renton JL, Byrne SK & Prameya R. 1988. Isoelectric focusing of ten strains of *Giardia duodenalis*. *J Parasitol.* 74:1054-6.
- Jarroll EL, Müller PJ, Meyer E & Morse SA. 1981. Lipid and carbohydrate metabolism of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol.* 2:187-96.
- Jarroll EL, Manning P, Berrada A, Hare D & Lindmark DG. 1989. Biochemistry and metabolism of *Giardia*. *J Protozool.* 36(2):190-7.
- Jarroll EL, Manning P, Lindmark G, Coggins JR & Erlandsen SL. 1989a. *Giardia* cyst wall-specific carbohydrate: evidence for the presence of galactosamine. *Mol Biochem Parasitol.* 32:121-32.

- Kabnick KS & Peattie DA. 1990. *In situ* analyses reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent. *J Cell Sci.* 95:353-60.
- Kaneda Y & Goutsu T. 1988. Lipid analysis of *Giardia lamblia* and its culture medium. *Ann Trop Med Parasit.* 82:83-90.
- Karapetyan AE. 1962. *In vitro* cultivation of *Giardia duodenalis*. *J Parasitol.* 48:337-40.
- Kay R, Barnes GL & Townley RRW. 1977. *Giardia lamblia* infestation in 154 children. *Aust Paediatr J.* 13:98-104.
- Kelster DB. 1983. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 77:487-8.
- Knight R. 1980. Epidemiology and transmission of giardiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 74:117-24.
- Laemmli WK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Le Blancq SM. 1994. Chromosome rearrangements in *Giardia lamblia*. *Parasitol Today.* 10(5):177-9.
- Lee CS, Jiménez BM & O'Sullivan J. 1988. Purification and characterization of uridine (thymidine) phosphorylase from *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol.* 30:271-8.
- Lindmark DG. 1988. *Giardia lamblia*: localization of hydrolase activities in lysosome-like organelles of trophozoites. *Exp Parasitol.* 65:141-7.
- Lindmark DG & Jarroll EL. 1980. Energy metabolism of the anaerobic protozoan *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol.* 65:141-7.
- Lindmark DG & Jarroll EL. 1982. Pyrimidine metabolism in *Giardia lamblia* trophozoites. *Mol Biochem Parasitol.* 5:291-6.
- Lindmark DG & Miller JJ. 1988. Enzyme activities of *Giardia lamblia* and *Giardia muris* trophozoites and cysts. *Advances in Giardia research* (P. Wallis & B. Hammond, eds.), pp 187-9. University of Calgary Press, Calgary.
- Lujan HD, Mowatt MR, Helman LJ & Nash TE. 1994. Insulin-like growth factors stimulate growth and L-cysteine uptake by the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *J Biol Chem.* 268(18):13069-72.
- Lyman RL & Marchin GL. 1984. Cryopreservation of *Giardia lamblia* with dimethyl sulfoxide using a dewar flask. *Cryobiology.* 21:170-6.

