



95
Leg.
RECIBIDO EN
BIBLIOTECA
4723
21/12/82

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ANALISIS DE DIEZ AISLADOS DE
Giardia duodenalis POR
ISOELECTROENFOQUE**

T E S I S
Que para obtener el Título de
B I O L O G O
p r e s e n t a

MARIO NOE MARTINEZ GORDILLO



MEXICO, D. FACULTAD DE CIENCIAS 1995
SECCION ESCOLAR

FALLA DE ORIGEN



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE

Jefe de la División de Estudios Profesionales

Facultad de Ciencias

Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron el pasante(s) MARTINEZ GORDILLO MARIO NOE

con número de cuenta 7050587-2 con el Título: "ANÁLISIS DE DIEZ MUESTRAS DE Giardia duodenalis POR ISOELECTROENFOQUE"

Otorgamos nuestro Voto Aprobatorio y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de BIÓLOGO

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
Dra.	MARTHA	PONCE MACOTELA	
Director de Tesis			
Dr.	ALFONSO	TORRE BLANCO	
Dr.	GUILLELMO	LAGUNA HERNANDEZ	
Dra.	SARA	FRIAS VAZQUEZ	
Suplente			
Biol.	LAURA	GOMEZ LAGUNA	
Suplente			

A Martha mi compañera,

a mis hijos

Nitiella

y

Axayácatl.

Contenido:

Antecedentes y justificación	1
Ubicación del género <i>Giardia</i>.	3
Diagnóstico del género <i>Giardia</i>.	4
Las especies en el género <i>Giardia</i>.	5
Objetivo.	11
Hipótesis.	12
Material y métodos.	13
Resultados.	16
Discusión .	29
Conclusiones.	33
Referencias.	38
Apéndices.	42

Justificación y antecedentes .

Todas las especies del género *Giardia* son parásitas de vertebrados e interactúan con poblaciones ectotérmicas y endotérmicas. La población humana se parasita con organismos del grupo morfológico *Giardia duodenalis*, Filice 1952, sinonimia *G. lamblia*, *G. intestinalis*. Este parásito es cosmopolita y esporádicamente tiene comportamiento epidémico (Isaac-Renton, 1993). Su frecuencia varía desde menos del 1% hasta más del 50%. En la década de los setentas se estimó que habían alrededor de 200 millones de infecciones/año en los países subdesarrollados. En Inglaterra y los Estados Unidos, la giardiasis es la infección intestinal más común que se detecta en el hombre. En los Estados Unidos en 1983, se identificó a *Giardia* como la causante del 68% de los brotes epidémicos de diarrea. (Comité de expertos WHO, 1987). Lengerich, del Centro para el Control de las Enfermedades de Atlanta, encontró en los registros de la "National Hospital Discharge Survey" en el periodo de 1979 a 1987 que un promedio de 4600 personas por año se hospitalizaron debido a la giardiasis; calculó una tasa de 2.0/100,000 personas-año y la duración del tiempo de hospitalización estuvo dentro de un rango de 1 a 35 días, con una mediana de 4 días. También detectó que la tasa de hospitalización en niños menores de 5 años, fue de 4.0/100,000 niño-año y una tasa menor, de 0.7/ 100,000 personas-año, para pacientes cuyas edades estuvieron comprendidas entre los 5 y 19 años (comunicación personal).

En nuestro país se desconoce la frecuencia real; sin embargo, algunas estadísticas señalan que se le halla hasta en el 45 % de los coproparasitoscópicos positivos a parásitos. En el Servicio de Parasitología del Instituto Nacional de Pediatría un análisis de la frecuencia de los protozoarios parásitos del intestino, mostró los siguientes datos: En 1985, de 3539 muestras, el 77.7 % correspondió a *Giardia duodenalis* y sólo el 22.1 % a *Entamoeba histolytica*. En 1986, de 2615 muestras, a *Giardia* se le encontró en el 71.4 % y a *E. histolytica* en el 24.1 %. En 1987, de 2507 muestras positivas a protozoarios el 77 % fueron positivas para *Giardia* en tanto que solamente el 21.3 % lo fueron para *E. histolytica*. En 1988, el comportamiento fue similar, el 77.5 % para *Giardia* y el 21.3 % para *E. histolytica*. Los porcentajes faltantes lo ocuparon *Trichomonas hominis*, *Cryptosporidium sp* e *Isospora belli*. La tendencia se ha mantenido hasta la fecha.

La elevada frecuencia de este protozooario se debe en parte a su ciclo de vida simple y eficiente; el quiste, se transmite por fecalismo e incluye la diseminación directa por el huésped (ano-mano-boca), o la dispersión indirecta a través de transmisores mecánicos tales como; moscas, cucarachas y vehículos como los alimentos o el agua de beber contaminados (Meyer, 1980). Con relación a ésta, se demostró la viabilidad de los quistes de *Giardia* obtenidos de los depósitos de agua contaminada, mediante el desenquistamiento y su establecimiento en cultivos axénicos *in vitro* (Sarafis, 1993). Por otra parte, algunas evidencias

apoyan la hipótesis de que la giardiasis es una zoonosis, sin embargo, se desconoce el papel real de otros mamíferos como reservorios y transmisores de organismos del género *Giardia*, (Buret, 1990, Strandén 1990, Xiao 1994)

Hoy se reconoce que *G. duodenalis* es un parásito que está entre las primeras diez causas de muerte por parásitos en las naciones subdesarrolladas (Thompson, 1993).

La giardiasis se presenta como una parasitosis asintomática o sintomática (Wilson, 1984) y produce diarrea; náusea; vómito; hiporexia; dolor abdominal postprandial inmediato; metereorismo; flatulencia; esteatorrea y síndrome de mala absorción intestinal, (Wright, 1980), por el bloqueo mecánico de la absorción, (Erlandsen 1974) y por alteración de la actividad enzimática de la mucosa intestinal (Nain, 1991).

Ubicación de género *Giardia*.

En los últimos años se implementaron técnicas Bioquímicas y de Biología Molecular para el estudio de los protozoarios, por esta razón, algunos conocimientos se transformaron, otros se pusieron en duda y muchos generaron nuevas incógnitas y expectativas. Por ejemplo, se aceptó la existencia de los cinco reinos y ahora el antiguo Phylum Protozoa se encuentra a nivel de subreino y en 1975 se redefinió al Orden Diplomonadida.

Orden Diplomonadida. Uno o dos cariomastigotes; géneros con dos

carionastigotes con simetría rotacional doble o en un género simetría bilateral; mastigotes individuales con uno a cuatro flagelos, típicamente uno de ellos recurrente y asociado con el citostoma o en los géneros más avanzados con orgánoides formando el eje celular; mitocondrias y complejo de Golgi ausentes, división intranuclear con huso; mitosis semiabierta reportada en un género; quistes presentes; de vida libre o parásitos.

De acuerdo con la nueva clasificación de los protozoarios (Levine 1980), el género *Giardia* se ubicó:

Reino:	Protista
Subreino:	Protozoa
Phylum:	Sarcomastigophora Honigberg y Balamuth 1963
Clase:	Zoomastigophorea Calkins, 1909.
Orden:	Diplomonadida (Wenyon, 1926) Brugerolle 1975
género:	<i>Giardia</i> , Kunstler.

Diagnosís del género *Giardia*.

Género *Giardia*. Los organismos que se integran en el género se caracterizan por presentar dos estadios: uno vegetativo, el trofozoito y otro de resistencia, el quiste. Los trofozoitos tienen el cuerpo piriforme o elipsoidal; generalmente con el extremo anterior ampliamente redondeado y el extremo posterior saliente; son bilateralmente simétricos, dorsalmente convexos y

ventralmente aplanados o cóncavos; presentan un disco succionador (suctor) en la mitad anterior; poseen dos núcleos, un par de axostilos y ocho flagelos en cuatro pares. Los quistes son ovales o elipsoides con dos a cuatro núcleos y se observan fibrillas en su interior (Kudo, 1966).

