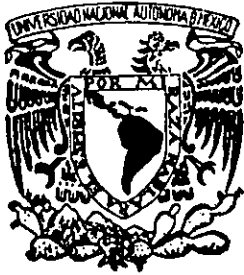


25



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“DETERMINACION DE LA CINETICA DE CRECIMIENTO Y GRUPO GENETICO EN AISLADOS DE *Giardia duodenalis* OBTENIDOS DE BORREGOS, CABRAS Y HUMANOS

299046

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
JOSE CORDERO HERNANDEZ



EXAMENES PRELIMINARES

México, D. F. FACULTAD DE QUIMICA Noviembre del 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ESTA TESIS NO SALI
DE LA BIBLIOTECA

JURADO ASIGNADO:

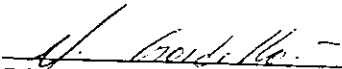
Presidente Prof. Beatriz Luna Millán.
Vocal Prof. Abel Gutiérrez Ramos.
Secretario Prof. Martha Ponce Macotela.
1er. Suplente Prof. María Guadalupe Tzuzuki Reyes.
2do. Suplente Prof. María de los Dolores Campos Echeverría.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Parasitología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría (INP) de la Secretaría de Salud.

Asesora:


Dra. Martha Ponce Macotela.

Supervisor técnico:


Biól. Mario Noé Martínez Gordillo.

Sustentante:


José Cordero Hernández.

Gracias:

A mis asesores: Martha y Mario, por su tiempo y dedicación para conmigo.

A los compañeros del laboratorio de Parasitología Experimental del INP, algunos bastante insistentes, pero de no ser por ellos aún la tesis estaría en redacción.

A todos aquellos que tuvieron la entereza de hacerme ver que estaba equivocado.

A la universidad, por la oportunidad de acceder a la educación superior.

A mis profesores que durante la carrera cooperaron en mi crecimiento personal y profesional.

Al INP por las facilidades que me otorgaron para la realización de este trabajo.

A mis tíos: Juan y Felicitas, por acogerme dentro de su familia desde el primer día, sin conocerme.

A todos ellos

Mil Gracias

Dedico este trabajo a:

Mis padres: María Inés Hernández Fernández y José Cordero Pérez, agradeciendo el gran esfuerzo que realizaron para dar a cada uno de nosotros (sus hijos) la oportunidad de concluir una licenciatura.

Gracias por el amor que han sembrado en nosotros, es la mejor forma de vivir para siempre, los quiero mucho.

Oscar y Adriana (mis hermanos), que siempre han creído en mí. Espero que esta tesis sea un aliciente que aumente su perseverancia.

Mis amigos, que durante la carrera me impulsaron, me alentaron y me acompañaron en todo momento. No necesito escribir nombres cada uno sabe de quien se trata.

Y muy especialmente a la persona que durante estos tres años, y dos meses me ha llenado de vida y ha hecho posible la realización de este

trabajo. Gracias María José C. M.



Índice

<i>Índice</i>	1
Introducción:	3
Objetivos:	4
Hipótesis:	4
Antecedentes:	5
Generalidades	5
El parásito (<i>Giardia duodenalis</i>)	7
Ciclo de vida	7
Estructura	9
Trofozoito.	9
Quiste	14
Manifestaciones clínicas	15
Patofisiología	15
Epidemiología	16
Caracterización de aislados de <i>G. duodenalis</i>	16
Perspectivas	18
Material y Métodos	19
Obtención de las muestras	19
Población de estudio	19
Exámenes Coproparasitológicos (CPS)	21
Concentración de quistes	21
Cuantificación de los quistes	22
Desenquistamiento	22
Enquistamiento in vitro	24

Obtención y mantenimiento de los cultivos de <i>Giardia duodenalis</i>	24
Determinación de la curva de crecimiento	25
Obtención de ADN de los trofozoítos	26
Amplificación de los genes, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	27
Visualización y determinación del tamaño de los productos amplificados	29
Resultados	30
Exámenes coproparasitológicos (CPS)	30
Desenquistamiento y establecimiento de los cultivos axénicos de <i>G. duodenalis</i> .	31
Determinación de la cinética de crecimiento	32
Identificación y análisis de productos amplificados por PCR	35
Discusión	40
Conclusiones:	49
Anexo A	50
Soluciones de trabajo	50
Apéndice B	55
Dislocación cervical	55
Bibliografía	56

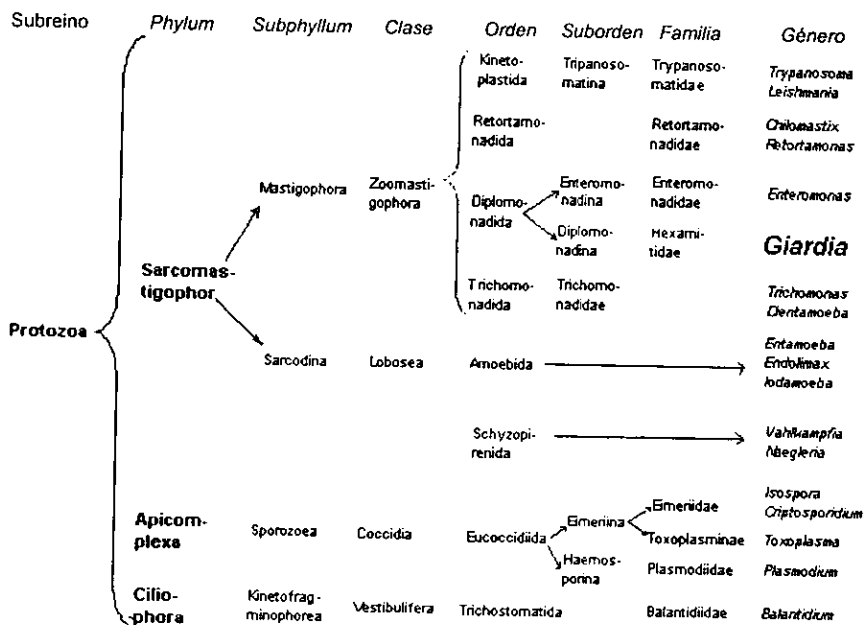
Antecedentes:

Generalidades

Giardia es un protozoo flagelado, binucleado, que coloniza el intestino de mamíferos, aves, reptiles y anfibios; carece de un retículo endoplásmico típico (RE), de mitocondrias o peroxisomas, hidrogenosomas, glicosomas¹ y aparato de Golgi; aunque, existe una descripción de un Golgi en el proceso de enquistamiento.¹⁸ Posee un ARN ribosomal más semejante al de bacterias que al de células eucarióticas;¹⁹ sin embargo, *Giardia* es una célula compleja y altamente desarrollada.

Giardia fue el primer parásito demostrado en el humano, Leewenhoek lo observó por primera vez en el siglo XVII (1681), cuando observaba con su microscopio una muestra de sus heces. En 1859, el investigador checo Lambl retomó el estudio del género, pero lo llamó *Cercomonas intestinalis*.²⁰ Por esta descripción la especie que infecta a humanos posteriormente recibió su nombre. Pero fue hasta 1882 cuando Kunstler sugirió el nombre de *Giardia*.²¹

La ubicación del género es:



Filice, en 1952, con base en la morfología de los trofozoítos describió tres especies¹: *Giardia duodenalis* (de mamíferos y aves), *Giardia agilis* (de anfibios) y *Giardia muris* (de roedores), como rasgo fundamental tomo en cuenta los cuerpos medios además de las pequeñas diferencias, en ocasiones no tan claras, de la forma y el tamaño (Fig 1).

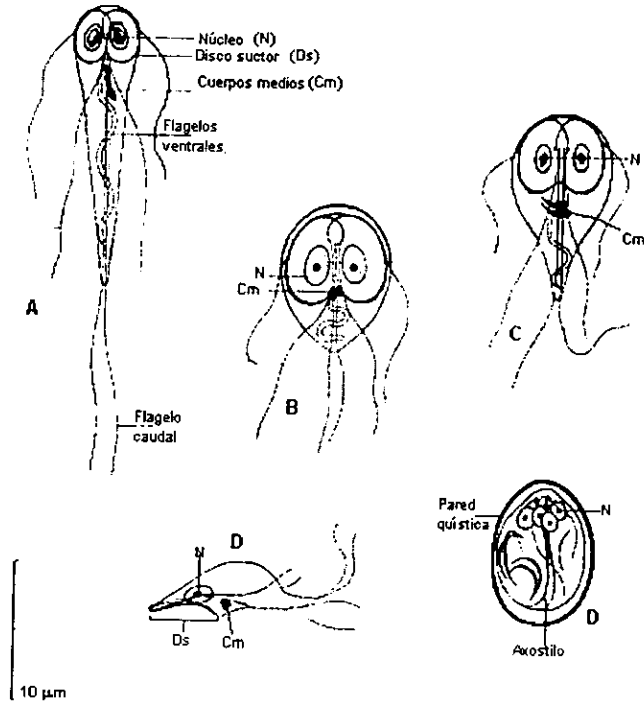


Figura 1. Representación esquemática de las tres especies de *Giardia*. Vista ventral de *G. agilis* (A), *G. muris* (B) y *G. duodenalis* (C). Vista lateral de *G. duodenalis* (D) y quiste (E). Esquema tomado de Kulda and Nohýnková 1978.

Los trofozoítos de *G. agilis* tienen un cuerpo largo y delgado, un disco suctor relativamente corto (AD) y sus cuerpos medios son largos, con forma de lágrima (MB) y están situados paralelamente al axostilo, bajo el disco suctor. Los dos núcleos (N) que *Giardia* presenta son grandes y están situados simétricamente en la parte anterior del parásito, bajo el disco suctor. *G. muris* tiene un cuerpo corto y ancho con un disco suctor

grande, que ocupa más de la mitad de la célula. Los cuerpos medios son pequeños y redondos, ubicados en el centro de la cara frontal de la célula. Los trofozoítos del grupo de *G. duodenalis* (C) tienen un cuerpo piriforme, su disco suctor ocupa un poco más de la mitad de su cuerpo. Los cuerpos medios tienen forma de clava, pero están colocados bajo el disco suctor (visto de frente) de forma perpendicular al axostilo.

Debido a que *Giardia* se puede establecer en una gran cantidad de animales, se describieron varias especies, dependiendo del huésped de origen.²²

Erlandsen y col., en 1987 y 1990, basados en características morfológicas de los trofozoítos, describieron dos nuevas especies: *Giardia psittac*²³ (en perico) que carece parcialmente del disco suctor y que fue observada previamente por Box²⁴ en 1981; *Giardia ardeae*²⁵ (en la garza azul), vista anteriormente por Georgi et al en 1986,²⁶ que se caracteriza por tener un solo flagelo caudal. En 1988, Feely describe otra especie: *Giardia microti*, la cual presenta diferencias morfológicas en los quistes, cada uno de ellos presenta dos trofozoítos con su disco suctor maduro.²⁷ Estas diferencias se corroboraron comparando el ARN ribosomal.²⁸

En los aislados del grupo morfológico *G. duodenalis* se han encontrado diferencias significativas, por lo que se sugiere que este grupo morfológico no es una sola especie sino un conjunto de subespecies.

El parásito (Giardia duodenalis)

Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Giardia duodenalis* se ilustra en la Figura 2. Posee dos fases: El **trofozoito**, el estadio vegetativo que coloniza el intestino delgado y causa daño al epitelio. El **Quiste**, es el estadio infectante y de resistencia que es capaz de soportar condiciones muy adversas del ambiente, como desecación y cambios de pH.²⁹

La infección se inicia cuando un huésped susceptible (mamífero) ingiere agua o alimentos contaminados con quistes tetranucleados de *Giardia*, éstos viajan a través del esófago hasta la cavidad estomacal, ahí son expuestos al contenido de los jugos gástricos y se

desencadena el proceso de desenquistamiento; en éste, la pared del quiste es degradada por agentes internos y externos.^{30,31 y 32}

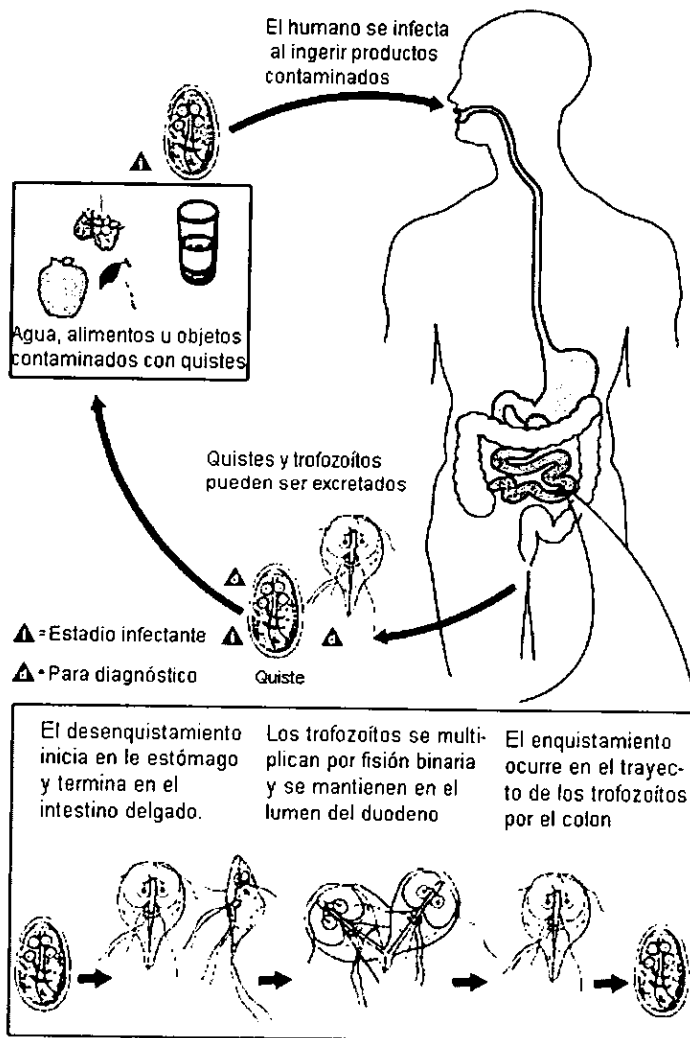


Figura 2. Representación esquemática del ciclo de vida de *Giardia duodenalis*. El ciclo completo del parásito se lleva a cabo en un solo huésped. (De la CDC).

En el intestino delgado, el parásito emerge rápidamente, en ese momento posee cuatro núcleos, se divide por fisión binaria longitudinal para dar lugar a dos trofozoitos

binucleados que se adhieren y colonizan las paredes del intestino delgado (figura 3). En este ambiente los trofozoítos se reproducen por varias semanas o meses.

Los trofozoítos son arrastrados hacia el intestino grueso se exponen a un medio que favorece el enquistamiento: presión osmótica alta, poca humedad, y diferencias de pH entre otros.^{33,34}

Los quistes son ovoides binucleados y están cubiertos de una pared gruesa que protege a la célula del ambiente adverso; en el trayecto del intestino grueso el quiste duplica sus núcleos y finalmente es excretado con las heces. Cuando otro huésped susceptible ingiere estos quistes el ciclo se inicia nuevamente.



