



Universidad Nacional Autónoma  
de México



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"CUAUTITLAN"

V N A M

FALLA DE ORIGEN

" AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE ANTIGENOS  
RELEVANTES DEL PROTOZOARIO PARASITO Giardia lamblia "

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A

RAUL ARGÜELLO GARCIA

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARIA GUADALUPE ORTEGA PIERRES



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	i
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	iv
ABREVIATURAS.....	vi
<b>I. INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
1A. <i>Giardia lamblia</i> : Aspectos generales.....	2
1B. <i>Giardia</i> y giardiasis.....	4
1C. Aspectos Inmunologicos de la giardiasis.....	10
1D. Antecedentes.....	15
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
Generales.....	23
Particulares.....	23
<b>III. MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>25</b>
1. Parasitos.....	25
2. Animales.....	25
3. Sueros humanos.....	26
4. Cultivo y cosecha de trofozoitos de <i>G. lamblia</i> .....	27
5. Preparacion y cuantificacion de antigenos solubles....	28
5A. Sonificacion y extraccion con detergentes.....	28
5B. Sonificacion y extraccion con acido acetico.....	28
5C. Congelacion-descongelacion y extraccion con detergentes.....	29
5D. Fraccionamiento celular de trofozoitos (membrana, citosol, citoesqueleto).....	29
6. Analisis electroforético de extractos solubles.....	31
6A. Electroforesis en geles de poli(acrilamida con dodecil sulfato de Sodio (SDS-PAGE)).....	31
6B. Electroforesis bidimensional.....	33
7. Analisis densitometrico de extractos solubles.....	35
8. Radiiodinacion de trofozoitos de <i>G. lamblia</i> . Analisis y cuantificacion de componentes accesibles al marcaje con <sup>125</sup> I.....	35
9. Infeccion experimental de jerbos mongolicos con trofozoitos de <i>G. lamblia</i> .....	37
9A. Monitoreo del patron de expulsion de quistes en muestras fecales.....	38
9A.1. Flotacion con sulfato de Zinc (Tecnica de Faust y cols., 1939).....	38
9A.2. Soporte de sacarosa 0.85M.....	39
9B. Obtencion de muestras sericas.....	40
9C. Vigilancia del peso corporal.....	41
10. Desarrollo de ensayos para el inmunodiagnostico de giardiasis clinica y experimental.....	41
10A. Preparacion de un conjugado de Inmuno- globulinas (Igs) de conejo anti-Igs de jervo acopladas a peroxidasa de rabano.....	41
10B. Ensayo del inmunosorbente acoplado a enzima (ELISA).....	44
10C. Inmuno-electrotransferencia (IET, Western blotting).....	45
10D. Ensayo de inmunoprecipitacion (IPF).....	48
11. Metodos estadisticos.....	50

<b>IV. RESULTADOS</b> .....	51
1. Cultivo de trofozoitos de <i>G. lamblia</i> .....	51
2. Eficiencia en la obtención de antígenos solubles totales, subcelulares y de superficie radiomarcados...	51
3. Análisis de componentes antígenicos en trofozoitos de <i>G. lamblia</i> .....	55
3.1. Caracterización electroforética.....	55
3.2. Análisis densitométrico.....	66
4. Evaluación de la actividad antigénica de los extractos solubles de <i>G. lamblia</i> .....	76
5. Valoración longitudinal de la infección de jerbos mongólicos con trofozoitos de <i>G. lamblia</i> .....	77
6. Obtención y titulación del conjugado de Igs de conejo anti-Igs de jerbo acopladas a HRP.....	88
7. Detección de Igs circulantes y de reconocimiento antigénico durante la giardiasis experimental.....	89
8. Detección de Igs circulantes y de reconocimiento antigénico en giardiasis clínica.....	91
<b>V. DISCUSION</b> .....	102
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	127
<b>ANEXOS</b> .....	131
Anexo 1: Reactivos y soluciones complementarias.....	131
Medio TYI-S-33 Suplementado con bilis.....	131
Amortiguador de Fosfatos-Salina (PBS){Stock 10X}...	131
Mezcla crónica [reactivo limpiador de ácido crómico].....	131
Sulfato de Zinc al 33%.....	132
Iugol [solución yodada de Dobell].....	132
PBS 0.1M, pH 6.8.....	132
Anexo 2: Técnicas complementarias.....	133
Determinación de proteínas con el Reactivo de Fenol según Folin [Ensayo de Lowry modif.]....	133
Electroforesis de proteínas en geles planos de poliacrilamida-SDS [SDS-PAGE].....	133
A. Preparación de geles con concentración constante de acrilamida (10%).....	133
B. Preparación de geles con un gradiente continuo de acrilamida (5-15%).....	134
Tinción de carbohidratos en ácido peryódico-Schiff [PAS] en geles tipo SDS-PAGE.....	135
Autorradiografía indirecta y revelado de placas de Rayos-X para geles tipo SDS-PAGE con <sup>125</sup> I...	136
Tinción de papel de Nitrocelulosa [NCP] con Ag transferido a partir de geles tipo SDS-PAGE...	136
Prueba de viabilidad basada en exclusión del Azul de Tripano.....	137
Criopreservación de trofozoitos de <i>G. lamblia</i> en Nitrogeno liquido.....	137
<b>VII. REFERENCIAS</b> .....	139

## RESUMEN

Dentro del ámbito de la salud humana y veterinaria, las parasitosis intestinales por protozoarios ocupan un lugar importante en función de sus características epidemiológicas y las repercusiones económicas que ocasionan. En particular, la giardiasis es actualmente un problema de salud pública en países desarrollados y más aun en aquellos en vías de desarrollo como lo es México, donde afecta una proporción importante de la población pediátrica de acuerdo con numerosos estudios precedentes.

El agente causal de la infección humana, Giardia lamblia, se aloja en el intestino delgado de una serie de hospederos susceptibles. En el hombre, la giardiasis se caracteriza por un cuadro clínico complejo (desde asintomático hasta cuadros diarreicos con síndrome de malabsorción) y un diagnóstico coprológico rutinario frecuentemente difícil y poco eficiente. En estas características se asume la participación de factores del hospedero (p.ej. el sistema inmune) y del parásito (v.gr. propiedades de ciertas biomoléculas o la virulencia de cepas). Dentro de los últimos, el análisis de antígenos (Ags) en la fase trofozoito en distintas cepas es una estrategia crucial para poder aportar material confiable para su uso en estudios sobre inmunodiagnóstico e inmunoprolifaxis de la infección.

En el presente trabajo se analizó el espectro antigénico de 2 cepas prototipo de G. lamblia (P-1 y WB) empleando variantes metodológicas para la extracción de componentes proteínicos totales, subcelulares y de superficie celular radiomarcados con

125]. Este análisis comprendió la caracterización electroforética, densitométrica y la evaluación de la reactividad de los extractos en un ensayo inmunoserológico empleando muestras a partir de infección natural y experimental con el protozooario. Las cepas analizadas presentaron heterogeneidad antigénica de orden cuantitativo (determinada densitométricamente) y cualitativo (determinada por electroforesis bidimensional) y los extractos solubles totales obtenidos por medio de sonicación de trofozoitos en presencia de detergentes (triton X-100 o desoxicolato de Sodio) presentaron ventajas (mayor facilidad de obtención y alta inmunoreactividad) como fuentes antigénicas de G. lamblia confiables para su uso en inmunodiagnóstico.

Por otro lado, se estableció la infección experimental por G. lamblia con estas cepas y se evaluó longitudinalmente la respuesta inmune en un modelo animal y se cotejaron estos datos con los observables en un estudio transversal de giardiasis clínica. Se inocularon jerbos mongólicos singénicos con trofozoitos del parásito por vía oral-intra gástrica, se colectaron muestras fecales para determinar cantidades de quistes expulsados y muestras séricas para determinar el título de Inmunoglobulinas (Igs) específicas empleando la técnica de ELISA y los patrones de reconocimiento antigénico de estas Igs por Inmunolectrotransferencia (IET) de los Ags solubles totales seleccionados y la inmunoprecipitación (IPP) de Ags de superficie marcados con 125I. En muestras séricas de 41 pacientes en edad pediátrica, a quienes se diagnosticó giardiasis sintomática o asintomática, se realizaron los ensayos mencionados.

Los jerbos presentaron un patrón de infección autolimitante con expulsión intermitente de quistes asociado a periodos de prepatencia y patencia semejantes a los observados en casos de giardiasis clínica, aunque la cantidad de quistes expulsados por gramo de heces fue mayor en animales infectados con la cepa WB. En los ensayos de IET se notó un patrón de reconocimiento antigénico el cual fue cuantitativamente y cualitativamente diferente en función de la cepa infectante, siendo más reactivos los Ags de 150-180, 133, 121, 92, 82, 65, 45 y 40 Kd. En los datos de IPP el repertorio de Ags reconocidos fue más limitado, especialmente hacia a los componentes de 82 y 55 Kd. Para los sueros humanos se observaron, en la prueba de IET, patrones de reconocimiento complejos y variables de individuo a individuo, aunque los Ags de 133, 92, 55, 45 y 38 Kd fueron reconocidos con mayor frecuencia. Los Ags de 82 y 55 Kd fueron detectados preferencialmente en ensayos de RIP. Todos estos datos guardaron relación con la heterogeneidad antigénica que se determinó en las cepas infectantes utilizadas. Un conjunto selecto de estos Ags fueron relevantes en ambos tipos de infección (p. ej. aquellos de 133, 92, 82, 65, 55 y 45 Kd) dada su reactividad y la frecuencia con que fueron detectados en los ensayos; por lo tanto, estos componentes podrían utilizarse para desarrollar métodos de inmunodiagnóstico o inmunoprofilaxis de la giardiasis.

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	pág.
TABLA 1. Eficiencia en la obtención de antígenos solubles totales de trofozoitos de <i>G. lamblia</i> empleando diferentes métodos.....	56
TABLA 2. Eficiencia en la obtención de antígenos subcelulares de trofozoitos de <i>G. lamblia</i> .....	57
TABLA 3. Antígenos de trofozoitos de <i>G. lamblia</i> reconocidos en estados de infección.....	101
FIGURA 1. Aspectos morfológicos de <i>G. lamblia</i> y su ciclo de vida en humanos.....	5
FIGURA 2. Integración de los mecanismos posibles que participan en la respuesta inmune humana hacia <i>G. lamblia</i> considerando las observaciones clínicas, experimentales y epidemiológicas.....	13
FIGURA 3. Eficiencia relativa de obtención de antígenos solubles de <i>G. lamblia</i> empleando diferentes métodos.	58
FIGURA 4. Eficiencia en la obtención de antígenos radiomarcados de trofozoitos de <i>G. lamblia</i> .....	59
FIGURA 5. Análisis electroforético de Ags solubles totales de <i>G. lamblia</i> .....	67
FIGURA 6. Análisis electroforético de antígenos solubles totales de <i>G. lamblia</i> obtenidos por diferentes métodos.....	68
FIGURA 7. Análisis electroforético de glucoproteínas en extractos solubles totales de <i>G. lamblia</i> : Tinción PAS.....	69
FIGURA 8. Detección de glucoproteínas en extractos solubles totales de trofozoitos de <i>G. lamblia</i> : Reactividad ante lectinas.....	70
FIGURA 9. Análisis electroforético de extractos subcelulares de <i>G. lamblia</i> .....	71
FIGURA 10. Análisis autorradiográfico de Ags de superficie de trofozoitos de <i>G. lamblia</i> .....	72
FIGURA 11. Análisis electroforético bidimensional de extractos solubles totales de <i>G. lamblia</i> .....	73
FIGURA 12. Análisis densitométrico de extractos solubles totales de trofozoitos de <i>G. lamblia</i> .....	78

FIGURA 13. Analisis densitométrico de extractos subcelulares de trofozoitos de <u>G. lamblia</u> .....	79
FIGURA 14. Analisis densitométrico de Ags de superficie de <u>G. lamblia</u> .....	80
FIGURA 15. Evaluación inmunoenzimática de la actividad antigénica de extractos solubles totales y subcelulares de trofozoitos de <u>G. lamblia</u> .....	81
FIGURA 16. Patrones de expulsión de quistes de <u>G. lamblia</u> en jerbos mongólicos (machos y hembras) infectados experimentalmente.....	85
FIGURA 17. Patrones de expulsión de quistes (por número y concentración) en heces de jerbos mongólicos infectados con trofozoitos de <u>G. lamblia</u> .....	86
FIGURA 18. Patrones individuales representativos de expulsión de quistes de <u>G. lamblia</u> por jerbos mongólicos infectados experimentalmente.....	87
FIGURA 19. Patrones de detección inmunoenzimática de Igs circulantes anti- <u>G. lamblia</u> en jerbos mongólicos infectados experimentalmente.....	92
FIGURA 20. Patrones de expulsión de quistes y de detección de Igs circulantes anti- <u>G. lamblia</u> en jerbos mongólicos infectados experimentalmente.....	93
FIGURA 21. Patrones individuales representativos de reconocimiento antigénico en jerbos mongólicos infectados con <u>G. lamblia</u> . Analisis por IET.....	94
FIGURA 22. Patrones individuales representativos de reconocimiento de Ags de superficie de <u>G. lamblia</u> por jerbos mongólicos infectados experimentalmente.....	95
FIGURA 23. Determinación inmunoenzimática de los niveles de Igs contra <u>G. lamblia</u> en sueros de pacientes con giardiasis.....	98
FIGURA 24. Patrones de reactividad de sueros de pacientes con giardiasis contra Ag soluble total de <u>G. lamblia</u> inmovilizado en NCP.....	99
FIGURA 25. Patrones de reactividad de sueros de pacientes con giardiasis en contra de Ags de superficie de <u>G. lamblia</u> marcados con <sup>125</sup> I.....	100

### ABREVIATURAS

Ag(s)	Antígeno(s)
BSA	Albumina sérica bovina
CIEF	Contraelectroforesis
Ci	Curie
c.b.p.	Cuanto baste para
c.p.m.	Cuentas por minuto
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidad óptica
EDTA	Etilendinitrilo-tetraacetato disódico
ELISA	Ensayo del inmunosorbente acoplado a enzima
FCA	Adyuvante completo de Freund
FIA	Adyuvante incompleto de Freund
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
°C	Grados Celsius
g	Gravedades
g.	Gramos
hrs.	Horas
HRP	Peroxidasa de rábano
ID	Inmunodifusión
i.e.	Esto es... (del latín id est)
IEE	Isoelectroenfoque
IET	Inmunolectrotransferencia
Ig(s)	Inmunoglobulina(s) [sin. anticuerpo]
Ig A,D,E,G ó M	Inmunoglobulina isotipo A,D,E,G ó M
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IPP	Inmunoprecipitación
Kd	Kilodaltones
µl.	Microlitros
µm.	Micras ó micrómetros
M	Molar (concentración)
mg.	Miligramos
min.	Minutos
mM	Milimolar

<b>Kr</b>	Movilidad relativa; masa relativa
<b>N</b>	Normal (concentracion)
<b>nm.</b>	Nanómetros
<b>NaDOC</b>	Desoxicolato de Sodio
<b>NCP</b>	Papel de nitrocelulosa
<b>NEM</b>	N-etil maleimida
<b>PBS</b>	Amortiguador de fosfatos-salina
<b>pg.</b>	Picogramas
<b>pH</b>	Potencial de Hidrogeno
<b>PI</b>	Punto isoelectrico
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenil-metil sulfonilo
<b>P-1</b>	Cepa Portland-1
<b>P/P, P/V, V/V</b>	Peso a peso, peso a volumen, volumen a volumen
<b>Rf</b>	Migración relativa
<b>R.F.M.</b>	Revoluciones por minuto
<b>SDBS-PAGE</b>	Electroforesis en geles de Poliacrilamida en presencia de Dodecil Sulfato de Sodio
<b>seg.</b>	Segundos
<b>SSSA</b>	Solucion saturada de sulfato de Amonio
<b>SSF</b>	Solucion salina fisiológica
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TAMED</b>	N,N,N',N'-tetrametilendiamina
<b>Tm</b>	Temperatura promedio del experimento.
<b>TY1-S-33</b>	Medio con tripticasa (T), extracto de levadura (Y), Hierro (I) y suero (S).

## I. INTRODUCCION

La relación hospedero-parasito ha constituido una de las interacciones más relevantes del hombre con su medio ambiente. Desde el punto de vista de la salud a nivel humano y veterinario, los parásitos representan un reto constante debido a la multiplicidad de compartimientos que pueden ocupar dentro del hospedero y asimismo por los procesos de adaptación tan sorprendentes que pueden desarrollar.

Dentro de los parásitos se incluyen algunos protozoarios, que son organismos eucarióticos unicelulares y son considerados como el grupo más primitivo dentro del reino animal. A partir de su descubrimiento por Leeuwenhoek, se estima actualmente que existen unas 45,000 especies de protozoarios, de las cuales aproximadamente 10,000 son parásitos en invertebrados y vertebrados (Cox, 1981). De esta forma, los parásitos constituyen un grupo importante y su influencia se refleja en varios ámbitos, abarcando el económico.

Los protozoarios parásitos intestinales representan en nuestro país un problema difícil de controlar, dado el riesgo del establecimiento de áreas endémicas. Esto se debe principalmente a la falta de educación higiénica y a las condiciones socioeconómicas precarias de una gran parte de la población mexicana (Tay y cols., 1978). Por tratarse de un fenómeno estrechamente vinculado a los factores anteriores, la giardiasis constituye ahora un problema bajo estudio en nuestro medio.

## IA. Giardia lamblia: ASPECTOS GENERALES

Se atribuye a Anton van Leeuwenhoek en 1681 la primera descripción de trofozoítos de Giardia como "animalículos" móviles en su propio material diarreico (Dobell, 1920). Diferentes giardias de humanos y otros animales fueron descritas posteriormente por varios autores. Kofoid y Christiansen (1915) proponen el nombre de Giardia lamblia para la especie parásita en humanos en honor de los Doctores S. Giard y W. Lambl (1859), siendo este último quien dio la primera descripción detallada del protozoario. El desarrollo de estudios más profundos del organismo, así como de la enfermedad que ocasiona ha sido posible a partir del establecimiento de cultivos axénicos para trofozoítos de G. lamblia por Meyer (1976).

La ubicación taxonómica más reciente del género Giardia la ha dado la Sociedad de Protozoólogos (Cox, 1981). Los protozoarios son considerados un subreino dentro del reino animal; el phylum 1 Sarcomastigophora comprende los organismos cuya locomoción es efectuada por flagelos, pseudópodos o ambos. En el subphylum 1 Mastigophora se agrupan los protozoarios flagelados, donde la clase 2 Zoomastigophora (cloroplastos ausentes) abarca el orden Diplomonadida. Los organismos de este orden poseen dos núcleos y organelos duplicados (simetría bilateral) y en él se ha clasificado el género Giardia.

Filice (1952) hace la clasificación del género en base a criterios morfológicos del trofozoito y lo separa en 3 grupos: G. agilis que se aloja en anfibios y posee forma alargada (20-30  $\mu\text{m}$ . x 4-5  $\mu\text{m}$ .) y dos estructuras denominadas cuerpos medianos que

semejan gotas de agua. *G. muris* es la especie que ocurre en murinos y aves pequeñas teniendo morfología redondeada (9-12  $\mu\text{m}$ . x 5-7  $\mu\text{m}$ .) con dos cuerpos medianos ovales. El tercer grupo lo conforma *G. duodenalis* que se presenta en humanos, animales domésticos y una variedad de mamíferos. Tiene morfología piriforme ventralmente aplanada y un cuerpo mediano en forma de cabeza de martillo. Esta última especie es conocida como *G. intestinalis* en Europa occidental, *G. lamblia* en América y como *Lamblia intestinalis* en la URSS y Europa Oriental.

*Giardia lamblia*, nombre que se utiliza en este trabajo para designar la especie que causa infección en humanos, es un protozooario parásito que coloniza el intestino delgado de los hospederos susceptibles y ocasiona en ellos la infección denominada giardiásis.

El parásito se presenta en dos formas: el trofozoito (Figura 1-A) que es la entidad patógena que mide 10-12  $\mu\text{m}$ . de largo x 5-7  $\mu\text{m}$ . de ancho x 1-2  $\mu\text{m}$ . de grosor. La entidad infecciosa es el quiste (Figura 1-B) que mide 8-12  $\mu\text{m}$ . de largo x 7-10  $\mu\text{m}$ . de ancho x 0.3-0.5  $\mu\text{m}$ . de grosor y forma elíptica.

El ciclo de vida de *G. lamblia* es de tipo directo con migración simple y se esquematiza en la Figura 1-C. El hábitat usual del trofozoito es el borde microvellosa epitelial del intestino delgado (duodeno y yeyuno) donde se halla adherido mediante su disco adherente ventral género-específico. Aquí lleva al cabo su reproducción por fisión binaria longitudinal que incrementa la concentración de trofozoitos y algunos de ellos son

liberados en las heces. Hacia la parte distal del intestino delgado estos se redondean y forman una pared quística, siendo eliminados los quistes resultantes en las excretas. Los quistes eliminados maduran en horas y permanecen viables varios días, hasta que un nuevo hospedero adquiere la infección ingiriéndolos en agua o alimentos contaminados. Bajo las condiciones ácidas del estómago emerge un trofozoito tetranucleado de la pared quística que rápidamente completa el ciclo de división, obteniéndose así 2 trofozoitos binucleados en cada desenquistamiento. El término "organismo reservorio" (Brown, 1975) se aplica a animales e individuos que aseguran la continuidad de la parasitosis primaria y actúan como fuentes adicionales en la infección humana.

#### IB. GIARDIA Y GIARDIASIS

El fenómeno de adhesión de trofozoitos de G. lamblia a células epiteliales es un evento clave para la colonización y proliferación de este parásito en el compartimiento intestinal del hospedero, y por consiguiente lo es para el establecimiento de la infección. Giardia posee un disco adherente especializado y se ha sugerido que tanto esta estructura como fuerzas hidrodinámicas inespecíficas, factores mecánicos mediados por proteínas contractiles y aún participación de biomoléculas tipo lectinas (antígenos?) pueden mediar la interacción del parásito con el epitelio intestinal del hospedero (Farthing, 1985; Feely et al., 1982; Farthing et al., 1986). De cualquier forma existe relación estrecha entre este evento y el desarrollo de la patología de la enfermedad, ya que

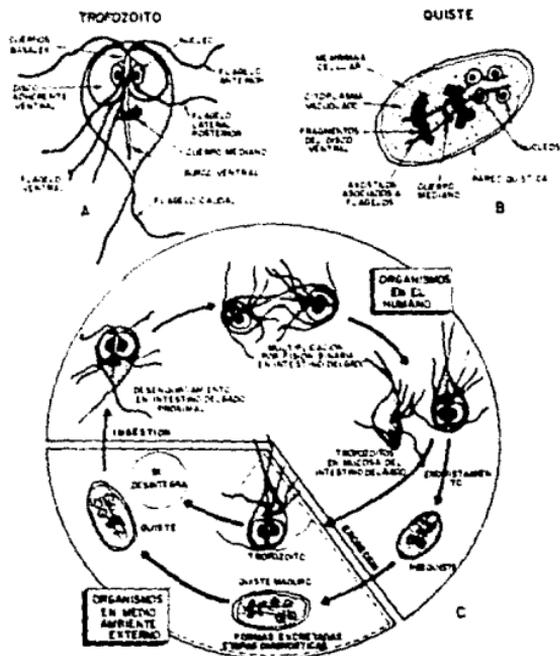


FIGURA 1. Aspectos morfológicos de *G. lamblia* (A y B) y su ciclo de vida en humanos (C). Reproducido de E.A. Meyer: Microorganisms and human disease, N.Y., Appleton-Century-Crofts, 1974.

hasta ahora no se ha demostrado concluyentemente la existencia de alguna enterotoxina secretada por G. lamblia. Asimismo, la capacidad invasiva del trofozoito al tejido epitelial es actualmente un aspecto controversial (Brandborg y cols., 1967; Chavez y cols., 1986).

Estudios en giardiasis murina y humana han revelado que la adhesión del trofozoito a la célula blanco (que produce una "huella" del disco adherente en la última) ocasiona un daño variable y transiente al borde microvellosos del epitelio intestinal que consta de acortamiento, engrosamiento y distorsión de las microvellosidades (Hoskins, 1967). Estas anormalidades estructurales ocasionan que el área de absorción duodenal de nutrientes se encuentre reducida, y contribuyen al cuadro de malabsorción asociado a giardiasis sintomática en mayor medida que la simple interferencia física del organismo adosado a la superficie del enterocito. La alteración en los niveles de algunos mediadores digestivos tales como las enzimas (disacaridasas, secretina, pancreozimina) las cuales tienen dependencia y actividad en la motilidad e integridad intestinal durante la infección por Giardia, así como la aparición de respuestas inflamatorias a nivel local (Hoskins, 1967), promueven probablemente la manifestación de síntomas y signos tan variados como la enteritis, diarrea alternada a constipación, dolor abdominal, hipoclorhidria, esteatorrea, náusea y otros detectados notablemente en giardiasis clínica.

La giardiasis no es considerada mortal por si sola. No obstante, el espectro clínico de la enfermedad varía desde un

estado de expulsión asintomática de quistes (Rendtorff, 1954) hasta un cuadro de diarrea severa con malabsorción (Wolfe, 1978). La presentación sintomática es autolimitante y se resuelve espontáneamente (inmunidad protectora?). La etapa aguda se caracteriza por síntomas que incluyen náusea, anorexia, hiperperistaltismo intestinal superior, malestar con fiebre moderada y escalofrío. También se pueden presentar diarrea explosiva asociada a flatulencia, malestar epigástrico tipo ulceroso, pérdida de peso y talla baja con posible esteatorrea y frecuente intolerancia a la lactosa. La etapa subaguda y crónica implica típicamente episodios diarreicos recurrentes breves con flatulencia y distensión abdominal. La presentación asintomática involucra un portador aparentemente sano que excreta quistes detectados en heces; pero con absorción intestinal subclínica deficiente (Coello-Ramírez, 1981).

Dos aspectos destacan en este momento: 1) el carácter autolimitante de la enfermedad sintomática, cuyos mecanismos no se han dilucidado y 2) la existencia de individuos asintomáticos, muy probablemente el núcleo más abundante de la población afectada, que constituyen una fuente importante de transmisión de G. lamblia en áreas endémicas.

Solamente en los últimos años se ha reconocido la importancia médica de la giardiasis y de G. lamblia como patógeno, a la vez que los datos epidemiológicos nacionales lo han identificado entre los agentes de parasitosis intestinal más frecuentes (IMSS, 1990). La enfermedad es de distribución cosmopolita y existen reportes

numerosos sobre su incidencia. En países desarrollados como Estados Unidos de Norteamérica y Gran Bretaña se estimaron tasas del 24% de población portadora con cerca de 4,000 casos anuales clínicamente diagnosticados (CDC, 1979; Knight, 1980). En Europa la morbilidad va de baja a moderadamente alta (WHO, 1986).

Para países en vías de desarrollo las tasas de incidencia oscilan entre un 8 y un 25% como ocurre en regiones de Latinoamérica (Figueroa *et al.*, 1981), Africa (Hason, 1987) y Asia (Hossain, 1983). En México se estima que afecta al 20% de la población pediátrica y en zonas como Xochimilco, Cd. Nezahualcóyotl y Cuautitlan se han detectado tasas de prevalencia de 66, 21 y 63.3% respectivamente (Tay *et al.*, 1978; Coello-Ramirez, 1981; Dueñas-Lopez, 1984). En el Instituto Mexicano del Seguro Social hay mensualmente entre 2,000-5,000 casos de giardiasis (1990).

La infección por *G. lamblia* tiene como características en humanos que es de duración corta (3 meses como máximo), aunque en pacientes crónicos puede durar años. Su transmisión es por portadores humanos o animales y por agua y alimentos contaminados, abatiéndose la tasa de infección conforme la edad avanza (afecta mayormente a niños en edad preescolar y escolar). La dosis infectiva es de 25-100 quistes, con periodo de prepatencia de 6 a 15 días y periodo de incubación de 7 a 21 días (Rendtorff, 1954).

El diagnóstico de la enfermedad se basa rutinariamente en exámenes coproparasitológicos para hallar quistes o trofozoitos en heces diarreicas o quistes en heces formadas mediante técnicas de microscopía directa o flotación en ZnSO<sub>4</sub> (Técnica de Faust). Para

el diagnostico se requieren 3 resultados positivos consecutivos y personal adiestrado que rindan datos confiables (Wolfe, 1978). Sin embargo, se pueden tener fallas en un 30 a 50% de casos sintomaticos (Kamath y Murugasu, 1974) y existe entonces una serie de procedimientos alternativos o complementarios [examen de liquido intestinal o Enterotest, biopsia intestinal y radiologia gastrointestinal (revisados por Wolfe, 1984)]. Ademas, se pueden presentar sintomas sin expulsion del parasito durante buen tiempo, o bien que se expulse en forma intermitente (Rendtorff, 1954).

A partir de la decada anterior se han iniciado estudios empleando pruebas como el ensayo del inmunosorbente acoplado a enzima [ELISA] (Smith y cols., 1981) e inmunofluorescencia indirecta [IFI] (Visvesvara y cols., 1980) con muestras sericas y la contraimmunoelectroforesis [CIEF] (Craft y Nelson, 1982) en muestras fecales para la búsqueda de inmunoglobulinas (Igs) circulantes o antigenos (Ags) del parasito expulsados por pacientes con giardiasis. Por ahora no se tiene un ensayo inmunológico rutinario en el diagnostico complementario, aunque tal alternativa debiera convertirse en una herramienta eficaz y adecuada para detectar especificamente al parasito en sus diferentes manifestaciones y asi se facilite obtener datos relevantes desde un punto de vista epidemiologico.

Varios agentes quimioterápicos se han aplicado en el tratamiento de la infección por G. lamblia [revisado por Wolfe, 1984]. La Quinacrina (Atabrine, no disponible comercialmente en Mexico) se considera el farmaco de eleccion en dosis de 40 a 100

mg. 3 veces al día durante 7 días y tiene eficiencia en un 90-95% de casos. Asimismo se prescribe el Metronidazol (Flagyl) en dosis de 100 a 250 mg. al día durante 7 días y se han reportado tasas de cura de 85-90%. Otra droga utilizada es la Furazolidona (Giardil, Furoxona) en dosis de 100 mg. al día durante 7 días, con la cual se han obtenido resultados exitosos en un 77-93% de casos bajo estudio. La Paromomicina (Humatin) [dosis: 1 g. al día durante 5 días, eficiencia: 55-73%], el Tinidazol (Fasigyn) [dosis única de 2 g. con eficiencia de un 93%] y el Ornidazol (Tiberol) [dosis única de 50 mg./kg. con eficiencia de 100%] son quimioterápicos alternativos para la giardiasis, aunque se requieren estudios de campo más extensos respecto a ellos.

#### IC. ASPECTOS INMUNOLOGICOS DE LA GIARDIASIS

La interacción de Giardia con su hospedero involucra una serie compleja de eventos, dentro de los cuales debe citarse el papel del sistema inmune. Diferentes evidencias clínicas y en giardiasis experimental sugieren el desarrollo de inmunidad contra el parásito: 1) la naturaleza autolimitante de la infección (Rendtorff, 1954; Roberts-Thomson *et al.*, 1976a), 2) la exposición previa al parásito incrementa la resistencia a la reinfección (Moore y cols., 1969; Roberts-Thomson y cols., 1976b), 3) la alta prevalencia de la enfermedad en pacientes hipogamaglobulinémicos y en homosexuales (Hughes *et al.*, 1971; Meyers *et al.*, 1977), 4) la presencia de Igs específicas isotipo IgG circulante e IgA intestinal en pacientes afectados (Smith y cols., 1980; Visvesvara

y cols., 1980) y ratones (Anders y cols., 1982) respectivamente, y 5) la alta prevalencia de giardiasis crónica en ratones preñados, atímicos o tratados con corticosteroides (Roberts-Thomson y Mitchell, 1978; Duncombe et al., 1980). De esta forma se implican mecanismos humorales y aquellos mediados por células en dicha interacción, aunque la aparición de respuestas protectoras así como de posibles respuestas inmunopatológicas (Stevens, 1982) no se han aclarado totalmente hasta ahora.

Estudios in vivo e in vitro en G. muris sugieren que la inmunidad humoral a nivel intestinal juega un papel en la resolución de la infección y que en ratones inmunocompetentes (cepa BALB/c) está mediada básicamente por IgG e IgA sin que se conozca su función exacta (Heyworth, 1986; Kaplan y cols., 1985). Posiblemente tal proceso es inducido por Ags timo-dependientes del parásito, ya que se ha observado in vivo que ratones atímicos o desnudos llegan a desarrollar crónicamente la infección (Roberts-Thomson y Mitchell, 1978; Underdown y cols., 1981; Erlich y cols., 1983). No obstante, pueden coexistir mecanismos timo-independientes en la protección a la enfermedad al considerar que ratones hembra transfieren inmunidad pasiva a sus crías con IgA Giardia-específica en leche materna (Stevens, 1978). La inmunidad celular parece participar en los mecanismos de eliminación del parásito a nivel intraepitelial y en funciones tanto de cooperación como de citotoxicidad. En experimentos in vivo e in vitro se ha visto que durante la infección se presenta una mejor reactividad inflamatoria, así como capacidad fagocítica y quimiotáctica

incrementadas de Macrófagos y Neutrófilos en ratones inmunocompetentes (Kaplan *et al.*, 1985; Belosevic *et al.*, 1986). En estos animales se presentó un aumento de Leucocitos y una relación de Linfocitos T cooperadores/supresores de >5/1 asociados a niveles mayores de Linfocitos B productores de IgM e IgA en las placas de Peyer (Carlson *et al.*, 1986a; Carlson *et al.*, 1986b). La presencia de Linfocitos T intraluminales no parece ser un factor determinante en la eliminación del parásito (Heyworth *et al.*, 1985).