Las especies en el género *Giardia*.

Una fuente de discusión se refiere a los criterios de especiación y al número de especies que integran al género *Giardia*. A continuación se anotan algunas de las descripciones que hace Kudo, (Kudo, 1966) en su ya clásico libro de Protozoología, para mostrar algunos de los criterios de la época.

Giardia intestinalis Lambl (*G. enterica*, Grassi; *G. lamblia* Stiles)

El trofozoito es piriforme, muy ancho y no es plástico; de 9 a 20 μM longitud por 5 a 10 μM de ancho; el disco suctor actúa como un organelo de adhesión; su citoplasma es hialino, tiene dos axostilos semejantes a una aguja, dos núcleos vesiculares cerca del margen anterior y ocho flagelos en cuatro pares; dos flagelos se originan cerca del margen anterior de los axostilos, otros dos surgen en la parte anterior de los axostilos y se separan del cuerpo en el tercio posterior, dos flagelos ventrales que son más gruesos se originan en los axostilos al nivel del núcleo y son libres; y los dos flagelos caudales que se originan en las puntas posteriores de los axostilos; cuando los flagelos se mueven activamente el organismo se desplaza hacia adelante con un

movimiento oscilatorio lateral; en el citoplasma puede encontrarse un cuerpo que se tiñe intensamente. Con respecto a los quistes, estos son ovoides y refringentes de 8 a 14 μM de largo por 6 a 10 μM de ancho, la pared del quiste es delgada y el contenido no llena la pared; en los especímenes teñidos pueden observarse de dos a cuatro núcleos, axostilos, fibrillas, y flagelos. El hábitat de este organismo es el lumen del duodeno del hombre.

Giardia duodenalis Davaine. Trofozoito que mide de 13 a 19 μM de largo por 8 a 11 μM de ancho; se le ha encontrado en el intestino de los conejos

Giardia canis Hegner. Trofozoito con 12 a 19 μM de largo por 7.6 a 10 μM de ancho; los quistes miden de 9 a 13 μM de largo por 7 a 9 μM de ancho se le aisló del intestino de los perros.

Giardia simoni Lavier. Mide de 14 a 19 μM de largo por 7 a 10.5 μM de ancho y vive en el intestino de las ratas.

G. ondratae Travis. Mide 7 μM de ancho por 13 μM de largo, se le encontró viviendo en el intestino del *Ondrata zibethica*.

G. caviae Hegner. El trofozoito mide de 8 a 14 μM de largo por 5.5 a 10 μM de ancho y vive en el intestino de los conejillos de indias.

G. muris Grassi. Vive en ratas y ratones y mide de 7 a 13 μM de largo por 5 a 10 μM de ancho.

Fillice en 1952, ofreció un esquema de especiación alternativo, propuso que para discriminar a los trofozoitos de *Giardia* se usara la morfología del cuerpo medio. De esta manera solo

reconoció tres especies: *Giardia apilis*, parásito de reptiles y anfibios, se caracteriza porque el cuerpo medio semeja la forma de gota de lágrima. *Giardia muris*, parásito de roedores que posee un cuerpo medio en forma redonda y *Giardia duodenalis* cuyo cuerpo medio tiene la forma de clava de martillo, vive en el intestino delgado de una gran cantidad de mamíferos, entre ellos el hombre.

Como lo muestran las descripciones anteriores, las normas para la especiación en el género *Giardia*, se establecieron con base en las características morfométricas y al concepto de que diferentes especies de huéspedes tienen que albergar diferentes especies de parásitos. Estos fundamentos dieron la pauta para la creación y el reconocimiento de más de 40 especies de *Giardia*; sin embargo, cuando se analiza la morfometría para definir a las especies, se encuentra que las medidas de éstas, se superponen dentro de un dominio que va de 7 a 20 μM de largo por 5.5 a 10 μM de ancho; esta particularidad hace difícil distinguir entre un trofozoito obtenido de un gato a otro que procede de una oveja o de un niño (Bertram 1984). Por otro lado, el panorama se complicó debido a que algunos experimentos de transmisión cruzada ponen en duda la hipótesis de la especificidad huésped-parásito (Hewlett 1982). También se observó que los patrones de hibridación del DNA de trofozoitos de *Giardia* obtenidos de primates y roedores, con una sonda de un fragmento clonado de 1.8 Kb de DNA ribosomal pG17, fueron semejantes (De Jonckheere 1990). Otra evidencia surgió al encontrar que sueros de pacientes con

giardiasis, reconocieron proteínas de *Giardia* procedentes de rumiantes; en todos los casos el reconocimiento se dió entre proteínas con pesos moleculares similares, por lo que los autores postularon que los rumiantes domésticos pueden ser reservorios para la infección de los humanos y visceversa; consideraron a la giardiasis como una zooantroponosis (Buret, 1990). Lo expuesto sugiere la necesidad de una revisión crítica del esquema de especiación de las más de 40 especies de *Giardia* (Bertram 1983).

Hoy el marco paradigmático de *Giardia* y la giardiasis se está transformando. Con el análisis inmunológico se buscan los mecanismos de la variación de la expresión de los determinantes antigénicos (Nash, 1989). Con los estudios isoenzimáticos se intenta definir los límites de la variación intraespecífica e interespecífica; con el objeto de agrupar a los aislados en función de sus semejanzas (Andrews, 1989; Meloni, 1989). Se escudriña al más fino nivel con técnicas de Biología Molecular para conocer la estructura y secuencia de los genes (Van Keulen, 1991; 1993). Se sabe por la comparación de secuencias del gen del RNA ribosomal 16S, que *Giardia* es un organismo que comparte rasgos primitivos con las bacterias y arqueobacterias (Sogin, 1989; Cavalier-Smith, 1989).

En la última década un mayor número de investigadores aceptó el esquema de las tres especies propuesto por Fillice y a estas se añadieron dos especies nuevas: 1.- *Giardia psittacci* Erlandsen 1987, parásito de pericos y que se puede discriminar, mediante

microscopia electrónica, porque carece del fleco lateral. 2.- *Giardia ardeae* Erlandsen 1990, quien la obtuvo del intestino de una ave zancuda y que difiere de las otras especies porque uno de los flagelos caudales es más corto que el otro. Sin embargo, este esquema no resuelve el problema ya que se deben definir dos aspectos: i.- Los trofozoitos que corresponden al grupo morfológico *Giardia duodenalis* pertenecen a una sola especie cuya variabilidad es amplia, o, ii.- Constituyen un grupo de especies que no se pueden discriminar por su morfología.

Para diferenciarlas en función de sus rasgos Bioquímicos, una estrategia adecuada es la de estudiar sistemas enzimáticos que cambian poco a lo largo de la evolución; a fin de reconocer a las especies crípticas o sibilantes (Ayala 1972, Carson 1975).

El análisis de isoenzimas en organismos microscópicos, representa algunas dificultades. Generalmente la muestra está constituida por varios millones de individuos y los individuos en una poblaciones se encuentran en una determinada proporción genotípica, razón por la que los fenotipos poco frecuentes quedan enmascarados por los fenotipos más comunes; esto explicaría por qué las pequeñas diferencias isoenzimáticas quedan ocultas por las isoenzimas más comunes.

La electroforesis de isoenzimas, en geles de agarosa, almidón, acetato de celulosa o poliacrilamida, muestra a la actividad de las isoenzimas como anchas bandas, (Meloni Ibdid, Andrews 1992, Proctor 1987, Cedillo-Rivera, 1989) que reflejan la distribución

de los diferentes fenotipos que se manifiestan en la población. Un método que permite obtener más información de la expresión de un sistema enzimático es el isoelectroenfoque. Se fundamenta en la conducta anfotérica de las proteínas; que se comportan como ácidos o bases en función del pH del medio en el que se encuentran y a su capacidad para inmovilizarse en un campo eléctrico; cuando la carga de la proteína es igual a la del pH, es decir, la carga neta es cero: el punto isoelectrico (pI).