Figura 3. Trofozoítos de *Giardia duodenalis* colonizando el duodeno de un perro. Los trofozoítos pueden ser identificados entre las vellosidades del intestino. Trofozoítos de *Giardia*(g); las cabezas de flecha señalan células caliciformes y las flechas, células caliciformes vacías. Cortesía de Ponce-Macotella M. y col.

Estructura

TROFOZOÍTO.

Los trofozoítos de *G. duodenalis* miden de 10 a 12 μm de longitud y 5 a 7 μm de ancho. De frente tiene la forma de gota de agua, la parte anterior más ancha que la parte posterior (fig. 4), de lado es una célula cóncava. Presenta un disco suctor o disco ventral que ocupa dos terceras partes de la superficie frontal del parásito, dos núcleos prominentes, un cuerpo medio, gránulos ribosomales y cuatro pares de flagelos. Carece

de: mitocondrias, retículo endoplásmico liso y aparato de Golgi, aunque se ha descrito una estructura similar a un Golgi en el proceso de enquistamiento.¹⁸

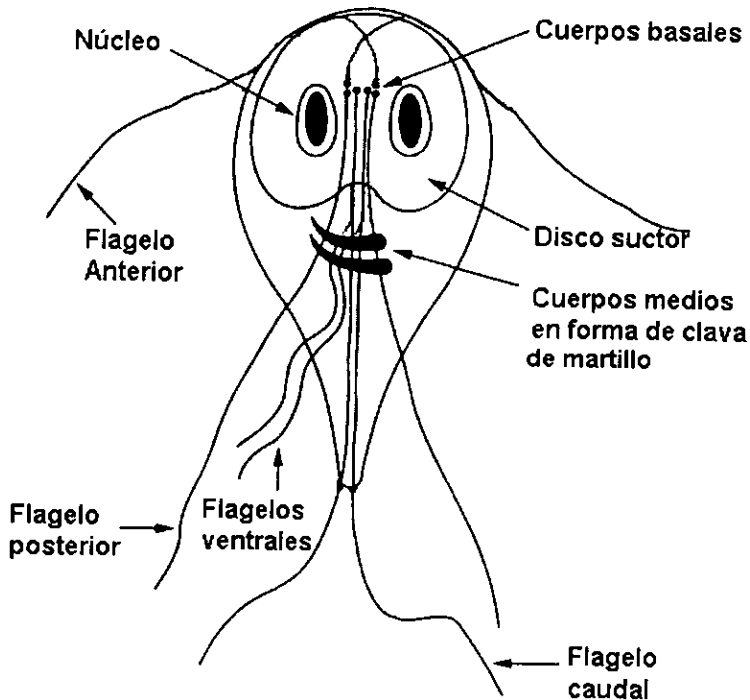


Figura 4. Esquema de un trofozoito de *Giardia duodenalis* visto de frente. Se muestran las características morfológicas fundamentales.

La superficie del trofozoito está cubierta con una serie de proteínas, las VSP's (proteínas variables de superficie), que son las que interactúan con el huésped.

Las VSP's se encuentran formando una capa delgada en la superficie de los trofozoitos,³⁵ la función que estas proteínas desempeñan para la célula, no es muy clara, sin embargo, se sabe que dichas proteínas poseen una gran cantidad de cisteína³⁶ y por

lo tanto tienen afinidad por los iones metálicos, como el Zn^+ y el Fe^{+2} ,³⁷ entre otros metales;³⁸ la cisteína se encuentra en forma de secuencias repetitivas de Cys-XX-Cys, similares a los dominios LIM³⁹ y RING,⁴⁰ repartidas aleatoriamente a lo largo del polipéptido, lo que sugiere su participación en interacciones proteína-proteína.

Los cationes metálicos son cofactores importantes de las proteasas intestinales y las VSP poseen la capacidad de captar esos cationes, esto le da al trofozoíto una importante resistencia a la digestión por este tipo de enzimas presentes en el intestino delgado (proteasas). Por esta capacidad quelante también se han propuesto como un mecanismo de captación de nutrientes (iones), favoreciendo el síndrome de mala absorción⁴¹ y creando deficiencia de estos metales en el organismo.^{42,43}

Cada trofozoíto tiene aproximadamente 150 genes que codifican a diferentes VSP's, sumando cerca del 2% de su material genético total, de éstos solo se expresa uno a la vez⁴⁴; sin embargo la cantidad de VSP's codificadas en el genoma de cada aislado es distinto. Durante el desarrollo de las células la capa superficial de VSP, puede ser sustituida por completo, (fenómeno reproducible *in vitro*);⁴⁵ esta estrategia de recambio antigénico, le permite al trofozoíto evadir la respuesta inmune del huésped, algunas evidencias sugieren que la expresión de las VSP's es modulada por la propia respuesta del huésped contra el parásito.⁴⁶

Disco suctor (disco ventral). Es cóncavo, ocupa cerca de dos terceras partes de la cara frontal del parásito, su función principal es la de adherirse a las microvellosidades del intestino. El centro del disco presenta una consistencia rígida, de apariencia estriada, debida a microtúbulos, constituidos de tubulina y microrribones que contienen proteínas denominadas giardinas. La periferia es lisa y se encuentra delimitada por un anillo muy flexible con propiedades contráctiles, por lo que se cree que tiene como principal función la adhesión a las microvellosidades intestinales.⁴⁷

Núcleos. El trofozoíto de *G. duodenalis* posee dos núcleos, localizados en la parte superior del trofozoíto y detrás del disco suctor, uno de cada lado del eje longitudinal de la célula. La membrana nuclear esta en estrecho contacto con los ribosomas. Los dos

núcleos son transcripcionalmente activos, durante la división celular ambos se dividen a la par.

El estudio del genoma de *G. duodenalis* no ha dejado hasta ahora material suficiente para decir que los dos núcleos no son idénticos. El material genético total está dividido en cinco cromosomas, que se encuentran en ambos núcleos.⁴⁸

A pesar de que el genoma de *Giardia* está por completarse, existen aún muchas dudas en cuanto a si *Giardia* es diploide o no, además de que algunos investigadores proponen la existencia de siete cromosomas y no de cinco.⁴⁹

Cuerpo medio. Esta estructura es única del género *Giardia* y se ha utilizado para diferenciar a las especies. *G. duodenalis* posee dos cuerpos medios, en forma de clava, que se encuentran cerca del centro del parásito, junto al borde inferior del disco suctor, su función no está dilucidada; pero, debido a que está constituido por microtúbulos, se cree que puede intervenir en la mitosis o en el proceso de enquistamiento.

Vacuolas. Las vacuolas de *G. duodenalis* se encuentran alineadas a lo largo del plasmalema dorsal y en menor cantidad del ventral (Fig 5), pueden contener hidrolasas, DNA'sas, RNA'sas y proteinasas, de las que se ha demostrado su capacidad para cortar, hemoglobina e inmunoglobulina A1 (IgA1),⁵⁰ por lo que se ha considerado que las vacuolas son importantes desde el punto de vista de la patogenicidad.

En el proceso de desenquistamiento se ha observado que algunas vacuolas son exteriorizadas, y su contenido principal es la N-acetil-D-galactosaminasa,³⁰ por lo cual es degradada la pared quística.

Flagelos. *G. duodenalis* posee cuatro pares de flagelos, los anteriores, los caudales, los posteriores y los ventrales. Todos ellos emergen de cuerpos basales, que se encuentran entre los dos núcleos (Fig. 4) Cada flagelo es constituido por nueve pares de microtúbulos colocados simétricamente alrededor de un par central (Figura 5 y 6). Además de su función de locomoción, los flagelos han sido propuestos como medio de adhesión.⁵¹



Figura 5. MET de un trofozoito de *Giardia muris*, vacuolas en el plasmalema, ocho axonemas de donde surgen los flagelos (A), dos núcleos (N), disco suctor (D) y cuerpo medio (M). Tomada de Trans Roy Soc Trop Med and Hyg. 1980; 74(4).



Figura 6. MET de un flagelo de una célula eucariótica. Se observa la organización clásica flagelar. Barra = 200 nm.

QUISTE

El quiste es la fase infectante del parásito y de resistencia al ambiente adverso. Tiene forma ovoide, mide aproximadamente $5\ \mu\text{m}$ de ancho por $8\ \mu\text{m}$ de longitud (Fig. 7). Esta cubierto por una pared quística de $0.3\ \mu\text{m}$ de espesor,⁵² constituida principalmente de N-acetil-galactosamina (Gal/Nac). La membrana citoplásmica se encuentra separada de la pared del quiste por una membrana interna y por una capa delgada de citoplasma, que protege a la célula. Los quistes maduros poseen cuatro núcleos, axonemas flagelares, ribosomas y fragmentos del disco ventral.

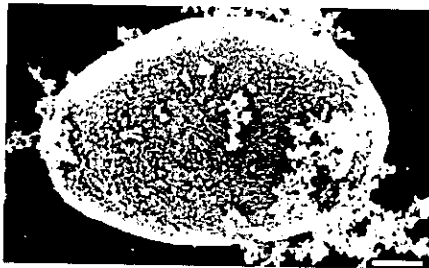


Fig. 7. Microscopía electrónica de barrido del quiste de *G. duodenalis*. Barra = $1\ \mu\text{m}$ (Erlandsen).

Durante el proceso de desenquistamiento la enzima N-acetil-galactosaminasa degrada la pared quística, la cual es secretada por medio de vacuolas hacia el espacio laminar y se libera el trofozoíto (Figura 8).

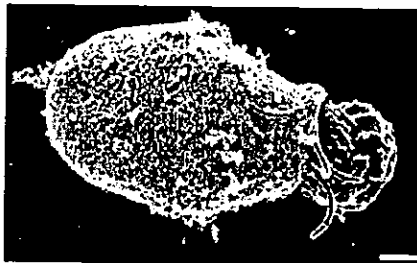


Fig. 8. Microscopía electrónica de barrido de un trofozoíto en proceso de desenquistamiento (por Stanley Erlandsen).

Manifestaciones clínicas

El periodo de incubación va de 1 a 45 días,⁵³ hay pacientes que pueden cursar asintomáticos y otros pueden presentar: náusea, vómito, dolor abdominal, diarrea, meteorismo, hiporexia, pérdida de peso y mala absorción intestinal.⁵⁴

En pacientes con hipogamaglobulinemia las manifestaciones clínicas son más severas, se presentan con mayor intensidad la diarrea y el síndrome de mala absorción, provocando deficiencias en la vitamina B12, lactosa (disacáridos), grasas y aminoácidos con el consecuente retardo en el crecimiento de los niños.

Además de las manifestaciones gastrointestinales, se reportan pacientes con giardiosis y alergia.⁵⁵

Patofisiología

La variedad de las manifestaciones clínicas son debidas a la patogenicidad de los aislados, al número de quistes ingeridos, la edad y el estado alimenticio del huésped, así como de su estado inmunológico durante la infección.

El daño provocado por el parásito va de lo moderado a lo severo, es debido a la presencia y adhesión de los trofozoítos en las paredes del lumen intestinal, esto puede ocasionar daño en los enterocitos, acortamiento de las microvellosidades e hiperplasia de las células crípticas.⁵⁶

El síndrome de mala absorción se presenta cuando los trofozoítos crean una barrera entre las microvellosidades intestinales y el lumen, impidiendo la absorción de los nutrientes; pero al migrar de su lugar de adhesión, dejan dañadas las células entéricas, provocando así una mala absorción por un tiempo más prolongado.

Todas estas manifestaciones son provocadas por la colonización del intestino delgado por los trofozoítos.

Epidemiología

Giardia duodenalis es el parásito intestinal más comunmente aislado en humanos, principalmente en niños.^{57,58,59,60} Aunque algunos niños son asintomáticos existen también algunos de ellos que presentan pérdida de peso y /o diarrea.

La gran prevalencia de la infección por *Giardia duodenalis* puede deberse a que los quistes son altamente infectivos; puede adquirirse con la ingestión de al menos 10 quistes del parásito.⁶¹ La infección por *G. Duodenalis* se puede dar por la ingestión de los quistes presentes en agua contaminada,¹⁰ por consumir alimentos que contengan quistes,⁶² o por vía fecal oral. Sin embargo la primera vía es la más importante, ya que se ha visto que el mayor número de brotes de giardiosis se da por que los depósitos de agua han sido contaminados con quistes, por algún animal infectado. Lo que posiblemente ubica a la fauna silvestre que viva cerca de depósitos de agua como reservorio y diseminadores de la enfermedad. Sin embargo la transmisión zoonótica de *Giardia* requiere una comparación exhaustiva de los aislados obtenidos de humanos y los de animales.

Debido a que los quistes no son susceptibles al 100% a las concentraciones de cloro habituales para agua potable, la forma más recomendable de eliminarlos es por filtración.⁶³

Caracterización de aislados de *G. duodenalis*

Debido a la enorme cantidad de mamíferos que hospedan a *Giardia* y a los ensayos de transmisión cruzada,⁶⁴ se ha enfatizado en descubrir las diferencias entre los aislados provenientes de distintos huéspedes, sobre todo en los que tienen un contacto más estrecho con el hombre.

Los aislados se han caracterizado con herramientas bioquímicas y moleculares: variabilidad antigénica,^{65,66} sensibilidad a fármacos,⁶⁷ análisis isoenzimáticos,^{68,69,70} cariotipos,⁷¹ hibridaciones,^{72,73} amplificación y restricción de genes.^{74,75}

Con los resultados isoenzimáticos, de variabilidad antigénica, hibridaciones, amplificación y restricciones los aislados de *G. duodenalis*, obtenidos de humanos, distintos autores

han clasificado a los aislados en grupos, pero todos ellos, sin importar el método de estudio utilizado concuerdan en la agrupación (Tabla I).

Los experimentos realizados con diferentes loci de las enzimas de *Giardia*, han demostrado diferencias entre los aislados, pero a pesar de las diferencias existen similitudes entre cierto número de aislados, dando lugar a dos grandes agrupaciones, llamados Ensamblés.⁷⁶

Tabla I. Clasificación de los aislados de *Giardia duodenalis*, de humanos

Andrews (Int J Parasitol 1989)	Ey PL. (Parasitol 1993)	Homan (Parasitol Res. 1992)	Nash TE. (Exp Parasitol 1992)
I	Ensamble A Grupo I	Polish	1
II	Ensamble A Grupo II	Polish	2
III	Ensamble B Grupo III	Belgian	3
IV	Ensamble B Grupo IV	Belgian	

Con los ensayos y el análisis de los RFLP's de genes amplificados, pertenecientes a la familia de las *VSP* (417), se han descrito de igual manera los grupos genéticos, que son subdivisiones de los ensamblés^{74,77} y que mantienen una gran relación con los grupos descritos por otros autores. Los genes utilizados para estos estudios son: *VSP417*, con sus distintos alelos, *VSP1267* y *GDH*.⁷⁸

En cuanto al tamaño de los productos de la amplificación y de las restricciones, se tiene que al amplificar una fracción distal del gen *TSA-417* (*VSP417-1*), obtenemos dos tipos de productos:

Uno de aproximadamente 0.52 Kb, el cual es característico de los grupos I y II (definidos por Andrews et al 1989), pertenecientes al ensamble A.

Y otro más pequeño de 0.37 Kb, obtenido de los aislados pertenecientes al Ensamble B, grupos III y IV.