- Mahalanabis D, Simpson TW, Chakraborty ML, Ganguli C, Battacharjee AK & Mukherjee KL. 1979. Malabsorption of water-miscible vitamin A in children with giardiasis and ascariasis. *Am J Clin Nutr.* 32:313-8.
- Manning P, Erlandsen SL & Jarroll EL. 1982. Carbohydrate and amino acid analyses of *Giardia muris* cysts. *J Protozool.* 39(2): 290-8.
- Mayr E. 1940. Speciation phenomena in birds. *Am Natur.* 74:249-78.
- Meloni BP & Thompson RCA. 1987. Comparative studies on the axenic *in vitro* cultivation of *Giardia* of human and canine origin: evidence for intraspecific variation. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 81:637-40.
- Meloni BP, Lymbery AJ & Thompson RCA. 1988. Isoenzyme electrophoresis of 30 isolates of *Giardia* from humans and felines. *Am J Trop Med Hyg.* 38(1):65-73.
- Meloni BP, Lymbery AJ, Thompson RCA & Gracey M. 1989. Characterization of *Giardia* isolates using a non-radiolabelled DNA probe, and correlation with the results of isoenzyme analysis. *Am J Trop Med Hyg.* 40:629-37.
- Meloni BP, Thompson RCA, Stranden AM, Koehler P & Eckert J. 1992. Critical comparison of *Giardia duodenalis* from Australia and Switzerland using isoenzyme electrophoresis. *Acta Tropica* 50(2): 115-124.
- Meloni BP, Lymbery AJ & Thompson RCA. 1995. Genetic characterization of isolates of *Giardia duodenalis* by enzyme electrophoresis: implications for reproductive biology, population structure, taxonomy, and epidemiology. *J Parasitol.* 81(3):368-83.
- Mendis AHW, Thompson RCA, Reynoldson JA, Amson A, Meloni BP & Gunsberg S. 1992. The uptake and conversion of [^{14}C] aspartate and [^{14}C] alanine to $^{14}\text{CO}_2$ by *Giardia duodenalis*. *Comp Biochem Physiol.* 102B:235-239.
- Merrill CR, Switzer RC, VanKeuren ML. 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:4335.
- Mertens E. 1990. Occurrence of pyrophosphate:fructose 6-phosphate-1-phosphotransferase in *Giardia lamblia* trophozoites. *Mol Biochem Parasitol.* 40:147-50.
- Meyer EA. 1970. Isolation and axenic cultivation of *Giardia* trophozoites from the rabbit, chinchilla and cat. *Exp Parasitol* 27:179-83.
- Meyer EA. 1976. *Giardia lamblia*: Isolation and axenic cultivation. *Exp Parasitol* 39:101-5.
- Mohareb EW, Rogers EJ, Welner EJ & Bruce JI. 1991. *Giardia lamblia*: phospholipid analysis of human isolates. *Ann Trop Med Parasitol.* 85(8):591-7.

- Morecki R & Parker JG. 1967. Ultrastructural studies of the human *Giardia lamblia* and subjacent jejunal mucosa in a subject with steatorrhea. *Gastroenterology*. 52:151-64.
- Moss DM, Visvesvara GS, Mathews HM & Ware DA. 1982. Isoenzyme comparison of axenic *Giardia lamblia* strains. *J Protozool* 39(5): 559-584.
- Mowatt MR, Aggarwal A & Nash TE. 1991. Carboxy-terminal sequence conservation among variant-specific surface proteins of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol*. 49:215-28.
- Mowatt MR & Nash TE. 1992. Characterization of a *Giardia lamblia* variant-specific surface protein (VSP) gene from isolate GSM and estimation of the VSP gene repertoire size. *Mol Biochem Parasitol*. 51(2):219-27.
- Müller M. 1988. Energy metabolism of protozoa without mitochondria. *Annu Rev Microbiol*. 42:465-488.
- Narcisi EM, Paulin JJ & Fechheimer M. 1984. Presence and localization of vinculin in *Giardia*. *J Parasitol*. 80(3):468-73.
- Nash T. 1992. Surface antigen variability and variation in *Giardia Lamblia*. *Parasitol Today* 8(7): 229-234.
- Nash TE & Keister DB. 1983. Differences in excretory-secretory products and surface antigens among 19 isolates of *Giardia*. *J Infect Dis*. 152(6):1166-71.
- Nash TE, McCutchan T, Keister D, Dame JB, Conrad JD & Gillin FD. 1985. Restriction-endonuclease analysis of DNA from 15 *Giardia* isolates obtained from humans and animals. *J Infect Dis*. 152(1):64-73.
- Nash TE, Herrington DA, Losonsky GA & Lavine MM. 1987. Experimental human infections with *Giardia lamblia*. *J Infect Dis*. 156(6):974-84.
- Nash TE, Aggarwal A, Adam RD, Conrad JT & Merritt JW. 1988. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *J Immunol*. 141(2):636-41.
- Nash TE, Banks SM, Alling DW, Merritt JW & Conrad JT. 1990. Frequency of variant antigens in *Giardia lamblia*. *Exp Parasitol*. 71:415-21.
- Nash TE, Herrington DA, Levine MM, Conrad JT & Merritt JW. 1990b. Antigenic variation of *Giardia lamblia* in experimental human infections. *J Immunol*. 144:4382-9.
- Nash TE, Merritt JW & Conrad JT. 1991. Isolate and epitope variability in susceptibility of *Giardia lamblia* to intestinal proteases. *Infect Immun*. 59:1334-40.
- Notis WM. 1972. Giardiasis and vitamin B12 malabsorption [letter]. *Gastroenterology*. 63:1085.