Las observaciones epidemiológicas, clínicas y experimentales para respuesta inmune en giardiasis humana se han llevado al cabo mediante ensayos *in vitro* principalmente y su posible integración se esquematiza en la Figura 2. Aparentemente las Igs circulantes detectadas (isotipo IgG) no son por sí solas protectoras, ya que se han determinado títulos altos aun en infecciones recurrentes (Smith y cols., 1981; Visvesvara y cols., 1980). Los niveles de IgM, IgA e IgG séricas no se han observado consistentemente alterados en los pacientes (Jones y Brown, 1974; Einnenan y Kaplan, 1972), aunque estudios recientes con voluntarios sugieren que sí aparecen respuestas de IgG e IgM específicas en suero (Nash *et al.*, 1987). Los niveles de IgD sérica parecen encontrarse bajos durante la infección (Jokipii y Jokipii, 1982). Otros estudios denotan el efecto letal del suero humano normal y de infección sobre trofozoitos de *G. lamblia*, y muestran que la lisis del organismo está mediada por una variante de la vía clásica del Complemento que requiere la presencia de C1 y Factor B, no de C4 y C2 y se acompaña de C5 a C8 sin C9, involucrando a la vez IgM como anticuerpo

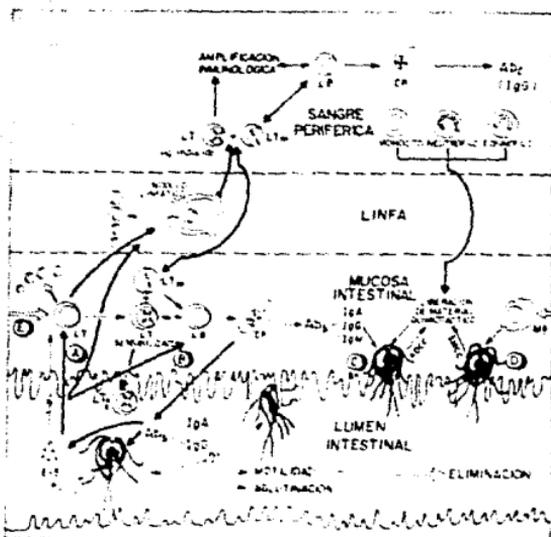


FIGURA 2. Integración de los mecanismos posibles que participan en la respuesta inmune humana hacia *G. lamblia* considerando las observaciones clínicas, experimentales y epidemiológicas. Los productos de excreción-secreción del parásito (E-S) pueden inducir la aparición de anticuerpos o Igs circulantes ( $Ab_c$ ) y secretorios ( $Ab_s$ ) con participación de células T (LT) [A] o por vía timo-independiente al través de interacción directa con células B (LB) [B]. La inmunidad celular contra el trofozoito inicialmente invasor debe estar limitada al compartimiento intraepitelial del intestino del hospedero. Esto se ha observado en los fenómenos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) que es mediada principalmente por Granulocitos [C] y en la citotoxicidad espontánea mediada por células (SMCC) la cual es realizada básicamente por Macrófagos [M $\phi$ ] [D]. la interacción Macrófago-Linfocito [E] puede ser asimismo un evento clave en la activación de la inmunidad humoral al protozoo parásito. CP=Celula plasmática, LT=Linfocito T intraluminal, LT<sub>m</sub>=Linfocito T de memoria.

activador (Deguchi et al., 1987). En reportes recientes se ha discutido la importancia del sistema inmunosecretor en los mecanismos probables de eliminación y protección del hospedero a la infección con el parásito. La asociación de giardiasis con bajos niveles de IgA secretoria intestinal podría ser un factor que predispone a la cronicidad de la infección (Zinneman y Kaplan, 1972) y por otra parte los títulos incrementados de IgA secretoria específica en leche de mujeres infectadas respecto al observado en mujeres no afectadas se correlaciona de manera significativa a un grado mayor de protección en los productos de las madres con infección previa (Nayak y cols., 1987). A nivel de lámina propia intestinal se detectan inicialmente células secretoras de IgM y posteriormente las que secretan IgG e IgA (Thompson y cols., 1977).

Se ha visto que diversas poblaciones celulares tienen actividad efectora in vitro contra G. lamblia. El material solubilizado de trofozoitos o bien productos excretorios-secretorios tienen efecto quimiotáctico y de reclutamiento sobre Monocitos humanos, los cuales después fagocitan el protozoario (Smith et al., 1983a). El fenómeno de citotoxicidad espontánea mediada por células (SMCC) se atribuye a la población Monocito-Macrófago y es no específica (Smith y cols., 1982a; debatido por Aggarwal y Nash, 1986). También la fagocitosis por Macrófagos de conejos inmunizados es más intensa en presencia de suero inmune que opsoniza el trofozoito (Radulescu y Meyer, 1981) y dichos fagocitos responden con mayor avidez y a periodos más tempranos en estados de reinfección (Kanwar y cols., 1987). Los eventos de citotoxicidad

celular dependiente de anticuerpo (ADCC) parece estar mediado por IgG y Granulocitos del tipo Neutrofilos Polimorfonucleares así como Eosinófilos en menor grado (Smith y cols., 1983b) y Macrófagos (Kanwar y cols., 1987). El papel del Linfocito T no se ha aclarado aquí; no obstante se han determinado respuestas proliferativas en Giardiasis crónica (Smith y cols., 1982b) además de la presencia de células T intraluminales en el intestino de pacientes sintomáticos (Ferguson, 1977). En este contexto, la inmunidad celular debe ser un factor importante para limitar y controlar la infección por G. lamblia a nivel intraepitelial en la primo-infección y la reinfección en humanos. Sin embargo su papel a nivel del lumen intestinal y en fenómenos de protección no se conoce aún.

#### ID. ANTECEDENTES

La inmunología como disciplina ha hecho valiosas aportaciones en el terreno del estudio y control de numerosas parasitosis en humanos y otros animales. Sus alcances se han aplicado en aspectos como diagnóstico, tratamiento, profilaxis y epidemiología de enfermedades infecciosas como lo es la giardiasis. Para alcanzar tales objetivos, una aproximación importante consiste en determinar la "antigenicidad" o capacidad de G. lamblia de despertar una respuesta inmune. De este modo se han realizado una serie de pruebas inmunológicas que han podido detectar Igs circulantes o Ags fecales en casos de infección natural e inmunización experimental con el protozooario. Entre las pruebas utilizadas se encuentra el ensayo de inmunodifusión (ID) donde Vinayak y cols. (1978) han

reportado la aparición de 1-2 líneas de precipitina en sueros de pacientes con Giardiasis utilizando material de quistes sonicados como Ag. Visvesvara y Healy (1980) obtuvieron de 7-8 líneas de precipitina con suero hiperinmune de conejo al emplear material de giardias sonicadas aisladas ya sea de humano, gato o cobayo. Otro ensayo es la CIEF con la que Craft y Nelson (1982) observaron reacción de precipitinas en muestras de heces en 65 de 66 pacientes infectados al usar suero inmune de conejo para detectar Ag fecal. El ensayo de inmunoadsorbencia en el que se emplea un sistema enzimático (ELISA) ha sido utilizado extensivamente a partir de los estudios realizados por Smith y cols. (1981). En ellos los autores demostraron que si se emplean trofozoitos completos como Ag se pueden obtener altos porcentajes de títulos positivos en pacientes sintomáticos, así como indicar la presencia de Igs contra el parásito que persisten desde 4 semanas hasta 15 meses después de seguir la terapia curativa. La técnica de IFI también ha mostrado gran utilidad de acuerdo con los datos de Visvesvara y cols. (1980), quienes observaron alta reproducibilidad y especificidad en ensayos de fijación de Ig fluorescente a prequistes o trofozoitos fijados con formol como fuente de Ags.

Otro enfoque de estudio es la identificación de componentes antigénicos de G. lamblia involucrados en la relación hospedero-parásito, así como sus características abarcando localización y función posibles. Se sabe que la membrana celular del trofozoito juega un papel inmunológicamente relevante en virtud de que es la primera estructura del parásito que interacciona directamente con

el hospedero. Diferentes investigaciones se han dirigido a identificar las biomoléculas capaces de activar una respuesta inmune en un estado de infección. Con tal propósito, la composición antigénica de G. lamblia ha sido estudiada por varios autores y los resultados son parcialmente semejantes. Moore y cols. (1982) empleando electroforesis en geles planos de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de Sodio (SDS-PAGE) y extractos por sonicación de trofozoitos, detectaron al menos 20 bandas de proteína teñidas con azul de Coomassie con peso molecular entre 14 y 125 kilodaltones (Kd), aunque el fraccionamiento con cromatografía líquida de alta presión (HPLC) reveló una fracción con peso aproximado de 200 Kd. Smith y cols. (1982c) compararon 4 cepas de G. lamblia de diferentes procedencias geográficas (PO de Portland, WB de Afganistán, RS de Ecuador y LT de Puerto Rico) y encontraron patrones de movilidad electroforética semejantes en aquellas, con 26 bandas de peso molecular entre 10 y 140 Kd y otras de mayor peso molecular débilmente teñidas. La cepa PO careció de un grupo de proteínas anódicas y otra neutra presentes en las cepas restantes examinadas mediante inmunoelectroforesis cruzada. Del mismo modo Wenman y cols. (1986) analizaron electroforéticamente el perfil proteínico de aislados de rata de campo, castores, perro, carnero y humano determinando similitud entre ellos, con presencia de proteínas heterogéneas de peso molecular de 20 a 25 Kd. Asimismo se hallaron conservadas las proteínas de 62, 52, 38 y 31 Kd.

El radiomarcaje de trofozoitos ha sido una estrategia empleada a fin de distinguir los componentes del protozoario localizados en

la membrana celular. Nash y cols. (1983) estudiaron los componentes de membrana y los posibles productos de excreción-secreción (E-S) accesibles al marcaje con  $^{125}\text{I}$  en las cepas Portland-1 (P-1) y WB. En estos ensayos se observó la presencia de un material polidisperso de peso molecular entre 94 y 220 Kd en ambas cepas además de otros componentes, entre ellos uno de 15 a 21 Kd. El material E-S consistió principalmente del material polidisperso mencionado, aparentemente proteolípido y antigénicamente diferente en P-1 y WB. Nash y Keister (1985) reportaron posteriormente diferencias entre los patrones electroforéticos y las reactividades a sueros homólogos y heterólogos de los productos E-S de 19 aislados de Giardia obtenidos de humanos y mamíferos pequeños. Existió una correlación entre los aislados en base a los patrones de SDS-PAGE y la reactividad del material E-S; pero sólo hubo correlación parcial al considerar los patrones de restricción de DNA determinados previamente. Por otra parte Einfeld y Stibbs (1984) caracterizaron los Ags superficiales de trofozoitos de G. lamblia en 4 cepas (P-1, WB, RS y LT) por medio de técnicas de inmunoelectrotransferencia (IET), inmunoelectroforesis cruzada e inmunoprecipitación (IPP) adicionales a radioiodinación. En este análisis se determinó la presencia de un Ag mayoritario de 82 Kd expuesto en la membrana plasmática del parásito e inmunodominante en la reacción con sueros hiperinmunes y monoespecíficos de conejo para todas las cepas utilizadas. Se observó que este Ag es hidrofóbico, termosensible y sensible parcialmente a pronasa o a peryodato, y que probablemente esta proteína es uno de los

principales marcadores inmunológicos en G. lamblia.

Un aspecto relevante en el estudio de la interacción de G. lamblia con su hospedero es el establecimiento de un modelo experimental que permita obtener datos que se puedan aplicar al fenómeno de infección en el hospedero humano.

Los estudios sobre infección experimental con G. muris han sido numerosos y han empleado una variedad de cepas murinas. A pesar de que se puede inducir la infección en estos animales, los resultados que se han obtenido son considerablemente variables en los periodos de patencia o de eliminación espontánea del organismo (Meyer *et al.*, 1984). Roberts-Thomson *et al.* (1976a) observaron que la infección por G. muris en ratones albinos suizos produjo un patron con picos de expulsión de quistes entre los días 5 y 14 tras la inoculación intraesofagica de quistes obtenidos de un hamster dorado. La infección se resuelve entre los días 21 y 28 post-inoculación en la mayoría de los animales, con pérdida de peso significativa en los mismos. A pesar de ello, los estudios en modelos murinos no se pueden extrapolar con profundidad hacia la giardiasis humana, ya que G. muris no es capaz de infectar a este último (Meyer *et al.*, 1984).

Muchos investigadores han llevado al cabo estudios con el fin de establecer un modelo animal para G. lamblia que pueda presentar características registradas en la infección humana. En primer lugar Sengal y cols. (1976) lograron establecer un estado de infección con quistes de G. lamblia en ratas recién destetadas, aunque sus resultados mostraron una tasa de infección baja en los animales.

Después Vinayak y cols. (1979) establecieron exitosamente la infección por G. lamblia en ratones suizos recién destetados con 150,000 quistes como dosis mínima, observándose un período prepatente de 3-5 días así como un patrón de eliminación de quistes continuo con pico de expulsión hacia el día 11 post-inoculación, y hacia el día 23 la infección fue resuelta. Hewlett y cols. (1982) lograron infectar perros mongrel y detectaron expulsión de quistes en 3 de 8 animales inoculados con quistes de pacientes y en 2 de 3 perros inoculados con trofozoitos de cultivos axénicos. El período de prepatencia y de expulsión de quistes fue similar al observado en humanos, aunque los perros no manifestaron clínicamente la enfermedad. En el reporte de Craft (1982) se infectaron experimentalmente ratas SPF (libres de patógenos específicos) empleando quistes de pacientes sintomáticos y se revisó el curso de la infección mediante biopsia intestinal, CIEF y examen microscópico de heces. Se determinó un período de prepatencia de 2 a 4 días con picos de infección entre los días 7 y 20 y el parásito se eliminó en un lapso de 28 a 42 días.

En otros estudios con trofozoitos de G. lamblia adaptados a cultivo axénico (cepa Rabbit 1/Portland) se ha observado que éstos pueden establecer la infección cuando se inoculan por vía intraduodenal en conejos (Schleinitz y cols., 1983). En este caso el período de prepatencia osciló entre 3 y 11 días; pero no se reportan datos sobre resolución de la infección ni de la presencia de lesiones a nivel intestinal. Por otro lado, en giardiasis natural e inducida con inoculación oral de quistes en gatos se ha

observado un periodo prepatente de 9 días. Algunos de estos animales desarrollaron signos clínicos característicos y eliminaron el protozooario en alrededor de 50 días. Los quistes aislados de heces de gatos infectados fueron capaces de infectar jerbos, no así ratones C57BL/6J (Kirkpatrick y Farrell, 1984).

En los últimos años se han utilizado jerbos mongólicos (Meriones unguiculatus) como posible modelo animal de infección por G. lamblia a partir de los experimentos de Belosevic y cols. (1983). Estos autores reportaron una alta susceptibilidad de los jerbos a la infección con quistes de pacientes o trofozoitos cultivados axénicamente (cepa P-1) e inoculados por vía intraduodenal u oral. Los animales desafiados presentaron un patrón de expulsión de quistes intermitente hasta alrededor de 39 días post-inoculación, con picos de concentración de trofozoitos en intestino hacia el día 15 y un promedio de 880 quistes en heces cada 2 horas por cada jerbo. Los roedores infectados resistieron un segundo desafío hasta 8 meses después del inicial. Estudios adicionales han presentado evidencia en relación a que los quistes de Giardia aislados de castores y ratones producen en los jerbos un patrón de infección diferente al inducido por quistes aislados de humanos, así como la presencia de resistencia completa de las especies a los aislados homólogos y resistencia sólo parcial ante los aislados heterólogos (Faubert et al., 1983).

Hasta ahora, la información sobre la obtención y caracterización más completas de fuentes antigénicas de G. lamblia, así como su relación a la respuesta inmune en un hospedero

experimental susceptible a nivel de reconocimiento antigénico es virtualmente fragmentaria y no ha seguido un curso del todo sistemático. Con base en estos antecedentes, en este trabajo se propuso analizar el espectro antigénico de 2 cepas de G. lamblia y emplear las mismas en el establecimiento y evaluación inmunológica del modelo experimental para giardiasis propuesto por Belosevic y cols. (1983) con la finalidad de cotejar estas observaciones con aquellas que se pueden obtener en pacientes de giardiasis clínica. Esta aproximación podrá rendir resultados aplicables en futuros estudios longitudinales de la enfermedad y en aquellos relacionados a los mecanismos involucrados en la interacción Giardia-hospedero.

## II. OBJETIVOS

Con el fin de aportar datos de interés al entendimiento de la giardiasis, se plantearon los siguientes objetivos:

### GENERALES

1) Identificar y caracterizar los componentes antigénicos solubles totales, subcelulares y de membrana celular de trofozoitos del protozoario parásito Giardia lamblia (cepas Portland-1 [P-1] y WB).

2) Establecer y evaluar inmunológicamente el estado de infección experimental por G. lamblia en jerbos mongólicos (Meriones unguiculatus) como modelo animal de giardiasis.

3) Comparar los resultados obtenidos en el modelo experimental con aquellos que se pueden observar en giardiasis clínica, empleando ensayos inmunodiagnósticos semejantes.

### PARTICULARES

a) Determinar la complejidad antigénica que se obtiene a partir de trofozoitos de G. lamblia al evaluar diferentes condiciones de extracción de proteínas celulares.

b) Caracterizar de manera física y parcialmente bioquímica los componentes solubles totales, subcelulares y accesibles al radiomarcaje de superficie del parásito, por medio de técnicas electroforéticas y densitométricas.

c) Implementar un protocolo de infección experimental con trofozoitos de G. lamblia en jerbos mongolicos, para analizar con técnicas coproparasitoscópicas el establecimiento y curso de la infección en el modelo animal.

d) Valorar longitudinalmente en forma temporal la respuesta inmune humoral de Igs circulantes inducida en los animales experimentales, e identificar los Ags del parásito que son reconocidos por Igs presentes en los sueros durante la infección.

e) Aplicar los ensayos serologicos establecidos para determinar características importantes de la respuesta inmune humoral en un estudio transversal de giardiasis clinica.

f) Comparar los resultados de caracterización antigénica y de evaluación inmunologica, tanto en el modelo animal como en el estudio clinico transversal, para las 2 cepas del parásito utilizadas (P-1 y WB).

### III. MATERIAL Y METODOS

1. **Parásitos.** Trofozoitos de Giardia lamblia de la cepa Portland-1 (P-1) proporcionados por el Dr. E. Weinbach y de la cepa WB obtenidos del Dr. T. Nash, ambos del National Institutes of Health en Bethesda, Md. (E.U.A.) fueron empleados en el presente trabajo. La cepa P-1 (American Type Culture Collection # 30888) fue aislada originalmente de una paciente sintomática de 16 años de edad en Portland, Oregon (Meyer, 1976), mientras que la cepa WB (ATCC # 30957) fue aislada de un individuo de 27 años de edad con giardiasis crónica durante 3 años, la cual adquirió en Afganistán (Smith y cols., 1982b).

2. **Animales.** Jerbos mongólicos (Meriones unguiculatus, sin.: gerbils, jerbos, ratas canguro, ratas australianas) fueron sometidos al protocolo de infección experimental descrito posteriormente (apartado 9). Se emplearon animales singénicos, tanto hembras como machos de 6 a 10 semanas de edad que fueron proporcionados por el bioterio del Instituto de Investigaciones Biológicas de Occidente en Guadalajara, Jal. En el bioterio del Instituto de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) se albergó a los jerbos individualmente en cajas de plástico autoclaveable, con aserrín esterilizado a 120°C durante 20 minutos en autoclave y se les proporcionó alimento comercial para roedores (nutricubos Purina<sup>®</sup>) previamente sometido a calor seco a 150°C durante 30 min. y agua

acidificada (pH 2.5) suplementada con vitaminas. Asimismo, los jerbos recibieron tratamiento antiparasitario a base de dos preparados comerciales (Lopitolito<sup>®</sup>, fórmula: 4-isotiocianato-4'-nitrodifeniléter [nitroscanate] micronizado 100 mg. por tableta, Ciba-Geigy; y Mebeciclor<sup>®</sup>, fórmula: mebendazol 60 mg., niclosamida 200 mg. y tinidazol 300 mg. por comprimido, Laboratorios Columbia, S.A. El régimen fue de 1 comprimido de cada fármaco en cada botella con 500 ml. de agua de bebida durante los 3 primeros días en 2 semanas consecutivas), todo esto anterior a la infección con G. lamblia. La ausencia de éste y de otros parásitos intestinales se verificó por exámenes coproparasitoscópicos empleando la técnica de flotación en sulfato de Zinc [Faust y cols. (1939)].

Conejos de la raza Nueva Zelanda (4 meses de edad), albergados en condiciones semejantes a los roedores, fueron empleados en protocolos de inmunización con trofozoitos completos de G. lamblia y con Igs de jerbos en la preparación de un conjugado para ensayos serológicos (apartado 10.A).

3. **Sueros humanos.** Las muestras séricas analizadas fueron obtenidas de 41 pacientes de giardiasis clínica tanto sintomática (28 casos) como asintomática (13 casos), determinado esto último por la detección de quistes de G. lamblia en 2 o 3 exámenes coproparasitoscópicos consecutivos asociados o no a síntomas típicos de la enfermedad (diarrea y dolor abdominal los más frecuentes). Todos los pacientes fueron de edad pediátrica (1 mes hasta 14 años), pertenecientes al Hospital Infantil de México

"Federico Gómez". Muestras de 6 niños sanos, sin infección gastrointestinal presente, sirvieron como testigos.

4. Cultivo y cosecha de trofozoítos de G. lamblia. Los parásitos de ambas cepas fueron cultivados axénicamente en medio TY1-S-33 modificado por Keister (1983) suplementado con bilis bovina al 0.05% p/v, suero fetal de ternera descomplementado 10% v/v y antibióticos (penicilina 50 UI/ml. y estreptomycin 50 µg./ml., Anexo 1) (medio ATCC 1404). Se emplearon botellas de plástico para cultivo de 50 ml. (Falcon, BDC) las cuales fueron incubadas a 37°C (incubadora Precision modelo 4EG). Los organismos se cosecharon en fase logarítmica de crecimiento (aproximadamente 72 hrs. de incubación) por enfriamiento de las botellas en un baño de hielo-agua durante 30 min. Las botellas se invirtieron mecánicamente de 5 a 10 veces y se vertió su contenido (medio con trofozoítos despegados de la superficie plástica) en tubos Falcon de 50 ml. Se procedió inmediatamente a lavar 3 veces las células con solución amortiguadora de fosfatos-salina (PBS, Anexo 1) pH 7.2 utilizando centrifugación a 750 x g por 10 min. a 4°C en una centrifuga con sistema refrigerador acoplado (Beckman modelo TJ-6+TJR). Los parásitos se contaron con un hemocitómetro (Reichert Bright-Line) y su concentración se ajustó con PBS de acuerdo al ensayo en que se emplearon.

Con el fin de almacenar trofozoítos viables para cultivo posterior, se empleó la técnica de criopreservación en presencia de dimetil sulfoxido al 10% y Nitrógeno líquido (Phillips et al.,

5. Preparación y cuantificación de antígenos solubles. 50 x 10<sup>6</sup> trofozoitos de *G. lamblia* fueron resuspendidos en 1 ml. de solución amortiguadora de pH 8.3 con inhibidores de proteasas (trizma base 10 mM, fluoruro de fenil-metil sulfonilo [PMSF] 1 mM, N-etil maleimida [NEM] 25 mM) y fueron tratados después en alguna de las siguientes formas:

5.A. Sonicación y extracción con detergentes. La suspensión de trofozoitos fue sonicada con 6 pulsos de 15 segundos a 12 micrones con intervalos de 30 seg. en baño de hielo (generador de ultrasonido MSE). Los 3 pulsos finales se hicieron en presencia de alguno de los agentes solubilizantes tritón X-100 al 0.5% o desoxicolato de Sodio (NaDOC) al 2% de concentración final, o en ausencia de detergentes. El material sonicado fue centrifugado a 15,600 x g por 30 min. a 4°C (centrifuga Eppendorf modelo 5414) y el sobrenadante se colectó y almacenó a -20°C (congelador Bendix) hasta su uso.

5.B. Sonicación y extracción con ácido acético. En este caso se hizo una adaptación del método reportado por Fraenkel-Conrat (1957). Los trofozoitos fueron suspendidos en una mezcla de 1 ml. de solución amortiguadora pH 8.3 con inhibidores de proteasas y 2 ml. de una solución formada por 2 volúmenes de ácido acético glacial y 0.1 volúmenes de cloruro de Magnesio 1M. La suspensión se sonicó con 6 pulsos consecutivos de acuerdo al formato anterior; pero sin adición de detergentes. El sobrenadante cosechado se agitó

con barra magnetica en baño de hielo por espacio de 1 hora y se colectó de nuevo el sobrenadante por centrifugación a 12,000 x g durante 15 min. a 4°C (centrifuga Sorvall modelo RC-5B, rotor SS-34). El material soluble fue dializado secuencialmente (tubos de diálisis Spectrapor, Spectrum Medical Industries, Inc.) contra 2 litros de las siguientes soluciones: ácido acético 6% v/v, ácido acético 4.5% v/v y ácido acético 3% v/v. Finalmente, el material solubilizado se liofilizó (Liofilizadora Virtis, Gardiner NY) y se almacenó a -20°C. Para fines de análisis y cuantificación de la muestra, un peso conocido se procesó previamente solubilizado.

#### 5.C. Congelación-descongelación y extracción con detergentes.

La suspensión de trofozoítos fue sometida a 5 ciclos de congelación-descongelación, empleando inmersión en Nitrógeno líquido para congelar e incubación en baño de agua a 37°C (incubadora de baño Thelco modelo 83, Precision Scientific Co.) para descongelar las muestras. Posteriormente se agregaron los detergentes a las concentraciones finales mencionadas. Los lisados celulares chequeados microscópicamente se incubaron 20 min. a 37°C con agitación suave y por último se centrifugaron y se colectó el sobrenadante de acuerdo al protocolo descrito en la parte 5.A.

#### 5.D. Fraccionamiento celular de trofozoítos (membrana, citosol, citoesqueleto).

Con la finalidad de identificar los componentes del parásito localizados en los 3 compartimientos mencionados, se llevó al cabo una marcha experimental basada en la solubilización de las diferentes proteínas con soluciones conteniendo agentes de distinta naturaleza y acción (detergentes,

quelantes, tampones, iónicos, inhibidores de proteasas). La técnica se basó en los anteriores factores conjuntados a centrifugación diferencial, los cuales fueron adecuados al caso de *G. lamblia* bajo condiciones establecidas en el laboratorio (en colaboración con el Dr. José Antonio Enciso Moreno). 200 x10<sup>6</sup> trofozoitos se resuspendieron en 1 ml. de amortiguador "A" (trizma base 10 mM, etiléndinitrilotetraacetato disódico o EDTA 5 mM, pH 8.3) y se transfirieron a un tubo conico Falcon de 15 ml. para ser sonicados con 6 pulsos según se ha explicado. El material se virtió en un tubo Corex de 15 ml. y se centrifugó a 20,200 x g durante 45 min. a 4°C (centrifuga Sorvall, rotor SS-34). El primer sobrenadante (proteínas de citosol) se colectó y almaceno a -20°C, mientras que la pastilla fue resuspendida en 2 fracciones de 500 µl. de amortiguador "B" (EDTA 5 mM, tritón X-100 0.5% v/v, NEM 25 mM, PMSF 1 mM, ácido N-2-hidroxietyl piperacino-N'-2-etanosulfónico [HEPES] 10 mM). El tubo se agitó a 120 R.P.M. 30 min. a 37°C y las muestras fueron centrifugadas a 100,000 x g por un lapso de 45 min. a 4°C (ultracentrifuga Beckman modelo L8-55, rotor 50 Ti). Se recuperó el sobrenadante (proteínas de membrana) y se guardó a -70°C (ultracongelador Hotpack). La pastilla restante (proteínas de citoesqueleto) fue solubilizada en 500 µl. de amortiguador "C" (dodecil sulfato de Sodio [SDS] SDS al 2% p/v en amortiguador "B") para su preservación en condiciones iguales a la fracción citosol.

La determinación de la concentración de proteína obtenida en los diferentes extractos se realizó mediante el método de Lowry et al. (1951) modificado por Pulley y Grieve (1975) [Anexo 2].

6. **Análisis electroforético de extractos solubles.** Con objeto de caracterizar el perfil proteínico de los extractos de trofozoitos de *G. lamblia* obtenidos con los procedimientos descritos, se efectuaron las técnicas electroforéticas que a continuación se detallan:

6.A. **Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de Sodio (SDS-PAGE).** El análisis por SDS-PAGE para los diferentes materiales solubilizados se hizo siguiendo el principio del sistema de pH discontinuo descrito por Laemmli (1970). Se prepararon geles planos verticales de poliacrilamida al 10% y aquellos de un gradiente continuo del 5 al 15% p/v de concentración del monómero en el gel resolvidor (Anexo 2). En ambos casos el gel concentrador tuvo un 5% de concentración de acrilamida y pH de 6.8, mientras que el gel resolvidor a las concentraciones indicadas fue de pH 8.8. Los geles se prepararon en placas de vidrio con separadores y peine formador de pozos de teflón de 1.5 mm. de grosor, para ser corridos en cámaras de electroforesis vertical (Bethesda Research Laboratories, modelo V-16) adaptadas a una fuente de poder (ISCO modelo 493) usando como amortiguador de corrimiento una solución de trizma base 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0.1% p/v a un pH de 8.3. Previamente las muestras en solución se hirvieron en baño maria por espacio de 5 min. para evitar la posible activación de las proteasas ante la adición posterior de  $\beta$ -mercaptoetanol al 5% v/v de concentración final, completando el proceso de desdoblamiento de las moléculas proteínicas en la muestra por tratamiento a baño maria en ebullición durante 1 min.

Las muestras se cargaron en los diferentes pozos y se efectuó la electroforesis con el siguiente patrón: 200 voltios durante 20 min. y 100 voltios durante 5.5 hrs. (geles al 10%) u 8.5 hrs. (geles del 5-15% de acrilamida) o prácticamente hasta que el colorante trazador azul de bromofenol llegó al borde inferior del gel resolvidor. Con el fin de fijar y teñir las proteínas separadas electroforeticamente en los geles, éstos se retiraron de las placas y se sumergieron en una solución de colorante azul de Coomassie R-250 al 0.1% p/v en metanol 50%-ácido acético 10% v/v por un lapso de 1 hora. Inmediatamente se removió el exceso de colorante con solución de metanol 50%-ácido acético 10% v/v con agitación suave (agitador giratorio New Brunswick Scientific Co., modelo G2). Se reemplazo despues de algunas horas la solución por otra de metanol 10%-ácido acético 5% hasta que el fondo quedo claro y las bandas de proteína se observaron con la nitidez deseada.

Cuando se requirió determinar la presencia de glucoproteínas en la muestra separada en el gel de poliacrilamida, se llevó al cabo la técnica de tinción PAS [ácido peryódico-Schiff] (Köiw y Grönwall, 1952). El protocolo consistió en una modificación de aquel reportado por Keyser (1964) [Anexo 2].

Para obtener la movilidad electroforética relativa (Mr) de las bandas proteínicas separadas, se corrió simultáneamente un juego de calibración para peso molecular de proteínas (Pharmacia Fine Chemicals) que contenia como estandares: catalasa (232 Kd),

fosforilasa B (94 Kd), albúmina sérica bovina (BSA, 67 Kd), ovoalbumina (43 Kd), anhidrasa carbonica (30 Kd), inhibidor de tripsina (20.1 Kd) y  $\alpha$ -lactoalbumina (14.4 Kd). La estimación del peso molecular de las bandas de interés se hizo por un análisis de regresión lineal al graficar en forma semilogarítmica el  $R_f$  de la proteína contra el  $\log_{10}$  del peso molecular calibrado.

**6.B. Electroforesis bidimensional.** Como sistema de caracterización mas fino para los extractos preparados, se siguió el metodo de isoelectroenfoque (IEE) en geles cilindricos con subsecuente electroforesis tipo SDS-PAGE en gel plano vertical segun el formato introducido originalmente por O'Farrell (1975). Se prepararon los geles de IEE en tubos de vidrio de 2.5 mm. de diametro interno x 150 mm. de longitud previamente tratados con mercla crómica (Anexo 1), cloroformo y agua bidestilada (30 min. cada caso) y sellados en un extremo con Parafilm<sup>™</sup> (American Can Co.). La solución formadora del gel en tubo contenía urea 9M, acrilamida 3.8% p/v, N,N'-metilen bisacrilamida 0.2% p/v, nonidet P-40 2% v/v, solución de anfólitos de pH 3.5-10 (Ampholine, LKB Bromma) al 1% v/v, solución de anfólitos de pH 5-7 (Ampholine) al 4% v/v, persulfato de amonio 0.007% p/v y TEMED (N,N,N',N'-tetrametiléndiamina) al 0.015% v/v. Los tubos se llenaron a una altura aproximada de 12.5 cms. A los geles polimerizados se les retiró el Parafilm y se les recubrió con 15  $\mu$ l. de amortiguador de lisis "A" (urea 9.5M, NP-40 2% v/v, anfólitos pH 5-7 1.6% v/v, anfólitos pH 3.5-10 0.4% v/v y  $\beta$ -mercaptoetanol 5% v/v), 15  $\mu$ l. de amortiguador "K" (urea 9M, anfólitos pH 5-7 0.8% v/v, anfólitos pH

pH 3.5-10 0.2% v/v) y se precorrieron en una cámara de electroenfoque (BRL, adaptador para modelo V-16) acoplada a una fuente de poder. Se utilizaron hidroxido de Sodio 20 mM desgasificada extensivamente con vacío como solución de reservorio catodo y acido orto-fosfórico 10 mM como solución de reservorio anodo. El patron de precorrimiento fue de 200 voltios durante 15 min., 300 voltios por 30 min. y 400 voltios 60 min. Las muestras se resuspendieron en un maximo de 80  $\mu$ l. de amortiguador de lisis "A" y se cargaron a los geles en tubo, sobreponiéndoles 10  $\mu$ l. de amortiguador "X". El IEE de las muestras se realizó a 400 voltios por espacio de 20 hrs. a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, los geles se removieron de los tubos de vidrios empleando jeringa y cada gel se equilibrio individualmente por 2 hrs. en 5 ml. de amortiguador "O" de muestra de SDS (glicerol 10% p/v, 8-mercaptoetanol 5% v/v, SDS 2.3% p/v, tris-HCl 0.0625M a un pH de 6.8). Los geles equilibrados se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

La segunda dimension (SDS-PAGE) se efectuó en geles planos verticales del 5 al 15% de acrilamida sin utilizar peine formador de pozos, con el fin de sobreponer a cada uno de ellos los geles de IEE sellados al gel plano con solución de Agarosa "P" (agarosa tipo I al 1% p/v en amortiguador "O" con azul de bromofenol al 0.00002% p/v como trazador). Se aplicó un voltaje constante de 50 voltios hasta que el trazador llegó a 1 cm. del borde inferior del gel plano, el cual después fue teñido con azul de Coomassie y se visualitaron las manchas discretas de proteina de acuerdo al formato descrito en la parte 6.A.