El análisis de las proteínas por isoelectroenfoque puede dar más información de los límites de la variabilidad genética de las poblaciones que integran el grupo morfológico *Giardia duodenalis*; razón por la que se propuso la siguiente meta:

Objetivo

Caracterizar diez aislados de *Giardia duodenalis*, mediante el isoelectroenfoco de tres sistemas isoenzimáticos.

Hipótesis

Si hay gran especificidad huésped parásito, entonces el patrón de agrupación mostrará similitud; ya que las muestras poblacionales de *Giardia duodenalis* se obtuvieron de una especie de huésped.

Material y métodos.

Los trofozoitos de diez aislados de *Giardia duodenalis* se obtuvieron de niños mexicanos; ocho de éstos se obtuvieron por desenquistamiento (Ponce, 1990), uno por aspirado duodenal y otro mediante clonación (Tabla 1). Los parásitos se crecieron en el medio de cultivo TYI-S-33 (Keister 1983), en tubos de 13X100 con tapón de rosca y se cosecharon después de 72 horas.

Para desadherirlos de las paredes de vidrio, los tubos de cultivo con los trofozoitos se enfriaron durante 20 minutos en un baño de hielo, se concentraron mediante centrifugación a 3000 g el sobrenadante se descartó y el botón de células se lavó tres veces con solución salina fosfatos (PBS) pH 7.2 a 4°C.

Posteriormente, se resuspendieron en un volumen igual de una solución que tenía una concentración final de 1 mM de Etilendiamintetracétato de Sodio (EDTA), 1 mM de Ácido aminocaproico y 1 mM de ditiotreitól (DTT). La lisis de los trofozoitos se llevó a cabo mediante tres ciclos de congelación descongelación en Nitrogeno líquido; luego los extractos libres de células se obtuvieron por centrifugación a 30 000 g y a 4°C durante 30 minutos, el extracto de cada uno de los aislados se almacenó en alícuotas de 20 µL a -192°C hasta su uso.

La concentración de las proteínas de cada extracto se determinó por medio del método de Lowry, y para la elaboración de la curva estándar se usó albúmina sérica bovina (Lowry 1951).

Tabla 1. Se anotan la denominación y la forma de obtención de los aislados que se estudiaron en el presente trabajo.

Denominación	forma de obtención
1.-INP260588-MAR	Desenquistamiento
2.-INP051187-MG	Desenquistamiento
3.-INP100288-CMG1	Clona del aislado MG
4.-INP040189-NIT-1	Desenquistamiento
5.-INP220290-NIT-2	Desenquistamiento
6.-INP240490-NIT-3	Desenquistamiento
7.-INP020590-NIT-4	Desenquistamiento
8.-INP031091-NIT-5	Aspirado duodenal
9.-INP250991-NIT-6	Desenquistamiento
10.-INP240392-NIT-11	Desenquistamiento

Tabla 1. Se anotan la denominación y la forma de obtención de los aislados que se estudiaron en el presente trabajo.

Denominación	forma de obtención
1.-INP260588-MAR	Desenquistamiento
2.-INP051187-MG	Desenquistamiento
3.-INP100288-CMG1	Clona del aislado MG
4.-INP040189-NIT-1	Desenquistamiento
5.-INP220290-NIT-2	Desenquistamiento
6.-INP240490-NIT-3	Desenquistamiento
7.-INP020590-NIT-4	Desenquistamiento
8.-INP031091-NIT-5	Aspirado duodenal
9.-INP250991-NIT-6	Desenquistamiento
10.-INP240392-NIT-11	Desenquistamiento

El isoelectroenfoque se efectuó en una cámara de electroforesis vertical (Protean Iixi de Bio-Rad) en un gel ~~Appendice 4~~ de acrilamida al 5.5 % en el que se generó un gradiente de pH, en un rango de 3 a 10, por la adición del 6.5% de anfolitos. En cada pozo del gel se colocaron 10 µg de cada uno de los extractos, para monitorear el desarrollo del isoelectroenfoque, se pusieron en un pozo, 5 µL de una solución que contenía una mezcla de proteínas con puntos isoelectrónicos ya determinados. ~~Appendice 4~~ De éstas, la ficocianina es azul, la mioglobina equina es café, la hemoglobina A humana es roja, la hemoglobina C humana es roja, y el citocromo es rojo. Para observar la actividad de la enzima a estudiar, también se corrieron 3 µg de las enzimas: malato deshidrogenasa descarboxilasa (enzima málica, ME) E.C.1.1.1.40, glucosa fosfato isomerasa (GPI) E.C.1.1.1.49 o fosfoglucomutasa (PGM) E.C. 2.7.5.1. Los geles se preenfocaron a 200 V 1.5 W durante 15 minutos y se enfocaron a 800V 3.0 W durante 1800 volt-hora. Después, los geles, se desmontaron y cada uno se reveló para las enzimas antes mencionadas, ME, GPI o PGM. Cada gel se procesó por separado y se incubó a 37° C durante una hora con la mezcla de sustratos e indicadores adecuada para cada enzima y de acuerdo a los procedimientos descritos por Harris y Hopkingson ~~Appendice 4~~ (Harris 1976). Las proteínas con pl conocidos se tiñeron con Azul de Coomassie en ácido perclórico durante 30 minutos.

Las bandas de la actividad se registraron de los geles, antes de

... ..

fijarlos y secarlos, como existentes (1) o no existentes (0); se elaboró una base de datos en donde cada uno de los aislados se tomó como una Unidad Taxonómica Operativa (OTU) y las bandas como características, posteriormente se interpretaron con el programa de taxonomía numérica NTSYS-PC. Para compararlos se usó el índice de distancia denominado: distancia genética estándar de Nei; que mide el promedio de las diferencias entre codones por gen entre dos poblaciones (Nei, 1972) y un algoritmo de agrupación llamado algoritmo de ligamento no ponderado UPGMA (unweighted pair group mathematical average) (Crisci 1989; Hillis, 1990) en donde el fenograma se construye por la unión del par de taxa que tiene la menor distancia genética; seguido por la adición de taxa o grupos de taxa que se encuentran con mayor distancia genética.

Los experimentos de isoelectroenfoque se hicieron por triplicado.

Resultados.

El isoelectroenfoque de la enzima málica con diez aislados de *Giardia duodenalis* se muestra en la figura 1A y 1B. Las bandas de actividad se encontraron en un rango de puntos isoelectrónicos desde 5.7 hasta 7.6. En la figura 1A se observa que los aislados CMG1, NIT-3, NIT-4, NIT-5 y NIT-6 en los carriles 3, 6, 7, 8 y 9 presentaron bandas que comparten puntos isoelectrónicos; patrones de bandeo diferente se observaron en los aislados MAR y NIT-11, carriles 1, 10 y con el mayor número de diferencias los aislados NIT-1 y NIT-2, carriles 4, 5. Un rasgo que llama la

atención es la diferencia que presentan el aislado paterno MG con respecto a su clona, ya que esta carece de tres bandas tenues. Para verificar estas diferencias se corrió por triplicado un gel en el cual se aumentó la concentración de las proteínas Fig. 1B. En el aislado paterno MG, carril 2, se observaron tres bandas indicadas con flechas, que están ausentes en la clona CMG1, carril 3.

La actividad de la glucosa fosfato isomerasa se muestra en la figura 2, se observó una gran cantidad de bandas y los pI están muy cercanos entre sí; van desde 5.1 hasta 7.5. En el último carril se observa el patrón de la GPI control.

La figura 3 muestra las isoenzimas de la fosfoglucomutasa de diez aislados de *G. duodenalis*. Se observó que los aislados MG, CMG1, NIT-3, NIT-4, NIT-5 y NIT-6 presentaron un patrón semejante mientras que los patrones de los aislados MAR, NIT-1, NIT-2 y NIT-11 fueron diferentes. En los extremos de la fotografía se muestran los controles por triplicado de la PGM; en el penúltimo carril se duplicó la muestra del aislado NIT-1.