- Ortega-Barria E, Ward H, Evans JE & Pereira MEA. 1990. N-acetylglucosamine is present in cysts and trophozoites of *Giardia lamblia* and serves as receptor for wheatgerm agglutinin. *Mol Biochem Parasitol.* 43:151-66.
- Owen RL, Nemanic PC & Stevens DP. 1979. Ultrastructural observations on giardiasis in a murine model. I. Intestinal distribution, attachment, and relationship to the immune system of *Giardia muris*. *Gastroenterology.* 76:757-69.
- Paget TA, Jarroll EL, Manning P, Lindmark DG & Lloyd D. 1989. Respiration in the cysts and trophozoites of *Giardia muris*. *J Gen Microbiol.* 135:145-54
- Peattie DA. 1990. The giardins of *Giardia lamblia*: genes and proteins with promise. *Parasitol Today.* 6:52-6.
- Peattie DA, Alonso RA, Hein A & Caulfield JP. 1989. Ultrastructural localization of giardins to the edges of disk microribbons of *Giardia lamblia* and the nucleotide and deduced protein sequence of alpha giardin. *J Cell Biol.* 109:2323-35.
- Phillips RE, Boreham PFL & Shepherd RW. 1984. Cryopreservation of viable *Giardia intestinalis* trophozoites. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 78:604-
- Pimenta PFP, Pinto DS & Nash TE. 1991. Variant surface antigens of *Giardia lamblia* are associated with the presence of a thick cell coat and label fracture immunocytochemistry survey. *Infect Immun.* 59(11):3989-96.
- Ramirez-Mayans JA, Rivera ME, Mora MA & Saucedo L. 1983. Principales manifestaciones gastrointestinales de la giardiasis en niños. *Bol Med Hosp Inf Cd Méx.* 40(10):571-6.
- Reiner DS, Douglas H & Gillin FD. 1989. Identification and localization of cyst-specific antigens *Giardia lamblia*. *Infect Immun.* 57:963-8.
- Reiner DS, McCaffery M & Gillin FD. 1990. Sorting of cyst wall proteins to a regulated secretory pathway during differentiation of the primitive eukaryote, *Giardia lamblia*. *Eur J Cell Biol.* 53:142-53.
- Rentdorff RC. 1954. The experimental transmission of human protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. *Am J Hyg.* 59:209-220.
- Reynoldson JA, Thomson RCA & Meloni BP. 1992. The potential and possible mode of action of benzimidazoles against *Giardia* and other protozoa. *J Pharmac Med.* 2:35-50.
- Rica EW & Schaefer FWII. 1981. Improved *in vitro* excystation procedure for *Giardia lamblia* cysts. *J Clin Microbiol.* 14:709-10.
- Ridley M & Ridley D. 1976. Serum antibodies and jejunal histology in giardiasis associated with malabsorption. *J Clin Pathol.* 29:30-4.