Para diferenciar entre los grupos de cada Ensamble se utilizó la enzima de restricción *Pst*I; la cual nos da un patrón distinto para cada grupo. En el caso del grupo I, la enzima corta una porción del producto de 0.52 Kb en dos fragmentos: uno de 0.33 Kb y otro de 0.19 Kb. Para el grupo II se tiene lo siguiente: cuatro fragmentos diferentes a la fracción restante de 0.52 Kb, con pesos de 0.37, 0.33, 0.19y 0.15 Kb (Figura 9).

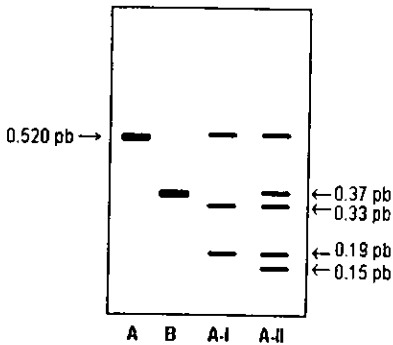


Figura 9. Esquema que representa los patrones de bandas de el Ensemble A (A) y el Ensemble B (B), resultado de la amplificación de ADN, utilizando los oligonucleótidos 432 y 433 (Ey PL. 1993).

La tercer y cuarta columna muestran el número y tamaño de los fragmentos obtenidos por la digestión del producto de 0.52 kb, con *Pst*I.

A-I = Ensemble A, grupo genético I.

A-II = Ensemble A, grupo genético II

Los ensayos hechos con aislados de animales han dejado datos interesantes, por ejemplo el surgimiento de nuevos grupos genéticos relacionados con los grupos genéticos I y II del Ensemble A,⁷⁹ el descubrimiento de aislados de animales, que pertenecen al Ensemble A, grupo genético II; el cuál se creía que era exclusivo del humano (datos no reportados). Esto dejó de lado la idea de que el grupo genético I es solamente el que puede ser potencialmente zoonótico y que el grupo II era exclusivo de un huésped, el humano.

Con los resultados obtenidos con los estudios genéticos y bioquímicos se ha planteado que la especie *G. duodenalis* no es un sola, sino que es un conjunto de especies con la misma morfología, pero genéticamente diferentes. Ya que algunos individuos del grupo de *G. duodenalis* muestran diferencias tan grandes como las presentes entre el propio grupo de *G. duodenalis* y el de *G. muris*, siendo ambas dos especies diferentes.⁸⁰ Esta propuesta hasta el momento sigue creando controversia, y no se han logrado unificar los criterios respecto a esto, por lo que queda mucho por hacer para demostrar esta hipótesis.

Perspectivas

Debido a que la giardiosis es una parasitosis muy frecuente en México, por la gran cantidad de individuos que pueden estar infectados,⁸¹ y que los niños y los pacientes hipogamaglobulinémicos son los más afectados, por las repercusiones a nivel de nutrición, en los primeros y de deshidratación en los últimos;⁴³ es necesario conocer los genotipos predominantes de los aislados de *G. duodenalis* procedentes de animales de granja, para apoyar la hipótesis de los aislados con potencial zoonótico.

Material y Métodos

Obtención de las muestras

El muestreo se realizó en pequeños rebaños de ganado ovino y caprino pertenecientes a poblaciones del altiplano mexicano. Los municipios estudiados fueron: Almoloya, Apan, Chimalpa, Col. los voladores, Emiliano Zapata, Ocoatepec, Tepetlayuca y San Isidro, del Estado de Hidalgo (Figura 10).

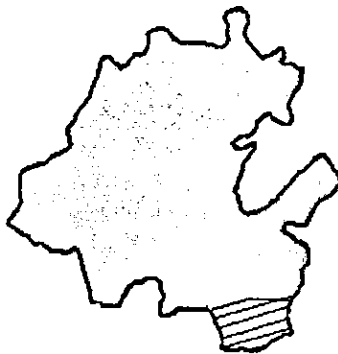


Figura 10. Mapa del Estado de Hidalgo. La zona más clara muestra la región de estudio.

Las muestras se obtuvieron por raspado anal o por recolección de las heces recién excretadas y depositadas en el suelo. Se colectaron en recipientes de plástico, se mantuvieron a 4°C y se trasladaron al laboratorio de Parasitología Experimental del INP. Debido a la lejanía de los poblados únicamente se obtuvo una muestra por animal.

Población de estudio

Los animales de estudio son de poblados pequeños con características rurales, que no poseen sistema de drenaje apropiado, los pisos de las casas son de tierra, hay defecación al ras del suelo, los niños caminan sin calzado por la casa y viven en estrecho contacto con los animales.

Los corrales donde los animales se resguardan son pequeños, están ubicados detrás o junto a la casa, pero en ocasiones se pueden encontrar en el traspatio o deambulando por el interior de la casa. Su alimentación se basa en el pastoreo, con esquilmos forrajeros y con los desperdicios de la comida de la familia. Este tipo de animales ocupa los sembradíos o los pastizales después de que otros rebaños mucho más grandes ya han pastado por ahí.

Exámenes Coproparasitológicos (CPS)

A cada una de las muestras se le realizaron CPS, directos y de concentración-flotación (Faust). Brevemente: Examen directo. Se tomaron tres alícuotas de diferentes regiones de la muestra (2 g aprox.), se hidrataron con agua destilada y se resuspendieron homogéneamente. De la suspensión se tomaron, con un asa, dos muestras una se mezcló con solución buffer de fosfatos (PBS, Apéndice A) y la otra con lugol, todo esto sobre un portaobjetos. Las observaciones se hicieron a 10 y 40X, en un microscopio Carl Zeiss.

Faust: Aproximadamente un gramo de heces de la muestra, se resuspendió en 7-8 mL de agua, se paso por un cedazo, se centrifugó por un minuto a 2000 r.p.m. (centrífuga Heraeus Christ GMBH, UJ3S); el sobrenadante se decantó, y el sedimento se lavó en dos ocasiones agregando agua, resuspendiéndolo y centrifugándolo. Al sedimento se le adicionó tres mililitros de $ZnSO_4$, se resuspendió y se le adicionó después el $ZnSO_4$ suficiente, hasta que el volumen de la suspensión no sobrepase el 90% de la capacidad del tubo. Esta suspensión se centrifugó un minuto a 1000 r.p.m., con un asa se tomó una muestra de la superficie, se colocó entre porta y cubreobjetos y se observó bajo el microscopio.

Las muestras con quistes de *G. duodenalis*, se hidrataron, resuspendieron y almacenaron a 4°C por un tiempo no mayor a tres semanas.

Concentración de quistes

Las muestras con *G. duodenalis* se pasaron por un cedazo y se centrifugaron a 2500 r.p.m., por dos minutos. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se resuspendió con agua destilada en una proporción de 5:1 y se centrifugó en las mismas condiciones; este procedimiento se repitió dos veces más. La suspensión obtenida se utilizó para adicionarla sobre un gradiente de fenol-sacarosa.

En tubos de ensayo de 8 mL se formó un gradiente de concentración con dos soluciones de sacarosa-fenol, cuyas densidades fueron de 1.18 y 1.08 g/mL en proporción 2:1 respectivamente. Después de formado el gradiente, se colocaron 0.5 mL de la suspensión homogénea de cada muestra, procurando que esta resbalara lentamente por las paredes.

Todos los tubos se centrifugaron por 20 minutos a 6000 r.p.m. Posteriormente, los tubos se sacaron cuidadosamente y se colocaron de forma vertical sobre una superficie plana; de cada uno de los tubos se extrajo el anillo denso que se formó en la interfase, donde se encontraron los quistes, y se colectó en un sólo tubo. Este concentrado se lavó con cinco veces su volumen de agua destilada, (tres ocasiones), el precipitado se resuspendió y centrifugó a 3500 r.p.m. por 12 minutos. Después de los lavados el precipitado final se colectó en un tubo eppendorf de 1.5 mL y los quistes se cuantificaron.

Cuantificación de los quistes

La cuantificación de los quistes se realizó en una cámara de Neubauer: se colocó una alícuota de 10 μ L de muestra en cada uno de los extremos de la cámara, la lectura se realizó con el objetivo de 16X de un microscopio Carl Zeiss; se contaron los cinco cuadrantes de cada pozo y el número final de quistes se obtuvo con el siguiente algoritmo:

$$\text{No. de células por mL} = (\text{No. de células en 10 cuadrantes})(1000)(1/\text{dilución})$$

La viabilidad de los quistes se determinó colocando una alícuota del concentrado de quistes en un portaobjetos y adicionándole una gota de eosina. Para obtener el porcentaje de quistes viables, que son susceptibles al desenquistamiento *in vitro*, se contabilizaron 100 quistes, y el número de quistes traslúcidos e incoloros se dividió entre el total de los quistes.

Los quistes obtenidos se dividieron en dos lotes:

- a) desenquistamiento *in vitro* (medio ácido-alcálico) y
- b) desenquistamiento *in vivo*, en *Meriones unguiculatus* (jerbo).

Desenquistamiento

a) *In vitro*. Este proceso se llevó a cabo en una campana de flujo laminar. A una suspensión de 1×10^5 quistes, contenidos en un volumen de 100 mL, se le agregó un

mililitro de medio de inducción (apéndice A), a 40°C; se agitó enérgicamente y se incubó por 30 minutos a 37°C en una atmósfera de bajo contenido de oxígeno. Después, el tubo se centrifugó durante 30 segundos a 6000 r.p.m., el sobrenadante se eliminó, el precipitado se resuspendió con un mililitro de solución neutralizante (apéndice A) y se centrifugó inmediatamente en las mismas condiciones. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se lavó nuevamente con la solución alcalina. El precipitado celular se resuspendió con medio TYI-S-33 a 37°C y se vertió en tubos con 8 mL de medio. Cada ensayo se realizó por cuadruplicado.

Para monitorear el proceso de desenquistamiento, una alícuota de 50 mL de la suspensión final se colocó en un portaobjetos excavado y se observó al microscopio.

b) *In vivo*. Se trabajó con tres grupos de 6 gerbos, machos, recién destetados y libres de parásitos. Cada grupo (6 animales), se dividió en dos lotes, (cada uno con tres gerbos):

- i) Uno de los lotes (con 3 animales) se usó como testigo . A estos animales se les inocularon 50 mL de agua destilada por vía oral.
- ii) El otro fue inoculado por vía oral con 30000-60000 quistes de *G. duodenalis* suspendidos en 50 mL de agua destilada.

Los gerbos se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum*. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical (apéndice B), trece días después de la inoculación. Se extrajo el intestino delgado, se colocó en un medio isotónico (PBS), se segmentó en sus tres porciones: duodeno, yeyuno e íleon y cada una de ellas se abrió longitudinalmente para buscar trofozoítos de *G. duodenalis*. Los segmentos que presentaron trofozoítos se colocaron en tubos con tapón de rosca, a los que se les adicionó PBS a 37°C. Esto para que las células se adhieran al tubo y se pudiera eliminar el contenido intestinal. Después de que las células se observaron adheridas al tubo de vidrio, los restos intestinales fueron eliminados y las células adheridas se lavaron con PBS, el número de veces que fuera necesario para eliminar cualquier tipo de contaminación y así poder obtener un cultivo axénico a partir de estas células. Después, el PBS se eliminó y se sustituyó por TYI-S-33, los tubos se incubaron a 37°C.

Enquistamiento in vitro

El enquistamiento se llevó a cabo en tres fases: Preenquistamiento, enquistamiento y postenquistamiento.

Preenquistamiento: A tres tubos con trofozoítos en fase de crecimiento logarítmico con una monocapa celular de aproximadamente 90%, se les decantó el medio de cultivo, se les agregó el TYI-S-33 modificado (Apéndice A) y se incubaron a 37°C, por 24 h.

Enquistamiento: Los tres tubos se centrifugaron siete minutos a 5000 r.p.m., se les decantó el medio de cultivo, se les agregó TYI-S-33 , pH 6.9. Se incubaron 24 h, 37°C.

Postenquistamiento: Después de la incubación, los tubos se centrifugaron por siete minutos a 5000 r.p.m., el medio se decantó y se substituyó por agua desionizada, con el fin de lisar las células no enquistadas.

Los quistes resultantes se concentraron por centrifugación y se cuantificaron.

Obtención y mantenimiento de los cultivos de Giardia duodenalis

Las células, resultantes del desenquistamiento *in vitro e in vivo*, se mantuvieron en TYI-S-33 a 37°C con una inclinación de 45° respecto a la horizontal y sin agitación. Cada 7 u 8 horas las células se observaron con ayuda de un microscopio invertido; se analizó la adherencia de las células, la morfología, la cantidad de células en división, la presencia o ausencia de células muertas (formando un botón en el fondo del tubo) y la opacidad del medio. A los cultivos que no mostraron un buen desarrollo se les reemplazó el medio de cultivo en varias ocasiones, hasta que el cultivo se estableciera por completo y se formara una monocapa de células adheridas a la pared del tubo. La axenización se comprobó al sembrar una alícuota del contenido de los tubos con los trofozoítos en una caja con gelosa sangre, observada 48 horas después y no observar cambio alguno en el medio.

Una vez establecidos los cultivos, se hizo una resiembra de los mismos en una serie de tubos (expansión) y se mantuvieron en las condiciones anteriormente descritas.

Determinación de la curva de crecimiento

El ensayo se realizó con tubos excluyentes (utilizados una sola vez), por cuadruplicado, dos ensayos por semana, con lotes de diez tubos y todas las cuantificaciones celulares se realizaron por duplicado.

Quantificación celular para preparar los tubos para la curva de crecimiento.

De los tubos resembrados se eligieron cuatro tubos al azar, que tuvieran la mayor parte de las células en fase logarítmica, que presentaran una morfología característica y con una monocapa celular que ocupara más del 80% de la superficie. Los tubos se enfriaron en hielo por 15 minutos, se centrifugaron a 3500 r.p.m. por cinco minutos, el medio se decantó, las células se concentraron en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, en un volumen final de un mililitro, y se cuantificaron en una cámara de Neubauer.

Alícuotas con 500 000 trofozoítos se sembraron en cada uno de los tubos, se incubaron a 37°C con una inclinación de 45° respecto a la horizontal de la incubadora y en una atmósfera con bajo contenido de oxígeno.

Curva de crecimiento: se seleccionó al azar un tubo con trofozoítos en fase de crecimiento se colocó en hielo por 15 minutos, se rotó sobre su eje vertical y horizontal en 10 ocasiones y de la parte superior se obtuvo una alícuota de 100 μ L. De éstos, se tomaron dos alícuotas de 10 μ L, cada una, se colocó en un extremo de la cámara de Neubauer y se contó el número de células por cuadrante.

Cuando el número de células contabilizadas en la cámara excedió los 250 trofozoítos, la muestra se diluyó hasta obtener entre 100 y 250 trofozoítos en 20 μ L. Las muestras se tomaron cada ocho horas, en un periodo de 88 horas o hasta observar que el cultivo comenzaba su fase de muerte.

Los datos obtenidos de las lecturas se promediaron, obteniendo de esta manera cada punto de la curva de crecimiento. Para obtener la curva de crecimiento se graficaron los datos obtenidos colocando el No. de células por mililitro de cultivo contra el tiempo de cultivo, en horas. Y para obtener el tiempo de generación se obtuvo la pendiente de la fase logarítmica de crecimiento, graficando el Logaritmo base "e" del No. de células contra tiempo de desarrollo en horas.