Con base en las bandas de actividad de las enzimas se elaboró el banco de datos que se muestra en la tabla 2; Posteriormente se calculó la distancia genética de Nei tabla 3 que sirvió de base para agrupar a los aislados mediante el algoritmo de ligamento no ponderado tabla 4 (UPGMA); aquí puede verse que la distancia entre el aislado paterno MG y su clona CMG1, es solamente de

0.055. El agrupamiento se presenta gráficamente en el fenograma de la figura 4 y 4A; aquí claramente se puede observar un patrón con tres conglomerados. Un primer gran conglomerado presentó dos subgrupos. el primer subconjunto involucra a los aislados MAR y NIT-11 (1, 10) y un el segundo subgrupo esta integrado por seis aislados; MG, CMG1 NIT-3, NIT-4, NIT-5 y NIT-6, (2, 3, 6, 7, 8, 9); por último, los aislados NIT-1 y NIT-2 que formaron el otro gran conglomerado.

Debe notarse que el aislado paterno (2) difiere de su clona (3) por una distancia de 0.055. Por otra parte, la diferencia entre los aislados NIT-1 y 2, fué superior a la unidad con respecto al grupo de los aislados MG, CMG1, NIT-2,4,5,6; y NIT-11, MAR. Un hallazgo sorprendente del análisis fue que solamente se encontró un árbol sin raíz.

Figura 1A. Se muestra el isoelectroenfoco de la enzima málica de diez aislados de *G. duodenalis* en el orden presentado en la tabla 1, a la izquierda se señalan los valores de los pI.

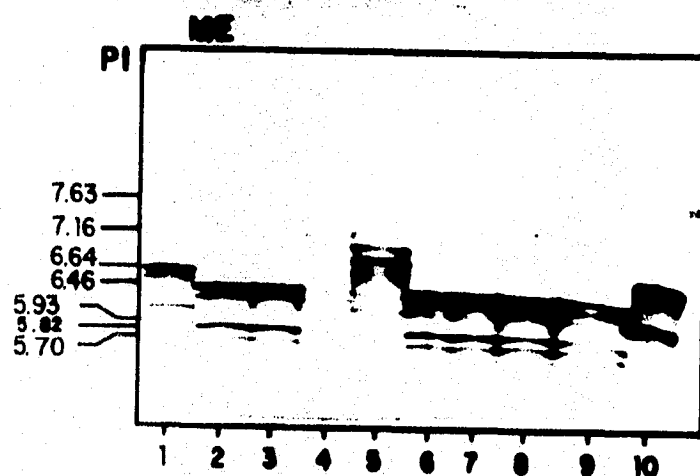


Figura 1B. Isoelectroenfoque de la enzima málica. Se muestra un gel con mayor concentración de proteínas, en el que se presentan tres isoenzimas (marcadas con flechas) del aislado paterno, carril 2; que no se encuentran en la clona, carril 3. Los valores de los puntos isoelectrónicos se anotan a la izquierda.

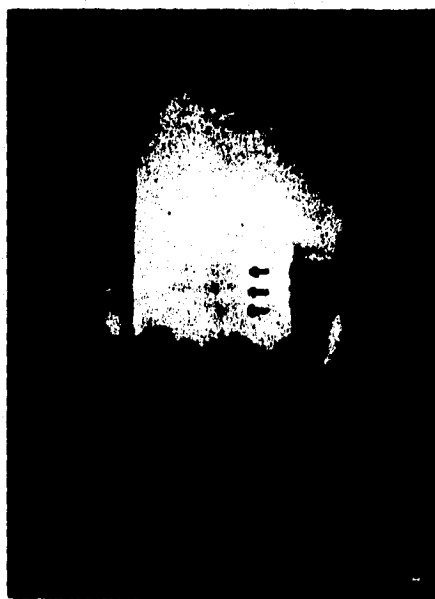


Figura 2. Figura que muestra el isoelectroenfoque de la enzima: glucosa fosfato isomerasa en diez aislados de *Giardia duodenalis*; se presentan los puntos isoelectricos y el control de la GPI.

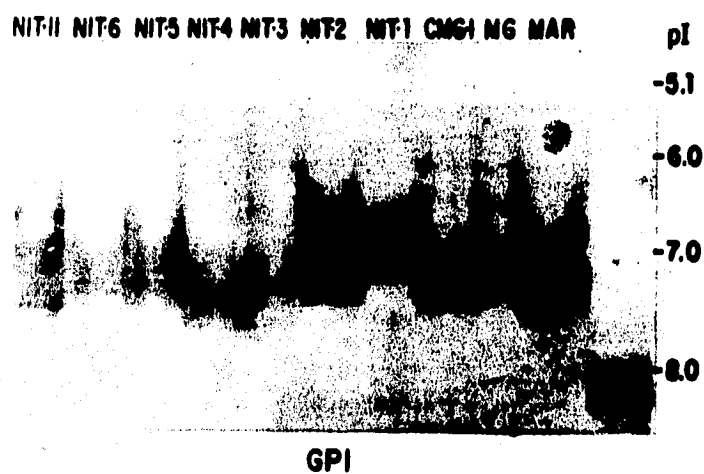


Figura 3, isoelectroenfoque de la enzima fosfoglucomutasa de diez aislados de *G. duodenalis*. El primero segundo y último carril señalan la actividad de la PGM control. El penúltimo carril corresponde a un duplicado de la muestra del aislado NIT-1.

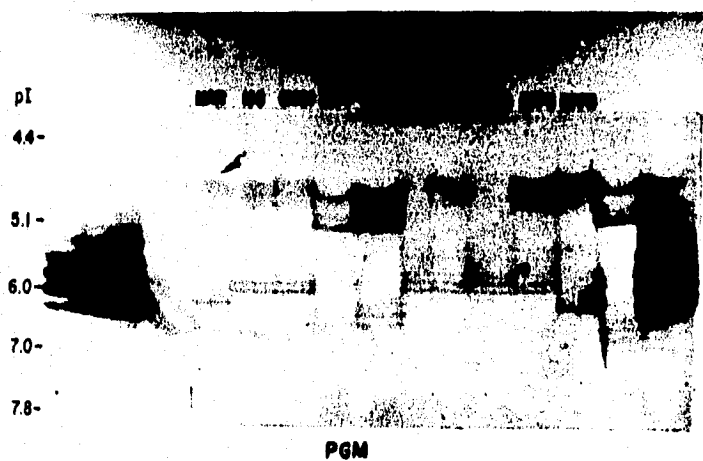


Tabla 2. Base de datos de 10 X 63 de las bandas de actividad (rasgos) de tres sistemas enzimáticos para 10 aislados de *Giardia duodenalis*. Los aislados constituyen las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU), y siguen el orden en el que se presentaron en la tabla 1.

OTU	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0
	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0
	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1
	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1
	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1

0 1 1 0 0 1 1 1 1 1
0 1 1 0 0 1 1 1 1 1
0 1 1 0 0 1 1 1 1 1
0 0 0 0 1 0 0 0 0 0
1 1 1 0 0 0 1 0 1 1
1 1 1 0 1 0 1 0 1 1
0 0 0 1 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 1 0
0 0 0 1 1 0 0 0 0 0
0 0 0 1 1 0 0 0 0 0
0 1 1 0 0 1 1 1 1 1
0 1 1 0 0 1 1 1 1 1
0 0 0 0 0 1 1 0 1 0
1 1 1 1 0 1 1 1 1 0
0 1 1 1 0 1 1 1 1 1
1 0 0 0 0 1 1 1 1 1
0 1 1 1 0 0 0 0 0 0
1 0 0 0 0 0 0 0 0 1
1 0 0 0 1 0 0 0 0 1
0 0 0 1 1 0 0 0 0 0
0 0 0 1 1 0 0 0 0 0
0 0 0 1 1 0 0 0 0 0
0 0 0 1 0 0 0 0 0 0
0 0 0 1 0 0 0 0 0 0
0 0 0 1 0 0 0 0 0 0

Tabla 3. Matriz de los valores calculados mediante el algoritmo de la distancia genética de Nei de 10 aislados de *G. duodenalis*. Los aislados siguen la ordenación de la tabla 1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.0000									
2	0.6642	0.0000								
3	0.6096	0.0546	0.0000							
4	1.6022	0.7107	0.8102	0.0000						
5	0.6812	0.8993	0.9317	0.6586	0.0000					
6	1.0975	0.2911	0.2365	1.0845	1.4067	0.0000				
7	0.9373	0.2769	0.2223	1.1757	1.3437	0.0912	0.0000			
8	0.7154	0.2069	0.1523	0.7489	0.9658	0.1212	0.2123	0.0000		
9	0.6285	0.1961	0.1415	0.8291	0.9506	0.1500	0.1459	0.0802	0.0000	
10	0.3880	0.4208	0.3662	1.3195	0.6609	0.5917	0.4887	0.4102	0.3851	0.0000

Tabla 4. Valores calculados por el algoritmo de ligamento no ponderado (UPGMA) para 10 aislados de *G. duodenalis*. Los aislados tienen la numeración de la tabla 1.

OTU Level	
1	0.388
10	0.610
2	0.055
3	0.215
6	0.091
7	0.157
8	0.080
9	1.008
4	0.659
5	-----

Figura 4. Fenograma que enseña el patrón de aglomeración de diez aislados de *G. duodenalis*. La denominación de los aislados es la presentada en la tabla uno. La escala superior muestra el grado de parecido entre los aislados.

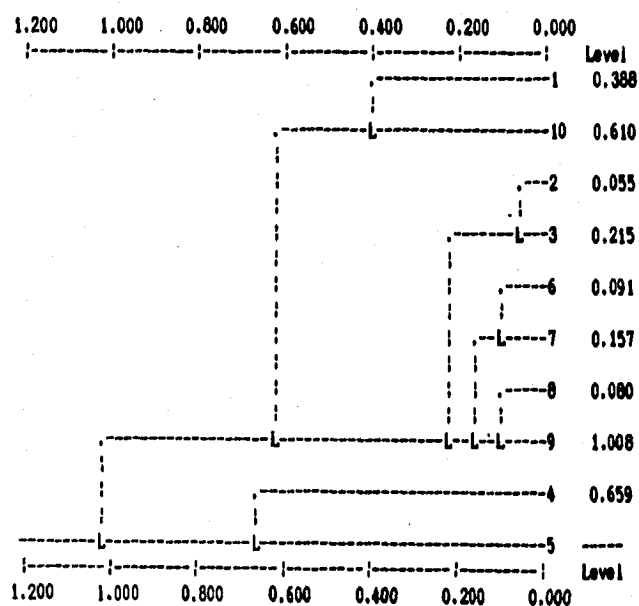
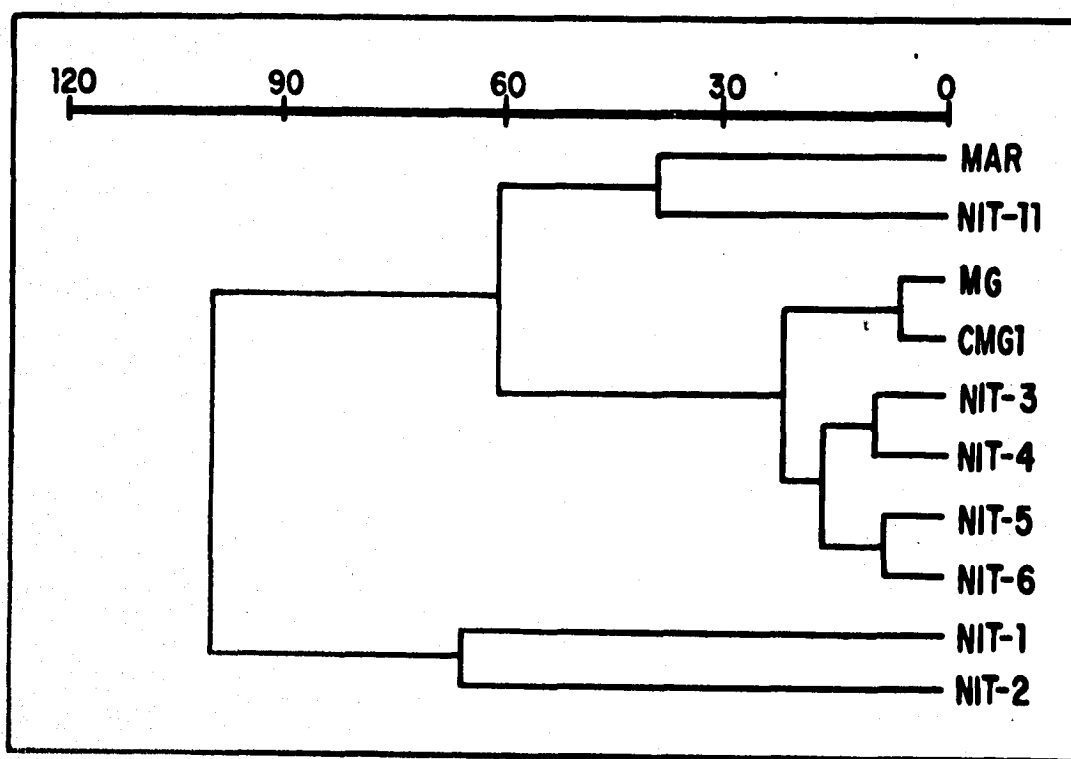


Figura 4A. Fenograma que representa a un árbol sin raíz, muestra la aglomeración de los aislados de *G. duodenalis* que se analizaron; en este se anota la denominación de cada uno de los aislados.



Discusión:

Las técnicas electroforéticas han evolucionado desde la etapa descriptiva, dando cuenta de la variación de una sola proteína hasta los estudios de *loci* múltiples, en donde se analizan los niveles de variabilidad genética y la estructura de las poblaciones. Fué una herramienta importante en la discusión de los neodarwinistas contra neutralistas y un subproducto de estos análisis que buscaban respuestas en el campo de la evolución constituyen la sistemática bioquímica (Avise, 1975).

Teóricamente las proteínas que migran a diferentes velocidades difieren en por lo menos un aminoácido que les confiere una diferencia de carga y/o masa. La colinearidad entre la secuencia de aminoácidos y la secuencia de los nucleótidos en el ADN implica que estas proteínas están codificadas por segmentos de ADN que difieren en por lo menos un par de bases. La motilidad electroforética de las proteínas da información indirecta acerca del ADN y de su forma de expresión. El término isoenzima describe proteínas que presentan formas moleculares múltiples pero que tienen la misma actividad enzimática y que se encuentran en un organismo o en diferentes organismos de la misma especie. Hay tres categorías de isoenzimas en función de su origen: 1.- Isoenzimas primarias debido a múltiples *loci* genéticos que codifican para cadenas polipeptídicas estructuralmente distintas. 2.- Aloenzimas debido a alelos múltiples en un simple *locus*, que determinan versiones estructuralmente diferentes de una cadena

polipéptidica en particular. 3.-Isoenzimas secundarias debidas a modificaciones post traduccionales en la estructura de la enzima (De Jonckheere 1984).

De los estudios de alelos múltiples surgió una conclusion, que hay un alto grado de similitud entre poblaciones conespecificas a lo largo de una especie y que este parecido puede patentizarse con los coeficientes de Rogers, Nei, Cavalli-Sforza y Edwards, Hedrick, entre otros (Avisé, 1975). Por ejemplo en 1972, Ayala (Ayala, 1972) apoyado en cinco loci diagnósticos formuló la primera descripción de un taxón con base en patrones alozimáticos y propuso dos pares de subespecies del complejo *Drosophila willistoni*; calculó que la probabilidad de equivocarse era de 1×10^{-10} . Después por pruebas de aislamiento reproductivo, confirmó que las poblaciones descritas estaban en el estatus de subespecies.

El presente trabajo generó el primer reporte en el que se usó al isoelectroenfoque en geles de acrilamida y el análisis de los patrones de bandeo mediante la distancia genética estándar de Nei, para la caracterización de diez muestras poblacionales de *Giardia duodenalis* aisladas de niños mexicanos.

Los resultados del isoelectroenfoque mostraron que los aislados de *Giardia* poseen sistemas isoenzimáticos que expresan un gran número de isoenzimas; sin embargo, es imposible discriminar entre isoenzimas primarias o isoenzimas secundarias. Llama la atención el número de bandas que se encontraron para los diferentes

sistemas enzimáticos. Resultados similares se reportaron en aislados de *Giardia* procedentes de Egipto, (Abaza, ibídem). Fujumoto, en 1992, comparó los patrones isoenzimáticos de *Spirometra erinace* y *S. mansonoides* y encontró perfiles de bandeo complejos, la glucosa fosfato isomerasa presentó isoenzimas en un espacio de pI entre 5 y 6.5; la fosfoglucomutasa en un rango de pH de 4.8 a 7.1 y el perfil más complejo lo exhibió la adenilato cinasa con pI en un intervalo desde 4.7 a 8.2.

Nuestros resultados de isoelectroenfoque en geles de acrilamida mostraron isoenzimas con pI muy cercanos entre sí; consideramos que con esta técnica se pueden detectar fenotipos que de otra manera quedan ocultos por los fenotipos más frecuentes. En este trabajo se encontró que la clona CMG1 presentó un patrón de bandeo diferente al del aislado paterno MG en las isoenzimas de la enzima málica; este indicio sugiere que la población del aislado MG está integrada por lo menos de dos subpoblaciones que expresaron diferentes patrones isoenzimáticos, esta evidencia que señala las diferencias entre una clona y su aislado paterno; es diferente a lo publicado en algunas otras partes del mundo, (Binz 1991). Sin embargo, apoyan nuestro hallazgo los resultados acumulados en el modelo del ratón lactante, en donde se probó que un huésped puede estar infectado con dos o más subpoblaciones del grupo morfológico *Giardia duodenalis*, (Upcroft 1994; Andrews, 1993).

El registro del desplazamiento y del número de bandas se llevó a

cabo antes de fijar y secar los geles, para evitar la pérdida de nitidez de las bandas. La base de datos que contiene más de 600 posiciones relativas se analizó con el programa NTSYS-PC. El análisis de las distancias genéticas mostró que los aislados de *Giardia* incluidos en este estudio se aglomeraron en tres grupos. Un resultado similar reportó Nash, (Nash, 1992), al analizar los resultados de hibridación del DNA de diferentes aislados de *Giardia* con una prueba del gen GLRF-C4, encontro que los aislados se podian dividir en por lo menos tres grupos. También se detectaron tres aglomerados en el grupo morfológico *G. duodenalis*, mediante la reacción en cadena de la DNA polimerasa, a partir de la amplificación del gen 16S del RNArribosomal, (Weiss, 1992). Si bien los resultados son parecidos, es evidente que las diferencias metodológicas y del material biológico impiden establecer algún tipo de correlación; sin embargo, llama la atención que los resultados sugieran un patrón con tres aglomeraciones. Esta circunstancia no deja de ser una interesante coincidencia ya que abre las puertas para la especulación. ¿Hasta dónde un modelo fenético refleja la realidad biológica?

Con el isoelectroenfoque se pudo documentar la divergencia entre el aislado paterno MG y su clona CMG1, diferencia que se refleja coherentemente en el fenograma y que apoya la consistencia del análisis.

Si una especie es predominantemente clonal, la distancia genética entre las clonas, debería discriminar grupos de clonas y con base

en este criterio posibilitar la asignación de un estatus en el nivel de especie o subespecie; sin embargo, se ignora el límite dentro del cual una población con reproducción asexual puede y debe considerarse como de la misma especie genómica; la pregunta está en el aire: ¿qué tan grande debe ser la distancia genética para apoyar la descripción de nuevos taxa dentro de los protozoos parásitos? (Tibayrenc, 1993). Añádase además el problema para definir el concepto de Especie en poblaciones con reproducción asexual. Dobzhansky las llamó pseudoespecies y Mayr concluyó que la definición biológica de especie se restringe a poblaciones con reproducción sexual (citados en Wiley, 1978).

Es evidente la necesidad de estudiar un mayor número de enzimas y aislados; así como también incluir aislados de diferentes huéspedes para encontrar sus patrones de agrupación e intentar definir el número de especies, subespecies o clonas que integran al grupo morfológico *G. duodenalis*.

Aunque las definiciones no son claras es imperativo avanzar en el conocimiento de las poblaciones de protozoarios parásitos para acumular evidencias y elaborar modelos que permitan aprehender la realidad biológica de estos organismos.

Conclusiones.

Los resultados del isoelectroenfoco en geles de acrilamida sugieren que es un método idóneo para distinguir enzimas con pl

muy cercanos entre si.

También se descubrió que el aislado MG está constituido por lo menos de dos subpoblaciones, que se expresaron con dos patrones isoenzimáticos en la enzima málica.

En contraposición con lo hipotetizado el análisis de los aislados de *Giardia duodenalis*, obtenidos de pacientes pediátricos, presentaron bajos nivel de similitud.

Los patrones de aglomeración de los aislados de *G. duodenalis*, obtenidos de humanos, mostraron tres grupos. Además al análisis fué coherente los valores de distancia genética situaron al aislado paterno y a su clona con una diferencia de 0.055, lo que permite afirmar que son muy parecidos.

Un primer paso es reconocer diferencias entre los aislados del grupo morfológico *Giardia duodenalis* con el objeto de establecer correlaciones entre los patrones de virulencia o de resistencia y caracterizar operacionalmente clonas y/o aislados de importancia médica y veterinaria.

El panorama es fragmentario porque se debe aumentar el número de aislados que pertenezcan al grupo morfológico *G. duodenalis* e incluir aquellos que procedan de diferentes especies de huésped. También es necesario definir si los aislados están constituidos por una o más subpoblaciones.

Creemos que los estudios de sistemática molecular serán de gran utilidad en el análisis de poblaciones de los protozoarios parásitos; para distinguir aquellas que son morfológicamente idénticas; para discriminar a las subpoblaciones virulentas; para reconocer subpoblaciones susceptibles o resistentes a los fármacos y para agruparlos en función de su parecido o de sus diferencias moleculares.

El estatus taxonómico de los patrones de asociación en el grupo morfológico *Giardia duodenalis* deberá esperar a la redefinición del concepto de especie, en organismos con reproducción asexual y al establecimiento de los límites de la especie genómica como una función de la similitud o de la distancia genética.

Referencias.

- Abaza SM, Sullivan JJ, Visvesvara GS. 1991. Isoenzyme profiles of four strains of *Giardia lamblia* and their infectivity to birds. Am J Trop Med Hyg, 44: 63-8.
- Andrews RH, Adams M, Boreham PFL, Mayrhofer G, Meloni BP. 1989. *Giardia intestinalis*: electrophoretic evidence for a species complex. Int J Parasitol, 19: 183-90.
- Andrews RH, Chilton NB, Mayrhofer G. 1992. Selection of specific genotypes of *Giardia intestinalis* by growth *in vitro* and *in vivo*. Parasitology, 105: 375-86.
- Avisé JC. 1975. Systematic value of electrophoretic data. Syst Zool, 23: 465-81.
- Ayala FJ, Powell JR. 1972. Allozymes as diagnostic characters of sibling species of *Drosophila*. Proc Nat Acad Sci, 69: 1094-96.
- Bertram MA, Meyer EA, Lile JD, Morse SA. 1983. A comparison of five axenic *Giardia* isolates. J Parasitol, 69: 793- 801.
- Bertram MA, Meyer EA, Anderson DL, Jones CT. 1984. A morphometric comparison of five axenic *Giardia* isolates. J Parasitol, 70:530-5
- Binz N, Thomson RCA, Meloni BP, Lymbery AJ. 1991. A simple method for cloning *Giardia duodenalis* from cultures and fecal samples. J Parasitol, 77: 627-631.
- Buret A, denHollander N, Wallis PM, Befus D, Olson ME. 1990. Zoonotic potential of giardiasis in domestic ruminants. J Infect Dis, 162: 231-7.

