

100



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CAMPUS IZTACALA

MODIFICACIONES DEL DISCO VENTRAL Y FLAGELOS DURANTE EL ENQUISTAMIENTO DE *Giardia lamblia*

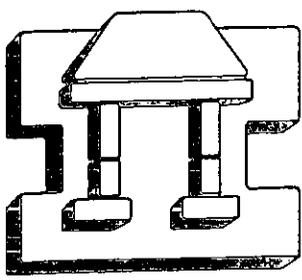
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE: BIÓLOGO

PRESENTA: ARMANDO PÉREZ RANGEL

204086

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSÉ MANUEL HERNÁNDEZ



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO 2001



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.

AGRADECIMIENTOS

Dr. José Manuel Hernández Hernández, quien me ha formado y me ayudado a concluir esta meta y porque se que puedo contar con el incondicionalmente.

Profesores: Biol. Maria de los Angeles Sanabria, Biol. José Antonio Martínez, Biol. Héctor Barrera, Biol. Felipe Cruz, por sus valiosos comentarios para el mejoramiento de este trabajo.

M. en C. Rafael Cortes Zarate, por su gran asesoría y su sincera amistad.

Biol. José Carmen Luna y al M. En C. Leobardo Mendoza por su gran apoyo técnico en el microscopio confocal.

Esther Cid por su apoyo en el trabajo secretarial y por su amistad.

Fortunato Mote, David Pérez, Armando Sánchez e Iván Vargas por su gran apoyo técnico.

Mis amigos del laboratorio, Hilda, Janneth, Araceli, David, Fortunato, Armando, Carlos, Rafael, Tonatiuh y Sergio.

A mis amigos Toño y Beto.

A mi amigo Ricardo Mejía por su impulso, por su apoyo y por su gran amistad.

Este trabajo se realizó en el laboratorio 26 del Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, bajo la dirección del Dr. José Manuel Hernández Hernández con el financiamiento del proyecto 211085-5-28776B de CONACYT.

DEDICATORIA

A mis padres:

Graciela y Pedro por su enorme sacrificio, porque me tuvieron paciencia y por que siempre sigamos tan unidos.

A mis hermanos:

Eva y Pedro, porque todo sea como antes... como extraño la infancia.

A mi hermano y esposa:

David y Carmela, por su cariño y apoyo pero sobre todo por los sobrinas que me han dado.

A mis pequeños sobrinitos:

Mónica y Ricardo David, los quiero mucho.

A mi esposa Lupita:

Gracias por apoyarme en todo y por estar siempre conmigo.

RESUMEN

Giardia lamblia presenta dos estadios durante su ciclo de vida: el quiste y el trofozoíto. Ambas formas tienen un citoesqueleto formado principalmente por el disco adhesivo, el cuerpo medio, 4 pares de flagelos. Durante el enquistamiento estas estructuras presentan cambios morfológicos profundos.

En este trabajo se determinaron los eventos ocurridos en el citoesqueleto de *G. lamblia* durante la fase de enquistamiento. Se utilizaron anticuerpos específicos contra dos de las proteínas más abundantes del citoesqueleto (giardinas y tubulina). El análisis por Western blot nos permitió establecer que tanto las giardinas como la tubulina aparentemente se mantuvieron constantes en ambos estadios. En el análisis de microscopía confocal, encontramos que aparentemente los flagelos no presentaron modificaciones estructurales durante el proceso; sin embargo el ordenamiento de éstos fue cambiando durante el enquistamiento, de una forma muy regular. Inicialmente, se agruparon sobre el eje central del parásito; después parcialmente fueron doblándose hacia la parte ventral de la *Giardia* y finalmente quedaron completamente enrollados en el interior del quiste. En la etapa de trofozoíto, el disco ventral presentó una forma circular, la cual se va perdiendo a lo largo del proceso, en las primeras 10 horas el disco se va plegando de los extremos laterales a manera de alas, en el quiste maduro la forma anular del disco se perdió, desdoblándose y dando la apariencia de una escalera de caracol. Con los cortes ópticos de estas imágenes pudimos establecer que el disco adhesivo no se fragmentó.

Este es el primer trabajo que estudia con anticuerpos específicos la organización del citoesqueleto durante el enquistamiento de *G. lamblia*.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN

Morfología	1
Trofozoíto	1
Quiste.....	2
Citoesqueleto	3
Ciclo de vida	5

ANTECEDENTES DIRECTOS	7
------------------------------------	----------

JUSTIFICACIÓN	9
----------------------------	----------

OBJETIVO GENERAL	11
-------------------------------	-----------

OBJETIVOS PARTICULARES	11
-------------------------------------	-----------

MATERIALES Y METODOS	12
-----------------------------------	-----------

Cepa	12
Condiciones de cultivo	12
Enquistamiento de <i>Giardia lamblia</i>	12
Electroforesis en geles de poliacrilamida	12
Cuantificación de proteínas	13
Inmunoelectrotransferencia	13
Revelado por quimioluminiscencia	13
Inmunofluorescencia	14
Microscopia confocal	14

RESULTADOS	15
-------------------------	-----------

Enquistamiento de <i>G. lamblia</i>	15
Seguimiento por microscopía de contraste de fases.....	15
Determinación del patrón de proteínas de quistes y trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	16

Inmunolocalización de tubulina y giardinas en extractos totales de trofozoítos y quistes de <i>G. lamblia</i>	17
Modificación a la técnica de inmunofluorescencia para <i>G. lamblia</i>	19
Patrón de tinción en trofozoítos de <i>G. lamblia</i> con anticuerpos específicos	20
Distribución de tubulina y giardinas durante el enquistamiento	21
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFÍA	33

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microscopía de contraste de fases, de <i>Giardia lamblia</i> a diferente tiempo	15
Figura 2. Electroforesis en geles al 10% de poliacrilamida SDS-PAGE, de extractos totales de trofozoítos y quistes	17
Figura 3. Inmunolocalización de actina en trofozoítos y quistes maduros	18
Figura 4. Detección de giardinas en trofozoítos y quistes maduros	19
Figura 5. Tinción de quistes de <i>G. lamblia</i> con Ab anti- tubulina	20
Figura 6. Inmunofluorescencia de trofozoítos de <i>G. lamblia</i> , 0 h de enquistamiento	21
Figura 7. Inmunolocalización de tubulina a diferentes tiempos de enquistamiento	22
Figura 8. Inmunolocalización de tubulina a 18 y 24 h de enquistamiento	22
Figura 9. Inmunolocalización de tubulina a 24 h de enquistamiento	23
Figura 10. Localización de giardinas 0 y 10 h de enquistamiento	24
Figura 11. Localización de giardinas a las 18 h de enquistamiento	25
Figura 15. Localización de giardinas a las 24 h de enquistamiento. A, B y C) Cortes ópticos	25

ABREVIATURAS

G. lamblia

KDa

ARNm

MEB

MET

MNC

PBS

PBS-T

Giardia lamblia

kilo Dalton

Acido ribonucleico mensajero

Microscopia electrónica de barrido

Microscopia electrónica de transmisión

Membrana de nitrocelulosa

Amortiguador de fosfatos salino

Amortiguador de fosfatos salino-Tween 20

INTRODUCCION

Giardia lamblia es uno de los protozoarios parásitos más comunes del hombre y de otros vertebrados. Este parásito es uno de los principales patógenos asociado con problemas gastrointestinales, tanto en países industrializados como en países en vías de desarrollo. (Adam 1991). Se presenta con mayor incidencia en la población infantil. La giardiosis puede ser asintomática o producir una variedad de manifestaciones clínicas entre las que se incluyen: diarrea, anorexia, malestar general y cefalea. La sintomatología parece depender de diversos factores entre los que destacan: la duración de la infección, factores predisponentes del hospedero y posiblemente, factores asociados o inherentes a la cepa de *giardia* que produce la infección (Wolfe 1992). En niños la giardiosis crónica produce malabsorción intestinal que causa retraso en el crecimiento y el aprendizaje (Farthing y col. 1986; Mason y Patterson 1987).

MORFOLOGIA

Trofozoíto

El trofozoíto posee simetría bilateral, mide de 10 a 20 μm de largo por 5 a 15 μm de ancho y 2 a 4 μm de espesor. Es dorsalmente convexo y en su porción ventral se encuentra un disco adhesivo característico de la especie, que ocupa casi la mitad anterior del cuerpo del parásito. Rodeando el cuerpo del parásito, entre la superficie dorsal y la ventral se forma una delgada expansión citoplasmática, conocida como borde ventrolateral. En el centro de esta estructura se encuentra una zona de apariencia menos rígida a la que se denomina área desnuda. Por debajo del disco adhesivo emerge un par de flagelos ventrales,

los cuales al parecer participan en el proceso de adhesión de los trofozoítos al epitelio intestinal (Holberton, 1974). Un segundo par de flagelos se ubican en la parte caudal; el tercero por fuera del disco en la superficie ventral y el cuarto, dorsalmente, en la región anterior de la célula.

Una estructura notable, es el cuerpo medio que se localiza en la mitad posterior del organismo, esta estructura por su forma se ha descrito como “uñas de martillo”. Su función es desconocida, aunque se sugiere que pudiera estar relacionada con la reestructuración del disco ventral (Feely y col. 1982; Crossley y col. 1986).