El tiempo de generación se obtuvo mediante la ecuación:

$$e^{((t_{1/2}) \cdot (m))} = N_t / N_0$$

despejando para $t_{1/2}$ tenemos:

$$t_{1/2} = (\ln(N_t / N_0)) / m$$

en donde t_2 es el tiempo de generación; m es la pendiente de la fase Log., N_t es el No. de células al tiempo t y N_0 es el número de células al tiempo 0. En este caso N_t / N_0 es 2.

Obtención de ADN de los trofozoítos

Lisis de los trofozoítos: A 20 tubos de cultivo con células de *Giardia* en fase logarítmica de su crecimiento, utilizados para la determinación de la cinética de crecimiento, se les colocó en hielo por 15 minutos. Posteriormente, los tubos se agitaron girándolos sobre su eje transversal para liberar los trofozoítos adheridos, se centrifugaron por 6 minutos a 5000 r.p.m. El sobrenadante del tubo se decantó y las células obtenidas se lavaron con PBS estéril en tres ocasiones. El concentrado de células se pasó a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se le adicionó 0.400 μ L de solución de lisis celular (Apéndice A) con 10 μ L de proteinasa K (10 mg/ ml). La suspensión se incubó por 12 horas a 42°C con agitación.

Extracción de los ácidos nucleicos. Para extraer los ácidos nucleicos se realizaron dos extracciones fenólicas. A los tubos se les adicionó 400 μ L de fenol (Apéndice A) y 400 μ L de cloroformo (-20°C), la mezcla se agitó por inversión durante 10 minutos, se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 10 minutos (microcentrifuga eppendorf) y la fase acuosa resultante se recuperó en otro tubo de 1.5 mL. Se realizó otra extracción fenólica, de la cual se aisló la fase acuosa y finalmente se hizo una extracción con cloroformo, se agitó y se centrifugó de igual manera. A la fase acuosa se le adicionó 800 μ L de etanol absoluto frío (-20°C) y 30 μ L de acetato de sodio 4 M; se mezcló y se colocó a -20°C durante 12 horas.

Posteriormente, los tubos se centrifugaron por 10 minutos a 12000 r.p.m., el sobrenadante se decantó y el etanol sobrante se eliminó por evaporación. El precipitado se resuspendió en 200 mL de Tris-EDTA (TE, apéndice A).

Eliminación del ARN: A la suspensión obtenida se le adicionó 10 μ L de una solución de RNAsa (apéndice A) y se incubó por treinta minutos a 37°C. Terminada la incubación se atemperaron los tubos, se hizo una extracción fenólica y una con cloroformo (-20°C), como se describió anteriormente. La fase acuosa resultante se colocó en un tubo nuevo y se le adicionó 800 μ L de etanol (-20°C) y 30 mL de acetato de sodio, esta solución se dejó por 12 horas a -20°C. Posteriormente, los tubos se centrifugaron por 10 min a 12000 r.p.m., el sobrenadante se decantó, el etanol residual se evaporó y el precipitado se resuspendió en 150 mL de TE. Finalmente se determinó la concentración del ADN midiendo la absorbancia de la solución con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm.

Amplificación de los genes, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se amplificaron secuencias de genes de proteínas variables de superficie: *VSP417-1*, *VSP417-2* y *VSP1267* (Figura 11).

Para realizar estos ensayos se preparó una solución de ADN con una concentración de 50 ng/ mL.

Las mezclas de reacción se trabajaron en un volumen de 50 μ L, conteniendo: 50-100 ng de ADN de *Giardia*; TRIS-HCl 10 mM (pH 8.3); KCl 50mM; MgCl₂ 2.25 mM; desoxiadenosin trifosfato (dADP), desoxiguanidin trifosfato (dGDP), desoxitimidin trifosfato (dTTP) y desoxicitidin trifosfato (dCTP); 0.2 mM de cada uno de los nucleótidos y 2.3 UI de Taq *gold* polimerasa. La mezcla se conservó en un baño de hielo.

Primer ensayo: Detección de los segmentos de \approx 0.52kb del gen *VSP417*

Se amplificaron segmentos homólogos de tres genes de la familia *VSP417* (proteínas variantes de superficie). En la amplificación se utilizaron los oligonucleótidos 432 y 433 (Ey et al. 1993a), con la siguiente secuencia:

432: 5'- ACGACGGTACTAAGGGCACGTG -3' y el oligonucleótido reverso

433: 5'- GTATCC(T/C)GGAGCTCAC(G/A)CCTTACATGTTGTAGCTGCTCCA -3'

Con estos oligonucleótidos se amplifican productos de ≈ 520 pb de tres alelos de la VSP417. (VSP417-1, 2 y 3). Las muestras se desnaturalizaron a 95°C por 10 minutos, después 5 ciclos de amplificación (95°C por 15s, 63°C por 45s y a 72°C por 2 min.), seguidos de 25 ciclos (15 s a 95°C, 45s a 67°C y 3 min. a 72°C) y un tiempo de elongación de 10 min. a 72°C.

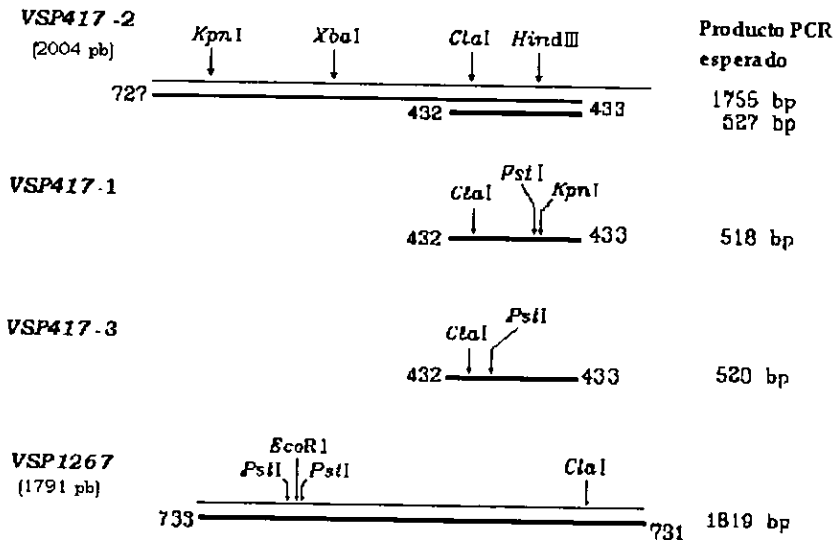


Figura 11. Diagrama a escala de los tres alelos de la VSP417, y del gen VSP1267, amplificados con los oligonucleótidos 5'-3'. 432+433 para VSP417-1,2,3; 727+433 para un segmento de 1766 pb del alelo VSP417-2 y 733+731 para VSP1267. También se muestra la localización de los sitios de restricción utilizados en la determinación de los RFLP's.

Segundo ensayo: Amplificación de un segmento de 1.8 Kb del VSP417-2

En este ensayo se amplificó un segmento de 1.8 kb del alelo 2 de la VSP417 con los oligonucleótidos 727 y 433.

727: 5'- CGTATCGATGAGCTGAGAAGGATTTTAATG -3'

y el 433 descrito anteriormente.

La amplificación se realizó con el mismo programa que se utilizó en el primer ensayo.

Tercer ensayo: Amplificación de un producto de 1.8 Kb del gen VSP1267

Para la amplificación de este gen se utilizaron los oligonucleótidos 733 y 731.

733: 5'- TTA~~CT~~CTAGAATAAGCTGAGgGAAACTTCAATG -3'

y el reverso

731: 5'- ACGCCTCTAGACYRCANABGAACCACCARCA -3'

(B=T,C ó G; R=A ó G; Y=C ó T; N=A,T,C ó G)

Las muestras se desnaturalizaron a 95°C por 10 minutos y posteriormente 5 ciclos de amplificación (95°C por 30s, 55°C por 60s y a 72°C por 2 min.), seguidos de 30 ciclos (15 s a 94°C, 45s a 60°C y 4 min. a 72°C), con un paso final de elongación de 10 min. a 72°C.

Visualización y determinación del tamaño de los productos amplificados

Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0 %, con 0.5 µL de bromuro de etidio (Apéndice A), y amortiguador Tris-Boratos-EDTA (Apéndice A). Para determinar el tamaño de los productos amplificados, una alícuota de 7 µL del amplificado, con 2 µL del amortiguador de carga (Apéndice A) y un microlitro de TE; se mezclaron y se colocaron en el gel de agarosa, inmerso en Tris-Boratos-EDTA. A este gel se le aplicó una corriente de a 60 voltios, 30 miliamperes y 10 wats, por 90 minutos. Después del corrimiento se observó el resultado de la amplificación en un transiluminador UV. El marcador de peso molecular de DNA fue el fago λ Eco RI *Hind* III.

Resultados

Exámenes coproparasitológicos (CPS)

El resultado de los CPS realizados a los animales de granja de la zona del altiplano mexicano que comprende: Almoloya, Apan, Chimalpa, Col. los Voladores, Emiliano Zapata, Tepetlayuca y Ocoatepec Hidalgo, mostró una frecuencia de giardiosis del 6.67 % (Tabla II).

Tabla II. Proporción y frecuencia de huéspedes infectados con *Giardia duodenalis*.

Origen de las muestras	Negativos	Positivos	Proporción	Frecuencia
Borregos	58	6	6/64	9.37%
Chivos	8	1	1/9	11.11%
Caballos	13	0	0/13	0.00%
Vacas	8	0	0/8	0.00%
Burros	11	0	0/11	0.00%
Total =	98	7	7/105	6.67%

En los CPS también se encontraron otros protozoarios y nemátodos (Tabla III). El 38.09% de los animales estuvo parasitado; de éstos el 75.23% presentó un solo parásito y el 14.3% restante dos o más parásitos (incluyendo comensales).

Tabla III. Proporción y frecuencia de otros parásitos y comensales.

Parásito	Huésped									
	Borrego		Chivo		Caballo		Burro		Vaca	
	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F
Strongiloideos(huevos)	8/64	12.5%	4/9	44.44%	5/13	38.46%	4/11	36.36%	0/8	-
Coccidias(ooquistes)	7/64	10.94%	2/9	22.22%	0/13	-	0/11	-	0/8	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	1/64	1.56%	0/9	-	0/13	-	0/11	-	0/8	-
<i>Entamoeba coli</i>	13/64	20.31%	2/9	22.22%	0/13	-	0/11	-	2/8	25.00%
<i>Giardia duodenalis</i>	6/64	9.37%	1/9	11.11%	0/13	-	0/11	-	0/8	-
<i>Chilomastix mesnili</i>	1/64	1.56%	0/9	0.00%	0/13	-	0/11	-	0/8	-
Total=	36/64	56.25%	9/9	100.0%	5/13	38.46%	4/11	36.36	2/8	25.00%

P = Proporción, F = Frecuencia

Desenquistamiento y establecimiento de los cultivos axénicos de *G. duodenalis*.

Para el proceso de desenquistamiento se seleccionaron las muestras que tenían más de 100 000 quistes viables, es por ello que dos lotes de quistes obtenidos de un borrego no aparecen en los resultados.

La denominación de los aislados, el huésped de origen, así como la región geográfica de procedencia del huésped y el método del desenquistamiento se muestran en la tabla IV.

En la denominación de los aislados se consideraron los siguientes puntos:

- Huésped de procedencia. A los que se obtuvieron de borregos se les asignó la letra **B** y a los de chivo **Ch**
- Método de obtención de trofozoítos. Si fue *in vivo* se coloca una **G**, de *Gerbil* (gerbos) y el número del gerbo. Si fue *in vitro* solamente se coloca el lote de desenquistamiento.
- Fecha del desenquistamiento.
- Si los quistes se obtuvieron *in vitro* entonces se coloca una **Q** después de la indicación del método de desenquistamiento, previo.

Ejemplo: **B2Q1G3** Trofozoítos del Borrego número 2 positivo a *Giardia duodenalis* desenquistados *in vitro*, posteriormente enquistados *in vitro*, lote 1 y desenquistados *in vivo* con el gerbo 3.

Tabla IV. Aislados de *G. duodenalis* obtenidos.

Aislado	Huésped	Origen geográfico	Método de desenquistamiento	Cultivo axénico
B1	Borrego	Emiliano Zapata	<i>in vitro</i>	No
B1G1	Borrego	Emiliano Zapata	<i>in vivo</i>	Sí
B2	Borrego	Tepetlayuca	<i>in vitro</i>	Sí
B2G3	Borrego	-	<i>in vivo</i>	Sí
B2Q1G3	Borrego	-	<i>in vivo</i>	Sí
B3	Borrego	Tepetlayuca	<i>in vitro</i>	Sí
B3G1	Borrego	-	<i>in vivo</i>	Sí
B4	Borrego	Tepetlayuca	<i>in vitro</i>	Sí
B4G1	Borrego	-	<i>in vivo</i>	Sí
Ch01	Chivo	Atla	<i>in vitro</i>	Sí
Ch01G1	Chivo	-	<i>in vivo</i>	No
J10	Humano	-	<i>in vitro</i>	Sí
HSP	Humano	-	<i>in vitro</i>	Sí
P-1	Humano	Cepa de referencia	desconocido	Sí

El aislado B1G1 no se utilizó en los ensayos debido a que solo se contaba con el aislado desenquistado *in vivo*, y el aislado Ch01, al ser el único de chivo, si se analizó.

Determinación de la cinética de crecimiento

Se determinó la dinámica de crecimiento de los aislados B2, B3, B4, B2G3, B3G1, B4G1, B2Q1G3, Ch01, HSP, J10. La figura 12 muestra la curva de crecimiento de la cepa de referencia Portland-1 (P1). Este tipo de cinética es característica de los microorganismos con reproducción asexual. Presenta una fase de adaptación (Lag), una fase de duplicación exponencial (Log), una fase estacionaria donde la duplicación se detiene y el número de células muertas y vivas es constante; y finalmente la fase de muerte.

Para el aislado P1 la fase Logarítmica (Log) tiene una duración de 24.75 horas aproximadamente, el número máximo de células fue de 2 786 000 células/mL y se alcanzó a las 58 hr. El tiempo de generación fue de 9.22 horas. (Tabla V)

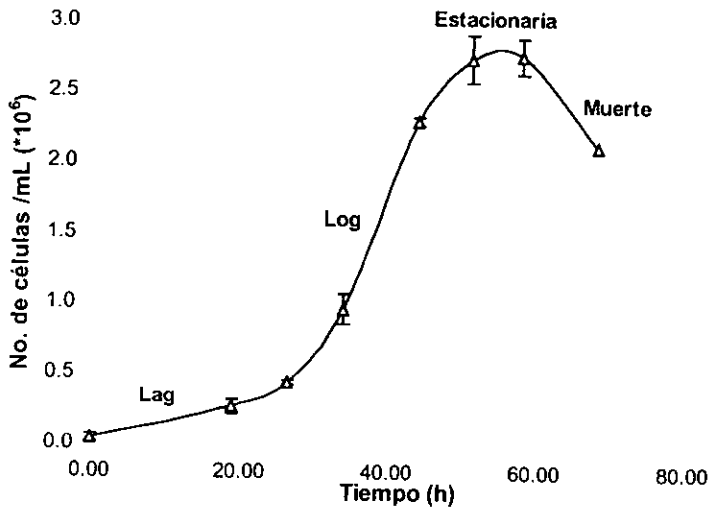


Figura 12. Curva de crecimiento de la cepa de referencia P1. Cada punto representa la media aritmética de cuatro determinaciones de células totales en tubos distintos.