- Roberts-Thomson IC, Stevens DP, Mahmoud AAF & Warren KS. 1976. Giardiasis in the mouse: an animal model. *Gastroenterology* 71:57-61.
- Sauch JF. 1988. A new method for excystation of *Giardia*. *Advances in Giardia Research*. P.M. Wallis y B.R.Hammond (ed), University of Calgary Press, Calgary. 261-4.
- Schaefer FW, Rice EW & Hoff JC. 1984. Factors promoting *in vitro* excystation of *Giardia muris* cysts. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 78:795-800.
- Schantz PM. 1991. Parasitic zoonoses in perspective. *Int J Parasit.* 21:161-70.
- Schofield PJ, Edwards MR & Kranz P. 1991. Glucose metabolism in *Giardia intestinalis*. *Mol Biochem Parasitol.* 45:39-48.
- Sheffield HG & Bjorvatn B. 1977. Ultrastructure of the cyst of *Giardia lamblia*. *Am J Trop Med Hyg.* 26:23-30.
- Smith PD, Gillin FD, Kaushal NA & Nash TE. 1982. Antigenic analysis of *Giardia lamblia* from Afghanistan, Puerto Rico, Ecuador, and Oregon. *Infect Immun.* 36(2):714-9
- Smith PD, Gillin FD, Spira WM & Nash TE. 1982a. Chronic giardiasis: studies in drug sensitivity, toxin production and host immune response. *Gastroenterology* 83:797-803.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ & Klenk DC. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150:76-85.
- Sotto EA. 1990. Giardiasis. Editorial Científico-Técnica. La habana, Cuba.
- Stranden AM, Eckert J & Köhler P. 1990. Electrophoretic characterization of *Giardia* isolated from humans, cattle, sheep, and a dog in Switzerland. *J Parasitol.* 75(5):660-8.
- Thompson RCA & Reynoldson JA. 1993. *Giardia* and giardiasis. *Adv Parasitol.* 32:71-160.
- Tibayrenc M, Kjellberg F & Ayala FJ. 1990. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas* and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87:2414-8.
- Udezulu IA, Visvesvara GS, Moss DM & Letch GJ. 1992. Isolation of two *Giardia lamblia* (WB strain) clones with distinct surface protein and antigenic profiles and differing infectivity and virulence. *Infect Immun.* 60(6): 2274-80.
- Upcroft JA & Upcroft P. 1994. Two distinct varieties of *Giardia* in a mixed infection from a single human patient. *J Euk Microbiol.* 41(3): 189-94.

Valencia ME, Jardines RP, Noriega E & Higuera I. 1980. Estudio nutricional en la zona serrana del estado de Sonora. Reporte técnico del Instituto de Investigación y Estudios Superiores del Noroeste, A.C. Hermosillo, Sonora.

Valencia ME, Jardines RP, Higuera I, Lozano T, Wong P & Noriega G. 1981. Estudio nutricional en centros urbanos marginados de Sonora. Reporte técnico del Instituto de Investigación y Estudios Superiores del Noroeste, A.C. Hermosillo, Sonora.

Visvesvara GS. 1980. Axenic growth of *Giardia lamblia* in Diamond's TPS-1 medium. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 74:213-5.

Waltzer PD, Wolfe MS & Schultz MG. 1971. Giardiasis in Russia. *J Infect Dis.* 124:235-7.

Wang CC & Aldritt S. 1983. Purine salvage networks in *Giardia lamblia*. *J Exp Med.* 158:1703-12.

Ward HD, Alroy J, Lev BI, Kausch GT & Pereira MEA. 1985. Identification of chitin as a structural component of *Giardia* cysts. *Infect Immun.* 49:629-34.

Warhurst DC & Wright SC. 1979. Cryopreservation of *Giardia intestinalis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 73:601.

Weinbach EC, Claggett CE, Kelster B & Diamond LS. 1980. Respiratory metabolism of *Giardia lamblia*. *J Parasitol.* 66:347-50.

Weiss JB, Van Keulen H & Nash TE. 1992. Classification of subgroups of *Giardia lamblia* based upon RNA gene sequence using the polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol.* 54:73-86.

Wieder SC, Keister DB & Reiner DS. 1983. Mass cultivation of *Giardia lamblia* in a serum-free medium. *J Parasitol.* 69(8):1181-2.

Wiesehahn GP, Jarroll EL, Lindmark DG, Meyer EA & Hallick LM. 1984. *Giardia lamblia*: autoradiographic analysis of nuclear replication. *Exp Parasit.* 58:94-100.