Giardia lamblia posee dos núcleos ovoides, situados uno a cada lado de la línea media, contienen un cariosoma central grueso formado por una masa de cromatina; al parecer ambos son transcripcionalmente activos. *Giardia* contiene 5 cromosomas y es un organismo poliploide. Carece de mitocondrias y hasta el momento no se han identificado peroxisomas, ni nucleolo, únicamente se conocen algunas actividades de tráfico de proteínas que han sugerido la presencia de un organelo con función similar al aparato de Golgi. Presenta un sistema de endomembranas formado por escasos canalículos de retículo endoplásmico (Feely y col. 1990). Estos conalículos se proyectan a partir de la cisterna perinuclear y a ellos frecuentemente se asocian corpúsculos densos y pequeños que pudieran corresponder a ribosomas. McCaffery y Gillin en 1994 describieron la presencia de un complejo membranoso similar al sistema de Golgi formado por escasos compartimentos.

Quiste.

Los quistes están envueltos por una pared fibrosa que les permite ser resistentes al medio ambiente. Entre la pared y la membrana plasmática del quiste se encuentra un espacio reducido en el que ocasionalmente se localizan tramos intactos de flagelos o

estrechos espacios de citoplasma limitados por membrana. La célula enquistada conserva la apariencia citoplásmica y el sistema vacuolar submembranal; incluso puede observarse pequeños fragmentos de retículo endoplásmico (Scheffild y Bjorvatn 1977) y al igual que el trofozoíto, carece de mitocondrias. La apariencia de los núcleos es muy similar a la de los trofozoítos y se encuentran colocados hacia un polo de la célula. En el prequiste se encuentran dos núcleos esféricos mientras en el quiste maduro se presentan cuatro. (Ortega y Adam 1997). Reiner y col. reportaron en 1990 durante el proceso de enquistamiento la existencia de vesículas de transporte que pueden ser elementos de un sistema de Golgi rudimentario.

CITOESQUELETO

Giardia lamblia tiene un citoesqueleto el cual, se puede obtener fácilmente después de incubar los trofozoítos con Tritón X-100. Está compuesto por: el disco adhesivo, el cuerpo medio, 4 pares de cuerpos basales que permanecen unidos al disco y los 8 flagelos a los que dan origen (Holberton y Ward, 1981)

El disco ventral o disco adhesivo es la estructura que por su tamaño y peculiaridad distingue a este parásito de otros flagelados. La estabilidad de esta estructura es muy importante ya que su función es clave para el mantenimiento del parásito en el intestino del hospedero, el disco funciona como una ventosa que mantiene fijo al trofozoíto evitando ser arrastrado por el contenido intestinal y el peristaltismo. Es una estructura cóncava que abarca los dos tercios de la superficie ventral, tiene una forma helicoidal con giro hacia la derecha alrededor de $1 \frac{1}{4}$ ó $1 \frac{3}{4}$ de vuelta provocando con ello que una parte se empalme con la superficie anterior del lado derecho. La estructura del disco es rígida, presenta un gran número de puentes cruzados entre sus componentes y uniones directas con los

flagelos, por esta razón el aislamiento de discos va acompañado de los flagelos. En la periferia del disco adhesivo se forma una estructura flexible denominada cresta lateral, que junto con la cresta ventrolateral del cuerpo celular producen la huella clásica en las superficies epiteliales en donde estuvo pegado el trofozoíto.

La estructura fina del disco en microscopía electrónica de transmisión muestra una sola capa de microtúbulos ordenados paralelamente y uniformemente espaciados (aproximadamente 50-60 nm de separación) cada uno de los cuales parece estar unido a la cara citoplasmática de la membrana por dos brazos que tienen actividad de dineína ATPasa. Los microtúbulos se ordenan concéntricamente formando aproximadamente 100 fibras en forma de espiral con giro hacia la derecha cerrándose el disco y quedando un anillo; a la parte central de este anillo se le conoce como zona desnuda, carece de microtúbulos y sólo está cubierta por membrana citoplásmica. De aproximadamente 100 microtúbulos que forman el disco 40-50 se originan en el extremo proximal o cuello, el resto se originan a lo largo de la circunferencia del disco (Friend 1966. Holberton 1973).

El citoesqueleto de *G. lamblia* está constituido por varias proteínas de las cuales tres son las más abundantes: tubulina, actina y giardinas. Crossley y Holberton (1983a) describieron 5 isoformas de tubulina. Esta proteína se encuentra distribuida en el disco ventral, axonemas, cuerpos basales y cuerpo medio (Crossley, y col. 1986). La tubulina de *Giardia* resulta ser muy interesante ya que se encuentra totalmente acetilada y destirosinada. Estas modificaciones postraduccionales se realizan en la alfa tubulina y sólo cuando está formando parte de los microtúbulos. El grado de acetilación tan alto que presenta *Giardia* no se ha encontrado en otro organismo o tipo celular. En las células de eucariontes, sólo una pequeña parte de sus microtúbulos presentan estas modificaciones y por lo general se asocian con microtúbulos estables al frío (Soltys, y col. 1994)

A lo largo de cada microtúbulo y proyectándose dorsalmente hacia el citoplasma, se localizan las microcintas formadas por giardinas, son un grupo de proteínas con un alto contenido de α hélices de pesos moleculares entre los 29-38 kDa. Comprenden el 20% de las proteínas del citoesqueleto y acompañan a los microtúbulos en todo su recorrido (Crossley y Holberton 1985)

En el análisis electroforético en una dimensión de las fracciones insolubles al detergente se han identificado 20 bandas correspondientes a proteínas entre los 20 a 200 kDa. Dos de ellas, tubulina y giardinas, comprenden alrededor del 40-50% de las proteínas de citoesqueleto. En la periferia del disco adhesivo, específicamente en la cresta lateral se han identificado por inmunofluorescencia proteínas como actina, α -actinina, tropomiosina, miosina y vinculina (Crossley y col. 1983b. Feely y col. 1982. Narcisi, y col. 1994). La localización de estas proteínas en la periferia del disco apoya la hipótesis de adhesión, que postula la participación de proteínas contráctiles en este fenómeno.

CICLO DE VIDA

Giardia lamblia tiene un ciclo de vida simple y directo semejante al de amiba. Presenta dos estadios morfológicos: el quiste responsable de la trasmisión del parásito de un hospedero a otro y el trofozoíto causante de la enfermedad. La infección se puede dar a través de la ingesta de quistes en agua o alimentos contaminados, los cuales pueden permanecer viables por varios meses en lugares húmedos.

El ciclo se inicia cuando el hospedero ingiere los quistes, estos atraviesan la parte alta del aparato digestivo, en donde los jugos gástricos reblandecen la pared del quiste, y da inicio el desenquistamiento. En el intestino delgado, se secretan sales biliares y pancreáticas, las cuales aparentemente crean un microambiente que favorecen el desarrollo

del trofozoíto. El trofozoíto se adhiere a las vellosidades del epitelio intestinal del hospedero a través del disco ventral. Este puede permanecer adherido o despegarse de la superficie. El parásito experimenta una división mitótica en el lumen intestinal, algunos trofozoítos se enquistan y salen del hospedero en las heces fecales. Los quistes pueden mantenerse viables por varios meses en condiciones óptimas de humedad y temperatura.

El ciclo de vida se puede reproducir completamente *in vitro*. En estos estudios se ha encontrado que el enquistamiento se produce al estimular al parásito con altas concentraciones de bilis (10 mg/ml) y pH de 7.8. Con estas condiciones se obtienen quistes viables después de 16 horas de incubación. Cuando se analiza la expresión de antígenos específicos de enquistamiento se ha encontrado que todo el proceso, se pueden dividir en dos etapas; la primera con duración de 8-10 hrs. que corresponde a la síntesis y transportación de estos antígenos a la superficie celular y la segunda, que dura aproximadamente de 8 a 6 hrs. Esta última se inicia con la aparición de los primeros antígenos en la superficie del trofozoíto en forma de racimos de aproximadamente 15 nm que paulatinamente se hacen más grandes y culmina con el ensamble de los mismos para formar filamentos que, finalmente envuelven al parásito en una estructura compacta y rígida (Erlandsen, et al. 1996).

ANTECEDENTES DIRECTOS

Los cambios morfológicos que se llevan a cabo durante el enquistamiento de *Giardia lamblia* son profundos y estos se hacen más evidentes en el citoesqueleto el cual cambia de una organización bien definida en el disco adhesivo de los trofozoítos a sólo segmentos o fragmentos dispersos en el quiste. Hasta el momento sólo se tiene la imagen aislada de los eventos que suceden en el proceso de desestructuración del citoesqueleto durante el enquistamiento, así mismo no se conoce la regulación de estos procesos ni de la posible participación de otras proteínas de citoesqueleto como la actina de la cual se sabe que está localizada en la periferia del disco ventral y en el cuerpo medio de los trofozoítos.