7. **Análisis densitométrico de extractos solubles.** Para los diferentes corrimientos electroforéticos unidimensionales (SPS-PAGE) se determinaron los perfiles densitométricos utilizando ya sea el carril de gel cortado, o bien impresiones fotográficas del mismo. Los perfiles proteínicos fueron analizados en una celda para densitometría de barrido a 560 nm. (Espectrofotómetro Beckman modelo DU-7) y se obtuvieron gráficos de distancia de corrimiento y/o peso molecular contra la absorbencia de cada componente a la longitud de onda indicada. El análisis computarizado del área bajo la curva para los diferentes densitogramas permitió obtener la abundancia porcentual de los diversos picos proteínicos detectados.

8. **Radioiodinación de trofozoitos de G. lamblia.** Análisis y cuantificación de componentes accesibles al marcaje con  $^{125}\text{I}$ . Un procedimiento alternativo para la caracterización de componentes inmunológicamente relevantes es el marcaje de las proteínas parasitarias in vivo. En este trabajo se llevó al cabo la radioiodinación de trofozoitos de G. lamblia utilizando una adaptación del método de la lactoperoxidasa que fue descrito por Marchalonis (1969). En tubos de ensayo de 13 x 100 mm. tratados por espacio de 14 hrs. con mezcla crónica (Anexo 1), en un baño de hielo se preparó un cocktail de marcaje mediante la adición secuencial de: 1 volumen de solución comercialmente disponible de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  equivalente a 0.5 mCi del isótopo (Amersham International Co., actividad específica 15.4 mCi  $^{125}\text{I}/\mu\text{g}$ . de I) que se neutralizó con 1 volumen de PBS 2X (doblemente concentrado al PBS) conteniendo

ácido clorhídrico 0.1N. Se adicionaron inmediatamente 11  $\mu$ l. de PBS-yoduro de Potasio 270  $\mu$ M, 100  $\mu$ l. de lactoperoxidasa (1 mg./ml. de PBS) y  $60 \times 10^6$  trofozoitos resuspendidos en un volumen de PBS suficiente para completar 1 ml. La reacción fue inducida con 2 adiciones de 25  $\mu$ l. de peróxido de Hidrógeno al 0.03% en PBS, seguidas cada una de agitación suave del tubo durante 2.5 min. La mezcla de reacción fue removida del contenido celular mediante centrifugación en tubos cónicos Falcon de 15 ml. a 2000 R.P.M. por 10 min. (centrifuga clínica IFC). El  $^{125}$ I libre residual se eliminó lavando los trofozoitos 4 veces con 10 ml. de PBS-yoduro de Potasio 0.1M y centrifugación en las condiciones especificadas, revisándose la radioactividad remanente en los diferentes sobrenadantes con un contador Geiger (Technical Associates, modelo PUG 1) hasta que la misma fue prácticamente nula. El paquete celular se resuspendió en 1 ml. de solución amortiguadora de pH 8.13 con inhibidores de proteasas (ver parte 5) para posteriormente obtener proteínas solubles de acuerdo al protocolo de sonicación y extracción con detergentes (parte 5.A.).

La cantidad de radioactividad incorporada a los componentes solubles (expresada en cuentas por minuto o c.p.m.) se determinó en alícuotas de 5  $\mu$ l. de los sobrenadantes finales contenidos en tubos de poliestireno, utilizando un contador automatizado para emisiones gamma (Packard, modelo 5230). Los extractos solubles fueron almacenados en viales de plomo a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su siguiente análisis en técnicas de SDS-PAGE y densitometría y en ensayos de IPP. En ambos casos la detección de las proteínas radiomarcadas se efectuó

por autorradiografía indirecta (Anexo 2). Los geles planos unidimensionales fueron secados con calor-vacío (secador de geles planos Bio-Rad, modelo 224) y expuestos en obscuridad a películas para rayos X de 20 x 29 cms. (Kodak X-Omat XK-1) en cassettes especiales equipados con pantallas intensificadoras de teflón-tungstato de Calcio (Dupont Lightning Plus GL) a  $-70^{\circ}\text{C}$  por espacio de tiempo determinado empíricamente. Los autorradiogramas se obtuvieron revelando las películas según las especificaciones de los proveedores (Anexo 2).

9. **Infección experimental de jerbos mongólicos con trofozoítos de G. lamblia.** Con el fin de poder evaluar el curso longitudinal temporal de la infección en jerbos con el protozoario, se realizaron experimentos de desafío oral en apego al protocolo empleado por Belosevic y cols. (1983). Los animales con las características y tratamiento previamente descritos se dividieron en grupos de 5 jerbos, de tal manera que la suma de los pesos corporales entre cada grupo no difiriera en más de 2 gramos. Cada jerbo se alojó en caja individual para evitar posibles transmisiones oro-fecales no deseadas y con acceso libre a comida y agua. En la noche anterior al desafío, se retiró el alimento pero no el agua a los animales. Esto facilitaría el establecimiento inicial del parásito.

Se cosecharon, contaron y ajustaron trofozoítos viables de G. lamblia de ambas cepas a una concentración de  $1 \times 10^6$  células en 0.2 ml. de PBS estéril, lo cual constituyó la dosis per os y que se

administró a los jerbos vía intragástrica mediante una jeringa plástica estéril adaptada con una canula metálica de calibre 18 (Popper & Sons, Inc.). Generalmente, la dosis de desafío referida se tuvo que aplicar bajo condiciones de anestesia con éter, verificándose después la recuperación del animal. Los jerbos que sirvieron como controles recibieron 0.2 ml. de PRS estéril como se ha indicado. A partir de ese momento se permitió a los animales el acceso libre a agua y alimento.

**9.A. Monitoreo del patrón de expulsión de quistes en muestras fecales.** El establecimiento de la infección en los jerbos desafiados se verificó por medio de exámenes coproparasitológicos realizados en deyecciones recolectadas individualmente a los animales durante un tiempo aproximado de 2 hrs. (generalmente de 10 a 12 A.M.), observando un intervalo de 3 días entre las coproparasitoscopias. El aserrín fue retirado de las cajas de los jerbos por el período indicado, las muestras fecales redondas se colectaron en viales de vidrio de 20 ml. previamente pesados y esterilizados en autoclave, y se calculó el peso de la muestra obtenida en cada caso. El contenido de los viales se procesó de inmediato o tras almacenaje a 4°C por una noche con alguna de las técnicas que siguen:

**9.A.1. Flotación con sulfato de zinc (Técnica de Faust y cols., 1939).** Se preparó una suspensión de la muestra en 10-15 veces su volumen en agua bidestilada. La suspensión se filtró al través de 2 capas de gasa húmeda en un embudo sobre un tubo de ensayo de 12 x 100 mm. Se agregaron de 1-2 ml. de éter dietílico

para remover lípidos. El tubo se tapó, se agitó por inversión mecánica aliviando presión interna y se le adicionó agua hasta 1 cm. por debajo de su borde. 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 a la pastilla de 2-3 ml. de una solución de sulfato de Zinc al 33% p/v (Anexo 1) con posterior resuspensión de la pastilla y adición de más solución de sulfato de Zinc suficiente para llenar el tubo, el cual fue centrifugado a 2500 R.P.M. por espacio de 2 min. Finalmente se tomaron muestras del material flotante en la superficie del sulfato de Zinc adosando a esta un portaobjetos, se le agregó una gota de solución yodada (lugol, ver Anexo 1) para colocar cubreobjetos y contar bajo microscopio óptico (Olympus B01) en objetivo de 100 a 400 aumentos los quistes de G. lamblia rescatados de las heces.

**9.A.2. Soporte de sacarosa 0.85M.** Este método fue reportado exitosamente por Bingham et al. (1979) por lo que se empleó en el presente trabajo. La muestra fecal se machacó en aproximadamente 5 ml. de agua bidestilada con mortero y se filtró por una malla de Nylon de apertura cercana a 520  $\mu$ m. para remover partículas grandes. Se colocaron (estratificaron) cuidadosamente de 3-5 ml. del filtrado sobre 3 ml. de solución de sacarosa 0.85M (Merck grado ultracentrifugación) con una densidad relativa de 1.11 y contenida en un tubo cónico de vidrio de 15 ml. en baño de hielo. El tubo se

sometió a centrifugación a 600 x g por 5 min. a TA (Centrifuga Beckman TJ-6). La interfase agua-Sacarosa se removió por aspiración suave con pipeta Pasteur, se diluyó 1:10 v/v en agua bidestilada y se centrifugó según el formato anterior. El sobrenadante se removió con pipeta Pasteur y la pastilla se resuspendió en 3 ml. de agua, con la finalidad de volver a estratificarle sobre 3 ml. de sacarosa 0.85M helada y centrifugarle como se indicó. Se extrajo nuevamente la interfase agua-sacarosa, se le diluyó 1:10 v/v en agua bidestilada y se le centrifugó igualmente. La pastilla final fue resuspendida en un volumen pequeño de agua bidestilada (p. ej. 100-500  $\mu$ l.). Los quistes semipurificados se cuantificaron microscópicamente y, análogamente a la técnica anterior, se calculó el número de quistes por cada gramo de muestra fecal colectada.

9.B. Obtención de muestras séricas. Se revisó el curso de la inmunidad en los jerbos experimentales utilizando muestras de suero individualmente colectadas a intervalos semanales después del desafío inicial. Los animales fueron anestesiados en una cámara de éter y se les extrajo sangre por medio de punción periorbital del ojo (comisura ocular) con pipeta Pasteur de 5 y 3/4 de pulgada de longitud y punta limada. El volumen de sangre recolectado fue de 100-200  $\mu$ l. cada vez, mismo que se transfirió de inmediato a un tubo Eppendorf de 0.5 ml. para separar posteriormente el suero con incubación en baño a 37°C por 30 min. y centrifugación a 2500 R.P.M. durante 10 min. a 4°C. Los sueros se almacenaron sin adición de conservadores a -20°C hasta su uso. Colateralmente se comprobó la total recuperación de los roedores.

9.C. Vigilancia del peso corporal. Como un monitoreo adicional, se pesó a los jerbos individualmente (báscula para animales Ohaus) cada tercer día después del desafío con los trofozoítos de G. lamblia, justo antes de recolectarles muestras fecales como se especificó.

10. Desarrollo de ensayos para el inmunodiagnóstico de Giardiasis clínica y experimental. En esta parte del trabajo, la implementación de los distintos ensayos serológicos para muestras a partir de humanos y animales experimentales requirió la estandarización de las concentraciones óptimas de los reactivos tanto químicos como biológicos a emplear; no obstante, fue preciso preparar en el laboratorio el reactivo inmunológico cuya elaboración se describe en el siguiente formato:

10.A. Preparación de un conjugado de Inmunoglobulinas (Igs) de conejo anti-Igs de jerbo acopladas a peroxidasa de rábano. En primera instancia se procedió a purificar las Igs a partir de muestras séricas colectadas de varios jerbos sanos como se mencionó en la parte 9.B. Los sueros en su conjunto fueron sometidos a precipitación salina con una solución saturada de sulfato de amonio [SSSA] (Garvey y cols., 1977). Brevemente, en un recipiente con agitador magnético y en baño de hielo se mezclaron 1 volumen del pozo de sueros con 1 vol. de SSSA [sulfato de amonio 40% p/v, pH 7.4] agregada gota a gota y se dejaron por un lapso de 1 hora, para centrifugar después a 12,000 R.P.M. durante 20 min. a 4°C (centrifuga Sorvall, rotor SS-34). El sobrenadante fue descartado,

el precipitado en tanto fue disuelto en 3 vols. de PBS y dializado extensivamente contra PBS. La cantidad de Igs solubilizadas se determinó con el ensayo modificado de Lowry (Dulley y Grieve, 1975) y el material fue almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

El siguiente paso implicó la obtención de Igs contra las Igs preparadas. Para tal propósito se inmunizó un conejo Nueva Zelanda adulto empleando como dosis las Igs de jerbo a una concentración de 200  $\mu\text{g}$ . en 500  $\mu\text{l}$ . de una emulsión formada por adyuvante completo de Freund (FCA, Gibco Laboratories) y PBS mezclados volumen a volumen. Esta dosis se administró al animal primero por vía intramuscular y se repitió 1 semana después por vía subcutánea. En las semanas 2 y 3 posteriores al primer inóculo se aplicaron 2 refuerzos vía s.c. y en la 4a. semana uno más por vía intraperitoneal; pero en éstas 3 últimas ocasiones el inóculo se preparó con adyuvante incompleto (FIA, Gibco). Se dejaron pasar de 1 a 2 semanas más para obtener muestras de suero mediante punción en la vena marginal de la oreja del conejo, las cuales fueron probadas en cuanto a la presencia de Igs contra Igs de jerbo (Ag) siguiendo la técnica de doble inmunodifusión según Ouchterlony (1968). Cuando se logró un título sérico satisfactorio, se sangró completamente el animal por punción cardíaca, se le sacrificó por sobredosis de éter y por su parte se separó el suero para precipitar las Igs de conejo anti-Igs de jerbo con SSSA. Esto último se realizó en la manera previamente descrita implicando las siguientes variantes: se mezcló 1 vol. de suero + 2 vol. de PBS + 3 vols. de SSSA por 30 min. a  $4^{\circ}\text{C}$ , se resuspendió el precipitado en

3 vols. de PBS, se precipito nuevamente 30 min. con 3 vols. de SSSA y el precipitado se solubilizó en 0.5 vols. de PBS, siendo después dializado y cuantificado. Se ajustó la concentración final a 5 mg. de globulinas/ml. de PBS.

La conjugación de las Igs con peroxidasa de rábano (HRP) se hizo aplicando el método del glutaraldehído en 2 pasos (Avrameas, 1969). El procedimiento se basó en una primera etapa de activación de la HRP: 10 mg. de HRP (RE 3.0, Sigma Chem. Co.) se disolvieron en 0.2 ml. de PBS 0.1M pH 6.8 (Anexo 1) conteniendo 1.25% v/v de glutaraldehído (Merck Ind.) y se dejaron por una noche a TA. En todos los pasos fue requisito preservar la HRP de la luz. Para remover el glutaraldehído en exceso, la solución se dializó contra solución salina fisiológica (SSF, que consta de cloruro de Sodio 0.85% p/v) y se aforo con la misma a 1 ml. Este volumen de HRP activada se mezcló con 1 ml. de la solución de globulinas y 0.1 ml. de amortiguador de carbonatos 1M pH 9.5 (carbonato de Sodio 0.13M, bicarbonato de Sodio 0.37M) los cuales se reaccionaron durante 24 hrs. a 4°C. Posteriormente se agregó 0.1 ml. de lisina 0.2M fresca para enmascarar los grupos activos de la HRP que no reaccionaron con la proteína por un espacio de 2 hrs. a TA. La mezcla se dializó una noche contra PBS y el material resultante fue precipitado agregando un volumen igual de SSSA. El precipitado se lavó 2 veces con solución semisaturada de sulfato de amonio y se resuspendió en 1 ml. de PBS, solución contra la cual fue nuevamente dializado en forma extensiva. El conjugado se centrifugó a 15,600 x g por 30 min. (centrifuga Eppendorf) y el sedimento fue descartado. Al

sobrenadante se le adicionó BSA (fracción V de Cohn) hasta una concentración de 1% p/v como estabilizador y se le filtró al través de una membrana de 0.22  $\mu$ m. de diámetro de poro (filtro Millipore GS). El preparado final se almacenó en alícuotas de 20  $\mu$ l. a  $-20^{\circ}\text{C}$  protegido de la luz, y su actividad fue estandarizada en pruebas de ELISA e inmunolectrotransferencia.

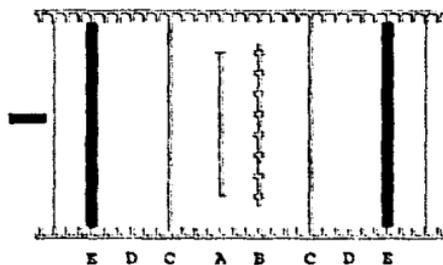
Como dato adicional, los siguientes conjugados: de Igs de cabra anti-Igs de conejo (IgA+IgG+IgM) y de Igs de cabra anti-Igs de humano (IgA+IgG+IgM), ambos acoplados a HRP, fueron adquiridos comercialmente (Cappel Laboratories).

10.B. Ensayo del Inmunsorbente acoplado a Enzima (ELISA). Las Igs contra *G. lamblia* presentes en sueros de pacientes y animales experimentales fueron detectados empleando un protocolo de ELISA indirecto basado en el que reportaron Engvall y Perlmann (1972). El Ag soluble de trofozoítos se acopló a las paredes de los pozos de una placa de poliestireno para microtitulación (Dynatech Immulon) en una concentración de 10  $\mu$ g. por ml. de amortiguador de acoplamiento (carbonato de Sodio 15 mM, bicarbonato de Sodio 35 mM a pH 9.6) con incubación por una noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Los sitios donde no se pegó el Ag fueron bloqueados llenando completamente los pozos con PBS que contenía BSA al 0.5% p/v y tween 20 al 0.5% v/v durante 30 min. a TA. Se hicieron 3 lavados a los pozos de 3 min. cada uno empleando PBS-T (tween 20 0.5% v/v en PBS), se adicionaron de inmediato los sueros bajo prueba diluidos adecuadamente en PBS-BSA-tween (200  $\mu$ l./pozo) y se incubaron las placas por 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Los complejos Ag-Ig se lavaron 3 veces con PBS-T en las condiciones

especificadas. El conjugado correspondiente (una 2a. Ig acoplada a HRP), diluido convenientemente en PBS-BSA-tween, se agregó en cantidad igual a la dilución del suero y las placas se dejaron a 37°C durante 1 hora, tras lo cual se repitieron los 3 lavados con PBS-T. A cada pozo se adicionaron 200 µl. de solución fresca de sustrato (peróxido de Hidrogeno 0.03% v/v y o-fenilendiamina 0.04% p/v en amortiguador de ácido cítrico 0.1M-difosfato de Sodio 0.2M) con objeto de desarrollar la reacción de hidrólisis del sustrato (aparición de un color amarillo a naranja debido al indicador) a TA en un tiempo de 10 a 15 min. En su caso, la reacción se detuvo con la adición de ácido sulfúrico 2.5M (50 µl./pozo). Los controles utilizados consistieron en acoplar el Ag relacionado a la 2a. Ig-HRP, incubarlo sin suero y revelar con el conjugado respectivo (control positivo) o bien acoplar el Ag de *G. lamblia*, incubarlo sin suero y revelar con el conjugado correspondiente (control negativo). La densidad óptica para cada pozo se registró a 492 nm. en un espectrofotómetro para placas de microtitulación (Minireader II, Dynatech Laboratories).

**10.C. Inmunoelctrotransferencia (IET, Western blotting).** Los componentes de los extractos solubles de *G. lamblia* que pueden ser reconocidos por Abs específicos presentes en las muestras séricas se caracterizaron con el uso del ensayo de IET en acuerdo al método de Towbin y cols. (1979) con modificaciones hechas por Hanff y cols. (1982) y Pekkala-Flagan y Ruoslathi (1982). El formato se basa en transferir proteínas separadas por SDS-PAGE desde un gel de poliacrilamida a un papel de nitrocelulosa (NCP) empleando un campo

eléctrico, y en una tira de este papel la reacción Ag-Ig es revelada con un sistema enzimático similar al caso del ELISA. Se hicieron geles preparativos con la parte resolvidora de 5-15% de acrilamida y parte concentradora de 5% del monomero; pero en este caso se usó un peine ciego (de pozo unico) en el que se cargaron 120 µg. de Ag soluble del parásito por cm. de amplitud del pozo disueltos en aproximadamente 500 µl. de amortiguador de muestra. En estos ensayos el colorante trazador fue pironina Y (Sigma Chem. Co.) al 0.00002% p/v (Anexo 2). La técnica de SDS-PAGE se desarrolló como se ha explicado, los geles se desmontaron de la cámara y se sumergieron durante 1 hora en amortiguador para transferencia de proteínas (trizma base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% v/v). En las mismas condiciones de inmersión se montó un "sandwich" de IET según el dispositivo mostrado a continuación:



- A: Gel 5-15% acrilamida.
- B: NCP.
- C: Papel tipo Whatman 3MM
- D: Fibra Scotch-Brite<sup>™</sup>
- E: Soporte de plexiglas.

Dentro de este montaje se cuidó que el lado opaco del NCP estuviera en contacto directo con el gel de acrilamida y también que el papel quedara del lado del ánodo (polo positivo), además de asegurarse que no quedaran burbujas atrapadas en el dispositivo. La

LET se realizó en una cámara especial (Trans-Blot, Bio-Rad) adaptada a una fuente de poder de alto amperaje (Hoefer Scientific Instruments, modelo TE50) con el sandwich sumergido en amortiguador de transferencia y en baño de hielo a 4°C. Dicho corrimiento se efectuó por espacio de 2.5 hrs. a 100 voltios (100-500 miliamperios). El sandwich fue desmontado y se cortó una tira del NCP para verificar la correcta transferencia de proteínas utilizando tinción de negro-azul de amido o con tinta india (Anexo 2). El resto del papel se bloqueó con una solución de BSA al 3% p/v en PBS por 6 hrs. a TA o una noche a 4°C con posterior secado al aire y almacenamiento a TA hasta su uso (dentro de 2 meses). Para su confrontación con los sueros individuales, el papel se cortó en tiras de 5 mm. de ancho y se les depositó en tubos de ensayo de 15 x 110 mm. con tapon de rosca, en donde se les adicionaron los sueros diluidos en 1 ml. de una solución de BSA 4% p/v, triton X-100 0.04% v/v, SDS 0.4% p/v y suero bovino al 10% v/v en PBS. La reacción se incuba 3 hrs. a 37°C en un agitador de balanceo (Bellco Glass Inc.). Posteriormente se hicieron 3 lavados de 15 min. a las tiras con 2 ml. de triton X-100 1% v/v en PBS a TA. El conjugado conveniente (una 2A. Ig acoplada a HRP) se adicionó diluido en 1 ml. de PBS adicionado con suero bovino al 10% v/v y las tiras se incubaron nuevamente por 3 hrs. a 37°C. Después de repetir los 3 lavados mencionados, las tiras se revelaron con la adición de 1 ml. de solución fresca de sustrato (peróxido de Hidrogeno 0.01% v/v, 4-Cloro-1-naftal 0.05% p/v, metanol 16.6% v/v en PBS) en agitación a TA hasta observar la aparición de bandas de tono violeta oscuro

en un fondo claro. Los experimentos testigo implicaron: incubar una tira sin Ag transferido con suero y revelada con conjugado, o una tira con Ag transferido incubada sin suero y revelada con el conjugado (controles negativos), o bien una tira con Ag transferido incubada con suero de conejo inmune y revelada con Igs de cabra anti-Igs de conejo acopladas a HRP (control positivo).

Cuando se realizaron ensayos de reactividad de los Ags transferidos en tiras de NCP ante lectinas acopladas a HRP, éstas fueron incubadas en una concentración de 1 µg./ml. de diluyente (PBS-tween 20 0.05%) por espacio de 1 hr. a TA, seguido de 3 lavados de las tiras de 10 min. cada uno con el diluyente sin lectina, revelandose la reacción Ag-lectina con solución de sustrato según se ha mencionado anteriormente. La batería de lectinas-HRP utilizadas (Sigma Chem. Co.) incluyó aquellas de: Arachis hipogaea (cacahuete) con afinidad por B-D-Galactosa, Bandeiraea simplicifolia BS-I con afinidad hacia α-D-Galactosa, Concanavalina A de Canavalia ensiformis que reconoce α-D-Manosa, Glycine max (frijol de soya) con afinidad hacia N-acetil-D-Galactosamina, Ulex europaeus UEA-I (argomon) que reacciona con α-L-Fucosa, y Triticum vulgare WGA (germen de trigo) que tiene afinidad por residuos de N-acetil-D-Glucosamina.

10.D. Ensayo de Inmunoprecipitación (IPF). Los componentes de superficie de trofozoitos de G. lamblia fueron marcados con <sup>125</sup>I (apartado 8) con objeto de saber cuáles de ellos pueden ser reconocidos por las Igs en sueros humanos y de jerbos, bajo condiciones de ensayo en que tales complejos Ag-Ig son

coprecipitadas con una molécula de alta afinidad por la región Fc de la IgG como lo es la proteína A acoplada previamente a un soporte (sefarosa en microperlas). Este complejo terciario es escindido y finalmente resuelto por análisis electroforético y autorradiográfico. El método que se empleó en este trabajo consistió en una adaptación de aquel descrito por David y cols. (1964).  $100 \times 10^3$  c.p.m. de Ag soluble diluido 1:2 con NETT 2X (cloruro de Sodio 0.3M, EDTA 10 mM, tris-HCl 0.1M, tritón X-100 0.1% v/v a pH 7.4) se mezclaron con 5 a 8  $\mu$ l. de suero sin diluir en tubos de vidrio de 12 x 100 mm. pretratados con un agente siliconizante (Frosil 28, PCR Research Chemicals, Inc.). Los tubos se incubaron por una noche a 4°C en agitador rotatorio, se les agregó individualmente 25  $\mu$ l. de una suspensión de proteína A-sefarosa CL-4B (Pharmacia Fine Chemicals) 50% v/v en BSA 6% p/v en NETT 1X (cuyas concentraciones de componentes son la mitad del caso 2X) y se les incubó de nuevo a 4°C, ahora por 1.5 hrs. Las perlas de sefarosa se lavaron consecutivamente con: 3 ml. de NETT 1X-BSA 1% p/v (2 veces), 3 ml. de NETT 1X-cloruro de Sodio 0.5M (1 vez) y 3 ml. de NETT 1X (2 veces). En cada lavado se utilizaron centrifugaciones a 2500 R.P.M. por 10 min. a 4°C, siendo retirado el sobrenadante con pipeta Pasteur. El complejo fijado en las perlas se transfirió resuspendido en el mínimo volumen de NETT 1X a tubos Eppendorf de 1.5 ml. para centrifugarse a 15,600 x g durante 5 min. Se removió el sobrenadante y se agregaron a la pastilla 30  $\mu$ l. de amortiguador de muestra para SDS-PAGE. Las muestras se sometieron a baño María a ebullición por espacio de 5

min., seguido de la adición de 1.5  $\mu$ l. de  $\beta$ -mercaptoetanol. Tras hervirles 1 min. más, las muestras se volvieron a centrifugar y el sobrenadante (que contiene los complejos Ag-Ig liberados) se cargó en los pozos de geles planos verticales de 5-15% de acrilamida en la zona resolvidora. Estos geles se procesaron para electroforesis y autorradiografía indirecta como ya se mencionó.

11. Métodos estadísticos. En el presente trabajo se emplearon análisis de regresión lineal para el ajuste de las determinaciones de pesos moleculares en las bandas visualizadas en los diversos geles de SDS-PAGE. En los casos en que se requirió la comparación estadística de varios grupos de observaciones, se realizó el análisis de varianza y pruebas de hipótesis tipo t de Student y F de Fisher. Para tal efecto, se asumió que los datos obtenidos se ajustan a una distribución normal y que las conclusiones estadísticas inferidas tienen por lo menos un 95% de confiabilidad.

#### IV. RESULTADOS

El conocimiento de la complejidad de un parásito desde el punto de vista biológico requiere la caracterización de sus diferentes componentes. En este sentido, el análisis de las biomoléculas potencialmente inmunogénicas en Giardia lamblia constituyó una estrategia inicial en el presente trabajo.

1. CULTIVO DE TROFOZOITOS DE Giardia lamblia. Las cepas P-1 y WB fueron cultivadas axénicamente en medio TYI-S-33 como se describió en Material y Métodos, no detectándose diferencias relevantes en cuanto a la velocidad de multiplicación de los organismos de ambas cepas, en función de las determinaciones de conteo celular iniciales y finales durante el cultivo. Generalmente, la fase logarítmica tardía de crecimiento fue el momento elegido para cosechar los parásitos y se alcanzó prácticamente a las 72 hrs. de incubación. El porcentaje de viabilidad celular fue cercano al 99% de acuerdo con la prueba de exclusión del azul de tripano (Anexo 2). Por otra parte, en la determinación de conteo de parásitos se encontró un rendimiento consistente de aproximadamente  $60 \times 10^6$  trofozoitos por cada botella con 50 ml. de medio de cultivo.

2. EFICIENCIA EN LA OBTENCION DE ANTIGENOS SOLUBLES TOTALES, SUBCELULARES Y DE SUPERFICIE RADIONMARCADOS. Para cuantificar confiablemente el contenido proteínico total en los diferentes extractos de G. lamblia, se siguió el protocolo que incluye el uso

del reactivo de fenol según Folin-Ciocalteu (Lowry y cols., 1951) combinado a la adición de SDS que permitió eliminar la interferencia por otros detergentes presentes en las muestras (tritón X-100 y NaDOC). Como patrón de calibración se utilizó BSA (5 a 100  $\mu\text{g.}$ ) y los datos espectrofotométricos confluyeron en una alta correlación ( $r^2=99.5\%$ ) para las variables  $x=\mu\text{g.}$  de proteína,  $y=A_{750}$ . La curva se ajustó a la fórmula  $y=mx+b$ , donde  $m=0.003$  y  $b=0.02$ . Como  $b$  fue diferente de cero, se sugiere que el método presentó baja sensibilidad a concentraciones de proteína más altas o bajas de las manejadas, por lo cual se recurrió básicamente a valores interpolables de las muestras problema.

Los componentes solubles totales y subcelulares en los trofozoítos de G. lamblia se pudieron cuantificar adecuadamente en las condiciones especificadas arriba. Debido a que se emplearon tanto una serie de técnicas de lisis celular (sonicación y congelación-descongelación), de solubilización de proteínas totales (dos detergentes y un solvente orgánico) y de compartimientos específicos del parásito (membrana, citosol y citoesqueleto), se compararon los rendimientos totales y relativos de los métodos empleados para extraer proteínas. En la Tabla 1 se muestran los valores promedio  $\bar{x} \pm$  la desviación estándar  $s$  para cada método ensayado. En función de los datos que se obtuvieron, el análisis estadístico de varianza demostró que: (a) la adición de cualquier agente solubilizante se correlacionó de manera significativa con mejores rendimientos en la extracción de proteínas ( $P<0.005$ ) y no dependió del proceso de lisis celular ni de la *scpa* utilizada, y

(b) los detergentes triton X-100 (no iónico) y NaDOC (aniónico), así como el solvente orgánico ácido acético proporcionaron niveles de eficiencia equiparables; sin embargo, los valores que se tuvieron empleando NaDOC fueron constantemente menores a aquellos obtenidos con los otros dos solubilizantes. El uso de tritón X-100 convirtió rendimientos consistentemente mayores combinado al método de lisis por sonicación en comparación al de congelación-descongelación, aunque este último método fue más eficaz en ausencia de solubilizantes. Para estas observaciones no se determinó una diferencia significativa en el análisis de varianza.

Con respecto a la metodología implementada para fraccionar y enriquecer algunos antígenos solubles de G. lamblia, los resultados fueron reproducibles empleando números de trofozoitos variables (de 150 a 400 x 10<sup>6</sup>) y los datos claves se resumen en la Tabla 2. La fracción denominada "Membrana" presentó cantidades de proteína ligeramente mayores a la fracción "Citoesqueleto", en tanto que la fracción "Citosol" presentó cerca del 70% de la proteína total. Estos datos se observaron tanto en la cepa P-1 como en la cepa WB. Por una parte, la estrategia experimental que se siguió en este caso permitió solubilizar en forma completa todos los componentes proteínicos del trofozoito, y por otra parte el rendimiento que se obtuvo fue óptimo en relación a los métodos descritos anteriormente. De esta forma, se le tomó como referencia para calcular la eficiencia relativa de aquellos, así como para determinar la cantidad de proteína por cada trofozoito de G. lamblia. Tomando en cuenta este criterio, se estimó un contenido de

aproximadamente 90 pg. de proteína por célula con una variabilidad menor al 1.5% (Tabla 2), además de que el rendimiento relativo de los diferentes métodos de obtención de antígeno soluble total osciló de un 67-83% cuando se utilizó algún solubilizante, y fue de un 41-50% al efectuar la lisis celular en ausencia de dichos agentes (Figura 3).

La determinación de la eficiencia de extracción de antígenos radiomarcados se llevó al cabo de manera semejante. Se marcaron con  $^{125}\text{I}$  los componentes de membrana celular de trofozoítos de G. lamblia mediante la técnica de la lactoperoxidasa (ver Material y Métodos). La eficiencia en el marcaje selectivo de la superficie del parásito se basó en el hecho de que el catalizador de la reacción de iodación en el sistema, la enzima lactoperoxidasa (P.M. 78 kd), no puede atravesar membranas celulares intactas. Por otro lado, no hubo daño aparente a los trofozoítos, ya que su morfología y motilidad permanecieron normales y la viabilidad de éstos fue cercana al 95% según se determinó por la exclusión del azul de tripano. El ultrasonido (sonicación) fue el método de elección sobre la congelación-descongelación por razones prácticas solamente. Además, el uso de detergentes evitó el empleo de ácido acético dada la alta afinidad de los primeros por solubilizar componentes de membrana. Considerando los valores presentados en la Figura 4 se pudo inferir que para las 2 cepas hubo un rendimiento mayor y reproducible de solubilización de componentes radioiodinados cuando se adicionó cualquiera de los detergentes ( $P < 0.0005$ ). Así, el detergente tritón X-100 solubilizó

constantemente una mayor cantidad de proteínas marcadas que el NaDOC; pero sin alcanzar la significancia en el análisis de varianza. Por consiguiente, los detergentes utilizados tuvieron una alta eficiencia en extraer específicamente biomoléculas de la membrana del trofozoito.

**3. ANALISIS DE COMPONENTES ANTIGENICOS EN TROFOZOITOS DE *G. lamblia*.** En esta parte del estudio se abordaron dos aspectos principales: determinar por un lado la complejidad del perfil proteínico del parásito y, por otra, identificar sus componentes más significativos con base en criterios cualitativos y cuantitativos.