En la figura 13 se muestra la cinética de crecimiento de tres aislados con diferentes tiempos de generación, todos provienen de la misma especie de huésped. Se observan claras diferencias entre cada uno de los aislados, sobre todo en la fase logarítmica.

El aislado B3 tiene un periodo de adaptación mayor que los otros dos aislados; sin embargo, a ese periodo le sigue una fase log muy corta, donde la población se incrementa muy rápido, por lo que su tiempo de generación es muy pequeño. En cambio el aislado B4 se comporta de manera contraria, tiene una fase lag corta y una fase log muy larga; aunado a esto, la población de B4 no alcanza niveles como los de B3. (Tabla V)

Cuando comparamos los aislados obtenidos de diferente huésped, observamos diferencias entre ellos (Fig. 14). El tiempo de generación es muy similar en los aislados J10 (humano) y B4 (borrego), mientras que el aislado CH01 (chivo) tiene un tiempo de 8.97 h. Por otro lado, el periodo de adaptación para CH01 es un poco más prolongado y aunque es más rápido solo se alcanza una densidad de población del $1.51 \cdot 10^6$ células/mL, a diferencia de la obtenida con el aislado J10 que fue de $2.47 \cdot 10^6$.

La fase log mucho más larga en el aislado J10 que en los otros dos aislados, le permite alcanzar una densidad de población mucho mayor.

El aislado de humano (J10) parece tener una mayor capacidad de adaptación al medio de cultivo, ya que a pesar de tener la misma cantidad de nutrientes y haber permanecido en las mismas condiciones que B4, éste último no fue capaz de seguirse duplicando después de las 70 horas y J10 lo hizo hasta las 90 h. (Tabla V)

Debido a que se obtuvieron tiempos de generación entre 6.42 y 15.50 h, a los aislados los clasificamos en tres grupos. Tabla V.

- i) Aislados de crecimiento rápido, con un tiempo de generación mayor a 6.00 h y ≤ 9.00 h.
- ii) Aislados de crecimiento medio, con tiempos de generación > 9.00 h y ≤ 12.00 h
- iii) Aislados de crecimiento lento, cuyo tiempo de generación está entre 12.00 y 15.00 h.

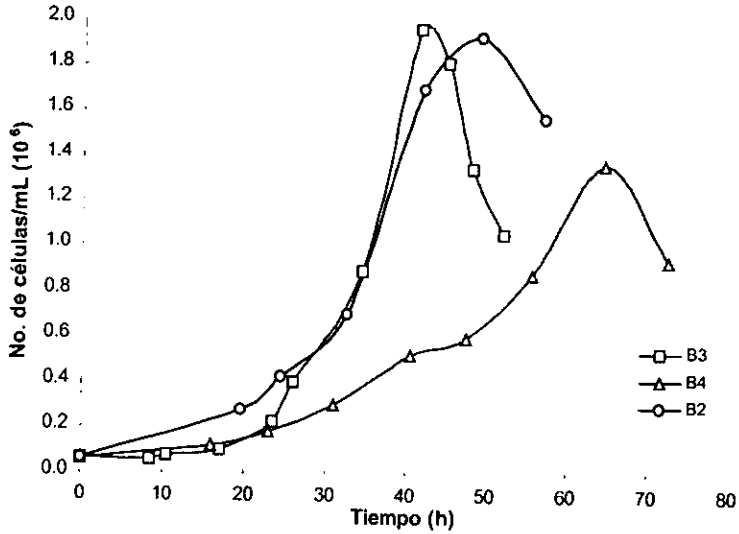


Figura 13. Curvas de crecimiento de tres aislados de borrego (B2, B3 y B4). B2 presenta un tiempo de generación de 10.06 hrs, B3 de 6.42 y B4 de 14.02 hrs. El coeficiente de variación promedio de todos los ensayos fue de 5.2%.

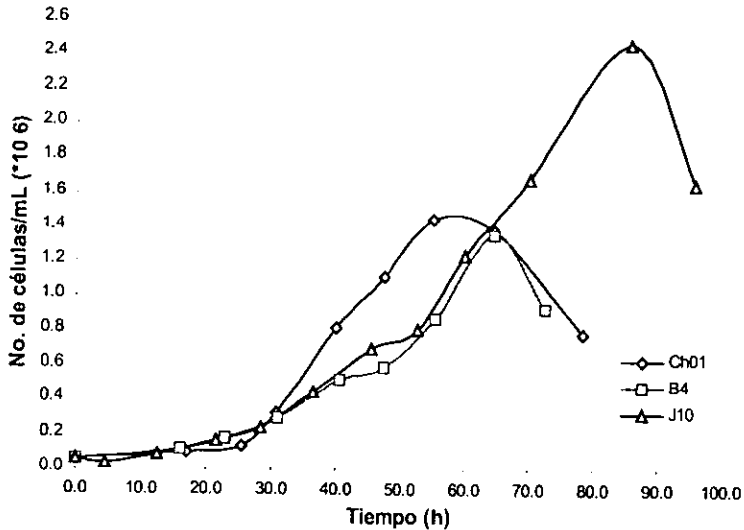


Figura 14. Curvas de crecimiento de tres aislados obtenidos de huéspedes distintos: J10 (humano), Ch01 (cabra) y B4 (borrego).

Tabla V. Resultados obtenidos de las curvas de crecimiento.

Aislado	T. generación $t_{1/2}$ (horas)	Población Máxima Tiempo (h)	Población Máxima # cél./mL ($\times 10^6$)	Fase Log duración (h)	Tipo de crecimiento
B3	6.42	41.50	1.96	24.50	Crecimiento rápido
B3G1	8.81	55.00	2.04	39.00	
Ch01	8.97	55.00	1.51	29.50	
P-1	9.22	58.00	2.78	32.25	Crecimiento medio
B4G1	9.35	55.00	1.84	31.50	
B2	10.06	49.00	1.90	29.50	
B2G3	11.34	64.50	1.47	48.50	
J10	13.62	85.50	2.47	ND	
B4	14.02	64.50	1.36	48.50	Crecimiento lento
HSP	14.26	66.00	1.09	55.75	
B2Q1G3	14.87	74.75	1.61	55.75	

ND = No determinada

Identificación y análisis de productos amplificados por PCR

Ensayo de la coamplificación de tres alelos de la vsp 417: vsp417-1, vsp417-2, vsp417-3.

Para la caracterización genética de los aislados de *G duodenalis* se utilizó la amplificación de ADN mediante la PCR. Inicialmente se examinaron los aislados utilizando los oligonucleótidos 432 y 433, con los que se amplifican segmentos homólogos de tres genes de proteínas de la familia de las VSP de *Giardia* (Fig. 11).

En todos los aislados se obtuvo un producto de ≈ 0.52 Kb (Fig. 15); lo que los clasifica como aislados del Ensamble A, pudiendo ser del grupo genético I, II o livestock. Los aislados del Ensamble B presentarían un producto de ≈ 330 pb. El DNA de *T. muris*, no amplificó.

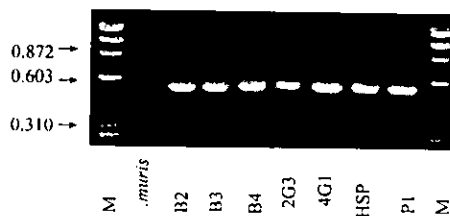


Fig. 15. Análisis electroforético de los productos obtenidos mediante la amplificación del ADN de *G. duodenalis* con los oligonucleótidos 432 y 433. En todos los carriles se observa un producto de ≈ 0.52 Kb. (M) es el marcador de ADN. ϕ E174 H α c III

Para diferenciar al grupo genético I del II (ensamble A), los productos de ≈ 0.52 Kb obtenidos en la amplificación se incubaron con *Pst* I. El RFLP mostró dos patrones de bandeo diferentes, CH01 y B4G1 presentaron dos bandas: una de 0.33 y otra de 0.19kb, productos de la restricción del alelo 1 y la banda de ≈ 0.52 Kb que corresponde al alelo 2 que no presenta sitio de corte con esta enzima. Este patrón es característico del grupo A-I. (figura 9). Los aislados B2, B3, B4, B2G3, B3G1, B2Q1G3 y HSP generaron cuatro bandas: de 0.33 y 0.19kb correspondientes al alelo 1; la banda de 0.52kb del alelo 2 y dos bandas más que son distintivas del grupo A-II, una de 0.37 y otra de 0.15kb, que pertenecen al alelo 3. (Fig. 16).

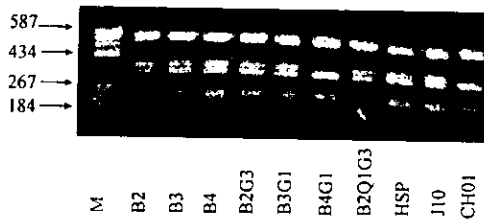


Fig. 16. Producto de la amplificación de los tres alelos *Vsp417* restringido con *Pst* I. CH01 y B4G1 presentan un RFLP característico de del Grupo A- I y el resto de los aislados al del Grupo genético A-II.

Cuando se compararon los diferentes lotes de tubos del mismo aislado, con diferencia de una semana en su tiempo de resiembra, se encontró solamente que B4G1 sufrió un cambio en su patrón de bandeo (RFLP), de Grupo genético I a Grupo II, en tan solo dos semanas (Fig. 17). El alelo 3 que no esta presente en el lote 1 de B4G1, después de una semana más en el medio de cultivo es expresado, apareciendo así las dos bandas nuevas: de 0.37 y 0.15kb.

Tabla VI. Tipificación genética de aislados de *Giardia duodenalis* por RFLP-PCR en loci de genes de VSP's

Aislado	VSP417-1,2,3		VSP417-2 (TSP11)		VSP1267		Grupo genético deducido
	Producto	Pst I	Producto	Pst I	HindIII	Producto	
B2	0.52	(2) ^a	1.8	+	--	---	semejante a I/II ^e
B3	0.52	(2) ^a	1.8	+	--	1.8 ^c	A-I/II ^e
B4	0.52	(2) ^a	1.8	+	--	1.8 ^c	A-I/II
B2G3	0.52	(2) ^a	1.8	+	--	1.8 ^c	A-I/II
B3G1	0.52	(2) ^a	1.8	+	--	1.8 ^c	A-I/II
B4G1/1	0.52	(1) ^a	1.8	+	+	1.8 ^b	<u>A-I</u>
B4G1/2	0.52	(2) ^a	1.8	+	--	1.8 ^c	A-I/II
B2Q1G3	0.52	(2) ^a	1.8	+	--	1.8 ^c	A-I/II
CHO1	0.52	(1) ^a	1.8	+	+	1.8 ^b	A-I
HSP	0.52	(2) ^a	1.8	+	--	1.6	A-II
P-1	0.52	(1) ^a	1.8	+	+	1.8	A-I
<i>T. muris</i>	--	NA	---	NA	NA	---	NA

a= Patrones de bandeos típicos de Grupo I (1) y de Grupo II (2). El tamaño del producto está dado en Kb.

b= La banda se presenta intensamente teñida. c= Banda muy tenue.

d= Es el I/II like descrito por Ey PL (Parasit Res 1996). e= A-I/II Semejante a Grupo I y Grupo II, no descrito

Tabla VII. Comparación de los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento y el grupo genético.

Aislado	T. generación $t_{1/2}$ (horas)	Población Máxima # cél./mL (*10 ⁶)	Fase Log duración (h)	Tipo de crecimiento	Grupo genético
B3	6.42	1.96	24.50	Crecimiento	semejante a I/II ^c
B3G1	8.81	2.04	39.00	rápido	semejante a I/II ^c
Ch01	8.97	1.51	29.50		A-I
P-1	9.22	2.78	32.25		A-I
B4G1	9.35	1.84	31.50	Crecimiento	semejante a I/II ^c
B2	10.06	1.90	29.50	medio	A-I/II like ^a
B2G3	11.34	1.47	48.50		semejante a I/II ^c
J10	13.62	2.47	-		A-II ^b
B4	14.02	1.36	48.50	Crecimiento	semejante a I/II ^c
HSP	14.26	1.09	55.75	lento	A-II
B2Q1G3	14.87	1.61	55.75		semejante a I/II ^c

a= determinado por Ey PL. Parasitol Res. 1996. b= Se determino previamente; c= Grupo genético nuevo

Discusión

El resultado de los CPS realizados a los animales; demostró la gran cantidad de animales que pueden encontrarse parasitados (38.09%). Las principales parasitosis que se encontraron fueron las helmintiasis, provocadas por nemátodos. A *Giardia duodenalis* sólo la encontramos en un 6.67% en borregos y chivos; cabe señalar que esta baja frecuencia se puede deber a que solamente se realizó un examen CPS por animal.

Al recolectar los quistes de *Giardia duodenalis* de diferentes huéspedes, se esperaría que los trofozoitos, al cultivarse en un medio sintético, se comportaran de manera distinta, y que estas diferencias se pudiesen detectar a nivel genético.

En este trabajo se estudiaron ocho nuevos aislados, obtenidos de animales de granja (artiodáctilos: de pezuña hendida); siete de borrego y uno de chivo; además de dos aislados obtenidos de humanos y un aislado de referencia, la Portland (P-1). Los aislados se desenquistaron in vivo e in vitro, y no se puede decir que uno de ellos sea mejor que el otro.⁸²

Los aislados estudiados mostraron diferencias en su velocidad de crecimiento, con un rango muy amplio entre sus tiempos de generación: oscilando entre 6.42 y 14.87 horas.

Para asegurar que la variación de los tiempos de generación no estuviera influenciado por el medio, se comparó el tiempo observado para el aislado P-1; quien presentó un tiempo de generación de 9.22 h y el obtenido por otros autores fue de 9.1 horas,⁸³ y se encontró que no hubo diferencias significativas.

Después de agrupar a los aislados, basándonos en su velocidad de crecimiento, observamos que existe una distribución normal de la población con un sesgo hacia los aislados de crecimiento lento (Tabla V). Pero, al comparar los aislados mexicanos B3, B3G1 y Ch01 de crecimiento rápido (6.42-8.97), con los analizados en Europa, de crecimiento rápido (9.4-10.8),⁸⁴ encontramos que nuestros aislados presentaron un tiempo de generación menor, lo que podría ser importante a nivel epidemiológico; ya que la velocidad de crecimiento in vitro puede estar relacionada con la capacidad del aislado para adaptarse a diferentes microambientes (probablemente relacionado con el potencial

de infectividad).⁸⁵ Así, los aislados mexicanos de *G. duodenalis* con estas características, cuando están en contacto con un huésped como el humano, quizá tengan una mayor probabilidad de mantener una infección, lo cual se vería reflejada de manera directa, en el desarrollo de la enfermedad.

Los aislados europeos de crecimiento lento tienen un tiempo de generación mayor de 18 horas, en tanto que los mexicanos fueron de 13 a 14.87 horas.

Es importante tomar en cuenta que la mayoría de los aislados europeos son de origen humano y que éstos se encontraron ubicados en los tres tiempos de generación, en tanto que los dos aislados mexicanos, obtenidos de humanos, presentaron velocidades de crecimiento lento.