Wolfe MS. 1992. Giardiasis. *Clin Microbiol Rev.* 5:93-100.

Wright SG, Tomkins AM & Ridley DS. 1977. Giardiasis: clinical and therapeutic aspects. *Gut.* 18:343-50.

ANEXO 1

Reactivos y soluciones complementarios

* Medio TYI-S-33 suplementado con billis (ATCC # 1404)

Bilis Bovina bacteriológica (Sigma Chem. Co.)	0.05 g
Tripticasa (casein digest peptone , BBL)	2.0 g
Extracto de levadura (Sigma Chem. Co.)	1.0 g
Dextrosa (Baker an.)	1.0 g
Cloruro de Sodio (Baker an.)	0.2 g
Cisteína-monoclorhidrato (Merck)	0.2 g
Acido ascórbico (Merck)	0.01 g
Fosfato de potasio monobásico (Baker An.)	0.06 g
Fosfato de potasio dibásico (Baker An.)	0.1 g
Citrato férrico de amonio (Sigma)	2.3 mg

- Disolver en agua bidestilada hasta 80 mL.

- Ajustar el pH a 6.8-6.9 y aforar hasta 90 mL.

- Filtrar en membrana de 0.4 µm de diámetro de poro.

- Realizar prueba de esterilidad, incubando a 37°C durante una noche.

- Completar con 10 mL de suero bovino fetal descomplementado (Sigma), 1 mL de gentamicina (80 mg/mL) (Schering-Plough) y 400 µL de anfotericina B (250 µg/mL) (Sigma Co.). Almacenar a 4°C hasta su uso. Es estable por 2 semanas una vez completado.

* Amortiguador Salino de Fosfatos (PBS) [10 X]

Cloruro de sodio (Merck)	80.0 g
Cloruro de potasio (Merck)	2.0 g
Fosfato de sodio dibásico heptahidratado (Aldrich Chem. Co.)	21.7 g
Fosfato de potasio monobásico (Aldrich Chem. Co.)	2.0 g

- Disolver en agua destilada hasta 800 mL.

- Ajustar pH a 7.2 y aforar a 1 L.

- Para su empleo como PBS 1 X , disolver 1:10 con agua destilada. Es estable por varias semanas.

*** Sulfato de Cinc al 33 %**

Sulfato de cinc heptahidratado (Merck)	330 g
Agua destilada c.b.p.	1 L

- Revisar periódicamente su densidad (1.18-1.20). La solución es estable por varias semanas.

*** Lugol [solución Weigert modificada]**

Yodo	5 g
Yoduro de potasio	10 g
Agua destilada c.b.p	100 mL

- Disolver completamente el yoduro de potasio en el agua y agregar posteriormente el yodo. Almacenar a temperatura ambiente, protegida de la luz. Es estable por varios meses.

ANEXO 2

Técnicas Complementarias

*** Método micro BCA^{MR} (Ácido Bicínconínico) para determinación de proteínas***
(Técnica de Smith & cols., 1985)

Solución A: carbonato de sodio al 8% (p/v), hidróxido de sodio al 1.6% (p/v), tartrato de sodio al 1.5% (p/v) en hidróxido de sodio 0.2 N. pH 11.25.

Solución B: ácido bicínconínico al 4% en agua destilada.

Solución C: sulfato cúprico pentahidratado al 4% en agua destilada. Estas soluciones son estables por al menos 12 meses, almacenados a temperatura ambiente.

Solución D: Mezclar 2 volúmenes de C con 48 volúmenes de B

Solución de trabajo: Mezclar 1 volumen de A con 1 volumen de D. Esta solución es estable por 1 día a temperatura ambiente.

Solución patrón de BSA . BSA en agua bidestilada (2 mg por mL).

La preparación de estándares de proteína para calibración se hace de acuerdo al siguiente formato:

Volumen de albúmina estándar (2 mg/mL)	Volumen de agua o diluyente *	Concentración de la primera dilución	Volumen de la primera dilución	Volumen de Agua o Diluyente	Concentración final del estándar
0.10 mL	1.90 mL	100 µg/mL	0.1 mL	9.9 mL	1.0 µg/mL
0.25 mL	1.75 mL	250 µg/mL	0.1 mL	9.9 mL	2.5 µg/mL
0.50 mL	1.50 mL	500 µg/mL	0.1 mL	9.9 mL	5.0 µg/mL
0.75 mL	1.25 mL	750 µg/mL	0.1 mL	9.9 mL	7.5 µg/mL
1.00 mL	1.00 mL	1000 µg/mL	0.1 mL	9.9 mL	10.0 µg/mL
		750 µg/mL	0.2 mL	9.9 mL	15.0 µg/mL
		1000 µg/mL	0.2 mL	9.9 mL	20.0 µg/mL

* Es preferible disolver los estándares en la misma matriz o diluyente en la cual están disueltas las muestras.

1. Mezclar 1 mL de cada estándar o de muestra en tubos etiquetados.
2. Adicionar 1 mL de solución de trabajo a cada tubo. Mezclar bien.
3. Incubar todos los tubos a 60°C por 60 minutos.

- 4 Después de incubar, dejar enfriar a temperatura ambiente.
5. Leer absorbancia a 562 nm calibrando con agua como referencia.
6. Corregir las absorbancias de los estándares y de la muestra restándoles la del blanco.
- 7 Preparar una curva estándar graficando la absorbancia corregida de los estándares a 562 nm contra concentración de proteína. Es recomendable realizar esta curva estándar, cada vez que sea necesario
8. Determinar la concentración de proteína empleando la curva estándar.

*** Preparación de geles con gradiente continuo de acrilamida (6-18%)(SDS-PAGE)***

- Preparar las siguientes soluciones:

Solución de monómeros (30% T, 2.7% C)

Acrlamida* (Bio-rad, Richmond, CA)	58.4 g
N.N'-metilén-bisacrilamida* (Bio-rad)	1.6 g

- Disolver en 150 mL de agua bidestilada y deionizada, filtrar en Whatman # 1 y aforar a 200 mL

- Almacenar en recipiente ámbar y refrigeración (4°C)

* Se deben manejar con precaución (neurotóxicas).

Amortiguador del gel resolvidor (Tris-HCl 1.5 M)

Trizma base	91.0 g
-------------	--------

- Disolver en 450 mL de agua bidestilada, ajustar el pH a 8.8 con HCl concentrado y aforar a 500 mL. Mantener en refrigeración.

Amortiguador del gel concentrador (Tris-HCl 0.5 M)

Trizma base	12.2 g
-------------	--------

- Disolver en 150 mL de agua destilada, ajustar el pH a 6.8 y aforar a 200 mL.

Mantener en refrigeración.

Amortiguador para cámara -10X- (Tris 0.025 M, Glicina 0.192 M, 0.1% SDS)

Trizma base	30.0 g
Glicina	144.0 g
SDS al 20%, acuoso	50.0 mL

- Disolver en 900 mL de agua bidestilada, ajustar el pH a 8.3 y aforar a 1000 mL.

Mantener en refrigeración. Antes de utilizarse, disolver 1:10 con agua bidestilada.

Solución APS: Persulfato de amonio 10 % en agua bidestilada).

Amortiguador de muestra 2X (Tris-HCl 0.125 M, SDS 4%, Glicerol 10%,
β-mercaptoetanol, pH 6.8).

Trizma base 1.5 M, pH 6.8	2.5 mL
SDS al 20%, acuoso	2.0 mL
Glicerol	2.0 mL
2-Mercaptoetanol	1.0 mL
Azul de bromofenol al 0.5 %, acuoso	1.0 mL
Agua bidestilada	1.5 mL
- Disolver, dividir en fracciones y congelar.	

- Preparar los geles de acuerdo con el siguiente formato:

	Gel Separador (Volumen total 36 mL)		Gel Concentrador (Volumen total 5 mL)
	Cámara A (6%)	Cámara B (18%)	Tot 4%. Bis 2.7 %
Solución de monómeros	3.6 mL	10.8 mL	660 µL
Amortiguador Resolvedor	4.8 mL	4.5 mL	
Amortiguador Concentrador			1.25 mL
SDS 20%	90 µL	90 µL	50 µL
Agua Bidestilada	9.5 mL	2.4 mL	3.05 mL
APS 10%	115 µL	90 µL	25 µL
TEMED	6 µL	6 µL	2.5 µL

NOTA: El gel separador se prepara empleando un formador de gradientes, el cual vierte la mezcla de las cámaras A y B en el depósito para el gel. Preparar el gel concentrador hasta que haya polimerizado completamente el gel separador. El gel separador polimeriza en aproximadamente 45 minutos y el gel concentrador en 20 minutos máximo.

*** Criopreservación de trofozoitos de *Giardia lamblia* * (Encliso, 1990)**

- Para la criopreservación:

1. Cultivar los trofozoitos en medio TYI-S-33 hasta la fase logarítmica de crecimiento
2. Enfriar los tubos de cultivo por 30 minutos en baño de hielo-agua.
3. Centrifugar los tubos a 600 g durante 10 minutos a 4°C. Retirar el sobrenadante y contar los trofozoitos en una cámara de Neubauer.
4. Agregar a la pastilla celular medio TYI-S-33 adicionado con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO)(Sigma Chem. Co.), en razón de 1 mL por cada 5×10^6 trofozoitos. Resuspender perfectamente la pastilla.
5. Transferir el contenido a criotubos Nunc (Inter Med, Dinamarca) de 1.8 mL. Enfriar rápidamente en baño de hielo-agua.
6. Inmediatamente colocar los tubos a -70°C. Bajo estas condiciones permanecen viables hasta por 6 meses.
7. O bien, transferir los criotubos a inmersión en nitrógeno líquido para almacenarlos hasta su descongelación. Bajo estas condiciones permanecen viables hasta por 3 años.

-Para la descongelación:

1. Colocar los criotubos a un baño a 37°C hasta la fusión completa del medio (también se puede hacer a temperatura ambiente).
2. Transferir el medio con células a un tubo cónico de 15 mL conteniendo 1 mL de medio TYI-S-33 fresco.
3. Centrifugar los tubos a 600 g, por 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Decantar el sobrenadante y llenar con 15 mL de medio TYI-S-33 fresco.
5. Revisar los trofozoitos en el microscopio invertido.
6. Incubar los tubos a 37°C.

*** Método de flotación con sulfato de zinc (Faust & cols., 1939) ***

Se preparó una suspensión de la muestra en 10-15 veces su volumen en agua destilada sobre un tubo de ensayo de 13 x 100 mm. La mezcla se centrifugó a 2500 R.P.M. durante 45 segundos (centrifuga clínica) y se removió el material sobrenadante

por decantación. Tras una nueva adición de 2-3 ml de agua y agitación manual, el tubo fue llenado con agua hasta 1 cm por debajo del borde y se centrifugó en las condiciones citadas. El sobrenadante se descartó y se agregaron 2-3 mL de solución de sulfato de cinc al 33 % (Anexo 1), para resuspender la pastilla. Se adicionó más solución de sulfato de cinc, hasta 1 cm por debajo del borde del tubo, el cual se centrifugó por 2 minutos a 2500 R.P.M. Finalmente, se llenó el tubo con solución de sulfato de cinc y se tomaron muestras del material flotante en la superficie del sulfato de cinc, adosando a ésta un cubreobjetos. Se agregó una gota de solución yodada (Iugol) [Anexo 1] en un portaobjetos para colocar el cubre y observar en microscopio óptico (Reichert Scientific Instruments, modelo 410) en objetivo de 100 a 400 aumentos a los quistes de *Giardia lamblia* y otros parásitos rescatados de las heces.