**3.1. Caracterización Electroforética.** Con el objeto de analizar los antígenos solubles de trofozoitos de *G. lamblia*, se establecieron las condiciones electroforéticas experimentales más adecuadas y confiables. Para ello se utilizaron geles de poliacrilamida al 10% y en gradiente del 5 al 15% del monómero en acuerdo a lo descrito en la parte metodológica. En la Figura 5 se ilustran los resultados obtenidos. En general, los geles con 10% de acrilamida proporcionaron una curva de calibración de masa relativa ( $M_r$ ) de fórmula  $y=mx+b$  ( $m=-0.96$ ,  $b=5.1$ , donde  $x=R_f$ ,  $y=\log_{10}P.M.$ ) cuyo nivel de correlación fue alto ( $r^2 \approx 96.5\%$  a  $99\%$ ) y para los electroforetogramas con 5-15% de acrilamida se obtuvieron curvas con mayor confiabilidad ( $r^2 \approx 99.4\%$ , en donde  $m=-1.30$ ,  $b=5.45$ ). Otro punto importante fue el hecho de que se observó una mejor definición en las bandas de proteína "individuales" en el

TABLA 1. Eficiencia en la obtención de antígenos solubles totales de trofozoitos de G. lamblia empleando diferentes métodos.

CEPA	SOLUBI- LIZANTE	SONICACION <sup>A</sup>		LISIS CELULAR CONG./DESCONG. <sup>B</sup>			
		x	s	s/x	x	s	s/x
P-1	-	1.93	0.11	0.05	2.22	0.09	0.04
	TX-100	3.60	0.46	0.12	3.09	0.42	0.13
	NaDOC	3.07	0.19	0.06	3.04	0.11	0.03
	CH <sub>3</sub> COOH	3.69	0.18	0.04	ND	ND	ND
WB	-	1.86	0.13	0.07	2.23	0.31	0.13
	TX-100	3.68	0.29	0.07	3.07	0.14	0.04
	NaDOC	3.09	0.33	0.10	3.08	0.22	0.07
	CH <sub>3</sub> COOH	3.70	0.29	0.08	ND	ND	ND

<sup>A</sup> Promedios de los valores obtenidos en 3 experimentos.

<sup>B</sup> Promedios de los valores obtenidos en 2 experimentos.

TX-100: Triton X-100 al 0.5%.

NaDOC: Desoxicolato de Sodio al 2%.

CH<sub>3</sub>COOH: Acido acético.

Numero de celulas empleadas: 50 x 10<sup>6</sup>.

Los datos se expresan como mg. de proteína total.

**TABLA 2. Eficiencia en la obtención de antígenos subcelulares de trofozoitos de *G. lamblia*.**

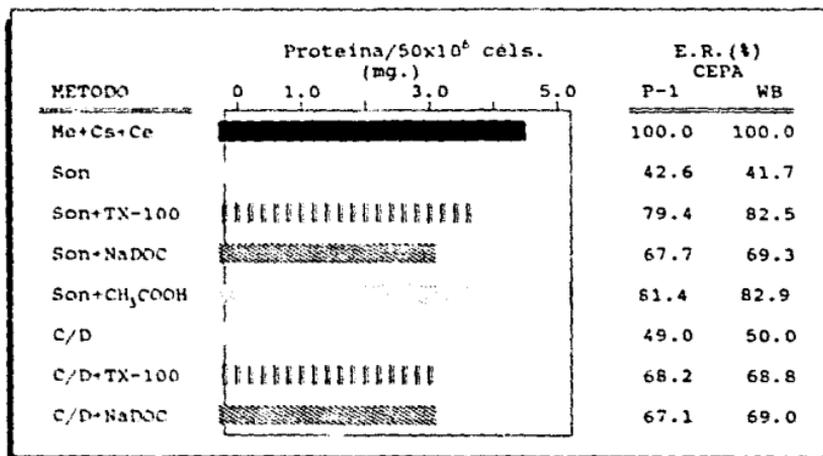
CEPA FRACCION	P-1			WB		
	Me	Cs	Ce	Me	Cs	Ce
-						
x	6.88	24.42	4.96	6.54	24.75	4.39
s	0.54	1.20	0.10	0.24	1.11	0.40
s/x	0.07	0.05	0.02	0.03	0.04	0.09
‡ P.T.	18.98	67.33	13.69	18.33	69.36	12.31
Proteína por célula	90.67 ± 1.37 pg.			89.22 ± 1.16 pg.		

Los datos se expresan como mg. de proteína calculados para un número de  $400 \times 10^6$  células. Se presentan promedios de los valores obtenidos en 2 experimentos.

Me: Membrana, Cs: Citosol, Ce: Citoesqueleto.

‡ P.T.: Por ciento de la Proteína Total (ΣMe-Cs-Ce).

FIGURA 3. Eficiencia relativa de obtención de antígenos solubles de *G. lamblia* empleando diferentes métodos.



Son: Sonicación.

C/D: Congelación-Descongelación.

TX-100: Tritón X-100.

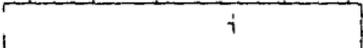
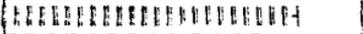
NaDOC: Desoxicolato de Sodio.

CH<sub>3</sub>COOH: Ácido acético.

Me+Cs+Ce: Proteína total (mg.) obtenida en las fracciones de Membrana, Citosol y Citoesqueleto.

E.R. (%): Eficiencia relativa en referencia a Me+Cs+Ce.

FIGURA 4. Eficiencia en la obtención de antígenos radiomarcados de trofozoitos de *G. lamblia*.

SOLUBILIZANTE	c.p.m. de $^{125}\text{I}$ x $10^3$ en 5 $\mu\text{l.}$		c.p.m. de $^{125}\text{I}$ x $10^6$ en $50 \times 10^6$ céls.	
	0	10	P-1	WB
Son			3.224	2.952
Son-TX-100			5.529	5.294
Son-NaDOC			4.639	4.661

\*Valores promedio  $\pm$  desviación estándar en 3 experimentos.  
Las abreviaturas son semejantes a las de la Figura 3.

patrón electroforético resuelto en los geles en gradiente (de 10 a 240 Kd). Los geles al 10% tuvieron de manera constante un decremento en la nitidez de las bandas localizadas por debajo de los 40 Kd, y el rango de PM detectado para las proteínas separadas solo abarca de los 10 a los 150 Kd. En la misma Figura se presentan los patrones electroforéticos de extractos totales obtenidos por sonicación y extracción con detergentes. En cuanto a la separación lograda en el gel "B" (gradiente), se demuestra claramente que la adición del agente reductor  $\beta$ -mercaptoetanol no afectó significativamente el corrimiento de las bandas (expresado como R<sub>f</sub>). Aunque en este caso se pudieron observar con mayor intensidad varios componentes minoritarios al emplear la tinción con azul de Coomassie, los datos anteriores permitieron seleccionar los electroforetogramas en gradiente (con  $\beta$ -Mercaptoetanol) como un sistema de análisis idóneo en los siguientes estudios.

Los diversos extractos celulares preparados se compararon directamente a fin de poder detectar diferencias cualitativas (presencia/ausencia de bandas) en los componentes proteínicos de cada extracto. Los perfiles de proteínas solubles mostrados en la Figura 6 indican una gran similitud en sus componentes, en forma independiente del procedimiento que se empleó para prepararlos (con y sin detergente, ya sea con sonicación o congelación-descongelación). En estas condiciones, la complejidad en el perfil proteínico consistió de aproximadamente 52 bandas con PM comprendido entre los 10 y los 240 Kd. Desde el punto de vista cuantitativo (intensidad de las bandas), las principales

diferencias se notaron en las regiones de 116, 51-58 y 40 Kd. Con el empleo de la técnica de sonicación combinada a solubilización con Acido Acético se observaron patrones distintos a los descritos: cualitativamente, se pudieron visualizar hasta 63 proteínas dentro del mismo rango de PM, y cuantitativamente fueron numerosas las bandas individuales que presentaron tinción distinta en intensidad a las bandas presentes en los extractos con detergente. Las diferencias cuantitativas se reflejaron en bandas comprendidas en zonas de PM muy amplias (entre los 19 y los 133 Kd).

A fin de determinar la naturaleza de las macromoléculas solubilizadas por los detergentes y el solvente orgánico, se empleó la tinción PAS. La oxidación mediada por el ácido peryódico ( $\text{HIO}_4$ ) de los grupos glucosilados de las proteínas dentro de la matriz electroforética, seguida de la reducción de los radicales generados con una solución de fucsina-sulfito, proporcionó los perfiles electroforéticos que aparecen en la Figura 7. En estos análisis se observó la presencia de varias glucoproteínas en todos los extractos celulares preparados, las cuales tuvieron una intensidad de tinción variable. El patrón obtenido con detergentes fue más expansivo que aquel resuelto con el uso de ácido acético, esto es, presentó algunas zonas de "barrimiento" que se pueden correlacionar a la presencia de componentes lipídicos densos en el extracto. En estos últimos los componentes de 55 a 58, 40, 31 y 27 Kd se tiñeron fuertemente, mientras que los componentes de 92, 82, 65, 51, 45, 38 y 22 Kd lo hicieron en forma más débil. Al utilizar el solvente orgánico se tiñeron más las bandas de 51, 36, 34, 31, 27 y 22 Kd y

con menor intensidad las proteínas de 82, 65, 55, 45, y 38 Kd. En el caso de algunas las proteínas utilizadas como marcadores de PM (v.gr. BSA de alta pureza y  $\beta$ -lactoglobulina) que no poseen regiones glucosiladas, no se observó tinción mediante esta técnica. Lo anterior indicó la especificidad de la técnica de PAS en el sistema electroforético desarrollado aquí.

Con el fin de determinar la presencia de azúcares "expuestos" en los componentes antigénicos de las 2 cepas de G. lamblia, estos se transfirieron a NCP y se realizaron ensayos de reactividad ante 6 lectinas acopladas a HRP, cuya especificidad era conocida y diferente entre una y otra (ver Material y Métodos). En la Figura 8 se puede observar que solamente la aglutinina de germen de trigo (WGA, con afinidad por residuos de N-acetil-D-Glucosamina) presentó afinidad hacia un número alto (aproximadamente 25) de componentes antigénicos en las cepas P-1 y WB del parásito, y los patrones de reactividad fueron cualitativamente y cuantitativamente semejantes entre ambas cepas. Dentro de los componentes más reactivos se encontraron los de 150, 133, 121, 82, 75, 65, 55, 45, 40 y 27 Kd, mientras que los de 105, 92, 35, 31 y 24 Kd, entre otros, se tiñeron en forma menos intensa. Con las lectinas restantes no se detectó reactividad aun ensayando diluciones de hasta un doble de concentración de la lectina en cuestión.

Otra metodología de gran utilidad en el estudio fue la extracción de componentes subcelulares de trofozoitos de G. lamblia. Las fracciones antigénicas resultantes (denominadas "Membrana", "Citosol" y "Citosqueleto") presentaron un perfil

proteínico relativamente complejo. Sin embargo, éstas fueron enriquecidas considerablemente en ciertos componentes individuales (Figura 9). Dentro de una misma cepa se observaron numerosas diferencias cualitativas y cuantitativas entre las fracciones mencionadas. En las fracciones de "Membrana" la complejidad fue de alrededor de 25 proteínas, en "Citoesqueleto" de unos 30 componentes y en "Citosol" de cerca de 40 proteínas, observándose en la última fracción numerosos componentes minoritarios en la tinción con azul de Coomassie. Del mismo modo, las fracciones de "Citosol" no mostraron la presencia significativa de proteínas con P.M. mayor a 94 Kd. En general, las tres fracciones antigénicas presentaron componentes únicos, aunque se detectaron algunos antígenos comunes en 2 o 3 de las fracciones incluyendo diferencias cuantitativas en ellos.

Con este tipo de análisis, no se pudieron determinar hasta este punto diferencias claras en los perfiles antigénicos totales ni subcelulares de las cepas P-1 y WB comparadas entre sí.

El análisis de antígenos de trofozoitos de G. lamblia se realizó también por medio de marcaje de proteínas de membrana celular externa del parásito con <sup>125</sup>I. En la Figura 10 se ilustran los patrones de radiomarcaje bajo condiciones reductoras y no reductoras. Los perfiles antigénicos fueron prácticamente iguales al utilizar o no detergentes en la solubilización de los componentes marcados con el isótopo. No obstante, el patrón electroforético se modificó significativamente al adicionar el agente β-mercaptoetanol al extracto. Así se observó que el número

de polipéptidos radioiodinables fue bajo (hasta 17 bandas) comprendidas entre los 10 y los 240 kd. de P.M. en condiciones reductoras o no reductoras, aunque en el último caso los componentes de P.M. mayor a 70 kd. se resolvieron en un patrón escalonado. Este perfil pudo ser ocasionado por artefactos relacionados a un desdoblamiento gradual o no completo de una o varias proteínas complejas, por lo cual se observó tal "efecto de escalera". En condiciones reductoras, las proteínas de 150 a 200 Kd (material polidiserso) y 82 Kd se marcaron intensamente, mientras que en los componentes de 63, 55, 35 y 24 Kd la incorporación del isótopo fue menor. Otros polipéptidos con menor incorporación fueron los de 133, 121, 111, 105, 92, 49, 45, 38, 31, 27 y 18 Kd. En ausencia del agente reductor, dentro del patrón de radiomarcaje los componentes de 170 a 200 Kd (material polidiserso) y de 66 a 75 Kd se marcaron intensamente, y los Aqs de 55, 35, 27 y 24 Kd tuvieron incorporación menos intensa que los anteriores, en tanto que los componentes de 63, 45, 40, 31 y 18 Kd se marcaron en forma más débil. En la región de 90 a 170 kd. se detectaron alrededor de 10 bandas separadas uniformemente entre sí y cuya intensidad de marcaje decreció conforme el P.M. era menor. Al comparar los patrones electroforéticos para las cepas P-1 y WB, se pudieron distinguir diferencias cuantitativas importantes en las proteínas de 150-200 (170-200), 51, 45, 40, 27 y 24 Kd implicando condiciones reductoras y no reductoras.

En los estudios de radioinmunoprecipitación descritos posteriormente, se decidió emplear la separación electroforética en

condiciones reductoras en función de los análisis electroforéticos iniciales (basados en tinción con azul de Coomassie) y en la práctica el perfil antigénico presentó bastante reproducibilidad. No obstante, los perfiles obtenidos bajo condiciones no reductoras también presentaron buena resolución, e incluso, se observó que concentraciones de  $\beta$ -mercaptoetanol mayores al 10% v/v con la muestra pueden ocasionar artefactos de barrimiento y dispersión de las bandas de proteína marcadas con  $^{125}\text{I}$  (datos no mostrados).

En virtud de la gran complejidad proteínica de los diferentes extractos solubles totales y con el fin de optimizar la resolución de los mismos, se empleó la técnica de electroforesis bidimensional. En estos ensayos se utilizaron extractos por sonicación y extracción con ácido acético en función de la capacidad solubilizante tan extensiva del solvente orgánico (Fraenkel-Conrat, 1957). En lo referente a la calibración del sistema, el uso de marcadores de los PM fue útil para el ajuste del punto isoelectrico (PI) de los componentes analizados. Los PI de referencia se obtuvieron por consulta bibliográfica (Anderson y Hickman, 1979) y el análisis de regresión mostró que el protocolo de IEF proporcione una curva de calibración de PI aproximada a la expresión  $y = a - bx - cx^2$  ( $a = 7.7$ ,  $b = -7.0$ ,  $c = 3.5$  donde  $x = R_f$ ,  $y = \text{P.I.}$ ) con un nivel de confiabilidad alto ( $r^2 = 99.5\%$ ). Estos datos permitieron determinar el PI de los componentes de interés que aparecen en la Figura 11. En esta se pueden apreciar 4 diferencias cuantitativas importantes cuando se comparan los geles de los antígenos de las cepas P-1 y WB: una fue la detección de un componente de 279 Kd y

5.96 de PI (279-5.96) en la cepa P-1, el cual es casi imperceptible en la cepa WB; observaciones similares correspondieron a las proteínas señaladas como 133-6.66 y 75-6.25. En el caso de la cepa WB existió un conjunto de proteínas de PM alto (entre 170 y 240 Kd) con PI disperso (entre 6.28 y 5.82) que se observaron en menor cantidad en la cepa P-1.

El empleo de este análisis permitió detectar 2 diferencias cualitativas en las cepas: una proteína de 37-6.19 en la cepa P-1 y otra de 30-5.43 en la cepa WB, las cuales fueron exclusivas de la cepa mencionada. El perfil de componentes resueltos en este sistema bidimensional mostro alrededor de 100 proteínas accesibles a la tinción con azul de Coomassie, comprendidas en un rango de pH de 4.5 a 7.7 en función del ajuste estadístico efectuado.

**3.2. Análisis Densitométrico.** El uso de la metodología que involucra la obtención de espectros de absorbencia de cada componente antigenico en una mezcla compleja de ellos, aun en cantidades muy pequeñas, permitió determinar con precisión y reproducibilidad las diferencias en los patrones electroforéticos unidimensionales de las cepas de G. lamblia utilizadas. Incluso, con el ajuste de las amplitudes de lectura fue posible determinar confiablemente la abundancia porcentual de cada banda proteínica dentro del extracto. De esta manera, en la Figura 12 se muestran los perfiles densitométricos para los marcadores de PM (MPM), y los extractos solubles totales empleando sonicación combinada ya sea al uso de triton X-100 (cepa-T) o ácido acético (cepa-A). Se señalan los Ags con mayor abundancia en el pico correspondiente. El patron

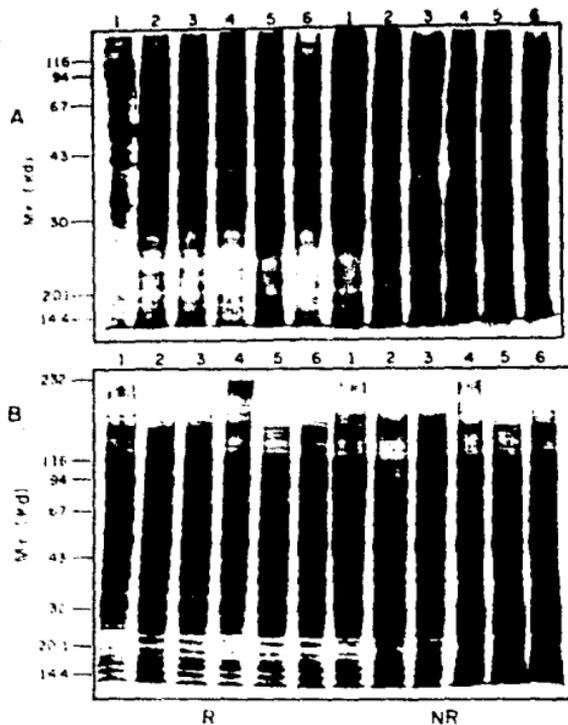


FIGURA 5. Análisis electroforético de de Ags solubles totales de *G. lamblia*. Trofozoitos de la cepa P-1 (carriles 1-3) y WB (carriles 4-6) fueron procesados con la técnica de sonicación y extracción de Ag soluble en ausencia de detergentes (carriles 1 y 4) o con adición de triton X-100 0.5% (carriles 2 y 5) o NaDOC 2% (carriles 3 y 6). Los extractos (90  $\mu$ g./carril) se resolvieron en geles con 10% de acrilamida (gel "A") o en geles con gradiente continuo del 5 al 15% del monómero (gel "B") y se tiñeron con azul de Coomassie. R significa corrimiento en condiciones reductoras (con  $\beta$ -mercaptoetanol al 5% de concentración v/v con las muestras) y NR es el corrimiento en ausencia del agente reductor. La masa relativa (Nr) se expresa en daltones  $\times 10^3$ .

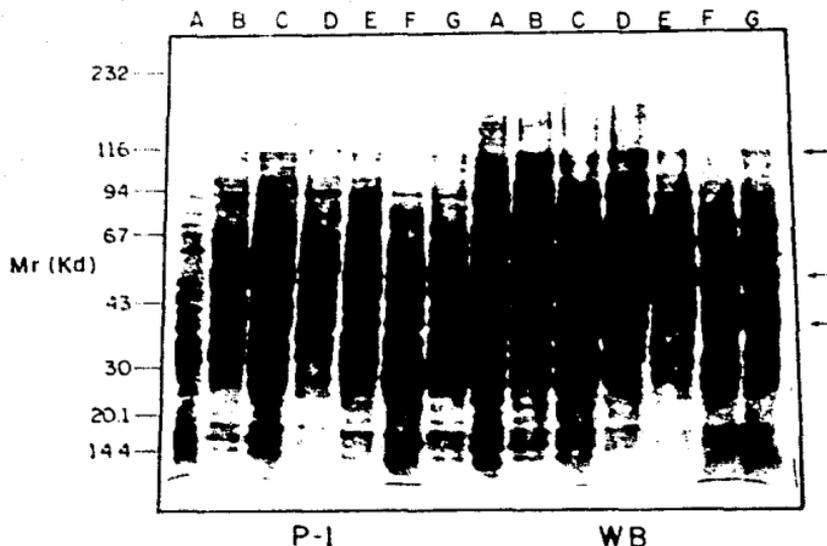
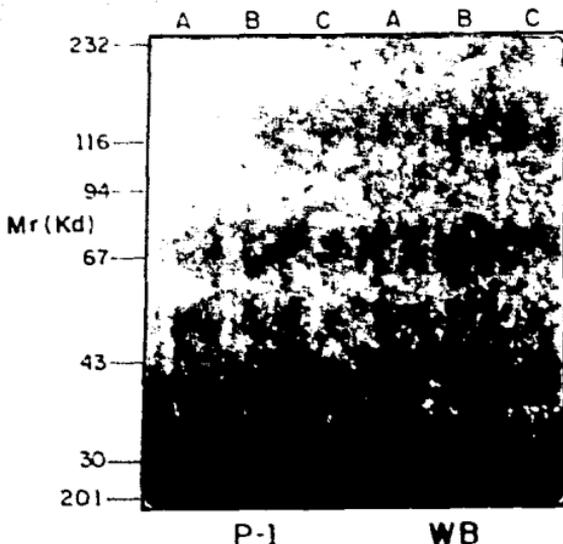
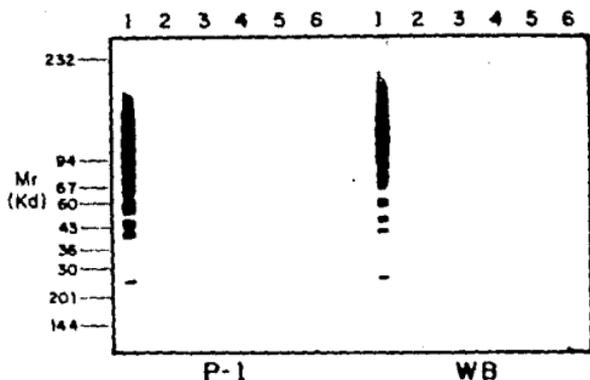


FIGURA 6. Análisis electroforético de Ags solubles totales de G. lamblia obtenidos por diferentes métodos. Las muestras antigénicas se separaron en geles de Poliacrilamida-SDS con gradiente del 5 al 15% del monómero. A cada carril se aplicaron  $\approx 90 \mu\text{g}$ . de proteína y se tiñeron con azul de Coomassie. Se indica en la parte inferior la cepa del parásito y en la parte superior los métodos que involucran sonicación (carriles A-D) o congelación-descongelación (carriles E-G). A, en presencia de ácido acético; B y E, sin agente solubilizante; C y F, con triton X-100 0.5%; D y G, en presencia de NaDOC 2%. Las flechas denotan diferencias cualitativas y cuantitativas entre los extractos. Mr en daltones  $\times 10^{-3}$ .



**FIGURA 7.** Análisis electroforético de glucoproteínas en extractos solubles totales de *G. lamblia*: Tinción PAS. Se procesaron trofozoitos de las cepas P-1 y WB y se corrió el electroforetograma en las condiciones indicadas en la Figura 6. El gel fue teñido por la técnica del ácido peryódico-reactivo de Schiff (tinción PAS). El carril A corresponde al extracto obtenido por sonicación y detergente (triton X-100 o NaDOC), B es el extracto obtenido por congelación-descongelación y detergente y C representa el que se obtuvo por sonicación y ácido acético. Mr en daltones  $\times 10^3$ .



- 1 - Aglutinina de Germen de Trigo (WGA)  $\rightarrow$  N-Acetil-D-Glucosamina  
 2 - Concanavalina A  $\rightarrow$   $\alpha$ -D-Manosa  
 3 - *Ulex europaeus*  $\rightarrow$   $\alpha$ -L-Fucosa  
 4 - *Glycine max*  $\rightarrow$  N-Acetil-D-Galactosamina  
 5 - *Banisteria simplicifolia*  $\rightarrow$   $\alpha$ -D-Galactosa  
 6 - *Arachis hypogaea*  $\rightarrow$   $\beta$ -D-Galactosa

FIGURA 8. Detección de glucoproteínas en extractos solubles totales de trofozoitos de *G. lamblia*: Reactividad ante lectinas. Extractos solubles obtenidos en presencia de detergente (triton X-100 o NADOC) fueron procesados por electroforesis en gradiente de acrilamida (5-15%) y transferidos a NCP. Las tiras de NCP fueron incubadas individualmente con lectinas acopladas a HRP (carriles 1-6) y reveladas de acuerdo a lo indicado en la parte metodológica. La especificidad de azúcares de las lectinas probadas se indica en la parte inferior de la figura, así como la cepa del parásito. Mr en daltones  $\times 10^{-3}$ .

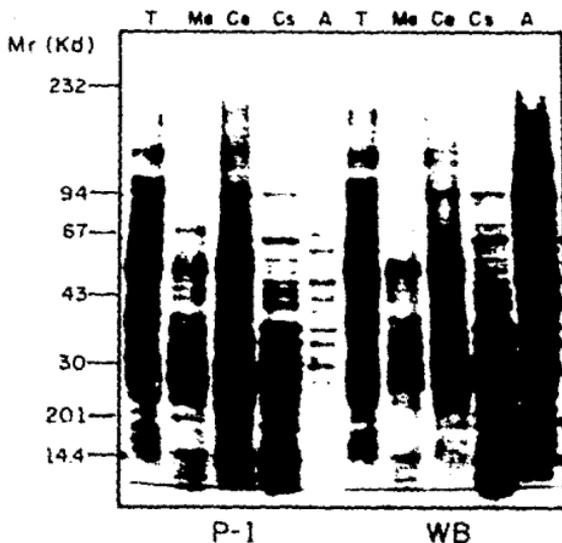


FIGURA 9. Análisis electroforético de extractos subcelulares de *G. lamblia*. Trofozoitos de las cepas P-1 y WB fueron procesados para la obtención de fracciones celulares enriquecidas (ver Material y Métodos) y las preparaciones se analizaron de acuerdo con las condiciones indicadas en la Figura 6. En la parte superior se indican las fracciones de "Membrana" (Me), "Citoesqueleto" (Ce) y "Citosol" (Cs), además de los extractos totales obtenidos con sonicación combinada a solubilización con tritón X-100 (T) o ácido acético (A). Este último se analizó empleando cantidades variables de proteína con la finalidad de poder establecer comparaciones claras con los demás patrones presentados en el electrofretograma. Mr en daltones  $\times 10^{-3}$ .

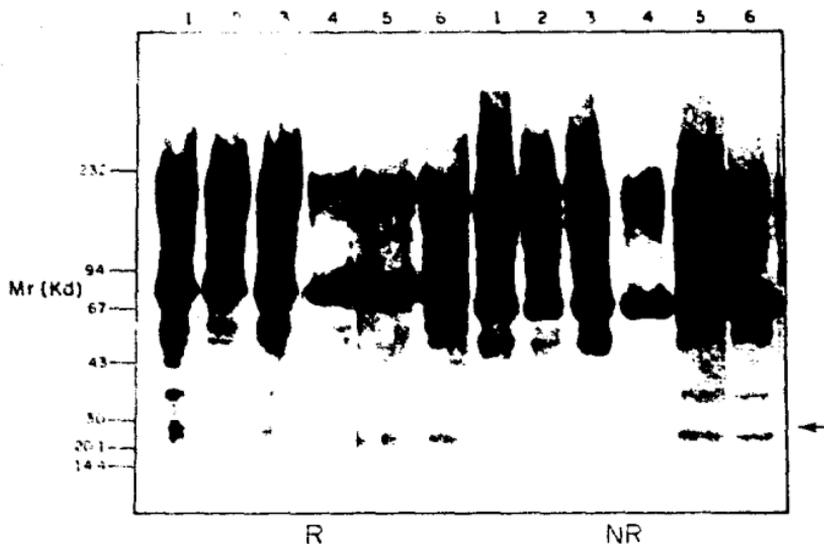


FIGURA 10. Análisis autorradiográfico de Aqs de superficie de trofozoitos de *G. lamblia*. Los parasitos de las cepas P-1 y WB fueron marcados con  $\text{Na}^{125}\text{I}$  por la técnica de Lactoperoxidasa y se procesaron para la obtencion de extractos solubles totales. La electroforesis se realizo en geles de poliacrilamida-SDS con 5 a 15% del monomero, aplicando 100,000 c.p.m. por carril. El gel se tiño, se secó con calor-vacío y se expuso a una placa de autorradiografía durante 120 hrs. Las acotaciones son idénticas a las del gel "B" de la Figura 5. La flecha denota variaciones observadas entre las cepas. Mr en daltones  $\times 10^3$ .

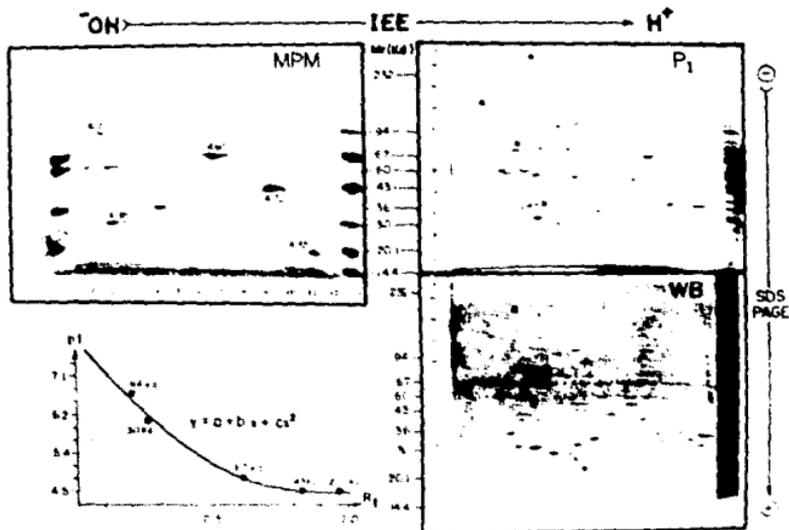


FIGURA 11. Analisis electroforético bidimensional de extractos solubles totales de *G. lamblia*. Trofozoitos de las cepas P-1 y WB fueron procesados por sonicación y solubilización con ácido acético. Aproximadamente 800 µg. de proteína se resolvieron por isoelectroenfoque (IEE) en geles cilindricos y posterior electroforesis en geles planos de poliacrilamida con 5 a 15% del monómero, los cuales fueron teñidos con azul de Coomassie. En el gel para MPM (Marcadores de Peso Molecular) se aplicaron de 5-10 µg. de cada proteína estandar, cuyo punto isoelectrico (PI) de referencia se indica. La grafica ilustra la curva de analisis de regresion de segundo orden para la estimación del PI de las proteínas en las muestras antigenicas. En los geles de cada cepa se indican con \* las proteínas con diferencia cuantitativa importante, y con \*- se marcan las proteínas presentes en sólo una de las cepas. Mr en daltones  $\times 10^3$ .

de MPM demostro la buena capacidad de resoluci3n de la t3cnica al obtenerse picos definidos y separados para diferentes bandas, asi como la correlacion que hubo entre la intensidad de la banda con la altura del pico de absorbencia. Los densitogramas para los patrones electroforeticos de una misma cepa mostraron diferencias notables entre los perfiles de antigenos solubilizados con triti3n X-100 y acido ac3tico, ademias de la presencia de un mayor n3mero de picos en los espectros para extractos con el solvente org3nico. Los patrones de densitometria empleando el detergente fueron relativamente semejantes en las dos cepas, donde los componentes de 55-58 Kd fueron los m3s abundantes (aproximadamente un 18% de la prote3na total) seguidos por otros de 40 Kd ( $\approx 7.5\%$ ), 38 Kd ( $\approx 5\%$ ) y 33 Kd ( $\approx 8\%$ ). Ademias de los anteriores, los picos de 94, 65 y 43 Kd tambien fueron prominentes en ambas cepas. Los patrones de absorbencia para los extractos con acido ac3tico mostraron diferencias notables entre las cepas desde el punto de vista cuantitativo; solamente los picos de los componentes de 58, 45, 36 y 33 Kd se presentaron con alta abundancia en las cepas P-1 y WB, aunque la cantidad relativa de cada uno de estos cuatro Ags vari3 significativamente entre las cepas.

La realizacion de este tipo de an3lisis para los perfiles de componentes subcelulares aport3 datos que sugirieron la existencia de diferencias antigenicas cuantitativas en trofozoitos de las cepas P-1 y WB (Figura 13). Los patrones de absorbencia para las fracciones de "Membrana" (cepa-Me), "Citoesqueleto" (cepa-Ce) y "Citosol" (cepa-Cs) evidenciaron una gran variabilidad cualitativa

y cuantitativa entre estas fracciones dentro de una misma cepa, e incluso entre una misma fracción comparando cuantitativamente los patrones para las dos cepas. Dentro de las fracciones de "Membrana" se encontraron enriquecidos principalmente los componentes de 55 Kd ( $\approx 19\%$  en WB y  $\approx 13\%$  en P-1), 33 Kd ( $\approx 7\%$  en WB y  $\approx 10\%$  en P-1), 27 Kd ( $\approx 6\%$  en WB y  $\approx 10\%$  en P-1) y 35 Kd ( $\approx 5\%$  en WB y P-1) entre otros indicados en la misma Figura 13. Los componentes de 75 y 45 Kd presentaron diferencias cuantitativas relevantes en ambas cepas. En las fracciones de "Citoesqueleto" se enriquecieron especialmente los antígenos de 58 Kd ( $\approx 16\%$  en WB y  $\approx 13\%$  en P-1) y 33 Kd ( $\approx 11\%$  en WB y  $\approx 10\%$  en P-1), mientras que los demás componentes se conservaron en relación a su cantidad relativa dentro del complejo antigenico. Al analizar los espectros de las fracciones de "Citosol", se observó una mayor homogeneidad en ellos para las dos cepas analizadas. En estos predominaron varios componentes con PM menor a 40 Kd, los cuales representaron cerca del 55% del total proteínico de dichos extractos.