Los cambios que ocurren en *Giardia lamblia* durante el enquistamiento se han estudiado mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) y de transmisión (MET), (Sheffield y Bjorvatn 1977; Erlandsen 1996), sin embargo, la primera sólo nos permite ver los cambios externos y en la segunda se visualizan las estructuras en un sólo plano del corte. Con MEB y MET no es posible observar los cambios morfológicos completos o tridimensionales que se están llevando a cabo en el citoesqueleto. Las evidencias que se tienen hasta el momento son las siguientes: el disco adhesivo en la fase de quiste se encuentra fragmentado, estos fragmentos por lo general formados por 8-20 microtúbulos con sus microcintas o incluso pueden encontrarse segmentos grandes y curvos dando la apariencia de que efectivamente el disco ventral, durante el proceso de enquistamiento, simplemente sufriera fragmentación. Además, cada uno de estos segmentos parece ser que conserva la estructura de las microcintas y de los microtúbulos intactos, así como la interacción entre ellos, lo cual implicaría que también se conserva la integridad de los puentes cruzados entre las microcintas. De hecho, una de las hipótesis señala que la reestructuración del disco sólo implica la reasociación de cada uno de estos fragmentos (Sheffield y Bjorvatn, 1977). En

cuanto a los flagelos estos se van acortando hasta quedar incluidos en el quiste. Se ha encontrado que en las etapas finales del enquistamiento estos tienen una estructura en forma de tallo largo que emerge de uno de sus polos y está formado de uno o dos flagelos que no lograron retraerse (Erlandsen 1996). Finalmente el quiste contiene segmentos del disco adhesivo, el cuerpo medio que aparentemente no sufre cambios, los 8 axonemas con sus cuerpos parabasales y algunas partes de los flagelos.

JUSTIFICACIÓN

Como se puede apreciar en los antecedentes, aunque se ha estudiado el enquistamiento de *Giardia lamblia*, no se han establecido con certeza los cambios que se llevan a cabo en el disco ventral y flagelos necesarios para la supervivencia del parásito. por lo que es importante el estudio de su comportamiento y regulación durante este estadio. La comprensión de lo que sucede en estos eventos permitirá entender mejor la biología de este parásito y contar con estrategias para controlar una de las parasitosis de mayor impacto en la salud de la población mundial.

La diferenciación de *Giardia lamblia* debe ser un proceso bien regulado para que el parásito asegure su supervivencia (Hetsko 1998). La organización que muestra el citoesqueleto durante el enquistamiento es muy compleja y muy distinta a la que presenta *G. lamblia* en la etapa de trofozoíto. Hasta el momento no se ha determinado con claridad que es lo que ocurre con las estructuras más notables e importantes de este parásito como lo son los flagelos y el disco ventral. Tampoco se sabe qué sucede con las proteínas más importantes de este parásito (tubulina y giardinas) pues es evidente que éstas juegan un papel primordial en la constitución de las estructuras mencionadas. De igual manera no se ha determinado si existe una redistribución de estas proteínas o existe un incremento o disminución de las mismas, por lo que se requiere de un estudio inicial que nos permita identificar los componentes involucrados. El análisis por microscopia confocal de los cambios morfológicos que se lleven a cabo en el citoesqueleto durante la diferenciación, nos permitirá determinar con mayor exactitud si el disco ventral realmente sufre fragmentación durante el enquistamiento y si las proteínas estudiadas (tubulina y giardinas) tienen una distribución distinta a la fase de trofozoíto, además de conocer si ocurre un

incremento o disminución de las mismas. Lo cual nos dará las bases para comprender los mecanismos de regulación de este parásito durante el enquistamiento.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los cambios que se llevan a cabo en el disco ventral y flagelos durante el procesos de enquistamiento con anticuerpos: anti giardinas y anti-tubulina.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la distribución de giardinas y tubulina, durante el procesos de enquistamiento de *Giardia lamblia*.

Analizar mediante inmunotransferencia cambios en la expresión de giardinas y tubulinas.

Determinar mediante microscopia confocal las modificaciones que se llevan a cabo en el disco ventral y flagelos de *Giardia lamblia* durante el enquistamiento.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los cambios que se llevan a cabo en el disco ventral y flagelos durante el procesos de enquistamiento con anticuerpos: anti giardinas y anti-tubulina.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la distribución de giardinas y tubulina, durante el procesos de enquistamiento de *Giardia lamblia*.

Analizar mediante inmunotransferencia cambios en la expresión de giardinas y tubulinas.

Determinar mediante microscopia confocal las modificaciones que se llevan a cabo en el disco ventral y flagelos de *Giardia lamblia* durante el enquistamiento.

MATERIALES Y METODOS

CEPA.

Se utilizaron trofozoítos de *G. lamblia* de la cepa Pórtland-1 (P-1) de origen humano (Meyer 1976).

CONDICIONES DE CULTIVO.

Los trofozoítos de *Giardia lamblia* se crecieron en tubos de borosilicato 12 x 100 mm con medio TYI-S-33 pH 7.1 a 37 °C, (Diamond 1978) suplementado con bilis 0.5 mg/ml, suero bovino adulto descomplementado al 10%, penicilina 100 U/ml y estreptomycinina 100 mg/ml.

ENQUISTAMIENTO DE *Giardia lamblia*

Los tubos con trofozoítos se crecieron a 90 % de confluencia, en medio de cultivo (TYI-S-33), se decantó el sobrenadante y se substituyó con medio de enquistamiento: TYI-S-33, pH 7.8, bilis bovina 10 mg/ml y se incubó durante 24 h a 37 °C. Al término de este tiempo se centrifugó a 1300 rpm por 10 minutos, la pastilla se resuspendió en medio de crecimiento y se incubó durante 24 h adicionales. Los trofozoítos se eliminaron por lisis hipotónica, los quistes se resuspendieron en agua bidestilada estéril y se mantuvieron en frío durante 24 hrs, posteriormente se lavaron varias veces con agua destilada para eliminar residuos de trofozoítos.

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

Se prepararon geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), de acuerdo a la técnica descrita por Leammli (1970). Se hicieron geles analíticos para determinar la cantidad adecuada de la muestra a aplicar, y posteriormente se corrieron geles preparativos, las muestras utilizadas fueron: trofozoítos y quistes maduros. Ambos tipos celulares se cosecharon y se centrifugaron, posteriormente se contó el número de parásitos en cámara de Neubauer y se agregaron inhibidores de proteasas, se sonicó 4 ocasiones por 20 seg. con intervalos de 30 seg. La muestra se mezcló volumen a volumen en amortiguador de muestra 2X, cuya concentración final contenía: Tris-HCl 0.5 M pH 6.8,

SDS al 4%, β -mercaptoetanol al 5%, glicerol y azul de bromofenol al 0.05%, se hirvieron durante 5 minutos. Se colocaron 230 μ g por gel preparativo. La electroforesis se realizó a 80 mA constantes a temperatura ambiente.

CUANTIFICACION DE PROTEINAS

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de micro-Bradford en microplacas de 96 pozos de 200 μ l, según la técnica descrita por Bradford en 1976. Se utilizó un lector de ELISA (BIORAD, modelo 450) con un filtro de 595 nm para la toma de las absorbencias.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

Las electrotransferencias se realizaron según la técnica descrita por Towbin en 1979. Las proteínas de los geles de poliacrilamida se transfirieron a papel de nitrocelulosa (PNC de 0.22 μ). en un sistema semi-húmedo (Enprotech) a 200 mA durante 25 minutos. Se utilizó como amortiguador de transferencia glicina, metanol al 2% en Tris 20 mM, pH 8.3. La transferencia de las proteínas se corroboró con rojo de Ponceau. Para eliminar el rojo Ponceau los papeles de NC se lavaron con agua destilada y se bloquearon con leche descremada Sveltes al 5% en amortiguador de fosfatos salino con Tween 20 al 0.05% (PBS-T) y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. El PNC que contenía las proteínas se incubó con los respectivos anticuerpos (anti-giardinas diluido 1:100, anti-tubulina sin diluir) durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavó con PBS-T, se agregó el conjugado anti-IgG peroxidado anti ratón a una dilución 1:4000 y se incubó durante una h. Posteriormente se lavó por diez ocasiones con PBS-T y se reveló por quimioluminiscencia.

REVELADO POR QUIMIOLUMINISCENCIA

Para el revelado se utilizó un kit comercial de quimioluminiscencia ECL (Amersham). Los PNC se cubrieron con esta solución y se incubaron durante 1 min. Al final de este tiempo los PNC se colocaron entre dos membranas de plástico, y posteriormente se montó en un cassette radiográfico. La placa radiográfica se expuso con el PNC durante 3 minutos, se sumergió en solución reveladora hasta que aparecieran las

bandas, variando el tiempo de exposición para cada anticuerpo. Se lavó con agua, se colocó en solución fijadora durante 3 min. y finalmente se secó al aire.

INMUNOFLUORESCENCIA

Los parásitos se tomaron a diferentes tiempos durante el proceso de enquistamiento, se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos y se lavaron 3 ocasiones con PBS, la pastilla se resuspendió y se colocaron 500 000 células por cubreobjetos, se incubaron durante 20 minutos a 37°C, los cubreobjetos fueron tratados previamente durante 20 minutos con poli-L-lisina al 0.1% por 20 minutos. La permeabilización se realizó con Tritón X-100 al 1% en PBS durante 30 min. Posteriormente se fijaron con formaldehído en una concentración final del 4% por 30 min. y se bloqueó con albúmina al 1% durante 30 min. Como anticuerpos primarios se utilizaron: monoclonal anti-tubulina, y policlonal anti-giardinas, se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente se utilizó un anticuerpo chivo anti-ratón fluoresceinado (ZYMED). Entre cada paso de incubación, los cubreobjetos se lavaron sumergiéndolos varias veces en 300 ml de PBS, finalmente para evitar la formación de cristales en el montaje, se lavaron con agua desionizada. Por último se realizó el montaje, con una gota de gelvatol. Las preparaciones se dejaron secar y se observaron al microscopio confocal.

MICROSCOPIA CONFOCAL

Para la microscopía confocal se utilizó el equipo MRC-600, Biorad,(sistema de laser confocal, Kriptón-argón, Watford, UK) montado sobre un microscopio de IPO fluorescencia Nikon Diaphot (Nikon, Japón) se hicieron cortes ópticos de 0.7 a 1 micras. Como procesador de imágenes se utilizó el programa COMOS (Bio-Rad). Las imágenes finales se imprimieron en una impresora Epson Stylus 740i, usando 1440 dpi y papel de calidad fotográfica HP (HP C1846A), después de haber sido procesadas en los programas Confocal Assistant (v. 4=2. copyright Todd Clark Brelje) y Power Point (v. 2000, Microsoft Corp.).

RESULTADOS

ENQUISTAMIENTO DE *G. lamblia*.

Seguimiento por microscopía de contraste de fases

Una vez establecidas las condiciones de crecimiento y enquistamiento de *G. lamblia* se llevó a cabo el seguimiento de los cambios morfológicos ocurridos durante el enquistamiento por microscopía de contraste de fases, lo cual nos permitió definir con claridad los tiempos en los que se presentaron modificaciones importantes en el citoesqueleto, cambios que fueron corroborados en los estudios de inmunofluorescencia. Para este experimento, los trofozoítos de *G. lamblia* se incubaron con el medio de enquistamiento durante 24 h. Cada hora se tomó un tubo, y se enfrió durante 10 min. en agua-hielo, para despegar las células adheridas a la pared del tubo. Se centrifugó, la pastilla se mezcló con 100 μ l de formaldehído al 3.7 %, se tomó una muestra y se observó al microscopio de contraste de fases.

Durante las primeras 9 h de enquistamiento no se encontraron cambios morfológicos aparentes (Fig. 1A).



Figura 1. Microscopía de contraste de fases, secuencia de enquistamiento de *Giardia lamblia*.

A) 0 h, B) 10 h, C) 18 h, D) 22 h, E) 24 h

A partir de las 10 h de enquistamiento, los trofozoítos se observaron de forma más oval (Fig. 1B). A las 18 h se notaron redondeados y se dificultó la observación de los flagelos dando la apariencia de estar más cortos. En este tiempo aún se pudieron observar los núcleos (Fig. 1C). A las 22 h el parásito se encontró más redondeado, sobresaliendo en uno de los polos una estructura filamentososa que pudiera corresponder a un flagelo, como lo reportó Erlandsen en 1996 (Fig. 1D). El quiste maduro se presentó a las 24 h, en forma oval y refringente, en esta etapa no fue posible observar estructuras en el interior del quiste (Fig. 1E)

DETERMINACIÓN DEL PATRON DE PROTEINAS DE QUISTES Y TROFOZOÍTOS DE *G. lamblia*.

Con la finalidad de comparar la variabilidad en la expresión de proteínas en los trofozoítos y quistes de *G. lamblia* se realizaron geles analíticos de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes. Trofozoítos y quistes, se sonicaron y mezclaron con amortiguador de muestra 2X en una proporción de 1 a 2, la muestra se hirvió durante 3 minutos y se aplicó a los geles.

Se encontró un patrón de proteínas diferente en los dos estadios. En los trofozoítos, se observaron 3 bandas de aproximadamente 27, 29 y 33 kD las cuales corresponden aparentemente a giardinas. En el carril de los quistes, la banda de 33 kD no se observó y las proteínas de 27 y 29 kD se encontraron en cantidades muy similares a las observadas en trofozoítos. Con respecto a la α tubulina ésta se mantuvo constante en los dos estadios (figura 2).

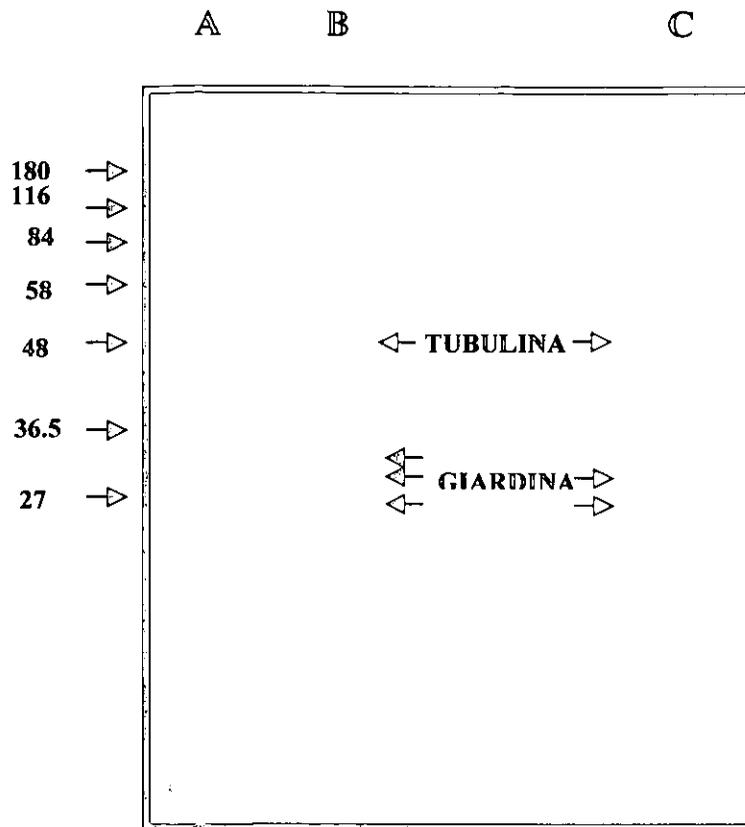


Figura 2. Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE, de extractos totales de trofozoitos y quistes. A) Marcadores de peso molecular, B) Trofozoitos de *G. lamblia*, C) Quistes de *G. lamblia*. En carriles B y C se colocaron 20 µg/carril.

INMUNODETECCION DE TUBULINA Y GIARDINAS EN EXTRACTOS TOTALES DE TROFOZOÍTOS Y QUISTES

Para analizar el reconocimiento de los anticuerpos anti: α tubulina y giardinas a las proteínas y estudiar las posibles diferencias de reconocimiento que pudieran existir entre la etapa de trofozoito y de quiste se realizaron inmunoelctrotransferencias.

Se hicieron geles preparativos de extractos de trofozoitos y quistes, las proteínas se transfirieron a PNC. Se cortaron tiras de 4 mm del PNC y se incubaron con los distintos anticuerpos.

En la inmunotransferencia donde se hizo reaccionar el anticuerpo anti α -tubulina se detectó marca en ambos estadios de *G. lamblia* (trofozoíto y quiste), se identificó una banda de aproximadamente 53 kD la cual corresponde a tubulina, se observó una intensidad similar en las dos fases (Fig. 3).

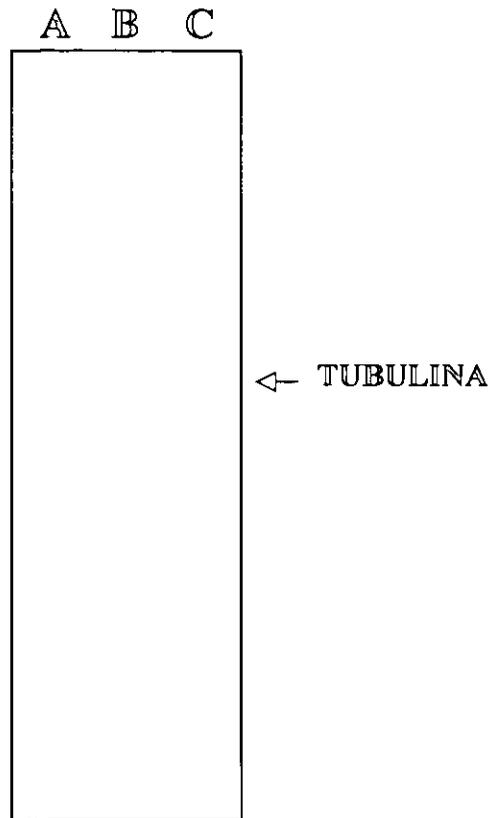


Figura 3. Inmunolocalización de tubulina. Carril A: control negativo; Carril B: extracto total trofozoítos de *G. lamblia* (20 μ g/carril); carril C: Extracto total de quistes de *G. lamblia*. (20 μ g/carril)

Para la detección de giardinas se utilizó un anticuerpo policlonal de ratón, este anticuerpo reconoció a las giardinas, y a la tubulina de ambos estadios. Cuando estos mismos extractos fueron analizados por electroforesis ya habíamos observado tres bandas de giardinas en el estadio de trofozoíto y sólo dos en el extracto de quistes de 27 y 29 KD.

Sin embargo, por inmuntransferencia el anticuerpo reconoció las 3 bandas en ambos etapas (Fig. 4). Posiblemente la proteína que no se observó en la electroforesis sólo estaba

disminuida en la fase de quiste por lo que no fue imposible detectarla con el azul de comassie, pero sí fue reconocida con el anticuerpo anti-giardinas.

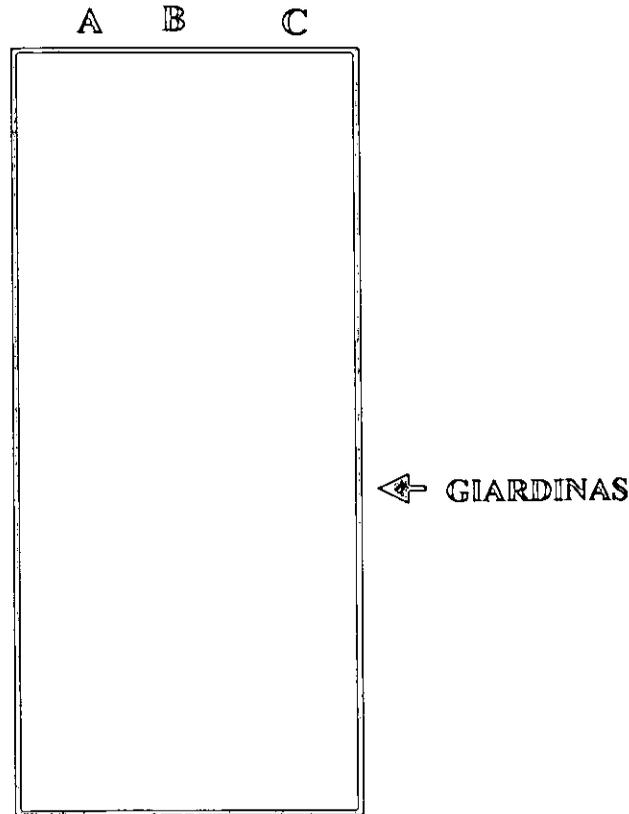


Figura 4. Detección de giardinas. Carril A) Control negativo, B) Extracto total trofozoítos, C) Extracto total quistes.

MODIFICACIONES A LA TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA *G. lamblia*.

Se realizó un seguimiento por inmunofluorescencia con los anticuerpos anti: tubulina y anti giardinas, con la finalidad de estudiar la reestructuración de los flagelos y el disco ventral de *G. lamblia* durante el enquistamiento.

Para determinar las condiciones de la técnica de fluorescencia se hicieron varias pruebas modificando los tiempos de incubación para la fijación, permeabilización y de incubación de los respectivos anticuerpos. Por otro lado, también se modificó la secuencia

de fijación-permeabilización, ya que cuando se fijó primero, la tinción del citoesqueleto era muy difusa (Fig. 5 A y B). Sin embargo cuando primero se permeabilizó y posteriormente se fijó, se obtuvo una tinción que nos permitió ver con claridad las estructuras en el interior del quiste. (fig. 5 C y D)

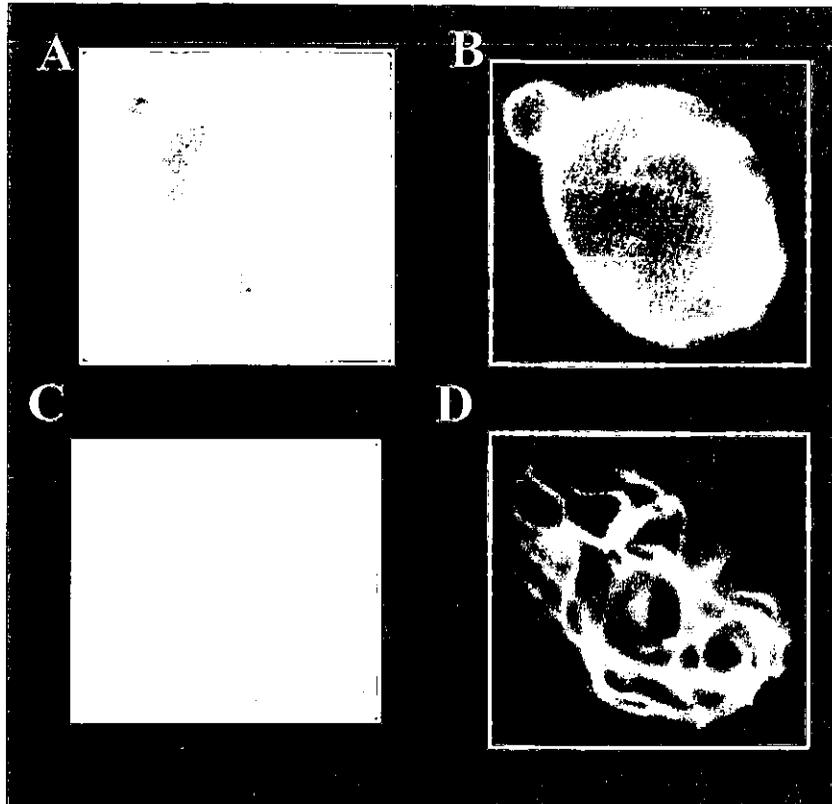


Figura 5. Tinción de quistes de *G. lamblia* con Ab anti-tubulina. A y C) Contraste de fases. B) Permeabilizado y fijado. D) Fijado y permeabilizado.

PATRON DE TINCION EN TROFOZOITOS DE *Giardia lamblia* CON ANTICUERPOS ESPECIFICOS

En la tinción de trofozoítos con los dos distintos anticuerpos, se observó un marcaje diferencial. Con el anticuerpo anti-tubulina, la marca fue selectiva para el disco ventral y los flagelos con una marca muy intensa para el cuerpo medio (Fig 6 A). Con el policlonal anti giardinas, la marca se localizó únicamente en el disco ventral. (Fig. 6 B).

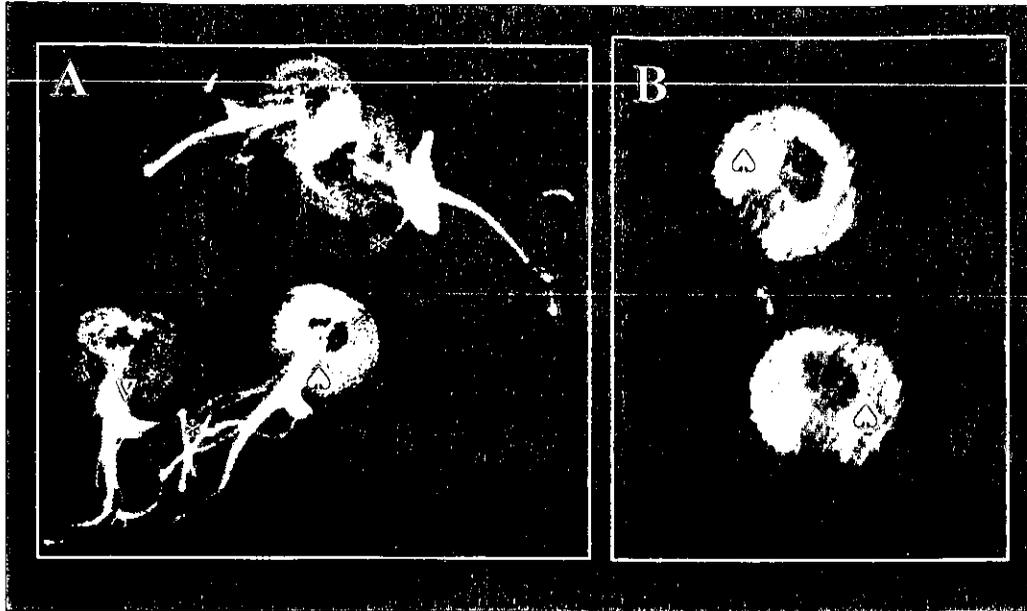


Figura 6. Inmunofluorescencia de trofozoítos de *G. lamblia*, 0 h de enquistamiento. A) Anti-Tubulina, B) anti-Giardinas, (Δ : disco ventral) (*: flagelos) (σ : axonemas) (∇ : cuerpo medio)

DISTRIBUCIÓN DE TUBULINA Y GIARDINAS DURANTE EL ENQUISTAMIENTO

Para analizar la secuencia de eventos ocurridos durante el enquistamiento, y determinar la posible redistribución de las proteínas más abundantes del citoesqueleto de *G. lamblia* (tubulina y giardinas) se realizaron inmunofluorescencias a diferentes tiempos del enquistamiento, con anticuerpos específicos contra dichas proteínas. Los tiempos seleccionados se determinaron conforme a los cambios morfológicos más evidentes observados por microscopía de contraste de fases.

El anticuerpo anti- α -tubulina dio muy buena definición en el citoesqueleto de *G. lamblia* lo cual nos permitió un mejor análisis con el microscopio confocal, este anticuerpo tiñó con gran intensidad los flagelos y el cuerpo medio, el disco ventral también se pudo observar aunque con menor intensidad (Fig. 7 A). A las 10 h de enquistamiento los cambios morfológicos se empezaron a observar. Un dato interesante fue la disposición de los flagelos, los cuales se encontraron agrupados a manera de racimo y doblados hacia el

cuerpo del parásito, al parecer los flagelos se doblaron hacia la zona del disco ventral (Fig. 7 B)

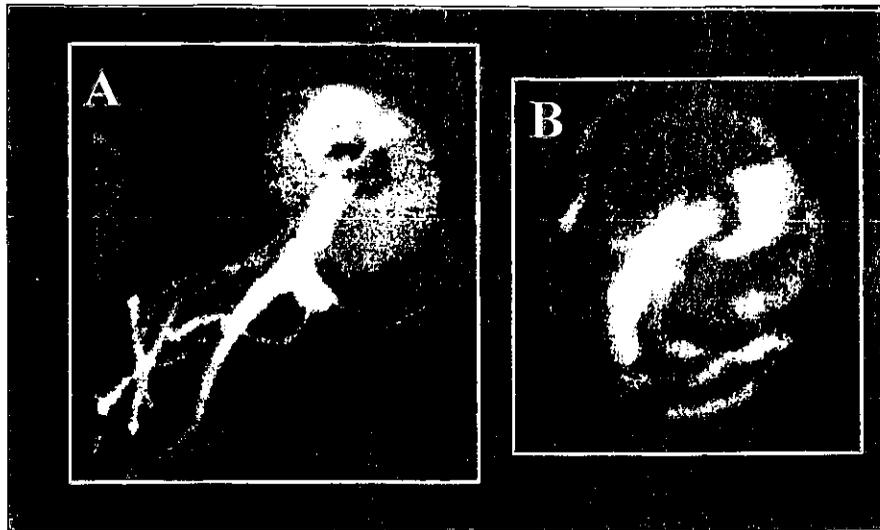


Figura 7. Inmunolocalización de tubulina. A) 0 h de enquistamiento, B) 10 h de enquistamiento.

A las 18 h de enquistamiento los flagelos se enrollaron entre si y se plegaron en la zona del disco ventral, en este tiempo aún se observó bien definido el disco. (Fig. 8 A). El disco ventral perdió definición a las 22 h, sin embargo aún se puede observar parte del mismo, los flagelos se enrollaron de una forma más compacta. (Fig. 8 B)

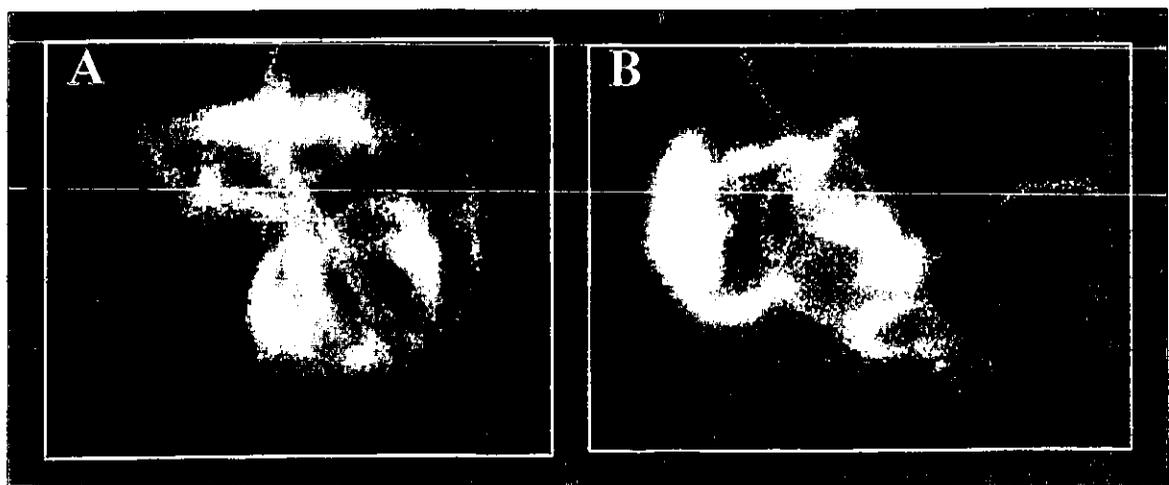


Figura 8. Inmunolocalización de tubulina en *G. lamblia*. A) 18 h de enquistamiento. B) 22 h de enquistamiento

A las 24 h, una vez que el quiste alcanzó su etapa madura, las imágenes de los cortes ópticos (Fig. 9 B, C y D) nos mostraron los flagelos aparentemente más delgados y filamentosos con una marca muy intensa. Con este anticuerpo se observó la distribución de tubulina preferentemente en los flagelos los cuales se distribuyeron en todo el cuerpo del quiste a manera de una madeja de hilo en donde no se pudieron apreciar las puntas de los mismos dando la apariencia de un hilo continuo. Intercalada en esta madeja se apreciaron algunas regiones menos intensas de tinción en forma de pequeñas placas curvas que aparentemente correspondían a secciones del disco ventral. Aunque se realizaron cortes ópticos, por la disposición espacial de estas placas y la marca tan intensa de los flagelos, no fue posible determinar si estas placas curvas eran debidas a una fragmentación del disco o a un desdoblamiento

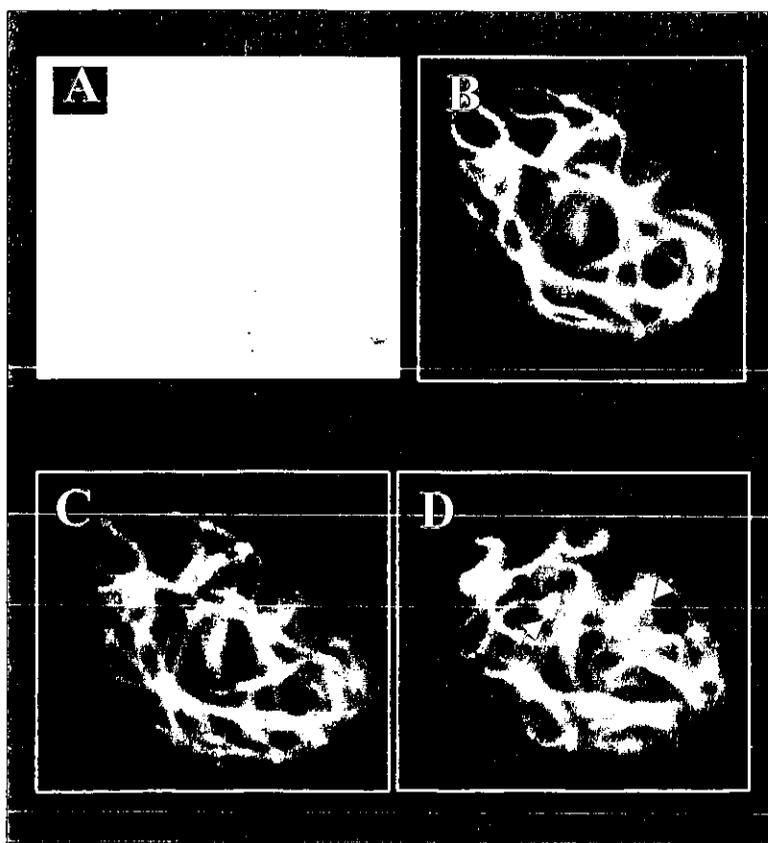


Figura 9. Inmunolocalización de tubulina a 24 h de enquistamiento. A) Contraste de fases. B, C y D) Cortes ópticos. (la flecha indica el disco ventral)

El seguimiento del enquistamiento con el anticuerpo anti giardinas fue de gran utilidad ya que sólo marcó el disco ventral.

Al tiempo 0 se observó una marca, exclusiva del disco ventral. Aunque el anticuerpo es policlonal este reconoció claramente el disco adhesivo y sin marcar otra estructura (Fig. 10 A), sin embargo por inmunotransferencia también se detectó tubulina, aunque sólo la isoforma del disco y no la de los flagelos, como se pudo observar en las fluorescencias (Fig 10). A las 10 h la tinción fue similar al de las 0 h, sin embargo, el disco presentó un ligero cambio en su forma original, se observó un ligero plegamiento de los bordes del disco (Fig 10 B).

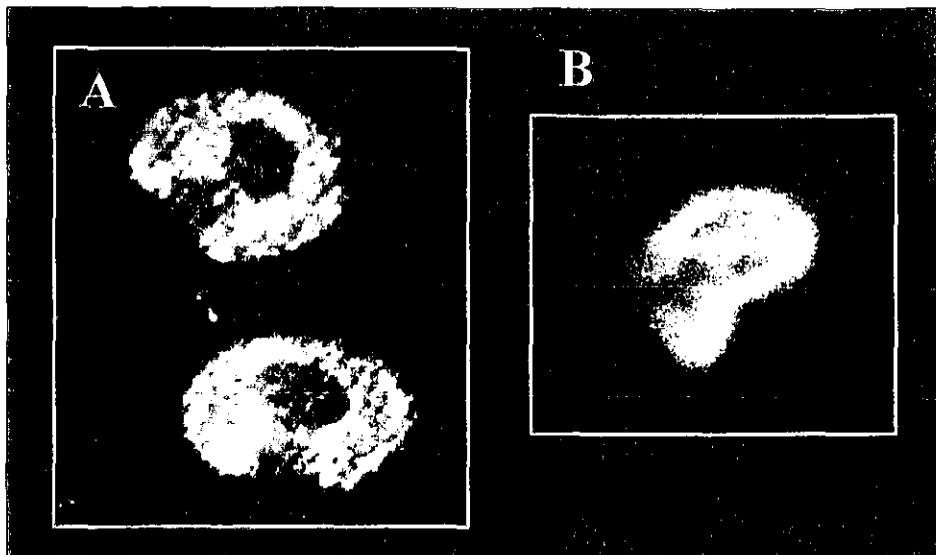


Figura 10. Localización de giardinas. A) 0 h de enquistamiento. B) 10 h de enquistamiento.

A las 18 h de enquistamiento se comenzaron a observar las primeras etapas de las formas quísticas, en donde el disco al parecer se mantuvo íntegro sin fragmentación pero si se presentó plegamiento de los bordes del disco hacia la parte central, este plegamiento dio la apariencia de una estructura más flexible (Fig. 11 A, B y C).

A las 24 h de enquistamiento, fue más evidente el aparente desdoblamiento del disco. Originalmente esta estructura tiene una forma helicoidal cerrada que al desdoblarse pierde la forma circular, y los extremos del disco que en la etapa de trofozoíto se solapaban ahora quedan separados. Los cortes ópticos del microscopio confocal nos permitieron demostrar que el disco tomó forma de cinta continua con pequeños giros a manera de escalera de caracol (Fig. 12 A, B y C).

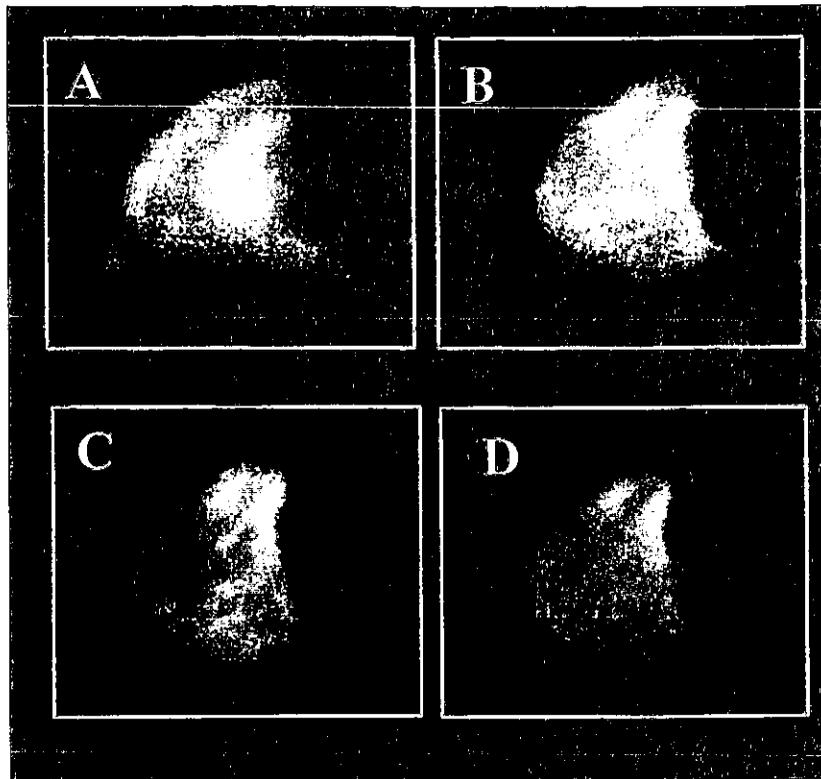


Figura 11. Localización de giardinas a las 18 h de enquistamiento. A, B, C y D) Cortes ópticos.

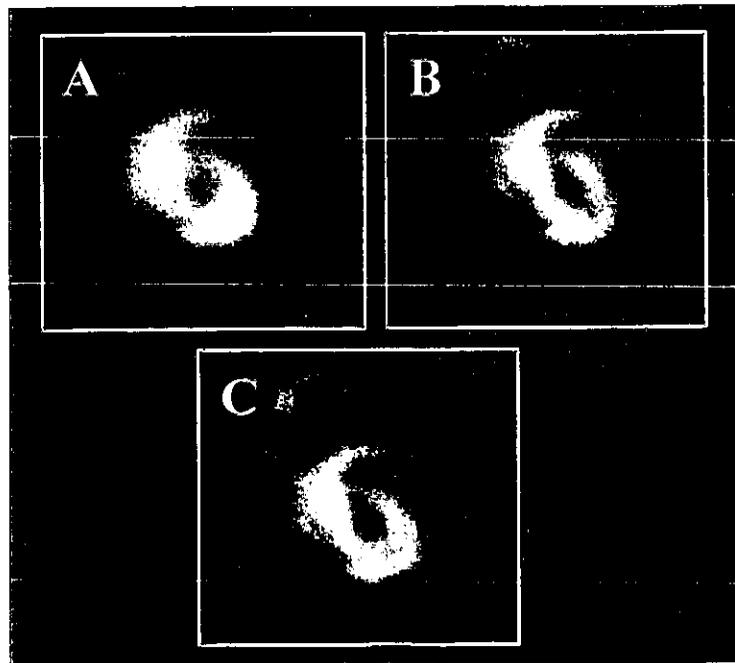


Figura 12. Localización de giardinas a las 24 h de enquistamiento. A, B y C) Cortes ópticos.

Este resultado fue muy importante ya que se demostró que el disco no se fragmentó durante el enquistamiento y que aparentemente se desdobló quedando en forma de una cinta continua y enrollada.

DISCUSION

Giardia lamblia es un parásito de gran importancia a nivel mundial, del cual se conoce poco acerca de los elementos que participan en el proceso de enquistamiento.

En este trabajo se determinó las modificaciones que sufren el disco ventral y los flagelos durante el enquistamiento, organelos fundamentales en el proceso de infección. También se estudio el papel que juegan dos de las principales proteínas del citoesqueleto: tubulina, proteína básica en la estructura de los flagelos y del disco ventral, las giardinas un grupo de proteínas específicas de *Giardia*, que conjuntamente con tubulina forman el disco adhesivo.

Con respecto al análisis de proteínas, hay algunos estudios en los que se reporta el cambio en la expresión de proteínas durante las etapas de diferenciación de trofozoíto a quiste, principalmente las proteínas que forman parte de la pared del parásito, (Guillin y col. 1987, Lujan y col. 1995), También a nivel molecular se ha demostrado un incremento en la fase de quistes en los mRNA totales de *G. lamblia*, pero no se ha especificado las proteínas que dan origen estos mRNA. En cuanto a proteínas del citoesqueleto, no existen trabajos en los que se compare qué está ocurriendo con estas proteínas en los dos estadios de *G. lamblia*.

En este trabajo se hizo un análisis de las modificaciones que sufre el disco ventral y los flagelos, también se comparó la distribución y las modificaciones en las concentraciones de 2 de las proteínas más abundantes del citoesqueleto de *Giardia* (tubulina y giardinas). El análisis electroforético (Fig. 2) nos mostró la presencia de algunas proteínas en la fase de trofozoítos que aparentemente no se encuentran en la forma quística, principalmente aquellas con un peso molecular del rango de 48 a 85 KDa. Sin embargo, durante el enquistamiento se expresaron proteínas de peso molecular alto (85-200 kDa) las cuales no se encontraron en el trofozoíto.

Cuando se analizó tubulina por electroforesis (Fig. 2 B y C) se observó una banda cuyo peso molecular oscila alrededor de 50 kDa, la cual corresponden a dicha proteína. Cuando se realizó la inmunotransferencia en quistes y trofozoítos sólo se confirmó la presencia de tubulina (Fig. 5 A y C), aparentemente en la misma concentración.

Por lo que toca a las giardinas se identificaron por western blot en trofozoítos y quistes tres proteínas de 27, 29 y 33 kDa las cuales corresponden a giardinas en donde aparentemente no hubo diferencias al menos en la intensidad de las bandas, al parecer esta proteína se mantiene constante en los dos estadios.

El estudio de las imágenes de fluorescencia para el análisis de los cambios que sufrió el citoesqueleto de *Giardia* durante el enquistamiento, nos arrojó resultados de gran relevancia, en general, la tinción con los dos anticuerpos nos permitió registrar la secuencia de algunos eventos ocurridas durante esta fase.

Con el análisis de microscopía confocal pudimos determinar los sucesos ocurridos durante el enquistamiento en estructuras tales como los flagelos y el disco ventral. De igual forma, pudimos corroborar lo reportado por Crossley y col. en 1986, en relación a la localización de tubulina en tres estructuras del citoesqueleto (flagelos, cuerpo medio y disco ventral) y de las giardinas, las cuales se localizan en el disco ventral en forma de microcintas (Crossley y Holberton 1985).

La distribución de tubulina en el trofozoíto pudo ser determinada con el anticuerpo anti-tubulina en las tres estructuras antes mencionadas, siendo la marca más intensa en el cuerpo medio y los flagelos. A medida que transcurría el enquistamiento (10 h) el disco ventral se notó de mayor tamaño y con marca menos intensa comparado con el tiempo 0 de enquistamiento, posiblemente esto se debió a que durante el proceso el disco sufre una descompactación de las cintas que lo forman, lo que dio la apariencia de haber aumentado de tamaño. En las etapas finales del proceso (18 y 22 h) el disco era menos evidente, posiblemente debido a dos cuestiones: al relajamiento del disco lo cual provocaba que la tinción no fuera tan compacta y diera la apariencia de estar disminuida, la segunda causa podría ser al solapamiento ocurrido de los flagelos con el disco. En el quiste maduro (24 h de enquistamiento) los flagelos se notaron más filamentosos y con una marca más intensa, las imágenes del microscopio confocal mostraron los flagelos como una hebra de hilo continua a manera de banda sin fin, esta estructura tomó una disposición dentro del quiste semejante a una madeja de hilo distribuida homogéneamente en todo el cuerpo del parásito. Los resultados que nos arrojaron las imágenes de microscopía confocal nos permitieron establecer que aparentemente los flagelos no sufren cambios morfológicos evidentes durante el enquistamiento, ni desaparecen, de igual forma no son reabsorbidos como lo sugirió Sheffield y Bjorvatn en 1977.

Aunque el anticuerpo anti-tubulina marcó tenue el disco ventral, los cortes ópticos en algunos planos nos permitieron localizar secciones en forma de placas curvas que aparentemente correspondieron al disco, dando la apariencia de estar dobladas y no fragmentadas. Lo cual fue corroborado con el anticuerpo anti-giardinas. Las giardinas son proteínas exclusivas del disco ventral (Holberton, 1981). Esta localización específica y el reconocimiento del anticuerpo selectivo por el disco nos permitió registrar los cambios ocurridos exclusivamente en dicha estructura. La tinción que mostró este anticuerpo en el trofozoíto se localizó en todo el disco, de manera muy intensa. A las 10 h el disco presentó un leve plegamiento de los extremos hacia el centro del mismo. A las 18 h el acercamiento de estos extremos entre si fue mayor, dando la apariencia de un disco más flexible, posiblemente esto sea debido a que durante el proceso de enquistamiento existe una disociación de algunas proteínas que interactúan con las giardinas, y con la tubulina (Crossley y Holberton, 1995). Cabe recordar que en los resultados de las tinciones con el anticuerpo anti-tubulina la marca disminuyó en el disco ventral durante el proceso..

En el quiste maduro (24 h de enquistamiento) no se observó el plegamiento del disco, más bien esta estructura presentó un desdoblamiento, tomando una conformación a manera de escalera de caracol, en donde los extremos del disco ya no se solaparon. Esta misma forma toma el disco ventral cuando se tratan citoesqueletos de *Giardia* con Tritón X-100, aparentemente las microcintas no sufren modificaciones. Sin embargo, los puentes cruzados que forman el disco se desordenan, lo cual hace que la estructura pierda rigidez y estabilidad.(Holberton y Ward, 1986). Estos resultados nos sugieren que el disco ventral no se fragmenta a diferencia de lo señalado por Sheffield y Bjorvatn en 1977, que mediante estudios de microscopía electrónica, interpretaron las imágenes como fragmentación del disco ventral durante el enquistamiento.

Las imágenes de microscopia confocal obtenidas por la tinción con los dos anticuerpos (anti: tubulina y giardinas) nos permitieron establecer que durante el enquistamiento los flagelos se agrupan en el eje central del cuerpo de la giardia y estos presentan un ligero enrollamiento a manera de trenzado. El disco ventral se pliega de los extremos laterales, ambas estructuras (flagelos y disco) se contraen quedando solapadas.

CONCLUSIONES

1. Los flagelos conservan su forma durante el proceso de diferenciación.
2. Durante el enquistamiento los flagelos se doblan hacia la parte ventral y/o el disco se pliega hacia ellos.
3. El disco ventral no se fragmenta durante el enquistamiento.

BIBLIOGRAFIA

1. Adam, R. D. 1991. The biology of *Giardia* spp. *Microbiol Rev* 55: 706-732.
2. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Chemistry* 72, 248-254.
3. Crossley, R, and Olberton, D. V. 1983a. Characterization of proteins from the cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *J.Cell. Sci.* 59: 81-103
4. Crossley, R, and Holberton, D. V. 1983b. *Giardia* spp.: Distribution of contractile proteins in the attachment organelle, *Exp. Parasitol.* 53: 145-154
5. Crossley, R, and Holberton, D. V. 1985. Assembly of 2.5 nm filaments from giardin, a protein associated with cytoskeleton microtubules in *Giardia*. *J. Cell Sci.* 78, 205-231.
6. Crossley, R., Marshall, J., Clark, J. T. and Holberton, D. V. 1986. Immunocytochemical differentiation of microtubules in the cytoskeleton of *Giardia lamblia* using monoclonal antibodies to α -tubulin and polyclonal antibodies to associated low molecular weight proteins. *J. Cell Sci.* 80, 233-252.
7. Drummond, D. R., E. S. Hennessey, and J. C. Sparrow. 1991. Stability of mutant actins: *Biochem. J.* 274: 301-303
8. Erlandsen, S.L. 1996. Formation of the *Giardia* cyst wall: studies on extracellular assembly using immunogold labeling and high resolution field emission SEM. *J. Euk. Microbiol.*, 43(5): 416-429
9. Farthing, M. J. G., Pereira, M. E. A. y Keusch, G. T. 1986. Description and characterization of a surface lectin from *Giardia lamblia*. *Infect and immun.* 52: 661-667.
10. Feely, D. E. and Erlandsen, S. L. 1982. Effect of cytochalasin-B, low Ca^{2+} concentration, iodoacetic acid and quinacrine-HCl on the attachment of *Giardia* trophozoites in vitro. *J. Parasitol.* 68, 869-873.

11. Feely, D. E., Holberton, D. V. and Erlandsen, S. E. 1990. The biology of *Giardia*. *En: Giardiasis*. (Meyer, E. A. ed), pp 11-49. Elsevier, Amsterdam.
12. Friend, D.S. 1966. The fine structure of *Giardia muris*. *J. Cell. Biol.* 29:317-332
13. Gillin, F. D., Reiner, D. S., Gault, H. D., Das, S., Wunderlich, A., and Sauch, J. F. 1987. Encystation and expression of cyst antigens by *Giardia lamblia* in vitro. *Science*. 235:1040-1043.
14. Hetsko, M., McCaffery, J. M., Svärd, S. G., Meng, T. C., Que, X., and Gillin, F. D. 1998. Cellular and transcriptional changes during excystation of *Giardia lamblia* in vitro. *Exp. Parasitol* 88: 189-201
15. Holberton, D.V. 1973. Fine structure of the ventral disk apparatus and the mechanism of attachment in the flagellate *Giardia muris*. *J. Cell. Sci.* 13: 11-41
16. Holberton, D. V. 1974. Attachment of *Giardia*-a hydrodynamic model based on flagellar activity. *J. Exp. Biol.* 60, 207-221.
17. Holberton D. V. and Ward A. P. 1981. Isolation of the cytoskeleton from *Giardia*, tubulin and a low-molecular-weight protein associated with microribbon structures. *J. Cell Sci.* 47, 193-166.
18. Holberton, D. V. and Ward, A. P. 1981. Isolation of the cytoskeleton from *Giardia*. Tubulin and a low molecular-weight protein associated with microribbon structures. *J. Cell Sci.* 47, 139-166.
19. Leammli, V. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
20. Lujan, H. D., Mowatt, M. R., Conrad, J. T., Blowers, B. and Nash, T. E. 1995. Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucin-rich repeats. *The Journal of Biological Chemistry*. 270 (49): 29307-29313.
21. Masson, P. y Patterson, B. 1987. Epidemiology of *Giardia lamblia* infection in children: cross-sectional and longitudinal studies in urban and rural communities in Zimbabwe. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37: 277-282.
22. McCaffery, J. M. and Gillin, F. D. 1994. *Giardia lamblia*: Ultrastructure basis of protein transport during growth and encystations. *Exp. Parasitol.* 79: 220-235.
23. Meyer, E. A. 1976. *Giardia lamblia*: Isolation and axenic cultivation. *Exp. Parasitol.* 39: 101-105

24. Narcisi, E.M., E. M., Paulin, J. J. and Fechheimer M. 1994. Presence and localization of vinculin in *Giardia*, J. Parasitol. 80(3): 468-473
25. Ortega, Y. R., and Adam, R. D. 1997. *Giardia*: overview and update. Clin. Infect. Dis. 25, 545-550.
26. Reiner, D. S., M. McCaffery, and F. D. Gillin. 1990 Sorting of cyst wall proteins to regulated secretory pathway during differentiation of the primitive eukaryote. *Giardia lamblia*. Eur. J. Cell Biol. 53:142-153.
27. Rubenstein, P. A. 1990. The functional importance of multiple actin isoforms. Bioessays 12: 309-315.
28. Sheffield, H. G., Bjorvatn, B. 1977. Ultrastructure of the cyst of *Giardia lamblia*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 26, 23-30.
29. Soltys, B.J., Gupta, R. S. 1994. Immunoelectron microscopy of *Giardia lamblia* cytoskeleton using antibody to acetylated α -tubulin J. Euk. Microbiol. 41(6): 625-632
30. Towbin, H., Staelin, T. and Gordon, J. 1979. Electroforetic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76(9):4350-4354.
31. Wolfe, M. S. 1992. Giardiasis. Clin. Microbiol. Rev. 5, 93-100.