* Tinción de geles con nitrato de plata (Merrill & cols., 1979)*

El procedimiento de tinción de geles de electroforesis con nitrato de plata se realizó de acuerdo al método del Centro de Estudios en Salud (1991).

En este método, es importante que las soluciones empleadas cubran completamente el gel durante cada uno de los pasos. En el caso de un gel de 14 x 16 cm, es suficiente preparar 200 mL de las soluciones siguientes:

Solución fijadora (etanol 40%, ácido acético 10%)

Etanol absoluto (Merck) 60 mL

Acido acético (Merck) 20 mL

- Aforar a 200 mL con agua bidestilada.

Solución incubadora (CH₃COONa 0.5 M, Na₂S₂O₃ 0.2 %, glutaraldehído 0.05 M).

Etanol absoluto (Merck) 80 mL

Acetato de sodio anhidro (Aldrich Chem. Co.) 8.2 g

Tiosulfato de sodio x 5H₂O (EM Science) 0.4 g

Glutaraldehído * (Sigma Chem. Co.) 4.0 mL

- Se disuelven todos los componentes en 100 mL de agua bidestilada y se aforan hasta 200 mL.

* Se debe agregar inmediatamente antes de usarse la solución.

Solución de plata (AgNO₃ 0.1 % p/v, formaldehído 0.02 % v/v)

Etanol absoluto (Merck)	60 mL
Nitrato de plata (Merck)	0.2 g
formaldehído * (Aldrich Chem. Co.)	133.2 µL

- Se disuelven todos los componentes en 100 mL de agua bidestilada y se aforan hasta 200 mL. La solución es fotosensible, se debe mantener en frasco ámbar.

* Se debe agregar inmediatamente antes de usarse la solución.

Solución reveladora (Na₂CO₃ 2.5 % p/v, formaldehído 0.01 % v/v)

Etanol absoluto (Merck)	60 mL
Carbonato de sodio (Aldrich Chem. Co.)	5.0 g
Formaldehído * (Aldrich Chem. Co.)	66.8 µL

- Disolver los componentes en 100 mL de agua bidestilada, ajustar pH dentro del rango de 11.3-11.8 y aforar hasta 200 mL.

* Se debe agregar inmediatamente antes de usarse la solución.

Solución terminadora (EDTA 0.05 M)

Etanol absoluto (Merck)	60 mL
EDTA x 2H ₂ O (Aldrich Chem. Co.)	2.9 g

- Disolver los componentes en 100 mL de agua bidestilada y aforar a 200 mL.

Solución preservante (etanol 10 % v/v, glicerol 6 % v/v)

Etanol absoluto (Merck)	20 mL
Glicerol (Sigma Chemical Co.)	12 mL

- Disolver los componentes en 100 mL de agua bidestilada y aforar a 200 mL.

Procedimiento:

1. Sumergir el gel por 30 minutos en solución fijadora. Agitación suave.
2. Descartar la solución fijadora y reemplazarla por solución incubadora. El periodo de incubación puede variar de 30 minutos a toda la noche, si es necesario. Agitación suave.
3. Lavar con agua deionizada, tres veces, por 5 minutos.
4. Vertir la solución de plata sobre el gel y dejarlo reaccionar por 20 minutos, con agitación suave. El recipiente debe estar cubierto por papel aluminio, para evitar la luz.
5. Descartar la solución de plata y agregar un poco de solución reveladora. Agitar el recipiente para hacer un primer lavado, generalmente de 2-3 minutos.

6. Descartar esta solución reveladora y reemplazarla por solución reveladora nueva para terminar el revelado de las bandas.

7. Una vez lograda la coloración deseada de las bandas, descartar la solución reveladora, e inmediatamente, reemplazarla por solución terminadora. Dejar el gel en esta solución con agitación suave durante 20 minutos.

8. Cambiar la solución terminadora por agua bidestilada y lavar el gel, 10 minutos.

9. Descartar el agua y verter sobre el gel la solución preservante. Lavar el gel por 20 minutos. Dejar el gel teñido en solución fijadora.