Con la finalidad de caracterizar en forma densitométrica los antígenos de G. lamblia accesibles al marcaje de membrana externa con  $^{125}\text{I}$ , se utilizaron los extractos separados en condiciones reductoras por razones explicadas previamente. En la Figura 14 se presentan los resultados, y en éstos se observó que el material polidisperso de 150-200 Kd estuvo presente en cantidad significativamente más baja en la cepa WB con relación a la cepa P-1 ( $\approx 33\%$  en WB contra  $\approx 50\%$  en la cepa P-1, expresado como el porcentaje de material radioiodinado). La banda de 82 Kd fue

cuantitativamente importante en ambas cepas ( $\approx 30\%$  en WB y  $\approx 25\%$  en P-1 como material radiomarcado). Desde el punto de vista cuantitativo, los demás componentes se presentaron en cantidad semejante en ambas cepas, con excepción del Ag de 27 Kd el cual tuvo mayor incorporación en la cepa P-1 que en la cepa WB.

**4. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIGENICA DE LOS EXTRACTOS SOLUBLES DE *G. lamblia*.** Una vez identificados y caracterizados los perfiles proteínicos en los extractos solubles totales y subcelulares, se confrontaron con sueros representativos obtenidos de animales experimentales y de pacientes con giardiasis determinada clínicamente. Estas muestras séricas fueron obtenidas de: a) conejo raza Nueva Zelanda, el cual fue inmunizado por vía parenteral con trofozoitos completos de la cepa P-1; b) jerbos mongólicos, los cuales fueron infectados por vía oral con trofozoitos viables de la cepa P-1, y c) humanos que presentaron giardiasis caracterizada clínicamente. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Figura 15 y corresponden al empleo de la técnica de ELISA, reportándose los valores de  $A_{402}$  registrados cuando se utilizaron extractos solubles de la cepa P-1. Cabe señalar que para extractos de la cepa WB se tuvieron lecturas semejantes (datos no mostrados) y éstas fueron reproducibles. El suero de conejo inmunizado (SIC, gráfica A) presentó alta reactividad con todos los extractos antigénicos, especialmente con aquel de la fracción de "Citosol" y en proporción menor con el de sonicación + ácido acético. El suero de conejo normal (SNC) y el

suero de jerbo normal (SNG) mostraron baja reactividad. En el caso de los sueros de jerbos infectados experimentalmente, las muestras obtenidas a los 17 días post-desafío (SIG<sub>1</sub>) tuvieron buena reactividad con las fracciones de "Membrana" y "Citosol". En tanto, con las muestras séricas obtenidas de los jerbos 53 días tras el desafío (SIG<sub>2</sub>), los extractos totales por sonicación + detergente (ya sea triton X-100 o NaDOC) y sonicación sin solubilizante dieron lecturas más altas que el resto de las preparaciones. Los resultados utilizando sueros de pacientes indicaron una mayor variabilidad en la actividad antigénica de los extractos, así como en los niveles de Igs circulantes en pacientes sintomáticos o asintomáticos (Figura 15, gráfica B). Sin embargo, con los extractos de Ags totales obtenidos con sonicación + detergente se observaron consistentemente lecturas altas en comparación con los demás preparados antigenicos, mientras que los extractos de sonicación + ácido acético proporcionaron lecturas más bajas con respecto a aquellos obtenidos con detergente. Entre los preparados subcutáneos se tuvieron mejores resultados empleando la fracción "Membrana", seguida de la fracción "Citosol".

Los resultados descritos sugirieron la conveniencia del uso de extractos solubles totales por sonicación + detergente para el desarrollo de los ensayos serológicos presentados posteriormente.

5. VALORACION LONGITUDINAL DE LA INFECCION DE JERBOS MONGOLICOS CON TROFOZOITOS DE G. lamblia. Como primera etapa dentro del estudio del modelo animal en giardiasis, fue preciso establecer

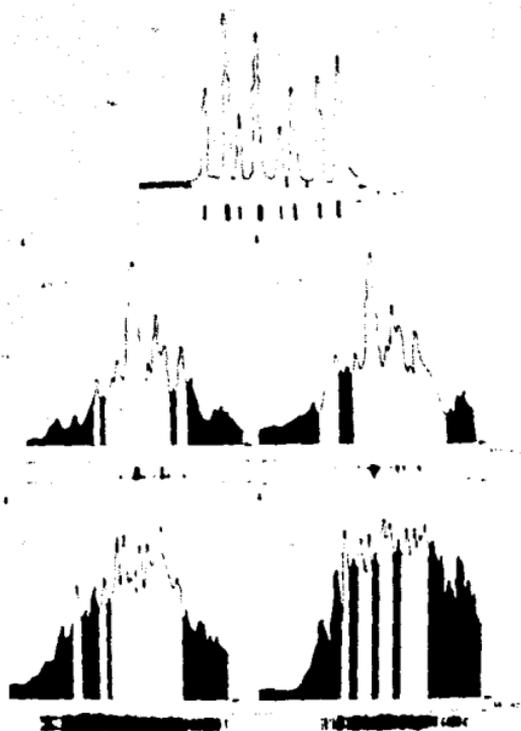


FIGURA 12. Análisis densitométrico de extractos solubles totales de trofozoitos de *G. lamblia*. Los extractos solubles se separaron electroforéticamente como se indicó en la Figura 9. Se representan en zonas claras los principales picos de absorbencia y el PM de los componentes correspondientes de las cepas P-1 y WB. MPM, Marcadores de Peso Molecular; A, extracto obtenido por sonicación + ácido acético; T, extracto obtenido con tritón X-100. Mr en daltones  $\times 10^3$ .

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

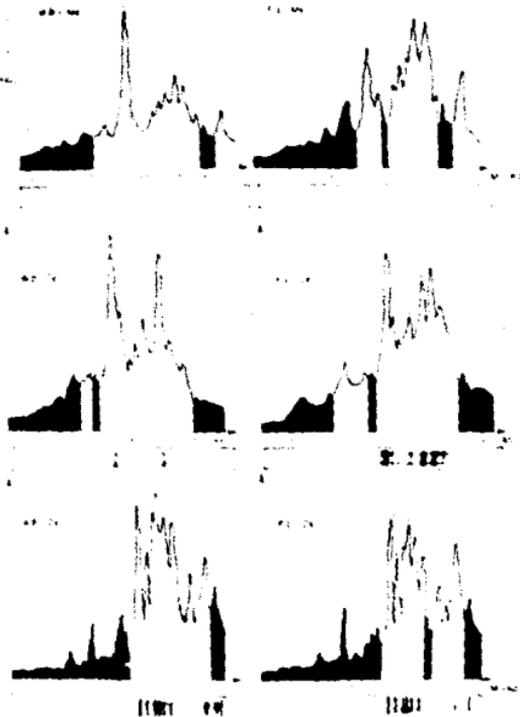


FIGURA 13. Análisis densitométrico de extractos subcelulares de trofozoitos de *G. lamblia*. Los extractos solubles se separaron electroforéticamente como se indicó en la Figura 9. Las zonas claras corresponden a los picos de absorbencia y los componentes respectivos cuyo PM se indica para las cepas P-1 y WB. M<sub>o</sub>, fracción de "Membrana"; C<sub>e</sub>, fracción de "Citoesqueleto"; C<sub>o</sub>, fracción de "Citosol". Mr en daltones x 10<sup>-3</sup>.

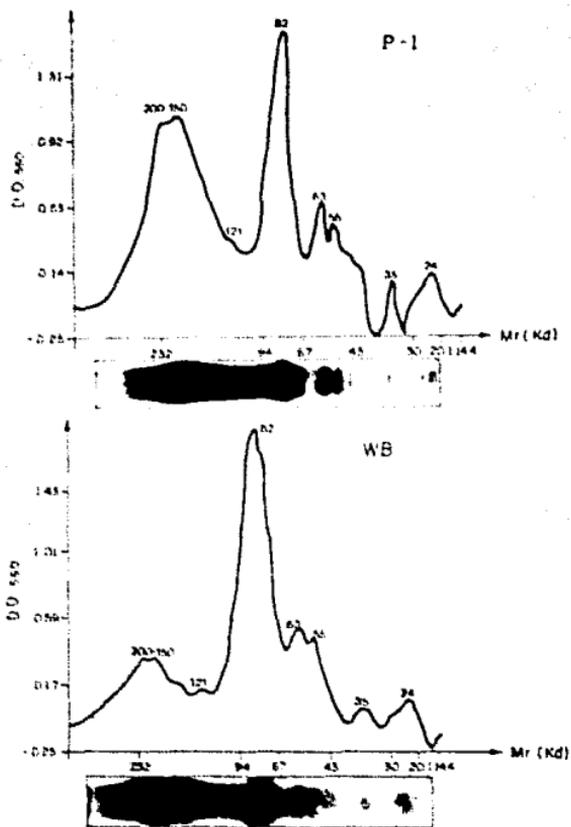
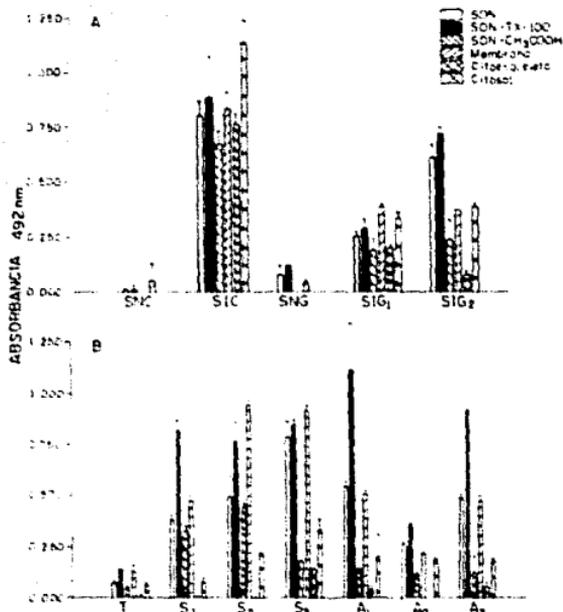


FIGURA 14. Analisis densitometrico de Ags de superficie de *G. lamblia*. Trofozoitos de las cepas P-1 y WB se marcaron con  $\text{Na}^{125}\text{I}$  por la tecnica de lactoperoxidasa y se analizaron autoradiograficamente despues de su separacion electroforética (Ver Figura 10). En los perfiles se denotan los picos de absorcion con el Mr de los componentes correspondientes. Mr en daltones  $\times 10^{-3}$ .



**FIGURA 15. Evaluación inmunoenzimática de la actividad antigénica de extractos solubles totales y subcelulares de trofozoitos de *G. lamblia*.** Los ensayos de ELISA se realizaron utilizando diferentes extractos ya sea totales (SON=Sonicación sin solubilizante; SON-TX-100=Sonicación + tritón X-100; SON-CH<sub>3</sub>COOH=Sonicación + ácido acético) o subcelulares (fracciones de Membrana, Citoesqueleto y Citosol) obtenidos de trofozoitos de la cepa P-1. En la gráfica "A" se presentan las D.O. promedio de determinaciones por octuplicado para sueros de conejo normal (SNC), suero de conejo inmunizado con varias dosis de  $500 \times 10^3$  trofozoitos completos (SIC, ver el apartado 10.A. de Material y Métodos), y de sueros de jerbos mongólicos infectados con trofozoitos viables por vía intragástrica los cuales se colectaron a los 17 (SIG<sub>1</sub>) y 53 (SIG<sub>2</sub>) días post-infección. En la gráfica "B" aparecen las lecturas para sueros obtenidos en un paciente testigo (T), así como de aquellos con giardiasis sintomática (S<sub>1,2,3</sub>) y asintomática (A<sub>1,2,3</sub>). Las preparaciones antigénicas se acoplaron en una concentración de 10 µg./ml. y las diluciones de sueros y conjugados a HRP se indican en el texto (apartado 6).

un estado de infección experimental en jerbos mongólicos empleando trofozoitos de las 2 cepas provenientes de cultivos axénicos. Para corroborar este efecto en los animales, se recurrió a la determinación de los niveles de expulsión de quistes en heces en periodos de tiempo definidos (cada 3 días) hasta que dicha eliminación cesara. Para ello fue necesario seleccionar las condiciones metodológicas más adecuadas que permitieran evaluar confiablemente el modelo en estudio, tanto como determinar características de importancia en el mismo.

En los experimentos iniciales de infección se pudo verificar la alta susceptibilidad de los jerbos ante la dosis infectante que se les administró oralmente ( $1 \times 10^6$  trofozoitos). Se utilizaron 5 grupos de 5 jerbos singénicos cada uno, 2 de los cuales fueron de animales hembra y los 3 restantes fueron de animales machos. El monitoreo de los niveles de expulsión de quistes se hizo mediante la técnica de flotación en sulfato de Zinc (Faust) y los puntos ilustrados en la Figura 16 representan los valores promedio de las cuantificaciones hechas en los 5 animales de cada grupo. Los 5 animales control no expulsaron quistes a lo largo de los 48 días que duró el monitoreo. En general, los quistes se comenzaron a detectar en las muestras fecales entre los días 6 y 9 post-infección, y entre los días 15 y 21 se tuvieron los niveles mayores de expulsión con ambas cepas del parásito. Esta cedió hacia los 39-42 días en todos los animales infectados. Otro aspecto importante fue el hecho de que los animales machos expulsaron concentraciones promedio de quistes consistentemente más altas que los animales

hembra. Asimismo, se observó que el número de quistes en heces fue constantemente mayor para animales infectados con la cepa WB, particularmente en los días con niveles de expulsión mayor.

De manera colateral, se implementó la técnica que se basa en un soporte de sacarosa 0.85M a fin de determinar si existía así mayor confiabilidad en la determinación de la concentración de quistes en muestras fecales de jerbos infectados (ver Material y Metodos). El empleo de esta metodología permitió obtener datos estadísticamente válidos y ajustables, e incluso, la eficiencia de recuperación de quistes en este caso se mejoró en forma considerable (Figura 17). En los resultados mostrados en dicha Figura se manejaron jerbos machos retados con la misma dosis infectante y los datos se expresan en términos tanto de cantidades totales de quistes expulsados (gráfica A), como la concentración de los mismos por cada gramo de muestra fecal (gráfica B). En algunos animales, la expulsión de quistes se detectó a partir del día 6 post-infección y al día 9 prácticamente todos los animales expulsaron quistes, con lo cual se consideró establecida la infección. El período de prepatencia (o de latencia) osciló así entre los 6 y los 9 días, y en la gráfica B se muestra que los picos de concentración de quistes expulsados por gramo de heces se detectaron entre la segunda y tercera semanas post-infección con las dos cepas. Prácticamente todos los animales resolvieron la infección. En algunos casos la expulsión de quistes cesó a los 30-33 días, y no fue sino hasta los 39-42 días cuando ninguno de los jerbos presentó quistes en sus muestras fecales. El período de

patencia determinado en esta forma oscilo entre 21 y 36 días. Resulto notable el hecho de que la concentración de quistes en las heces de los animales infectados con la cepa WB fue constantemente mayor que la registrada en los jerbos infectados con la cepa P-1. Estadísticamente, el análisis de varianza indicó que para este experimento (un diseño en bloques completos azarizados) las variaciones en los niveles de expulsión de quistes no fueron funcion estricta de la cepa infectante; pero sí influyó el día post-infección en el cual se realizó la coproparasitoscopia ( $\alpha=0.05$ ). Por consiguiente, los jerbos expulsaron quistes con un patron cuantitativamente heterogeneo a lo largo la infección (i.e. los periodos-pico de expulsion son reales). Como dato adicional, los animales infectados con la cepa P-1 expulsaron un promedio aproximado de 1800 quistes por cada gramo de heces en un lapso de 2 hrs., mientras que aquellos infectados con la cepa WB arrojaron aproximadamente 2800 quistes por cada gramo de heces en el mismo lapso de tiempo.

El patron de expulsión de quistes en cada animal infectado tuvo una característica importante, es decir, dicha eliminación se hizo de manera intermitente. Este tipo de comportamiento se muestra en los perfiles que aparecen en la Figura 18, en la cual se puede observar que los jerbos infectados con cualquiera de las cepas no expulsaron quistes durante el tiempo de colección en 2 o más de los días seleccionados para el monitoreo.

Con respecto a la determinación del peso corporal para los jerbos infectados y controles, se hicieron determinaciones cada 3

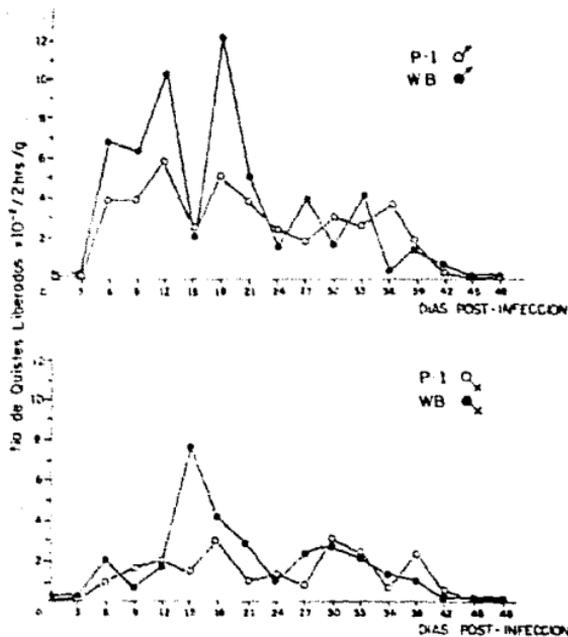
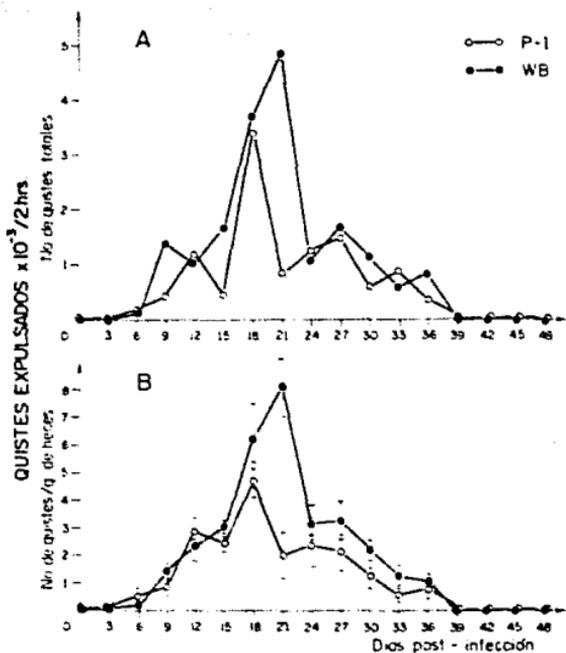


FIGURA 16. Patrones de expulsión de quistes de *G. lamblia* en jerbos mongólicos (machos y hembras) infectados experimentalmente. Animales singénicos fueron infectados con  $1 \times 10^6$  trofozoitos viables por os de las cepas P-1 y WB por vía intragástrica. El monitoreo de la expulsión de quistes en heces se hizo mediante la técnica de flotación en sulfato de zinc. En cada animal se determinó el número de quistes expulsados por gramo de muestra fecal, y los puntos representan el promedio para grupos de 5 jerbos.



**FIGURA 17.** Patrones de expulsión de quistes (por número y concentración) en heces de jerbos mongólicos infectados con trofozoitos de *G. lamblia*. Grupos de 5 animales singénicos, machos, se infectaron con  $1 \times 10^6$  trofozoitos viables per os de las cepas P-1 y WB por vía intragástrica. El monitoreo de la expulsión de quistes en heces se hizo mediante la técnica del soporte de sacarosa 0.85M. En cada animal se determinó el número de quistes expulsados tanto en cantidad total (gráfica A) como por gramo de muestra fecal (gráfica B) en un lapso de 2 hrs. Los puntos representan la media  $\pm$  desviación estandar de cada grupo.

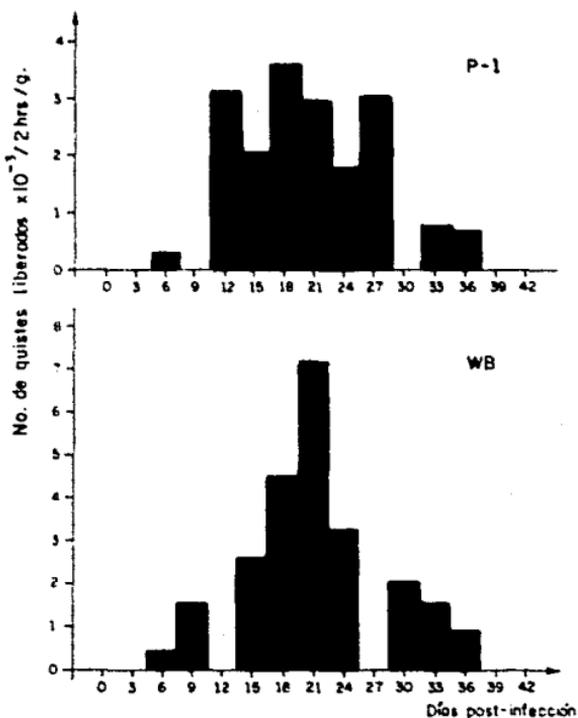


FIGURA 18. Patrones individuales representativos de expulsión de quistes de *G. lamblia* por jerbos mongólicos infectados experimentalmente. Los animales fueron infectados con trofozoitos y se realizó el monitoreo en muestras fecales de acuerdo a lo indicado en la Fig. 17-B. En cada gráfica se indica la cepa inyectante del parásito.

días post-infección hasta la resolución de esta. No se observaron diferencias significativas en el promedio de peso ganado por los dos grupos de animales (datos no mostrados).

6. OBTENCION Y TITULACION DEL CONJUGADO DE Igs DE CONEJO ANTI-Igs DE JERBO MONGOLICO ACOPLADAS A HRP. El procedimiento descrito en la parte metodológica permitió la obtención de un conjugado con buena actividad en los ensayos serológicos en que se empleó, y su reactividad fue solo ligeramente menor a la de los preparados comerciales contra especies como humano, ratón o conejo. Después de precipitar las Igs de gerbils e inocularlas en el conejo para obtener Igs contra ellas, se verificó que los antisueros tuvieron un buen título en la prueba de doble inmunodifusión (1:1000) para finalmente precipitar las Igs del conejo y acoplarlas a HRP sin problemas técnicos considerables. Se evaluó la reactividad del preparado con ensayos de ELISA inicialmente, empleando diferentes diluciones de Ag soluble, de suero de jerbos y del propio conjugado. Los resultados de la estandarización de esta técnica fueron los siguientes: el Ag soluble acoplado en concentración de 10  $\mu\text{g./ml.}$ , suero de jerbos diluido 1:100 y el conjugado diluido 1:1000. En tales condiciones, los fondos de reactividad (sueros control) fueron generalmente bajos y las lecturas para los sueros de infección fueron significativamente mayores. Para su uso en la técnica de IET las condiciones óptimas fueron: Ag soluble transferido en concentración de 120  $\mu\text{g./cm.}$  de ancho del pozo, suero de jerbo diluido 1:30 y el conjugado diluido 1:800. Los

conjugados a HRP adquiridos comercialmente se manejaron en las condiciones que siguen: a) Igs de cabra anti-Igs de humano diluidas 1:1000 (en ELISA e IET) con suero diluido 1:100 (ELISA) o 1:30 (IET), y b) Igs de cabra anti-Igs de conejo 1:2000 (ELISA e IET) con suero diluido 1:800 (ELISA) o 1:250 (IET).

**7. DETECCION DE Igs CIRCULANTES Y DE RECONOCIMIENTO ANTIGENICO DURANTE LA GIARDIASIS EXPERIMENTAL.** Con el objeto de determinar si la infección experimental de jerbos mongolicos utilizando trofozoitos viables de G. lamblia inducia la aparición de Igs circulantes contra el parásito, se efectuaron ensayos de ELISA en función de su extrema sensibilidad. En la Figura 19 se presentan los resultados de las D.O. promedio para los grupos infectados con cepa P-1 y WB  $\pm$  desviacion estandar en periodos semanales. Se apreció que los niveles de Igs séricas totales (IgG+IgA+IgM) contra Ags solubles de trofozoitos se comenzaron a detectar en la primera semana post-infección, y conforme la infección progresó éstos aumentaron en los animales infectados con P-1 y WB. Dicha tendencia permaneció al menos hasta los 53 dias tras la infección (D.O.>0.6) y los patrones de seguimiento longitudinal de Igs circulantes fueron semejantes para las dos cepas infectantes. Los jerbos control (inoculados con PBS) no presentaron niveles significativos de Igs anti-G. lamblia a lo largo del periodo de observación. Cuando se compararon los datos de este seguimiento con los patrones de expulsión de quistes (Figura 20) se apreció que, para la infección con ambas cepas, los niveles de Igs circulantes siguieron

un patrón ascendente sin depender del curso de la infección, ya sea en su etapa de patencia o de resolución, o inmediatamente posterior a ella.

Los ensayos de IET permitieron identificar los Ags del parásito que fueron reconocidos por las Igs en muestras séricas de los jerbos infectados. En ninguno de los animales control se detectó reactividad durante todo el período de seguimiento. Sin embargo, en las muestras de suero de animales infectados se observó reactividad hacia algunos Ags. El patrón cinético representativo de tal reconocimiento se muestra en la Figura 21. La respuesta de los jerbos reveló patrones de reconocimiento complejos, cualitativamente y cuantitativamente diferentes en P-1 y WB. En los animales infectados con la cepa P-1, se detectaron a partir de la primera semana post-infección los componentes de  $\approx 150-180$ , 121, 65, 45 y 40 Kd; hacia el día 53 se reconocieron otros componentes de 133, 94, 92, 82, 70, 38, 33, 31 y 27 Kd en forma menos intensa, con excepción del primero. Los Ags de 124, 110-115 (tripleto) y 82 kd. fueron reconocidos; pero con menor intensidad. Por su parte, los patrones de reconocimiento con la cepa WB presentaron mayor complejidad, ya que se detectaron numerosos componentes por encima de los 80 Kd, resaltando entre ellos los de  $\approx 150-180$ , 133 y 121 Kd. En la primera semana después de la inoculación se pudieron revelar Ags de 82 (doblete), 65 y 40 Kd hasta que en el día 53, además de estos componentes se identificaron, entre otros, los de 70, 63, 38 y 35 Kd con menor intensidad. En resumen, en los sueros de jerbos infectados con la cepa P-1 se determinó reconocimiento de hasta 20

Ags, mientras que con los sueros de animales infectados con la cepa WB se detectaron cerca de 30 Ags por medio de este ensayo.

Siguiendo el mismo sistema; pero utilizando ahora los extractos solubles de radiomarcaje de superficie del parásito en ensayos de IPP, se comprobó que el número de componentes reconocidos fue más limitado que con el ensayo anterior. La estandarización de la técnica requirió el empleo de condiciones de alta astringencia ( $T_m = 4^\circ C$  y varios lavados de complejos terciarios como se indicó en Material y Metodos), de tal forma que los patrones cinéticos representativos de reconocimiento antigénico fuesen adecuados, lo cual se ilustra en los autorradiogramas de la Figura 22. En el grupo de animales control prácticamente no hubo reactividad en el período de análisis. Por otra parte, a lo largo de la infección con las cepas P-1 y WB la banda de 82 Kd fue el componente radioiodinado reconocido con mayor intensidad, y desde períodos tempranos (17 días post-infección) se comenzaron a detectar otros polipéptidos, especialmente uno de 55 Kd. En los jerbos infectados con la cepa WB se pudieron observar, hacia los 53 días post-infección, los componentes de 63, 35 y 150 a 200 Kd.

**8. DETECCIÓN DE Igs CIRCULANTES Y DE RECONOCIMIENTO ANTIGENICO EN GIARDIASIS CLINICA.** Con el objeto de identificar los componentes de trofozoitos de *G. lamblia* reconocidos por sueros de pacientes con giardiasis clínica, se emplearon los ensayos de ELISA, de IET y de IPP. En estos se utilizaron muestras séricas de pacientes sintomáticos e individuos asintomáticos de edad pediátrica

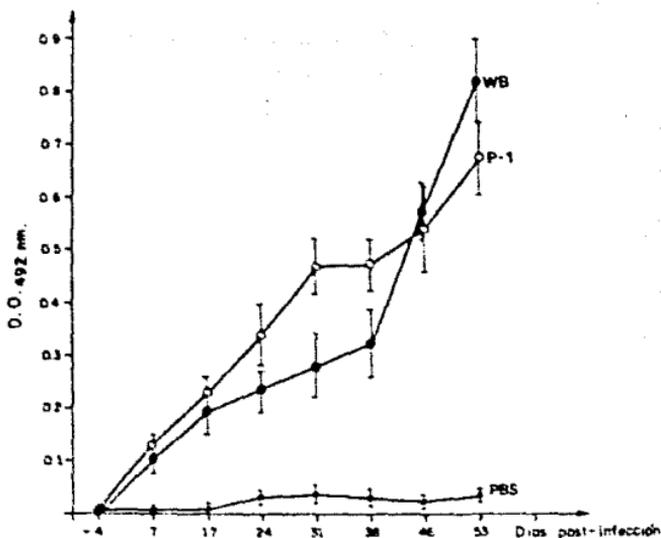


FIGURA 19. Patrones de detección inmunoensimática de Igs circulantes anti-*G. lamblia* en jerbos mongólicos infectados experimentalmente. Los animales se infectaron con trofozoitos de las cepas P-1 y WB siguiendo el protocolo mencionado en la Fig. 16. El monitoreo de los niveles de Igs séricas (IgG+IgA+IgM) en los jerbos contra Ags solubles totales del parásito se realizó con una técnica indirecta de ELISA (ver Material y Métodos). Cada punto representa la media  $\pm$  desviación estándar de las lecturas para grupos de 5 animales. Se indica en cada curva la cepa del parásito infectante, o bien el diluyente (PBS) inoculado en los animales control. Las condiciones estandarizadas del ensayo se mencionan en el texto (apartado 6).

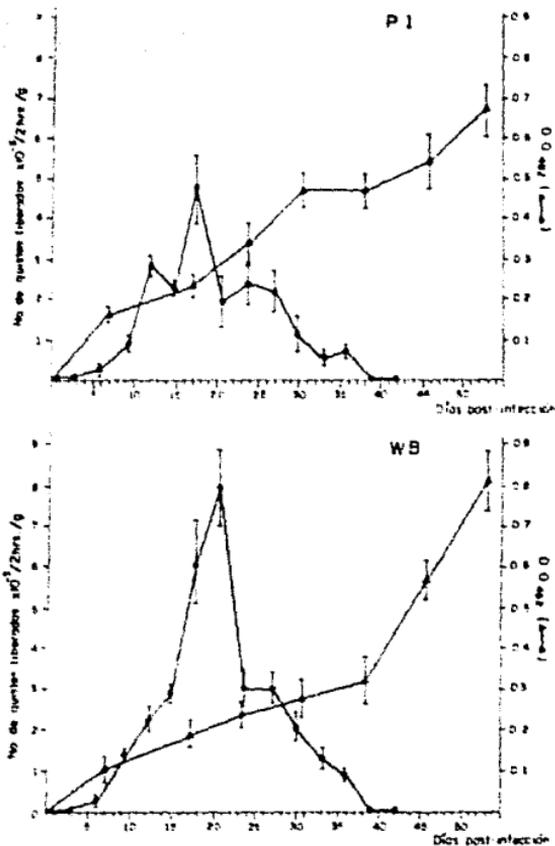
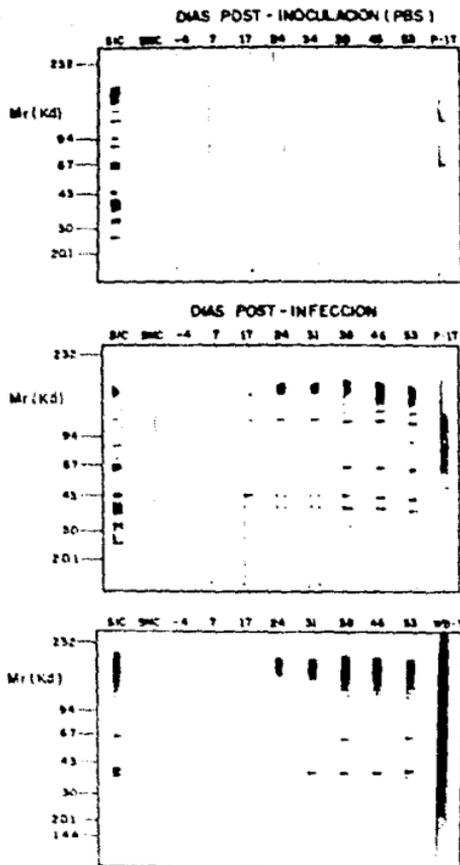


FIGURA 20. Patrones de expulsión de quistes y de detección de Igs circulantes anti-*G. lamblia* en jerbos mongólicos infectados experimentalmente. Los datos presentados corresponden a una combinación de aquellos descritos en las Figs. 17 y 19. En cada gráfica se indica la cepa del parásito, y los puntos representan la media  $\pm$  desviación estándar para grupos de 5 animales.



**FIGURA 21.** Patrones individuales representativos de reconocimiento antigénico en jirbos mongólicos infectados con *G. lamblia*. Análisis por IET. Los animales se infectaron con trofozoitos viables de las cepas P-1 y WB como se indica en la Figura 17. Las muestras séricas se confrontaron con Ag soluble total de *G. lamblia* transferido a papel de Nitrocelulosa (NCP). Las tiras de P-1T y WB-T son los extractos separados electroforéticamente, transferidos a NCP y teñidos con tinta india. Las condiciones estandarizadas del ensayo se mencionan en el texto (apartado 6). SIC=suero de conejo inmunizado, SNC=suero de conejo normal. Mr en daltones  $\times 10^{-3}$ .