Carson HL, Johnson WE, Nair PS, Sene FM. 1975. Allozymic and chromosomal similarity in two *Drosophila* species. Proc Nat Acad Sci 72:4521-25.

Cavalier-Smith T. 1989. Archaeobacteria and archezoa. Nature, 339: 100-1.

Cedillo-Rivera R, Enciso-Moreno JA, Martinez-Palomo A, Ortega-Pierres G. 1989. *Giardia lamblia*: isoenzyme analysis of 19 axenic strains isolated from symptomatic and asymptomatic patients in México. Trans Roy Soc Trop Med Hyg, 83: 644-8

Crisci JV, Cigliano MM, Sarandón R, Morrone JJ, Roig-Junent S. 1989. Curso taller de técnicas numéricas en sistemática. Teoría y práctica. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de la Plata, Argentina.

De Jonckheere JF. 1984. Postgraduate course on biochemical techniques for the diagnosis of primary amoebic meningoencephalitis. Sponsored by ENEP-Iztacala, UNAM, CONACyT México; Instituut voor Hygiëne en Epidemiologie, Brussel, België and Commissariaat Generaal voor de Internationale Culturele Samenwerking van de Vlaamse Gemeenschap, België.

De Jonckheere JF, Majewska AC, Kasprzak W. 1990. *Giardia* isolates from primates and rodents display the same molecular polymorphism as human isolates. Mol Biochem Parasitol, 39: 23-8.

Erlandsen SL, Chase DG. 1974. Morphological alterations in the microvillous border of villous epithelial cells produced by intestinal microorganisms. Am J Clin Nutr, 27: 1277-86.

Erlandsen SL, Bemrick WJ. 1987. SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. J Parasitol, 73: 623-29.

- Erlandsen SL, Bemrick WJ, Wells CL, Feely DE, Knudson L, Campbell SR, Van Keulen H, Jarroll EL. 1990. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). J Parasitol, 76: 717-24.
- Fillice FP. 1952. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. Univ Cal Publ Zool, 57: 53.
- Fukumoto S, Tsuboi T, Hirai K, Phares CK. 1992. Comparizon of isosyme patterns between *Spirometra erinacei* and *Spirometra mansonoides* by isoelectric focusing. J Parasitol, 78: 735-38.
- Harris H, Hopkingson DA. 1976. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. Amsterdam: North-Holland Publishing Company.
- Hewlett EL, Andrews JS, Rufier J, Shaefer FW. 1982. Experimental infection of mongrel dogs with *Giardia lamblia* cysts and cultured trophozoites. J Infect Dis, 145: 89-93.
- Hillis DM, Moritz C. 1990. Molecular systematics. Sinauer associates Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts, USA.
- Isaac-Renton JL, Cordeiro C, Sarafis K, Shahriari H. 1993. Characterizataion of *Giardia duodenalis* isolates from a waterborne outbreak. J Infect Dis, 167: 431-40.
- Keister DB. 1983. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. Trans Roy Soc Trop Med Hyg, 77: 487-8.
- Kudo RR. 1966. Protozoologia. Cia. Editorial Continental, México, Séptima impresión. pp 905.
- Levine ND, Corliss JO, Cox FEG, Deroux G, Grain J, Honinberg BM, Leedale GF, Loeblich AR, Lom J, Lynn D, Merinfeld EG, Page EC, Poljansky G, Sprage V, Vavra J, Wallace FG. 1980. A newly revised

- classification of the protozoa. *J Protozool*, 27: 37-55.
- Lowry OH, Rosebrougt NJ, Far AI, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-75.
- Mayrhofer G, Andrews RH, Ey PL, Albert MJ, Grimmond TR. 1992. The use of suckling mice to isolate and grow *Giardia* from mammalian faecal specimens for genetic analysis. *Parasitology*, 105: 255-63.
- Meloni BP, Lymbery AJ, Thompson RCA. 1988. Isoenzyme electrophoresis of 30 isolates of *Giardia* from humans and felines. *Am J Trop Med Hyg*, 38: 65-73.
- Meloni BP, Lymbery AJ, Thompson RCA. 1989. Characterization of *Giardia* isolates using a non-radiolabeled DNA probe, and correlation with the results of isoenzyme analysis. *Am J Trop Med Hyg*, 40: 629- 37.
- Meyer EA, Jarrol EL. 1980. Giardiasis. *Am J Epidemiology* 111: 1-12
- Nain CK, Dutt P, Vinayak VK. 1991. Alterations in enzymatic activities of the intestinal mucosa during the course of *Giardia lamblia* infection in mice. *Ann Trop Med Parasitol*, 85: 515-22
- Nash TE. 1989. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Exp Parasitol*, 68: 238-41.
- Nash TE, Mowatt MR. 1992. Identification and characterization of a *Giardia lamblia* Group-specific gene. *Exp Parasitol*, 75:369-78.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *Am Natur*, 106 283-92.
- Ponce-Macotela M, Martinez-Gordillo MN, Alvarez-Chaoón R. 1990. Obtención y cultivo de *Giardia* spp. *Infectologia*, 10: 91-5.
- Proctor EM, Isaac-Renton J, Boyd J, Wong Q, Bowie WR. 1989.

isoenzyme analysis of human and animal isolates of *Giardia duodenalis* from British Columbia, Canada. Am J Trop Med Hyg, 41: 411-5.

Sarafis K, Isaac-Renton J. 1993. Pulse-field electrophoresis as a method of biotyping of *Giardia duodenalis*. Am J Trop Med Hyg, 48: 134-44.

Sogin ML, Gunderson JH, Elwood HJ, Alonso RA, Peattie DA. 1989. Phylogenetic meaning of the kingdom concept an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. Science, 243: 75-7

Strandén AN, Eckert J, Köhler P. 1990. Electrophoretic characterization of *Giardia* isolated from humans, cattle, sheep and dog in Switzerland. J Parasitol, 76: 660-8.

Thompson RCA, Reynoldson JA, Lymbey AJ. 1993. *Giardia* - from molecules to disease and beyond. Parasitology today, 9: 313-5.

Tibayrenc M, Kjellberg F, Ayala FJ. 1990. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas* and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. Proc Natl Acad Sci USA, 87: 2414- 2418.

Tibayrenc M. 1993. *Entamoeba*, *Giardia* and *Toxoplasma*: clones or cryptic species?. Parasitology today, 9:102-5.

Upcroft J, Upcroft P. 1994. Two distinct varieties of *Giardia* in a mixed infection from a single human patient J Euk Microbiol, 41: 189-94.

Van Keulen H, Horvat S, Erlandsen SL, Jarrol EL. 1991. Nucleotide sequence of the 5.8S and large subunit rRNA genes and the internal transcribed spacer and part of the external spacer

from *Giardia ardeae* Nucl Acids Res, 19: 6050.

Van Keulen H, Gutell RR, Gates MA, Campbell SR, Erlandsen SL, Jarrol EL, Kulda J, Meyer EA. 1993. Unique phylogenetic position of diplomonadida based on the complete small subunit ribosomal RNA sequence of *Giardia ardeae*, *G. muris*, *G. duodenalis* and *Hexamita* sp. FASEB, 7: 223-31.

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

WHO Expert Committee. 1987. Public health significance of intestinal parasitic infections. Bull WHO, 65: 575- 88.

Wiley EO. 1978. The evolutionary species concept reconsidered. Syst Zool, 27: 17-26.

Wilson A. 1984. *Giardia misteriosa*. Salud Mundial, marzo: 22-4.

Wright SG, 1980. Giardiasis and malabsorption. Trans Roy Soc Trop Med Hyg, 74: 436-7.