Las diferencias entre aislados, provenientes de distinto huésped, se deben a la variabilidad biológica intrínseca de cada aislado, constituido por una población, y a la potencialidad genética de su interacción Parásito-Huésped. Este fenómeno se explica fácilmente porque a partir de los quistes que el huésped ingiere, desenquistan trofozoitos que entran en contacto con el microambiente intestinal, con el sistema inmune y con los microorganismos previamente establecidos en el huésped, ejercen una presión de selección y solamente aquellas células que poseen la potencialidad genética suficiente, fueron capaces de adaptarse, porque poseían las características bioquímico-metabólicas adecuadas para su desarrollo, o bien, porque tienen una historia en la que tuvieron contacto con una serie de huéspedes diferentes,⁴⁵ son las que tienen mayor adaptabilidad y por esta característica las logramos ver en los cultivos in vitro.

Ya que cada relación Huésped-Parásito es distinta para cada uno de los aislados, entonces se espera que las células resultantes lo fueran, esto se corroboró, ya que los resultados de los tiempos de generación así lo sugieren. Sin embargo, cuando se trata de un mismo aislado, al que se sometió a dos procesos distintos de desenquistamiento, la variable Huésped-Parásito desaparece, y las diferencias se deben solamente a los factores externos que intervinieron en los procesos de desenquistamiento.

Comparando las células obtenidas por diferente tipo de desenquistamiento, observamos que en dos de los tres ensayos, las células obtenidas a partir del desenquistamiento in vivo tienen un tiempo de generación mayor (6.42 y 10.06 hrs) al de sus homólogas obtenidas a partir del desenquistamiento in vitro (8.81 y 11.34 hrs respectivamente), lo que quizá se debe, a que los trofozoítos están sujetos a diferentes presiones de selección. En el gerbo debe adaptarse a las presiones bioquímicas, inmunológicas y resistir las mecánicas, lo que condiciona un proceso de adaptación que se refleja en el tiempo que necesitan los trofozoítos para doblar el tamaño de su población. Este fenómeno puede observarse claramente con el aislado B2, en el que se encontró un tiempo de generación de 10 horas y que aumento hasta 11.3 horas en el aislado B2G3. Sin embargo, algunos autores sugieren que el desenquistamiento in vivo representa un problema menor para adaptarse,⁸² pero los resultados obtenidos en este trabajo, contradicen esta propuesta. (tabla V)

En el desenquistamiento in vivo,⁸⁶ los estímulos que reciben los quistes son diversos ya que provienen de un sistema biológico complejo y completo (el gerbo), al eclosionar el protozooario se encuentra en un microambiente ideal para su desarrollo; al que debe adaptarse para sobrevivir a las presiones de selección que ejerce el huésped, donde pasa de 10 a 12 días; después de los cuales la célula se extrae del huésped, y se transfiere a un medio sintético y constante, que representa otro conjunto de presiones de selección en donde no hay recambio de nutrimentos, se establece competencia alimentaria y no posee un sistema que permita la eliminación de los desechos metabólicos, que acidifican y vuelven tóxico el ambiente. Este cambio afecta de manera definitiva el desarrollo de las células, ya que tienen que pasar por un nuevo periodo de adaptación que quizá requiera de algunas generaciones para prender o apagar otros procesos metabólicos que le permitan su desarrollo dentro del nuevo microambiente.⁸⁷

Durante el proceso de desenquistamiento, la célula dentro del quiste, se encuentra en estado latente y su respuesta dependerá del estímulo que reciba del ambiente externo,³² en este estadio se podría considerar una célula totipotencial, con las limitaciones propias de la especie, pero capaz de responder a los estímulos ambientales activando los procesos metabólicos necesarios para sobrevivir. Por ello al tener un mayor número de cambios en el microambiente que rodea a las células de Giardia, obtuvimos un tiempo de

adaptación y un tiempo de generación más prolongado, como lo sugieren los resultados del aislado B3 con un tiempo de generación de 6.42 horas; contra el tiempo observado para el aislado B2G3 con 8.81 horas.

Sin embargo, este fenómeno no puede generalizarse ya que para el aislado B4, esto no se cumplió, porque las células obtenidas en el desenquistamiento in vivo, tuvieron un tiempo de generación mucho menor (9.35 h) que sus homólogos desenquistados in vitro (14.02 h). Las células que vinieron del gerbo mostraron un proceso de adaptación muy rápida al medio (TYI-S-33). Este fenómeno podría explicarse de la siguiente manera:

- 1.- El desenquistamiento in vitro no generó todos los estímulos necesarios para prender los procesos metabólicos necesarios para un desarrollo máximo, solamente encendió los procesos necesarios para un desarrollo mínimo ó;
- 2.- Que contara con una carga génica con mucha plasticidad (precondicionada) para prender o apagar rápidamente un grupo de genes.
3. Que haya una mayor capacidad, para este aislado, cuando se encuentra en su fase de trofozoito que en su fase de quiste; lo que contradice el postulado que los trofozoitos en estado de quiste son células totipotenciales.

Por otro lado, además de las diferencias detectadas en la velocidad de crecimiento de los aislados del borrego número cuatro, también se encontraron diferencias importantes cuando se estudiaron los genes, en la determinación del grupo genético, como se discutirá más adelante.

Los aislados de *G. duodenalis* estudiados, presentan genotipos diferentes a los ya caracterizados, pero muestran una relación muy estrecha con los grupos I y II del Ensamble A, ya que todos los aislados estudiados presentaron un producto de 0.52 Kb con los oligos, 432-433, característico del Ensamble A.

Aunque el medio de cultivo, TYI-S-33, es el medio común para el crecimiento de *G. duodenalis*, se sugiere que produce la selección de genotipos en aislados de *Giardia*,⁸⁸ y

se cree que el ensamble A se presenta con alta frecuencia como resultado de esta selección que el medio de cultivo y los métodos de desenquistamiento ejercen sobre las células.⁷²

Los aislados que integran el ensamble B presentan una velocidad de crecimiento muy baja con velocidades para duplicar el tamaño de su población mayores de 18 horas,⁸³ y en ocasiones las células solamente se establecen temporalmente y derivan a la extinción después de algunas generaciones en este medio.⁸⁰ Tal es el caso de los aislados de *G. duodenalis* obtenidos de perros.⁸⁹ Las causas a las que se adjudican este fenómeno, son la falta de factores en el medio que favorezcan el crecimiento de las células, lo que pone de manifiesto las diferencias bioquímico-metabólicas, las que permitieron segregar ambos grupos.

Los aislados que analizamos en este trabajo, después de la determinación de su grupo genético, se agruparon en cuatro bloques:

El primer grupo de aislados de *G. duodenalis*, está constituido por: B4G1/1 y Ch01, que presentan un patrón de bandas muy similar al de los aislados P-1 y WB, y que se pueden clasificar dentro del grupo A-I (Ensamble A, grupo genético I). Porque presentaron los genes *tsa417*, *tsp11* (VSP417 alelos 1 y 2) y un segmento del gen VSP1267 de 1.8 Kb

El segundo grupo, compuesto únicamente por el aislado HSP, el cual presentó, después de la restricción del producto de 0.52 kb con Pst I, un patrón de bandeo idéntico al de los aislados A-II, que representa a los genes *tsa417*, *tsp11* y un gen parecido al *tsa417* (VSP417 alelos 1, 2 y 3), además de amplificar un segmento del gen VSP1267 de 1.6 Kb diagnósticos del ensamble A, grupo genético II

Los aislados B3, B4, B2G3, B3G1, B2Q1G3 y B4G1/2 (borrego), integran el tercer grupo. Estos presentaron un producto del gen VSP1267 de 1.8 Kb después de la amplificación con los oligonucleótidos 733-731, diagnóstico del grupo genético I. Sin embargo, el patrón de bandas que presentó después de cortar el producto de 0.52kb con la enzima Pst I, corresponde al grupo II. Por lo que no pueden ser clasificados dentro de los grupos genéticos I o II establecidos hasta ahora.⁵⁰ Sin embargo las características mostradas,

a nivel genético, los agrupa dentro del Ensemble A, junto con los otros cuatro grupos descritos hasta el momento.

El último grupo está formado por el aislado B2. Este presentó en los ensayos para VSP417-1, 2 y 3, un patrón idéntico al grupo II; el producto de 1.8 Kb del gen VSP417-2 (tsp 11), estuvo presente, pero no fue susceptible a la digestión por la enzima HindIII, lo que confirmaba hasta entonces su semejanza con el grupo II. La diferencia que presentó este grupo es que al intentar amplificar el segmento del gen VSP1267, con los oligonucleótidos 733-731, no se obtuvo producto alguno lo que los hace semejantes a aislados descritos por Ey PL, en Suiza. ⁹¹

De éstas determinaciones surgieron varios puntos interesantes:

Dos de los tres aislados de borrego, desenquistados tanto *in vivo* como *in vitro*, presentaron cambios en su genotipo. El aislado B3 se mantuvo idéntico, no mostró variación genotípica con los marcadores utilizados, aún cuando tuvo un tratamiento similar a los otros dos, en el proceso de desenquistamiento.

El aislado B4 (procedente del borrego 4) representa un caso muy especial porque mostró diferencias importantes a nivel genético. Con el nivel de detección que se cuenta, se observó un cambio de genotipo en dos ocasiones:

1.- El aislado B4 desenquistado *in vitro*, presentó los alelos VSP417-1, VSP417-2 y VSP417-3 y una banda débil de 1.8 Kb del gen VSP417, dando un genotipo semejante a los grupos I y II. Sin embargo, un primer lote del aislado desenquistado *in vivo* (B4G1/1), presentó un genotipo que involucra a los alelos VSP417-1, VSP417-2 y una banda intensa de 1.8 Kb del gen VSP1267, todos diagnósticos del ensemble A, grupo genético I. El producto del alelo VSP417-3 no está presente en el aislado B4G1/1. Una vez que los aislados están establecidos en el medio de cultivo, se expanden para obtener proteínas y ADN. El aislado B4G1/1 entró al protocolo de expansión y cosecha. Por lo que una semana después se cosechó y se obtuvo otro lote de ADN (B4G1/2), de este se amplificaron los genes VSP417 y VSP1267.

Al hacer la comparación entre los patrones de bandeado obtenidos de los dos lotes, se encontró que de los genes VSP417 se habían amplificado los tres alelos y no dos

como en B4G1/1. A nivel del gen VSP1267 se encontró, nuevamente una débil banda de 1.8 Kb similar a la observada en el aislado B4.

Al final los dos aislados (B4 y B4G1), presentan el mismo genotipo en el medio de cultivo, Los datos sugieren que las presiones de selección sobre los trofozoítos posibilitan que se prenda o apague un gen. Debido a que los genes estudiados son de proteínas variables de superficie (VSP), la hipótesis más plausible es la que supone que, los recambios antigénicos se pueden inducir y quizás sean constantes; es decir, que ante un mismo estímulo, el aislado produzca un cambio previsible al recambiar sus VSP's. A la fecha todavía no hay un modelo experimental que permita hacerlo; pero los datos sugieren que es posible.

Otro punto interesante con este mismo aislado (B4G1), es la diferencia que presentó en la intensidad con la que se tiñeron las bandas de los productos amplificados (de 1.8 Kb) del gen VSP1267. El DNA del aislado B4G1/1, presentó una gran concentración de producto amplificado y por ello una banda de gran intensidad. Por otro lado, el DNA del aislado B4G1/2 se amplificó en muy baja concentración y produjo una débil banda. Estos resultados sugieren que están ocurriendo fenómenos de regulación genética. Muy probablemente el aislado B4G1/1 poseía una mayor cantidad de copias del gen VSP1267 en su ADN, que el lote dos (B4G1/2) que se aisló una semana después. Se sugiere que en el tiempo 1 el aislado produjo en mayor número proteínas vsp1267, mientras el alelo VSP417-3 no se expresaba. Pero en el tiempo 2 al estar en contacto con un ambiente nuevo, pero aún propicio para el crecimiento, se lleva a cabo un recambio de proteínas (VSP), necesitando la expresión de otro gen, en este caso el VSP417-3.

Esta sugerencia apoyaría la idea, que los trofozoítos mantienen dormidos los genes de las VSP, que se han expresado previamente para que sean expresarlos en el momento que sean requeridos.

El porque y el como de estos recambios aún se ignora; pero, se propone que estén involucrados algunos de los siguientes mecanismos:

a) La duplicación génica, como se sugiere sucedió para el aislado b4g1/1 con el gen vsp1267, el que aparentemente contenía muchas copias.

b) El reordenamiento de genes, mecanismo que suponemos involucrado en el aislado B4G1/2 que presentó el alelo vsp417-3, que no estaba presente una semana antes.

La utilidad de variación de las vsp está en discusión por ejemplo: para evadir la respuesta inmunológica o bien como mecanismo de adecuación en un proceso de adaptación al ambiente.

Ignoramos la magnitud de los reordenamientos, pero éstos, involucraron los codones previos y la secuencia de inicio ATG; ya que en el caso del gen vsp417-3 se permitió la alineación del oligonucleótido que contiene la secuencia de inicio.

Un fenómeno similar de diferencia en la concentración de los productos amplificados se observó también en la serie del aislado del borrego 2 (B2, B2G3 y B2Q1G3). El fenómeno puede explicarse si proponemos que el medio de cultivo TYI-S-33, así como el microambiente que constituye el intestino del huésped, influyen sobre la expresión de los genes de las VSP's,⁴⁵ ejerciendo una presión de selección para las células; como sucede en realidad con cada huésped diferente. Los trofozoítos del aislado, deben de adaptarse para sobrevivir; sin embargo, el mecanismo podría solamente implicar recambio antigénico mediado por fenómenos de duplicación y re-acomodo de secuencias y no de un proceso selección de poblaciones.⁹²

La adaptación es un proceso multifactorial que ocurre a todos los niveles en un ser vivo. A nivel de las proteínas de superficie, la célula sufre modificaciones a lo largo de su ciclo biológico, pero debido a que median interacciones directas con el huésped, su importancia es mayúscula, son la tarjeta de presentación del parásito ante el huésped, y son también, el medio por el que se buscará pasar inadvertido. Cuando una célula siempre presenta ante el huésped las mismas proteínas, entonces su tiempo de vida se verá muy disminuido, ya que el sistema inmune del huésped, en todos los casos, reconocerá estas proteínas y terminará por eliminar a las células parásitas. Pero si existe un recambio continuo ante las condiciones del microambiente, entonces la posibilidad de éxito es mucho mayor y la gran diversidad de genes para VSP's apoya fuertemente esta propuesta.⁹³

Aunque en el tubo de ensayo no se tienen los anticuerpos que neutralicen estas proteínas, trabajos previos han demostrado que la variación antigénica en *Giardia* puede ocurrir por mecanismos que no involucran a los anticuerpos.⁴⁵ La selección puede ser positiva o negativa, pero, lo importante es que los trofozoítos de *Giardia* se enfrenten a un mayor número de presiones de selección ejercidas por muchos huéspedes de diversas especies, de tal forma que estas presiones selectivas que enfrenta el parásito, diversificarán la expresión de su repertorio de vsp's y lo "precondicionaran", de tal forma que los quistes excretados quizá tengan una diversidad tal de VSP's, que la probabilidad de éxito en una nueva infección será mayor.