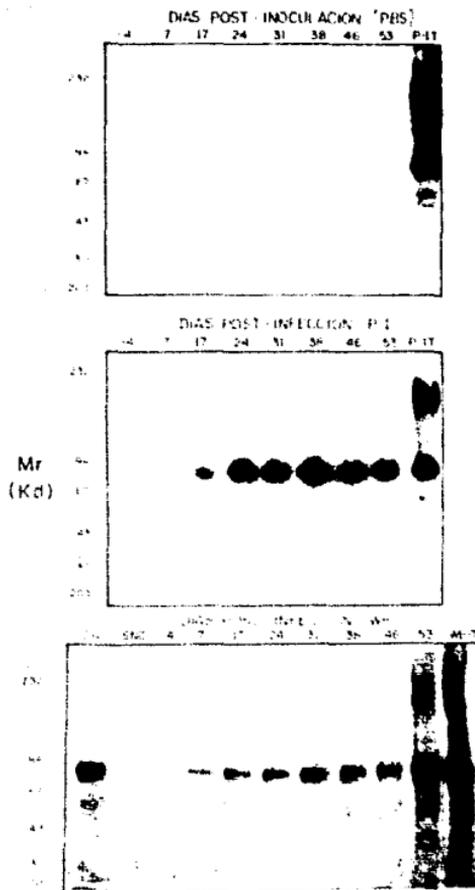


FIGURA 22. Patrones individuales representativos de reconocimiento de Aqs de superficie de *G. lamblia* por jerbos mongólicos infectados experimentalmente. La infección de los animales se realizó de acuerdo a lo descrito en la Figura 17. Las muestras séricas se emplearon para inmunoprecipitar Aqs de superficie de trofozoitos marcados con  $\text{Na}^{22}\text{I}$ . Los complejos Ag-Ig se analizaron en gels de SDS-PAGE y posteriormente por autorradiografía. P-IT y WB-T son los perfiles totales de Aqs radiomarcados de superficie de la cepa del parásito infectante. SIC=suero de conejo inmunizado, SNC=suero de conejo normal. Mr en daltones  $\times 10^{-3}$ .

obtenidas en un estudio transversal. En este caso se confrontó cada suero individual con Ags de las dos cepas del parásito.

En primer término, los niveles de Igs séricas totales (IgG-IgA+IgM) anti-*G. lamblia* fueron determinados mediante la técnica de ELISA. Los resultados indicaron que, al emplear extractos solubles totales de trofozoitos como Ag, las muestras de pacientes testigo (panel "T", Figura 23) presentaron reactividad relativamente baja contra los Ags de ambas cepas del parásito (D.O. =  $0.056 \pm 0.03$ ). Asimismo, en 32 casos de giardiasis ya sea sintomática (panel "S") o asintomática (panel "As"), los niveles de Igs fueron consistentemente mayores a los obtenidos en las muestras testigo (D.O. de 0.2 a 0.9), a excepción de 9 casos en los que los valores de D.O. estuvieron cercanos a los testigos (D.O. de 0.1 a 0.2). En general, las muestras individuales mostraron reactividad semejante contra Ags de cualquiera de las cepas empleadas.

En relación al análisis por IET, en la Figura 24 aparecen resultados representativos. Los sueros testigo no tuvieron reactividad contra Ags del parásito (solamente 2 de 6 tuvieron un reconocimiento apenas detectable). Respecto a las muestras de pacientes con giardiasis, se observó una reactividad variable contra Ags de las dos cepas, lo cual fue independiente del curso de la infección (sintomática o asintomática), aunque los sueros individuales tuvieron algunas diferencias cuantitativas y cualitativas de reconocimiento antigénico a las cepas P-1 y WB. Hasta cerca de 30 componentes del parásito fueron reconocidos por los sueros. De manera global, los Ags de la cepa P-1 reconocidos

más frecuentemente fueron aquellos de 133, 92, 82, 55, 51, 49, 45 y 38 Kd. Otros de  $\approx$ 155-174 (trípLETE), 65, 63, 40, 35, 31 y 24 Kd fueron reconocidos con menor frecuencia (Figura 24-A). Los Ags de la cepa WB más reconocidos fueron los de 148, 133, 92, 65, 55 y 40 Kd y en menor frecuencia los de 174, 82, 63, 45, 35, 33 y 31 Kd (Figura 24-B).

Por otra parte, en la Figura 25 se presentan los autorradiogramas con los patrones de reconocimiento con 10 muestras representativas ante los Ags de membrana celular externa de G. lamblia marcados con  $^{125}$ I. En este caso el perfil de reactividad fue muy homogéneo: en la cepa P-1 (Figura 25-A) predominaron los componentes de 82, 63, 55 y 35 Kd, en tanto que para la cepa WB los más reconocidos fueron los de 82 y 55 Kd. (Figura 25-B). En los ensayos descritos, las muestras testigo no presentaron reactividad alguna contra los Ags radiomarcados.

Finalmente, con base en los resultados del presente estudio y de otros previamente reportados, se hizo un resumen acerca de los Ags de G. lamblia con posible relevancia desde los puntos de vista experimental, clínico y epidemiológico (Tabla 3). Cabe indicar que estos componentes han sido identificados en estados de infección, ya que existen numerosos estudios que emplearon estados de inmunización experimental (revisados por den Hollander y Befus, 1988). Asimismo, dichos Ags no fueron los únicos que se detectaron; pero sí los que se observaron con mayor reactividad y frecuencia en los ensayos serológicos, además de que las cepas analizadas los compartieron.

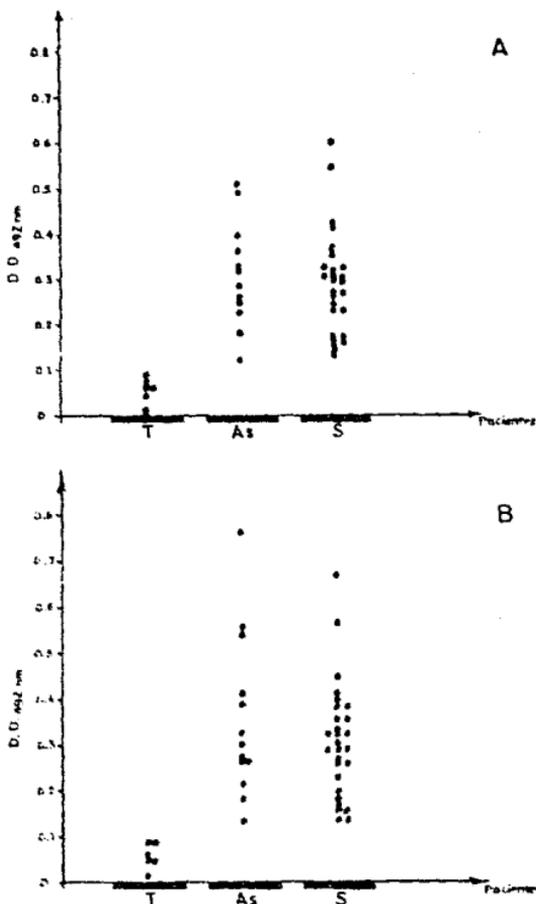


FIGURA 23. Determinación inmunoenzimática de los niveles de Igs contra *G. lamblia* en sueros de pacientes con giardiasis. El Ag soluble total de trofozoitos de la cepa P-1 (A) y WB (B) se incubó con muestras sericas de individuos testigo (panel T) o de pacientes con giardiasis sintomática (panel S) o asintomática (panel As) siguiendo un ensayo de ELISA indirecto. Los valores de D.O. se registraron 15 min. después de adicionar solución de sustrato a los poros. Las cantidades estandarizadas de los reactivos biológicos utilizados se mencionan en el texto (apartado 6).

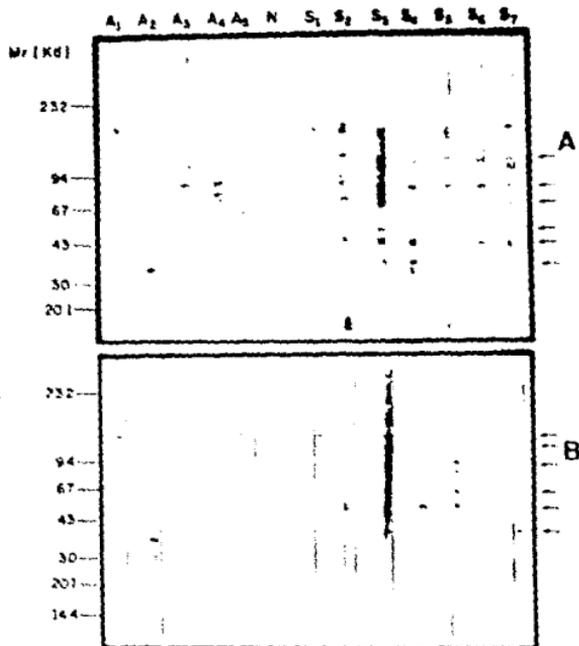


FIGURA 24. Patrones de reactividad de sueros de pacientes con giardiasis contra Ag soluble total de *G. lamblia* inmovilizado en NCP. El extracto soluble total de las cepas P-1 (A) y WB (B) fue separado mediante SDS-PAGE y transferido a papel de nitrocelulosa (NCP). Posteriormente se adicionaron las muestras séricas de pacientes con giardiasis asintomática (A<sub>1-5</sub>) o sintomática (S<sub>1-7</sub>) y las tiras se procesaron según lo descrito en Material y Métodos. Las cantidades estandarizadas de reactivos biológicos se describen en el apartado 6. N se refiere a una de las muestras testigo y las flechas denotan los Ags reconocidos con mayor frecuencia por las muestras. Mr en daltones x 10<sup>-3</sup>.

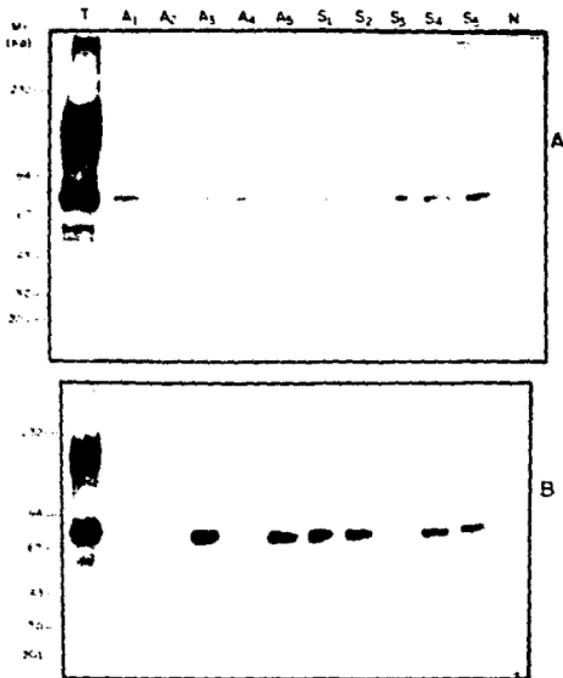


FIGURA 25. Patrones de reactividad de sueros de pacientes con Giardiasis en contra de Aqs de superficie de G. lamblia marcados con <sup>125</sup>I. Trofozoitos de las cepas P-1 (A) y WB (B) fueron marcados con el isotopo empleando la enzima lactoperoxidasa. El extracto soluble se incubo con sueros de pacientes asintomaticos (A<sub>1-5</sub>) o sintomaticos (S<sub>1-5</sub>), o con muestras testigo (N). La placa autorradiografica se revelo despues de 15 dias de exposicion al gel de SDS-PAGE secado con calor-vacio. Mr en daltones x 10<sup>3</sup>.

TARIA 3. Antigenos de trofozoitos de *Giardia lamblia* reconocidos en estados de infeccion

I. INFECCION EXPERIMENTAL EN JERBAS MONDOLICAS				
PM (Kd)	LOCALIZACION	CARACTERISTICAS*	ENSAYO	CEPAS
150-180	?	—	IET	P-1, WB
150-200	Superficie	Sensible a $\beta$ -ME <sup>a</sup>	IPP	"
133	?	Gp <sup>b</sup>	IET	"
121	?	Gp	IET	"
92	?	Gp	IET	"
82	Superficie	Gp, sensible a $\beta$ -ME	IPP	"
65	?	Gp	IET	"
63	Superficie	Gp, sensible a $\beta$ -ME	IPP	"
55	Superficie	Gp	IPP	"
45	?	Gp	IET	"
40	?	Gp	IET	"
38	?	—	IPP	"
35	Superficie	Gp, sensible a $\beta$ -ME	IPP	"

II. INFECCION CLINICA Y EXPERIMENTAL EN HUMANOS					
PM (Kd)	LOCALIZACION	CARACTERISTICAS	ENSAYO	CEPAS	AUTORES (Ref.)
120	?	Gp	IET	P-1, WB	Tesis
92	?	Gp	IET	P-1, WB	Tesis
68	Superficie	—	IPP	P-1, WB	Edson y cols (1986)
82	Superficie	Gp, sensible a $\beta$ -ME	IPP	P-1, WB	Tesis
65	Superficie	"GSA 65": Gp, resistente a proteasas	CIEF <sup>c</sup>	WB	Rosoff y Stibbs (1986a y 1986b)
65	?	Gp	IET	P-1, WB	Tesis
56	?	—	IET	WB	Taylor y Werman (1987)
55	Superficie	Gp	IET, IPP	P-1, WB	Tesis
45	?	Gp	IET	P-1, WB	Tesis
31	Superficie	—	IET	WB	Taylor y Werman (1987)
28	?	—	IET	WB	Taylor y Werman (1987)
27	?	—	IET	WB	Taylor y Werman (1987)
24.5	?	—	IPP	WB2X, GS/E	Aggarwal y Nash (1987a)
24	?	—	IPP	WB2X, GS/E	Aggarwal y Nash (1987a)
23.5	?	—	IPP	WB2X, GS/E	Aggarwal y Nash (1987a)

\*: Implica datos obtenidos en Ags con Mr igual.

a: Su Mr se modificó en ausencia o presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol.

b: Glucoproteina. Contiene N-acetil-D-glucosamina como azúcar terminal.

c: Contraímmunoelectroforesis.

## V. DISCUSION

El estudio y conocimiento de los aspectos básicos y aplicados de las enfermedades infecciosas ocasionadas por parásitos de interés médico, es un factor importante para el control epidemiológico de las mismas. En el contexto de las parasitosis intestinales causadas por protozoarios, se ha observado la participación de factores relacionados directamente con el hospedero que afectan y su medio ambiente (v. gr. edad, fondo genético, estado nutricional, educación higiénica y condiciones socioeconómicas), así como de factores inherentes al parásito infectante (habitat, virulencia de cepas y mecanismos de patogenicidad, entre otros).

En el caso específico de la giardiasis y de Giardia lamblia, se tiene actualmente un avance notorio en su estudio a partir de que se logró cultivar axenicamente in vitro al parásito (4). Así se han abordado diferentes estrategias de estudio, y dentro de ellas, la identificación y caracterización de antígenos relevantes en diferentes cepas de G. lamblia es un aspecto clave. Esto se debe a la necesidad de obtener fuentes antigénicas confiables para el estudio de la relación hospedero-parásito, así como para el desarrollo de métodos de inmunodiagnóstico e inmunoprofilaxis potencial de alta eficiencia para la enfermedad.

Con base en lo anterior, en el presente trabajo se abordó el análisis antigénico en trofozoitos de dos cepas de G. lamblia ampliamente utilizadas en investigación (P-1 y WB). Para ello se efectuaron diferentes metodologías a fin de obtener Ags solubles

totales, subcelulares y de superficie celular. Los componentes obtenidos fueron caracterizados en base en criterios electroforéticos, densitométricos y de reactividad inmunológica en ensayos serológicos empleando extractos antigénicos seleccionados y muestras obtenidas a partir de inmunización e infección experimental en animales, así como de casos clínicos de infección natural con G. lamblia.

Como un primer nivel de análisis, se manejaron algunas variaciones metodológicas para obtener extractos solubles totales de trofozoitos de G. lamblia. Los resultados correspondientes al rendimiento obtenido al emplear dichas metodologías, expresado como el peso de proteína obtenida por masa celular definida, fueron semejantes para las cepas F-1 y W5. No obstante, al comparar los métodos entre sí se observó que los extractos solubles totales fueron obtenidos con mejor eficiencia al utilizar agentes solubilizantes (i.e. detergentes y solvente orgánico). Esto se debe a la eficiente acción solvatante de estos agentes sobre moléculas de proteína que en medio solamente acuoso no pueden interaccionar con el solvente. En este sentido, la ventaja del uso de estos solubilizantes ha sido discutida ampliamente para una gama de sustancias y organismos en estudio (Helenius y Simons, 1975; Colowick y Kaplan, 1984; Arguello-García et al., 1990). En cuanto a las variantes empleadas para lisar los trofozoitos (sonicación y congelación-descongelación), estas no proporcionaron diferencias significativas estadísticamente en la eficiencia de extracción antigénica de los métodos ensayados. Estos datos son explicables si

se considera una fragilidad celular relativamente alta en los trofozoitos de G. lamblia ante un estrés de tipo físico, ya que en parásitos con cubierta altamente resistente como Trichinella spiralis, la técnica de lisis celular empleada puede ser crítica en el rendimiento proteínico logrado (Barriga, 1981).

En relación a los componentes subcelulares de G. lamblia, éstos fueron enriquecidos por medio de una solubilización selectiva basada en las propiedades fisicoquímicas y compartimentalización de sus proteínas (Holberton y Ward, 1981; Clark y Holberton, 1986; den Hollander y Refus, 1988). En este estudio se determinó una alta concentración de componentes proteínicos en la fracción hidrosoluble enriquecida en componentes de citosol ( $\approx 70\%$ ) y una menor concentración ( $\approx 10\%$ ) en la fracción soluble en presencia de SDS, enriquecida para proteínas de citoesqueleto. Para la fracción obtenida en presencia de agentes solubilizantes de membrana celular (v.gr. triton X-100, NaDOC o HEPES) la concentración fue cercana al 20% del material proteínico celular. Asimismo, se determinó que cada trofozoito de G. lamblia contiene aproximadamente 90 pg. de proteína. Estos datos no han sido reportados en algún otro estudio precedente; pero son concordantes con las proporciones esperadas para las fracciones antigénicas indicadas, además de que la cantidad de proteína por célula es indicativa del tamaño relativo de este parásito al compararlo con otros protozoarios. Así por ejemplo, en trofozoitos de mayor tamaño como Entamoeba histolytica, se ha estimado una cantidad aproximada de 1.8 ng. por célula (Arguello-García et al., 1990), y para organismos más pequeños como

promastigotes de Leishmania mexicana se han calculado cantidades cercanas a 5 pg. por célula (M. en C. Francisco Nava Sinsel, comunicación personal).

Las variantes experimentales empleadas para extraer Ags de superficie en trofozoitos de G. lamblia fueron más limitadas en función de la mejor selectividad de los detergentes por solubilizar componentes de membrana (Helenius y Simons, 1975). Debido a que solo los Ags accesibles en la superficie de los trofozoitos fueron marcados y cuantificados (como c.p.m. de <sup>125</sup>I enlazado), el mejor rendimiento que se obtuvo con el uso de trítón X-100 y NaDOC confirmó la calidad solubilizante de ellos.

El siguiente nivel de caracterización de Ags solubles de G. lamblia en los distintos extractos se realizó empleando condiciones electroforéticas optimizadas y análisis densitométrico computarizado. Los resultados mostraron diversas ventajas para el uso de gels de poliacrilamida en un gradiente de 5-15% del monómero con respecto a aquellos con una concentración constante de acrilamida (i.e. 10%). Entre ellas se encuentran la mejor resolución de bandas proteínicas y una mayor confiabilidad en las determinaciones de PM. El uso del agente reductor  $\beta$ -mercaptoetanol favoreció ligeramente dicha resolución electroforética. Estas condiciones de caracterización antigénica han sido recomendadas ampliamente (Goding, 1983) e incluso confirmadas en reportes recientes sobre este parásito (Mohareb y cols., 1989).

Con respecto al análisis cuantitativo y cualitativo de los perfiles electroforéticos para los extractos solubles preparados,

al analizar visualmente dichos patrones se observaron algunas diferencias. Asimismo no se observó degradación proteínica en ningún caso. No obstante, las determinaciones densitométricas permitieron confirmar y optimizar las diferencias cuantitativas entre los extractos y entre las cepas P-1 y WB, así como cuantificar los componentes que se presentaron con mayor abundancia. Además, la técnica de electroforesis bidimensional permitió detectar con claridad diferencias cualitativas en los perfiles antigénicos de las dos cepas de G. lamblia estudiadas.

Considerando los criterios anteriores se determinó la complejidad del patron proteínico de trofozoitos de G. lamblia. Esta vario de aproximadamente 50 componentes (extractos con o sin detergente) hasta cerca de 65 bandas (extractos con ácido acético) en análisis electrofético unidimensional, y de cerca de 100 componentes al realizar electroforesis bidimensional (extractos con ácido acético). Por una parte, estos datos se explican por una interacción muy fuerte del solvente orgánico con las moléculas de proteína, lo cual puede implicar un desdoblamiento más extensivo de aquellas (Colowick y Kaplan, 1964) y por consiguiente la obtención de un perfil más complejo.

Por otro lado, en estudios previos de caracterización antigénica de este parasito se obtuvieron patrones menos complejos aun cuando los trofozoitos fueron procesados por sonicación (Moore y cols., 1982; Smith y cols., 1982c; Wenman y cols., 1986); sin embargo, en estos análisis no se emplearon inhibidores de proteasas (proteinasas). Se ha reportado recientemente que en trofozoitos de

G. lamblia la actividad de proteasas es principalmente del tipo de proteinasas de cisteína (Hare *et al.*, 1989) y en experimentos de marcaje metabólico con cisteína-<sup>35</sup>S se ha demostrado la presencia de un número abundante de Ags con este aminoácido (Nash, 1989). En el presente estudio se utilizaron dos inhibidores de proteasas: N-etil maleimida, un antagonista clásico de cisteinasas y PMSF, un inhibidor específico de serinasas con alguna actividad sobre cisteinasas (Bond y Butler, 1987). De esta forma, se puede sugerir que el empleo de tales agentes es recomendable en la preparación de antígenos de trofozoitos de G. lamblia, evitándose así artefactos ocasionados por degradación de proteínas.

Como un dato adicional, al analizar los extractos solubles totales se observó que un gran número de bandas eran glucoproteínas detectables tanto por tinción PAS como por reactividad ante lectinas. Respecto a estas últimas, resulto interesante el hecho de que solamente el aminoglucosido N-acetil-D-glucosamina fuera detectado como azúcar expuesto (terminal) en Ags de los trofozoitos de ambas cepas. Varios de estos componentes se localizan a nivel de membrana celular, de acuerdo a experimentos de tinción fluorescente realizados sobre trofozoitos vivos y fijados empleando WGA acoplada a FITC (datos no mostrados). Estos datos son concordantes con los reportados por Ward y cols. (1985), quienes identificaron el aminoglucosido en un enlace tipo B. Sin embargo, el papel biológico de este sacárido debe ser estudiado en detalle.

Las cepas analizadas en este estudio mostraron entre sí algunas diferencias cuantitativas a nivel de extractos solubles

totales, y en las fracciones subcelulares estas diferencias fueron más evidentes. Las fracciones de "Membrana" y de "Citoesqueleto" presentaron varios componentes comunes, aunque la primera presentó un grado de variabilidad mayor en relación a las otras dos fracciones al comparar directamente las cepas. Esta última observación ha sido confirmada en estudios recientes sobre este protozooario (den Hollander y Befus, 1988).

El grado de semejanza detectado en los perfiles para los extractos de "Membrana" y "Citoesqueleto" en una misma cepa sugiere que existe una posible relación estructural y biológica muy estrecha entre las proteínas de tales fracciones del parásito (Clark y Holberton, 1986), la cual dificulta en algún grado la separación de los componentes específicos de estos dos compartimientos. A pesar de ello, en la fracción de "Membrana" fueron detectables componentes identificados en otros estudios, v.gr. 75 Kd (Clark y Holberton, 1986) y 55 -ó 56- Kd (Kumkum y cols., 1988a), mientras que en la fracción "Citoesqueleto" se detectaron aquellos de 58, 53 y 33 Kd (Holberton y Ward, 1981; Crossley y Holberton, 1983; Aggarwal y Nash, 1989).

Al analizar los patrones de componentes de superficie accesibles al marcaje con  $^{125}\text{I}$ , se observó que los componentes de 150-200 Kd (material polidisperso, posiblemente un conjunto de proteínas) y de 82 Kd incorporaron mayoritariamente el isótopo. Estos patrones también mostraron diferencias cuantitativas importantes entre las cepas P-1 y WB principalmente a nivel de los antígenos de alto PM, aunque el componente de 82 Kd se presentó de

manera constante en los experimentos de radiomarcaje. Estas observaciones se han reiterado en una serie de aislados obtenidos en el laboratorio de la Dra. Guadalupe Ortega-Pierres a partir de pacientes sintomáticos y asintomáticos, donde la metodología descrita aquí se ha aplicado para estudiar cambios recurrentes in vitro en componentes de superficie de clonas de G. lamblia cultivadas de manera continua (Enciso-Moreno y cols., 1989).

De manera interesante, la sensibilidad que presentaron muchos de los componentes de superficie radiomarcados al agente reductor  $\beta$ -mercaptoetanol sugiere la presencia de puentes disulfuros y/o de aminoácidos que contienen Azufre (v. gr. cisteína), aunque las variaciones de migración de dichos Ags (comparando condiciones reductoras y no reductoras) pueden ser el resultado tanto del desdoblamiento de complejos proteínicos en moléculas más pequeñas, como de linearización molecular inducida por reducción de enlaces Azufre-Azufre. En algunos reportes (p.ej. Nash y Keister, 1985) se han manejado patrones analizados bajo condiciones no reductoras, mientras que otros investigadores (p.ej. Einfeld y Stibbs, 1984; Wenman y cols., 1986; entre otros) han descrito patrones de marcaje bajo condiciones reductoras. Este tipo de variantes metodológicas tiene significancia crucial en los datos sobre caracterización de Ags de superficie de G. lamblia, tal como se ha determinado en epimastigotes de Trypanosoma cruzi, donde los perfiles de marcaje de superficie pueden variar en función de modificaciones aparentemente mínimas en la técnica de análisis (Schechter y Nogueira, 1988).

Un aspecto importante en el presente estudio fue la selección de un extracto antigénico, total o subcelular, que permitiese una detección adecuada de Igs anti-G. lamblia en estados de inmunización e infección experimental y clínica con el parásito. De manera global, los extractos obtenidos por sonicación + detergente (triton X-100 o NaDOC) mostraron consistentemente reactividad y sensibilidad altas frente a los sueros representativos ensayados; pero los extractos de "Membrana" también fueron eficientes en una mayoría de casos. Esto sugiere un grado semejante de enriquecimiento de Ags relevantes entre estas dos preparaciones. En contraste, la reactividad más baja que presentaron los extractos solubles en ácido acético puede ser indicativa de: a) una extracción más extensiva de proteínas inmunológicamente no relevantes, o b) una interacción molecular íntima del solvente orgánico con los Ags o epitopes (i.e. formilación), la cual puede afectar su actividad inmunológica (Colowick y Kaplan, 1984).

Tomados en su conjunto, los resultados descritos hasta aquí sugieren la conveniencia del uso de extractos solubles totales obtenidos en presencia de detergentes para una extracción eficiente de Ags relevantes de trofozoitos de G. lamblia. Esto se relaciona a su relativa facilidad de obtención y a la eficiencia con que son inmunodetectados. Observaciones similares se tienen en estudios sobre actividad antigénica de extractos totales y de fracciones purificadas de E. histolytica (Aust-Kettis *et al.*, 1983). En particular, el uso de NaDOC podría ser recomendable si se requiere remover el solubilizante para procesamiento posterior, dado que su

concentración micelar crítica (CMC $\approx$ 4-6 mM) permite su remoción rápida por diálisis (Helenius y Simons, 1975). El tritón X-100, si bien es más difícil de remover (CMC $\approx$ 0.24 mM), es un solubilizante muy eficiente que tiene efecto mínimo sobre interacciones proteína-proteína, y las interacciones Ag-Ig no sufren efecto alguno (Colowick y Kaplan, 1984).

El siguiente nivel de análisis en este trabajo consistió en el establecimiento de la infección por G. lamblia en jerbos mongólicos como modelo experimental siguiendo el protocolo propuesto por Belosevic y cols. (1983). Se ha descrito anteriormente el uso de otros animales como modelos incluyendo ratones lactantes (Hill y cols., 1983) o recién destetados (Vinayak y cols., 1979), perros mongrel (Hewlett y cols., 1982), ratas (Sehgal y cols., 1976), conejos (Schleinitz y cols., 1963) y gatos (Kirkpatrick y Farrell, 1984). No obstante, los datos sobre susceptibilidad reportados en el modelo del jerbo para giardiasis, además de la facilidad de su manipulación en el laboratorio para inoculación y obtención de muestras, posibilitaron en mayor medida esta fase del estudio. Estos roedores han mostrado susceptibilidad a la infección experimental con otros protozoarios incluyendo Babesia divergens (Lewis y Williams, 1979) y E. histolytica (revisado por Meerovitch y Chadee, 1988). Por su parte, el empleo de jerbos singénicos permite obtener datos representativos en cuanto a la capacidad infectante de diferentes cepas de G. lamblia, así como para identificar y determinar características biológicas para los componentes del parásito que son relevantes en la interacción in

vivo del parasito con el hospedero, sin implicar alguna variabilidad biologica significativa en este ultimo.

De acuerdo con lo anterior, la infeccion con trofozoitos de las cepas P-1 y WB en los jerbos por via intragastrica se caracterizo por ser autolimitante (los animales la resolvieron en 30-42 dias post-inoculacion) con periodos de expulsion mayoritaria de quistes en heces entre la segunda y tercera semana post-infeccion, y dicha expulsion se hizo de manera intermitente. Los periodos de prepatencia y patencia determinados fueron de 6-9 dias y 21-36 dias respectivamente. Ademias, los jerbos infectados con la cepa P-1 expulsaron entre 0-4500 (promedio  $\approx$ 1800) quistes/g. heces/2 hrs. y aquellos infectados con la cepa WB entre 0-8000 (promedio  $\approx$ 2800) quistes/g. heces/2 hrs. No se observo una alteracion estadistica en la ganancia de peso de los jerbos infectados durante la patencia de la infeccion.

Los datos anteriores permiten considerar algunas características importantes en los jerbos como un modelo animal adecuado para estudios sobre giardiasis experimental. En primera instancia, debe considerarse la alta susceptibilidad de los jerbos (particularmente machos) a la infeccion con trofozoitos cultivados axenicamente in vitro y administrados por via intragastrica, dado que practicamente todos ellos desarrollaron la infeccion. Si bien esta modalidad de infeccion no ocurre aparentemente en la naturaleza, los trofozoitos de G. lamblia (pese a su aparente fragilidad mecanica comparados con la fase de quiste) pueden resistir determinados tipos de estres medio-ambiental, como el bajo

pH estomacal (rico en proteasas) en el cual son alojados inicialmente. Una explicación, al menos parcial, puede darse con base en los datos de caracterización antigénica, donde se observó que una serie de componentes localizados en la superficie del trofozoito contienen carbohidratos asociados (N-acetil-glucosamina terminal) así como posibles residuos de aminoácidos reductores (v.gr. cisteína) y puentes disulfuro, estructuras que pueden conferir a las moléculas de membrana celular resistencia fisicoquímica alta a las condiciones adversas del tracto digestivo. Además, en el estudio de Belosevic y cols. (1983) no se observaron diferencias en el patrón cualitativo de expulsión de quistes en heces al modificar la vía de administración (oral-intragástrica y duodenal) ni la forma infectante del parásito (quistes o trofozoitos) [Faubert *et al.*, 1983]. No obstante, en los reportes de Belosevic y cols. (1983) con jerbos, de Hill y cols. (1983) con ratones lactantes y de Hewlett y cols. (1982) con perros mongrel se ha logrado una tasa alta de infección en los animales empleando trofozoitos como fase infectiva, lo cual se puede relacionar también con la adecuada viabilidad de las células en el inóculo administrado, dado que provienen de cultivos axénicos. Al emplear la fase de quiste en la inoculación de los animales, es un factor crítico conocer la viabilidad de los mismos, ya que los procedimientos rutinarios de almacenamiento de la muestra y purificación basados en soluciones de sacarosa y sulfato de Zinc pueden alterar significativamente la viabilidad, y con ello, la capacidad infectiva de los quistes (Craft, 1982; Wallis y Wallis,

1986). En una amplia mayoría de estudios de infección experimental con G. lamblia no se han reportado datos acerca de lo anterior, aunque en algunos casos [p. ej. Vinayak y cols. (1979) con ratones destetados, Belosevic y cols. (1983) con jerbos y Craft (1982) en ratas] se han logrado tasas altas de infección ( $\approx 100\%$ ) al usar diferentes dosis infectivas de quistes.

Durante los experimentos preliminares de esta fase, los jerbos machos expulsaron cantidades de quistes en heces consistentemente mayores a aquellas en muestras fecales de animales hembra, aunque no se determinó una diferencia significativa estadísticamente para esta observación. En los estudios de Heyworth (1988) empleando ratones BALB/c infectados con G. muris no se determinó tampoco una dependencia absoluta entre los niveles de expulsión de quistes y el sexo de los animales maduros, aunque también se verificó una tasa de expulsión consistentemente mayor en ratones machos. Al realizar un estudio a fondo al respecto, se podría analizar el papel de factores inmunomoduladores ligados al sexo (i.e. hormonas sexuales) en la capacidad del hospedero de eliminar el parásito.

Las características de autolimitación, intermitencia en la expulsión de quistes, períodos de prepatencia y patencia para la infección por G. lamblia observados en los jerbos de este estudio son virtualmente las mismas que las reportadas precedentemente por Belosevic y cols. (1983) y semejan notablemente las registradas en infecciones humanas (Rendtorff, 1954). En los modelos de ratas recién destetadas (Craft, 1982), perros mongrel (Hewlett y cols., 1982) y gatos (Kirkpatrick y cols., 1984) se han obtenido datos

concordantes, mientras que en el modelo murino se han registrado tanto un patrón de expulsión de quistes continuo (Vinayak y cols., 1979) como una susceptibilidad a la infección dependiente de la edad del animal (Hill y cols., 1983). Debido a ello, no se puede concluir si la intermitencia en la expulsión de quistes es totalmente especie-específica en Giardia o bien participan factores del hospedero, aunque existen datos que sugieren lo primero, i.e. en ratones y jerbos infectados con G. muris se han detectado sólo patrones continuos de expulsión (Roberts-Thomson y cols., 1976a; Faubert y cols., 1983).

Un dato interesante en este modelo fue la diferencia en los niveles de expulsión de quistes con el cambio de la cepa infectante (P-1 y WB). Esto puede tener una relación con las diferencias antigenicas que existen entre estas dos cepas de acuerdo con lo determinado en la primera fase del presente trabajo, las cuales podrían jugar un papel para la capacidad del protozoario de reproducirse dentro del hospedero. Aggarwal y Nash (1987b) infectaron jerbos con trofozoitos de 2 aislados (WB y GS-E) los cuales presentaban patrones de restricción de DNA y de Ags de superficie diferentes, observando que con el aislado WB la infección se resolvió en  $\approx 28$  días, mientras que los animales desafiados con el aislado GS-E estuvieron infectados hasta un lapso de 42 días. Estos datos en conjunto sugieren que aislados diferentes de G. lamblia pueden inducir patrones de infección distintos en los jerbos, tanto en la intensidad de la infección como en la patencia de la misma.

En general, se ha reportado la existencia de heterogeneidad biológica en aislados de G. lamblia a nivel de su "virulencia" en diferentes modelos experimentales: Aggarwal y cols. (1983) emplearon ratones NMRI inoculados con quistes y observaron correlación entre la intensidad de la infección y la severidad de la sintomatología del paciente del cual se obtuvo el aislado; Visvesvara y cols. (1988) observaron que quistes del parásito obtenidos a partir de individuos sintomáticos o asintomáticos pueden tener diferente eficiencia para infectar jerbos, e incluso no ser infectivos. Por su parte Nash et al. (1987) inocularon voluntarios con trofozoitos de 2 aislados (CS/M e Isr) y solamente el primero fue infectivo.

Por ahora existen dos expectativas interesantes: determinar si existen trofozoitos de aislados de G. lamblia que no sean infectivos en jerbos, así como poder evaluar un estado de infección experimental involucrando reproducción de la enfermedad sintomática. A este respecto Hill et al. (1983) no observaron manifestaciones características de enfermedad en ratones CF-1 infectados con trofozoitos. En el presente estudio los jerbos infectados no presentaron, al menos, un deterioro significativo en su ganancia de peso ni diarrea evidente (datos no mostrados) aunque existen reportes sobre la reproducción de manifestaciones clínicas de giardiasis incluyendo pérdida de peso, anomalías ultraestructurales intestinales y diarrea en jerbos infectados con G. lamblia (Cheng-1, 1988), así como actividades de disacaridasas y área superficial del borde microvellososo intestinal decrecentadas

(Buret et al., 1991). Estos últimos datos amplifican las ventajas de los estos roedores como modelo experimental y permitirá un análisis más fino de los factores de patogenicidad del parásito que desempeñan un papel relevante en el curso de la giardiasis experimental y clínica.

Con respecto a la respuesta inmunológica mediada por Igs circulantes específicos en los animales infectados, ésta fue cinéticamente similar empleando una u otra cepa infectante del parásito de acuerdo con el análisis por ELISA, aunque existieron diferencias cuantitativas en etapas tardías de la patencia de la infección. Un dato que vale la pena añadir fue que se observó una tendencia aparente a persistencia de Igs, i.e. se detectaron Igs anti-G. lamblia a niveles aun significativos ( $DO_{412}$  cercanas a 0.3) hasta 4 meses después de la inoculación (datos no mostrados). Este fenómeno puede desempeñar un papel biológico importante en la infección, ya que se ha reportado anteriormente resistencia a la reinfección en jerbos desafiados ya sea inmediatamente después de recibir la terapia curativa (Aggarwal y Nash, 1987b) o aún 8 meses después de la infección primaria (Belosevic et al., 1983) y Lewis y cols. (1987) han observado que la administración de agentes inmunodepresores como drogas tipo corticosteroides en los jerbos puede contribuir decisivamente a la susceptibilidad a reinfección experimental. Si bien los datos sobre los títulos de Igs circulantes de este estudio refuerzan el hecho de que este parámetro es diagnósticamente conveniente para indicar exposición del hospedero al parásito, se deben establecer trabajos futuros

para determinar su posible valor pronóstico en infecciones pasadas o actuales, así como para evaluar la correlación de datos serológicos y clínicos en estudios transversales/experimentales y longitudinales/ epidemiológicos.

El presente trabajo constituye el primer reporte sobre reconocimiento antigénico específico por Igs circulantes en jerbos infectados con Giardia. Los ensayos longitudinales de IET e IPP mostraron resultados virtualmente más diferenciales que los obtenidos por ELISA. De esta forma, patrones complejos de Ags ( $\approx 20$  con la cepa P-1 y  $\approx 30$  con la cepa WB) fueron progresiva y consistentemente reactivos con los sueros de los animales en ensayos de IET, aunque este repertorio fue más limitado (5 con la cepa P-1 y 7 con la cepa WB) en ensayos de IPP. Estos datos son explicables desde el punto de vista de que el ensayo de IET permite visualizar interacciones Ag-Ig que involucran varios isotipos de Ig (IgA+IgG+IgM) mientras que el ensayo de IPP involucra principalmente Igs de isotipo IgG dada la afinidad a ella de la proteína A de Staphylococcus aureus usada como coprecipitador (Jensen, 1959), aunque Igs de isotipo IgM también son detectables en este sistema (M. en C. Lilián Yépez Mulia, comunicación personal); además, el mosaico de componentes antigénicos es más complejo en extractos solubles totales que en aquellos de superficie radiomarcados. Sin embargo, el hecho de haberse observado con ambos ensayos diferencias cualitativas y cuantitativas en los patrones de reconocimiento en función de la cepa infectante del parásito permite sugerir que estas dos cepas de

G. lamblia indujeron en los jerbos inoculados respuestas inmunes humorales parcialmente cepa-dependientes. Aggarwal y Nash (1987b) obtuvieron una conclusión semejante, aunque en su trabajo se manejaron ensayos de detección de Igs (ELISA, IF y de citotoxicidad dependiente de Complemento) empleando un conjugado heteroespecifico, esto es, preparado contra Igs de hamster, mientras que en este análisis se utilizó un conjugado homoespecifico (contra Igs de jerbo) según se ha mencionado.

En resumen, los datos obtenidos a partir del modelo de infección experimental empleado en este trabajo sugieren que existen trofozoitos de cepas o aislados de G. lamblia que son capaces de inducir una intensidad de infección diferente en los jerbos, lo cual se relaciono con respuestas mediadas por Igs circulantes cuantitativamente y cualitativamente distintas, y lo anterior podría estar influido directamente por diferencias antigenicas presentes en los aislados de este protozooario. Estos datos guardan buena correlacion con las observaciones hechas por Nash y cols. (1987) en su estudio de giardiasis experimental en humanos, aunque en dicho trabajo la heterogeneidad genetica de los individuos es un factor distintivo. Tomando en cuenta lo expuesto, los jerbos mongolicos pueden considerarse un modelo animal idóneo de giardiasis experimental.

El nivel final de analisis en el presente estudio involucró la determinacion de la presencia de Igs anti-G. lamblia y de reconocimiento antigenico en muestras séricas a partir de un estudio transversal de giardiasis clinica efectuado sobre una

población de individuos en edad pediátrica. Un número de estudios precedentes han mostrado que G. lamblia, si bien es un parásito intestinal "estricto", es capaz de inducir respuesta inmunológica sistémica de Igs circulantes por mecanismos no dilucidados actualmente. En esta forma, varias técnicas seroinmunológicas han sido propuestas para fines diagnósticos con base en estudios epidemiológicos de tipo transversal (Visvesvara y cols., 1980; Smith y cols., 1981; revisados en reporte de la WHO, 1986).

La técnica de ELISA se empleó en el presente trabajo para determinar los niveles de Igs totales (IgG+IgA+IgM) en las muestras séricas mencionadas en función de su alta sensibilidad (se utilizó el equivalente de 20,000 células como Ag y 1 µl de suero por pozo). Asimismo, en una mayoría de casos (35/41=85.3%) los títulos fueron discriminables directamente de aquellos correspondientes a las muestras control aun considerando 3 desviaciones estándar sobre la media en estos últimos, indicando una especificidad alta para el método descrito. Las lecturas de  $DO_{492}$  fueron relativamente semejantes para una muestra sérica confrontada con Ags de las dos cepas de G. lamblia empleadas, confirmando estos datos la existencia de reactividad serológica cruzada hacia aislados diferentes del parásito. Sin embargo, no se determinó ninguna correlación entre los niveles de Igs anti-G. lamblia y la sintomatología del individuo del cual se obtuvo la muestra. Esto puede estar influido desde el punto de vista cuantitativo por el tipo de estudio realizado (transversal) dado que el título de Igs puede encontrarse modificado con el tiempo post-infección en el que se colectó el

sueros, así como por el fondo genético de los individuos involucrados en el análisis (i.e. no son singénicos). El último factor también podría influir en estudios longitudinales, ya que en los estudios de Nash y cols. (1987) con voluntarios infectados con un aislado (GS/M) se obtuvieron patrones de inducción de isotipos de Igs variables de individuo a individuo, aunque del mismo modo se observó un grado de variabilidad en el cuadro clínico inducido por la infección.

Con base en lo anterior, se puede sugerir que esta metodología puede ser capaz de detectar con confiabilidad no solamente la infección por G. lamblia en humanos sino aquellos casos sin una sintomatología asociada lo cual es importante desde un enfoque epidemiológico, si bien se requiere todavía determinar su posible utilidad pronóstica. Estudios recientes sugieren que el análisis por isotipos de Igs específicos pueden aportar datos relevantes al respecto: p.ej. niveles séricos altos de IgM anti-G. lamblia parecen ser indicativos en casos agudos (Goka et al., 1986) y en la etapa pediátrica del individuo (Janoff et al., 1990); aparentemente los niveles de IgG no discriminan infecciones actuales de las previas (Goka et al., 1986).

El reconocimiento antigénico de los sueros humanos probados hacia trofozoitos de las cepas P-1 y WB del parásito fue por lo general complejo y variante en un número de individuos en los ensayos de IET y muy restringido y homogéneo en el análisis por IPP, no encontrándose tampoco en estos datos correlación entre la sintomatología del individuo y los patrones de reactividad

antigénica. Con respecto a la complejidad del reconocimiento por IET ésta no se ha explicado actualmente, aunque existen algunas posibilidades tales como la presencia de un mosaico complejo de determinantes antigenicos (epitopes) presentes en los extractos o bien la presencia de una especie particular de epitope compartido por varios Ags. Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de que por lo menos algunos de estos determinantes puedan estar glucosilados, lo cual es posible en función de los resultados obtenidos por reactividad ante lectinas. Ensayos futuros sobre bioquímica de epitopes (v.gr. preincubación de Ags con proteinasas, endoglucosidasas y metaperyodato de Sodio) podrían dar resultados relevantes en este sentido. Por su parte, la variabilidad en el análisis por IET es explicable por la naturaleza transversal del estudio, así como por factores propios potencialmente presentes en la interacción G. lamblia-humano: la heterogeneidad genética de los individuos que puede implicar una respuesta ampliamente variable al por sí complejo patrón de determinantes antigenicos que se presentan durante el curso de la infección, el balance de los diferentes isotipos de Igs con distinta afinidad y el propio título de Igs en el momento de colección del suero además de que, como se observó en esta fase del estudio, una sola muestra sérica presentó reactividad cuantitativamente y cualitativamente diferente ante las cepas P-1 y WB, lo cual indica la participación de la heterogeneidad antigenica del parásito en este fenómeno.

En los autorradiogramas de IPP se determinaron dos componentes inmunogénicos de superficie de 63 Kd y 35 Kd para la cepa P-1 que

no se observaron con la cepa WB, mientras que los Ags de 82 y 55 Kd fueron reconocidos constantemente por las muestras séricas. Estas observaciones, más que contradictorias a las obtenidas con el ensayo de IET, pueden ser complementarias, i.e. en los extractos solubles se pueden encontrar varios precursores de los componentes de superficie que ya contengan los epitopes, de tal forma que en IET se observen varias bandas de Ag y por IPP un repertorio más limitado, aunque debe considerarse el hecho de que los Ags de superficie accesibles al marcaje con  $^{125}\text{I}$  deben contener residuos de histidina y principalmente tirosina (Marchalonis, 1969). De cualquier manera, este ensayo también permitió determinar la existencia de heterogeneidad antigénica en estas dos cepas de G. lamblia, así como detectar reactividad en individuos con infección no sintomática.

Aun considerando los potenciales de variabilidad anteriores, uno de los datos más importantes en este tipo de análisis es la identificación de Ags del organismo infectante que son inmunogénicos, desde el punto de vista de su reactividad y la frecuencia con que son inmunodetectados. Así, los sueros humanos empleados en este estudio reconocieron con mayor intensidad y frecuencia los componentes de 133, 92, 55, 45 y 36 Kd en la prueba de IFT, y aquellos de 82 y 55 Kd en el ensayo de IPP en las cepas P-1 y WB de G. lamblia. Cabe destacar que en la fase de caracterización inmunológica longitudinal del modelo animal de jerbos mongoles se determinaron como Ags relevantes, en base a los criterios mencionados, los componentes de 150-180, 133, 121,

92, 82, 65, 45 y 40 Kd por IET y aquellos de 82 y 55 Kd por IPP.

Por consiguiente, un conjunto selecto de estos Ags (con PM de 133, 92, 82, 65, 55 y 45 Kd) pueden ser propuestos como posibles marcadores inmunológicos en giardiasis tanto clinica como experimental a partir del presente trabajo. De hecho, algunos de estos componentes han sido detectados y utilizados probablemente por otros investigadores, v. gr. el Ag de 82 Kd y similares [Einfeld y Stibbs (1984); Edson *et al.* (1986); Clark y Holberton (1986); Kumkum *et al.* (1988a); Kumkum *et al.* (1988b)], el de 65 Kd. [Rosoff y Stibbs (1986a y 1986b)] y el de 55-56 Kd. [Kumkum *et al.* (1988a); Vinayak *et al.* (1989)]. De manera inversa, existen estudios sobre giardiasis en humanos donde otros componentes han sido detectados en frecuencia mayoritaria, como en el caso del Ag de 31 Kd. (Taylor y Wenman, 1987), el cual si fue detectado en el presente estudio aunque no entre los principales inmunógenos; reciprocamente, estos autores también detectaron los componentes de 80 (u 82) y 55 Kd en sus perfiles antigénicos de la cepa WB de G. lamblia. Una fuente importante de variabilidad entre estos datos puede ser la metodología de preparación de Ags solubles totales y de superficie (en aquel estudio se sonicaron trofozoitos en PBS sin adición de inhibidores de proteasas, mismos que si se utilizaron en este trabajo). Este aspecto se ha discutido previamente.

Existe una serie de perspectivas y alternativas de tipo básico como aplicado a partir de los datos del presente estudio en conjunto con los antecedentes relacionados, y actualmente se tiene un grado de avance en los mismos. En primera instancia, los

estudios longitudinales con seguimiento clínico e inmunológico pueden dar información adicional de gran valor en relación a los Ags de G. lamblia que son reconocidos durante el curso de la infección humana, además de proporcionar datos significativos sobre el valor diagnóstico y pronóstico de una serie de ensayos serológicos (basados en la detección de Igs) o de tipo coprológicos [basados en captura de Ags (Craft y Nelson, 1982; Rosoff y Stibbs, 1986a; Janoff y cols., 1989) o en el uso de sondas de DNA (Butcher y Farthing, 1989; Lewis y cols., 1990)].

En estos estudios se pueden incluir herramientas de Ingeniería Genética, i.e. la construcción de genotecas de DNA (genómicas) y las de cDNA (de expresión). A partir de estas últimas se pueden inmunoseleccionar proteínas recombinantes y subclonar en vectores de expresión adecuados el gene(s) que codifican para los Ags propuestos con el fin de producir éstos en forma más pura, económica y en cantidades suficientes para estos estudios. En el laboratorio de la Dra. Guadalupe Ortega-Pierres se ha logrado caracterizar parte de un gen que codifica para una región antigénica, hidrofóbica, rica en cisteína (probablemente expuesta en la superficie del trofozoíto) e inmunolocalizada en un Ag de 65 Kd de la cepa P-1 de G. lamblia (M. en C. Ramón Coral-Vázquez, 1990), mientras que Gillin y cols. (1990) han reportado la clonación de un gen que codifica un determinante(s) antigénico(s) presentes en dos proteínas de superficie de trofozoítos de la cepa WB accesibles al marcaje con <sup>125</sup>I (con PM de 85 y ≈66 Kd) y cuyo producto es una proteína recombinante de 72.5 Kd rica en cisteína.

Estos genes pueden tener una relación con la expresión de los Ags de 82 y 65 Kd que se han identificado en el presente estudio y en otros más sobre giardiasis experimental y clínica.

Como perspectivas adicionales, se puede plantear el uso de estos Ags (o anticuerpos monoclonales dirigidos en contra de ellos) en el diseño de sistemas preliminares de inmunoprofilaxis experimental para la giardiasis empleando el modelo animal de jerbos mongolicos. Esta estrategia ha dado resultado en infecciones experimentales con otros protozoarios incluyendo Plasmodium (Holden y Freeman, 1981), Toxoplasma gondii (Handman y cols., 1980), T. cruzi (Scott y Snary, 1979) y E. histolytica (Petri y Ravdin, 1991), así como en el organismo que infecta roedores, G. muris (Roberts-Thomson y cols., 1976b; Butscher y Faubert, 1988).

Con lo anterior, se debe tomar en cuenta que las diferentes estrategias de control epidemiológico de largo plazo para la giardiasis, particularmente en países en vías de desarrollo como el nuestro (revisado por Stevens, 1985), deben considerar no solamente las fuentes de infección entre humanos, sino aquellas entre humanos y animales (Faubert, Bemrick y Erlandsen, 1988) involucrando sistemas comunitarios de depuración de agua potable y mejoramiento de condiciones higiénicas de la población y alimentos de consumo. Por ahora no se cuenta con un método preventivo artificial para la enfermedad y sí con una serie de agentes para su tratamiento; pero los antecedentes ofrecen una perspectiva promisoría enfocada a evitar con anticipación los efectos clínicos o subclínicos (e indirectamente económicos) causados por esta enfermedad.

## VI. CONCLUSIONES

1. La eficiencia en la obtención de extractos de proteínas solubles totales de trofozoitos de G. lamblia fue semejante al comparar las cepas P-1 y WB, existiendo diferencias al comparar los métodos empleados para ello. En particular, la adición de agentes solubilizantes como son los detergentes tritón X-100 al 0.5%, desoxicolato de Sodio al 2% y ácido acético favoreció la eficiencia de extracción proteínica.

2. El análisis electroforético de los extractos solubles totales obtenidos de las dos cepas del parásito mostró una gran complejidad antigénica (52 a 63 componentes), así como diferencias cuantitativas y cualitativas entre ellas. En ensayos similares en doble dimensión se detectaron aproximadamente 100 componentes utilizando extractos con ácido acético, dentro de un rango de PM de 10 a 240 Kd. La tinción PAS reveló el carácter glucoproteínico de un gran número de Ags del parásito. La reacción con lectinas mostró que el carbohidrato terminal en estos Ags de G. lamblia fue la N-acetil-D-glucosamina.

3. El análisis de extractos subcelulares enriquecidos en componentes de membrana, citosol y citoesqueleto de trofozoitos de las cepas P-1 y WB de G. lamblia mostraron diferencias antigénicas entre ellos, y existió una mayor variabilidad en el primero al comparar las cepas. El método empleado permitió determinar un contenido de  $\approx 90$  pg. de proteína por célula.

4. Los componentes de superficie celular de trofozoitos de G. lamblia accesibles al marcaje con  $^{125}\text{I}$  fueron obtenidos con mejor eficiencia al emplear detergentes solubilizantes de membrana (triton X-100 y desoxicolato de Sodio). El número de proteínas marcadas fue limitado (hasta 17 bandas en el rango de PM de 10 a 240 Kd) y varias de ellas mostraron sensibilidad al agente  $\beta$ -mercaptoetanol, lo que sugiere la presencia de puentes disulfuro y/o residuos de cisteína en éstas. Se detectaron diferencias antigénicas cuantitativas en las 2 cepas, en especial a nivel de componentes de alto PM.

5. Los trofozoitos de las cepas P-1 y WB de G. lamblia presentaron heterogeneidad antigénica tanto de tipo cualitativo (determinada al emplear electroforesis bidimensional) como cuantitativo (detectado por medio de densitometría en extractos solubles totales, subcelulares y radiomarcados).

6. El procedimiento para obtención de extractos antigénicos de G. lamblia que involucra sonicación con el uso de detergentes (triton X-100 o desoxicolato de Sodio) presentó mejores resultados en cuanto a reactividad en ensayos serológicos de giardiasis experimental y clínica.

7. En la infección experimental de jerbos mongólicos singénicos utilizando trofozoitos de G. lamblia administrados via intragástrica, se determinó una alta susceptibilidad de los animales, especialmente machos, a la dosis infectante utilizada. Los periodos observados de prepatencia y patencia con picos de expulsión de quistes, asociados con autolimitancia y expulsión intermitente de éstos, semejan notablemente a los registrados en giardiasis humana. Por lo anterior, los jerbos mongólicos pueden considerarse un modelo animal idóneo de giardiasis experimental.

8. Los jerbos infectados con la cepa WB expulsaron concentraciones de quistes en heces más altas que aquellos infectados con la cepa P-1, sugiriendo esto una intensidad de infección diferente inducida por la cepa infectante de G. lamblia. Así, estas dos cepas mostraron una heterogeneidad en su comportamiento biológico que podría estar relacionada a la heterogeneidad antigénica detectada en ellas.

9. Los patrones cinéticos de aparición de Igs circulantes en los jerbos infectados fue ligeramente diferencial con la cepa infectante. Sin embargo, la especificidad antigénica de éstos fue distinta desde el punto de vista cuantitativo y cualitativo, tanto con Aqs solubles totales como radiomarcados del parásito. Las respuestas inmunes humorales inducidas fueron parcialmente cepa-dependientes y ésto también puede estar relacionado con la heterogeneidad antigénica de estas cepas de G. lamblia.

10. En el análisis seroinmunológico de muestras obtenidas en el estudio transversal de giardiasis clínica, no se encontró relación entre la presentación de la infección (sintomática o asintomática) y el título de Igs circulantes ni el patrón de reconocimiento antigénico. Sin embargo, los sueros individuales reconocieron patrones antigénicos con diferencias cuantitativas y cualitativas ante las cepas P-1 y WB sugiriéndose así la participación, por lo menos parcial, de la heterogeneidad antigénica del parásito en la inducción de respuestas inmunológicas variables en casos identificados clínicamente.

11. Se detectaron Ags de trofozoitos de G. lamblia con PM de 133, 92, 82, 65, 55 y 45 Kd que fueron preferencialmente reconocidos por sueros tanto de individuos con giardiasis como de jerbos mongólicos infectados experimentalmente. Considerando estas observaciones, así como estudios de otros grupos en relación a los Ags mencionados, se sugiere que éstos pueden ser empleados en el desarrollo de ensayos de inmunodiagnóstico más eficientes y en ensayos de inmunoprofilaxis de esta enfermedad.

## ANEXO 1

### REACTIVOS Y SOLUCIONES COMPLEMENTARIOS

Los reactivos empleados en este trabajo fueron de alta pureza. Solamente se indica la marca respectiva, tanto en el texto como en este apartado, cuando se trata de alguna de las presentaciones del reactivo más recomendables para su uso.

- **Medio TYI-8-33 suplementado con bilis (ATCC # 1404)**
  - Bilis bovina bacteriológica (Sigma Chem. Co.)... 0.5 g.
  - Tripticasa (casein digest peptone, BBL)..... 20 g.
  - Extracto de levadura (BBL)..... 10 g.
  - Dextrosa (Baker An.)..... 10 g.
  - Cloruro de Sodio..... 2 g.
  - Cisteína-monoclorhidrato..... 2 g.
  - Acido ascorbico (Merck)..... 0.1 g.
  - Fosfato de Potasio monobásico (Baker An.)..... 0.6 g.
  - Fosfato de Potasio dibásico (Baker An.)..... 1 g.
  - Citrato ferrico de amonio (Baker An.)..... 23 mg.
  - Disolver en H<sub>2</sub>O bidestilada hasta 800 ml.
  - Ajustar pH a 6.8-6.9 y aforar a 900 ml.
  - Filtrar en membrana de 0.22  $\mu$ m. de diámetro de poro
  - Realizar prueba de esterilidad
  - Completar con 100 ml. de suero bovino descomplementado (HyClone) y 1 ml. de stock de penicilina (50,000 UI)-estreptomocina (50 mg.). Almacenar a 4°C hasta su uso. Es estable por 2 semanas una vez completado.
  
- **Amortiguador de Fosfatos-Salina (PBS) [Stock 10X]**
  - Cloruro de Sodio..... 80 g.
  - Cloruro de Potasio..... 2 g.
  - Fosfato de Sodio dibásico heptahidratado..... 21.7 g.
  - ó dodecahidratado..... 28.98 g.
  - Fosfato de Potasio monobásico..... 2 g.
  - Disolver en H<sub>2</sub>O bidestilada hasta 800 ml.
  - Ajustar pH a 7.2 y aforar a 1 lt.
  - Para su uso como PBS 1X, disolver 1:10 con H<sub>2</sub>O bidestilada. Es estable por varias semanas.
  
- **Mezcla crómica [reactivo limpiador de Acido Crómico]**
  - Dicromato de Potasio..... 100 g.
  - Acido sulfúrico, concentrado..... 250 ml.
  - H<sub>2</sub>O bidestilada..... 750 ml.
  - Agregar el H<sub>2</sub>O al dicromato y mezclar
  - Agregar lentamente el ácido y mezclar hasta la disolución completa del dicromato.
  - Dejar enfriar la solución y almacenar a TA, protegida de la luz. Es estable por tiempo indefinido.

**\*Sulfato de Zinc al 33%**

Sulfato de Zinc heptahidratado (Merck)..... 330 g.  
H<sub>2</sub>O bidestilada c.b.p..... 1 lt.  
-Revisar periódicamente su densidad (1.18-1.20). La  
solución es estable por varias semanas.

**\*Lugol [solución iodinada de Dobell]**

Yodo..... 4 g.  
Yoduro de Potasio..... 8 g.  
H<sub>2</sub>O bidestilada c.b.p..... 200 ml.  
-Disolver completamente el yoduro de Potasio en el H<sub>2</sub>O  
y agregar posteriormente el Yodo. Almacenar a TA,  
protegida de la luz. Es estable por varios meses.

**\*PBS 0.1M, pH 6.8**

Fosfato de Sodio monobásico tetrahidratado..... 1.38 g.  
Fosfato de Sodio dibásico dodecahidratado.... 3.5815 g.  
Cloruro de Sodio..... 580 mg.  
-Disolver en H<sub>2</sub>O bidestilada hasta 80 ml.  
-Ajustar pH a 6.8 y aforar a 100 ml.

## ANEXO 2

### TECNICAS COMPLEMENTARIAS

#### \*DETERMINACION DE PROTEINAS CON EL REACTIVO DE FENOL SEGUN FOLIN [ENSAYO DE LOWRY MODIFICADO]\*

-Preparar las siguientes soluciones:

SOLUCION A: Sulfato de Cobre heptahidratado al 0.5% en H<sub>2</sub>O bidestilada.

SOLUCION B: Carbonato de Sodio al 2% en Hidróxido de Sodio 0.1N.

SOLUCION C: Tartrato de Sodio y Potasio al 2% en H<sub>2</sub>O bidestilada.

SOLUCION D: Mezclar 1 vol. de A con 1 vol. de C.

SOLUCION E: Mezclar 50 vol. de B con 1 vol. de D.

REACTIVO DE FOLIN-CIOCALTEU: Diluir 1:2 con H<sub>2</sub>O.

SOLUCION PATRON DE BSA: BSA en H<sub>2</sub>O (1 mg./ml.)

-Procesar la serie de tubos de acuerdo al siguiente formato:

Tubo #	1	2	3	4	5	6	7	8
BSA (1 mg/ml)	-	10	20	40	60	80	100	- $\mu$ l
H <sub>2</sub> O bid.	500	490	480	460	440	420	400	490 $\mu$ l
Muestra	-	-	-	-	-	-	-	10 $\mu$ l
Detergente**	5	5	5	5	5	5	5	- $\mu$ l
Solución E	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5 ml

\* Puede modificarse. En su caso se ajusta el volumen de H<sub>2</sub>O para completar 500  $\mu$ l.

\*\* Si el extracto fue obtenido en presencia de Tritón X-100 0.5%, se debe agregar la cantidad indicada de Tritón X-100 al 10%. Si se obtuvo con NaDOC 2%, se deben agregar 50  $\mu$ l. de NaDOC al 10%.

-Mezclar cada tubo y dejar reposar 10 min. a TA.

-Agregar a cada tubo 250  $\mu$ l. de Reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma o Merck) diluido 1:2 y 500  $\mu$ l. de SDS al 5%. Agitar en vortex y dejar reposar 30 min. a TA.

-Leer absorbencia a 750 nm.

-La concentración de la muestra problema se obtiene por interpolación con la curva patrón de BSA (10 a 100  $\mu$ g.).

#### \*ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES PLANOS DE POLIACRILAMIDA-SDS [SDS-PAGE]\*

\*A. Preparación de geles con concentración constante de Acrilamida (10%)\*

-Preparar las siguientes soluciones:

SOLUCION A: Acrilamida (Bio-Rad) al 30% en H<sub>2</sub>O bidestilada.

SOLUCION B: N,N'-metilén-bisacrilamida (Bio-Rad) al 2% en H<sub>2</sub>O bidestilada.

SOLUCION S: SDS al 20% en H<sub>2</sub>O bidestilada.

SOLUCION GE: Trizma base 1M, pH 8.8.

SOLUCION GC: Trizma base 1M, pH 6.8.

SOLUCION APS: Persulfato de amonio 10% en H<sub>2</sub>O bidestilada.

-Preparar los geles resolvidor y concentrador de acuerdo al siguiente formato:

	GEL RESOLVEDOR (30 ml.)	GEL CONCENTRADOR (10 ml.)
Sol. A	10 ml.	1.7 ml.
Sol. B	4 ml.	0.7 ml.
Sol. GE	11.25 ml.	-
Sol. GC	-	1.25 ml.
H <sub>2</sub> O bid.	4.4 ml.	6.8 ml.
Sol. S	150 µl.	50 µl.
TEMED (Bio-Rad)	13 µl.	10 µl.
Sol. APS	90 µl.	50 µl.

NOTA: Es conveniente deaerar la solución antes de agregar el TEMED. El gel resolvidor polimeriza en aproximadamente 30 min. y el gel concentrador en 20 min. máximo.

**\*B. Preparación de geles con un gradiente continuo de Acrilamida (5-15%)\***

-Preparar las siguientes soluciones:

**AMORTIGUADOR DE GEL CONCENTRADOR [BGC 8X]**

Trizma base 2M, pH 6.8..... 50 ml.  
 SDS 20%..... 4 ml.  
 H<sub>2</sub>O bidestilada c.b.p..... 100 ml.

**AMORTIGUADOR DE GEL RESOLVEDOR [BGE 5X]**

Trizma base 2M, pH 8.8..... 187.5 ml.  
 SDS 20%..... 5 ml.  
 H<sub>2</sub>O bidestilada c.b.p..... 200 ml.

**SOLUCIÓN ACRILAMIDA-BISACRILAMIDA-GLICEROL [ABG]**

Acrilamida..... 60 g.  
 N,N'-metilén-bisacrilamida..... 1.6 g.  
 H<sub>2</sub>O bidestilada c.b.p..... 60 ml.  
 Glicerol..... 60 ml.  
 H<sub>2</sub>O bidestilada c.b.p..... 200 ml.  
 Filtrar en Millipore o Whatman # 1

\*Se debe manejar con precaución (neurotóxica).

**SOLUCION APS: Persulfato de amonio 10% en H<sub>2</sub>O bidestilada.**

**AMORTIGUADOR DE MUESTRA (Para geles con gradiente continuo o de concentración constante de acrilamida).**

	2X	5X
Trizma base 2M, pH 6.8	312 µl.	780 µl.
SDS 20%	1 ml.	2.5 ml.
Glicerol	388 µl.	970 µl.
Colorante (azul de bro- mofenol o pironina Y)	0.00002%	
	(c.f.)	
H <sub>2</sub> O bidestilada c.b.p.	5 ml.	5 ml.

-Preparar los geles de acuerdo con el siguiente formato:

	GEL RESOLVEDOR (30 ml.)		GEL CONCENTRADOR (10 ml.)
	5%	15%	
BGE 5X	3.4 ml.	3.4 ml.	-
BGC 8X	-	-	1.25 ml.
H <sub>2</sub> O bidestilada	10.85 ml.	5.15 ml.	7.085 ml.
ABG	2.85 ml.	8.55 ml.	1.66 ml.
TEMED	4 $\mu$ l.	4 $\mu$ l.	5 $\mu$ l.
APS	17 $\mu$ l.	17 $\mu$ l.	50 $\mu$ l.

NOTA: Es conveniente deaerar la solución antes de agregar el TEMED. El gel resolvedor polimeriza en aproximadamente 45 min. y el gel concentrador en 20 min. máximo. El gel resolvedor se prepara empleando un formador de gradientes conectado a una bomba peristáltica la cual vierte la mezcla en el depósito para el gel.

**\*TINCION DE CARBOHIDRATOS CON ACIDO PERYODICO-SCHIFF [PAS] EN GELES TIPO SDS-PAGE\***

-Preparación del reactivo de Schiff:

1. Disolver 1 g. de fucsina básica en 200 ml. de H<sub>2</sub>O bidestilada en ebullición. Agitar 5 min. y enfriar hasta 50°C.
2. Filtrar y agregar al filtrado 20 ml. de HCl 1N. (preparado agregando 1.7 ml. de HCl fumante a 18.3 ml. de H<sub>2</sub>O). Enfriar hasta 25°C y adicionar 1 g. de metabisulfito de Sodio o Potasio (fresco). Dejar reposar la solución en la obscuridad por 12-24 hrs.
3. Agregar 2 g. de Carbón activado, agitar 1 min., filtrar y almacenar a TA.

-Procedimiento de tinción:

1. Someter las muestras a electroforesis como se acostumbra.
2. Colocar el gel plano en ácido acético al 7.5%, y dejarlo a TA por espacio de 1 hr.
3. Sumergir el gel plano en ácido peryódico acuoso al 2%, y almacenar a 4°C por 45 min.
4. Colocar el gel inmediatamente en el reactivo de Schiff, y refrigerarlo por 45 min. (No enjuagar la solución de ácido peryódico antes de colocar el gel en el reactivo).
5. Desteñir el del plano a TA en 2 o 3 cambios de ácido acético al 10%. Para desteñir con mayor rapidez, sumergir el gel en una solución conteniendo 50 ml. de HCl 1N, 5 g. de metabisulfito de Potasio en 950 ml. de H<sub>2</sub>O, la cual debe estar fresca para resultados óptimos. Este proceso resulta en un desteñimiento mas bien rápido, por lo cual se debe cuidar no desteñir demasiado el gel.
6. Almacenar los geles en un refrigerador para retención prolongada de las bandas. Los geles sobreteñidos o desteñidos pueden volver a ser teñidos.

**\*AUTORRADIOGRAFIA INDIRECTA Y REVELADO DE PLACAS DE RAYOS-X PARA GELES TIPO SDS-PAGE CON <sup>125</sup>I\***

**-Para autorradiografía indirecta:**

1. Correr electroforéticamente los Ags radiomarcados como se acostumbra.
2. Teñir las proteínas separadas de acuerdo con los protocolos convencionales.
3. Una vez desteñido el gel, lavarlo 3 veces con H<sub>2</sub>O bidestilada por espacio de 30 min. en agitación.
4. Tratar el gel con solución de Salicilato de Sodio 1M, pH 6.0 durante 30 min. en agitación.
5. Equilibrar con glicerol 3%-metanol 30% 5 min. con agitación.
6. Proceder al secado del gel.

**-Para el revelado de las placas:**

1. Dejar el cassette con el gel secado y película a TA por espacio de 1-2 hrs.
2. En condiciones de obscuridad o bajo luz con filtro para fotografía, sumergir la placa en la solución reveladora (revelador y reforzador Kodak GBX ó Kodak Dektol 1:2 en H<sub>2</sub>O) durante 1.5 min.
3. Enjuagar con H<sub>2</sub>O corriente por 3 min.
4. Sumergir la placa en solución fijadora (fijador y reforzador Kodak GBX) por espacio de 3 min.
5. Lavar la placa extensivamente con H<sub>2</sub>O corriente.

**\*TINCION DE PAPEL DE NITROCELULOSA [NCP] CON Ag TRANSFERIDO A PARTIR DE GELES TIPO SDS-PAGE\***

**-Para la tinción con amido black:**

1. Inmediatamente después de la transferencia de proteínas, teñir el NCP con solución de amido black (negro azul de naftol [Sigma Chem. Co.] 0.1% p/v, metanol 45% v/v, ácido acético 10% v/v) durante 5 min. en agitación.
2. Desteñir con metanol 45%-ácido acético 10% por 15 min. hasta observarse un fondo claro.
3. Lavar extensivamente con H<sub>2</sub>O bidestilada en agitación.

**-Para la tinción con tinta india:**

1. Lavar el NCP 2 veces con tween 20 al 0.3% en PBS (10 min. cada lavado).
2. Teñir empleando PBS-tween 20 0.3% con 1 µl. de tinta india (Pelikan) por ml. de la solución durante 1 hr.
3. Lavar extensivamente con H<sub>2</sub>O bidestilada.

**\*PRUEBA DE VIABILIDAD BASADA EN EXCLUSION DEL AZUL DE TRIPANO\***

1. Cosechar las células y lavarlas 2 veces con PBS.
2. Contar las células.
3. Preparar control de células muertas incubando  $5 \times 10^6$  trofozoitos en 1.5 ml. de PBS a  $56^\circ\text{C}$  en baño María por 30 min. Dejar enfriar.
4. En un tubo Eppendorf<sup>®</sup> colocar 9 vol. de la suspensión celular y agregar 1 vol. de solución de azul de tripano al 0.4% en PBS. Agitar en vortex para mezclar adecuadamente.
5. Esperar 5 min. a fin de permitir que las células muertas incorporen la tinta.
6. Contar las células vivas y muertas bajo observación microscópica en un total combinado mínimo de 200-300. La viabilidad se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ DE CELULAS VIABLES} = \frac{\% \text{ de cels. vivas contadas}}{\% \text{ total de células contadas}} \times 100$$

Como la membrana de una célula viva es impermeable a este colorante, aquella aparecerá incolora en presencia del azul de tripano.

**\*CRIOPRESERVACION DE TROFOZOITOS DE *G. lamblia* EN NITROGENO LIQUIDO\***

- Para la criopreservación:

1. Cultivar los trofozoitos en medio TYI-S-33 como se acostumbra, hasta la fase logarítmica de crecimiento.
2. Enfriar los tubos de cultivo por 30 min. en baño de hielo-agua.
3. Centrifugar los tubos a 2000 R.P.M. durante 10 min. a  $4^\circ\text{C}$ . Retirar el sobrenadante y contar los trofozoitos en cámara de Neubauer.
4. Agregar a la pastilla celular medio TYI-S-33 adicionado con dimetil-sulfóxido (DMSO) al 10% (en razón de 1 ml. por cada  $5 \times 10^6$  trofozoitos). Resuspender perfectamente la pastilla.
5. Transferir el contenido a criotubos Nunc<sup>™</sup> de 1.8 ml. de capacidad. Enfriar rápidamente en baño de hielo-agua.
6. Almacenar los tubos de inmediato en ultracongelador a temperatura de  $-70^\circ\text{C}$  durante una noche.
7. Transferir los criotubos a inmersión en Nitrógeno líquido y almacenarles hasta su descongelación. Bajo estas condiciones, pueden permanecer viables hasta por 3 años.

- Para la descongelación:

1. Colocar los criotubos a un baño a 37°C hasta su fusión completa (también se puede hacer a TA).
2. Transferir el medio con células a un tubo conico de 15 ml. conteniendo 1 ml. de medio TYI-S-33 fresco.
3. Centrifugar los tubos a 2000 R.P.M. por 5 min. a TA.
4. Decantar el sobrenadante y llenar con 15 ml. de medio TYI-S-33 fresco.
5. Revisar los trofozoitos en el microscopio óptico.
6. Incubar los tubos a 37°C como se acostumbra.

## VII. REFERENCIAS

- Aggarwal, A., Bhatia, A., Naik, S.R. y Vinayak, V.K. (1983). Variable virulence of isolates of Giardia lamblia in mice. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 77:163-167.
- Aggarwal, A. y Nash, T.E. (1986). Lack of cellular cytotoxicity by human mononuclear cells to Giardia. Journal of Immunology 136:3486-3488.
- Aggarwal, A. y Nash, T.E. (1987a). Giardia lamblia: RNA translation products. Experimental Parasitology 64:336-341.
- Aggarwal, A. y Nash, T.E. (1987b). Comparison of two antigenically distinct Giardia lamblia isolates in gerbils. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 36:325-332.
- Aggarwal, A. y Nash, T.E. (1989). Characterization of a 33-Kilodalton structural protein of Giardia lamblia and localization to the ventral disk. Infection and Immunity 57:1305-1310.
- Anders, R.F., Roberts-Thomson, I.C. y Mitchell, G.F. (1982). Giardiasis in mice: analysis of humoral and cellular immune responses to Giardia muris. Parasite Immunology 4:47-57.
- Anderson, N.L. y Hickman, B.J. (1979). Analytical techniques for cell fractionation. XXIV. Isoelectric points standards for two-dimensional electrophoresis. Analytical Biochemistry 93:312-320.
- Argüello-García, R., Sánchez-Guillén, M.C., Garduño, G., Valadez-Salazar, A., Martínez-García, M.C., Muñoz, O. y Ortega-Pierres, M.G. (1990). Evaluation of an immunoblot methodology for the detection of relevant Entamoeba histolytica antigens by antibodies induced in human amebiasis. Archivos de Investigación Médica (México) 21 (Supl. 3):1-8.
- Aust-Kettis, A., Thorstensson, R. y Utter, G. (1983). Antigenicity of Entamoeba histolytica strain NIH 200: a survey of clinically relevant antigenic components. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 32:512-522.
- Avrameas, S. (1969). Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Immunochemistry 6:43-52.
- Barriga, O.O. (1981). Influence of routine extraction procedures in the composition of Trichinella spiralis extracts. Journal of Parasitology 67:120-123.

- Belosevic, M., Faubert, G.M., MacLean, J.D., Law, C. y Croll, N.A. (1983). Giardia lamblia infections in Mongolian gerbils: an animal model. *Journal of Infectious Diseases* **147**:222-226.
- Belosevic, M. y Faubert, G.M. (1986). Comparative studies of inflammatory responses in susceptible and resistant mice infected with Giardia muris. *Clinical and Experimental Immunology* **65**:622-630.
- Bingham, A.K., Jarroll, E.L. Jr. y Meyer, E.A. (1979). Giardia sp.: Physical factors of excystation in vitro, and excystation vs. eosin exclusion as determinants of viability. *Experimental Parasitology* **47**:284-291.
- Bond, J. y Butler, P. (1987). Intracellular proteases. *Annual Review of Biochemistry* **56**:333-364.
- Brandborg, L.L., Tankersley, C.B., Gottlieb, S., Barancik, M. y Sartor, V.E. (1967). Histological demonstration of mucosal invasion by Giardia lamblia in man. *Gastroenterology* **52**:143-150.
- Brown, H.W. (1975). *Basic Clinical Parasitology*. 4a. ed. Appleton Century Crofts, New York, E.U.A.
- Buret, A., Gall, D.G. y Olson, M.E. (1991). Growth, activities of enzymes in the small intestine, and ultrastructure of microvillous border in gerbils infected with Giardia duodenalis. *Parasitology Research* **77**:109-114.
- Butcher, P.D. y Farthing, M.J.G. (1989). DNA probes for the faecal diagnosis of Giardia lamblia infections in man. *Biochemical Society Transactions* **17**:363-364.
- Butscher, W.G. y Faubert, G.M. (1988). The therapeutic action of monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of Giardia muris. *Immunology* **64**:175-180.
- Carlson, J.R., Heyworth, M.F. y Owen, R.L. (1986a). Response of Peyer's patch lymphocyte subsets to Giardia muris infection in BALB/c mice. I. T-Cell subsets. *Cellular Immunology* **97**:44-50.
- Carlson, J.R., Heyworth, M.F. y Owen, R.L. (1986b). Response of Peyer's patch lymphocyte subsets to Giardia muris infection in mice. II. B-Cell subsets: enteric antigen exposure is associated with immunoglobulin isotype switching by Peyer's patch B cells. *Cellular Immunology* **97**:51-58.
- Centers for Disease Control (1979). *Intestinal Parasite Surveillance, Annual Summary 1978*. CDC (E.U.A.).

- Clark, J.T. y Holberton, D.V. (1986). Plasma membrane isolated from Giardia lamblia: identification of membrane proteins. European Journal of Cell Biology 42:200-206.
- Coello-Ramírez, P. (1981). Giardiasis. Revista Médica del IMSS (México) 19 (2):243.
- Colowick, S.P. y Kaplan, N.O. (1984). Methods in Enzymology. Vol. 104. Jakoby, W.B. (ed.). Academic Press, Inc., E.U.A.
- Coral-Vázquez, R.M. (1990). Identificación y caracterización de clonas de una biblioteca de expresión que codifican para antígenos de superficie de Giardia lamblia relevantes en la relación hospedero-parásito. Tesis de Maestría. CINVESTAV-IPN, México.
- Cox, F.E.G. (1981). A new classification of the parasitic protozoa. Protozoological Abstracts 5:9-14.
- Craft, J.C. y Nelson, J.D. (1982). Diagnosis of giardiasis by counterimmunoelectrophoresis of feces. Journal of Infectious Diseases 145:499-504.
- Crossley, R. y Holberton, D.V. (1983). Characterization of proteins from the cytoskeleton of Giardia lamblia. Journal of Cell Science 59:61-103.
- Chávez, B., Knaippe, F., González-Mariscal, L. y Martínez-Palomo, A. (1986). Giardia lamblia: Electrophysiology and ultrastructure of cytopathology in cultured epithelial cells. Experimental Parasitology 61:379-389.
- Cheng-i, W. (1988). Parasitic diarrhoeas in China. Parasitology Today 4:284-287.
- David, P.H., Hadley, T.J., Aikawa, M. y Miller, L.H. (1984). Processing of a major parasite surface glycoprotein during the ultimate stages of differentiation in Plasmodium knowlesi. Molecular and Biochemical Parasitology 11:267-282.
- Deguchi, M., Gillin, F.D. y Gigli, I. (1987). Mechanism of killing of Giardia lamblia trophozoites by complement. Journal of Clinical Investigation 79:1296-1302.
- Dobell, C. (1920). The discovery of the intestinal protozoa in man. Proceedures of the Royal Society of Medicine 13:1-15.
- Dueñas-Iópez, M.H. (1984). Frecuencia de parasitosis intestinales diagnosticadas en el Laboratorio de Parasitología de la F.E.S.C. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, México.

- Dulley, J.R. y Grieve, P.A. (1975). A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination. *Analytical Biochemistry* 64:136-141
- Duncombe, V.M., Bolin, T.D., Davis, M., Fagan, M.R. y Davis, A.E. (1980). The effect of iron deficiency, protein deficiency and dexamethasone on infection, reinfection and treatment of Giardia muris in the mouse. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Sciences* 58:19-26.
- Edson, C.M., Farthing, M.J.G., Thorley-Lawson, D.A. y Keusch, G.T. (1986). An 88,000-Mr Giardia lamblia surface protein which is immunogenic in humans. *Infection and Immunity* 54:621-625.
- Einfeld, D.A. y Stibbs, H.H. (1984). Identification and characterization of a major surface antigen of Giardia lamblia. *Infection and Immunity* 46:377-383.
- Enciso, J.A., Fonseca, R., Arguello-Garcia, R., Cedillo, R. y Ortega-Pierres, M.G. (1989). Recurrent variations of surface antigens in clones of Giardia lamblia. The 380. Annual Meeting of The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Honolulu, Hawaii. Dic. 10-14.
- Engvall, E. y Perlmann, P. (1972). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *Journal of Immunology* 109:129-135.
- Erlich, J.H., Anders, R.F., Roberts-Thomson, I.C., Schrader, J.W. y Mitchell, G.F. (1983). An examination of differences in serum antibody specificities and hypersensitivity reactivity as contributing factors to chronic infection with the intestinal protozoan parasite, Giardia muris, in mice. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Sciences* 61:599-615.
- Farthing, M.J.G. (1985). Receptors and recognition mechanisms in intestinal infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 79:569-576.
- Farthing, M.J.G., Pereira, M.E.A. y Keusch, G.T. (1986). Description and characterization of a surface lectin from Giardia lamblia. *Infection and Immunity* 51:661-667.
- Faubert, G.M., Belosevic, M., Walker, T.S., MacLean, J.D. y Meerovitch, E. (1983). Comparative studies on the pattern of infection with Giardia spp. in Mongolian gerbils. *Journal of Parasitology* 69:802-805.

- Faubert, G.M., Bemrick, W.J. y Erlandsen, S.L. (1988). Is Giardiasis a true zoonosis? (Debate). *Parasitology Today* 4:66-71.
- Faust, E.C., Sawitz, W., Tobie, J., Odom, U., Peres, C. y Lincicome, D.R. (1939). Comparative efficiency of various techniques for the diagnosis of protozoa and helminths in faeces. *Journal of Parasitology* 25:241-262.
- Feely, D.E., Schoolmeyer, J.V. y Erlandsen, S.L. (1982). Giardia spp.: Distribution of contractile proteins in the attachment organelle. *Experimental Parasitology* 53:145-154.
- Ferguson, A. (1977). Intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *Gut* 18:921-937.
- Figueroa, L., Navarrete, N., Franjola, R. y Puga, S. (1981). A coproparasitoscopical survey among school children from the city of Concepcion, Chile. *Boletín Chileno de Parasitología* 16:66-67.
- Filice, F.P. (1952). Studies on the cytology and life history of Giardia from laboratory rat. University of California Publications in Zoology 57:53-146.
- Fraenkel-Conrat, H. (1957). Degradation of Tobacco Mosaic Virus with acetic acid. *Virology* 4:1-4.
- Garvey, J.S., Cremer, N.E. y Sussdorf, D.H. (1977). Ammonium Sulfate precipitation. En: Garvey, J.S., Cremer, N.E. y Sussdorf, D.H.(eds.). *Methods in Immunology*. 3a. ed. W.A. Benjamin, Inc., E.U.A.
- Goding, J.W. (1983). Analysis of antigens recognized by monoclonal antibodies. En: Goding, J.W. *Monoclonal antibodies: principles and practice*. 1a. ed. Academic Press, Inglaterra.
- Goka, A.K.J., Rolston, D.D.K., Mathan, V.I. y Farthing, M.J.G. (1986). *Lancet* 1:184-186.
- Gillin, F.D., Hagblom, P., Harwood, J., Aley, S.B., Reiner, D.S., McCaffery, M., So, D. y Guiney, D.G. (1990). Isolation and expression of the gene for a major surface protein of Giardia lamblia. *Proceedures of The National Academy of Sciences (U.S.A.)* 87:4463-4467.
- Handman, E., Goding, J.W. y Remington, J.S. (1980). Detection and characterization of membrane antigens of Toxoplasma gondii. *Journal of Immunology* 124:2578-2583.
- Hanff, P.A., Feihniger, T.E., Miller, J.N. y Lovett, M.A. (1982). Humoral immune response in human syphilis to polypeptides of Treponema pallidum. *Journals of Immunology* 129:1287-1291.

- Harc, D.F., Jarroll, E.L. y Lindmark, D.G. (1989). Giardia lamblia: Characterization of proteinase activity in trophozoites. *Experimental Parasitology* 68:168-175.
- Hason, P.R. y Patterson, B.A. (1987). Epidemiology of Giardia lamblia infection in children: cross-sectional and longitudinal studies in urban and rural communities in Zimbabwe. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 37:277-282.
- Helenius, A. y Simons, K. (1975). Solubilization of membranes by detergents. *Biochimica et Biophysica Acta* 415:29-79.
- Hewlett, E.L., Andrews, J.S., Ruffier, J. y Schaefer III, F.W. (1982). Experimental infection of mongrel dogs with Giardia lamblia cysts and cultured trophozoites. *Journal of Infectious Diseases* 145:89-93.
- Heyworth, M.F., Owen, R.L. y Jones, A.L. (1985). Comparison of leukocytes obtained from the intestinal lumen of Giardia-infected immunocompetent mice and nude mice. *Gastroenterology* 89:1360-1365.
- Heyworth, M.F. (1986). Antibody response to Giardia muris trophozoites in mouse intestine. *Infection and Immunity* 52:568-571.
- Heyworth, M.F. (1988). Time course of Giardia muris infection in male and female mice. *Journal of Parasitology* 74:491-493.
- Hill, D.R., Guerrant, R.L., Pearson, R.D. y Hewlett, E.L. (1983). Giardia lamblia infection of suckling mice. *Journal of Infectious Diseases* 147:217-221.
- Holberton, D.V. y Ward, A.P. (1981). Isolation of the cytoskeleton from Giardia. Tubulin and a low-molecular-weight protein associated with microribbon structures. *Journal of Cell Science* 47:139-166.
- Holden, A.A. y Freeman, R.R. (1981). Immunization against blood-stage malaria using purified parasite antigens. *Nature (London)* 294:361-364.
- Hollander, N. den, Riley, D. y Befus, D. (1988). Immunology of Giardiasis. *Parasitology Today* 4:124-131.
- Hoskins, L.C., Winawer, S.J., Broitman, S.A., Gottlieb, L.S. y Zamcheck, N. (1967). Clinical Giardiasis and intestinal malabsorption. *Gastroenterology* 53:265-279.

- Hossain, M.M., Ljungstrom, I., Glass, R.I., Lundin, L., Stoll, B.J. y Huldtt, G. (1983). Amoebiasis and giardiasis in Bangladesh: parasitological and serological studies. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 77:552-554.
- Hughes, W.S., Cerda, J.J., Holtzapple, P. y Brooks, F.P. (1971). Primary hypogammaglobulinemia and malabsorption. *Annals of Internal Medicine* 74:903-910.
- Instituto Mexicano del Seguro Social (1990). Boletín Epidemiológico Anual. IMSS, México.
- Janoff, E.N., Craft, J.C., Pickering, L.K., Novotny, T., Blaser, M.J., Knisley, C.V. y Reller, L.B. (1989). Diagnosis of *Giardia lamblia* infections by detection of parasite-specific antigens. *Journal of Clinical Microbiology* 27:431-435.
- Janoff, E.N., Taylor, D.N., Echeverría, P., Glode, M.P. y Blaser, M.J. (1990). Serum antibodies to *Giardia lamblia* by age in populations in Colorado and Thailand. *Western Journal of Medicine* 152:253-256.
- Jensen, K. (1959). Tesis. Munksgaard, Copenhagen, Dinamarca.
- Jones, E.G. y Brown, W.R. (1974). Serum and intestinal fluid immunoglobulins in patients with giardiasis. *Digestive Diseases* 19:791-796.
- Jokipii, A.M. y Jokipii, L. (1982). Serum IgG, IgA, IgM and IgD in giardiasis: the most severely ill patients have little IgD. *Journal of Infectology* 5:189-193.
- Kamath, K.R. y Murugasu, R. (1974). A comparative study of four methods for detecting *Giardia lamblia* in children with diarrhoeal disease and malabsorption. *Gastroenterology* 66:16-21.
- Kanwar, S.S., Walia, B.N.S., Ganguly, N.K. y Mahajan, R.C. (1987). The macrophage as an effector cell in *Giardia lamblia* infections. *Medical Microbiology and Immunology* 176:83-88.
- Kaplan, B.S., Uni, S., Aikawa, M. y Mahmoud, A.A.F. (1985). Effector mechanism of host resistance in murine giardiasis: specific IgG and IgA cell-mediated toxicity. *Journal of Immunology* 134:1975-1981.
- Koister, D.B. (1983). Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 77:431-432.

- Keyser, J.W., (1964). Staining of serum glycoproteins after electrophoretic separation in acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **2**:249-252.
- Kirkpatrick, C.E. y Farrell, J.P. (1984). Feline giardiasis: observations on natural and induced infections. *American Journal of Veterinary Research* **45**:2182-2188.
- Knight, R. (1980). Epidemiology and transmission of Giardiasis. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **74** (4):433-436.
- Kofoed, C.A. y Christiansen, E.B. (1915). On *Giardia microti* sp. nov., from the meadow mouse. University of California Publications in Zoology **16**:23-29.
- Koiv, E. y Grönwall, A. (1952). *Scandinavian Journal of Clinics and Laboratory Investigation* **4**:244.
- Kumkum, Khanna, R., Khuller, M., Meths, S. y Vinayak, V.K. (1988a). Plasma membrane associated antigens of trophozoites of axenic *Giardia lamblia*. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **82**:439-444.
- Kumkum, Khanna, R., Naik, C.K., Metha, S. y Vinayak, V.K. (1988b). Depressed humoral immune response to surface antigens of *Giardia lamblia* in persistent Giardiasis. *Pediatric Infectious Diseases* **7**:492-498.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**:680-685.
- Lambl, W. (1859). Mikroskopische untersuchungen der darmexcrete. *Vierteljahrsschrift für die Praktische Heilkunde (Prag)* **61**:1-58.
- Lewis, D. y Williams, H. (1979). Infection of the Mongolian gerbil with the cattle piroplasm *Babesia divergens*. *Nature (London)* **278**:170-171.
- Lewis, D.J.M., Green, E.L. y Ashall, F. (1990). Total genomic DNA probe to detect *Giardia lamblia*. *Lancet* **336**:257.
- Lewis, P.D. Jr., Belosevic, M., Faubert, G.M., Curthoys, L. y Maclean, J.D. (1987). Cortisone-induced recrudescence of *Giardia lamblia* infections in gerbils. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **36**:33-40.
- Lowry, O.K., Rosenbrough, N.J., Lewis-Farr, A. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**:265-275.

- Marchalonis, J.J. (1969). An enzymic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins. *Biochemical Journal* 111:299-305.
- Meerovitch, E. y Chadee, K. (1988). *In vivo* models of immunity in amebiasis. En: Amebiasis. Human Infection by Entamoeba histolytica. Ravdin, J.I. (ed.). John Wiley & Sons, E.U.A.
- Meyer, E.A. (1976). Giardia lamblia: Isolation and axenic cultivation. *Experimental Parasitology* 39:101-105.
- Meyer, E.A., Erlandsen, S.L. y Radulescu, S. (1984). Animal models for giardiasis. En: Erlandsen, S.L. y Meyer, E.A. (eds.). *Giardia and Giardiasis*. N.Y. Plenum Press, E.U.A.
- Meyers, J.D., Kuharic, H.A. y Holmes, K.K. (1977). Giardia lamblia infection in homosexual men. *British Journal of Venereal Diseases* 55:54-55.
- Mohareb, E.W., Hughes, J.B. y Bruce, J.I. (1989). Sensitive resolution of Giardia lamblia membrane antigens. *Journal of Chromatography* 480:421-426.
- Moore, G.T., Goss, W.M. y McGuire, D. (1969). Epidemic giardiasis at a ski resort. *New England Journal of Medicine* 281:402-407
- Moora, G.W., Sogandares-Bernal, F. y Dennis, M.V. (1982). Characterization of Giardia lamblia trophozoite antigens using polyacrylamide gel electrophoresis, high-performance liquid chromatography, and enzyme-labelled immunosorbent assay. *Veterinary Parasitology* 10:229-237.
- Nash, T.E., Gillin, F.D. y Smith, P.D. (1983). Excretory-secretory products of Giardia lamblia. *Journal of Immunology* 131:2004-2010.
- Nash, T.E. y Keister, D.B. (1985). Differences in excretory-secretory products and surface antigens among 19 isolates of Giardia. *Journal of Infectious Diseases* 152:1166-1171.
- Nash, T.E., Herrington, D.A., Losonsky, G.A. y Levine, M.M. (1987). Experimental human infections with Giardia lamblia. *Journal of Infectious Diseases* 156:974-984.
- Nash, T.E. (1989). Antigenic variation in Giardia lamblia. *Experimental Parasitology* 65:238-241.
- Nayak, N., Ganguly, N.K., Walia, B.N.S., Wahi, V., Kanwar, S.S. y Mahajan, R.C. (1987). Specific secretory IgA in the milk of Giardia lamblia infected and uninfected women. *Journal of Infectious Diseases* 155:724-727.

- O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry* 250:4007-4021.
- Ouchterlony, O. (1968). *Handbook of Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis*. 1a. ed. Ann Arbor Science Publications, Michigan, E.U.A.
- Pekkala-Flagan, A. y Ruoslathi, E. (1982). Unfolded transferrin polypeptide chain is immunologically cross-reactive with similar derivatives of serum albumin and alpha-fetoprotein. *Journal of Immunology* 128:1163-1167.
- Petri, W.A. y Ravdin, J.I. (1991). Protection of gerbils from amebic abscess by immunization with the Galactose-specific adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity* 52:97-101.
- Phillips, R.E., Boreham, P.F.L. y Shepherd, R.W. (1984). Cryopreservation of viable *Giardia intestinalis* trophozoites. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 78:604-606.
- Radulescu, S. y Meyer, E.A. (1981). Opsonization *in vitro* of *Giardia lamblia* trophozoites. *Infection and Immunity* 32:852-856.
- Rendtorff, R.C. (1954). The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. *American Journal of Hygiene* 59:209-220.
- Roberts-Thomson, I.C., Stevens, D.P., Mahmoud, A.A.F. y Warren, K.S. (1976a). Giardiasis in the mouse: an animal model. *Gastroenterology* 71:57-61.
- Roberts-Thomson, I.C., Stevens, D.P., Mahmoud, A.A.F. y Warren, K.S. (1976b). Acquired resistance to infection in an animal model of giardiasis. *Journal of Immunology* 117:2036-2037.
- Roberts-Thomson, I.C. y Mitchell, G.F. (1978). Giardiasis in mice. 1. Prolonged infection in certain mouse strains and hypothyroid (nude) mice. *Gastroenterology* 75:42-46.
- Rosoff, J.D. y Stibbs, H.H. (1986a). Isolation and identification of a *Giardia lamblia*-specific stool antigen (GSA 65) useful in coprodiagnosis of Giardiasis. *Journal of Clinical Microbiology* 23:905-910.
- Rosoff, J.D. y Stibbs, H.H. (1986b). Physical and chemical characterization of a *Giardia lamblia*-specific antigen useful in the coprodiagnosis of Giardiasis. *Journal of Clinical Microbiology* 24:1079-1083.

- Schetcher, M. y Nogueira, N. (1988). Variations induced by different methodologies in Trypanosoma cruzi surface antigen profiles. Molecular and Biochemical Parasitology 29:37-46.
- Schleinitz, P., Justus, P., Stenzel, P., Owen, R. y Meyer, E. A. (1983). Successful introduction of culture-adapted Giardia into a rabbit model: ultrastructural features. Gastroenterology 84:1301.
- Scott, M.T. y Snary, D. (1979). Protective immunization of mice using cell surface glycoprotein from Trypanosoma cruzi. Nature (London) 282:73-76.
- Sehgal, A.K., Grewal, M.S., Chakravarti, R.N., Broor, S.L., Deka, N.C. y Chuttapi, P.N. (1976). Experimental Giardiasis in albino rats. Indian Journal of Medical Research 64:1015.
- Smith, P.D., Gillin, F.D., Brown, W.R. y Nash, T.E. (1981). IgG antibody to Giardia lamblia detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Gastroenterology 80:1476-1480.
- Smith, P.D., Elson, C.O., Keister, D.B. y Nash, T.E. (1982a). Human host response to Giardia lamblia. I. Spontaneous killing by mononuclear leukocytes in vitro. Journal of Immunology 128:1372-1376.
- Smith, P.D., Gillin, F.D., Spira, W.M. y Nash, T.E. (1982b). Chronic giardiasis: studies on drug sensitivity, toxin production, and host immune response. Gastroenterology 83:797-803.
- Smith, P.D., Gillin, F.D., Kaushal, N.A. y Nash, T.E. (1982c). Antigenic analysis of Giardia lamblia from Afghanistan, Puerto Rico, Ecuador, and Oregon. Infection and Immunity 36:714-719.
- Smith, P.D., Elson, C.O. y Wahl, S.M. (1983a). Human monocyte recruitment by and phagocytosis of Giardia lamblia. Federation Procedures 42:857.
- Smith, P.D., Keister, D.B. y Elson, C.O. (1983b). Human host response to Giardia lamblia. II. Antibody-dependent killing in vitro. Cellular Immunology 82:308-315.
- Stevens, D.P. (1978). Giardiasis in the mouse: clues to host immune mechanisms. En: Proceedings, Symposium on Waterborne Transmission of Giardiasis. US Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, Sept. 18-20.
- Stevens, D.P. (1982). Giardiasis: host-pathogen biology. Reviews of Infectious Diseases 4:851-858.

- Stevens, D.P. (1985). Selective primary health care: Strategies for control of disease in the developing world. XIX. Giardiasis. Reviews of Infectious Diseases 7:530-535.
- Tay, J., Salazar, S. y de Haro, I. (1978). Frecuencia de las Protozoosis en México. Salud Pública de México XX:297-337.
- Taylor, G.D. y Wenman, W.M. (1987). Human immune response to Giardia lamblia infection. Journal of Infectious Diseases 155:137-140.
- Thompson, A., Roland, R., Hecker, R., Gibson, G.E. y Reid, D.P. (1977). Immunoglobulin-bearing cells in giardiasis. Journal of Clinical Pathology 30:292-294.
- Towbin, H., Staehelin, T. y Bordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Procedures of The National Academy of Sciences (U.S.A.) 76:4350-4354.
- Underdown, B.J., Roberts-Thomson, I.C., Anders, R.F. y Mitchell, G.F. (1981). Giardiasis in mice: studies on the characteristics of chronic infection in C3H/He mice. Journal of Immunology 126:669-672.
- Vinayak, V.K., Jain, P. y Naik, S.R. (1978). Demonstration of antibodies in giardiasis using the immunodiffusion technique with Giardia cysts as antigen. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 72:581-582.
- Vinayak, V.K., Sharma, G.L. y Naik, S.R. (1979). Experimental Giardia lamblia infection in Swiss mice: a preliminary report. Indian Journal of Medical Research 70:195-198.
- Vinayak, V.K., Kumkum y Khanna, R. (1989). Serum antibodies to Giardial surface antigens: lower titres in persistent Giardiasis. Pediatric Infectious Diseases 7:492-498.
- Visvesvara, G.S. y Healy, G.K. (1980). Comparative antigenic analysis of Giardia from human, the cat, and the guinea pig. Journal of Protozoology 27:38A.
- Visvesvara, G.S., Smith, P.D., Healy, G.R. y Brown, W.R. (1980). An immunofluorescence test to detect serum antibodies to Giardia lamblia. Annals of Internal Medicine 93:802-805.
- Visvesvara, G.S., Dickerson, J.W. y Healy, G.R. (1988). Variable infectivity of human-derived Giardia lamblia cysts for Mongolian gerbils (Meriones unguiculatus). Journal of Clinical Microbiology 26:837-841.

- Wallis, P.M. and Wallis, H.M. (1986). Excystation and culturing of human and animal *Giardia spp.* by using gerbils and TYI-S-33 medium. *Applied and Environmental Microbiology* 51:647-651
- Ward, H.D., Alroy, J., Lev, B.I., Keusch, G.T. y Pereira, M.E.A. (1988). Biology of *Giardia lamblia*: Detection of N-Acetyl-D-Glucosamine as the only surface saccharide moiety and identification of two distinct subsets of trophozoites by lectin binding. *Journal of Experimental Medicine* 167:73-88.
- Wenman, W.M., Meuser, R.U. y Wallis, P.M. (1986). Antigenic analysis of *Giardia duodenalis* strains isolated in Alberta. *Canadian Journal of Microbiology* 32:926-929.
- Wolfe, M.S. (1978). Giardiasis. *New England Journal of Medicine* 298:319-321.
- Wolfe, M.S. (1984). Symptomatology, Diagnosis, and Treatment. En: Erlandsen, S.L. y Meyer, E.A. (eds.). *Giardia and Giardiasis*. Plenum Press, New York, E.U.A.
- World Health Organization (1986). Guidelines for the prevention and control of Giardiasis. WHO (Suiza).
- Zinneman, H.H. y Kaplan, A.P. (1972). The association of Giardiasis with reduced intestinal secretory immunoglobulin A. *Digestive Diseases* 17:793-797.