Xiao L, Herd RP, McClure KE. 1994. Periparturient rise in the excretion of *Giardia* sp. cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts as a source of infection for lambs. J Parasitol, 80: 55-9.

Apéndices.

Apéndice 1.

Composición del medio TYI-S-33 para el cultivo axénico de *Giardia duodenalis*, modificado por Keister por la adición de bilis.

Fórmula para elaborar 500 mL.

Glucosa	5 g
Acido citrico	100 mg
Citrato de fierro y amonio	15 mg
NaCl	1.0 g
K ₂ HPO ₄	500 mg
KH ₂ PO ₄	300 mg
Bilis bovina	500 mg
Cloruro de cisteina	1.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Tryptona	10 g

El pH se ajustó a 7.20 con NaOH 1 M.

Se añadió 1 mg de gentamicina y 20 mg de penicilina.

Posteriormente se esterilizó por filtración a través de una membrana de 0.22 µm y se complementó con 50 mL de suero humano previamente esterilizado por filtración y deplementado a 56 °C durante 30 minutos .

Apéndice 2.

Fórmula para la elaboración de solución salina fosfatos (PBS) pH 7.2.

K_2HPO_4	2.8 g
KH_2PO_4	0.4 g
NaCl	6.5 g

Aforar a un Litro. El pH de la solución deberá estar en un rango de pH entre 7.0 y 7.3.

Apéndice 3.

Para la determinación de microcantidades de proteínas en fluidos biológicos se utilizó el reactivo de fenol.

* La muestra se diluyó en cloruro de sodio 0.9% para ajustar la concentración de las proteínas dentro de un intervalo de 150 μ g hasta 1 mg.

* Se marcaron 11 tubos de 13X100, uno para el blanco y los otros 10 para los problemas

* Al tubo marcado para el blanco se le añadió 200 μ L de la solución de cloruro de sodio 0.9 %.

* A los tubos marcados como problema se les puso 200 μ L de la muestra.

* Se agregaron 2.2 mL del reactivo de Biuret Cat. No. 690-1 se mezclaron y se dejaron a la temperatura ambiente por 10 minutos.

* A cada tubo se le añadió 100 μ L del reactivo de fenol de Folin Ciocalteu Cat. No. 690-2. Los reactivos se mezclaron y se incubaron durante 30 minutos a la

temperatura ambiente.

* El contenido de los tubos se transfirió a celdas para espectrofotómetro y la absorbancia se leyó a 670 nm. El blanco se usó para calibrar al espectrofotómetro, en la elaboración de la curva estándar y la medición de la DO de los extractos.

* La concentración de las proteínas se determinó por interpolación de las DO en la curva estándar.

La curva estándar se elaboró con las siguientes concentraciones de proteína:

Tubo	ABSAU*
1	0 µg
2	250 µg
3	500 µg
4	750 µg
5	1000 µg

*Albúmina sérica bovina.

Apéndice 4.

Cantidades que se usaron para hacer 100 mL de una solución madre de acrilamida al 30 % de T y 2.66 % de C.

29.2 g Acrilamida

0.8 g Bis/acrilamida

Disolver con agitador magnético durante una hora, posteriormente filtrar al vacío en una membrana de 0.45 o 0.22 μ m y almacenar a 4°C en frasco ámbar o cubierto con papel de aluminio.

Cantidades necesarias para hacer 50 mL de una solución al 5.5 % de acrilamida, 10 % de glicerina y 6.5 % de anfolitos.

9.15 mL acrilamida/bisacrilamida

5.00 mL de glicerina

3.25 mL anfolitos

33.5 mL H₂O

100 μ L persulfato de amonio

10 μ L TEMED

El persulfato de amonio y el TEMED son los catalizadores para la polimerización del gel y se agregaron después de quitar el aire a la solución de acrilamida y segundos antes de colocarla en el molde de vidrio.

Apéndice 4

Las soluciones para el cátodo y el ánodo tienen la siguiente composición:

Catolito: NaOH 0.1 M 4 g/Litro

Anolito: H_3PO_4 0.06 % 3.06 mL/4.5 L

Estas soluciones se preparan antes de la electroforesis y de preferencia deberán elaborarse con agua desionizada.

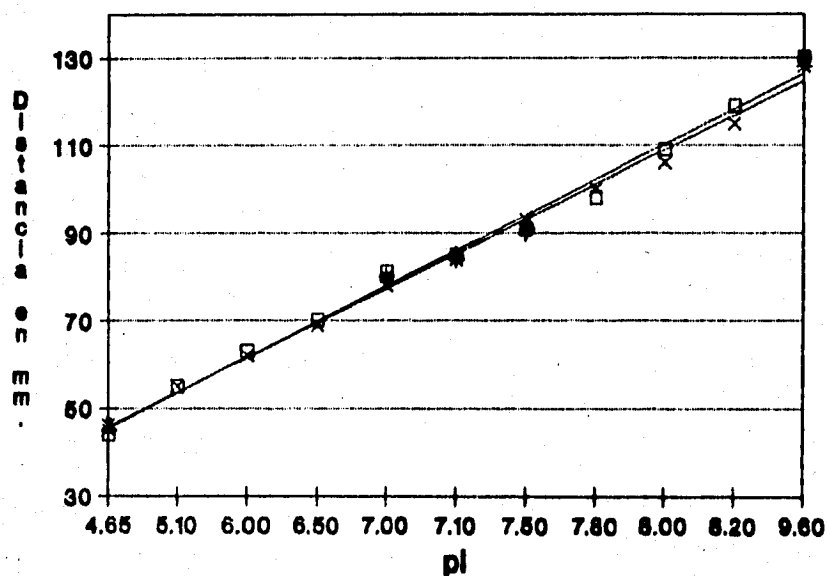
Es recomendable que estén a 4 °C para que las enzimas mantengan su actividad.

Apéndice 5.

Proteínas estándar de puntos isoeléctricos (pI) Bio-Rad y la gráfica que muestra su comportamiento a las condiciones experimentales.

	pI
Ficocianina	4.65
β -lactoglobulina B	5.10
Anhidrasa carbónica bovina	6.00
Anhidrasa carbónica humana	6.50
Mioglobina equina	7.00
Hemoglobina A humana	7.10
Hemoglobina C humana	7.50
Lentil lectina	7.80, 8.00 8.20
Citocromo C	9.60

Curva control de P I.



**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Apéndice 6.

Soluciones para revelar a las enzimas que se estudiaron.

Enzima málica.

7.00 mL	tris/HCl 0.5 M, pH 8.00
0.20 mL	MgCl ₂ 1.0 M
0.50 mL	NADP 10 mg/mL
0.10 mL	Malato de sodio 1.0 M
5.00 mg	MTT (sal de tetrazolio)
1.00 mg	PMS (metosulfato de fenazina)
12.0 mL	agua desionizada
para un volumen final de 20 mL.	

Apéndice 6.

Glucosa fosfato isomerasa (GPI)

7.00 mL	tris/HCl 0.5 M pH 8.0
0.20 mL	MgCl ₂ 1.0 M
0.50 mL	NADP 10 mg/mL
0.50 mL	glucosa 6 fosfato
	deshidrogenasa 100 U/mL
0.20 mL	Fructuosa 6 fosfato 10mg/mL
5.00 mg	MTT sal de tetrazolio.
1.00 mg	PMS
12.0 mL	agua desionizada
para un volumen final de 20 mL	

Apéndice 6.

Fosfoglucomutasa (PGM).

7.00 mL	tris/HCl 0.5 M pH 8.0
0.20 ml	MgCl ₂ 1.0 M
0.50 mL	NADP 10 mg/mL
0.70 mL	glucosa 6 fosfato deshidrogenasa 100 U/mL
0.50 mL	glucosa 1 fosfato 25 mg/mL
5.00 mg	MTT sal de tetrazolio
2.00 mg	PMS
12.0 mL	agua desionizada
Para un volumen final de 20 mL.	