A pesar de las variaciones en las proteínas de superficie, los genes del complejo vsp417 son constantes y permiten discriminar aislados del ensamble A, los que generan con los oligos 432/433 un segmento de 0.52 Kb.

El segmento de 1.6 o 1.8 Kb de la vsp1267 también es diagnóstico del grupo genético I o grupo genético II dentro del ensamble A. La identificación de los vsp417-1, vsp417-2 y vsp417-3 en el segmento de 0.52 Kb y la amplificación de un segmento del gen vsp1267 de 1.8 Kb, o la carencia de amplificación es diagnóstico de un genotipo de animales y muy probablemente de artiodáctilos; sin embargo, existe la necesidad de buscar otros marcadores que faciliten la clasificación de los aislados de *G. duodenalis* procedentes de animales de, los que hasta este momento se han agrupado de manera imperfecta.

No obstante el panorama fragmentario la presencia de dos aislados que pertenecen al grupo A-I y la gran relación que presentan seis de los aislados de animales con los grupos A-I y A-II, evidencian que son un riesgo para la población que los maneja porque se ha demostrado el potencial zoonótico que presenta el grupo A-1.⁹⁴

En nuestro país la giardiasis tiene un prevalencia muy alta y uno de los objetivos de salud pública debe de estar enfocado en la prevención, tratamiento y erradicación de las parasitosis. La OPS recomienda que las heces de los pacientes infectados deben tratarse para evitar la propagación de los quistes infectantes y los casos que se presenten deberán reportarse. Pero la mayoría de las recomendaciones no se aceptan, y la giardiasis sigue sin tomarse con la seriedad que requiere, sobre todo porque afecta a

una población tan vulnerable como la infantil⁹⁵ expoliando la ya de por sí mermada alimentación de grandes sectores de la población mexicana.

Ante este panorama es necesario un estudio epidemiológico a mayor escala para conocer la verdadera distribución de *Giardia duodenalis* tanto en la población humana, como en la de animales que conviven fuertemente con el hombre, para evaluar el riesgo que representa *Giardia duodenalis* en la salud pública de los mexicanos.

Conclusiones:

- ✓ En este trabajo se demuestra la presencia del grupo genético A-I en la población animal, del cual se ha demostrado su potencial zoonótico, por lo que la relación Humano- Animal eleva el riesgo de infectarse con *Giardia duodenalis*.
- ✓ Los fenómenos de modificación genotípica presentados por estos aislados, dejan un índice de incertidumbre ante la proposición de que únicamente los aislados del grupo A-I, presentan potencial zoonótico.
- ✓ La falta de marcadores que permitan la clasificación de los aislados estudiados en este trabajo, hace visible la necesidad de buscar nuevas metodologías para la identificación de nuevos genes, que permitan una mejor caracterización de los aislados de *G. duodenalis* presentes en el país.

Anexo A

Soluciones de trabajo

Bromuro de etidio (10mg/mL)

Se pesan 0.2 g de Bromuro de etidio y se disuelven en 20.0 mL desionizada, se mezcla bien y se conserva en un recipiente obscuro a 4°C.

Este producto es carcinogénico, utilizar guantes y cubrebocas al manejarlo.

Fenol

Reactivos	Cantidad
Fenol	500.0 mL (68°C)
H ₂ O	330.0 mL
Tris-HCl pH 8.0	5.6 ml
NaOH 10M	488.0 mL
8-hidroxiquinoleina	500.0 mg

El fenol se licúa a 68°C, se toman 500 mL y se les adiciona el agua, el Tris Hcl y el NaOH, se disuelven y posteriormente se adiciona la 8-hidroxiquinoleina, se homogeniza la solución y se almacena en un frasco obscuro a temperatura ambiente.

PBS (Solución amortiguadora de fosfastos)

Reactivos	Cantidad
NaCl	6.5g
K ₂ HPO ₄	2.8g
KH ₂ PO ₄	0.4g

Los reactivos se disuelven en 900 mL de agua desionizada, se afora a 1.0L y se esteriliza por calor humedo (autoclave).

Solución amortiguadora. Tris- Boratos-EDTA (20X)

Reactivos	Concentración	Cantidad
Tris-base	1.0 M	121.0g
Ac. Bórico	1.0 M	61.7g
EDTA Na ₂ •2H ₂ O	20mM	7.44g
H ₂ O		c.b.p. 1.0 L

Las sales se disuelven poco a poco en 700 mL de agua destilada, con agitación constante, ya disueltas las sales la solución se afora a 1.0 L.

La solución de trabajo es un dilución 1:20 de la que se preparó.

Soluciones de Sheatear

Solución madre

Reactivos	Cantidad
Sacarosa	500.0g
Fenol	5.0g
Agua	350.0mL
Tween 80	1.0%

El agua se coloca en un vaso de precipitados de 1.0 L. Con agitación energética y constante, se adiciona la sacarosa muy lentamente, hasta su completa disolución; después de adicionada la sacarosa el fenol es agregado a la solución (aunque la sacarosa aún no se haya disuelto por completo). Finalmente el Tween 80 es adicionado a la solución de fenol-sacarosa, mientras se agita suavemente, para evitar que se formen burbujas. Ya disuelto esta solución debe conservarse en un recipiente cerrado y en refrigeración.

Solución pesada (densidad=1.18g/mL) y solución ligera(1.063g/mL)

De la solución madre se toman 200 mL, a los que se les adiciona solución amortiguadora de fosfatos, con pH 7.2, para diluirla hasta alcanzar la densidad deseada.

La solución ligera se prepara de la misma forma que la pesada.

Solución de lisis

Reactivos	Concentración
Tris pH 7.4	10.0mM
EDTA	10.0mM
NaCl	50.0mM
SDS	0.4%
H ₂ O estéril	La necesaria

Para preparar la solución de lisis de trabajo se toman 25 mL de Tris 2.0M, 100 mL de EDTA 0.5M, 150 mL de NaCl 5.0M y 200 mL de SDS10.0%, los cuales se diluyen con 4525 mL de H₂O estéril. Esta solución debe utilizarse el mismo día de su preparación.

Cuando se adiciona a las células a digerir se complementa con 10mL de proteinasa K (10mg/mL), para tener una concentración de 200.0mg/mL.

Soluciones salina balanceada de Hank (SSBH)

Solución base (10X)

Reactivos	Cantidades
CaCl ₂ anhidra	700.0 mg
KCl	2.0g
KH ₂ PO ₄	300.0 mg
MgSO ₄	485.0 mg
NaCl	40.0 g
NaHCO ₃	350.0 mg
NaHPO ₄	240.0 mg

El total de los componentes se disuelven en 800 mL de agua estéril, excepto el NaHCO₃, ya disueltos los reactivos la solución se afora a 1.0 L y se esteriliza por filtración. El NaHCO₃ se adiciona al momento de utilizar la solución.

Solución ácida

De la solución base de HancK se toman 30 mL, se les adiciona NaHCO_3 hasta alcanzar un pH de 7.4 y posteriormente adicionar Hcl concentrado hasta obtener un pH de 2.0. Esta solución se calienta hasta 42°C para ser utilizada.

Solución básica

A 30 mL de solución base se le agrega NaHCO_3 hasta obtener un pH de 7.4. Esta solución se calienta a 39°C para poder ser utilizada.

Solución de Faust

Se pesan 300 g de ZnSO_4 , se disuelven en 600 mL de agua destilada; se mide la densidad y se ajusta con agua a 1.18g/mL.

Stop-mix

Reactivos	Cantidad	Concentración
Fycol	14.0g	35%
TAE 40X	250.0mL	1X
Azul de bromofenol saturado	1.0mL	1.0%
Xilene-cianol (10%)	1.0mL	1.0%
H_2O		c.b.p.40mL

El Fycol se adiciona poco a poco a 20 mL de agua, con agitación energética, hasta su completa disolución, posteriormente se el resto de los reactivos son incorporados.

Tris-EDTA

Reactivos	Concentración
Tris base pH 7.4	10 mM
EDTA	0.1mM
H_2O	c.b.p 100.0 mL

Debido a que las cantidades necesarias para preparar la solución son muy pequeñas, se debe preparar una solución de EDTA 0.5M y de Tris 2M; de las cuales se tomarán 2.0 mL del primero y 0.5 mL de Tris. Ambos se diluyen en 50 mL de agua destilada estéril y se afora la solución a 100 mL.

TYI-S-33

Reactivos	Cantidad
Glucosa	5.0 g
Ac. cítrico	100.0 mg
Citrato de Fe	15.0 mg
NaCl	1.0 g
K ₂ HPO ₄	500.0 mg
KH ₂ PO ₄	300.0 mg
Bilis bovina	500.0 mg
Cloruro de L-cisteína	1.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Triptona	10.0 g
Suero fetal bovino	50.0mL
Agua estéril	c.b.p. 0.5L

Todos los componentes se disuelven en 350 mL de agua desionizada estéril, excepto el suero fetal bovino; ya disueltos, a la solución se le adiciona Ampicilina (25 mg), Sulfato de gentamicina (30 mg) y Ceftazidina pentahidratada (30 mg). El pH se ajusta a 7.0 con hidróxido de sodio 1.0N y la solución se afora a 450.0 mL.

El medio de cultivo se esteriliza por filtración, primero se pasa por una membrana con un poro de 0.4 mm, en ambiente no estéril, para posteriormente pasarla por una membrana de 0.22 mm en un ambiente estéril. Una vez esterilizado se le adiciona el suero fetal bovino.

TYI-S-33 modificado (de enquistamiento)

Los componentes de este medio son los mismos que el TYI-S-33, con la diferencia de que en este medio se tiene una concentración de 7.5% de bilis bovina.

Apéndice B

Dislocación cervical

La dislocación cervical es un método de sacrificio físico; es seguro y se utiliza principalmente con los animales cuyos tejidos deben estar libres de fármacos. Esta metodología es recomendada en roedores,⁹⁶ menores de 200g, en pollos y en conejos de menos de 1.0Kg.

La técnica consiste en sujetar el animal por la cola o por la parte media del cuerpo con una mano y de la cabeza con la otra; después se procede a dislocar las vértebras cervicales por medio de la tracción del cuerpo y al mismo tiempo presionando sobre el cuello con un lápiz.^{97, 98}

Bibliografía

- ¹ Filice FP. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. Univ Cal Publ Zool. 1952; **57**: 53-146.
- ² Adam, RD. The biology of *Giardia* spp. Microbiol Rev. 1991; **55**: 706-732.
- ³ Nash TE, Herrington DA, Losonsky GA and Levine MM. Experimental human infections with *Giardia lamblia*. J. Infec. Dis. 1987; **156**: 974-984.
- ⁴ Scott KG-E, Logan MR, Klammer GM, Teoh DA and Buret AG. Jejunal Brush Border Microvillous Alterations in *Giardia muris*-Infected Mice: Role of T Lymphocytes and Interleukin-6. Inf. Inm. 2000; **68** (6): 3412-3418.
- ⁵ Buret A, Hardin JA, Olson ME and Gall DG. Pathophysiology of small intestinal malabsorption in gerbils infected with *Giardia lamblia*. Gastroenterology 1992; **103**: 506-513.
- ⁶ Mahalanabis D, Simpson TW, Chakraborty ML, Ganguli C, Bhattacharjee AK and KL Mukherjee. Malabsorption of water miscible vitamin A in children with giardiasis and ascariasis. Am. J. Clinical Nutrition; **32**: 313-318.
- ⁷ Tandon BN, Tandon RK, Satpathy BK, and Shrinivas. Mechanism of malabsorption in giardiasis: a study of bacterial flora and bile salt deconjugation in upper jejunum. Gut **18**: 176-181.
- ⁸ WHO (1996) *The World Health Report* 1996.
- ⁹ Mejía LA, Dávalos R, Romo A. Growth and vitamin status of free living Mexican children with giardiasis (abstract). FASEB J 1988;**2**(5):5213.
- ¹⁰ Isaac-Renton JL, Cordeiro C, Sarafis K and Shahriari H. Characterization of *Giardia* duodenalis isolates from a waterborne outbreak. J Infect Dis 1993; **167**(2):431-40.
- ¹¹ Meloni BP, Lymbery AI, Thompson RC. Isoenzyme electrophoresis of 30 isolates of *Giardia* from human and felines. Am J Trop Med Hyg 1988; **38**: 65-73.
- ¹² Homan WL, van Enkevort FHJ, Limper L, van Eys GJJM, Schoone GJ, Kasprzak W, Majewska AC, and van Knapen F. Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes. Parasitol Res 1992; **78**: 316-323.
- ¹³ Ey PL, Andrews RH and Mayrhofer G. Differentiation of genotypes of *Giardia intestinalis* by polimerase chain reaction analysis of a gene encoding a trophozoite surface antigen. Parasitology 1993; **106**: 347-356.
- ¹⁴ Thompson RCA, Hopkins RM and Homan WL. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. Parasitology Today 2000; **16**(5): 210-213.
- ¹⁵ Thompson R.C. Andrew. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential International Journal for Parasitology 2000; **30**: 1259-1267.
- ¹⁶ Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. Clin Microbiol Rev. 2001; **14**(3): 447-475.

-
- ¹⁷ Mejía LA, Dávalos R, Romo A. Growth and vitamin status of free living Mexican children with giardiasis (abstract). *FASEB J* 1988;**2**(5):5213.
- ¹⁸ Lanfredi-Rangel A, Kattenbach WM, Diniz JA, de Souza W. Trophozoites of *Giardia lamblia* may have a Golgi-like structure. *FEMS Microbiol Lett* 1999; **181**(2): 245-251.
- ¹⁹ Sogin ML, Gunderson JH, Elwood HJ, Alonso RA, Peatti DA. Phylogenetic meaning of the Kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science* 1989; **243**: 75-77.
- ²⁰ Lambl W. Mikroskopische Untersuchungen der Darmexcrete. *Vierteljahrsschr. Prakst. Heilkunde* (Prague) 1859; **61**: 1-58.
- ²¹ Kunstler J. Surcing protozoaires parasites nouveaux. *C.R. Soc. Biol. (Paris)* 1882; **95**: 347-349.
- ²² Kulda J and Nohynkova E. Flagellates of the human intestine and the intestines of other species. *Parasitic protozoa* 1978; **2**: 1-138.
- ²³ Erlandsen SL and Bemrick WJ. SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. *Journal of Parasitology* 1987; **73**: 623-629.
- ²⁴ Box ED. Observations on *Giardia* of budgerigars. *J Protozool* 1981; **28**: 491-494.
- ²⁵ Erlandsen SL, Bemrick WJ, Wells CL, Feely DE, Knudson Li, Campbell SR, van Keulen H, Jarroll E. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from great blue heron (*Ardea herodias*). *J Parasitol* 1990; **76**: 717-724.
- ²⁶ Georgi ME, Carlisle MS and Smiley LE. Giardiasis in a great blu heron(*Ardea herodias*) in New York state: Another potential source of waterborne giardiasis *Am J Epidemiol* 1986; **123**: 916-917.
- ²⁷ Feely, DE. Morphology of the cyst of *Giardia microti* by lighth and electron microscopy. *J Protozool.* 1988; **35**: 52-54.
- ²⁸ Van Keulen H, Feely DE, Macechko PT, Jarroll EL and Erlandsen SL. The sequence of *Giardia* small subunit rRNA shows that voles and muskrats are parasited by a unique species *Giardia microti*. *J Parasitol.* 1998; **84**: 294-300.
- ²⁹ DeRegnier, DP; Cole, L; Schupp, DG; Erlandsen, SL. Viability of *Giardia* cysts suspended in lake, river, and tap water. *Appl. Environ. Microbiol.* 1989; **55** (5): 1223-1229.
- ³⁰ Feely DE, Gardner MD and Hardin EL. Excystation of *Giardia muris* induced by a phosphate-bicarbonate medium: Localization of acid phosphatase. *J. Parasitol.* 1991; **77**: 441-448.
- ³¹ Bingham AK and Meyer EA. *Giardia* excystation can be induced *in vitro* in acidic solutions. *Nature* 1979; **277**: 301-302.
- ³² Gillin, FD; Boucher, SE; Rossi, SS; Reiner, DS. *Giardia lamblia* : The roles of bile, lactic acid, and pH in the completion of the life cycle in vitro. *Exp. Parasitol.* 1989; **69** (2): 164-174.
- ³³ Luján HD, Mowatt MR and Nash TE. The molecular Mechanisms of *Giardia* Encystation. *Parasitology Today* 1998; **14** (11): 446-450

-
- ³⁴ Luján HD, Mowatt MR and Nash TE. Mechanisms of *Giardia lamblia* Differentiation into Cysts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1997; **61** (3): 294-304.
- ³⁵ Aggarwal A, Merritt JW Jr. and Nash TE. Cysteine-rich variant surface proteins of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol* 1989; **32**(1): 39-48.
- ³⁶ Brown DM, Upcroft JA and Upcroft P. Cysteine is the major low-molecular weight thiol in *Giardia duodenalis*. *Mol Biochem Parasitol* (NETHERLANDS), 1993; **61**(1):155-8.
- ³⁷ Nash TE and Mowatt MR. Variant-Specific Surface Proteins of *Giardia lamblia* are Zinc-Binding Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **90**: 5489-5493.
- ³⁸ Zhang, Y.-Y., Aley, S. B., Stanley, S. L., Jr., and Gillin, F. D. Cysteine-dependent zinc binding by membrane proteins of *Giardia lamblia*. *Infect. Immun.* 1993; **61**: 520-524.
- ³⁹ Gill GN. The enigma of LIM domains. *Structure* 1995; **3**:1285-9.
- ⁴⁰ Borden KL. RING domains: master builders of molecular scaffolds? *J Mol Biol* 2000; **295**:1103-12.
- ⁴¹ Nash, TE. Surface antigen variability and variation in *Giardia lamblia*. *Parasitology Today* 1992; **8**: 229-234.
- ⁴² Mejía L, Aztiazarán H, Sotelo N, Saucedo S, González A. Effect of anti-parasitic treatment on vitamin A and Iron status of Mexican children with giardiasis. *FASEB J* 1989; **3**(3): A 647.
- ⁴³ Rosado Jorge L, Bourges Hector, Saint-Martin Blanca. Deficiencia de vitaminas y minerales en México. Una revisión crítica del estado de la información. *SALUD PUBLICA DE MEXICO* 1995; **37**(5): 452-461.
- ⁴⁴ Smith MW, Aley SB, Sogin M, Gillin FD, Evans GA. Sequence survey of the *Giardia lamblia* genome. *Mol Biochem Parasitol* 1998; **95**:267-80.
- ⁴⁵ Singer, Steven M., Elmendorf Heidi G., Conrad, John T. and Nash, Theodore E. Biological Selection of Variant-Specific Surface Proteins in *Giardia lamblia* *The Journal of Infectious Diseases* 2001; **183**: 119-24.
- ⁴⁶ Gaétan Faubert. Immune Response to *Giardia duodenalis*. *Microbiology Reviews* 2000; **13**(1): 35-54.
- ⁴⁷ Feely DE, Schollmeyer JV and Erlandsen SL. *Giardia*: distribution of contractile proteins in the attachment organelle. *Exp Parasitol* 1982; **53**: 145-154.
- ⁴⁸ Adam Rodney D. The *Giardia lamblia* genome. *International Journal for Parasitology* 2000; **30**: 475-484.
- ⁴⁹ Upcroft JA, Healey A and Upcroft P. Chromosomal duplication in *Giardia duodenalis*. *Int J parasitol.* **23**: 609-616.
- ⁵⁰ Parenti DM. Characterization on a thiol proteinase in *Giardia lamblia* *J. Inf. Dis.* 1989; **160**: 1076-1080.

-
- ⁵¹ Owen RL. The ultrastructure basis of *Giardia* function. Trans Roy Trop Med Hyg. 1980; **74**(4): 429-433.
- ⁵² Sheffield HG and Bjorvatn B. Ultrastructure of the cyst of *Giardia lamblia*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1977; **26**: 23-30.
- ⁵³ Brodsky RE, Spencer HC Jr. and Schultz MG. Giardiasis in American travelers to the Sovietic Union. J. Infect. Dis. 1974; **130**: 319-323.
- ⁵⁴ Hoskins LC, Winawer SJ, Broitman SA, Gottlieb LS and Zamcheck N. Clinical giardiasis and intestinal malabsorption. Gastroenterology. 1967; **53**: 265-279.
- ⁵⁵ di Prisco MC, Hagel I, Lynch NR, Barrios RM, Alvarez N and Lopez R. Possible relationship between allergic disease and infection by *Giardia lamblia*. ANN. ALLERGY 1993; **70**(3): 210-213.
- ⁵⁶ SCOTT KGE, LOGAN MR, KLAMMER GM, TEOH DA AND BURET AG. Jejunal Brush Border Microvillous Alterations in *Giardia muris*-infected Mice: Role of T Lymphocytes and Interleukin-6. Inf Immun. 2000; **68**(6): 3412-3418.
- ⁵⁷ Wolfe MS. Giardiasis. Clin. Microbiol. Rev. 1992; **5**: 93-100.
- ⁵⁸ Mason PR and Patterson BA. Epidemiology of *Giardia lamblia* infection in children: Cross-sectional and longitudinal studies in urban and rural communities in Zimbabwe. American J Trop Med Hyg. 1987; **37**(2): 277-282.
- ⁵⁹ Pickering LK, Woodward WE, DuPont HL and Sullivan P. Occurrence of *Giardia lamblia* in children in day care centers. Journal of Pediatrics 1984; **104**(4): 522-526.
- ⁶⁰ Martini AS, Buainain A, Rodrigues VC, Fujimori C, Taba MRM, Gaspar LMM and Sanomyia NS. *Giardia lamblia*: incidence on two hundred and twenty hospitalized children in the first years of life. Revista de Ciencias Farmaceuticas 1984; **6**: 73-78.
- ⁶¹ Rendtorff RC. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. Am. J. Hyg. 1954; **59**: 209-220.
- ⁶² Barnard RJ, Jackson GJ. *Giardia lamblia* : The transfer of human infections by foods. GIARDIA AND GIARDIASIS. BIOLOGY, PATHOGENESIS, AND EPIDEMIOLOGY., 1984, pp. 365-378.
- ⁶³ DeWalle FB, Engeset J, Lawrence W. Removal of *Giardia lamblia* cysts by drinking water treatment plants. NTIS, SPRINGFIELD, VA (USA) 1984, pp 123.
- ⁶⁴ Grant, DR and Woo, PTK. Comparative studies of *Giardia* ssp. in small mammals in Southern Ontario. II. Host specificity and infectivity of stored cysts. Canadian Journal of Zoology, **55**: 1360-1366.
- ⁶⁵ Nash TE, Aggarwal A, Adam RD, Conrad JT and Merritt JW Jr. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. J Immunol 1988; **141**(2): 636-341.
- ⁶⁶ Nash TE, Banks SM, Alling DW, Merritt JW Jr. and Conrad JT. Frequency of variant antigens in *Giardia lamblia*. Exp Parasitol 1990; **71**: 415-421.

-
- ⁶⁷ Boreham PFL, Phillips RE, Shepherd RW. Heterogeneity in the responses of clones of *Giardia intestinalis* to anti-giardial drugs. *Trans Roy Trop Med Hyg* 1987; **81**:406-407.
- ⁶⁸ Meloni BP, Lymbery AI, Thompson RC. Isoenzyme electrophoresis of 30 isolates of *Giardia* from human and felines. *Am J Trop Med Hyg*.1988; **38**: 65-73.
- ⁶⁹ Meloni BP, Thompson RC, Stranden AM, Kohler P, Eckert J. Critical comparison of *Giardia duodenalis* from Australia and Switzerland using isoenzyme electrophoresis. *Acta Trop (NETHERLANDS)* 1991; **50(2)**: 115-24.
- ⁷⁰ Cedillo-Rivera R; Enciso-Moreno JA, Martinez-Palomo A, Ortega-Pierres G. *Giardia lamblia*: Isoenzyme analysis of 19 axenic strains isolated from symptomatic and asymptomatic patients in Mexico. *TRANS. R. SOC. TROP. MED. HYG.* 1989; **83(5)**: 644-646.
- ⁷¹ Upcroft Ja, Boreham PF and Upcroft P. Geograpic variation in *Giardia* karyotypes. *Int J Parasitol* 1989; **19**: 519-527.
- ⁷² Nash TE, Mowatt MR. Identification and characterization of a *Giardia lamblia* group-specific gene *Exp Parasitol* 1992; **75(4)**: 369-378.
- ⁷³ Homan WL, van Enckevort FHJ, Limper L, van Eys GJJM, Schoone GJ, Kasprzak W, Majewska AC and van Knapen F. Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes. *Parasitol Res* 1992; **78**: 316-323.
- ⁷⁴ Ey PL, Darby JM, Andrews RH, Mayrhofer G. *Giardia intestinalis*: Detection of major genotypes by restriction analysis of gene amplification products. *Int J Parasitol* 1993; **23**: 591-600.
- ⁷⁵ Meloni BP, Lymbery AJ and Thompson RCA. Characterization of *Giardia* isolates using a non-radiolabeled DNA probe, and correlation with the result of isoenzyme analysis. *Am J Trop Med Hyg* 1989; **40**: 629-637.
- ⁷⁶ Mayrhofer G, Andrews RH, Ey PL, Chilton NB. Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. *Parasitology*. 1995; **111**: 11-17.
- ⁷⁷ Andrews RH, Adams M, Boreham PF, Mayrhofer G, Meloni BP. *Giardia intestinalis*: electrophoretic evidence for a species complex. *Int J Parasitol*. 1989; **19(2)**: 183-90.
- ⁷⁸ Monis PT, Mayrhofer G, Andrews RH, Homan WL, Limper L, Ey PL. Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. *Parasitology*. 1996; **112(1)**: 1-12.
- ⁷⁹ Ey PL, Mansouri M, Kulda J, Nohynkova E, Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G. Genetic analysis of *Giardia* from hoofed farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. *J Eukaryot Microbiol*. 1997; **44(6)**: 626-35.
- ⁸⁰ Andrews RH, Monis PT, Ey PL and Mayrhofer G. Comparison of the levels of intra-specific genetic variation within *Giardia muris* and *Giardia intestinalis*. *International Journal for Parasitology* 1998; **28(8)**: 1179-1185.

-
- ⁸¹ Cifuentes E, Blumenthal U, Ruiz Palacios G, Bennett S, Quigley M, Peasey A y Romero-Alvarez H, PROBLEMAS DE SALUD ASOCIADOS AL RIEGO AGRICOLA CON AGUA RESIDUAL EN MEXICO. SALUD PUBLICA DE MEXICO 1993; **35(6)**.
- ⁸² Isaac-Renton JL, Shahriari H and Bowie WR. Comparison of an *in vitro* method and an *in vivo* method of *Giardia* excystation. Appl. Environ Microbiol. 1992; **58(5)**: 1530-1533.
- ⁸³ Karanis P and Ey PL. Characterization of axenic isolates of *Giardia intestinalis* established from humans and animals in Germany. Parasitol Res. (GERMANY)1998; **84(6)**: 442-449.
- ⁸⁴ Binz N, Thompson RC, Lymbery AJ and Hobbs RP. Comparative studies on the growth dynamics of two genetically distinct isolates of *Giardia duodenalis* *in vitro*. Int J Parasitol (ENGLAND), 1992; **22(2)**:195-202
- ⁸⁵ Udezulu IA, Visvesvara GS, Moss DM and Leitch, GJ. Isolation of two *Giardia lamblia* (WB strain) clones with distinct surface protein and antigenic profiles and differing infectivity and virulence. Infec Immun. 1992; **60(6)**: 2274-2280.
- ⁸⁶ Wallis PM and Wallis HM. Excystation and culturing of human and animal *Giardia* spp. By using gerbils and TYI-S-33 medium. Appl. Environ Microbiol. 1986; **51**: 647-651.
- ⁸⁷ Hall ML; Costa ND; Thompson RC; Lymbery AJ; Meloni BP; Wales RG. Genetic variants of *Giardia duodenalis* differ in their metabolism. Parasitol Res 1992, **78(8)**: 712-714.
- ⁸⁸ Andrews RH, Chilton NB, Mayrhofer G. Selection of specific genotypes of *Giardia intestinalis* by growth *in vitro* and *in vivo*. Parasitology. 1992; **105(3)**: 375-86.
- ⁸⁹ Meloni BP and Thompson RCA. Comparative studies on the axenic *in vitro* cultivation of *Giardia* of human and canine origin: evidence for intraspecific variation.
- ⁹⁰ Ey PL, Mansouri M, Kulda J, Nohynkova E, Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G. Genetic analysis of *Giardia* from hooved farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. J Eukaryot Microbiol. 1997; **44(6)**: 626-35.
- ⁹¹ Ey PL, Bruderer T, Wehrli C and Kohler P. Comparison of genetic groups determined by molecular and immunological analyses of *Giardia* isolated from animals and humans in Switzerland and Australia. Parasitol Res. 1996;**82(1)**:52-60.
- ⁹² Yang YM and Adam RD. Analysis of repeat-containing family of *Giardia lamblia*, variant-specific surface protein genes: Diversity through gene duplication and divergence. J. Euk. Microbiol. 1995; **42(5)**: 439-444.
- ⁹³ Gillin FD, Hagblom P, Harwood J, Aley SB, Reiner DS, McCaffery M, So M, Guiney DG. Isolation and expression of the gene for a major surface protein of *Giardia lamblia*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Jun; **87(12)**:4463-7. 150 genes
- ⁹⁴ Meloni BP, Lymbery AJ and Thompson RC. Genetic characterization of isolates of *Giardia duodenalis* by enzyme electrophoresis: implications for reproductive biology, population structure, taxonomy, and epidemiology. J Parasitol. 1995; **81(3)**: 368-383.
- ⁹⁵ Benenson Abram S.(Editor) Manual para el control de las enfermedades transmisibles. OPS, Sexta edición, 1997; 226-228. Pub. Cient. 564.

⁹⁶ Soriano Rosales Rosa Eugenia. Manual atlas para el entrenamiento de técnicos en animales de laboratorio. TESIS 1997. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM

⁹⁷ Inglis, JK. Introduction to laboratory animal science and technology. Pergamon Press, England, 1988.

⁹⁸ Rodríguez Navarro Helen. Guía para el manejo y sujeción de los animales de laboratorio más usuales. TESIS 1996. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM