



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**Histopatología del intestino delgado de
Meriones unguiculatus infectado con trofozoítos
de la clona INP-HGInvC3a de *Giardia intestinalis***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

JUAN CARLOS LÓPEZ SORIANO

**ASESORA: DRA EN C. MARTHA PONCE
MACOTELA**

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AYTAMA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

UNAM
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de: **Tesis**

"Histopatología del intestino delgado de *Meriones unguiculatus* infectado con trofozoitos de la clona INP-HGInvC3a de *Giardia intestinalis*".

Que presenta el pasante: **Juan Carlos López Soriano**.
Con número de cuenta: **311339349** para obtener el Título de: **Médico Veterinario Zootecnista**.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de octubre de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Juan Pablo Martínez Labat	
VOCAL	M.V.Z. Blanca Rosa Moreno Cardenti	
SECRETARIO	Dra. Martha Ponce Macotella	
1er. SUPLENTE	Dr. Juan Carlos Del Río García	
2do. SUPLENTE	Dr. Alejandro Vargas Ruiz	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

Esta Tesis se realizó en el Laboratorio de Parasitología Experimental y en el Servicio de Patología del Instituto Nacional de Pediatría (INP), y es producto del Protocolo con número de registro 075/2018.

Agradecimientos

Principalmente a la Dra. Martha Ponce Macotela (Jefa del Laboratorio de Parasitología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría) por haberme dado esta oportunidad tan grande tanto de hacer mi servicio social, como de hacer mi diseño experimental en el laboratorio, también por haber estado al pendiente todo el tiempo de mi trabajo, por compartirme todo ese conocimiento, no solo de *Giardia* sino de otros parásitos de interés en humanos y por todo ese apoyo incondicional que me brindó durante mi estancia en el Instituto.

Al Biólogo Mario Noé Martínez Gordillo, a la M en C Yadira Rufino Gonzales y al Laboratorista Gustavo Peralta Abarca, que me brindaron mucho apoyo en el laboratorio, tanto en la elaboración de laminillas con tinciones como capacitarme para hacer las diferentes técnicas que se emplearon en este trabajo, además de todo el conocimiento que me compartieron, a Ricardo Hernández que fue un gran apoyo para mí, por toda su ayuda en el Laboratorio.

A la Histotecnóloga Ana Isabel Sierra Santiesteban, por compartirme su conocimiento, haber brindado mucho tiempo en capacitarme y ayudarme en el proceso de la elaboración de las laminillas en el Laboratorio de Patología del INP.

A todos mis amigos de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia: Alejandra Cortés, Aarón Rodríguez, Daniela Gonzáles, Edgar Picazo, Liliana Bárcenas, Liliana Martínez, Pamela Arias, Levi Estrada, Michelle Guzmán, Marlén Correa, Ignacio Herrera, Carlos Martínez, Metzli Hernández, Miguel Cuevas, Axel Hernández, etc. Que trabajaron conmigo en diferentes proyectos, me hicieron más amena la carrera, me dieron su apoyo todo el tiempo y que compartieron conmigo muchos momentos inolvidables.

A los sinodales por tomarse el tiempo en revisar esta tesis, hacer mis correcciones y sugerirme en colocar algunos puntos para hacer de esta tesis un trabajo muy

completo.

Dedicatoria

Esta Tesis se la dedico principalmente a mis padres Erika Soriano Esteves y Juan Carlos López López, que me brindaron su apoyo toda la vida, por todos los sacrificios que hicieron por mí, por enseñarme desde pequeño que la formación académica y profesional es de suma importancia; nunca terminaría de agradecerles toda la ayuda, todos los consejos, todas las gratificaciones, todas esas recompensas, celebraciones por mis logros y todas esas enseñanzas que día con día me hicieron llegar hasta aquí. Fueron el pilar más importante en mi desarrollo como persona y profesional.

También, por animarme a estudiar la carrera que quise desde que era muy pequeño, para que así ustedes puedan decir “mi hijo es Médico Veterinario Zootecnista”, esta tesis la hice todo el tiempo pensando en ustedes, espero y confío aportar mucho de mí en la ciencia y, que con mucho orgullo sus apellidos estén en muchas publicaciones.

También va dedicada a mi familia Soriano y López, en especial a mis tías Evelyn Soriano Esteves, Ivonne Soriano Esteves y a mi abuelita Blanca Esteves Lomelí, que desde muy pequeño me brindaron todo el apoyo incondicional, ayudándome en mis tareas, asesorándome y aconsejándome desde el Preescolar hasta la Universidad, con el fin de formar a un sobrino y nieto profesionalista.

Por último, va dedicada a todos esos animales, mascotas, médicos, científicos, etc. que contribuyeron en la formación de esta hermosa carrera.

“La Medicina cura al hombre, la Medicina Veterinaria cura a la humanidad”

ÍNDICE

1.RESUMEN.....	
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1 Generalidades.....	2
2.2 Historia	2
2.3 Posición taxonómica.....	3
2.4 Morfología.....	4
2.5 Especies de <i>Giardia</i>	5
2.6 Epidemiología.....	6
2.7 Ciclo biológico	9
2.8 Patogenia.....	10
2.9 Manifestaciones clínicas.....	17
2.9.1 En animales.....	17
2.9.2 En humanos.....	17
2.10 Diagnóstico etiológico.....	18
2.11 Tratamiento.....	18
2.11.1 En animales.....	18
2.11.2 En humanos.....	18
2.12 Prevención.....	19
2.13 Histología del intestino delgado.....	20
3. ANTECEDENTES EN EL LABORATORIO.....	22
4. JUSTIFICACIÓN.....	23

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	24
6. HIPÓTESIS.....	24
7. OBJETIVO.....	24
8. MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
8.1 Material biológico.....	25
8.2 Estrategia.....	25
8.3 Metodología.....	26
8.3.1 Jerbos.....	26
8.3.1.2 Grupos de jerbos.....	27
8.3.2 Trofozoítos de la clona INP-HGInvC3a de <i>G. intestinalis</i>	28
8.3.3 Cuantificación celular.....	29
8.3.4 Inoculación de <i>Giardia</i> en jerbos.....	30
8.3.5 Eutanasia de los jerbos.....	30
8.3.6 Obtención del intestino delgado.....	31
8.3.7 Técnicas histológicas.....	32
8.3.8 Tinciones.....	33
8.3.8.1 Hematoxilina-Eosina (H-E).....	33
8.3.8.2 Ácido Peryódico de Schiff (PAS).....	37
8.3.8.3 Inmunohistoquímica.....	39
8.3.9 Análisis estadístico.....	41
9.RESULTADOS.....	42
9.1 Modelo experimental.....	42
9.2 Histología e Histopatología.....	42

9.2.1 Tinción con H-E.....	42
9.2.2 Tinción con PAS.....	74
9.2.3 Inmunohistoquímica.....	90
10; DISCUSIÓN.....	116
11; CONCLUSIONES.....	126
12; PERSPECTIVAS.....	126
13; REFERENCIAS.....	127
14; ANEXO.....	136

1. RESUMEN

Giardia intestinalis es un protozoo flagelado que parasita a una gran cantidad de mamíferos, incluido al humano. La patogenia es multifactorial, y se sabe poco del efecto patogénico de trofozoítos de aislados invasores en el hospedero. En el Laboratorio de Parasitología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría se cuenta con trofozoítos de clones procedentes de un aislado con potencial invasor, pero, no hay reportes de su efecto en el hospedero.

Objetivo. Comparar la relación cripta/vellosidad y la cantidad de células caliciformes entre jerbos infectados con trofozoítos de la clona INP-HGInvC3a de *Giardia intestinalis* y jerbos no infectados, y probar si los trofozoítos de la clona INP-HGInvC3a invaden el epitelio intestinal.

Metodología. Fueron tres grupos de jerbos (4-7 jerbos por grupo): A) Control, B) Control inoculado con PBS y C) Infectados con 25, 000 trofozoítos de *Giardia*. Los jerbos fueron inoculados a los cinco días de edad y sacrificados a los 10 y 15 días de edad. Se obtuvo el intestino delgado, se identificaron las regiones de duodeno, yeyuno e íleon. Las muestras se procesaron para histología y se realizaron las tinciones de HE, PAS e IHQ. Se determinó la relación cripta: vellosidad; número de células caliciformes y la invasión tisular. Los resultados se analizaron por ANOVA y Tukey

Resultados. En todos los segmentos del intestino de los jerbos infectados (10 y 15 días de edad) se encontró disminución en la relación cripta: vellosidad ($p < 0.05$). En el duodeno de los jerbos de 10 días de edad se encontró aumento de las células caliciformes ($p < 0.05$); en el duodeno, yeyuno e íleon de los jerbos de 15 días de edad hubo aumento de las células caliciformes ($p < 0.05$). En los jerbos infectados con *Giardia* se encontraron linfocitos tisulares, atrofia de microvellosidades y alteraciones estructurales de la mucosa. Se observaron trofozoítos sobre el moco, entre el moco, sobre el borde en cepillo e intraepiteliales.

Conclusiones. En la interacción hospedero-parásito se encontró que los trofozoítos de la clona INP-HGInvC3a provocaron disminución en la relación cripta/vellosidad del duodeno, yeyuno e íleon; aumento de las células caliciformes e invasión tisular.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Generalidades

Giardia intestinalis (Syn. *G. duodenalis* ó *G. lamblia*) es un protozooario flagelado, que parasita a los animales domésticos, silvestres y a los humanos. Se transmite por fecalismo, produce diarrea, malabsorción intestinal y pérdida en la ganancia de peso (Abe *et al.*, 2012). En pacientes humanos infectados puede impactar negativamente en su desarrollo ponderal e intelectual.

2.2 Historia

Anton Van Leeuwenhoek además de su oficio, se dedicaba a pulir lentes, con los cuales observó varios microorganismos y actualmente se le considera el padre de la microscopía. Quizá Leeuwenhoek fue el primero que describió a *Giardia* (1681) porque cuando examinó sus propias heces diarreicas, con sus lentes pulidos, encontró unos “animálculos con patitas” que se movían, como cuando las hojas se caen en el otoño (Adam., 2001).

El primer reporte clínico confirmado se le atribuyó a Vilem Lambl (1859), porque en las heces con moco de un niño, encontró al protozooario; que describió como "renacuajo", que tenía un "disco de succión ovalado " con "dos estructuras en forma de núcleo". De este hallazgo el investigador hizo dos publicaciones e ilustró a los trofozoítos y los quistes, dándole el nombre de *Cercomonas intestinalis* (Adam., 2001). Grassi (1878), al microorganismo que encontró en un roedor, lo denominó *Dimorphus muris*, aparentemente inconsciente de la descripción de Lambl. Kunstler (1882,1883) encontró trofozoítos en renacuajos y les llamó *Giardia agilis*, fue la primera vez que se usó el género *Giardia* (Adam., 2001).

Blanchard (1888) sugirió el nombre *Lamblia intestinalis*, y Stiles en 1902 lo cambió a *G. duodenalis*, Posteriormente, Kofoid (1915) y Christiansen (1920) propusieron los nombres *G. lamblia* y *G. entérica*, respectivamente (Adam., 2001).

Pero, la controversia sobre el número de especies de *Giardia* continuó durante muchos años, y algunos investigadores sugirieron nombres de especies en función

del hospedero de origen y otros centrándose en la morfología (Adam., 2001). Por otro lado, Simon (1922) usó el criterio morfológico para distinguir entre *G lamblia* y *G muris*, aceptándose el nombre de *G lamblia* para la especie de humanos (Adam., 2001).

Filice publicó una descripción morfológica detallada de *Giardia* y propuso que se usaran tres nombres de especies sobre la base de la morfología y de la forma del cuerpo medio: *G. duodenalis*, *G. muris* y *G. agilis* (Filice., 1952).

El nombre de la especie *G. lamblia* fue ampliamente aceptado durante la década de 1970. Desde la década de 1980, algunos autores utilizan la especie *G. duodenalis*, y en la década de 1990, la especie *G. intestinalis* ha sido alentado por otros investigadores (Adam., 2001).

2.3 Posición taxonómica

Los protozoarios como *Giardia sp* son Eucariotas, ya que presentan núcleo, del Reino *Protozoa*, que son organismos unicelulares, del subreino *Eozoa*, que presentan flagelos, Infrareino *Excavata*: que presentan un surco ventral excavado, del Phylum: *Metamonada* microaerofílicos que carece de mitocondrias y presenta cuatro pares de flagelos, de la Clase: *Eopharyngea*: que carece de hidrogenosomas, del Orden *Diplomonadida*: que son flagelados bilateralmente, simétricos con dos núcleos. (Cavalier., 1997; Álvarez., 2006; Ruggiero *et al.*, 2015)

Superreino: ***Eucaryota***

Reino: ***Protozoa***

Subreino: ***Eozoa***

Infrareino: ***Excavata***

Phylum: ***Metamonada***

Clase: ***Eopharyngea***

Orden: ***Diplomonadida***

Género: ***Giardia***

Especie: ***intestinalis***

(Ruggiero *et al.*, 2015).

2.4 Morfología

El protozooario *Giardia spp* tiene dos estadios. Fig. 1

1. **Trofozoíto**, es la fase trófica que produce las manifestaciones clínicas. Es piriforme, mide de 12 - 15 μm de longitud y de 5-9 μm de ancho. Tiene dos núcleos, cuerpos basales, cuatro pares de flagelos, cuerpos medios, ribosomas y vacuolas periféricas. El disco suctor se localiza en la región ventral, la región dorsal es convexa y en ésta se lleva a cabo la endo y exocitosis (Ponce-Macotela & Martínez-Gordillo. 2011).

2. **Quiste**, que es la fase de resistencia, disseminación e infección. Es ovoide de 8-12 μm de longitud y 7-10 μm de ancho; con su pared quística, cuatro núcleos, axonemas, láminas de microtúbulos, ribosomas, vacuolas y fragmentos del disco ventral. Cuando los quistes salen con las heces son infectantes (Ponce-Macotela *et al.*, 2011).

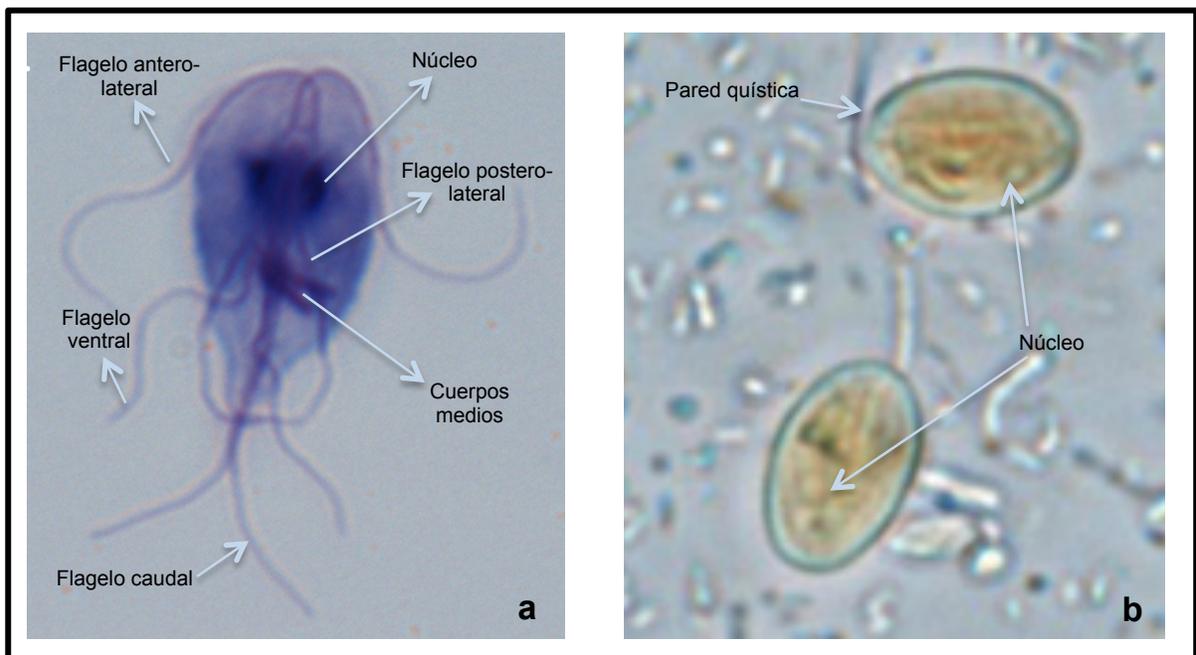


Figura 1. Morfología de los estadios de *Giardia intestinalis*: a: trofozoíto b: quistes (Lab. Parasitología Exp. INP).

2.5 Especies de *Giardia*

A la fecha se conocen seis especies de *Giardia* divididas en dos grandes grupos. Filice (1952) basado en la forma del cuerpo medio y la morfología del trofozoíto describió tres especies: *G. agilis*, *G. muris* y *G. duodenalis*. Posteriormente se describieron otras 3 especies: *G. psittaci*, *G. microti* y *G. ardeae* (Erlandsen *et al.*, 1990; van Keulen *et al* 1998). Tabla 1.

Tabla 1. Especies, hospederos y morfología de *Giardia spp*

Especie	Hospederos	Morfología	Referencias
<i>G. agilis</i>	Anfibios	Trofozoítos son delgados y alargados, con cuerpos medios en forma de gota de lágrima que se encuentran a lo largo del eje del cuerpo.	Filice., 1952
<i>G. muris</i>	Roedores	Trofozoítos son casi esféricos y los cuerpos medios redondos.	Filice., 1952
<i>G. duodenalis</i>	Hombre y a otros mamíferos (ovinos, bovinos, porcinos, equinos, felinos y cánidos, entre otros)	Trofozoítos son piriformes y los cuerpos medios en forma de uña de martillo.	Filice., 1952
<i>G. psittaci</i>	Aves	Trofozoítos piriformes y cuerpos medios en forma de uña de martillo, carece del flanco ventrolateral	Erlandsen <i>et al.</i> , 1990
<i>G. microti</i>	Ratas	Trofozoítos piriformes y cuerpos medios en forma de uña de martillo y tiene quistes con dos trofozoitos, con discos ventrales maduros.	Erlandsen <i>et al.</i> , 1990
<i>G. ardeae</i>	Aves	Trofozoítos piriformes y cuerpos medios pleomórficos (parecidos a <i>G. muris</i> y a <i>G. duodenalis</i>) y sin un flagelo caudal	van Keulen <i>et al.</i> , 1998

Se ha observado que, los trofozoítos y quistes del grupo morfológico *Giardia intestinalis* (Syn. *G. duodenalis* ó *G. lamblia*) obtenidos de diferentes hospederos son morfológicamente semejantes, por tal motivo, se han utilizado herramientas moleculares para poder diferenciarlos. Actualmente se han descrito ocho ensambles (A al H) basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y polimorfismos de los fragmentos largos de restricción (RFLP) y secuenciación

(Monis *et al.*, 2003; Cacciò & Ryan., 2008). Entre los ocho ensamblajes solo el A y el B son zoonóticos, porque se han encontrado en humanos y en una amplia gama de mamíferos. Los ensamblajes C al G tienen hospederos más específicos. Tabla 2.

Es importante resaltar que, se ha tratado de correlacionar a los ensamblajes con la sintomatología y/o signología (virulencia) de los trofozoítos; pero, hasta el momento, los ensamblajes o genotipos solo se han relacionado con la especificidad del hospedero (Homan & Mank., 2001; Read *et al.*, 2002). En esta tesis nos referiremos al grupo morfológico *G. intestinalis*.

Tabla 2. Ensamblajes de *Giardia intestinalis* y su distribución en los hospederos

Ensamblajes	Hospederos
A	Humanos, otros primates, ovinos, porcinos, bovinos, caprinos, equinos, cánidos, felinos
B	Humanos, otros primates, ovinos, porcinos, bovinos, caprinos, equinos, cánidos, felinos
C, D	Cánidos, felinos
E	Ovinos, porcinos, bovinos, caprinos, equinos.
F	Felinos
G	Ratas
H	Pinnípedos

2.6 Epidemiología

La transmisión es directa (ano-mano-boca), o indirecta por el consumo de alimento, agua contaminada con quistes, por fosisis ó por fómites (Ponce-Macotella *et al.*, 1990).

G. intestinalis es más prevalente en lugares donde hay poca sanidad la presencia de artrópodos que contaminan los alimentos, el consumo de agua no potable y el no desinfectar de manera correcta los alimentos (Adam *et al.*, 2016; Bouzid *et al.*, 2008).

Es común en todo el mundo debido a la globalización, viajar de un país a otro, distribución de alimentos, estilo de vida, cambio climático, el no tener aseo de las instalaciones y/o ambiente en donde se encuentran las mascotas o el ganado; esto último es muy importante, debido a que es una zoonosis (Dib *et al.*, 2008; Sahatchai *et al.*, 2010). En diferentes partes del mundo la prevalencia es variable, con mayor prevalencia en animales jóvenes, en perreras y refugios (Ballweber *et al.*, 2010). En los establos las moscas representan un 5% de la transmisión en un estudio realizado en China (Zhao *et al.*, 2014).

El resumen de diferentes estudios nos menciona la prevalencia de *Giardia spp.* en animales de granja y de compañía, en diferentes países se muestra en la tabla 3 (Feng & Xiao., 2011). Por ejemplo, en bovinos oscila entre 1.09 al 74.2%; en ovinos entre 1.5 y 39.2%, en caprinos entre 4 y 43.5%, en porcinos entre 3.5 y 31.1% (Feng & Xiao., 2011; Sprong *et al.*, 2009), en cánidos y felinos entre 1.1 y 45.9% (Ballweber *et al.*, 2010; Feng & Xiao., 2011; Ramírez-Ocampo *et al.*, 2017).

Un estudio realizado con muestras en 5 estados de la República Mexicana donde se muestrearon 174 bovinos y 265 ovinos de traspatio, tuvo una prevalencia en bovinos del 5.17% y de ovinos del 11.3%. (Ortero *et al.*, 2011). Por otro lado, en un estudio realizado en el sur de la ciudad de México, se muestrearon 100 canidos adultos en época de frío y calor, la prevalencia fue de 42%- 51% respectivamente (Ponce-Macotela *et al.*, 2005).

En fauna silvestre *Giardia* infecta a un amplio rango de hospederos mamíferos (Cacciò *et al.*, 2018; Feng and Xiao., 2011; Ryan & Cacciò., 2013). Existen varios estudios sobre epidemiología y transmisión, pero aún se sabe poco sobre la distribución, diversidad genética y el potencial zoonótico en poblaciones de animales terrestres y acuáticos de vida silvestre (Cacciò *et al.*, 2018).

En humanos la giardiasis fue incluida en la “Iniciativa de Enfermedades Desatendidas” y es una de las enfermedades más estudiadas en la actualidad (Savioli *et al.*, 2006). En los países menos desarrollados, hay cerca de 300 millones de infecciones en humanos por año y puede ser causa de muerte de niños

menores de 5 años (Kottlof *et al.*, 2013). En México los análisis epidemiológicos demostraron el 55% de la seroprevalencia en la población (Cedillo-Rivera *et al.*, 2009).

Tabla 3. Prevalencia de *Giardia Intestinalis* en animales domésticos de diferentes partes del mundo

Especie	País	Rango de animales muestreados	Prevalencia (%)
Bovinos	Alemania	536	51.2
	Australia	175-474	29.5-36.6
	Bangladesh	623	22
	Brasil	256	11.7
	Canadá	739	42
	China	371-2945	1.09-74.2
	Egipto	248	13.3
	Escocia	388	32.5
	España	362	12.4
	Estados Unidos	819-2109	23.9-32.9
	Etiopia	449	9.6
	Ghana	328	8.5
	Irán	246	9.3
	Corea del sur	90-590	10
	Malasia	240	12.5
	Nueva Zelanda	180	6.1
	Polonia	86	18.6
	Reino Unido	283	32.9
	Sicilia	149	35.6
	Sri Lanka	340	41.5
Tailandia	900	6	
Uganda	45	4.4	
Vietnam	412	13.8	
Ovinos	Australia	3412	20.2
	Brasil	100-105	24.8-34
	China	100-716	4.3-5.6
	España	120	89.2
	Etiopia	389	2.6
	Ghana	217	12.9
	Grecia	429	31.3
	Irán	86	19.8
	Polonia	81	21
	Reino Unido	64	43.7
Caprinos	Australia	500	7.6
	China	139-1311	2.9-14.9
	Ghana	285	12.3
	Grecia	255	40.4
	India	207	33.8
	Irán	94	15.9
	Malasia	310	6.8
Tanzania	41	21.9	
Porcinos	China	560	8
	Dinamarca	856	14
	Nigeria	209	25.4
	Polonia	84	29.8
Perros	Alemania	31	42
	Australia	721	16.1
	Brasil	32-97	6.3-19.6
	China	159-940	11.3-14.3
	Corea del Sur	202	33.2
	España	55-348	9.2-36.5
	Estados Unidos	84-120	15-32
	Grecia	879	25.2
	Italia	262-705	20-79
	Jamaica	225	19.6
	México	21	23.8
	Polonia	36-128	19.4-21.1
Tailandia	109	45.9	
Turquía	473	18.8	
Vietnam	209	8.6	
Gatos	Australia	345	10.1
	Alemania	145	5.5
	China	52-102	1.9-9.8
	España	34-65	5.9-9.2
	Grecia	264	20.5
	Japón	342	18.7
Polonia	33	15.1	

Feng & Xiao., 2011.

2.7 Ciclo biológico

Giardia intestinalis tiene un periodo de prepatencia de 9 días y un periodo de incubación de 10-19 días, su ciclo de vida es directo, Fig. 2, es decir, no hay presencia de hospedero intermediario (Ankarklev *et al.*, 2010). Presenta dos estadios en el ciclo; la fase de trofozoíto que es la que va a provocar los signos clínicos y el quiste que es la fase infectante o de transmisión, la dosis mínima infectante es de 10 quistes (Ankarklev *et al.*, 2010; Ponce-Macotela *et al.*, 1990).

En los hospederos, el ciclo se inicia cuando se ingieren los quistes (a), de éstos salen los trofozoítos (un trofozoíto por quiste), es decir, hay un desenquistamiento por el pH ácido en el estómago y por la presencia de bilis y tripsina en el duodeno (b).

Los trofozoítos se adhieren rápidamente a las células del epitelio intestinal por medio del disco suctor, el cual es esencial para la adherencia del parásito, siendo este uno de los factores de virulencia. El proceso es rápido y los trofozoítos se dividen asexualmente por fisión binaria longitudinal, después de salir del quiste y en ocasiones antes de terminar su salida, y colonizan el intestino delgado (Ankarklev *et al.*, 2010; Ponce-Macotela *et al.*, 1990).

El enquistamiento (c) se inicia cuando el trofozoíto se va alejando del duodeno y yeyuno, y percibe un cambio en el ambiente (disminución del colesterol), entonces se inicia la producción de proteínas de pared que se dirigen a la periferia del trofozoíto, éste pierde citoplasma, flagelos, se reacomoda el disco suctor y se forma la pared quística, que permitirá que el parásito sobreviva de forma infectante fuera del hospedero por varias semanas a meses (Cacciò *et al.*, 2008).

En evacuaciones diarreicas los trofozoítos salen (d), pero, no sobreviven al medio ambiente (Dawson *et al.*, 2010).

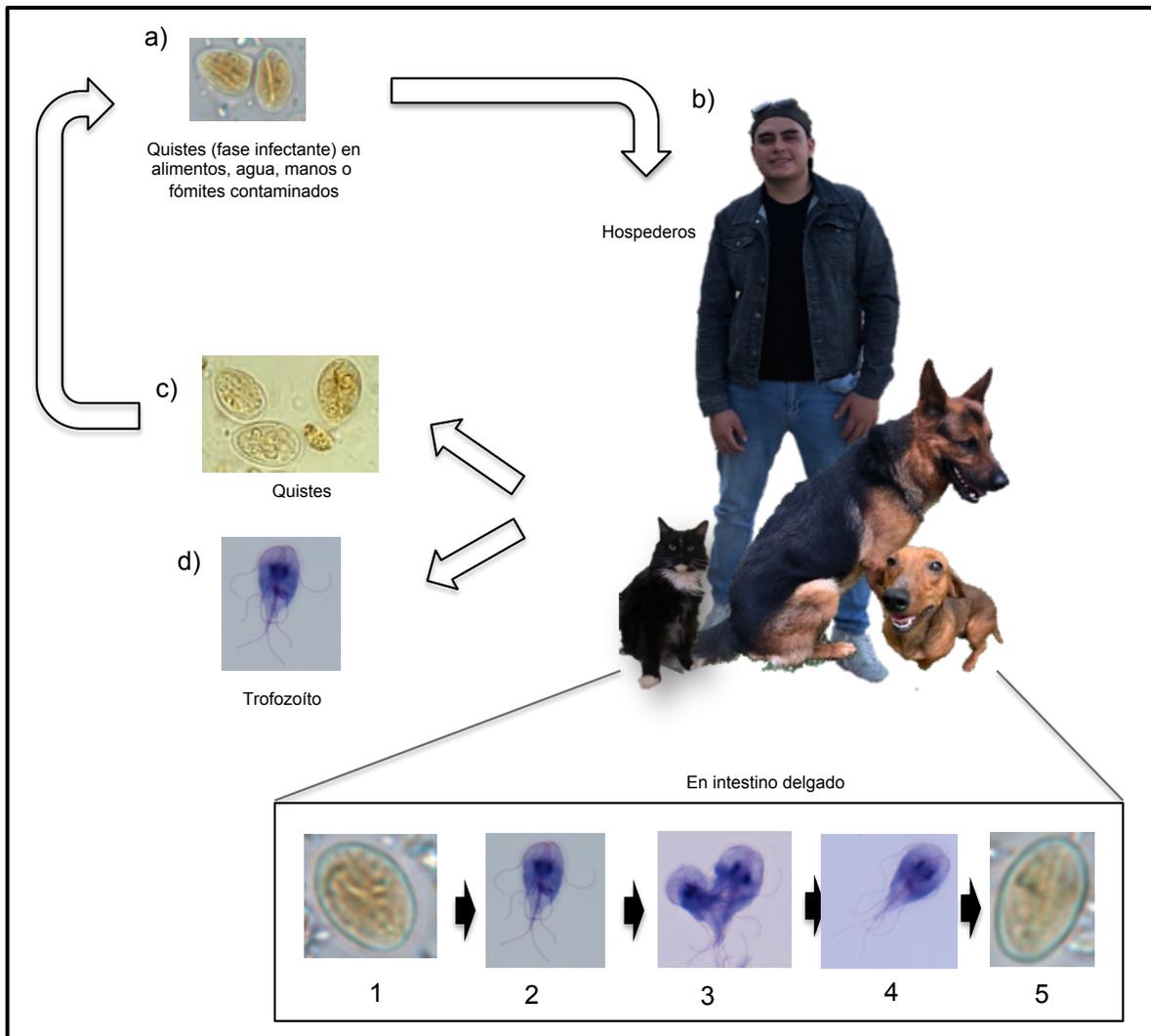


Figura 2. Ciclo Biológico de *G. intestinalis*: 1; quiste (fase infectante), 2; Trofozoito (fase que provoca el daño en el epitelio), 3; trofozoítos en fisión binaria (fase de reproducción asexual), 4; trofozoito (resultado de la reproducción asexual), 5; quiste (enquistamiento del trofozoito que saldrá al ambiente).

2.8 Patogenia

Como ya se mencionó anteriormente, *Giardia spp.* es un parásito zoonótico que provoca daño al hospedero. Se ha documentado que la patogenia de la giardiasis es multifactorial y en la interacción hospedero-parásito se desencadenan varios mecanismos que perjudican al hospedero.

Los mecanismos patogénicos registrados en la literatura son: a) competencia con el hospedero por los nutrientes, b) traumático, c) formación de barrera mecánica, d)

enzimático, e) tóxico, f) ruptura de uniones celulares, g) apoptosis y h) inhibición de especies reactivas, i) Proteínas variables de superficie, j) Incremento de células de defensa, k) hiperplasia de células caliciformes, l) Invasión tisular. Fig 3 (Farthing., 1997; Eckman & Gillin., 2001; Adam., 2001; Chin *et al.*, 2002; Ponce-Macotela *et al.*, 2008).

Figura 3. Esquema de Patogenia de *G. intestinalis*

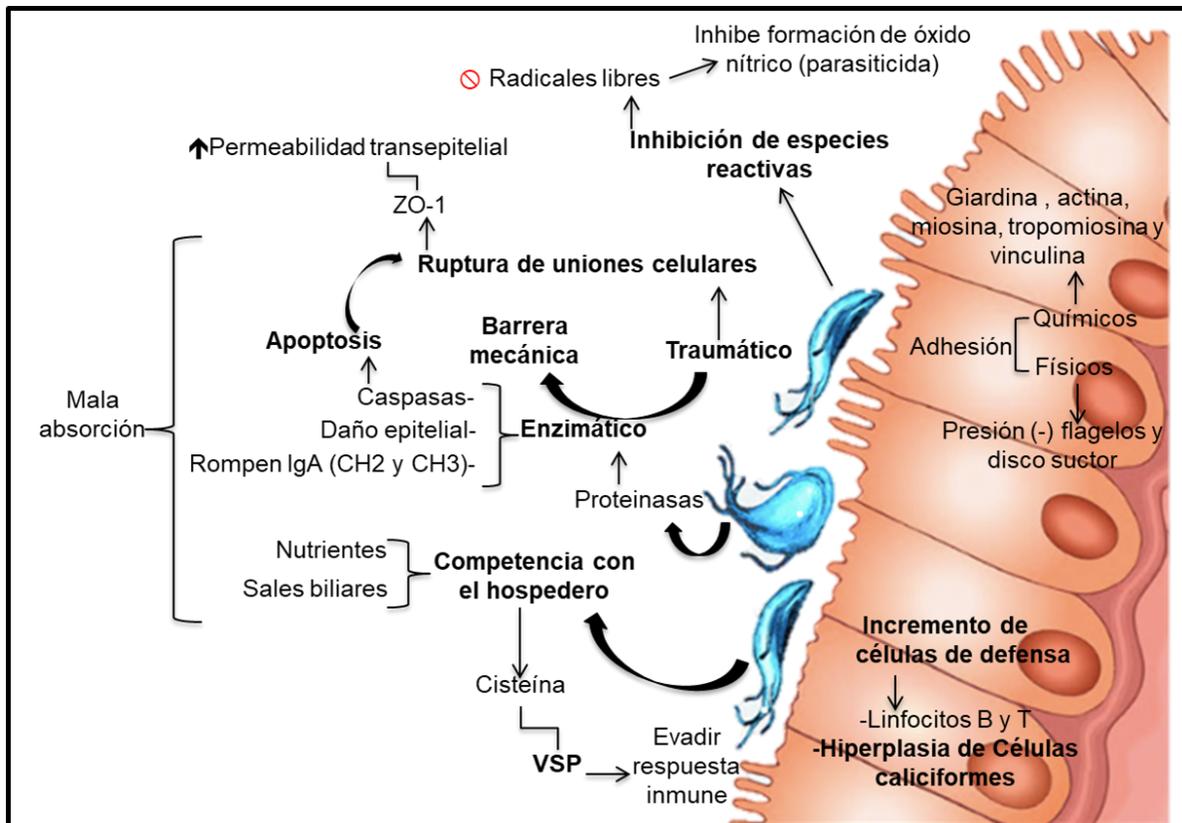


Ilustración obtenida de Barash *et al.*, 2019

a) Competencia con el hospedero

Giardia no sintetiza nada de *novo* (carbohidratos, aminoácidos, colesterol, los fosfolípidos, nucleótidos y micronutrientes) por tal motivo, todo lo adquiere del medio. Los trofozoítos de *Giardia spp.* colonizan el duodeno y yeyuno, con menor frecuencia el íleon. El duodeno es un ambiente hostil por las sales biliares que inhiben el crecimiento de los microorganismos; sin embargo, los trofozoítos de *Giardia spp.* compiten con el hospedero por las sales biliares, ya que las consume para su desarrollo (Keister., 1983; Ponce-Macotela *et al.*, 1990).

En el ambiente intestinal, la disminución de sales biliares altera la formación de micelas y repercute en la saponificación de las grasas, lo que conlleva a la esteatorrea (Keister., 1983; Ponce-Macotella *et al.*, 1990). Para la producción de energía, además de metabolizar la glucosa, utiliza aminoácidos como el aspartato, alanina y arginina. Para *Giardia* la cisteína es un aminoácido fundamental porque es un componente de las proteínas variables de superficie (VSP) dependientes de Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} . Las cisteínas forman puentes disulfuro que le dan resistencia a la membrana de los trofozoítos, y con éstas evita el efecto de las especies reactivas. Por otro lado, conlleva a una reducción de la actividad enzimática de la isomaltasa y otras disacaridasas, fosfatasa alcalina, ATPasas y otros. La mala absorción de nutrientes lo lleva a alteraciones en el desarrollo ponderal y cognitivo de los pacientes parasitados (Eckman & Gillin., 2001; Adam., 2001; Buret. *et al.*, 2008; Geurden & Olson., 2011).

b) Traumático

La adhesión de los trofozoítos de *Giardia spp.* al intestino está mediada por factores físicos como la adherencia por presión negativa del disco suctor, generada por la fuerza hidrodinámica secundaria a la actividad constante de los flagelos ventrales, y bioquímicos en donde participan las proteínas contráctiles (giardina, actina, miosina, tropomiosina y vinculina) del disco suctor. *Giardia spp.* posee una lectina (tanglina) de 28 a 30 KDa que se une a un receptor de membrana que contiene residuos de manosa-6-fosfato. El daño bioquímico mediado por lectinas se debe a la interacción específica entre las células intestinales y el parásito. Esta interacción produce exfoliación, lisis celular, aumento del índice mitótico y aplanamiento de las microvellosidades. Adicionalmente, se ha observado que la pérdida de la continuidad del epitelio intestinal puede estar inducido por alteraciones de resistencia transepitelial debido al debilitamiento de las uniones fuertes de la zonula occludens. Por si misma, la discontinuidad epitelial produce despolarización de las membranas, desequilibrio electrolítico, hiperperistaltismo y diarrea (Eckman & Gillin., 2001; Adam., 2001; Chin *et al.*, 2002; Ponce-Macotella *et al.*, 2008; Buret. *et al.*, 2008; Geurden & Olson., 2011).

c) Barrera mecánica

Los trofozoítos de *Giardia spp.* se adhieren a los enterocitos a lo largo del intestino delgado y forman una especie de parches. Esta adherencia (física y/o química) produce atrofia parcial de las microvellosidades (borde de cepillo), que se traduce en la mala absorción de los nutrientes (Luján *et al.*, 1995; Eckmann & Gillin., 2001; Ponce-Macotela, *et al.*, 2008).

d) Enzimático

Los trofozoítos de *Giardia* secretan proteinasas que pueden contribuir a la lesión de varias maneras, primera: al dañar las células epiteliales (Parenti., 1989), segunda: actúan como caspasas y promueven la apoptosis, otras enzimas como las sulfatasas, fosfatasa ácida, hidrolasas, tiolproteinasas, pueden favorecer la adherencia del parásito al epitelio intestinal debido a que atacan a las glicoproteínas de los enterocitos, alteran la integridad de las microvellosidades y tercera: rompen a la IgA (entre CH2 y CH3) dirigida contra *Giardia spp.* (Chin *et al.*, 2002).

e) Tóxico

Aunque todavía no se ha logrado aislar alguna toxina, pero, se ha observado que el medio de cultivo en donde se crecieron trofozoítos produce alteraciones en el epitelio intestinal. Además, se ha descrito el gen de una proteína variable de superficie (CRP136) que tiene secuencias repetidas que codifican un péptido que tiene una homología de 57% con una sarafotoxina, encontrada en el veneno de *Ataraspis enggadensis*. El envenenamiento por la mordedura de esta serpiente ocasiona dolor abdominal, diarrea, vómito, náuseas; síntomas semejantes a los observados en la giardiasis (Farthing., 1997; Eckman & Gillin., 2001)

f) Ruptura de uniones celulares

Las proteínas implicadas en las uniones celulares del epitelio intestinal son: *zónula-occludens* (ZO-1) cingulina, ocludina y claudinas. La ZO-1 es una proteína de membrana periférica que interactúa en la unión de la claudina con las F-actina del citoesqueleto. La función intermediaria de la ZO-1 entre las uniones celulares y el citoesqueleto es muy importante para la regulación de permeabilidad paracelular.

Se ha demostrado que los trofozoítos desorganizan las uniones celulares a nivel de la ZO-1 e incrementan la permeabilidad transepitelial (Buret *et al.*, 2008). Por sí misma, la discontinuidad epitelial produce despolarización de las membranas, desequilibrio electrolítico, hiperperistaltismo y diarrea (Eckman & Gillin., 2001; Adam., 2001; Chin, *et al.*, 2002; Ponce-Macotella *et al.*, 2008; Buret. *et al.*, 2008; Geurden & Olson., 2011).

g) Apoptosis

Se ha observado un aumento en la tasa de apoptosis de enterocitos en experimentos *in vitro* (Chin *et al.*, 2002). Así mismo se ha observado en pacientes con diarrea crónica. La apoptosis está mediada por la activación de una enzima proapoptótica caspasa-3 y caspasa-9, aumentan la expresión de la Bax proapoptótica, hay disminución de la expresión de Bcl-2 anti apoptótica y escisión proteolítica inducida de poli (-ADP-ribosa) polimerasa (PARP). Los genes asociados con la apoptosis están regulados por incremento en células expuestas a productos de la cepa WB, ensamble A (Roxström-Lindquist *et al.*, 2005). También se ha establecido que la muerte celular por apoptosis contribuye a la resolución de la inflamación. Este tipo de muerte celular se ha correlacionado con la ruptura de uniones celulares a nivel de la ZO-1 e incremento de la permeabilidad epitelial (Chin *et al.*, 2002).

h) Inhibición de especies reactivas

El parásito evita la formación de radicales libres, inhibiendo la formación de óxido nítrico (que es parasiticida), debido a que consume arginina, aminoácido precursor del óxido nítrico, vía el óxido nítrico sintetasa (Eckmann., 2003).

i) Proteínas variables de superficie (VSP)

La familia de genes VSP comprende alrededor de 270 genes en la cepa WB. El encendido y apagado de la expresión de genes que codifican a las VSP es el mecanismo que permite a *Giardia spp.* reemplazar a la VSP expresada. Aunque una sola VSP se expresa en un determinado tiempo por el trofozoíto, el repertorio de VSP potenciales (hasta 270) podría estar asociado con una mayor virulencia (Carranza *et al.*, 2002).

Las VSP de *Giardia spp.* constantemente están cambiando, son ricas en cisteína, se sabe que las uniones entre dos cisteínas forman enlaces covalentes que le confieren gran estabilidad a la membrana y las hace muy resistentes a los radicales libres. Adicionalmente, le sirven para evadir la respuesta inmune del hospedero (Adam *et al.*, 2010; Nash & Mowatt 1993; Luján *et al.*, 1995).

j) Incremento de células de defensa

En el tracto intestinal, se encuentra el llamado tejido linfoide asociado a intestino (GALT), y se compone de las placas de Peyer, folículos linfoides y nódulos linfáticos mesentéricos. En el GALT se diferencian y proliferan las células T, para que en el epitelio y la lámina propia se lleven a cabo la respuesta inmune (Wu *et al.*, 2014).

El hospedero desarrolla mecanismos de autodefensa específicos (Faubert., 2000) e inespecíficos contra parásitos (Eckmann., 2003). La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa, la conforman barreras de las mucosas intestinales, cuenta con diversas poblaciones de células, algunas con gran capacidad fagocítica como macrófagos, y de producción de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico, como neutrófilos y eosinófilos. Además, en la respuesta innata participan células especializadas en la presentación de antígenos, como las células dendríticas, que se caracterizan por la expresión de proteínas específicas a las que se les considera clave en la integración de las respuestas innatas y adaptativas (Janeway *et al.*, 2002). Entre los mecanismos específicos se encuentran las respuestas inmunitarias basadas en mecanismos dependientes de células B y T (Singer & Nash., 2000). Las respuestas inespecíficas están parcialmente respaldadas por el óxido nítrico, los péptidos antimicrobianos y otros (Eckmann., 2003), así como por las células caliciformes secretoras de moco que protegen el intestino al estratificar el epitelio (Ho *et al.*, 1995).

k) Hiperplasia de células caliciformes

Se ha observado que *Giardia spp.* estimula el incremento de células caliciformes, la hiperplasia de células caliciformes puede contribuir a la discontinuidad epitelial, que

podría aumentar la probabilidad de invasión del epitelio (Ponce-Macotella *et al.*, 2008). Las células caliciformes tienen varias funciones, una de éstas es cubrir al epitelio intestinal con glicoproteínas que lo protegen de los alimentos y para protegerla contra virus, bacterias y parásitos.

En la giardiasis el aumento de células caliciformes puede ser el responsable de dos diferentes procesos: los trofozoítos se protegen con el moco para neutralizar los ácidos grasos libres, que son perjudiciales para su membrana celular (Rayan *et al.*, 2005) un fenómeno que está potenciado por *Giardia* ya que los trofozoítos liberan una lipasa inhibidora (Gilling *et al.*, 1983) y los trofozoítos están protegidos contra la IgA encontrada en el moco (Parenti., 1989). Pero los parásitos se ven afectados negativamente porque las glucoproteínas de mucina bloquean los receptores de lectina en la superficie de los trofozoítos, lo que perjudica la adherencia de *Giardia* a las células epiteliales (Chadee *et al.*, 1990).

I) Invasión tisular

El paradigma dice que el hábitat de los trofozoítos de *Giardia* está en el lumen del intestino delgado (Buret., 2007; Ankarklev *et al.*, 2010). Pero existen algunos reportes de giardiasis con trofozoítos dentro de la mucosa, submucosa o la capa muscular del intestino (Morecki & Parker., 1967; Brandborg *et al.*, 1967; Saha & Ghosh., 1977; Fleck *et al.*, 1985; Sinelnikov *et al.*, 2009; Martínez-Gordillo *et al.*, 2014).

Todos estos mecanismos modifican la histomorfología intestinal y dan lugar a la pérdida de las microvellosidades intestinales (borde de cepillo), aumento de células caliciformes y atrofia parcial de las microvellosidades intestinales (Belosevic *et al.*, 1989; Nain *et al.*, 1991; Ponce Macotella *et al.*, 2008).

Por otro lado, existen los *Giardiavirus*, virus que comprenden una doble cadena RNA de 7 kb de la familia *Togaviridae* de 36 nm, no envuelto icosaédrico específico de *Giardia spp.* que infecta a varios ensamblajes A, B, C/D y E. Aunque no se ha encontrado correlación entre la presencia o ausencia del virus, el ensamblaje específico y la cohabitación de múltiples especies de *Giardiavirus*, no ha sido demostrado (Ortega-Perez *et al.*, 2009).

2.9 Manifestaciones clínicas

2.9.1 En animales:

Se han descrito una gran variedad de signos, que incluyen diarrea y síndrome de mala absorción (O'Handley *et al.* 1999; Geurden & Olson., 2011). En cánidos y felinos es muy común cuando se encuentran en situaciones estresantes como el alojamiento en los refugios y las perreras (Ballweber *et al.*, 2010) y la mayoría de los casos no presentan fiebre.

Al hacer el examen físico al animal, se detecta pérdida de peso y al hacer la palpación en la zona abdominal se observa que manifiesta dolor (Vasilopoulos *et al.*, 2006; Gooking *et al.*, 2004; Scorza *et al.*, 2007). En el caso del ganado bovino se reduce la tasa de crecimiento de los terneros y en vacas afecta la eficiencia alimentaria; en ovinos y caprinos puede causar diarrea severa, depresión, pérdida de peso y mortalidad, provocando pérdidas económicas y baja rentabilidad para el productor, los animales asintomáticos son portadores y diseminadores de la parasitosis (O'Handley *et al.*, 1999; Sahatchai *et al.*, 2010; Geurden & Olson., 2011).

2.9.2 En humanos

Las manifestaciones clínicas varían entre los individuos, que van desde agudas a crónicas y en algunos casos son asintomáticos, se ha hipotetizado que la giardiasis asintomática es debida a la condición fisiológica de los individuos y/o el tipo de aislado del trofozoíto, debido a que presenta varios genotipos descritos en la tabla 2. Pag 6. En casos agudos, hay dolor abdominal, diarrea explosiva fétida, esteatorrea, náuseas y vómito. En la giardiasis crónica presentan dolor abdominal, diarrea, pérdida de peso, síndrome de mala absorción y déficit intelectual (Adam., 2001, Cotton *et al.*, 2011). En algunos pacientes los síntomas pueden persistir después de haber tenido tratamiento con metronidazol (Hanevik *et al.*, 2007).

2.10 Diagnóstico etiológico.

Para la búsqueda de trofozoítos (fase lábil) en heces diarreicas se solicita el coproparasitoscópico directo en fresco. Para la detección de quistes (fase de resistencia) se solicita el coproparasitoscópico de concentración flotación (Van., 2014). Detección de coproantígenos mediante el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Detección de segmentos de genes que codifican a varias proteínas, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y frecuentemente se utiliza para mostrar la prevalencia de ensamblajes (Parcina *et al.*, 2019).

2.11 Tratamiento

2.11.1 En animales

El tratamiento en animales de compañía y domésticos se utiliza el Metronidazol, Tinidazol e Ipronidazol. Cuando existen hallazgos clínicos que sugieren infección concurrente con nematodos se utiliza el Fenbendazol, Albendazol, o combinación de Pyrantel/Prazicuantel/Febantel (Sahatchai *et al.*, 2010).

2.11.2 En humanos

Las terapias farmacológicas incluyen derivados de la familia de los nitroimidazoles como el metronidazol, tinidazol, ornidazol, secnidazol y derivados del grupo de los benzimidazoles, que incluyen albendazol y mebendazol. Además, se pueden utilizar la nitazoxanida, furazolidona, quinacrina, cloroquina y paramomicina como tratamientos alternativos (Canete *et al.*, 2006b, Leitsch., 2015).

El tratamiento de personas asintomáticas, que excretan quistes, está indicado para prevenir la autoinfección y la propagación de la infección a personas y animales sanos (Hemphill *et al.*, 2019).

Tabla 4. Fármacos utilizados en la giardiasis.

Fármaco	Características	Eficacia	Bibliografía
Metronidazol	Fue uno de los primeros tratamientos desde 1959, siendo considerada la primera opción de tratamiento.	60-100%	Bassily <i>et al.</i> , 1970, Gardner & Hill., 2001, Escobedo & Cimerman., 2007.
Tinidazol	La eficacia depende de la carga parasitaria.	72-100%	Bassily <i>et al.</i> , 1987, Canete <i>et al.</i> , 2006b, Pasupuleti <i>et al.</i> , 2014.
Secnidazol	Buenos resultados en estudios clínicos.	80-98%	Canete <i>et al.</i> , 2006a; Di Pri sco <i>et al.</i> , 2000.
Ornidazol	Buena alternativa de tratamiento.	90-100%	Jokipii & Jokipii., 1982, Sabchareon <i>et al.</i> , 1980.
Nitazoxanida	Alta eficacia contra cepas de <i>Giardia</i> resistentes al metronidazol.	71-80%	Hoffman <i>et al.</i> , 2007, Muller <i>et al.</i> , 2007b.
Albendazol	Tratamiento de opción para gran variedad de infecciones parasitarias, es uno de los 4 antihelmínticos encontrado en el listado de medicamentos esenciales de la OMS. Los trofozoítos son capaces de convertirlo en sus metabolitos y no se ha determinado qué proteína realiza esta función, haciéndolo resistente contra este fármaco.	Variable	Leitsch, 2015 Dimitrijevic <i>et al.</i> , 2012, Locatelli <i>et al.</i> , 2004, Martínez-Espinosa <i>et al.</i> , 2015.
Mebendazol	Hay estudios que reportan una buena erradicación y otros en donde no se logró una buena eficacia.	Variable	al-Waili <i>et al.</i> , 1988, Vivancos <i>et al.</i> , 2018, Gascon <i>et al.</i> , 1989.
Paramomicina	Este aminoglucosido tiene actividad más baja que los nitroimidazoles, quinacrina y furazolidona.	55-90%	Vivancos <i>et al.</i> , 2018.
Furazolidona	Es un nitrofurano muy eficaz contra parásitos microaerofílicos.	Variable	Leitsch, 2015.

2.12 Prevención

Medidas higiénicas y servicios públicos generales. La transmisión de persona a persona y de animal a persona se puede prevenir mediante la higiene; es decir, lavado de manos, no meterse los dedos u objetos sucios a la boca, evitar que los artrópodos contaminen los alimentos. El consumo de agua potable, desinfección de frutas y verduras (Adam *et al.*, 2016; Bouzid *et al.*, 2008), aseo frecuente del ambiente (instalaciones) donde se encuentran las mascotas o el ganado (Sahatchai *et al.*, 2010).

2.13 Histología del intestino delgado

En el intestino delgado la túnica mucosa está conformada por un epitelio simple columnar con microvellosidades y exocrinocitos (células caliciformes) intercaladas. A las criptas de Lieberkühn también se les conoce como glándulas intestinales, son estructuras tubulares compuestas por epitelio simple columnar que se extienden desde la muscular de la mucosa a través de todo el espesor de la lámina propia y desembocan a la altura de la base de las vellosidades, la relación vellosidad/cripta está entre 3:1 - 5:1. (Ferrufino *et al.*, 1996, Ross & Pawlina., 2006).

En la base de las criptas se encuentran las células madre, que generan células de Paneth, caliciformes y enteroendócrinas. Las células de Paneth son importantes en la inmunidad innata de la mucosa porque secretan péptidos antimicrobianos (Booth *et al.*, 2000; Ross & Pawlina., 2006).

Las células caliciformes son glándulas unicelulares mucosecretantes, con propiedades hidrófobas y tensoactivas, que previenen la adhesión de las bacterias entéricas al epitelio intestinal (Qin *et al.*, 2008; Ross & Pawlina., 2006). Las enteroendócrinas producen diversas hormonas endócrinas y parácrinas; por ejemplo, la secretina que estimula la secreción pancreática de agua y bicarbonato, en menor grado también estimula la salida de bilis e insulina, conlleva mayor producción de enzimas pancreáticas y de tripsina gástrica (Martén., 1978; Ross & Pawlina., 2006) y las células de absorción (enterocitos), especializadas en el transporte de sustancias desde la luz intestinal hasta el torrente sanguíneo (Ross & Pawlina., 2006).

La submucosa está formada por un tejido conjuntivo denso que en algunos sitios focalizados contiene acumulaciones de adipocitos. Las glándulas de Brunner poseen células secretoras con características tanto de células productoras de zimógeno como de células productoras de moco, contiene glucoproteínas neutras y alcalinas y iones de bicarbonato (Ross & Pawlina., 2006).

La muscular de la mucosa consiste en dos capas delgadas de células musculares lisas, una circular interna y una longitudinal externa, entre estas dos capas

musculares están situados los componentes principales del plexo mioentérico (plexo de Auerbach) que es una parte del sistema nervioso entérico, que posee inervación motora en ambas capas e inervación secretomotora a la mucosa, que dan lugar a las contracciones intestinales, de las cuales hay dos tipos, las contracciones de segmentación (causadas por la circular interna), que movilizan el quilo para mezclarlo con los jugos digestivos y ponerlo en contacto con la mucosa para absorber el producto de la digestión; las contracciones peristálticas que se deben a la acción coordinada de ambas capas musculares y desplazan el contenido del intestino en dirección distal.

Finalmente, la túnica serosa, que está cubierta por peritoneo dentro de la cavidad abdominal (Ross & Pawlina., 2006).

3. ANTECEDENTES EN EL LABORATORIO

Una de las líneas de investigación en *Giardia* se ha enfocado en la contribución en el conocimiento de la patogenia de este parásito.

Se inició con el estudio clínico de pacientes pediátricos con giardiasis, de quienes se obtuvieron muestras biológicas, se concentraron quistes para el desenquistamiento y cultivos axénicos de los trofozoítos (Ponce-Macotela *et al.*, 1990), el objetivo era buscar marcadores de patogenicidad mediante estudios isoenzimáticos y moleculares. Los aislados de *Giardia* obtenidos de los pacientes, uno de un cánido y dos de felinos fueron del ensamble A (grupo genético All). No hubo correlación entre el ensamble y la patogenicidad (Ponce-Macotela *et al.*, 1990; Ponce-Macotela *et al.*, 2002).

En un análisis histológico se mostró que los cánidos con *Giardia* tenían un mayor número de células caliciformes en comparación con los cánidos sin el parásito y los autores hipotetizaron que los trofozoítos podrían invadir el epitelio a través de las células caliciformes (Ponce Macotela *et al.*, 2008).

Por otro lado, en la biopsia de un paciente con intolerancia a la lactosa, mediante histología y microscopía electrónica de transmisión encontraron trofozoítos dentro del epitelio duodenal. Obtuvieron el cultivo axénico del aislado (INP-HGINV) de *Giardia*, lo genotipificaron y fue del ensamble A (grupo genético All) (Martínez-Gordillo *et al.*, 2014). Con la intención de corroborar que era un aislado con trofozoítos invasores; posteriormente, reprodujeron uno de los postulados de Koch al infectar a jerbos y observar el duodeno a los 11, 18, 27, 57 y 87 días post-inoculación, que correspondieron a 14, 21, 30, 60 y 90 días de edad con 10^6 trofozoítos de la cepa HGINV de este aislado de *Giardia* y volvieron a encontrar trofozoítos dentro del epitelio intestinal (Reynoso *et al.*, 2015).

Adicionalmente, se sabe que los aislados de *Giardia* pueden estar conformados por varias subpoblaciones de trofozoítos, y por lo tanto algunos trofozoítos pudieran no ser invasores. Por tal motivo, se propusieron obtener clonas a partir del aislado paternal. En el Laboratorio se obtuvieron clonas de tercera generación de

trofozoítos del aislado invasor; brevemente, un inóculo de 100 trofozoítos del aislado INP-HGINV (Human *Giardia* Invasor) se clonaron en medio semisólido con agarosa al 0.18% (Gillin & Diamond.,1980). Después de 8 días de incubación se observaron las colonias de trofozoítos de *Giardia*. Con una pipeta Pasteur se obtuvo una colonia y los trofozoítos se crecieron en medio TYI-S-33 (Primera clonación). Trofozoítos de la primera clona se volvieron a subclonar (Segunda clonación). El procedimiento se repitió y se obtuvieron dos clonas de tercera subclonación (INP-HGInvC3a e INP-HGInvC3b). Todas las clonas obtenidas se crecieron y se criopreservaron en nitrógeno líquido.

Es necesario demostrar el efecto de estos trofozoítos en la mucosa intestinal en un modelo *in vivo*.

4. JUSTIFICACIÓN

La giardiasis es una de las parasitosis intestinales de amplia distribución a nivel mundial, que afecta a los animales y a los humanos. En México, independientemente del nivel socioeconómico de la población, la seroprevalencia es mayor del 50%.

Escasos reportes han mostrado que existen en la naturaleza, aislados de *Giardia* con potencial invasivo.

El grupo de trabajo del Laboratorio de Parasitología Experimental del INP obtuvo un aislado de *Giardia* que en un modelo *in vivo* invadió el epitelio intestinal. Debido a que los aislados pueden estar conformados por varias subpoblaciones, se obtuvieron clonas de tercera generación; sin embargo, para conocer el efecto del parásito en el hospedero es necesario continuar con el estudio de estas clonas.

En este proyecto, que está enmarcado dentro de una de las líneas de investigación prioritaria del Instituto Nacional de Pediatría (enfermedades infecciosas y parasitarias), nos propusimos analizar las alteraciones del intestino delgado de jerbos infectados con una de estas clonas.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cómo estará la relación cripta/vellosidad y la cantidad de células caliciformes en jerbos de 10 y 15 días de edad infectados con trofozoítos de la clona INP-HGInvC3a de *Giardia*, y se encontrarán trofozoítos dentro del epitelio intestinal?

6. HIPÓTESIS

La relación cripta/vellosidad y el número de células caliciformes en jerbos de 10 y 15 días de edad infectados con trofozoítos de la clona INP-HGInvC3a de *Giardia* no será similar que en jerbos no infectados; además, dado que los trofozoítos de la clona INP-HGInvC3a provienen de un aislado invasor, entonces se encontrarán trofozoítos dentro del epitelio intestinal.

7. OBJETIVO

Comparar la relación cripta/vellosidad y la cantidad de células caliciformes entre jerbos de 10 y 15 días de edad infectados con trofozoítos de la clona INP-HGInvC3a de *Giardia intestinalis* y jerbos no infectados, y probar que los trofozoítos de la clona INP-HGInvC3a invaden el epitelio intestinal.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Material biológico

a) *Meriones unguiculatus*

Como modelo biológico se utilizaron jerbos (*Meriones unguiculatus*) de Biomedicina Integral para Invertebrados (BIOINVERT), que es una empresa dedicada a la investigación biomédica y contaban con un certificado médico donde se especificó que eran libres de patógenos específicos.

Todos los procedimientos que se realizaron en los jerbos estuvieron sujetos a las normas estipuladas por el Comité de Cuidados y Uso de Animales para Experimentación (CICUAL) del Instituto Nacional de Pediatría (INP); y a los establecidos por los Institutos Nacionales de Salud de México (NOM-062-ZOO-1999). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. (D.O.F. 22-VIII-2001).

b) Trofozoítos de *Giardia intestinalis* de la clona INP-HGInvC3a

Los trofozoítos de la clona INP-HGInvC3a se descongelaron y se mantuvieron en cultivos axénicos en el medio TYI5-33.

8.2 Estrategia

En la Fig.4 se muestra un diagrama de flujo que se siguió para cumplir con los objetivos planteados.

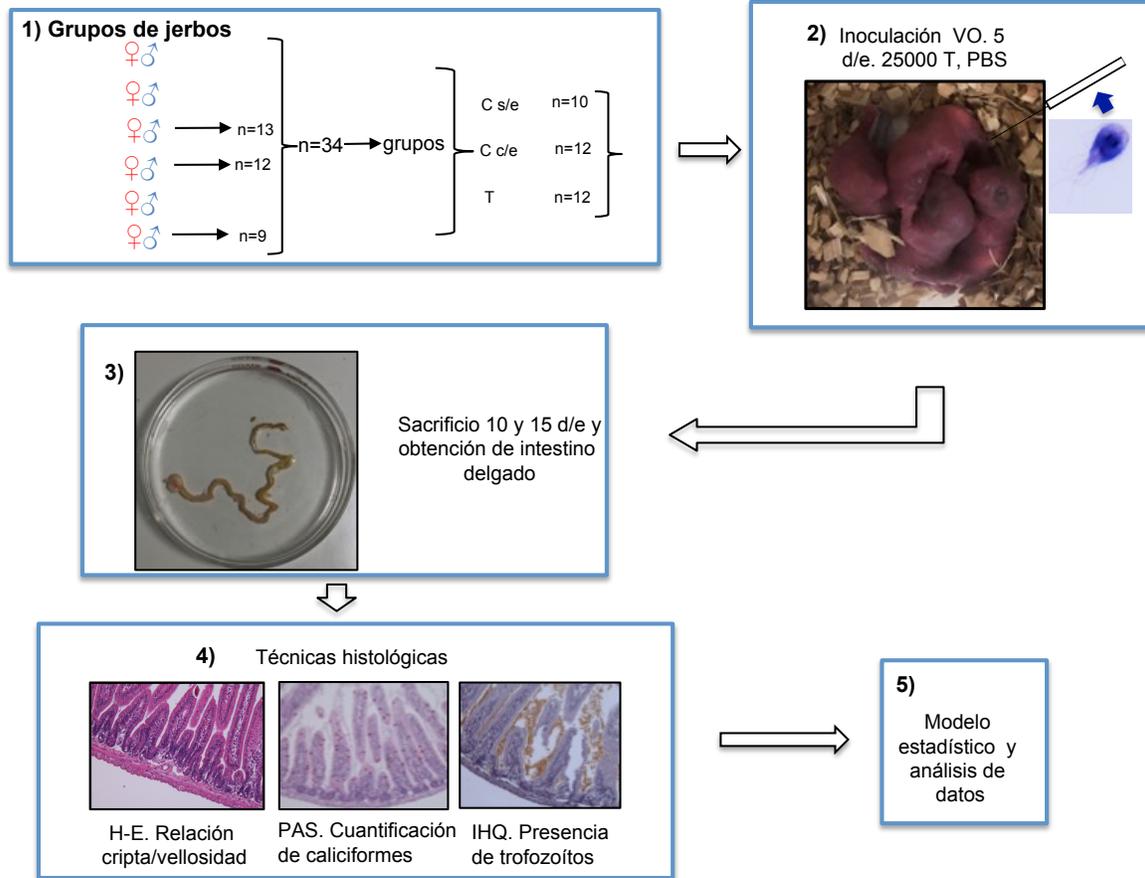


Figura 4. Diagrama de flujo. 1) Número de parejas de jerbos y crías de jerbos totales divididos en los diferentes grupos. 2) Inoculación de los trofozoítos a los jerbos de 5 días de edad. 3) sacrificio y diferenciación de los tres segmentos del intestino delgado. 4) técnicas histológicas y análisis de la histomorfología. 5) Registro de datos obtenidos en base al análisis por medio del programa image-pro-insight y Excel para obtener análisis estadístico. PBS: solución de fosfatos amortiguada, VO: vía oral, C s/e: Control con estímulo, C c/e: Control con PBS, T: Trofozoítos, d/e: días de edad.

8.3 Metodología

8.3.1 Jerbos (*Meriones unguiculatus*):

Se adquirieron seis parejas de jerbos de ocho semanas de edad.

Las parejas de jerbos se alojaron en el bioterio del INP con ambiente controlado en cajas de policarbonato de 51 X 41 X 21 cm, con ciclo de luz-obscuridad (12:12), humedad 40%, temperatura $23 \pm 3^\circ\text{C}$, con agua esterilizada y alimento *ad libitum*, las cajas y camas se cambiaron los días lunes, miércoles y viernes.

En la bitácora se mantuvo el registro de: la fecha de ingreso, de nacimiento, del

destete, y la de los inóculos correspondientes (ninguno, vehículo o trofozoítos). Se realizó el registro del número de jerbos por camada, el número de generación (F1, F2, F3) y la edad pre y post inoculación. También se registró el número de jerbos que murieron por causas desconocidas. Murieron ocho jerbos, los cuales no fueron incluidos en el presente experimento.

Los jerbos inoculados con trofozoítos se transfirieron al área de animales inoculados con agentes patógenos. La distribución de los jerbos para los experimentales se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Jerbos que se obtuvieron de las diferentes camadas

Pareja	Generación	# de jerbos	Días de edad	Estímulo	Jerbos muertos
1	-	-	-	-	2
2	-	-	-	-	3
3	F1	3	10	Control	-
	F2	2	10	Control	-
	F3	3	15	Vehículo	1
4	F1	5	10	Vehículo	-
	F2	3	10	25, 000 trofozoítos	-
		4	15	25, 000 trofozoítos	-
5	-	-	-	-	2
6	F1	2	10	Vehículo	-
	F2	2	15	Vehículo	-
		2	10	25, 000 trofozoítos	-
		3	15	25, 000 trofozoítos	-

8.3.1.2 Grupos de jerbos

Los jerbos se distribuyeron en tres grupos:

- A. Grupo control: sin estímulo.
- B. Grupo control con vehículo: se les inoculó el vehículo solución fosfatos amortiguada (PBS) estéril que se utilizó con los trofozoítos.
- C. Grupo infectado con trofozoítos: se inocularon 25,000 trofozoítos de la clona INP-HGInvC3a de *Giardia intestinalis* en 100 – 120 µL de PBS.

8.3.2 Trofozoítos de la clona INP-HGInvC3a de *Giardia intestinalis*

Los trofozoítos en medio de cultivo TYI-S-33, en tubos (8 mL) con tapón de rosca a 37°C durante 72 h; Cuando se incuban alcanzan la fase *log* de la curva de crecimiento (formación de monocapa). En cada tubo hay de 10-12 millones de trofozoítos.

Los tubos se revisaron en un invertoscopio Olympus IX50 para constatar que estuvieran en la fase *log* de crecimiento formando monocapa. Fig. 5 y Fig. 6.

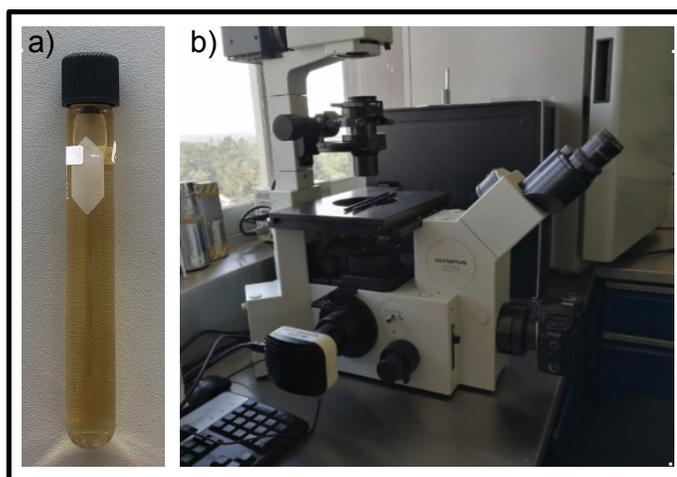


Figura 5. Fotografía que muestra un tubo con cultivo TYI-S-33 axénico con trofozoítos de *G. intestinalis* (a) y el invertoscopio Olympus IX50 (b) (Lab. Parasitología Exp. INP).

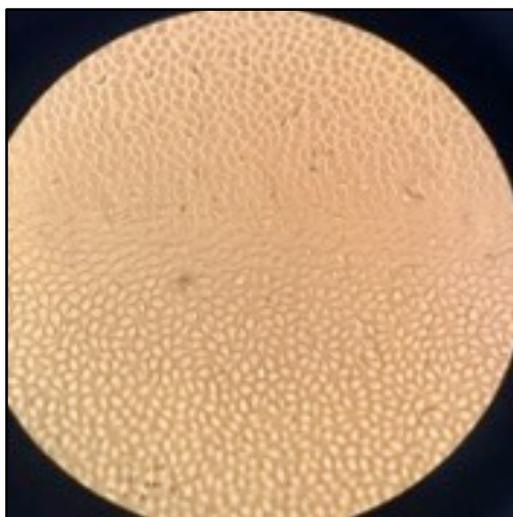


Figura 6. Microfotografía que muestra a los trofozoítos en fase *log* de crecimiento y formando monocapa en el tubo de cultivo, observados en el invertoscopio. 20X. (Lab. Parasitología Exp. INP).

8.3.3 Cuantificación celular

- a) A los tubos con trofozoítos en fase *log* se les decantó el medio de cultivo y se les agregó la solución salina amortiguada (PBS), para desprender a los trofozoítos de las paredes de los tubos, éstos se incubaron en hielo durante 10 minutos, posteriormente se homogeneizaron y centrifugaron (Heraeus Instruments) a 3500 rpm (revoluciones por minuto) durante 15 minutos. Fig. 7 (a).
- b) El sobrenadante se decantó y el precipitado se transfirió, con una pipeta Pasteur, a un tubo Eppendorf de 1.5 mL.
- c) El tubo se niveló a 1.0 mL con PBS, se incubó en hielo por 10 minutos, y se realizaron dos lavados con PBS, centrifugando a 8000 rpm por 5 minutos (Eppendorf 5415 C). Fig. 7 (b).
- d) El sobrenadante se homogeneizó y una alícuota de 10 μ L se llevó a un volumen final de 1000 μ L en otro tubo Eppendorf. Posteriormente, la muestra se homogeneizó y en cada cuadrante de la cámara de Neubauer se colocaron 10 μ L de la dilución y los trofozoítos se cuantificaron. Fig. 8.

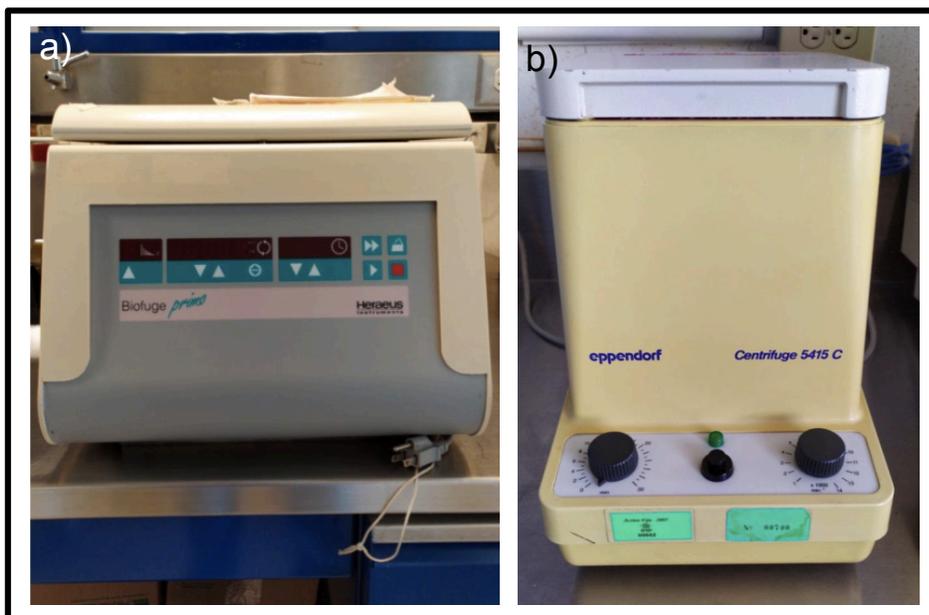


Figura 7. Fotografías de la centrifuga Biofuge primo (a) y la microcentrifuga Eppendorf 5415 C (b) (Lab. Parasitología Exp. INP).

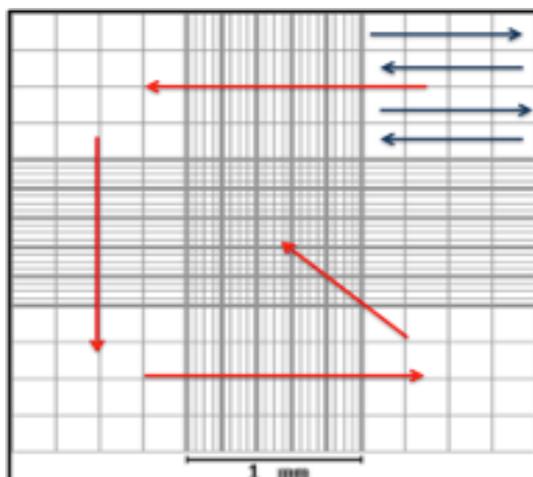


Figura 8. Esquema de una cámara de Neubauer y forma de conteo en los cuadrantes

El número de trofozoítos se determinó con la fórmula:

$$\frac{\text{No. Total de células}}{\text{No. de cuadrantes}} \times F. \text{ dilución} \times 10,000 = \text{No. de células/mL}$$

e) Una vez que se tuvo el número total de trofozoítos, se determinó la cantidad de microlitros (μL) para la inoculación con la siguiente fórmula:

$$\frac{25,000 \text{ células} \times 1 \text{ mL}}{\text{No. de células/mL}} = \text{mL de inóculo} \times 1,000 \mu\text{L} = \text{No. total de } \mu\text{L}$$

8.3.4 Inoculación de *Giardia* en Jerbos

A los jerbos de cinco días de edad se les inocularon 25,000 trofozoítos en un volumen aproximado de 100 – 120 μL de PBS por medio de un catéter. A uno de los grupos control solamente se les administró el PBS.

8.3.5 Eutanasia de los jerbos

A los 10 ó 15 días de edad, los jerbos se sacrificaron por dislocación cervical. Con los dedos pulgar y meñique de la mano izquierda, se sujetó el cuello a la altura de la articulación atlanto-occipital y con la mano derecha se sujetó la base de la cola para así desarticular e inmovilizar al animal.

8.3.6 Obtención del intestino delgado

Una vez que el animal estaba completamente inmobilizado, sobre una base de cera se fijaron las cuatro extremidades. Con unas pinzas de Halstead se sujetó la piel y con tijeras Mayo rectas se realizó una incisión en la línea media exponiendo la cavidad abdominal. Fig. 9.



Figura 9. Fotografía que muestra la obtención de intestino delgado del jerbo (Lab. Parasitología Exp. INP).

Se localizó el estómago y el recto, se extrajo todo el intestino (delgado y grueso) para que al momento de hacer los cortes no provocar algún tipo de lesión en los órganos digestivos, e inmediatamente se depositó en una caja de Petri con formaldehído amortiguado al 4%. Fig. 10. Los intestinos delgados de los diferentes animales tuvieron longitudes variables, desde 10 a 13 cm. Se diferenciaron las regiones del intestino:

- a) Duodeno: desde la terminación del píloro hasta la flexura duodenoyeyunal.
- b) Yeyuno: desde la flexura duodenoyeyunal hasta la porción proximal del íleon
- c) Íleon: hasta el límite de la válvula ileocecal.

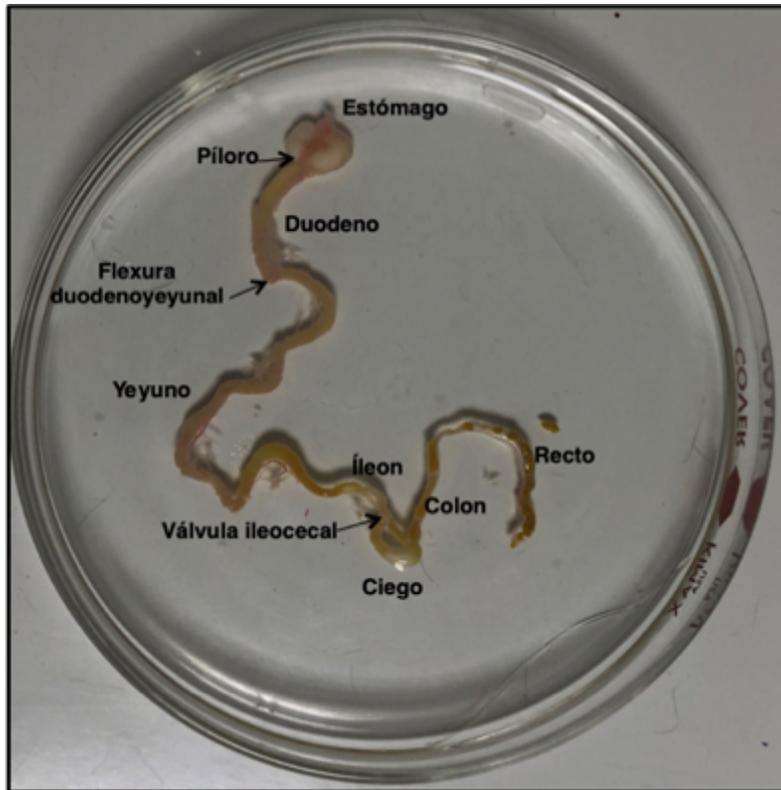


Figura 10. Fotografía que muestra la anatomía de tracto digestivo del jervo, desde el estómago hasta el recto (Lab. Parasitología Exp. INP).

Las diferentes regiones anatómicas del intestino se colocaron en cassettes para histología, se depositaron dentro de recipientes de vidrio con tapa que contenían formaldehído amortiguado al 4% y se transportaron al Servicio de Patología del INP.

Los cadáveres de los jerbos se pusieron en bolsas amarillas y se trataron siguiendo la norma oficial mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002. Se transportaron en un contenedor de unicel con tapadera y se depositaron en la sección de cadáveres del congelador del Bioterio del INP.

8.3.7 Técnicas histológicas

a) Fijación.

A las muestras se les retiró todo el formaldehído amortiguado con agua destilada, y se realizó la deshidratación del tejido utilizando un sistema automatizado (histoquinete) en siete pasos que se describen a continuación.

1. Formalina amortiguada al 10% (1 hora).
2. Alcohol al 80% (1 hora).
3. Alcohol al 96% (2 horas). Dos veces.
4. Alcohol absoluto (2 horas). Dos veces
5. Alcohol absoluto-xilol 50/50 (1 hora).
6. Xilol (2 horas). Dos veces
7. Parafina (3 horas). Tres veces

b) Inclusión en parafina.

Al siguiente día se realizó el proceso de inclusión del tejido en parafina en un sistema neumático. Con unas pinzas de disección sin dientes se obtuvo tejido por tejido y cuidadosamente se acomodó en la base de metal para el cassette, de tal forma que al momento de hacer el corte se hiciera de forma transversal. Posteriormente, se les colocó la parafina y se dejaron en la zona de enfriamiento. Se dejaron los bloques aproximadamente media hora y se retiraron de las bases para el cassette.

c) Cortes histológicos.

En un microtomo se realizaron los cortes de 3.0 μm ., se obtuvieron de 2 a 3 cortes por tejido. Los cortes en cinta se pusieron cuidadosamente con ayuda del dedo índice en un baño de flotación con agua a 45°C, se tomó el portaobjetos con los dedos pulgar e índice y cuidadosamente se adhirieron los tejidos del baño de flotación. Posteriormente, para derretir la parafina, los portaobjetos se incubaron durante 45 minutos en la estufa térmica a 42°C y finalmente se obtuvieron los cortes histológicos para las tinciones.

8.3.8 Tinciones

8.3.8.1 Hematoxilina-Eosina (H-E).

Fundamento de la tinción: La hematoxilina es un colorante básico (catiónico) y su afinidad es a las estructuras que son ácidas; por ejemplo, a los núcleos; entonces, los núcleos se tiñen de color azul. Por el contrario, la eosina es un colorante ácido

(aniónico) y tiene afinidad por todos los componentes alcalinos o básicos, por ejemplo, el citoplasma celular que se tiñe de color rosado.

Procedimiento. Las laminillas se colocaron en una rejilla y se pasaron por el tren de tinción. Fig. 11. Eliminar la parafina, hidratar los tejidos, tinción, deshidratación y montaje.

Hidratar:

1. En xilol (10 lavados). Dos veces
2. En etanol y Xilol 50/50 (10 lavados).
3. En etanol absoluto (se hicieron 10 lavados por cada uno). Dos veces
4. En etanol al 96% (se hicieron 10 lavados por cada uno). Dos veces
5. Se enjuagó con agua (10 lavados)

Teñir:

1. Las muestras se colocaron en la Hematoxilina por 10 minutos.
2. Se enjuagó en agua corriente hasta que desapareciera por completo el colorante; el tejido se podía observar en el microscopio (sin secarse) para decidir si se pasaría o no por una solución viradora (hidróxido de amonio), con esta solución se disminuye el tono de morado a un tono azulado, en caso de que quedara muy saturado. Se lavó con agua corriente cuando se usó este paso.
3. Las muestras se colocaron en Eosina por 3 minutos.

Deshidratar

1. Etanol al 96% (se hicieron 10 lavados por cada uno). Dos veces
2. Etanol absoluto (se hicieron 10 lavados por cada uno). Dos veces
3. Etanol y Xilol 50/50 (10 lavados).
4. Xilol (10 lavados). Dos veces

Montar:

1. A las laminillas, en donde se encontraba el tejido, se le colocó una gota de resina sintética, se le colocó el cubreobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente por un día.

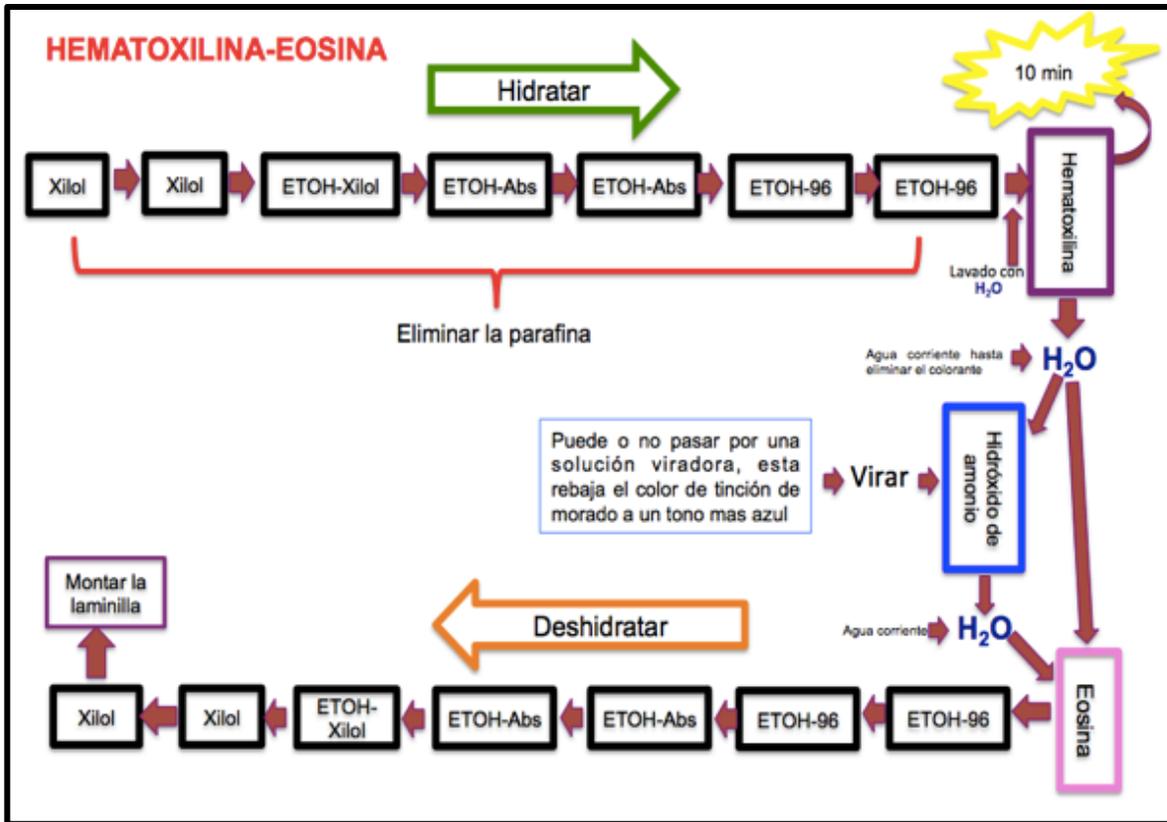


Figura 11. Tren de tinción de tinción con H-E

Con un microscopio Olympus BX50 y el software Image-Pro Insight Fig. 12. se determinó la longitud de 20 vellosidades y sus respectivas criptas. En la Fig. 13 se muestra un corte transversal del duodeno de un jerbo de 15 días de edad sin ningún tipo de estímulo, teñido con H-E. Se observa la serosa, muscular submucosa y mucosa. Son evidentes las fibras musculares de color rosa y sus núcleos teñidos de azul. El citoplasma de los enterocitos teñido de color rosa y sus núcleos de color azul. En la microfotografía representativa se muestra la longitud de las criptas y de las vellosidades marcadas con una línea de color blanco, los números en color negro corresponden a las micras.

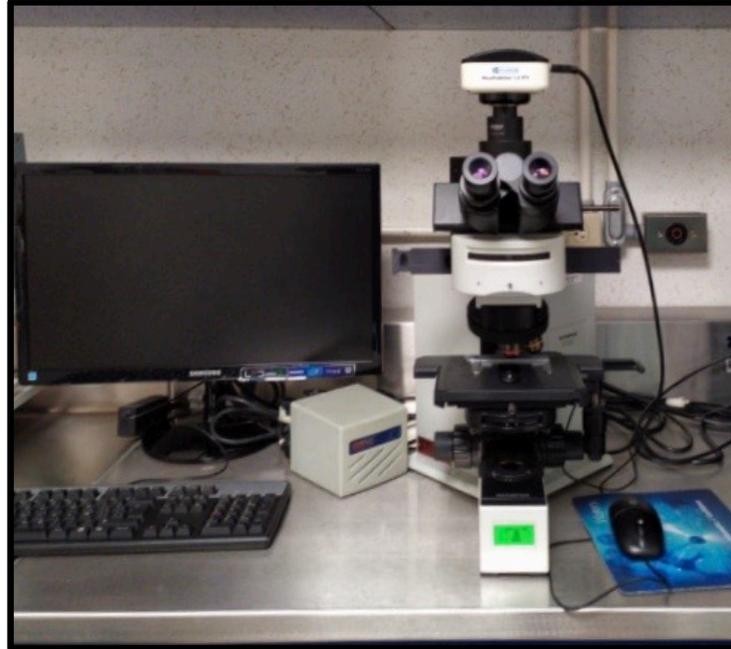


Figura 12. Fotografía del microscopio Olympus BX50 (Lab. Parasitología Exp. INP).

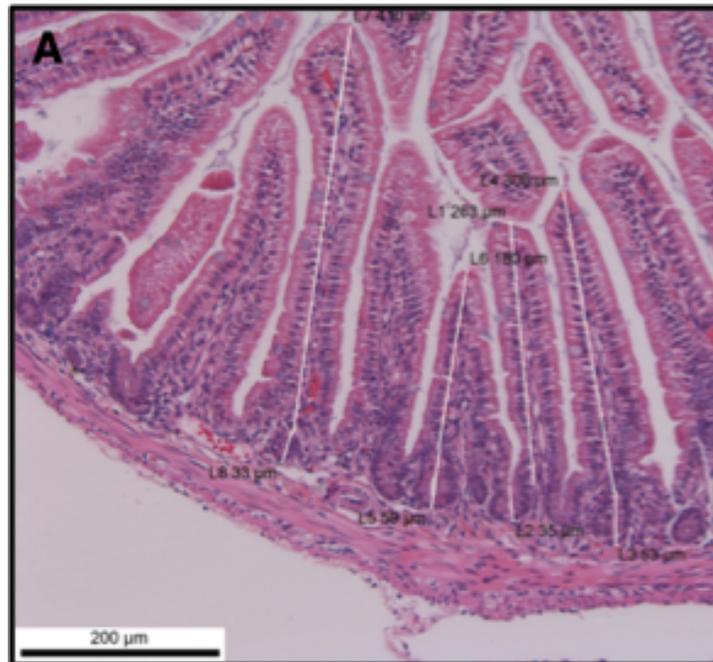


Figura 13. Microfotografía que muestra un corte transversal del duodeno normal de un jerbo de 15 días de edad, sin ningún estímulo teñido con HE. Las líneas en blanco representan la longitud de las vellosidades y las criptas obtenidas con la regleta del programa image-pro insight 10x.

8.3.8.2 Tinción Ácido Peryódico de Schiff (PAS).

El fundamento de esta tinción es mostrar a los grupos aldehídos formados por la oxidación de los carbohidratos. El ácido peryódico oxida los grupos oxhidrilos (incrementando el número de grupos carbonilos, aldehídos y cetonas). El reactivo de Schiff reacciona con grupos aldehídos y forma una coloración roja. Por tal motivo los mucopolisacáridos neutros se tiñen de rojo. En nuestro caso, el propósito de esta tinción fue evidenciar a las células caliciformes que tienen mucopolisacáridos neutros.

Para derretir la parafina, los portaobjetos con los tejidos se colocaron en la rejilla y se incubaron durante 45 minutos en una estufa incubadora a 42°C., posteriormente pasaron por el tren de alcoholes para hidratar y eliminar el resto de parafina como se describió anteriormente en la técnica de H-E.

1. Las laminillas se lavaron con agua destilada (3 lavados) y se colocaron en vasos Coplin de plástico, a los cuales se les añadió el ácido peryódico al 0.05% y se dejaron por 5 minutos (el ácido peryódico se vació en un recipiente de vidrio con tapa para ser reutilizado) y se lavaron con agua destilada (3 lavados).
2. Después se les colocó el reactivo de Schiff por 30 minutos a temperatura ambiente (16-20°C aproximadamente).
3. Se lavaron con agua destilada (3 lavados) y se les volvió a colocar ácido peryódico al 0.05% durante 5 minutos, y se observó cómo se empezaba a teñir el tejido.
4. Se realizó otro lavado con agua destilada (3 lavados) y las laminillas se colocaron en Hematoxilina por 30 minutos para teñir los núcleos, se colocaron en agua corriente hasta eliminar el resto del colorante y finalmente se deshidrataron por el tren de alcoholes al igual que en la tinción de H-E.
5. En los portaobjetos, en donde se encontraba el tejido se les colocó una gota de resina sintética; posteriormente se les colocó el cubreobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente por un día.

Con un microscopio Olympus BX50 y el software Image-Pro Insight se contaron las células caliciformes. Al azar se seleccionó un área de 100, 000 μm^2 (mínimo 95, 000 y máximo 105, 000 μm^2) del tejido, y se contaron las células caliciformes que se encontraban en esa superficie. Las imágenes se almacenaron en un archivo electrónico.

En la Fig. 14. se muestra una microfotografía panorámica de un corte transversal del duodeno de un jerbo infectado con 25, 000 trofozoítos teñido con PAS, donde se observa la pared intestinal íntegra con sus tunicas serosa, muscular submucosa y mucosa, las fibras musculares se observan de un tono rosa muy claro con los núcleos teñidos de un tono azulado, al igual que en HE el citoplasma de los enterocitos teñido de color rosa más claro, sus núcleos de un tono azulado; en el epitelio sobresalen de un tono rojizo las células caliciformes y del mismo tono los trofozoítos. En esta microfotografía representativa se muestra un corte transversal del duodeno de un jerbo de 15 días de edad en vista panorámica infectado con 25, 000 trofozoítos, la superficie de la vellosidad en μm^2 marcada en blanco.

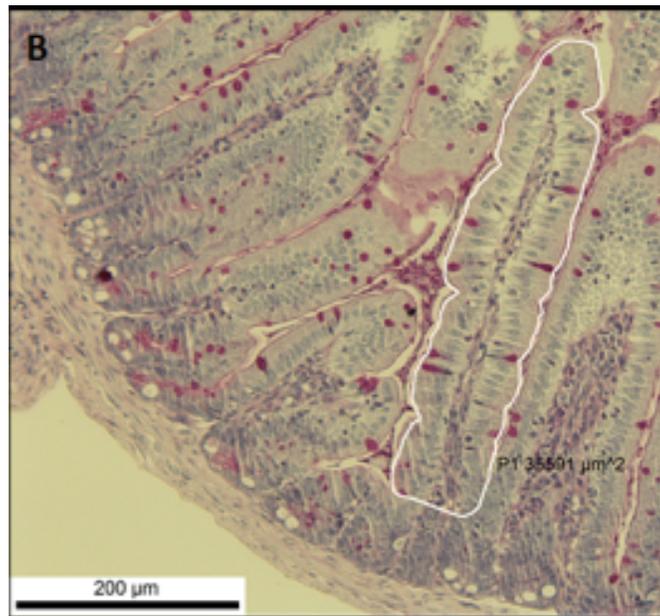


Figura 14. Microfotografía del duodeno de un jerbo de 15 días de edad infectado con 25, 000 trofozoítos, que muestra la tinción de PAS del duodeno. Se muestra la densidad en μm^2 de una vellosidad obtenidas con la regla del programa image-pro insight. 10x.

8.3.8.3 Inmunohistoquímica (IHQ).

La IHQ se utilizó para la detección de trofozoítos en la luz intestinal, sobre las vellosidades y dentro del tejido intestinal.

Para esta técnica se utilizaron laminillas electrocargadas. Previamente, se realizó la dilución de anticuerpo anti-*Giardia*: con una micropipeta se hizo la dilución de 1:100 (1 μ L de anticuerpo en 99 μ L de PBS estéril), en un tubo Eppendorf estéril. Para cada laminilla se utilizaron 100 μ L de anticuerpo diluido.

1. Para derretir la parafina: los portaobjetos electrocargados con los tejidos se colocaron en la rejilla y se incubaron durante 45 minutos en la estufa térmica a 42°C. Posteriormente, pasaron por el tren de alcoholes para hidratar y eliminar el resto de parafina como se describió anteriormente en la técnica de H-E.
2. Las laminillas se colocaron en vasos Coplin y se lavaron con agua destilada (2 lavados) para retirar los restos de alcohol.
3. El agua destilada se decantó e inmediatamente se les añadió la solución de citratos (comercial) 0.1 M pH 6. Para evitar alteraciones (inviabilidad del procedimiento) en el tejido, las laminillas en ningún momento se dejaron secar.
4. A una olla de presión (Oster) se le colocaron 400 mL de agua destilada, dentro de la olla se colocaron los vasos Coplin que contenían las laminillas bien tapados, a la olla se le colocó en la función de alubias y se calentó por 45 minutos, una vez terminado el tiempo, se dejó enfriar aproximadamente 1 hora.
5. A los vasos Coplin se les decantó la solución de citratos y se les colocó inmediatamente agua destilada. Se realizaron 3 lavados para retirar el exceso de citratos y posteriormente se le colocó el peróxido de hidrógeno al 3% /5 minutos (para bloquear la peroxidasa endógena) y se lavaron 3 veces con agua destilada.

6. Las laminillas se colocaron en la cámara de cultivo para inmunohistoquímicas. A cada laminilla se les puso 100 μ L de anticuerpo monoclonal anti-*Giardia* diluido y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.

7. Las laminillas se lavaron con PBST-20 utilizando una piseta y retirando todo el exceso del anticuerpo diluido, la laminilla se secó y solo se dejó húmeda la zona donde estaba el tejido.

8. Después se les colocó el sistema de detección, primero se le agregaron dos gotas de biotina por laminilla y se dejó incubando por 30 minutos, se lavaron con PBST-20 se secó la laminilla y solo se dejó húmeda la zona donde estaba el tejido.

9. Posteriormente se le agregó la estreptavidina, igualmente dos gotas por laminilla, se dejó incubar por 30 minutos y se repitió el lavado con PBST-20.

10. Las laminillas se colocaron nuevamente en vasos Copling con PBS (para que la muestra no se seque) y se procedió a hacer el revelado, con una pipeta Pasteur se le agregaron dos gotas del cromógeno (3,3'-Diamino benzidina), la reacción se visualizó en un microscopio, una vez que se revelaba (los trofozoítos se tiñeron de un tono marrón), se lavaron con PBST-20 y el cromógeno se depositó en una solución de cloro al 30% para desactivarlo.

11. Finalmente se contrastó con la tinción de hematoxilina y al portaobjetos se le colocó una gota de resina sintética, se le colocó el cubreobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente por un día.

Se obtuvieron las microfotografías en un microscopio Olympus BX50. Fig. 12., y con el software Image-Pro Insight, se almacenaron en un archivo para su análisis.

8.3.9 Análisis estadístico.

En el programa Excel se diseñaron las tablas para determinar la relación cripta/vellosidad. Se consideró la altura (μm) de las vellosidades y la altura (μm) de las criptas. Se obtuvieron los promedios y la diferencial entre la cripta y la vellosidad.

Se diseñaron las tablas para la cuantificación de las células caliciformes. Considerando el número de células caliciformes en $100,000 \mu\text{m}^2$ (mínimo $95,000$ y máximo $105,000 \mu\text{m}^2$) de tejido.

Los resultados se analizaron con análisis de varianza (ANOVA unidireccional), este método se utiliza para comparar dos medias de dos grupos (tratamientos) independientes (no relacionados) utilizando la distribución "F" la hipótesis nula para la prueba es que las dos medias sean iguales; Por lo tanto, un resultado significativo es que las dos medidas sean desiguales.

Con la prueba honesta de Tukey es un test de comparaciones múltiples, que permite comparar las medidas de las pruebas (t) de un factor después de haber rechazado la hipótesis nula de igualdad de medias mediante la técnica de ANOVA, por lo que un test que trata de especificar una hipótesis alternativa.

9. RESULTADOS

9.1. Modelo experimental

Se incluyeron 42 jerbos, ocho de ellos murieron, el resto se dividió en seis grupos, 17 para los 10 días de edad y 17 para los 15 días de edad. En la Tabla 6. se presenta la distribución de los jerbos en los diferentes grupos.

Tabla 6. Distribución de los jerbos para cada uno de los grupos

Edad	Jerbos del grupo control sin estímulo	Jerbos del grupo control con PBS	Jerbos inoculados con 25, 000 trofozoítos
10	5	7	5
15	5	5	7

9.2. Histología e histopatología

9.2.1. Tinción con H-E

Duodeno de jerbos de 10 días de edad de los tres grupos.

A) Grupo Control sin Estímulo

Prevaleció la integridad de la arquitectura intestinal. La mucosa, submucosa, muscular y serosa sin alteraciones aparentes. Una microfotografía representativa muestra la pared intestinal, las criptas y vellosidades con su epitelio de revestimiento, el quilífero en el centro de las vellosidades. Fig.15.



Figura 15. Corte transversal del duodeno de jervo de 10 días de edad, teñido con H-E. Pared intestinal (P), vellosidad (V), cripta (Cr), quilífero (Q), luz intestinal (*). 10x.
B) Grupo Control con Estímulo (PBS)

Hubo predominio de vellosidades y borde en cepillo sin alteraciones aparentes. En la Fig. 16 se muestra una microfotografía panorámica representativa, en donde se observa la pared, las criptas y las vellosidades.



Figura 16. Corte transversal del duodeno de un jerbo de 10 días de edad teñido con H-E. Pared intestinal (P), vellosidad (V), cripta (Cr), luz intestinal (*). 10x.

C) Grupo Inoculado con Trofozoítos

Se observó acortamiento de las vellosidades y en algunos casos con pérdida de la continuidad; cúmulos de trofozoítos en la luz intestinal. No se encontró infiltrado inflamatorio. En una microfotografía representativa, se muestra el evidente acortamiento de las vellosidades, en algunas zonas los trofozoítos están muy cerca de la pared intestinal, otros trofozoítos se encuentran en estrecha unión con las vellosidades. Fig 17.



Figura 17. Vista panorámica de duodeno de jerbo de 5 d.p.i teñido con H-E. Pared intestinal (P), vellosidad (V), cripta (Cr), luz intestinal (*), trofozoítos (T). 10x.
Longitud de las criptas y las vellosidades, promedios y análisis estadístico.

La longitud de las criptas y de las vellosidades (μm) del duodeno, de los jerbos de los tres grupos (control, control con PBS e infectados con trofozoítos), sacrificados a los 10 días de edad se muestran en las Tablas 7-9. Como se puede observar en estas Tablas, la longitud de las vellosidades de los jerbos infectados con trofozoítos de *Giardia* fue menor que la longitud de las vellosidades de los otros dos grupos (control e inoculados con PBS).

Con los datos obtenidos de las tablas, se determinó la relación cripta/vellosidad de cada uno de los jerbos y el promedio que se obtuvo fue de: 7.86, 7.06 y 4.82 para los grupos control sin estímulo, control con estímulo, e infectados con trofozoítos, respectivamente. Tabla 10.

Para determinar si había diferencias significativas en los resultados obtenidos, decidimos analizarlos por ANOVA y ésta arrojó una $p < 0.0017$. Tabla 11. Dado que el ANOVA dio datos de significancia, entonces se realizó la Prueba de Tukey para demostrar las diferencias entre los grupos. Se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo con trofozoítos ($p < 0.01$) y entre el grupo control con PBS y el grupo con trofozoítos ($p < 0.01$). Tabla 12.

Tabla 7. Dimensiones de las criptas y las vellosidades del duodeno de los jerbos del Grupo Control

J1		J2		J3		J4		J5	
Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades
μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm
21	106	26	154	25	208	19	213	34	221
45	179	28	186	54	118	17	138	26	222
24	164	38	185	30	287	30	297	23	220
22	185	24	190	26	126	41	405	16	111
39	106	26	164	32	538	25	142	19	110
22	165	23	271	40	116	21	122	24	117
33	103	29	244	18	172	37	195	26	204
39	123	24	271	30	120	24	146	28	125
27	76	19	182	24	510	29	114	27	188
29	233	31	144	25	97	30	194	23	146
19	168	16	159	28	158	21	288	21	184
28	277	21	173	30	129	20	315	19	240
24	242	29	387	21	430	19	128	30	476
35	289	32	212	31	155	31	156	34	179
22	110	32	161	32	170	25	312	27	176
54	216	25	277	30	134	26	416	18	348
28	368	30	132	32	147	27	483	30	215
25	365	40	161	21	110	39	314	28	232
41	407	36	546	28	106	36	257	25	318
25	189	31	159	30	134	25	288	22	438
P: 30.1	203.55	28	217.9	29.35	198.25	27.1	246.15	25	223.5

J1-J5: Jerbos; P: Promedio

Tabla 8. Dimensiones de las criptas y vellosidades del duodeno de los jerbos del Grupo

Control con Estímulo (PBS)

J1		J2		J3		J4		J5		J6		J7	
Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	vellosidades
μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm
50	144	62	213	50	185	28	376	59	117	54	198	45	131
27	136	46	215	27	432	33	227	66	225	45	136	40	316
20	540	36	63	24	158	39	431	37	307	29	99	49	146
36	342	23	420	29	176	31	486	45	139	38	259	61	157
38	750	49	413	22	181	25	390	44	226	44	100	35	297
27	111	29	55	21	110	24	156	31	347	23	110	48	371
44	110	28	172	37	398	45	410	30	150	28	179	34	109
58	200	30	122	21	146	37	100	30	134	47	225	47	816
39	149	41	306	41	116	37	158	32	142	24	139	47	478
43	163	32	170	34	300	26	270	25	151	25	189	47	761
42	179	39	159	48	334	58	128	41	161	49	182	22	161
42	253	38	402	44	323	29	422	36	270	24	177	59	329
50	303	34	282	41	211	53	152	34	267	29	182	27	854
33	273	41	501	30	158	58	263	24	121	58	232	50	585
43	331	33	333	20	135	29	321	37	373	37	242	38	726
31	102	49	289	29	512	26	131	32	306	42	173	37	259
25	175	53	319	63	412	42	146	30	149	50	198	34	186
44	182	51	705	30	175	46	280	38	247	45	136	46	195
42	248	33	448	63	202	19	285	47	359	29	100	38	465
25	705	42	625	59	666	24	192	55	251	38	256	34	411
P: 37.95	269.8	39.45	310.6	36.65	266.5	35.45	266.2	38.65	222.1	37.9	175.6	41.9	387.65

J1-J7: Jerbos; P: Promedio

Tabla 9. Dimensiones de las criptas y vellosidades del duodeno de los jerbos del Grupo Infectado con 25,000 Trofozoítos de *Giardia intestinalis*

J1		J2		J3		J4		J5	
Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades
μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm
37	217	27	99	38	74	16	48	10	60
41	174	33	88	45	133	26	102	37	111
21	74	32	90	21	210	31	97	29	73
29	133	28	131	38	292	24	155	41	86
35	85	29	142	39	218	28	99	35	99
40	77	24	114	25	79	21	175	22	89
24	149	38	141	29	151	46	102	35	171
32	95	41	131	34	143	24	380	32	129
34	82	22	114	25	100	24	136	34	283
41	122	23	115	51	140	24	160	22	214
39	230	33	60	34	211	22	151	24	176
31	155	25	70	35	71	52	121	23	96
34	110	26	214	27	182	34	94	23	58
30	39	38	113	26	85	30	202	29	145
39	153	24	133	37	87	29	96	27	120
40	92	22	298	20	147	17	126	27	120
49	128	25	298	22	158	24	197	34	167
58	450	26	159	29	88	28	115	31	252
61	432	48	92	20	49	27	189	26	155
21	55	33	138	39	255	40	192	17	83
P: 36.8	152.6	29.85	137	31.7	143.65	28.35	146.85	27.9	134.35

J1-J5: Jerbos; P: Promedio

Tabla 10. Relación cripta: vellosidad del duodeno de

los jerbos de 10 días de edad, de los tres grupos.

Jerbos	A)	B)	C)
1	6.76	7.11	4.15
2	7.78	7.87	4.59
3	6.75	7.27	4.53
4	9.08	7.51	5.18
5	8.94	5.75	4.82
6		4.63	
7		9.25	
Promedio	7.86	7.06	4.82

A) Control; B) Control con PBS y C) Con trofozoítos

Tabla 11. Análisis de varianza de los tres grupos

ANOVA: K= 3 tratamientos independientes					
Fuente	Suma de cuadrados SS	Grados de libertad v	Cuadrados medios MS	F estadística	Valor P <0.05
Tratamiento	28.40	2	14.20	10.46	0.0017
Error	19.00	14	1.35		
Total	47.40	16			

Tabla 12. Análisis por Tukey entre los tres grupos

Resultados Prueba HSD Tukey			
Par de tratamientos	Q estadístico de Tukey HSD	Valor P de Tukey HSD	Interferencia de Tukey HSD
A vs B	1.6755	0.4822933	Insignificante
A vs C	6.1637	0.0017656	**p<0.01
B vs C	4.9821	0.0088455	**p<0.01

A) Control; B) Control con PBS y C) Con trofozoítos

Yeyuno de jerbos de 10 días de edad

A) Grupo Control sin Estímulo.

La mucosa, submucosa, muscular y serosa sin alteraciones, vellosidades con borde en cepillo íntegro.

Una representación de lo que se observó se muestra en la Fig. 18 A. Microfotografía del yeyuno en vista panorámica: pared intestinal con sus diferentes tunicas; criptas; enterocitos y células caliciformes en las vellosidades. Eritrocitos en los quilíferos. En un acercamiento se observan los plexos de Auerbach ó también conocidos como plexos musculares entre la túnica muscular longitudinal y la muscular circular. Fig 18 B.

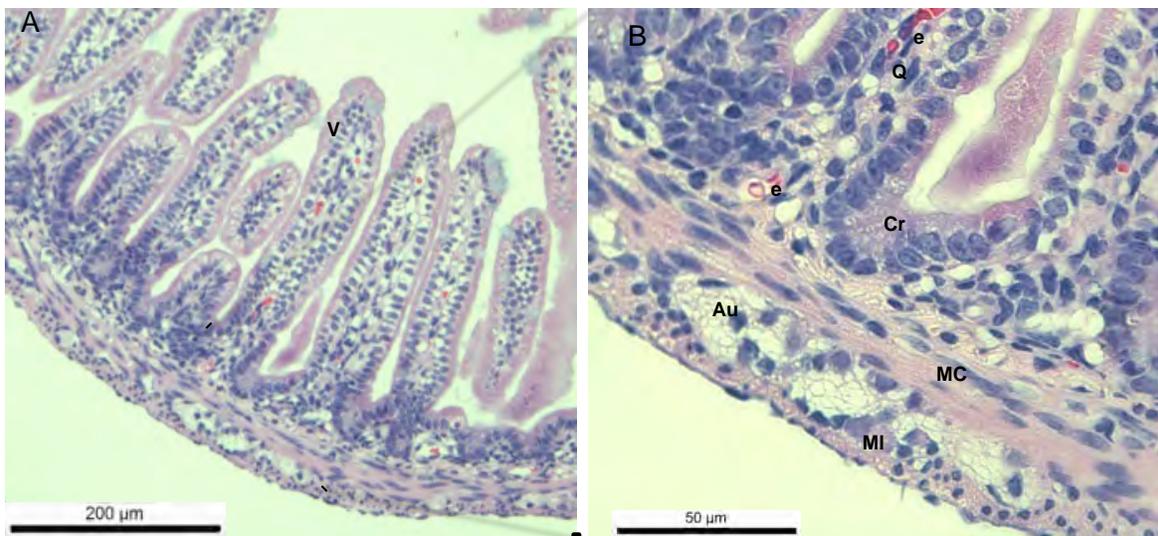


Figura 18. A (Panorámica) del yeyuno de un jerbo de 10 días de edad, teñido con H-E. 10x. B (acercamiento). Vellosidad (V), cripta (Cr), quilífero (Q), eritrocitos (e), luz intestinal (*), muscular longitudinal (MI) y muscular circular (Mc), plexos de Auerbach (Au) 40x.

B) Grupo Control con Estímulo (PBS).

Predominaron las vellosidades y borde en cepillo sin alteraciones aparentes. En la microfotografía representativa se observa la pared, un vaso sanguíneo, las criptas y las vellosidades. Fig 19.

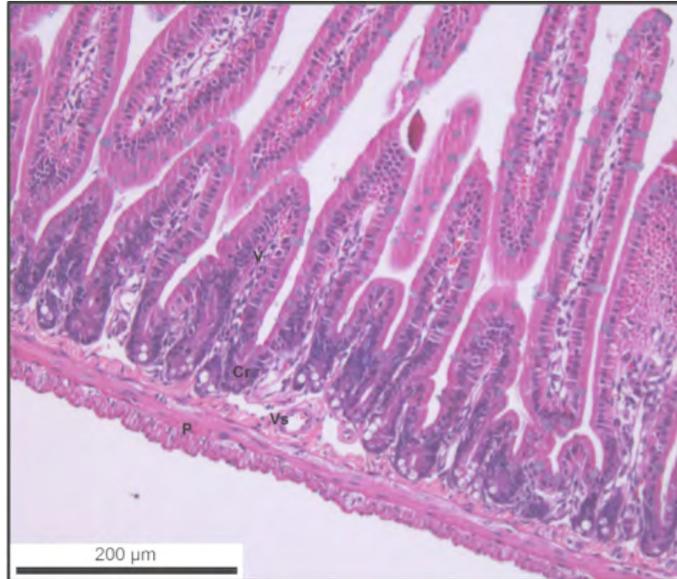


Figura 19. Panorámica del yeyuno de jervo de 10 días de edad inoculado con PBS teñido con H-E. Pared intestinal (P), vaso sanguíneo (Vs), cripta (Cr), vellosidad (V) 10x.

C) Grupo Inoculado con Trofozoítos.

En este grupo de jervos se encontró predominio del acortamiento de las vellosidades y en algunos casos con posible pérdida de la continuidad; se observaron cúmulos de trofozoítos en la luz intestinal. En una micrografía representativa, se muestra el evidente acortamiento de las vellosidades, en algunas zonas los trofozoítos están en estrecha unión con las vellosidades. Fig 20.

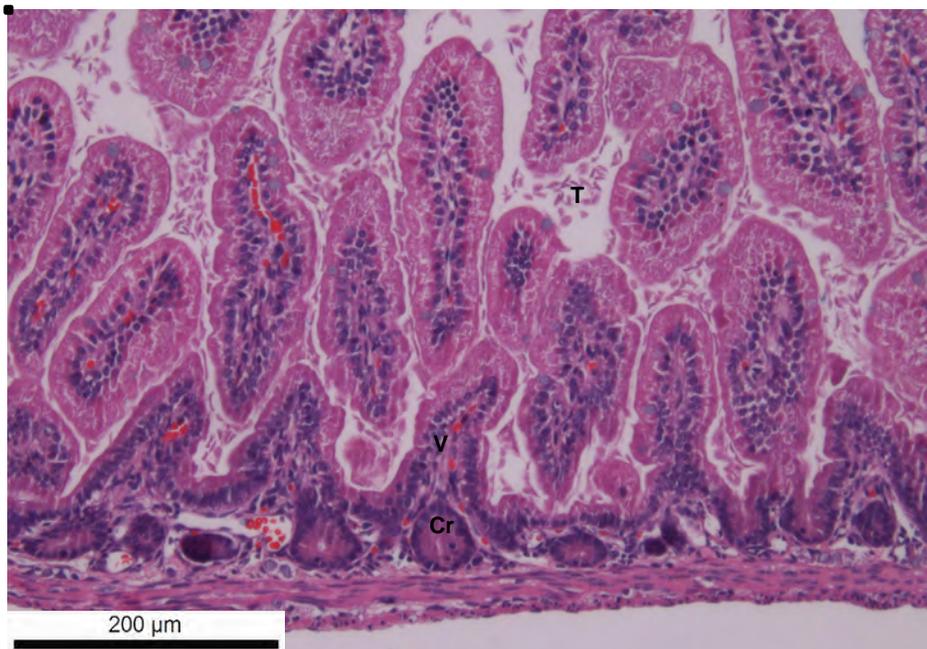


Figura 20. Panorámica del yeyuno de un jervo de 10 días de edad, inoculado con 25, 000 trofozoítos teñido con H-E. Cripta (Cr), vellosidad (V), trofozoítos en la luz intestinal (T). 10x.

Longitud de las criptas y vellosidades, promedios y análisis estadístico.

Las dimensiones de las criptas y de las vellosidades (μm) del yeyuno, de cada uno de los jerbos de los tres grupos (control, control con PBS e infectados con trofozoítos), sacrificados a los 10 días de edad se muestran en las Tablas 13-15.

Con estos datos, se obtuvo la relación vellosidad/cripta y el promedio fue: 7.93, 7.45 y 4.37 para los grupos control sin estímulo, control con estímulo, e infectados con trofozoítos, respectivamente. Tabla 16.

Como en el caso del análisis del duodeno, los resultados se analizaron mediante ANOVA y se encontraron diferencias significativas ($p < 0.0203$). Tabla 17. La prueba de Tukey mostró diferencias significativas entre el grupo control y el grupo con trofozoítos ($p < 0.01$) y entre el grupo control con PBS y el grupo con trofozoítos ($p < 0.01$). Tabla 18.

Tabla 13. Dimensiones de las criptas y vellosidades del yeyuno de los jerbos del Grupo Control

J1		J2		J3		J4		J5	
Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades
μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm
25	112	23	137	29	271	16	110	20	131
18	172	34	290	26	196	21	446	23	222
32	190	16	114	32	152	22	352	17	137
23	256	33	106	23	145	26	144	16	150
26	189	26	186	28	184	29	101	14	179
37	166	27	239	27	116	26	332	25	206
30	143	28	145	34	107	24	163	25	125
27	133	18	228	26	91	30	166	29	116
35	229	18	99	21	24	17	91	21	170
25	109	32	188	24	180	20	265	14	13
21	426	33	156	19	1354	21	99	21	102
28	116	22	89	25	506	25	160	20	103
23	307	27	89	24	178	39	403	23	113
21	130	21	137	36	154	21	506	14	99
19	145	22	206	25	185	22	149	33	316
33	186	19	78	36	132	22	79	28	167
18	120	15	189	31	463	21	446	18	202
28	105	34	290	25	271	19	110	21	119
22	111	22	174	36	268	16	110	17	388
20	117	32	89	27	153	29	86	20	261
P: 25.55	173.1	25.1	161.45	27.7	256.5	23.3	215.9	20.95	165.95

J1-J5: Jerbos; P: Promedio

Tabla 14. Dimensiones de las criptas y vellosidades del yeyuno de los jerbos del Grupo Control con PBS

J1		J2		J3		J4		J5		J6		J7	
Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades
μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm
27	302	28	215	42	111	31	210	41	184	65	228	37	138
52	245	25	302	46	142	37	246	32	215	42	341	38	265
29	307	25	506	33	199	48	114	39	222	31	72	25	265
30	73	21	408	48	210	30	237	46	109	51	232	26	106
36	514	21	599	51	120	27	175	56	224	57	316	29	245
51	262	35	181	57	194	36	159	43	234	49	175	32	606
42	250	38	182	22	169	21	174	31	158	28	353	35	217
22	503	79	118	21	183	28	289	57	300	46	173	35	173
24	512	42	179	20	169	22	216	46	255	25	272	37	556
24	248	22	343	35	221	32	319	38	124	40	191	27	436
43	376	22	222	29	192	44	237	39	153	57	396	30	320
25	587	27	196	55	216	47	250	49	256	41	194	44	189
20	420	38	171	42	222	34	155	29	180	55	212	36	632
51	468	29	163	36	205	38	135	22	171	27	121	36	348
31	577	26	116	28	166	24	185	38	162	32	191	36	575
27	395	35	181	21	160	44	345	30	198	33	144	40	614
27	57	38	189	26	109	20	291	40	210	37	181	20	280
17	450	34	179	26	195	47	289	46	209	34	122	35	390
36	193	29	155	22	186	35	390	50	188	38	228	25	670
27	123	22	343	22	186	30	384	32	215	37	166	45	430
P: 32.05	343.1	31.8	247.4	34.1	177.75	33.75	240	40.2	198.35	41.25	215.4	33.4	372.75

J1-J7: Jerbos; P: Promedio

Tabla 15. Dimensiones de las criptas y vellosidades del yeyuno de los jerbos del Grupo Infectado con 25,000 Trofozoítos de *Giardia intestinalis*

J1		J2		J3		J4		J5	
Criptas	Vellosidades								
μm									
32	64	19	86	21	102	39	116	21	130
38	156	25	64	23	82	32	194	27	221
26	103	21	61	34	163	31	288	17	122
44	64	29	169	25	99	29	154	25	115
25	207	35	258	12	184	16	42	26	157
32	324	40	63	17	61	43	112	26	175
50	96	24	193	22	98	31	139	26	206
46	107	32	75	21	157	21	142	17	93
43	227	34	68	17	82	32	190	30	223
33	116	41	85	32	113	32	126	36	89
29	150	34	149	35	157	28	132	21	156
30	140	31	68	17	52	25	55	19	135
35	112	34	98	23	91	23	74	31	217
25	86	30	149	26	172	19	66	27	121
19	106	39	66	23	127	26	88	37	65
23	96	40	174	25	94	20	248	25	58
33	146	49	225	22	173	26	132	21	117
23	126	58	115	18	134	35	266	37	68
24	106	61	149	26	149	21	27	35	88
30	151	21	211	21	136	32	137	25	104
P: 32	134.15	34.85	126.3	23	121.3	28.05	136.4	26.45	133

J1-J5: Jerbos; P: Promedio

Tabla 16. Relación cripta: vellosidad del yeyuno de los jerbos de 10 días de edad y de los tres grupos

Jerbos	A)	B)	C)
1	6.77	10.71	3.08
2	6.43	7.78	3.62
3	9.26	5.21	5.27
4	9.27	7.11	4.86
5	7.92	4.93	5.03
6		5.22	
7		11.16	
Promedio	7.93	7.45	4.37

A) Grupo control; B) Grupo control con PBS y C) Grupo con trofozoítos

Tabla 17. Análisis de varianza de los tres grupos

ANOVA: K= 3 tratamientos independientes					
Fuente	Suma de cuadrados SS	Grados de libertad v	Cuadrados medios MS	F estadística	Valor P <0.05
Tratamiento	38.5267	2	19.2634	5.2137	0.0203
Error	51.7269	14	3.6948		
Total	90.2537	16			

Tabla 18. Análisis por Tukey entre los tres grupos

Resultados Prueba HSD Tukey			
Par de tratamientos	Q estadístico de Tukey HSD	Valor P de Tukey HSD	Interferencia de Tukey HSD
A vs B	0.6086	0.8999947	Insignificante
A vs C	4.1378	0.0279361	**p<0.01
B vs C	3.8608	0.0404538	**p<0.01

A) Grupo control; B) Grupo control con PBS y C) Grupo con trofozoítos

Íleon de jerbos de 10 días de edad

A) Grupo Control sin Estímulo

Se observaron vellosidades con epitelio íntegro, las criptas y pared intestinal sin alteraciones. Abundantes células caliciformes.

Una microfotografía representativa muestra la pared intestinal, las vellosidades, células caliciformes, vasos sanguíneos y el quilífero. Fig. 21A. En un acercamiento se muestra el epitelio de la vellosidad, fibroblastos y eritrocitos en los capilares. Fig. 21B.

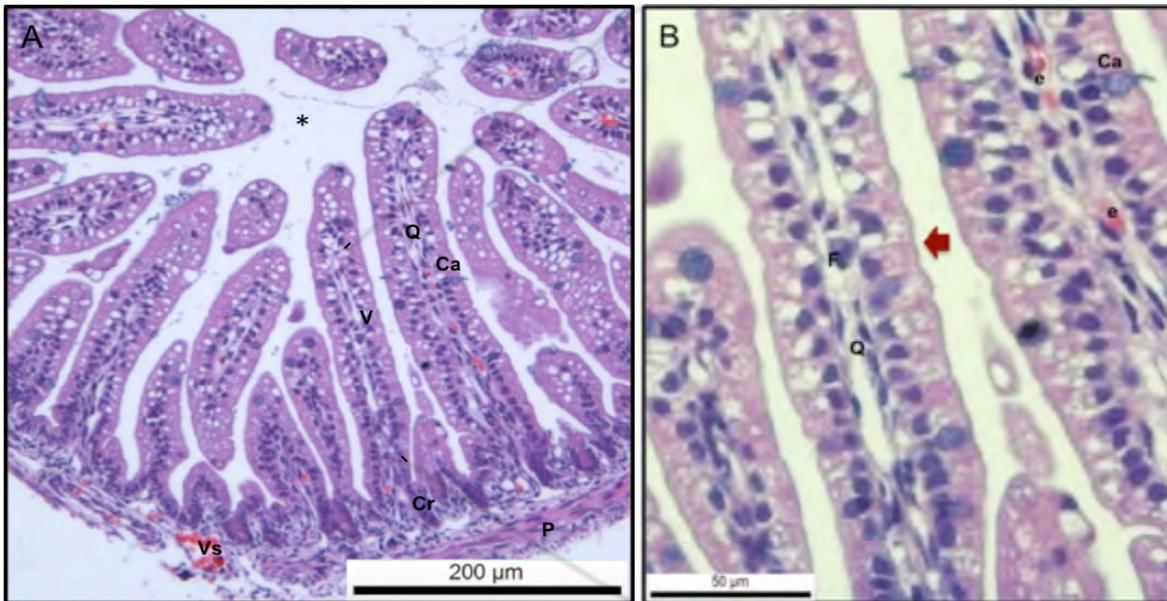


Figura 21. (A) Panorámica 10x y (B) Acercamiento del íleon de un jervo de 10 días de edad, H-E. Pared intestinal (P), cripta (Cr), vellosidad (V), quilífero (Q), célula caliciforme (Ca), vaso sanguíneo (Vs), luz intestinal (*). epitelio simple columnar con microvellosidades y exocinocitos ó células caliciformes intercaladas (Flecha), fibroblastos (F), eritrocitos (e) 40x.

B) Grupo Control con Estímulo (PBS)

Con arquitectura intestinal sin alteraciones, vellosidades con borde en cepillo y células caliciformes. Pared intestinal íntegra.

Una microfotografía panorámica representativa muestra la pared intestinal íntegra, las criptas y las vellosidades. Fig. 22A. En un acercamiento de una cripta de Lieberkühn se observan las células de Paneth, importantes para la formación de lisozima. Fig. 22B.

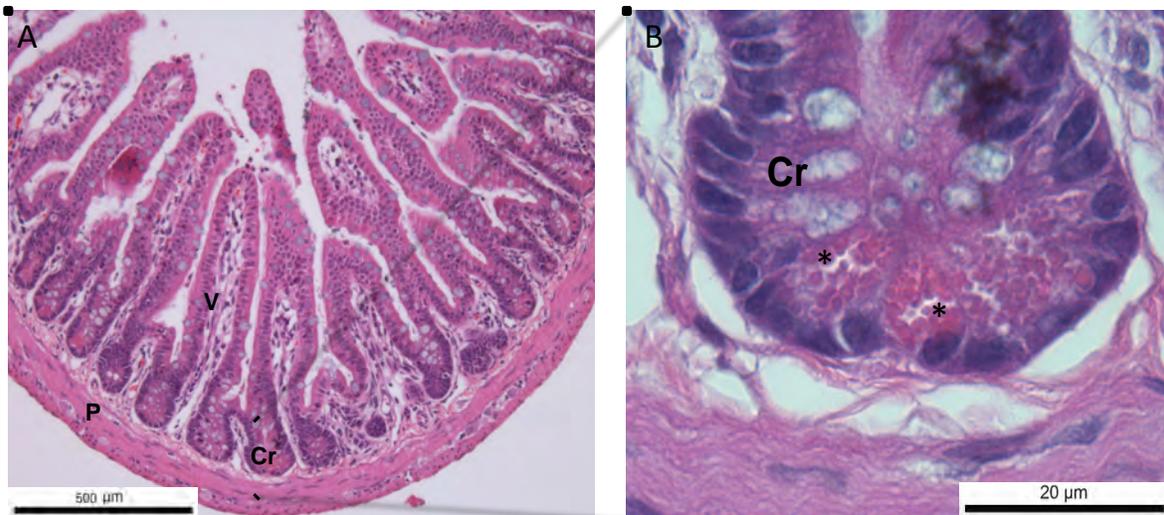


Figura 22. A: Panorámica íleon de un jervo de 10 días de edad 4x. B. Acercamiento de una cripta de Lieberkühn teñido con H-E. Pared intestinal (P), cripta (Cr), vellosidad (V), Células de Paneth (*) 100x.

C) Grupo Inoculado con Trofozoítos:

En el íleon de estos jervos predominó el acortamiento de las vellosidades y en algunos casos con pérdida de la continuidad. Se encontraron escasos trofozoítos.

En la microfotografía representativa se puede observar que las vellosidades tienen menor tamaño que las observadas en los dos grupos control (sin y con estímulo).

Fig.23.

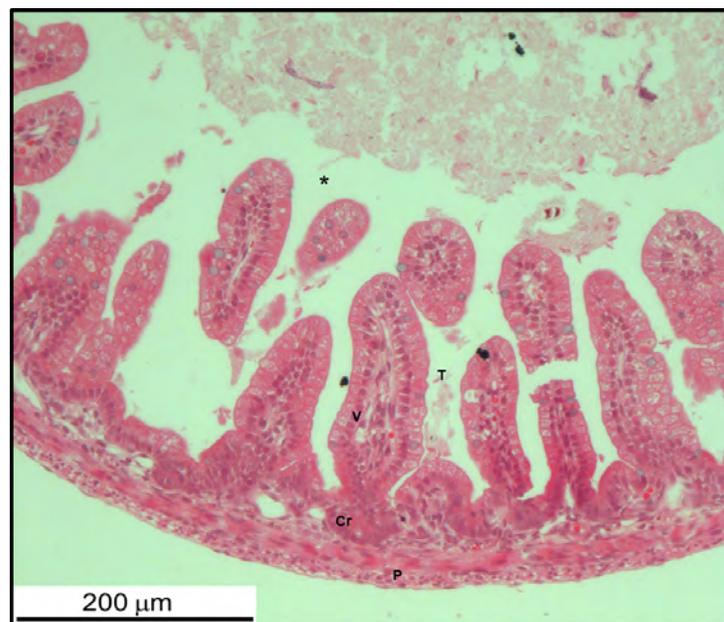


Figura 23. Panorámica de íleon de un jervo de 10 días de edad inoculado con 25, 000 trofozoítos, teñido con H-E. Pared intestinal (P), cripta (Cr), vellosidad (V), trofozoítos en la luz intestinal (T) 10x.

Longitud de las criptas y las vellosidades, promedios y análisis estadístico.

Las dimensiones de las vellosidades y de las criptas (μm) del íleon, de los jerbos de los tres grupos (control, control con PBS e infectados con trofozoítos), sacrificados a los 10 días de edad se muestran en las Tablas 19-21. Como se puede observar, la longitud de las vellosidades de los jerbos infectados con trofozoítos de *Giardia* fue menor que la encontrada en las vellosidades de ambos grupos control.

El promedio de la relación cripta/vellosidad fue: 7.85, 7.42 y 3.87 para los grupos control sin estímulo, control con estímulo, e infectados con trofozoítos, respectivamente. Tabla 22.

El análisis de los datos por ANOVA mostró diferencias significas $p < 0.0002$. Tabla 23. Las diferencias entre los grupos mediante la prueba de Tukey se muestran en la Tabla 24.

Tabla 19. Dimensiones de las criptas y vellosidades del íleon de los jerbos del Grupo Control

J1		J2		J3		J4		J5	
Criptas μm	Vellosidades μm								
24	274	30	141	20	315	17	105	17	267
28	131	53	360	28	298	22	173	22	105
38	187	27	311	29	107	22	105	32	180
29	183	29	163	22	131	15	90	15	153
20	178	18	116	18	122	24	148	24	167
30	200	18	91	21	176	20	219	20	137
31	76	26	76	30	274	18	105	18	117
23	238	22	87	21	108	18	226	18	184
32	212	25	162	26	232	25	191	25	218
27	201	38	200	28	315	17	107	17	180
30	109	40	91	21	133	25	167	25	188
36	167	12	99	22	123	21	199	21	166
26	131	28	108	31	265	13	103	13	268
24	218	24	300	25	343	26	219	26	204
11	55	20	153	24	57	18	230	18	171
35	74	23	239	21	233	19	155	19	294
24	86	30	276	21	419	20	232	20	221
31	176	28	341	34	128	23	306	23	156
21	186	25	133	23	108	15	228	15	235
33	120	24	216	23	117	15	289	15	154
P:	27.65	160.1	183.15	24.4	200.2	19.65	179.85	20.15	188.25

J1-J5: Jerbos; P: Promedio

Tabla 20. Dimensiones de las criptas y vellosidades del íleon de los jerbos del Grupo Control con PBS

J1		J2		J3		J4		J5		J6		J7	
Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades
μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm
28	135	22	195	27	138	20	233	49	429	28	96	42	88
45	161	33	156	22	228	27	317	43	234	29	546	44	295
33	83	35	275	21	118	36	238	43	249	26	265	44	274
31	64	38	273	24	212	30	129	48	104	25	177	51	293
36	289	20	157	26	237	28	117	27	217	38	118	46	223
25	149	17	198	26	165	45	160	21	236	28	123	30	316
25	285	29	203	28	101	39	248	29	197	31	116	29	404
38	77	28	102	39	176	28	119	35	217	36	143	48	226
34	91	25	206	21	223	49	194	29	236	29	149	40	295
22	186	22	179	36	148	21	200	43	197	41	548	41	287
28	157	42	314	36	173	43	150	41	509	44	279	52	266
25	104	47	102	43	321	36	198	33	316	37	174	53	280
48	106	24	195	20	171	33	197	32	271	24	188	51	237
47	145	22	173	24	111	40	175	35	369	22	142	40	358
17	124	29	77	23	240	42	136	30	553	23	216	32	131
42	170	33	103	30	151	46	104	30	195	28	176	30	159
21	152	28	110	32	266	32	324	46	397	34	243	34	289
25	154	28	184	28	243	23	206	32	139	33	263	33	119
47	166	28	245	43	267	31	184	32	311	21	103	35	316
27	139	42	289	28	250	24	222	44	269	19	268	30	301
P: 32.2	146.85	29.6	186.8	28.85	196.95	33.65	192.55	36.1	282.25	29.8	216.65	40.25	257.85

J1-J7: Jerbos; P: Promedio

Tabla 21. Dimensiones de las criptas y vellosidades del íleon de los jerbos del Grupo Infectado con 25,000 Trofozoítos de *Giardia intestinalis*

J1		J2		J3		J4		J5	
Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades
μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm
28	113	27	97	25	134	21	36	40	145
47	98	38	71	28	145	23	33	25	98
45	132	24	27	27	49	29	37	30	101
37	158	23	135	23	41	19	39	23	66
35	89	18	77	22	69	22	65	26	120
39	83	23	87	32	119	29	165	20	97
38	159	17	101	18	133	23	122	26	35
33	100	21	176	11	148	33	131	16	47
38	191	24	88	18	101	24	44	21	32
25	136	41	140	20	55	27	51	35	82
21	64	22	158	36	149	26	79	25	78
42	137	39	109	43	108	25	60	16	35
31	132	23	41	22	186	33	54	18	84
39	91	35	163	26	88	28	182	17	45
14	76	12	41	57	120	36	138	20	99
25	98	39	163	25	143	21	155	25	91
31	76	23	128	23	87	34	63	13	57
25	141	12	98	26	172	29	202	26	102
32	121	17	239	30	94	24	155	25	125
21	179	25	104	39	96	23	79	31	170
P: 32.3	118.7	25.15	112.15	27.55	111.85	26.45	94.5	23.9	85.45

J1-J5: Jerbos; P: Promedio

Tabla 22. Relación cripta: vellosidad del íleon de los jerbos de 10 días de edad y de los tres grupos

Jerbos	A)	B)	C)
1	5.79	4.56	3.67
2	6.78	6.31	4.46
3	8.20	6.83	4.06
4	9.15	5.72	3.57
5	9.34	7.82	3.58
6		7.27	
7		6.41	
Promedio	7.85	6.42	3.87

A) Grupo control; B) Grupo control con PBS y C) Grupo con trofozoítos

Tabla 23. Análisis de varianza de los tres grupos

ANOVA: K= 3 tratamientos independientes					
Fuente	Suma de cuadrados SS	Grados de libertad v	Cuadrados medios MS	F estadística	Valor P <0.05
Tratamiento	40.9931	2	20.4966	17.0515	0.0002
Error	16.8286	14	1.2020		
Total	57.8217	16			

Tabla 24. Análisis por Tukey entre los tres grupos

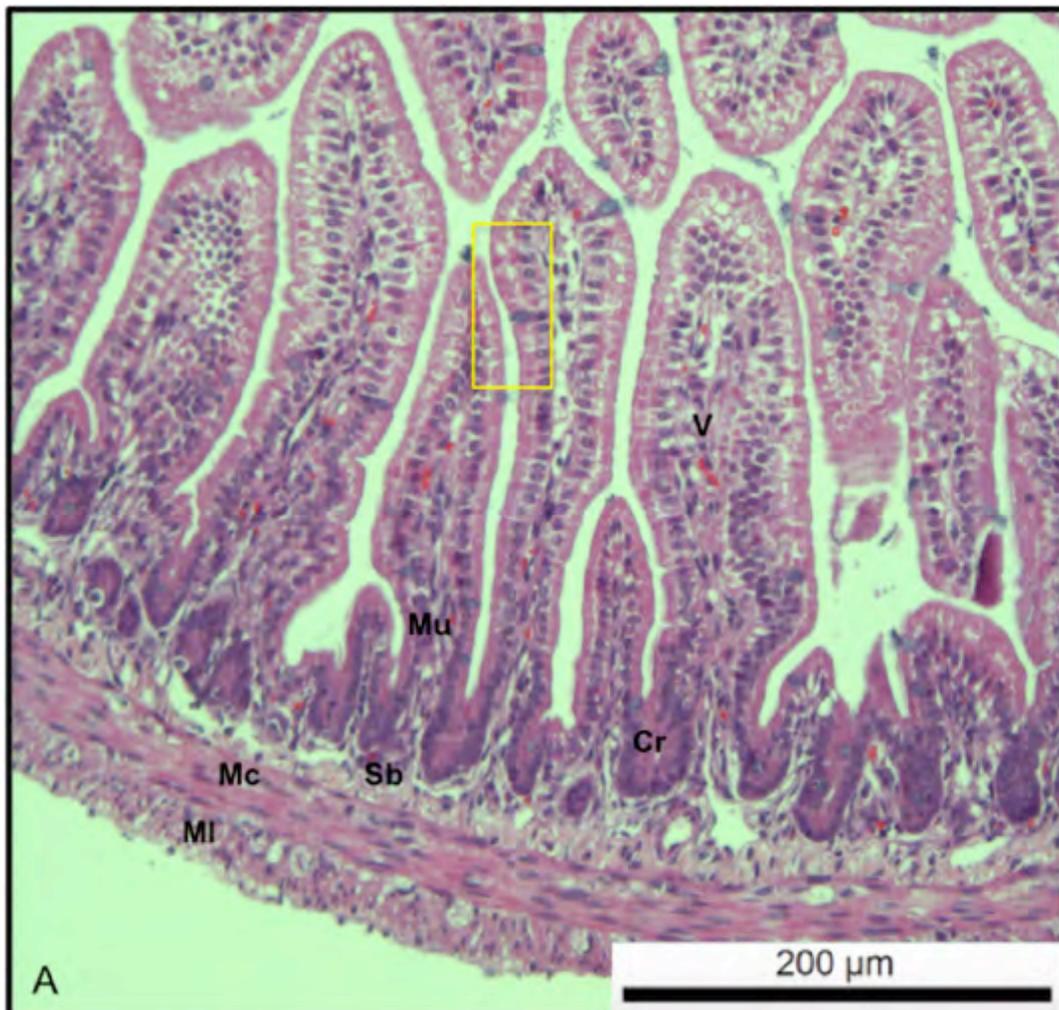
Resultados Prueba HSD Tukey			
Par de tratamientos	Q estadístico de Tukey HSD	Valor P de Tukey HSD	Interferencia de Tukey HSD
A vs B	2.2400	0.1171641	Insignificante
A vs C	5.7487	0.0002066	**p<0.01
B vs C	3.9693	0.0051045	**p<0.01

A) Control; B) Control con PBS y C) Con trofozoítos

Duodeno de jerbos de 15 días de edad.

A) Grupo Control sin Estímulo.

Hubo predominio de la arquitectura intestinal sin alteraciones aparentes. En la Fig. 24A se muestra una microfotografía representativa en donde se observa la túnica muscular, con sus porciones muscular longitudinal y muscular circular mostrando sus fibras en diferente dirección. Es muy evidente la submucosa, en la mucosa se observan las criptas de Lieberkühn y las vellosidades con su borde en cepillo. En la Fig. 24B se muestra un aumento de un segmento de la vellosidad: es evidente el epitelio simple columnar con el borde en cepillo íntegro, una célula caliciforme iniciando la expulsión de moco, tejido conectivo y el quilífero.



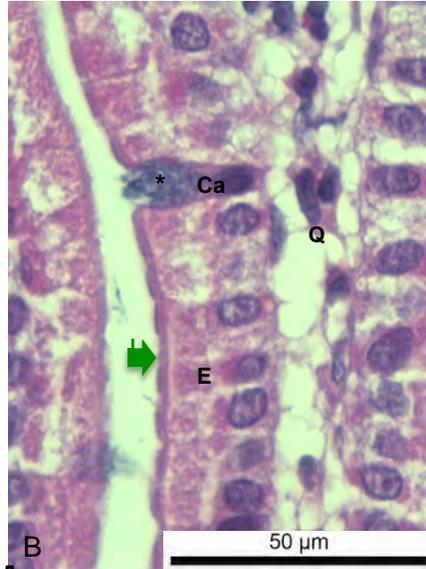


Figura 24. A: Panorámica en corte transversal del duodeno de un jerbo de 15 días de edad teñidos con H-E 10x. B: Acercamiento de la vellosidad. túnica muscular con sus porciones: Muscular circular (Mc), muscular longitudinal (MI), submucosa (Sb), mucosa (Mu), cripta (Cr), vellosidad (V), epitelio simple columnar con microvellosidades y células caliciformes intercaladas (Flecha), célula caliciforme (Ca), moco (*), enterocito (E), quilífero (Q) 40x.

B) Grupo Control con Estímulo (PBS).

Se encontró un predominio de la arquitectura intestinal sin alteraciones aparentes. En la micrografía panorámica representativa, se observa la pared intestinal íntegra, las criptas, las vellosidades y la luz intestinal. Fig. 25.



Figura 25. Vista panorámica de duodeno de un jerbo de 15 días de edad del grupo control con PBS teñido con H-E: Pared intestinal (P), cripta (Cr), vellosidad (V), luz intestinal (*) 4x.

C) Grupo Inoculado con Trofozoítos.

Se encontró un evidente acortamiento de las vellosidades con respecto a las vellosidades de los grupos control. Hubo pérdida de la continuidad y trofozoítos adheridos al epitelio o en cúmulos en la luz intestinal.

Una microfotografía representativa muestra la integridad de las tunicas muscular y submucosa. Pérdida de la continuidad epitelial y trofozoítos adheridos al epitelio o en cúmulos. Fig. 26A. En un aumento se observan los trofozoítos adheridos en el epitelio, pérdida de continuidad del epitelio y algunas células inflamatorias. Fig. 26 B y C.



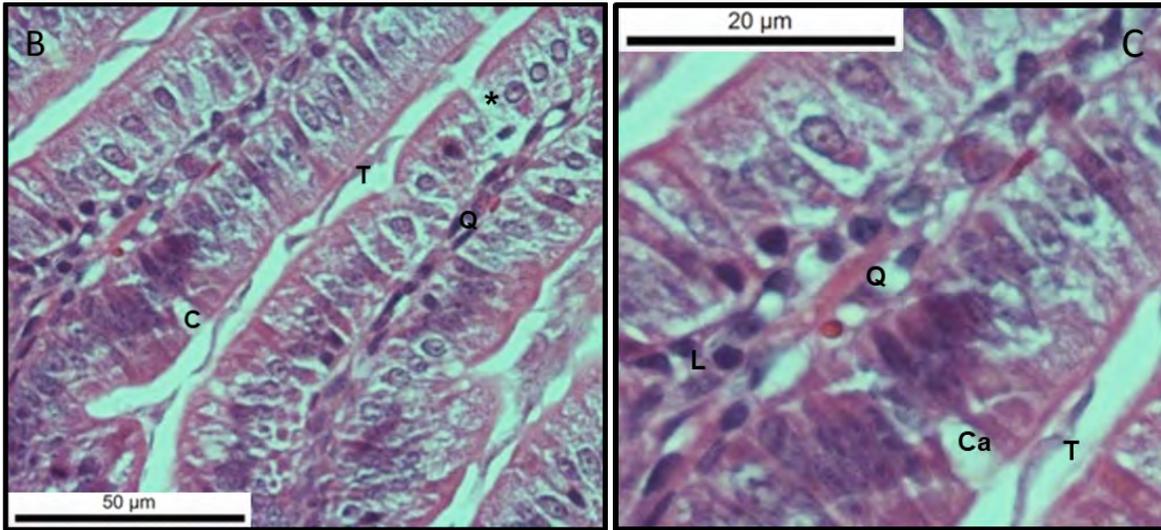


Figura 26A H-E. Microfotografía en vista panorámica del duodeno de un jervo de 10 d.p.i 10x. B (40x), C (100x): Acercamientos. Pared intestinal (P), cripta (Cr), vellosidad (V), trofozoítos (T), célula caliciforme vacía (Ca), quilífero (Q), posible pérdida de continuidad del epitelio (*), linfocito (L).

Longitud de las criptas y las vellosidades, promedios y análisis estadístico.

La longitud de las criptas y de las vellosidades (μm) del duodeno, de los jervos de los tres grupos (control, control con PBS e infectados con trofozoítos) sacrificados a los 15 días de edad se muestran en las Tablas 25-27. Como se puede observar, la longitud de las vellosidades de los jervos infectados con trofozoítos de *Giardia* fue menor que las vellosidades de ambos grupos control.

Con estos datos, se obtuvo la relación cripta/vellosidad y el promedio fue: 7.91, 8.15 y 4.04 para los grupos control sin estímulo, control con estímulo, e infectados con trofozoítos, respectivamente. Tabla 28.

El análisis de los datos por ANOVA mostró diferencias significas $p < 0.0004$. Tabla 29. Con la prueba de Tukey se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo con trofozoítos $p < 0.01$ y entre el grupo control con PBS y el grupo con trofozoítos $p < 0.01$. Tabla 30.

Tabla 25. Dimensiones de las criptas y vellosidades del duodeno de los jerbos del Grupo Control

J1		J2		J3		J4		J5	
Criptas µm	Vellosidades µm	Criptas µm	Vellosidades µm	Criptas µm	Vellosidades µm	Criptas µm	Vellosidades µm	Criptas µm	Vellosidades µm
32	204	36	204	24	144	46	146	23	124
36	341	33	196	21	102	24	226	26	263
25	117	32	185	21	178	26	237	20	120
30	427	22	158	18	171	34	288	23	135
32	151	19	233	19	171	34	234	19	140
31	120	19	424	28	152	41	302	25	139
13	163	30	262	20	128	21	107	24	196
13	155	32	212	31	149	32	296	22	280
24	114	28	181	28	134	45	216	20	126
25	418	24	585	24	209	38	141	21	201
23	270	26	199	26	168	29	234	20	147
27	122	39	296	31	137	39	125	16	106
15	466	29	213	36	95	26	136	24	194
25	227	33	324	26	198	23	310	16	186
20	393	32	173	17	105	26	107	31	294
30	191	46	129	16	181	21	164	2	133
28	427	33	130	32	223	20	298	17	193
20	140	41	138	20	195	28	391	38	215
29	242	22	160	24	197	30	272	20	163
31	446	24	137	32	223	26	226	28	115
P: 25.45	256.7	30	226.95	24.7	163	30.45	222.8	21.75	173.5

J1-J5: Jerbos; P: Promedio

Tabla 26. Dimensiones de las criptas y vellosidades del duodeno de los jerbos del Grupo Control con PBS

J1		J2		J3		J4		J5	
Criptas µm	Vellosidades µm	Criptas µm	Vellosidades µm	Criptas µm	Vellosidades µm	Criptas µm	Vellosidades µm	Criptas µm	Vellosidades µm
43	257	32	236	46	548	37	203	34	379
38	279	48	215	36	305	60	178	59	557
41	351	49	169	18	62	29	121	22	255
44	210	48	259	26	355	39	220	31	169
68	250	39	165	48	460	21	162	34	218
65	655	36	241	30	237	32	142	25	323
44	291	35	298	41	285	24	278	43	368
58	278	40	149	38	158	36	420	35	325
36	310	57	212	24	191	39	508	25	304
36	200	42	135	23	457	41	390	28	236
35	245	49	301	11	236	30	386	21	266
76	408	38	168	28	157	23	126	43	202
40	352	45	425	27	472	31	321	22	507
78	271	45	281	41	194	50	481	21	335
66	180	42	180	39	352	18	104	21	203
52	733	20	140	36	472	31	321	30	280
62	128	47	309	33	705	33	257	33	325
58	192	46	358	19	645	35	469	24	172
66	206	45	564	28	461	31	381	45	196
53	253	59	362	16	114	45	320	38	275
P: 52.95	302.45	43.1	258.35	30.4	343.3	34.25	289.4	31.7	294.75

J1-J5: Jerbos; P: Promedio

Tabla 27. Dimensiones de las criptas y vellosidades del duodeno de los jerbos del Grupo Infectado con 25,000 Trofozoítos de *G. intestinalis*

J1		J2		J3		J4		J5		J6		J7	
Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades
μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm
24	109	33	106	60	118	28	70	38	48	38	61	30	213
31	68	36	291	26	194	26	73	48	253	30	139	70	99
20	134	48	206	43	173	22	80	56	170	30	126	42	173
25	104	49	106	36	256	20	81	43	235	45	271	37	54
13	173	24	205	67	87	19	60	40	91	36	323	31	87
20	90	28	147	31	122	21	159	46	152	48	97	36	133
36	107	44	233	23	94	26	149	33	78	41	268	17	96
53	174	53	115	33	175	21	88	41	120	42	112	37	148
20	82	44	148	60	186	20	191	51	120	43	220	44	237
22	193	40	95	30	131	22	197	27	95	39	120	37	270
21	158	26	96	20	208	25	136	36	145	33	143	20	253
19	50	46	131	42	165	19	84	42	129	34	112	43	113
36	74	39	138	53	109	26	154	42	66	28	158	34	71
30	131	41	167	59	187	25	95	66	173	44	253	40	135
20	93	41	210	45	179	22	81	71	203	41	63	60	185
28	129	39	212	62	183	30	194	39	215	40	82	23	198
13	176	57	151	51	188	33	95	52	82	41	251	42	178
19	179	32	71	21	143	40	125	63	218	63	132	42	108
19	118	61	185	33	89	33	107	56	123	47	129	30	152
23	282	83	162	38	183	28	86	48	167	58	148	38	64
P: 24.6	131.2	43.2	158.75	41.65	158.5	25.3	115.25	46.9	144.15	41.05	160.4	37.65	148.35

J1-J7: Jerbos; P: Promedio

Tabla 28. Relación cripta: vellosidad del duodeno de los jerbos de 15 días de edad y de los tres grupos

Jerbos	A)	B)	C)
1	10.09	5.71	5.33
2	7.57	5.99	3.67
3	6.60	11.29	3.81
4	7.32	8.45	4.56
5	7.98	9.30	3.07
6			3.91
7			3.94
Promedio	7.91	8.15	4.04

A) Grupo control; B) grupo control con PBS y C) con trofozoítos

Tabla 29. Análisis de varianza de los tres grupos

ANOVA: K= 3 tratamientos independientes					
Fuente	Suma de cuadrados SS	Grados de libertad v	Cuadrados medios MS	F estadística	Valor P <0.05
Tratamiento	65.6216	2	32.8180	14.4028	0.0004
Error	31.8933	14	2.2781		
Total	97.5149	16			

Tabla 30. Análisis por Tukey entre los tres grupos

Resultados Prueba HSD Tukey			
Par de tratamientos	Q estadístico de Tukey HSD	Valor P de Tukey HSD	Interferencia de Tukey HSD
A vs B	0.3564	0.8999947	Insignificante
A vs C	6.1885	0.0017082	**p<0.01
B vs C	6.5736	0.0010227	**p<0.01

A) Grupo control; B) grupo control con PBS y C) con trofozoítos

Yeyuno de jerbos de 15 días de edad.

A) Grupo Control sin Estímulo

Se encontró integridad de la mucosa, la submucosa, muscular y serosa.

Una micrografía representativa, con una vista panorámica, muestra la pared intestinal la longitud de las vellosidades y las criptas. Fig. 27.



Figura 27. H-E. Corte transversal del yeyuno de un jerbo de 15 días de edad del grupo control: Pared intestinal (P), cripta (Cr), vellosidad (V), luz intestinal (*) 4x.

B) Grupo Control con Estímulo

Prevaleció la integridad de la mucosa, la submucosa, muscular y serosa.

Se muestra en una vista panorámica el yeyuno de un jerbo de 15 días de edad, se muestra la longitud de las vellosidades, las criptas, el quilífero, la pared intestinal y gran cantidad de células caliciformes. Fig. 28.



Figura 28. H-E. Panorámica de yeyuno de un jerbo de 15 días de edad del grupo control con PBS: Pared intestinal (P), cripta (Cr), vellosidad (V), quilífero (Q), luz intestinal (*) 10x.

C) Grupo Inoculado con Trofozoítos:

Se encontró acortamiento de las vellosidades, con respecto a las vellosidades de los 2 grupos control. Trofozoítos adheridos al epitelio en menor cantidad que en duodeno.

Microfotografía representativa muestra el acortamiento de las vellosidades en relación con los otros dos grupos. Fig. 29.

En la Fig. 30A. se observa la pared intestinal, un vaso sanguíneo y varias “donas” (cortes transversales de las vellosidades) con el estroma y enterocitos sin daño aparente. En un acercamiento se observa el vaso sanguíneo, en un corte longitudinal, lleno de eritrocitos y un linfocito. Fig. 30B. En la luz intestinal los trofozoítos.



Figura 29. H-E. Corte transversal del yeyuno de un jerbo de 15 días de edad inoculado con 25, 000 trofozoítos. Pared intestinal (P), cripta (Cr), vellosidad (V), trofozoítos (T) luz intestinal (*) 4x.

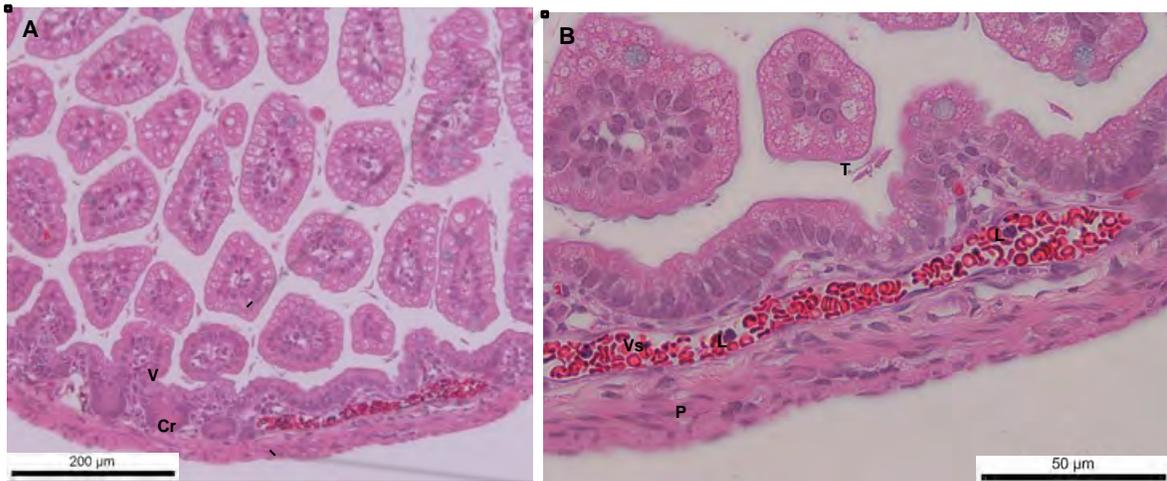


Figura 30. H-E. Microfotografías de yeyuno de jerbo de 15 días de edad inoculado con 25, 000 trofozoítos. Panorámica (A) 10x y acercamiento (B): vellosidad (V), Cripta (Cr), trofozoítos (T), pared intestinal (P), vaso sanguíneo en corte transversal (Vs), posibles linfocitos (L) 40x.

Longitud de las criptas y las vellosidades, promedios y análisis estadístico.

La longitud de las criptas y de las vellosidades (μm) del yeyuno, de los jerbos de los tres grupos (control, control con PBS e infectados con trofozoítos) sacrificados a los 15 días de edad se muestran en las Tablas 31-33. Como se puede observar, la longitud de las vellosidades de los jerbos infectados con trofozoítos de *Giardia* fue menor que las vellosidades de ambos grupos control.

Con estos datos, se obtuvo la relación cripta/vellosidad y el promedio fue: 9.37, 7.71 y 4.05 para los grupos control sin estímulo, control con estímulo, e infectados con trofozoítos, respectivamente. Tabla 34.

El análisis de los datos por ANOVA mostró diferencias significativas $p < 3.2334e-05$. Tabla 33. Con la prueba de Tukey se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo con trofozoítos $p < 0.01$ y entre el grupo control con PBS y el grupo con trofozoítos $p < 0.01$. Tabla 36.

Tabla 31. Dimensiones de las criptas y vellosidades del yeyuno de los jerbos del Grupo Control

J1		J2		J3		J4		J5	
Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades
μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm
35	236	19	232	22	188	24	125	29	216
33	404	22	146	23	133	30	171	20	202
30	299	25	214	18	137	26	130	28	115
33	739	26	257	15	305	32	247	29	178
53	720	34	268	20	294	25	142	26	297
31	227	24	262	31	208	31	178	20	288
35	157	24	226	18	108	32	232	27	424
39	249	38	119	26	110	29	122	18	312
25	387	21	262	19	127	27	107	20	391
33	438	19	120	17	175	20	158	19	395
22	309	37	266	28	191	21	244	30	255
36	547	38	343	17	119	38	207	23	103
35	147	35	265	24	288	28	200	16	179
41	424	21	307	27	110	21	149	32	373
39	391	28	108	21	183	20	180	17	136
20	291	36	240	14	187	33	117	19	257
38	339	22	134	27	355	30	185	14	298
26	121	25	227	27	301	45	166	20	125
32	187	18	289	23	188	31	156	20	510
47	295	23	295	22	133	20	198	24	372
P: 34.15	345.35	26.75	229	21.95	192	28.15	170.7	22.55	271.3

J1-J5: Jerbos; P: Promedio

Tabla 32. Dimensiones de las criptas y vellosidades del yeyuno de los jerbos del Grupo Control con PBS

J1		J2		J3		J4		J5	
Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades
μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm
58	199	31	145	36	167	43	165	28	143
51	188	32	238	23	264	42	237	21	174
47	124	25	102	30	152	27	191	25	117
49	210	28	350	29	303	24	115	14	127
55	248	28	320	26	249	25	113	26	115
58	259	27	345	29	172	22	287	23	157
28	210	37	432	32	432	18	108	24	186
36	315	27	305	26	409	18	144	22	195
27	356	39	199	43	395	38	438	18	212
32	707	49	567	37	214	34	219	38	102
30	667	33	408	18	320	40	129	34	189
54	515	24	330	26	332	43	105	24	112
30	413	27	157	34	127	44	303	24	200
65	203	25	119	41	275	24	169	16	309
46	227	34	215	37	201	38	393	27	157
56	601	35	535	25	159	48	263	18	126
52	460	47	310	38	218	57	183	32	436
53	558	27	252	38	275	17	137	34	183
45	172	37	199	34	298	27	375	28	317
47	309	39	159	39	292	37	153	28	342
P: 45.95	347.05	32.55	284.35	32.05	262.7	33.3	211.35	25.2	194.95

J1-J5: Jerbos; P: Promedio

Tabla 33. Dimensiones de las criptas y vellosidades del yeyuno de los jerbos del Grupo Infectado con 25,000 Trofozoítos de *Giardia intestinalis*

J1		J2		J3		J4		J5		J6		J7	
Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades
μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm
15	76	41	181	88	131	44	153	35	81	42	215	24	43
18	51	41	160	74	205	33	70	40	77	35	88	23	143
31	118	46	167	41	113	35	137	35	63	38	178	28	46
52	215	62	65	39	81	30	117	42	195	44	207	44	213
29	52	37	149	26	259	45	89	37	150	46	466	27	138
20	276	45	138	25	265	39	290	27	155	46	90	37	87
20	75	46	119	43	252	39	139	41	97	42	128	23	138
23	297	57	129	66	156	29	273	46	175	50	117	32	159
21	73	41	140	29	89	32	271	36	189	35	183	24	213
18	134	55	161	28	104	33	150	25	86	44	225	37	141
33	216	38	125	34	172	35	100	42	191	47	95	37	143
22	141	33	180	30	66	23	91	37	73	46	148	27	150
27	94	30	184	26	70	38	194	36	115	34	188	52	235
26	135	40	171	35	52	39	165	35	220	40	134	18	147
20	91	47	148	20	98	33	246	45	130	49	125	47	171
17	63	51	108	33	117	24	134	45	215	31	132	27	90
29	188	58	132	29	153	35	126	33	140	33	235	20	101
17	66	32	84	51	173	42	61	37	133	56	95	18	160
19	139	32	63	25	199	28	87	42	90	48	142	22	71
18	126	39	114	42	127	45	114	37	85	46	66	46	107
P: 23.75	131.3	43.55	135.9	39.2	144.1	35.05	150.35	37.65	133	42.6	162.85	30.65	134.8

J1-J7: Jerbos; P: Promedio

Tabla 34. Relación cripta: vellosidad del yeyuno de los jerbos de 15 días de edad y de los tres grupos

Jerbos	A)	B)	C)
1	10.11	7.55	5.53
2	8.56	8.74	3.12
3	10.09	8.20	3.68
4	6.06	6.35	4.29
5	12.03	7.74	3.53
6			3.82
7			4.40
Promedio	9.37	7.71	4.05

A) Control; B) Control con PBS y C) Con trofozoítos

Tabla 35. Análisis de varianza de los tres grupos

ANOVA: K= 3 tratamientos independientes					
Fuente	Suma de cuadrados SS	Grados de libertad v	Cuadrados medios MS	F estadística	Valor P <0.05
Tratamiento	89.8663	2	44.9332	23.6602	3.2334e-05
Error	26.5875	14	1.8991		
Total	116.4538	16			

Tabla 36. Análisis por Tukey entre los tres grupos

Resultados Prueba HSD Tukey			
Par de tratamientos	Q estadístico de Tukey HSD	Valor P de Tukey HSD	Interferencia de Tukey HSD
A vs B	2.6890	0.1747615	Insignificante
A vs C	9.3209	0.0010053	**p<0.01
B vs C	6.4164	0.0012599	**p<0.01

A) Control; B) Control con PBS y C) Con trofozoítos

Íleon de jerbos de 15 días de edad

Se observan las diferencias del íleon entre el grupo control, estrés y el inoculado con 25, 000 trofozoítos en vistas panorámicas en la longitud de las vellosidades, ya que en el grupo infectado, hay un acortamiento de las mismas. Se demuestra la histología normal y la histopatología provocada por *Giardia*.

A) Grupo Control sin Estímulo

Predominaron las vellosidades digitiformes largas.

Una microfotografía de referencia muestra la pared intestinal, las criptas y las vellosidades largas y digitiformes. Fig. 31.

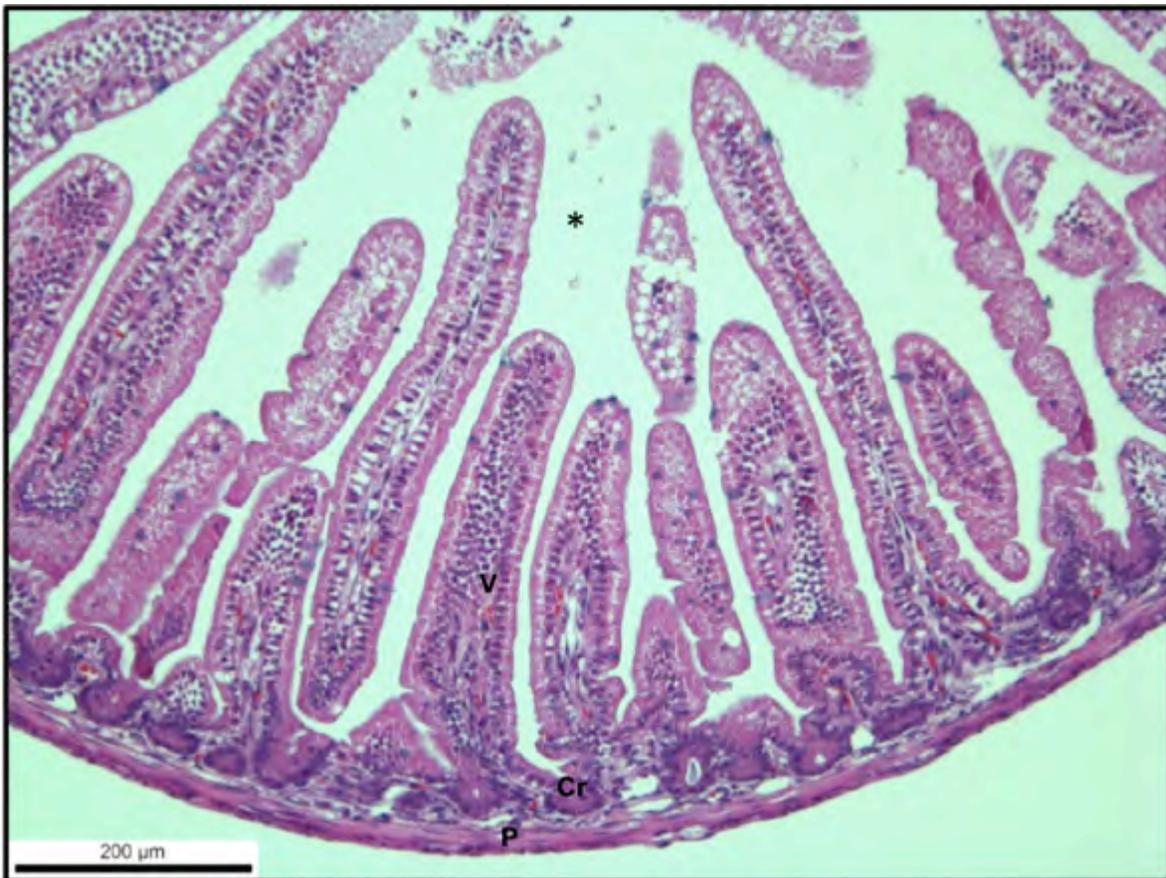


Figura 31 H-E. Panorámica de íleon de un jervo de 15 días de edad del grupo control: Pared intestinal (P), cripta (Cr), vellosidad (V), luz intestinal (*)10x.

B) Grupo Control con Estímulo

Predominaron las vellosidades y las criptas sin alteraciones aparentes.

En una microfotografía representativa, se muestra una región con Placas de Peyer ó nódulos linfoides. Fig. 32.



Figura 32 H-E. Íleon de jerbo de 15 días de edad con PBS, Placas de Peyer (LQ) 10x.

C) Grupo Inoculado con Trofozoítos:

Se encontraron vellosidades de menor tamaño que las observadas en los grupos de control.

En una microfotografía de referencia se muestra la pared intestinal, las criptas y las vellosidades con abundantes células caliciformes. Trofozoítos adheridos al epitelio y en la luz intestinal Fig. 33.



Figura 33 H-E, 10x. Panorámica de íleon de jerbo de 15 días de edad inoculado con 25, 000 trofozoítos. Pared intestinal (P), cripta (Cr), vellosidad (V), trofozoítos (T), luz intestinal (*).

Longitud de las criptas y vellosidades, promedios y análisis estadístico.

La longitud de las vellosidades y de las criptas (μm) del íleon, de los jerbos de los tres grupos (control, control con PBS e infectados con trofozoítos) sacrificados a los 15 días de edad se muestran en las Tablas 37-39. Como se puede observar, el tamaño de las vellosidades de los jerbos infectados con trofozoítos de *Giardia* fue menor que el registrado de las vellosidades de ambos grupos control.

La relación cripta/vellosidad arrojó un promedio de: 8.71, 6.94 y 3.08 para los grupos control sin estímulo, control con estímulo, e infectados con trofozoítos, respectivamente. Tabla 40.

El análisis de los datos por ANOVA mostró diferencias significas $p < 3.7927\text{e-}05$. Tabla 41. Con la prueba de Tukey se encontraron diferencias significativas entre el

grupo control y el grupo con trofozoítos $p < 0.01$ y entre el grupo control con PBS y el grupo con trofozoítos $p < 0.01$. Tabla 42.

Tabla 37. Dimensiones de las criptas y vellosidades del yeyuno de los jerbos del Grupo Control

J1		J2		J3		J4		J5		
Criptas μm	Vellosidades μm									
19	126	22	267	28	155	23	115	30	288	
26	106	24	288	19	135	20	72	36	212	
36	96	24	100	27	259	27	174	34	198	
29	225	22	198	25	182	26	234	27	364	
29	113	15	204	38	173	21	612	28	80	
37	290	14	196	30	183	21	128	28	118	
18	204	40	134	33	190	19	123	25	222	
28	102	33	303	24	304	20	55	28	500	
16	191	28	222	26	381	26	86	22	443	
20	101	29	234	23	193	23	62	26	406	
22	202	21	171	22	128	17	324	24	50	
27	209	15	163	34	140	17	196	20	129	
25	201	15	290	21	181	25	228	22	451	
26	130	20	126	25	156	19	100	15	236	
15	227	19	280	27	320	18	67	18	334	
22	171	15	156	24	318	21	148	20	193	
27	121	18	288	30	91	15	67	23	139	
29	278	26	216	19	97	18	247	23	200	
39	168	24	192	23	456	15	98	13	120	
37	304	31	262	19	550	27	493	22	168	
P:	26.35	178.25	22.75	214.5	25.85	229.6	20.9	181.45	24.2	237.15

J1-J5: Jerbos; P: Promedio

Tabla 38. Dimensiones de las criptas y vellosidades del yeyuno de los jerbos del Grupo Control con PBS

J1		J2		J3		J4		J5		
Criptas μm	Vellosidades μm									
47	166	22	106	34	231	18	239	28	124	
43	198	23	150	36	119	36	120	29	114	
43	242	27	105	30	372	23	107	31	154	
41	140	27	126	21	85	16	116	22	132	
36	230	22	110	21	87	21	117	29	102	
46	121	32	143	21	107	24	100	20	152	
33	210	42	147	30	412	27	279	12	208	
51	150	53	245	24	184	8	105	38	196	
43	242	51	182	19	153	21	157	24	152	
33	218	25	251	24	128	17	288	19	100	
37	259	25	220	24	155	24	174	29	133	
33	199	21	228	21	146	17	197	33	178	
34	244	23	157	24	148	23	176	24	175	
42	230	29	233	29	165	28	428	25	113	
40	297	20	188	27	138	19	261	20	159	
48	261	26	268	25	257	31	403	18	113	
53	232	27	227	31	122	23	250	28	279	
60	256	22	203	22	409	23	267	24	228	
62	229	27	261	26	193	21	222	20	214	
53	251	39	248	23	119	28	238	25	182	
P:	43.9	218.75	29.15	189.9	25.6	186.5	22.4	212.2	24.9	160.4

J1-J5: Jerbos; P: Promedio

Tabla 39. Dimensiones de las criptas y vellosidades del yeyuno de los jerbos del Grupo Infectado con 25,000 trofozoítos de *Giardia intestinalis*

J1		J2		J3		J4		J5		J6	
Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades	Criptas	Vellosidades
μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm	μm
38	79	27	144	35	133	14	87	50	101	31	125
41	154	32	104	36	45	24	243	48	112	56	152
18	177	32	153	36	113	23	76	78	69	18	122
30	132	47	81	56	129	33	85	50	111	43	99
34	78	33	76	27	170	19	138	28	77	36	195
25	93	31	75	40	170	28	173	36	163	36	103
26	87	23	143	31	174	29	168	35	195	33	88
26	93	26	113	32	206	28	151	29	95	41	151
26	57	23	114	24	178	21	60	37	132	33	143
22	140	42	85	55	86	24	72	52	245	31	46
29	253	43	60	50	136	23	72	29	213	26	144
27	142	27	92	17	146	20	66	73	59	37	97
25	128	24	54	28	97	24	171	64	70	33	237
33	140	34	135	23	170	23	143	72	77	18	71
21	50	46	67	51	79	32	85	42	74	33	138
32	81	34	91	24	91	16	93	62	78	27	147
36	166	38	70	24	73	19	68	55	86	53	160
39	84	36	148	35	86	27	240	57	82	62	212
40	83	30	109	25	87	24	49	40	208	43	162
36	37	27	79	27	42	16	91	54	209	30	85
P: 30.2	112.7	32.75	99.65	33.8	120.55	23.35	116.55	49.55	122.8	36	133.85

J1-J6: Jerbos; P: Promedio

Tabla 40. Relación cripta: vellosidad del ileon de los jerbos de 15 días de edad y de los tres grupos

Jerbos	A)	B)	C)
1	6.76	4.98	3.73
2	9.43	6.51	3.04
3	8.88	7.29	3.57
4	8.68	9.47	4.99
5	9.80	6.44	2.48
6			3.72
7			
Promedio	8.71	6.94	3.58

A) Control; B) Control con PBS y C) Con trofozoítos

Tabla 41. Análisis de varianza de los tres grupos

ANOVA: K=3 tratamientos independientes					
Fuente	Suma de cuadrados SS	Grados de libertad v	Cuadrados medios MS	F estadística	Valor P <0.05
Tratamiento	75.1282	2	37.5641	24.5762	3.8296e-05
Error	19.8702	13	1.5285		
Total	94.9984	15			

Tabla 42. Análisis por Tukey entre los tres grupos

Resultados Prueba HSD Tukey			
Par de tratamientos	Q estadístico de Tukey HSD	Valor P de Tukey HSD	Interferencia de Tukey HSD
A vs B	3.2049	0.0967194	Insignificante
A vs C	9.6752	0.0010053	**p<0.01
B vs C	6.3278	0.0016797	**p<0.01

A) Control; B) Control con PBS y C) Con trofozoítos

9.2.2 Tinción con PAS

Duodeno de jerbos de 10 días de edad

A) Grupo Control sin Estímulo.

Se observó la histología intestinal integra; las tunicas mucosa, submucosa, muscular y serosa sin alteraciones aparentes. Las células caliciformes teñidas de color rojo y distribuidas desde las criptas hasta el ápice de las vellosidades.

En la microfotografía representativa se observa la pared intestinal, la muscular y la serosa. Las células caliciformes teñidas de color rojo localizadas en las criptas de Lieberkühn y en las vellosidades. Fig. 34

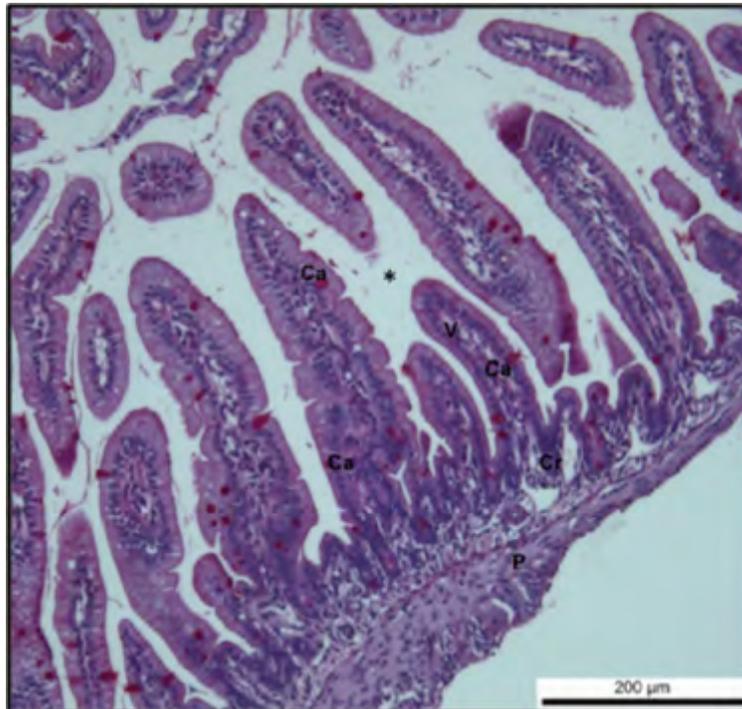


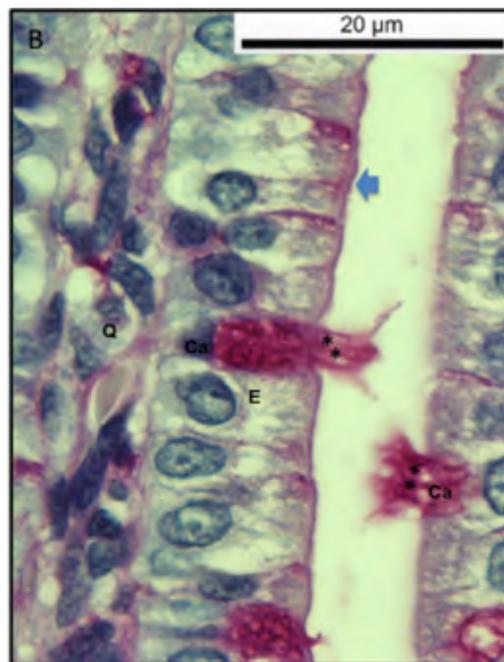
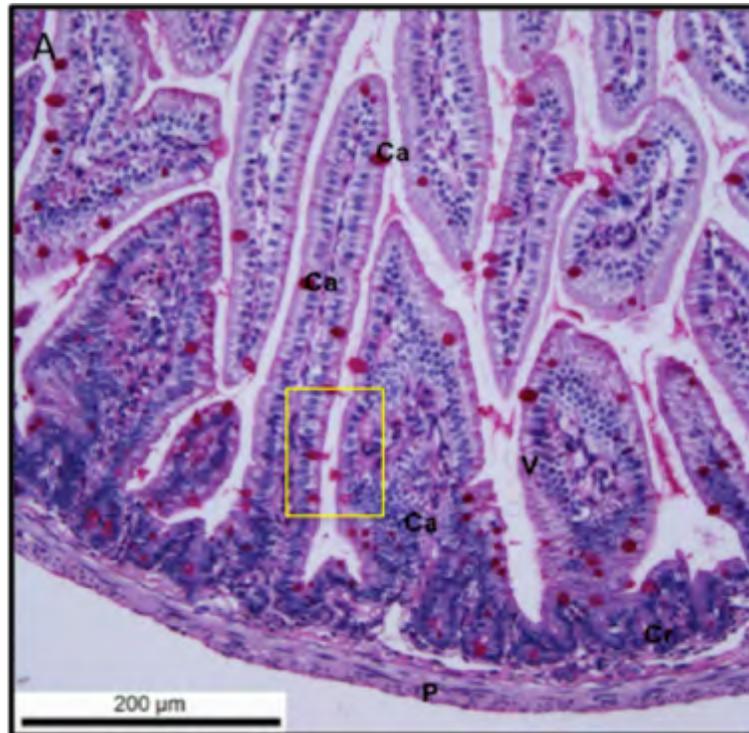
Figura 34. PAS. Vista panorámica del duodeno de un jervo de 10 días de edad. Pared intestinal (P), vellosidad (V), cripta (Cr), células caliciformes (Ca), luz intestinal (*) 10x.

B) Grupo Control con Estímulo

Las vellosidades y las criptas sin alteraciones aparentes.

En la Fig. 35A se muestra una microfotografía panorámica representativa, en donde se observa la pared intestinal, las criptas, y las células caliciformes en las vellosidades. En un acercamiento se observa a las células caliciformes expulsando

moco Fig. 35B; dada la tinción de PAS, el moco corresponde a mucopolisacáridos neutros y glicoproteínas. También se muestran las microvellosidades intestinales (borde de cepillo) y el quilífero entre las dos columnas de enterocitos.



PAS. Fig. 35A. Panorámica de un jerbo de 10 días de edad 10x. B: Acercamiento. Pared intestinal (P), cripta (Cr), vellosidad (V), células caliciformes (Ca), quilífero (Q), enterocito (E), moco (**), microvellosidades intestinales (Flecha) 100x.

C) Grupo Inoculado con Trofozoítos

La pared intestinal y las tunicas con arquitectura íntegra. En la luz intestinal se encontraron cúmulos de trofozoítos de *Giardia*, también se localizaron adheridos al borde en cepillo. Se apreció un mayor número de células caliciformes, comparado con los grupos control. No se encontró infiltrado inflamatorio.

En una microfotografía representativa, se observan los cúmulos de trofozoítos de *Giardia* en la luz intestinal y adheridos al borde en cepillo. En algunas células caliciformes se aprecia el cáliz basófilo (color azul) y en la mitad superior más globosa se observan los gránulos de mucina de color rojo intenso. Algunas células caliciformes en formación, otras completamente maduras y varias secretando moco. Fig. 36.

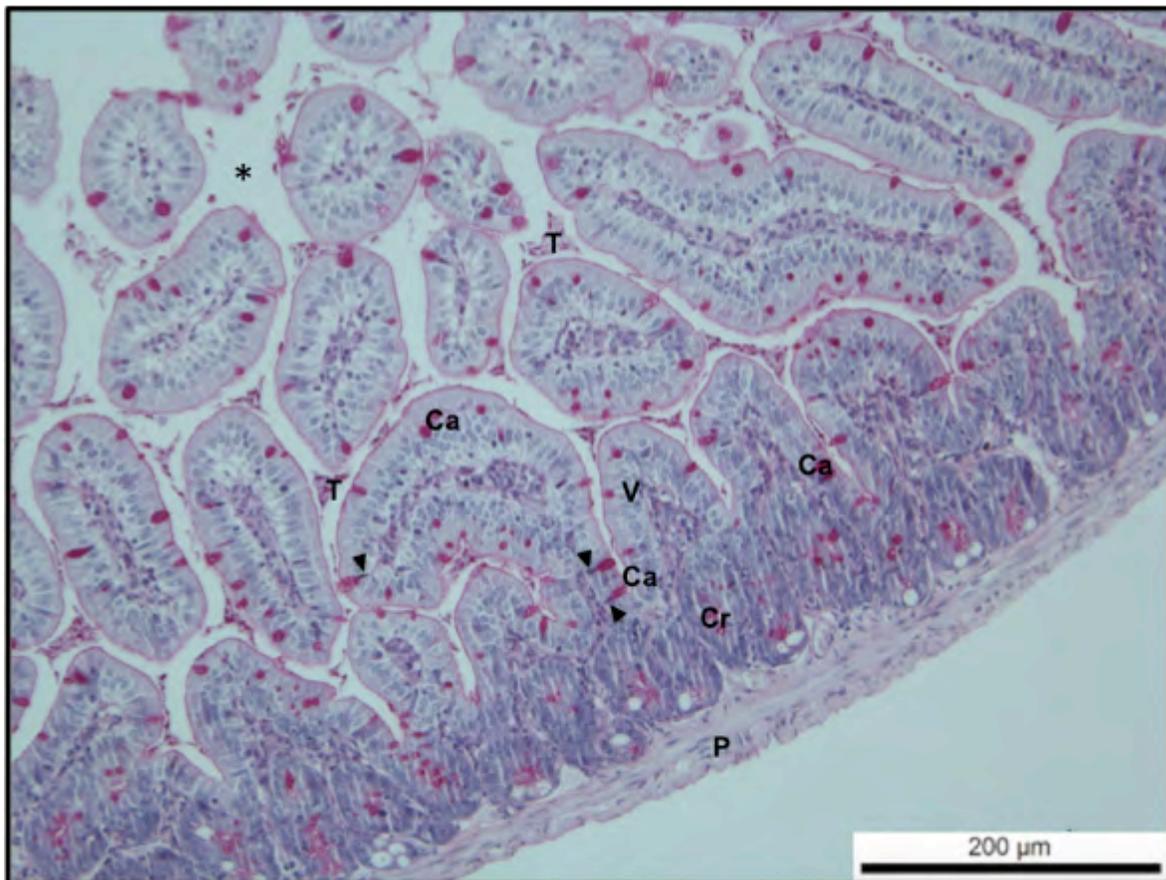


Figura. 36. PAS. Vista panorámica de duodeno de un jervo de 5 d.p.i. P: pared intestinal Vellosidad (V), cripta (Cr), célula caliciforme (Ca), núcleo de células caliciformes (Cabeza de flecha), luz intestinal (*), trofozoítos (T) 10x.

Cuantificación de células caliciformes por densidad en μm^2 promedios y análisis estadístico.

El promedio de células caliciformes en 100,000 μm^2 de cada uno de los jerbos de los tres grupos fue: grupos control sin estímulo 47.4, control con estímulo 49.14, e infectados con trofozoítos de *Giardia* 66.8. Tabla 43.

Para determinar si había diferencias significativas en los resultados obtenidos decidimos analizarlos por ANOVA y ésta arrojó una $p < 0.0230$. Tabla 44.

Dado que el ANOVA dio datos de significancia, entonces se realizó la Prueba de Tukey para demostrar las diferencias entre los grupos. Se encontró diferencia significativa entre el grupo control y el grupo con trofozoítos ($p < 0.05$) y entre el grupo control con PBS y el grupo con trofozoítos ($p < 0.05$). Tabla 45.

Tabla 43. Promedio del conteo de células caliciformes de las mediciones por densidad en μm^2

Jerbos	A)	B)	C)
1	55	51	69
2	52	45	68
3	39	50	58
4	55	58	58
5	36	55	81
6		23	
7		62	
Promedio	47.4	49.14	66.8

A) Grupo control; B) grupo control con PBS y C) con trofozoítos

Tabla 44. Análisis de varianza de los tres grupos

ANOVA: K= 3 tratamientos independientes					
Fuente	Suma de cuadrados SS	Grados de libertad v	Cuadrados medios MS	F estadística	Valor P <0.05
Tratamiento	1,201.6134	2	600.8067	4.9982	0.0230
Error	1,682.8571	14	120.2041		
Total	2,884.4706	16			

Tabla 45. Análisis de los datos con la prueba de Tukey

Resultados Prueba HSD Tukey			
Par de tratamientos	Q estadístico de Tukey HSD	Valor P de Tukey HSD	Interferencia de Tukey HSD
A vs B	0.3839	0.8999947	Insignificante
A vs C	3.9566	0.0356123	** $p < 0.05$
B vs C	3.8897	0.0389280	** $p < 0.05$

A) Grupo control; B) grupo control con PBS y C) con trofozoítos

Yeyuno de jerbos de 10 días de edad

A) Grupo Control sin Estímulo

Las tunicas mucosa, submucosa, muscular y serosa sin alteraciones, las células caliciformes bien definidas, de color rojo.

Una representación de lo observado se muestra en la Fig. 37. En la microfotografía panorámica del yeyuno en corte transversal, se muestra la pared intestinal, vellosidades y criptas. Se observan las células caliciformes de color rojo intenso, que contrastan con los enterocitos; algunas células caliciformes están secretando moco.



Figura 37. PAS. Panorámica de yeyuno de un jervo de 10 días de edad. Pared intestinal (P), vellosidad (V), cripta (Cr), células caliciformes (Ca) 10x.

B) Grupo Control con Estímulo

La pared intestinal y el epitelio con aparente integridad; se observó una mayor cantidad de células caliciformes con respecto al grupo control sin estímulo. En la microfotografía representativa se observan las vellosidades y las células caliciformes teñidas de un tono rojo. Fig.38

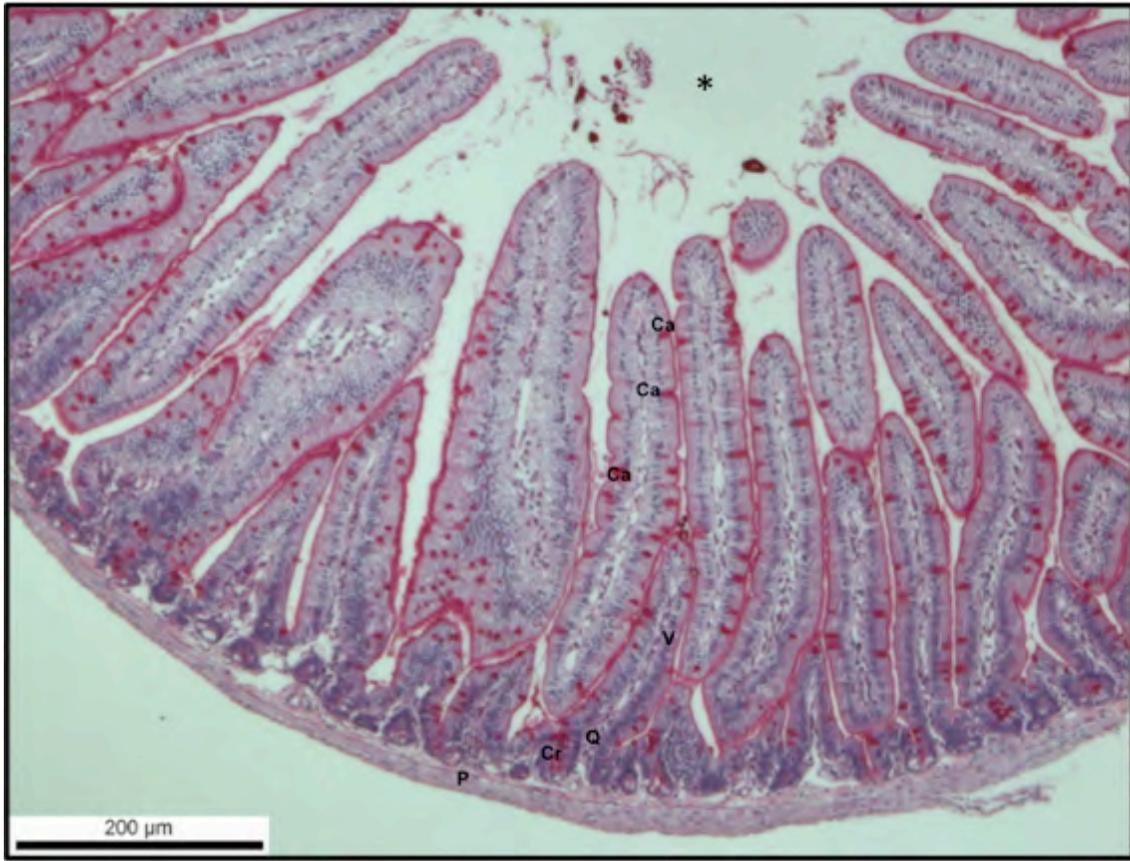


Figura 38. PAS. Panorámica de yeyuno de un jerbo de 10 días de edad. Pared intestinal (P), vellosidad (V), cripta (Cr), célula caliciforme (Ca), luz intestinal (*) 10x.

C) Grupo inoculado con trofozoítos

Se observaron cúmulos de trofozoítos en la luz intestinal y formando hileras en estrecho contacto con el borde en cepillo. Las células caliciformes de color rojo intenso. La pared intestinal con sus tunicas serosa, muscular y submucosa íntegras y sin ninguna alteración aparente.

En la microfotografía representativa se observan trofozoítos formando colonias en la luz intestinal, y en hileras sobre el borde en cepillo en diferentes vellosidades. Las células caliciformes muy evidentes y distribuidas en las vellosidades, así mismo en la mayoría de las vellosidades fue visible el quilífero. Fig. 39.

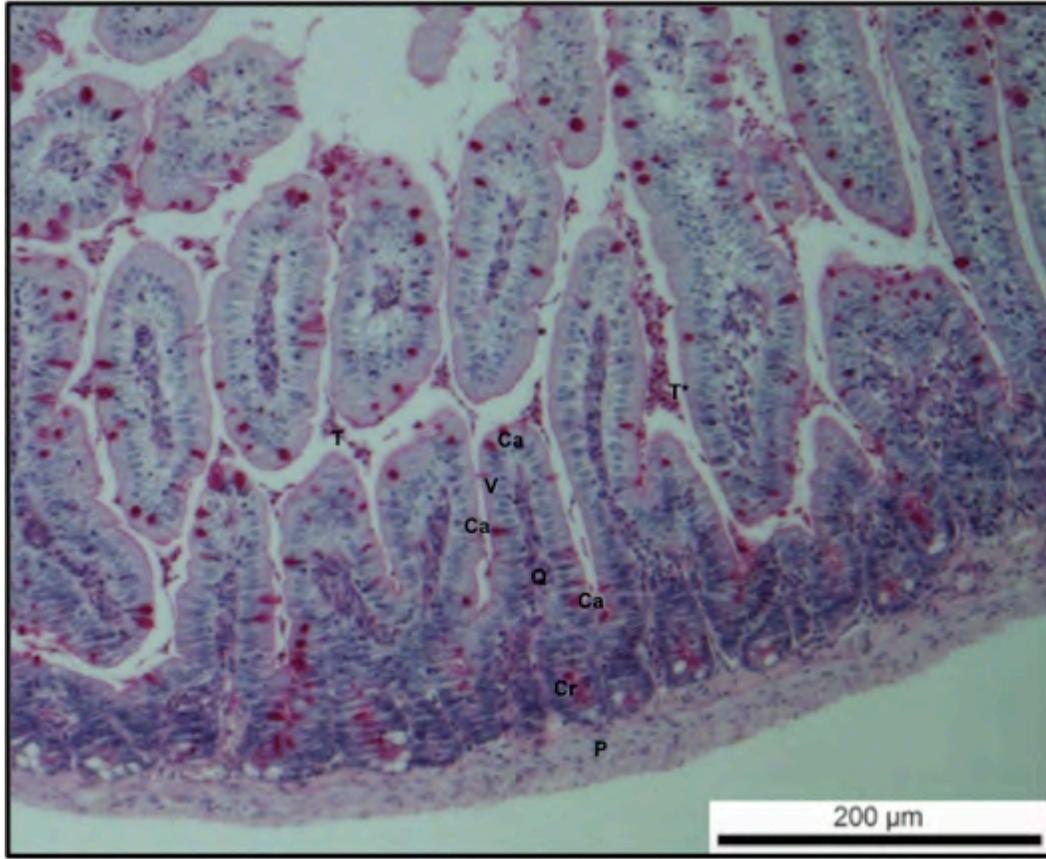


Figura 39. PAS. Panorámica de yeyuno de un jervo de 10 días de edad inoculado con 25,000 trofozoítos. Pared intestinal (P), vellosidad (V), quilífero (Q), cripta (Cr), células caliciformes (Ca), trofozoítos en la luz intestinal (T), trofozoítos en hileras sobre el borde en cepillo (T*) 10 x.

Cuantificación de células caliciformes por densidad en μm^2 promedios y análisis estadístico.

Después de cuantificar las células caliciformes en $100,000 \mu\text{m}^2$, de cada uno de los jervos y de cada grupo, se obtuvo el promedio que se puede observar en la Tabla No 46.

Para determinar si había diferencias significativas en los resultados obtenidos decidimos analizarlos por ANOVA y esta arrojó una $p < 0.02773$. Tabla 47.

Dado que el ANOVA dio datos de significancia, entonces se realizó la Prueba de Tukey para corroborar si había diferencias entre los grupos y no se encontraron diferencias entre los grupos. Tabla 48.

Tabla 46. Promedio del conteo de células calciformes de las mediciones por densidad en μm^2

Jerbos	A)	B)	C)
1	81	88	47
2	42	63	61
3	41	66	69
4	54	54	52
5	43	81	70
6		46	
7		65	
Promedio	52.2	66.14	59.8

A) Grupo control; B) Grupo control con PBS y C) Grupo con trofozoítos

Tabla 47. Análisis de varianza de los tres grupos

ANOVA: K= 3 tratamientos independientes					
Fuente	Suma de cuadrados SS	Grados de libertad v	Cuadrados medios MS	F estadística	Valor P <0.05
Tratamiento	568.0134	2	284.0067	1.4077	0.02773
Error	2,824.4571	14	201.7469		
Total	3,392.4706	16			

Tabla 48. Análisis con la prueba de Tukey de los tres grupos

Resultados Prueba HSD Tukey			
Par de tratamientos	Q estadístico de Tukey HSD	Valor P de Tukey HSD	Interferencia de Tukey HSD
A vs B	2.3709	0.2482774	Insignificante
A vs C	1.1965	0.6725368	Insignificante
B vs C	1.0785	0.7193939	Insignificante

A) Grupo control; B) Grupo control con PBS y C) Grupo con trofozoítos

Íleon de jerbos de 10 días de edad

A) Grupo Control sin Estímulo

Se encontró integridad de la arquitectura del epitelio, así como de las tunicas mucosa, submucosa, muscular y serosa. Las células caliciformes muy evidentes (color rojo)

En la microfotografía representativa se observa la pared intestinal, las vellosidades digitiformes y las células caliciformes. Fig. 40

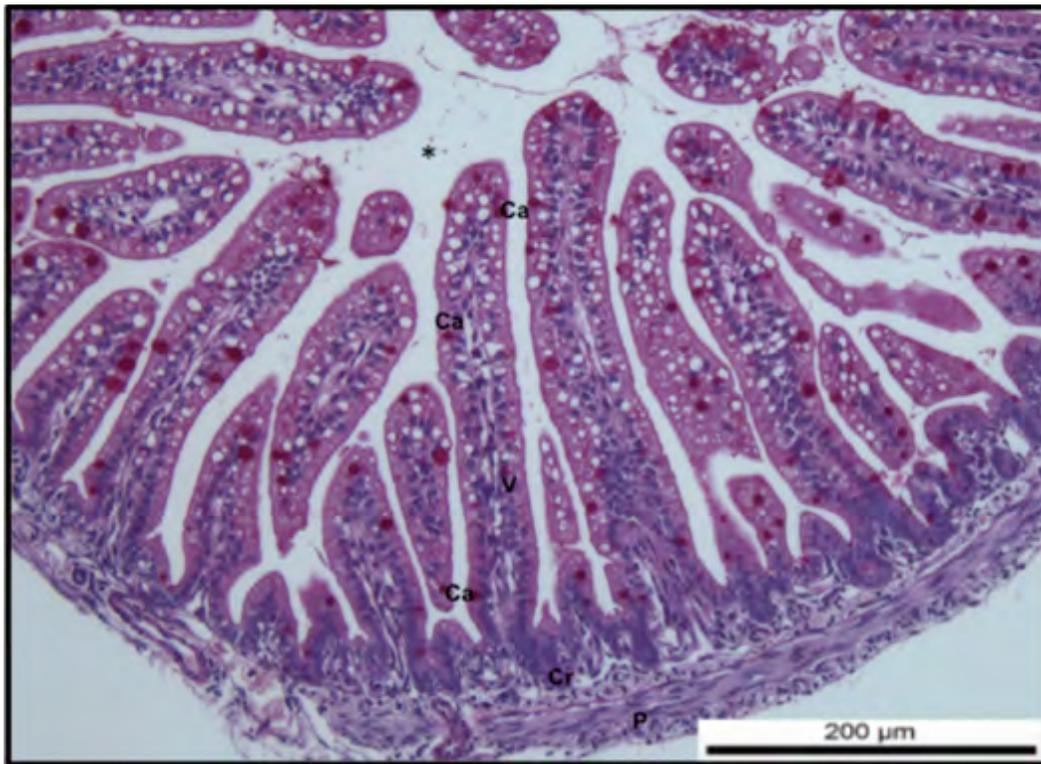


Figura 40. PAS. Panorámica del íleon de un jervo de 5 d.p.i Pared intestinal (P), vellosidad (V), cripta (Cr), células caliciformes (Ca), luz intestinal (*) 10x.

B) Grupo Control con Estímulo

La pared intestinal y el epitelio íntegros, así como también las tunicas mucosa, submucosa, muscular y serosa. Se observaron abundantes células caliciformes.

Se muestra una microfotografía representativa en donde se observa la pared intestinal, las criptas, las vellosidades, el quilífero en el centro de la vellosidad y abundantes células caliciformes. Fig. 41

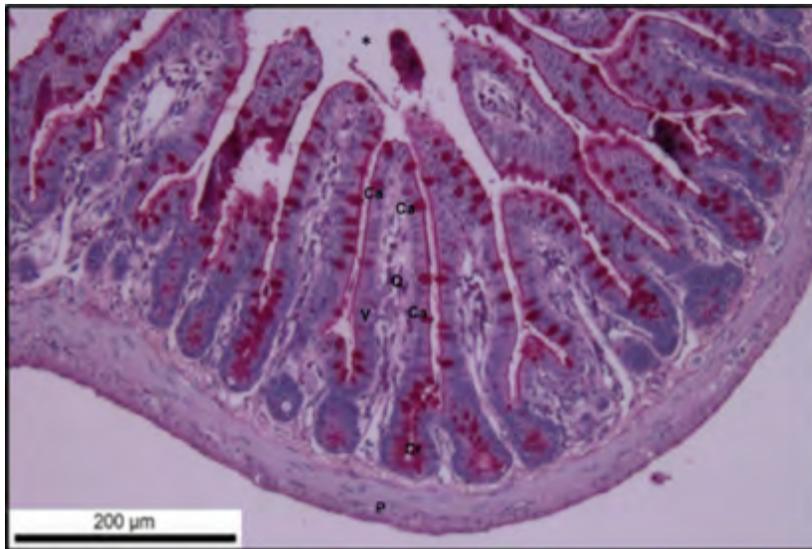


Figura 41. PAS. Panorámica de íleon de un jerbo de 10 días de edad inoculado con PBS. Pared intestinal (P) vellosidad (V), cripta (Cr), células caliciformes (Ca), quilífero (Q), luz intestinal (*) 10x.

C) Grupo Inoculado con Trofozoítos

Las tunicas submucosa, muscular y serosa sin alteración aparente. Las células caliciformes de color rojo

En la microfotografía representativa se observa la pared intestinal, las criptas, las vellosidades y el quilífero en el centro de la vellosidad. Células caliciformes y escasos trofozoítos. Fig. 42

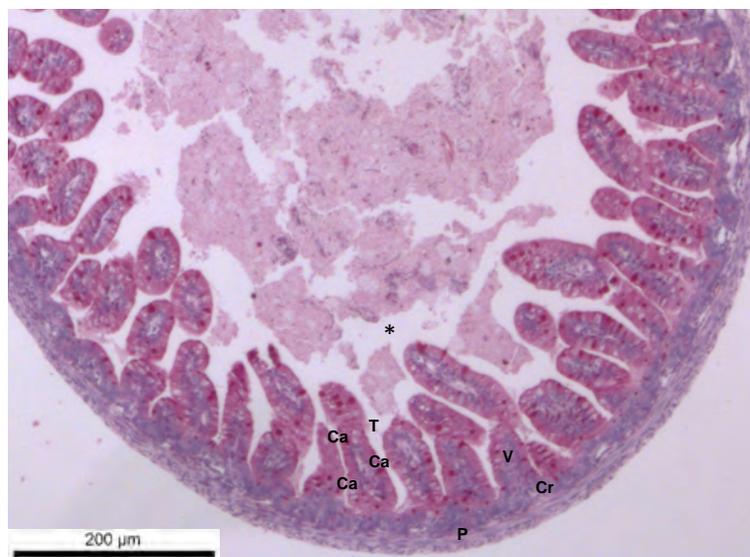


Figura 42. PAS. Panorámica del íleon de un jerbo de 10 días de edad. Pared intestinal (P), vellosidad (V), cripta (Cr), células caliciformes (Ca), trofozoítos. (T) luz intestinal (*) 10x.

Cuantificación de células caliciformes en 100,000 μm^2 , promedios y análisis estadístico.

El número de células caliciformes por jerbo y el promedio de cada grupo se muestra en la Tabla 49.

Para determinar si había diferencias significativas en los resultados obtenidos decidimos analizarlos por ANOVA y se encontró una $p < 8.9408\text{e-}06$. Tabla 50.

Dado que el ANOVA dio datos de significancia, entonces se realizó la Prueba de Tukey para corroborar si había diferencias entre los grupos. Se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo control con PBS $p < 0.01$ y entre el grupo control con PBS y el grupo inoculado con trofozoítos $p < 0.01$. Tabla 51.

Tabla 49. Promedio del conteo de células caliciformes de las mediciones por densidad en μm^2

Jerbos	A)	B)	C)
1	64	120	56
2	43	122	74
3	46	105	61
4	41	110	66
5		88	60
Promedio	48.5	109	63.4

A) grupo control; B) Grupo control con PBS y C) Grupo con trofozoítos

Tabla 50. Análisis de varianza de los tres grupos

ANOVA: K= 3 tratamientos independientes					
Fuente	Suma de cuadrados SS	Grados de libertad v	Cuadrados medios MS	F estadística	Valor P <0.05
Tratamiento	9,259.2286	2	4,629.6143	40.0297	8.9408e-06
Error	1,272.200	11	115.6545		
Total	10,531.4286	13			

Tabla 51. Análisis por Tukey de los tres grupos

Resultados Prueba HSD Tukey			
Par de tratamientos	Q estadístico de Tukey HSD	Valor P de Tukey HSD	Interferencia de Tukey HSD
A vs B	11.8599	0.0010053	**p<0.01
A vs C	2.9209	0.1425405	Insignificante
B vs C	9.4813	0.0010053	**p<0.01

A) Grupo control; B) grupo control con PBS y C) con trofozoítos

Duodeno de jerbos de 15 días de edad

A) Grupo Control sin Estímulo

Con histología intestinal íntegra, es decir las tunicas mucosa, submucosa, muscular y serosa sin alteración aparentemente.

En la microfotografía representativa se observa la pared intestinal, fibras musculares, plexo mientérico y un vaso sanguíneo. Las vellosidades digitiformes y el quilífero en el centro. Las células caliciformes (células epiteliales columnares simples glandulares) en las criptas y en las vellosidades. Fig. 43

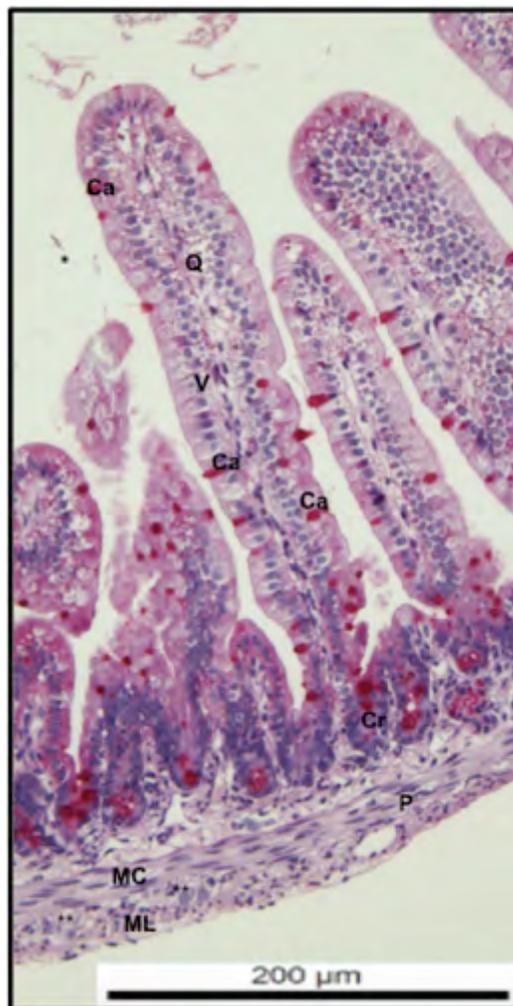


Figura 43. PAS. Corte transversal del duodeno de un jervo de 15 días de edad. Pared intestinal (P), túnica muscular longitudinal (ML), túnica muscular circular (MC), plexos mientéricos (**), vellosidad (V), cripta (Cr), célula caliciforme (Ca), quilífero (Q), luz intestinal (*) 10x.

B) Grupo Control con Estímulo

Arquitectura intestinal sin alteración aparente.

En la microfotografía representativa, se observan las vellosidades digitiformes, enterocitos con núcleos basófilos (azules) y células caliciformes con mucígeno neutro teñido de color rojo. Fig. 44

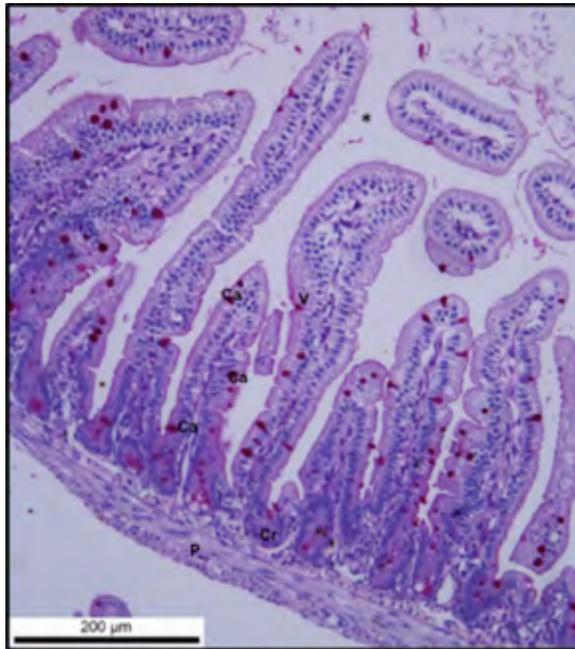


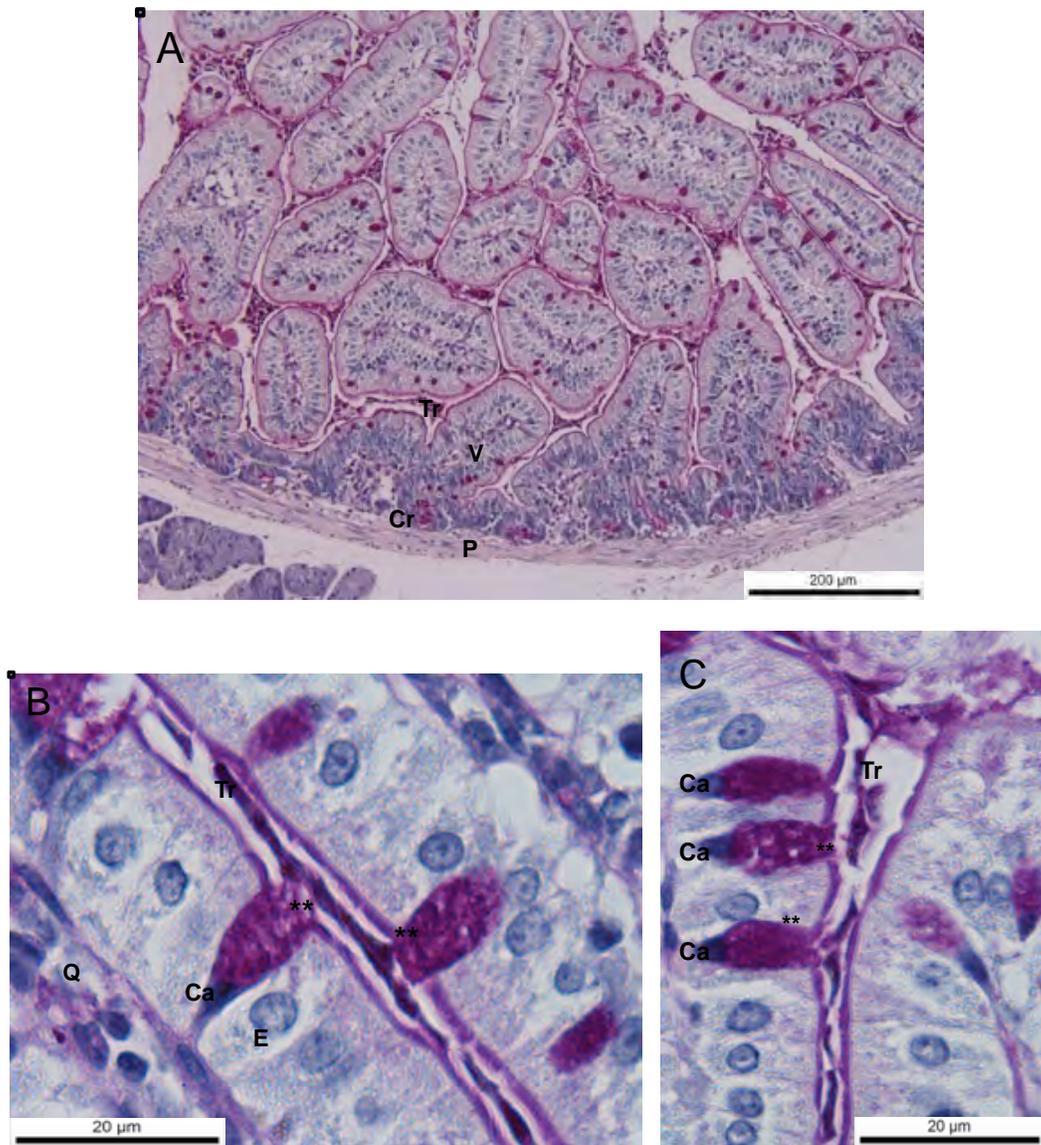
Fig 44. PAS. Corte transversal del duodeno de un jerbo de 15 días de edad. Pared intestinal (P), vellosidad (V), cripta (Cr), célula caliciforme (Ca), luz intestinal (*) 10x.

C) Grupo Inoculado con Trofozoítos

Abundantes trofozoítos distribuidos en cúmulos o adheridos a la mucosa intestinal, otros muy cerca de las criptas. Las vellosidades con menor longitud que las observadas en los grupos control. Las células caliciformes expulsando moco.

En la Fig. 45A. se muestra una microfotografía panorámica representativa, en donde se observa el acortamiento de las vellosidades. El borde en cepillo teñido de color rojo, quizá por el aumento de la actividad de las células caliciformes que están secretando moco. Los trofozoítos adheridos a los enterocitos o en cúmulos. En la Fig. 45B un acercamiento, en donde se observa a los enterocitos con sus núcleos basófilos (azules), las células caliciformes intercaladas entre los

enterocitos, en una de ellas se observa el cáliz (basófilo) y en la región anterior los gránulos de mucígeno; en la región superior izquierda una caliciforme casi vacía. Es evidente el quilífero. Los trofozoítos entre las dos vellosidades y en algunas zonas en contacto directo con el borde en cepillo. La Fig. 45C también es un acercamiento, en la vellosidad de la región izquierda se encuentran tres células caliciformes con sus cálices bien definidos y en la vellosidad derecha se observan dos caliciformes en proceso de migración. Los trofozoítos en estrecho contacto con los enterocitos.



Tinción de PAS. Figura 45A. Panorámica de duodeno de un jerbo de 15 días de edad 10x. B y C. Acercamiento de las vellosidades. Pared intestinal (P), cripta (Cr), vellosidad (V), trofozoítos (T), célula caliciforme (Ca), moco (mucina) (**), enterocito (E), quilífero (Q) 100x.

Cuantificación de células caliciformes por densidad en μm^2 promedios y análisis estadístico.

El promedio de células caliciformes del grupo control sin estímulo fue de 38.5; en el control con estímulo fue de 39.75 y en el grupo de jerbos infectados con trofozoítos de *Giardia* fue de 62.2. Tabla No 52.

Mediante el análisis de varianza se encontraron diferencias ($p < 0.0032$) Tabla 53. Dado que el ANOVA dio datos de significancia, entonces se realizó la Prueba de Tukey para demostrar las diferencias entre los grupos. Se encontró diferencia significativa entre el grupo control y el grupo con trofozoítos ($p < 0.05$) y entre el grupo control con PBS y el grupo con trofozoítos ($p < 0.01$). Tabla 54.

Tabla 52. Promedio del conteo de células caliciformes de las mediciones por densidad en μm^2

Jerbos	A)	B)	C)
1	43	36	68
2	23	50	54
3	47	28	48
4	41	22	65
5		26	76
Promedio	38.5	39.75	62.2

A) Grupo control; B) Grupo control con PBS y C) Grupo con trofozoítos

Tabla 53. Análisis de varianza de los tres grupos

ANOVA: K= 3 tratamientos independientes					
Fuente	Suma de cuadrados SS	Grados de libertad v	Cuadrados medios MS	F estadística	Valor P <0.05
Tratamiento	2,441.3571	2	1,220.6786	10.0883	0.0032
Error	1,311.0000	11	121.0000		
Total	3,772.3571	13			

Tabla 54. Análisis por Tukey de los tres grupos

Resultados Prueba HSD Tukey			
Par de tratamientos	Q estadístico de Tukey HSD	Valor P de Tukey HSD	Interferencia de Tukey HSD
A vs B	1.1691	0.6867846	Insignificante
A vs C	4.5422	0.0207390	** $p < 0.05$
B vs C	6.0577	0.0033722	** $p < 0.01$

A) Grupo control; B) grupo control con PBS y C) con trofozoítos

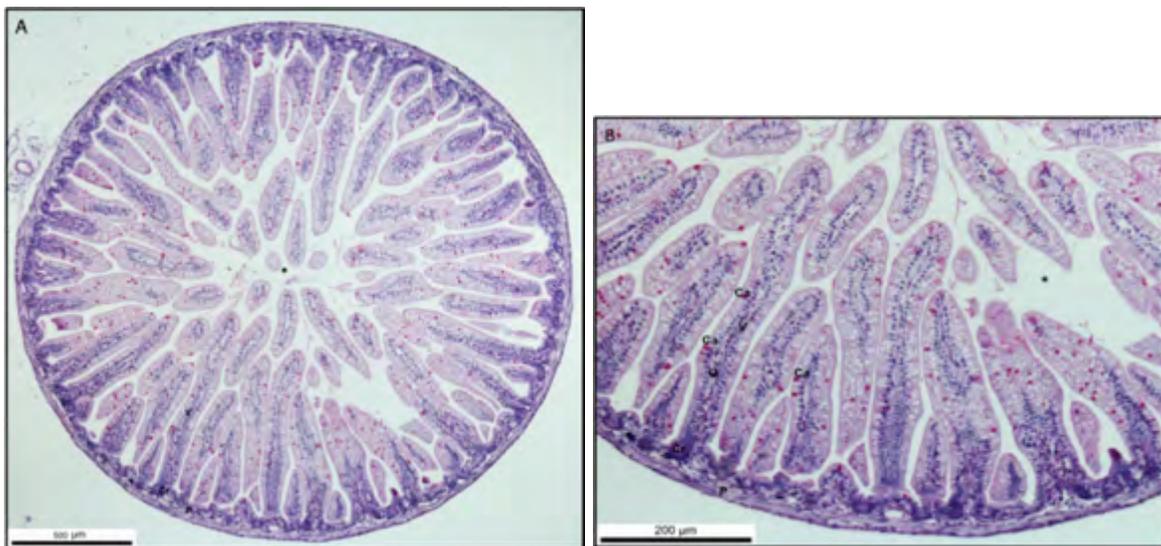
Yeyuno de jerbos de 15 días de edad

A) Grupo Control sin Estímulo

Predominó la integridad de las tunicas mucosa, submucosa, muscular y serosa; el epitelio sin alteración aparente.

En una vista panorámica de una microfotografía representativa, se muestra un corte transversal, en donde se aprecia toda la superficie intestinal (serosa, muscular, submucosa, mucosa y la luz intestinal). Son evidentes las células caliciformes (teñidas de rojo) en las vellosidades. Fig. 46A.

En un aumento se observan la integridad de la pared intestinal, las vellosidades con sus enterocitos y los núcleos de los enterocitos teñidos de un tono azul (basófilos), las células caliciformes (color rojo), la lámina propia y en el centro de la vellosidad es visible el quilífero. Fig. 46B.



PAS. Figura 46A. Microfotografía de corte transversal en vista panorámica del yeyuno de un jervo de 15 días de edad 4x. B: acercamiento panorámico 10x. Pared intestinal (P), cripta (Cr), vellosidad (V), luz intestinal (*), quilífero (Q), célula caliciforme (Ca).

B) Grupo Control con Estímulo

La pared intestinal, las vellosidades y las criptas sin alteración aparente, En la Fig. 47 se muestra una microfotografía panorámica representativa, en donde se observa la pared intestinal, las células caliciformes, las vellosidades, las criptas y en el centro de la vellosidad el quilífero.

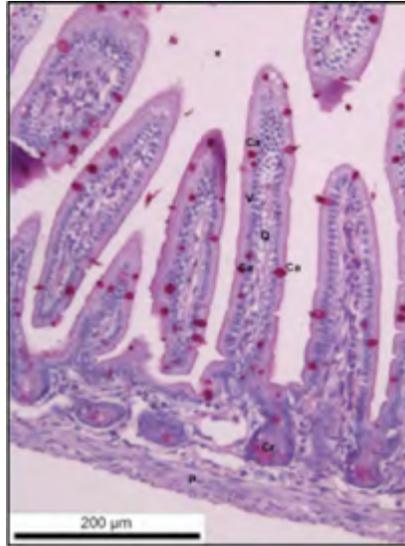


Figura 47. PAS. Microfotografía panorámica de yeyuno de jerbo de 15 días de edad: Pared intestinal (P), cripta (Cr), vellosidad (V), quilífero (Q), luz intestinal (*) 10x.

C) Grupo Inoculado con Trofozoítos

Predominaron las vellosidades cortas, en algunas regiones se observó posible edema de la mucosa. Abundantes células caliciformes, trofozoítos adheridos a la mucosa o en cúmulos en la luz intestinal.

En la Fig. 48 se muestra una microfotografía panorámica representativa, en donde se observan vellosidades cortas, posible edema de la mucosa, criptas, abundantes células caliciformes, trofozoítos adheridos a la mucosa y en la luz intestinal.

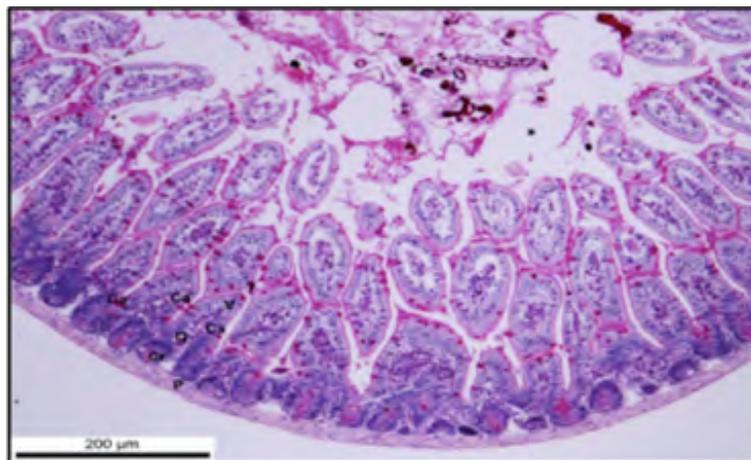


Figura 48. PAS. Panorámica de un corte transversal del yeyuno de un jerbo de 10 dpi, Pared intestinal (P), cripta (Cr), vellosidad (V), quilífero (Q), trofozoítos (T) 10x.

Cuantificación de células caliciformes por densidad en μm^2 promedios y análisis estadístico.

El promedio de las células caliciformes en grupos control sin estímulo fue de 39.75, en el control con estímulo fue de 40 y en el grupo de infectados con trofozoítos de *Giardia* fue de 73. Tabla No 55.

Para determinar si había diferencias significativas en los resultados obtenidos se realizó el ANOVA y ésta arrojó una $p < 0.0067$. Tabla 56.

Dado que el ANOVA dio datos de significancia, entonces se realizó la Prueba de Tukey para demostrar las diferencias entre los grupos. Se encontró diferencia significativa entre el grupo control y el grupo con trofozoítos ($p < 0.05$) y entre el grupo control con PBS y el grupo con trofozoítos ($p < 0.05$). Tabla 57.

Tabla 55 Promedio del conteo de células caliciformes de las mediciones por densidad en μm^2

Jerbos	A)	B)	C)
1	37	60	59
2	59	60	66
3	27	23	76
4	36	28	87
5		29	77
Promedio	39.75	40	73

A) Grupo control; B) Grupo control con PBS y C) Grupo con trofozoítos

Tabla 56. Análisis de varianza de los tres grupos

ANOVA: K= 3 tratamientos independientes					
Fuente	Suma de cuadrados SS	Grados de libertad v	Cuadrados medios MS	F estadística	Valor P <0.05
Tratamiento	3,524.1071	2	1,762.0536	8.1619	0.0067
Error	2,374.7500	11	215.8864		
Total	5,898.8571	13			

Tabla 57. Análisis por Tukey de los tres grupos

Resultados Prueba HSD Tukey			
Par de tratamientos	Q estadístico de Tukey HSD	Valor P de Tukey HSD	Interferencia de Tukey HSD
A vs B	0.0359	0.8999947	Insignificante
A vs C	4.7708	0.0157051	** $p < 0.05$
B vs C	5.0221	0.0115748	** $p < 0.05$

A) Grupo control; B) grupo control con PBS y C) con trofozoítos

Ileon de jerbos de 15 días de edad

A) Grupo Control sin Estímulo

La serosa, muscular, submucosa y mucosa sin alteración aparente. En la microfotografía representativa del íleon, en corte transversal, se observa la serosa, muscular y submucosa; las criptas y las vellosidades con células caliciformes. Fig. 49.

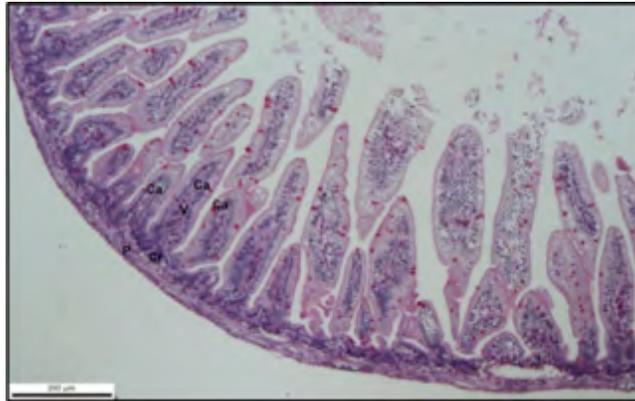


Figura 49. PAS. Panorámica de un corte transversal del íleon de un jerbo de 15 días de edad del grupo control. Pared intestinal (P), cripta (Cr), vellosidad (V), células caliciformes Ca) 10x.

B) Grupo Control con Estímulo

Con vellosidades digitiformes y túnicas con aparente integridad. En la microfotografía representativa se muestra la serosa, muscular y submucosa; las vellosidades digitiformes con su quilífero central y las células caliciformes. Fig. 50

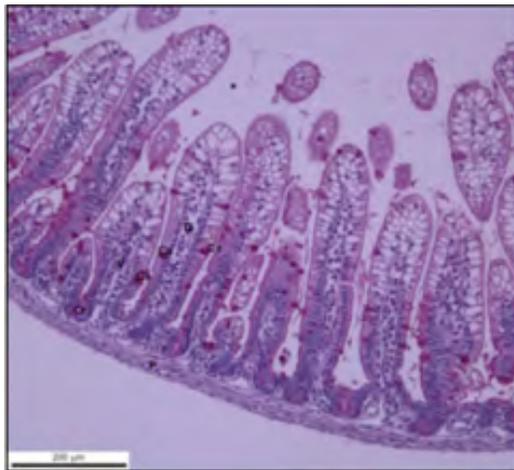
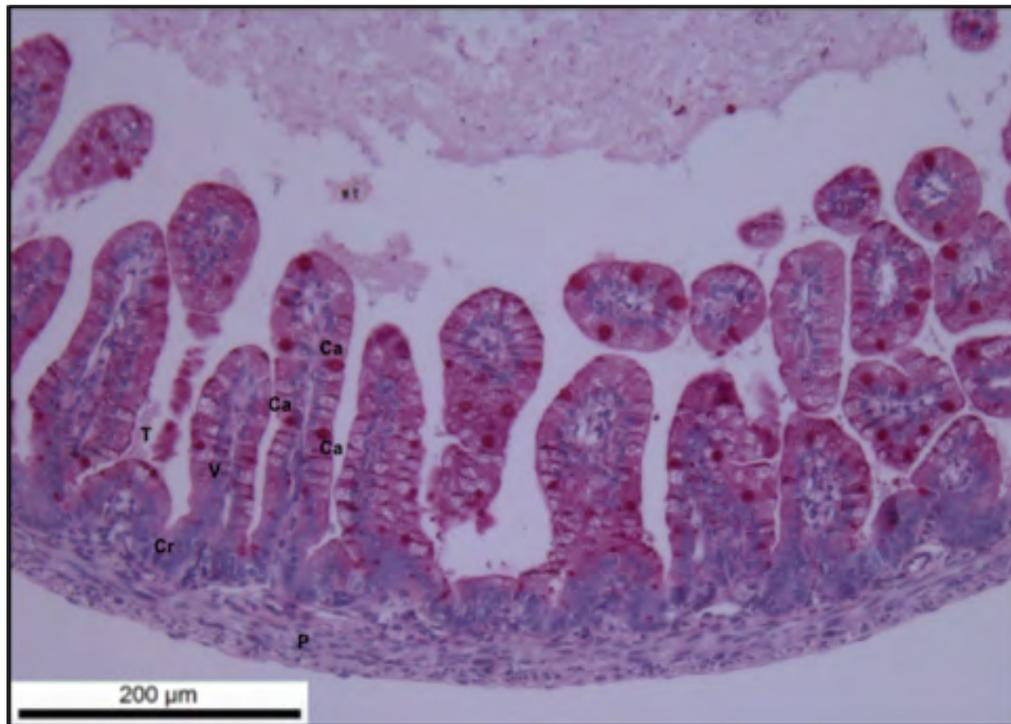


Figura 50. PAS. Panorámica de un corte transversal de íleon de un jerbo de 15 días de edad del grupo control con estímulo. Pared intestinal (P), vellosidad (V), cripta (Cr), células caliciformes (Ca), quilífero (Q), luz intestinal (*) 10x.

C) Grupo Inoculado con Trofozoítos

Predominaron las vellosidades más cortas con relación a los grupos de control. Abundantes células caliciformes. Trofozoítos en cúmulos.

En la microfotografía panorámica representativa, se observa la pared, las vellosidades cortas y abundantes células caliciformes. Trofozoítos en cúmulos en la luz intestinal o adheridas al epitelio. Fig. 51.



PAS. Figura 51. Panorámica de un corte transversal del íleon de un jerbo de 15 días de edad. Pared intestinal (P), cripta (Cr), vellosidad (V), quilífero (Q), trofozoítos (T) 10x.

Cuantificación de células caliciformes por densidad en μm^2 promedios y análisis estadístico.

EL promedio de las células caliciformes fue: grupo control sin estímulo (35.25), grupo control con estímulo (39.8) y grupo infectado con trofozoítos de *Giardia* (76). Tabla 58.

Para determinar si había diferencias significativas en los resultados obtenidos decidimos analizar por ANOVA y esta arrojó una $p < 0.0067$. Tabla 59. Para

demostrar las diferencias entre los grupos, los datos se analizaron con la Prueba de Tukey. Tabla 60.

Tabla 58 Promedio del conteo de células caliciformes de las mediciones por densidad en μm^2

Jerbos	A)	B)	C)
1	20	24	73
2	60	54	81
3	22	64	73
4	39	27	77
5		30	
Promedio	35.25	39.8	76

A) Grupo control; B) Grupo control con PBS y C) Grupo con trofozoítos

Tabla 59. Análisis de varianza de los tres grupos

ANOVA: K= 3 tratamientos independientes					
Fuente	Suma de cuadrados SS	Grados de libertad v	Cuadrados medios MS	F estadística	Valor P <0.05
Tratamiento	4,091.6808	2	2,045.8404	8.6121	0.0067
Error	2,375.5500	10	237.5550		
Total	6,467.2308	12			

Tabla 60. Análisis por Tukey de los tres grupos

Resultados Prueba HSD Tukey			
Par de tratamientos	Q estadístico de Tukey HSD	Valor P de Tukey HSD	Interferencia de Tukey HSD
A vs B	0.6224	0.8999947	Insignificante
A vs C	5.2878	0.0097644	**p<0.01
B vs C	4.9515	0.0143450	**p<0.05

A) Grupo control; B) grupo control con PBS y C) con trofozoítos

9.2.3 Inmunohistoquímicas

Duodeno de jerbos de 10 días de edad

En la mayoría de los cortes, la túnica serosa, la muscular y la submucosa sin alteraciones aparentes. Por otro lado, se encontraron abundantes trofozoítos (color dorado) formando cúmulos en la luz intestinal, adheridos al moco, adheridos al borde en cepillo, y en probable proceso invasivo. En algunas regiones de la mucosa se encontró atrofia de las microvellosidades, pérdida de la continuidad del epitelio, alteraciones de la arquitectura de las vellosidades y posible infiltrado inflamatorio de linfocitos. Fig. 52-57.

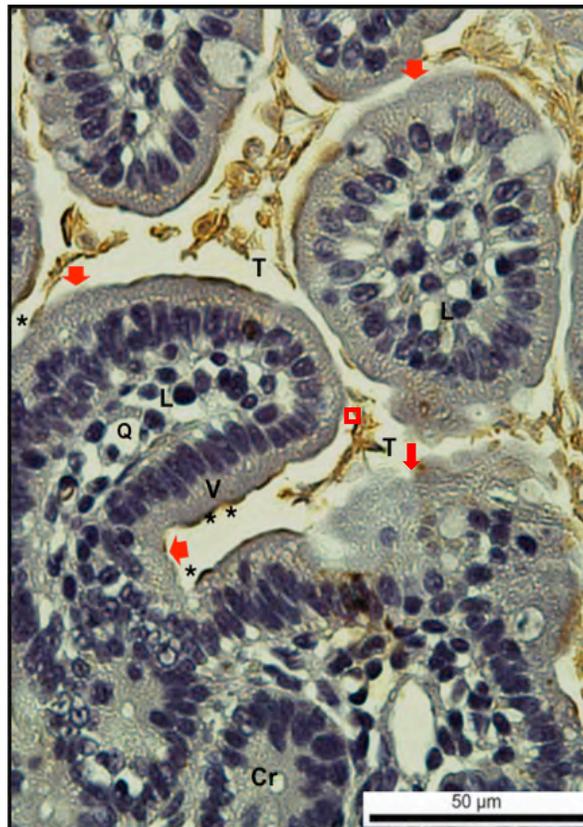


Figura 52. IHQ. Microfotografía en corte transversal, acercamiento del duodeno de un jervo a los 5 dpi (10 días de edad). Se observa la probable capa de moco, varios trofozoítos (T), algunos adheridos al epitelio (*). Atrofia multifocal de microvellosidades (flecha). La vellosidad de la derecha con el ápice ancho y con desorganización de la arquitectura (Cuadro rojo). Linfocitos (L) en diferentes vellosidades. Cripta (Cr), vellosidad (V) y quilífero (Q) 40x.

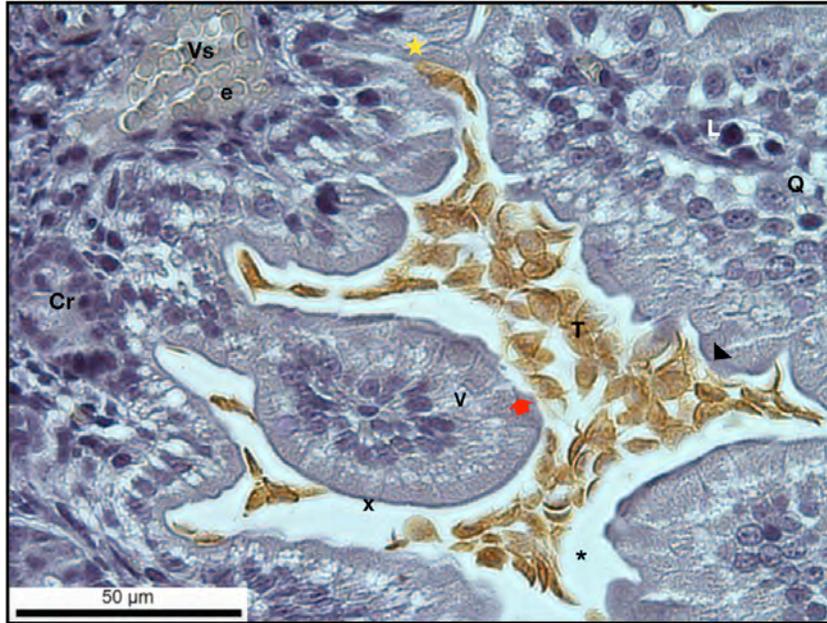


Figura 53. IHQ. Duodeno de un jerbo a los 5 dpi. Acercamiento. En la zona inferior derecha se observa que los trofozoítos están sobre el moco y entre el moco. En la vellosidad de la derecha con desprendimiento celular. Cercano al vaso sanguíneo, los trofozoítos quizá en proceso de invasión tisular (estrella). Una vellosidad con borde en cepillo íntegro en el extremo inferior (X) y con pérdida de la continuidad en la zona superior (flecha), abundante moco que evita la adherencia de los trofozoítos al borde en cepillo. En el cuadrante inferior izquierdo se observan trofozoítos adheridos al epitelio. Vaso sanguíneo con eritrocitos (Vs, e), criptas (Cr), el quilífero (Q), linfocitos (L) y luz intestinal (*) 40x.

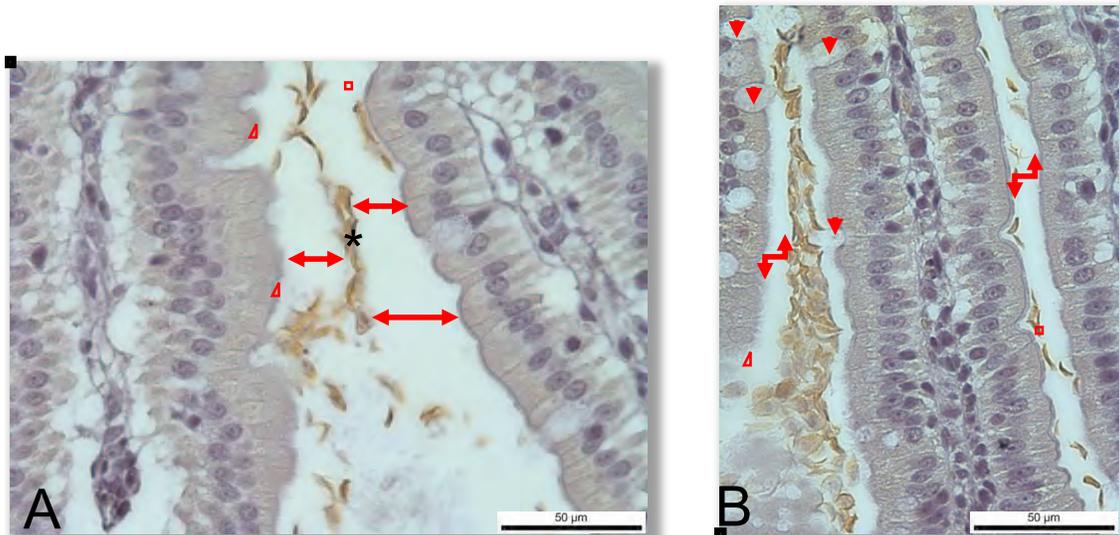


Figura 54. IHQ. Duodeno de un jerbo a los 5 dpi. A: Se observa la capa de moco (flecha bidireccional), trofozoítos sobre la capa de moco (*), cúmulo de trofozoítos entre el moco (círculo), trofozoíto anclado al epitelio (triángulo) y trofozoítos adheridos al epitelio (rectángulo). B: Trofozoítos atacados por células calciformes (cabeza de flecha), Capa de moco (flecha bidireccional), cúmulo de trofozoítos entre el moco (círculo) y trofozoítos adheridos al epitelio (rectángulo) 40x.

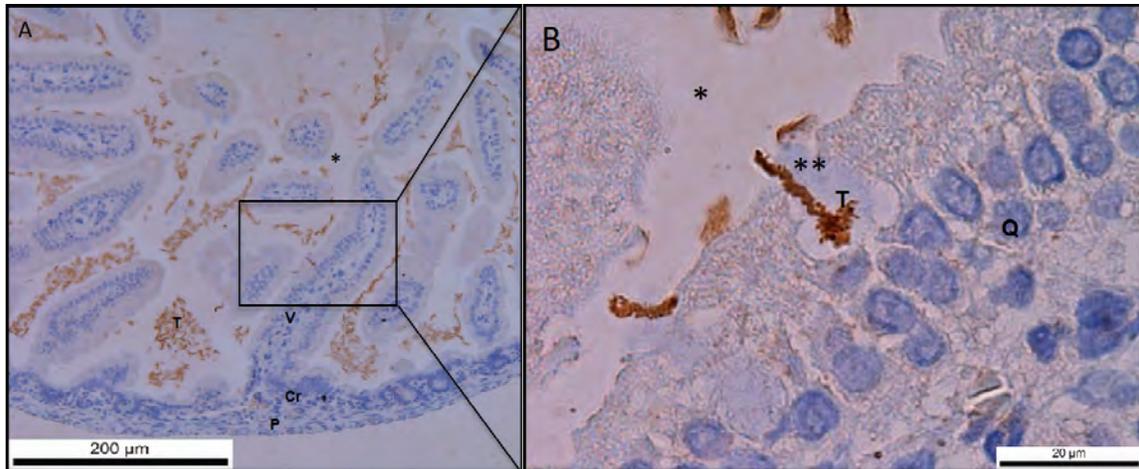


Figura 55. IHQ. Corte transversal del duodeno de un jervo de 5 dpi. A: Vista panorámica. Se observa la pared intestinal íntegra y una gran cantidad de trofozoítos (T) en la luz intestinal, adheridos al borde en cepillo, entre el moco, y separados del epitelio por el moco 10x. B: En el acercamiento de la vellosidad se observan algunos trofozoítos (T) entre las células caliciformes secretando mucinas (**) y adheridos a la mucosa. Pared intestinal (P), cripta (Cr), vellosidad (V), quilífero (Q), luz intestinal (*) 100x.

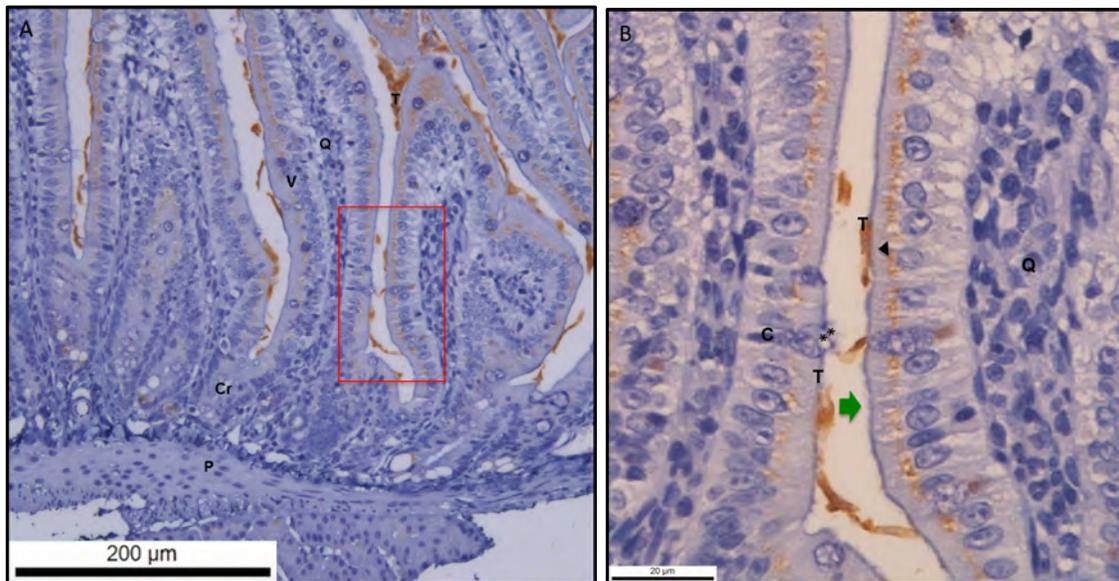


Figura 56A. IHQ: Microfotografía panorámica del duodeno de un jervo infectado de 10 días de edad. Se observan trofozoítos adheridos a la mucosa 10x. B: Acercamiento del epitelio de dos vellosidades, en donde se observa a los trofozoítos adheridos. Pared intestinal (P), cripta (Cr), vellosidad (V), quilífero (Q), trofozoítos (T). Célula caliciforme (C), moco expulsado por la célula caliciforme (**), microvellosidades intestinales (flecha), trofozoítos adheridos (cabeza de flecha) 100x.

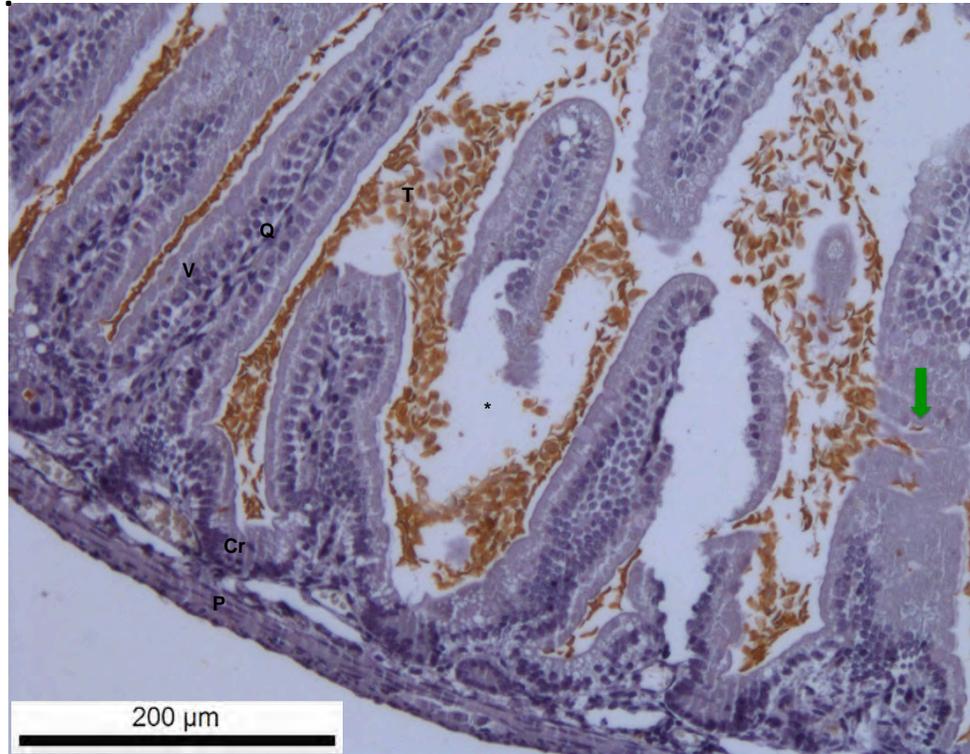


Figura 57. IHQ: Corte transversal de duodeno en vista panorámica de un jerbo de 5 dpi. Se observan cúmulos de trofozoítos desde las criptas. La vellosidad con daño estructural (flecha), trofozoítos entre la mucosa, y desprendimiento del epitelio en el ápice. Pared intestinal (P), cripta (Cr), vellosidad (V), quilífero (Q), luz intestinal (*), pérdida de la arquitectura de la vellosidad (flecha) 10x.

Yeyuno de jerbos de 10 días de edad

La pared intestinal (serosa, muscular y submucosa) sin alteración. Se observaron abundantes trofozoítos: en la luz intestinal, adheridos al epitelio desde el ápice de la vellosidad hasta las criptas de Lieberkühn, embebidos en la mucosa intestinal, sobre el moco, y separados de las vellosidades por el moco. Se observó pérdida de la arquitectura de algunas vellosidades. Trofozoítos adheridos al epitelio de las placas de Peyer ó nódulos linfoides. Fig. 58- 62.

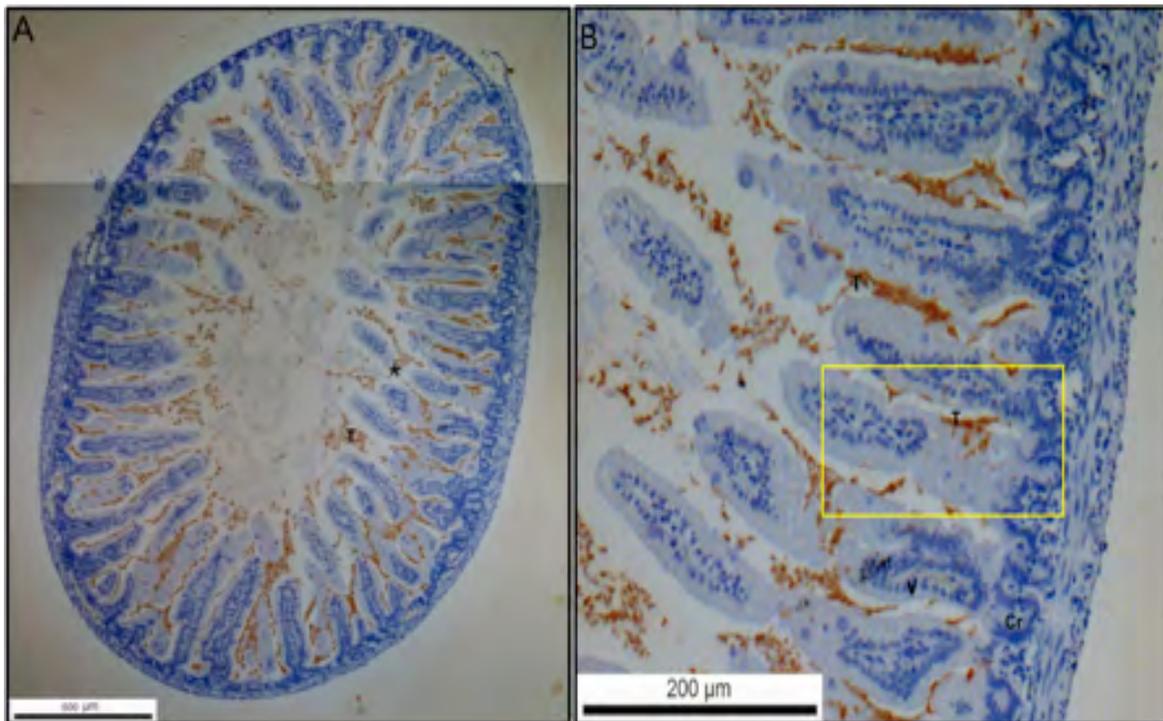


Figura 58. IHQ. A) Microfotografía panorámica de un corte transversal (completo) del yeyuno de un jervo con 5 dpi 4x. y B) Acercamiento. En el recuadro se observan trofozoítos (T) entre el epitelio de las vellosidades (V), algunos cerca del conducto quilífero. Otros muy cerca de las criptas (Cr), o separados por las capas de moco (*) 10x.

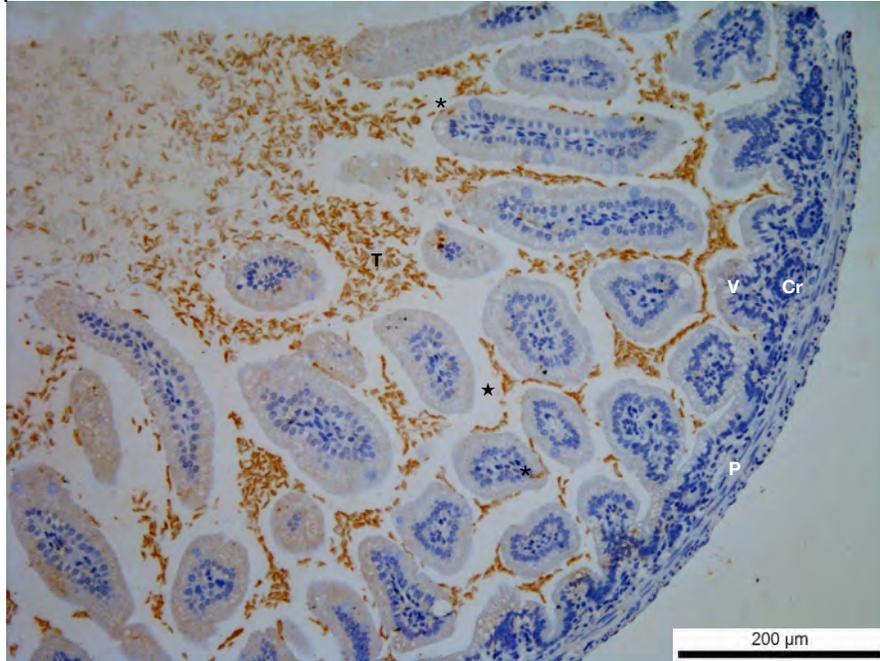


Figura 59 IHQ. Corte transversal del yeyuno de un jerbo de 5 dpi en vista panorámica. Se muestran cúmulos de trofozoítos (T) en la luz intestinal, trofozoítos separados del epitelio por la gruesa capa de moco (semejante a una cápsula protectora) (estrella); aun así, en varias vellosidades se observan zonas con trofozoítos adheridos al borde en cepillo, o dentro del epitelio (asterisco). Pared intestinal (P), cripta (Cr), vellosidad (V) 10x.

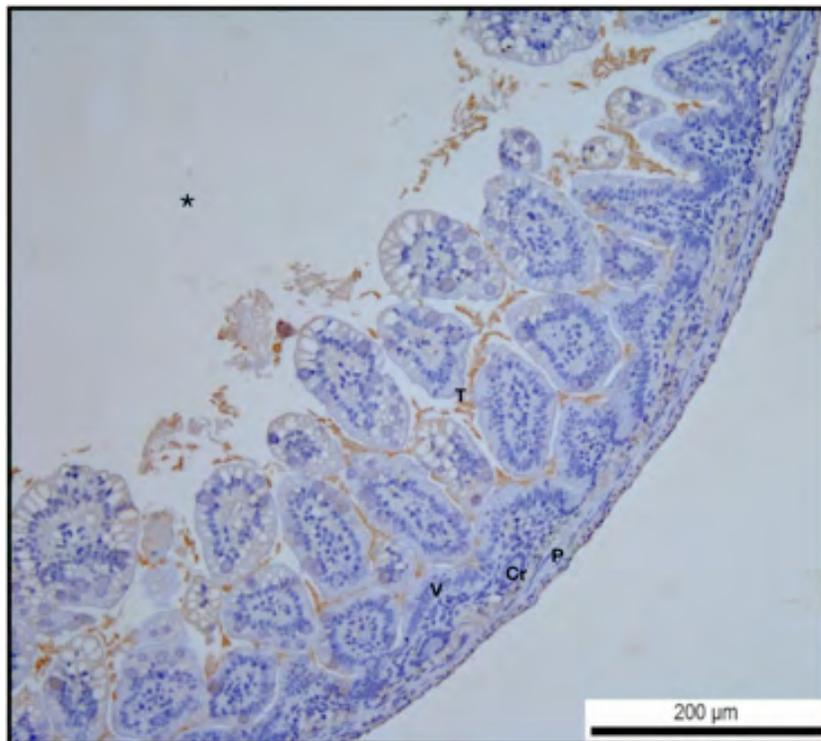


Figura 60 IHQ. Microfotografía panorámica del yeyuno de un jerbo de 5 dpi en corte transversal. Se observan trofozoítos adheridos a la mucosa (T), otros en cúmulos. Luz intestinal (*), pared intestinal (P), cripta (Cr), vellosidad (V) 10x.

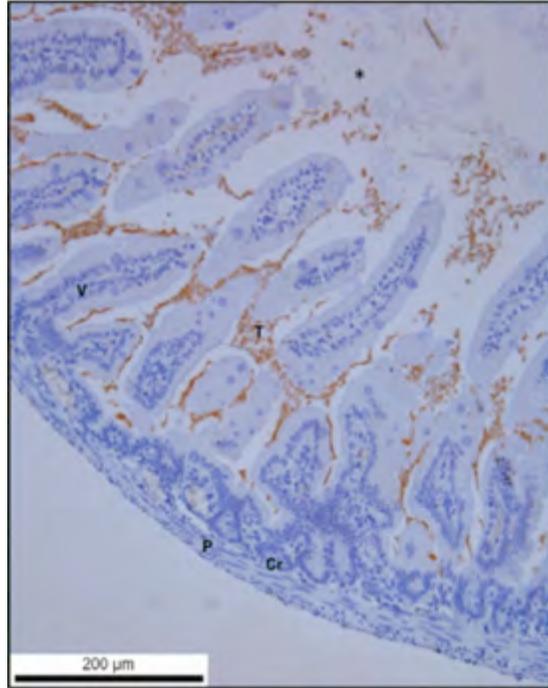


Figura 61. IHQ. Corte transversal del yeyuno de un jerbo de 5 días post inoculación en vista panorámica. Se observan cúmulos de trofozoítos (T) en la luz intestinal (*) y adheridos a la mucosa. Pared intestinal (P), vellosidad (V) y cripta (Cr) 10x.

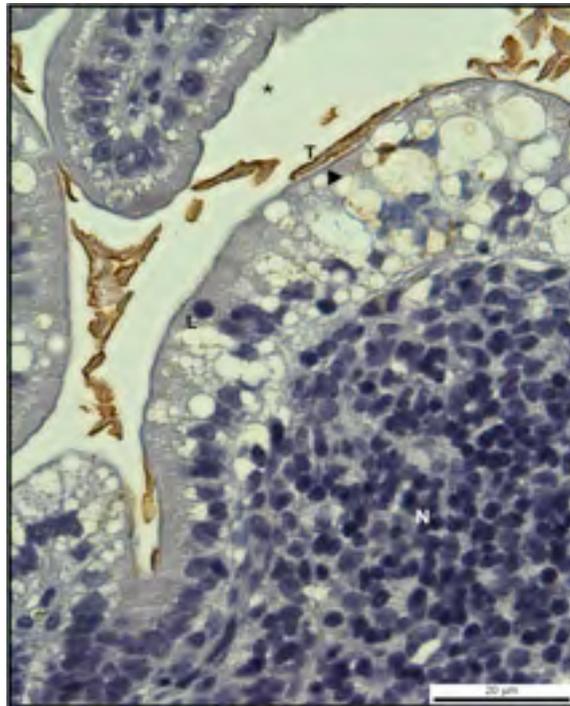


Figura 62. IHQ. Corte transversal del yeyuno de un jerbo de 5 días post inoculación. En este acercamiento se observan trofozoítos adheridos al epitelio (cabeza de flecha) de un nódulo linfoide ó Placa de Peyer (N). Linfocitos en el epitelio (L). En algunas zonas abundante moco que protege al epitelio de los trofozoítos 10x.

Íleon de jerbos de 10 días de edad

También se encontraron trofozoítos adheridos a la mucosa, algunos muy cerca de las criptas. Se observaron cúmulos de quistes en la luz intestinal. En algunas regiones se observó acortamiento de las vellosidades. Fig. 63-65

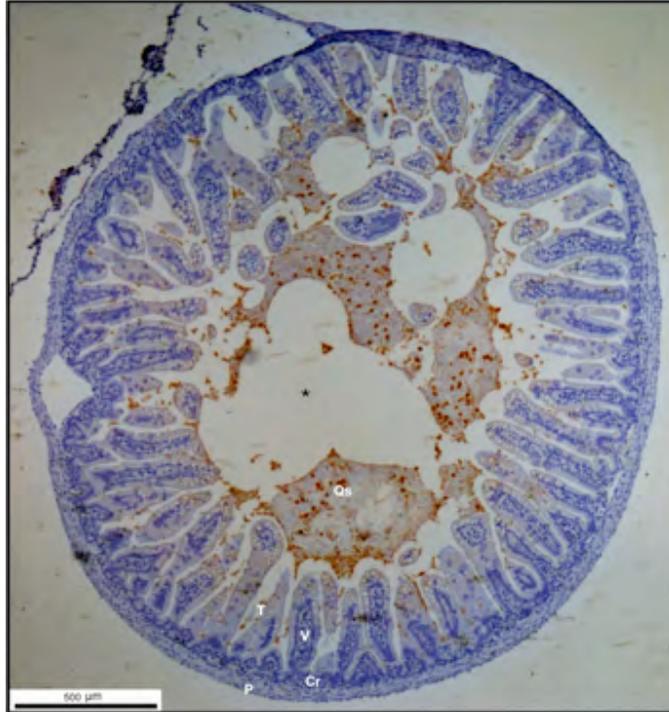


Figura 63. IHQ. Panorámica del íleon de un jervo de 5 dpi. Se observan vellosidades de diferentes dimensiones. Trofozoítos (T) adheridos al epitelio y cúmulos de quistes (Qs) en la luz intestinal (*), pared intestinal (P), cripta (Cr), vellosidad (V) 4x.

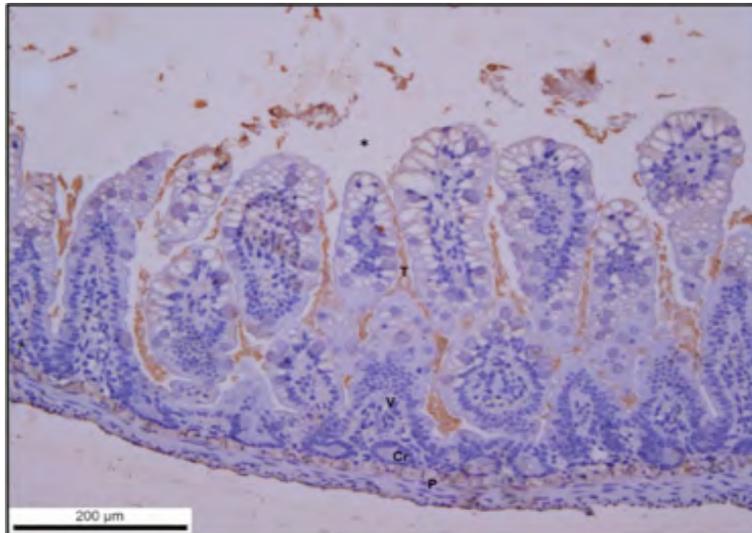


Figura 64. IHQ: Corte transversal del íleon de un jervo de 5 días post inoculación en vista panorámica. Se observan trofozoítos (T) adheridos al epitelio y abundantes células calciformes. Pared intestinal (P), vellosidad (V), cripta (Cr), luz intestinal (*) 10x.

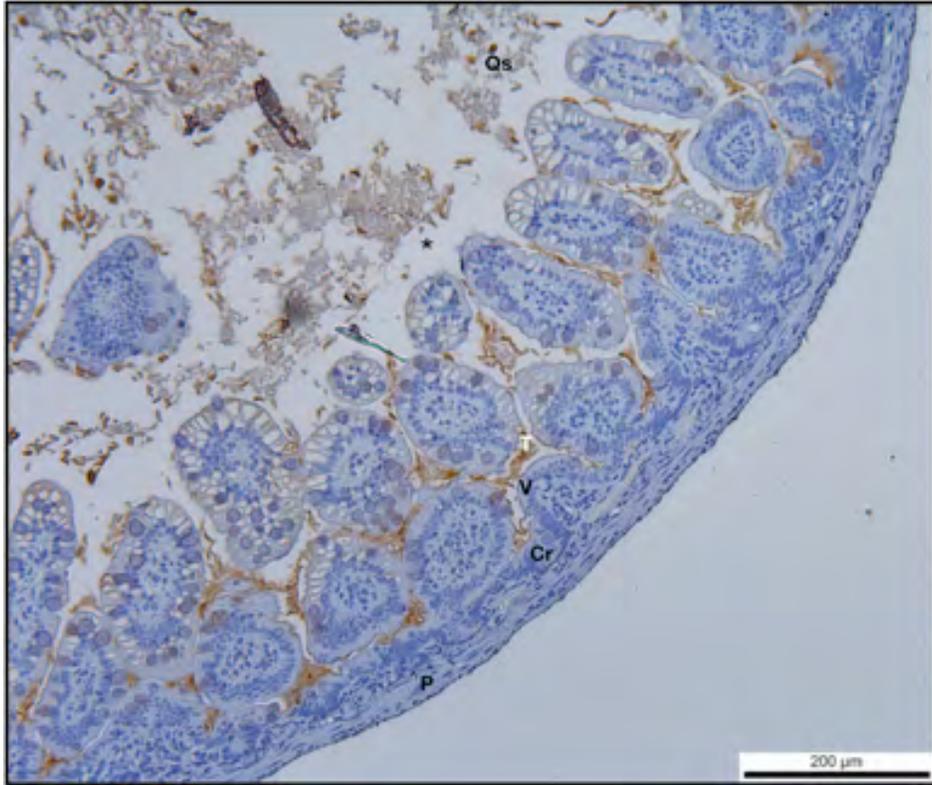
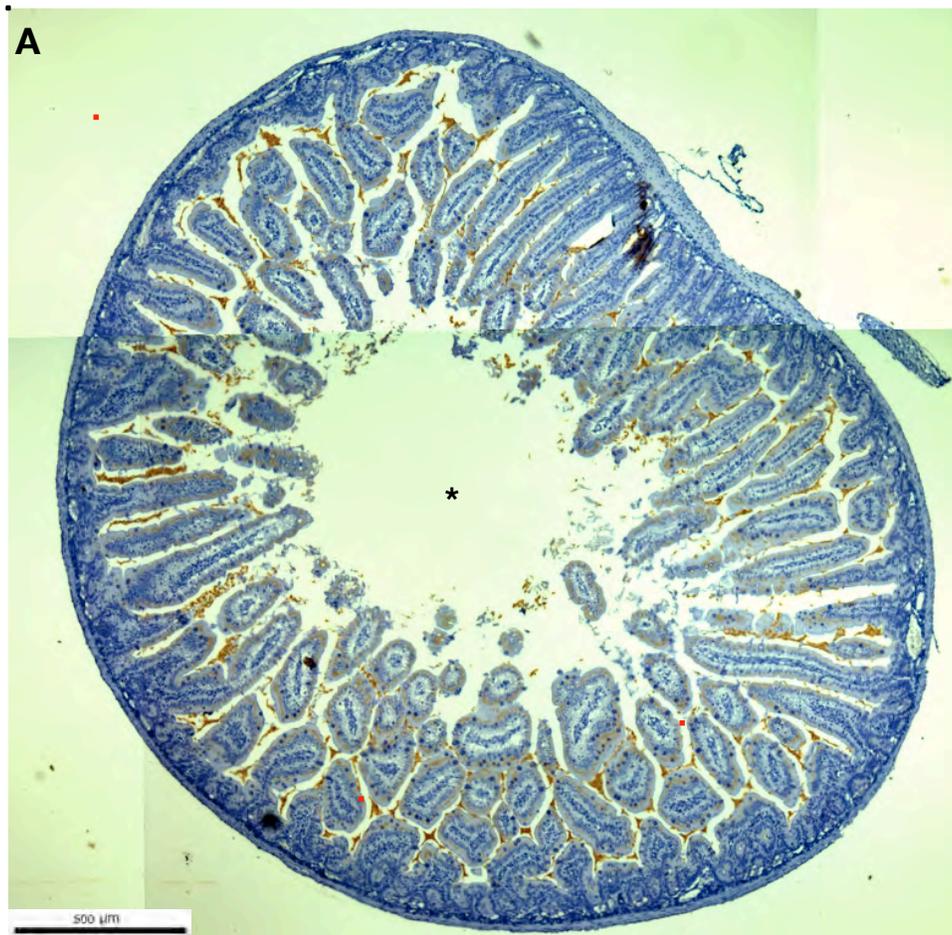


Figura 65. IHQ. Íleon de un jerbo de 5 dpi, corte transversal y vista panorámica. Se observa una zona con acortamiento de las vellosidades, trofozoítos adheridos a la mucosa intestinal y algunos muy cerca de las criptas. Quistes (Qs) en la luz intestinal (*). Pared intestinal (P), cripta (Cr), vellosidad (V) 10X.

Duodeno de jerbos de 15 días de edad

Hubo predominio de la arquitectura normal de las tunicas serosa, muscular y submucosa. En la túnica mucosa se observó pérdida de la arquitectura de las vellosidades, atrofia de microvellosidades, intensa actividad de las células caliciformes y linfocitos tisulares. En varios cortes se observaron zonas con vellosidades semejantes a las encontradas en pacientes con enfermedad celiaca. Hubo multitud de trofozoítos, en la luz intestinal, adheridos al epitelio y embebidos en el moco. Algunos trofozoítos dentro del epitelio. Fig. 66- 71.



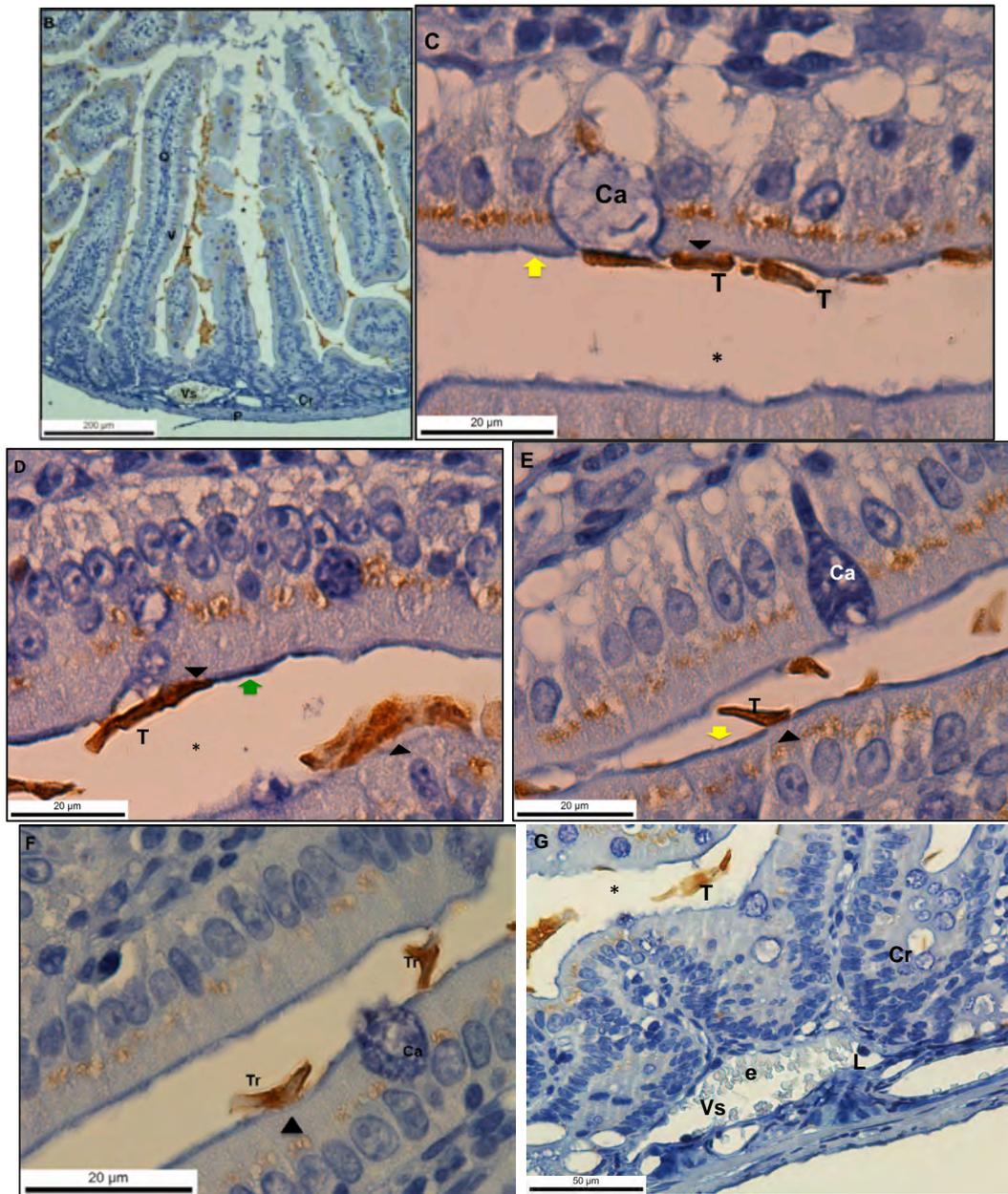


Figura 66. IHQ. Corte transversal del duodeno de jerbo de 15 días de edad. A: Panorámica que muestra la integridad de las tunicas (serosa, muscular y submucosa). Algunas vellosidades intestinales recuerdan a las observadas en la enfermedad celiaca (cuadros). Se observa un intenso ataque de las células caliciformes contra los trofozoítos (color dorado). Los trofozoítos en estrecho contacto con las células epiteliales y algunos embebidos entre el moco y el tejido 4x. B: Se observa la actividad de las caliciformes, dando la impresión que la vellosidad está llorando, la destrucción del epitelio y cúmulos de trofozoítos entre el epitelio 10x. C: Se muestran trofozoítos adheridos a los enterocitos y a una célula caliciforme. Pérdida de las microvellosidades de los enterocitos que tienen trofozoítos 100x. D y E: Se muestra la región dorsal de los trofozoítos adherida a los enterocitos y dañando el borde en cepillo 100x. F (100x) y G (40x): Trofozoítos anclados al epitelio intestinal y otros muy cerca de las criptas. Pared intestinal (P), cripta (Cr), vellosidad (V), trofozoítos (T), atrofia focal de microvellosidades (cabeza de flecha), microvellosidades íntegras y sin ninguna alteración (flecha), luz intestinal (*), célula caliciforme (Ca), quilífero (Q), enterocito (E), linfocito (L), vaso sanguíneo (Vs), eritrocitos (e).

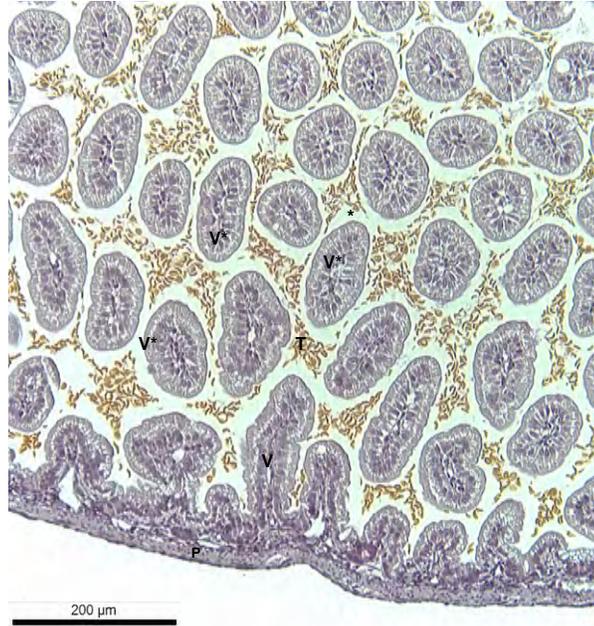


Figura 67. IHQ. Panorámica del duodeno de un jervo de 10 dpi que muestra una multitud de trofozoítos. Vellosidades con ápice amplio, en algunas zonas con pérdida de la continuidad del tejido o pérdida del borde en cepillo. Se observa la integridad de la pared intestinal. Vellosidades en dona (V*), vellosidad (V), cúmulos de trofozoítos (T), pared intestinal (P) 10x.

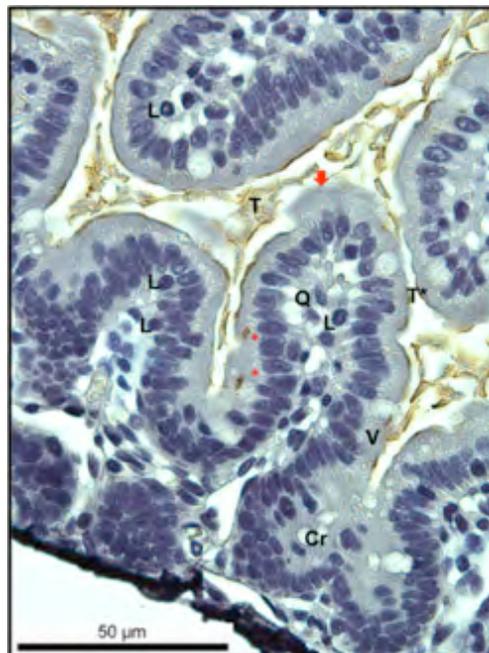


Figura 68. IHQ. Acercamiento a dos vellosidades del duodeno de un jervo de 10 dpi. Se muestran dos trofozoítos por arriba de los núcleos de los enterocitos (*), otros trofozoítos en estrecho contacto con las microvellosidades (T*). Se observan varios linfocitos (L) y en algunas zonas atrofia de microvellosidades intestinales (flecha). Cripta (Cr), vellosidad (V), trofozoítos en la luz intestinal (T) 40x.

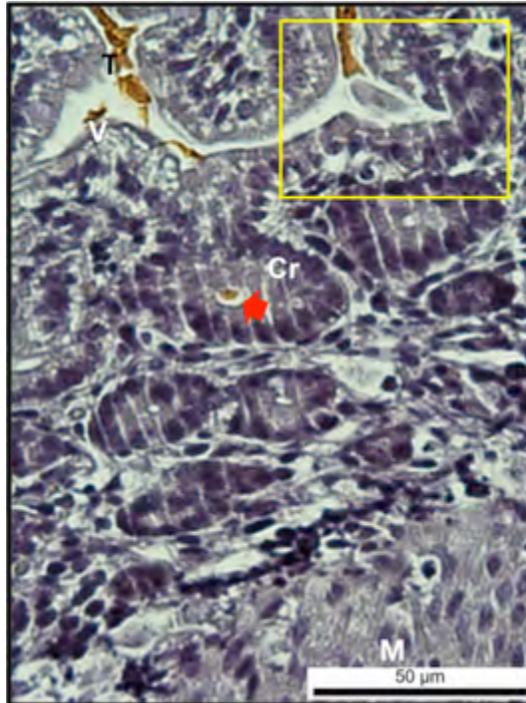


Figura 69. IHQ. Acercamiento a las criptas del duodeno de un jerbo de 10 dpi. Se observa un trofozoíto (color dorado) dentro de una cripta (flecha). Pérdida de la continuidad del epitelio (Recuadro). Túnica muscular (M), vellosidad (V), trofozoítos (T) 40x.

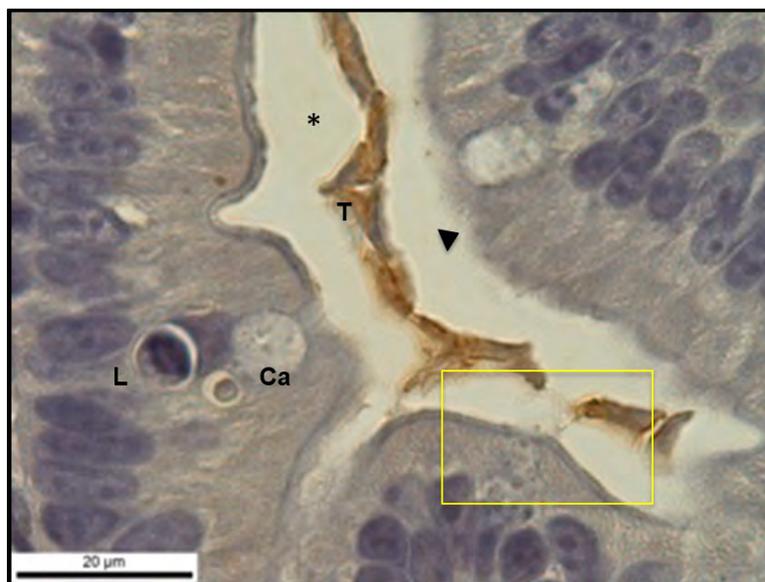


Figura 70. IHQ. Acercamiento del duodeno de un jerbo de 10 días post inoculación. En algunas zonas se observa atrofia de microvellosidades intestinales (cabeza de flecha), un linfocito (L) por encima de los núcleos de los enterocitos y cerca de una célula caliciforme (Ca). Eliminación de mucina por una célula caliciforme (recuadro), abundante moco, trofozoítos (T), luz intestinal (*) 100x.

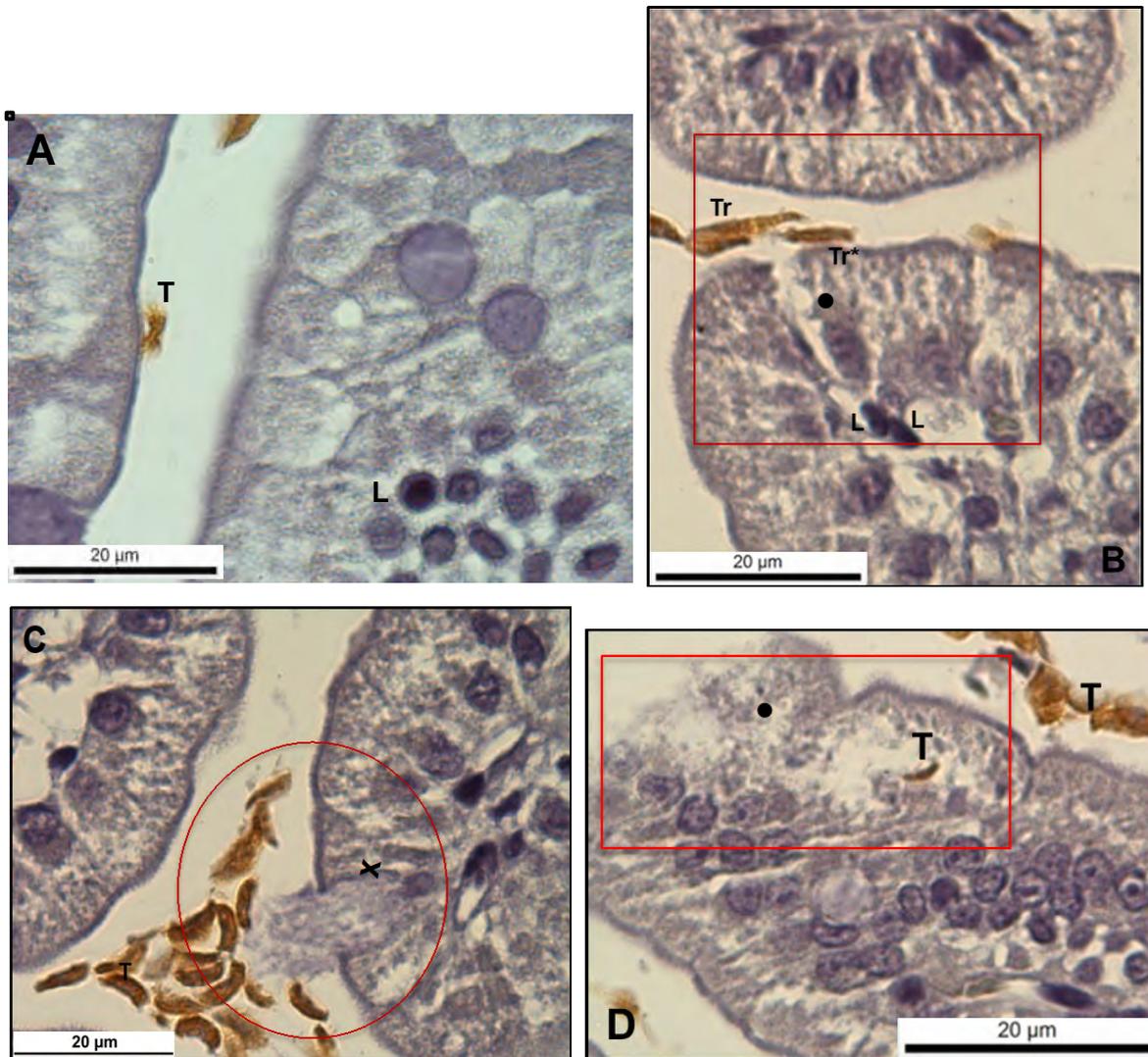


Figura 71. IHQ. Acercamiento del duodeno de un jervo de 10 días post inoculación. A: Se muestra un trofozoíto (T) adherido al epitelio y otro entre el moco. Un linfocito (L) entre núcleos de enterocitos. Abundante moco. B: Se observan trofozoítos en la zona apical de la vellosidad (cabeza de flecha) y pérdida de la continuidad del epitelio (X), el borde en cepillo (flecha). C: Multitud de trofozoítos (T) atacados con las mucinas (**) de una célula caliciforme (Ca), abundante moco. D: En el recuadro se observa un trofozoíto (T) dentro de la vellosidad, pérdida de la arquitectura de la vellosidad quizá producida por los trofozoítos (•) 100x.

Yeyuno de jerbos de 15 días de edad

Frecuentemente se encontraron las tunicas serosa y muscular sin alteración. Se observó daño en la estructura de las vellosidades, atrofia de microvellosidades intestinales y gran actividad de las células caliciformes. Se encontraron trofozoítos en estrecho contacto con las vellosidades, adheridos a los enterocitos sueltos, embebidos entre la mucosa y adheridas al epitelio de las placas de Peyer. Fig. 72-75.

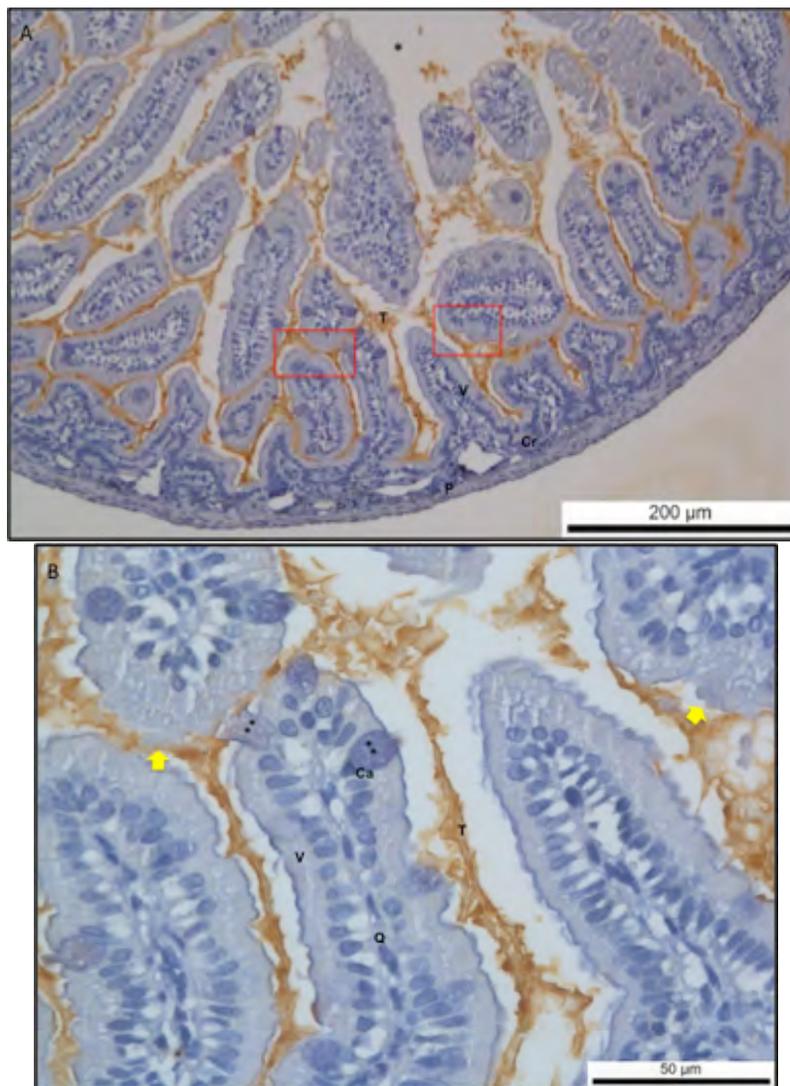


Figura 72. IHQ. Corte transversal del yeyuno de un jervo de 10 días post inoculación. A: Vista panorámica en donde se observa la pared intestinal (P), atrofia de microvellosidades (Recuadros), trofozoítos (T) adheridos y en cúmulos. Luz intestinal (*), Pared intestinal (P), cripta (Cr) 10x. B: Acercamiento a las vellosidades intestinales. Se muestra la atrofia multifocal de microvellosidades (flecha), trofozoítos adheridos (T), actividad de las células caliciformes (Ca) (**), quilífero (Q) 40x.

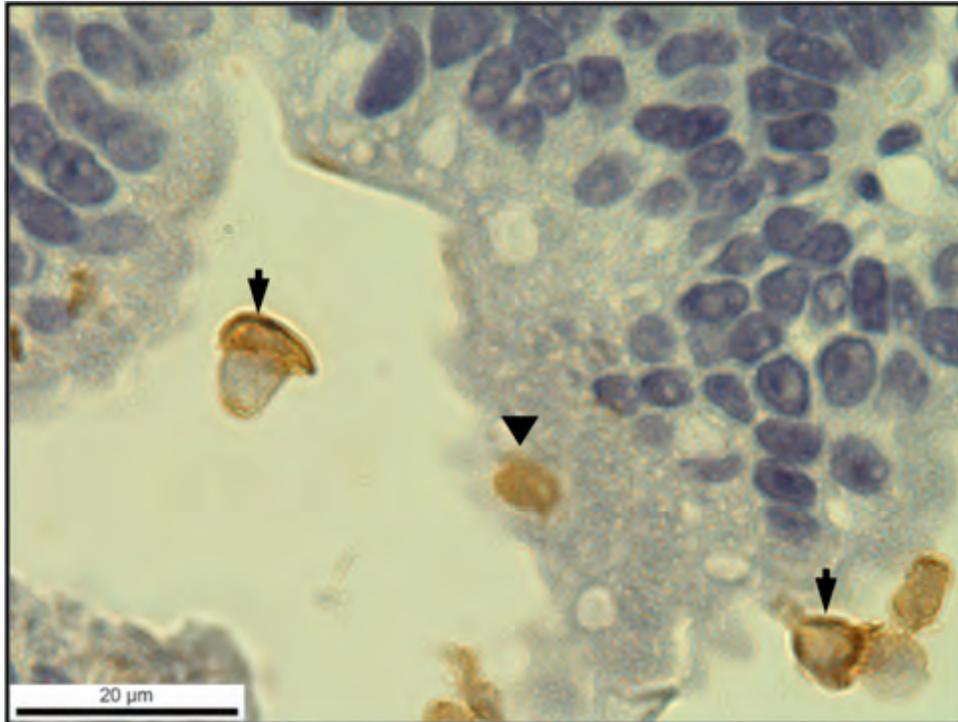
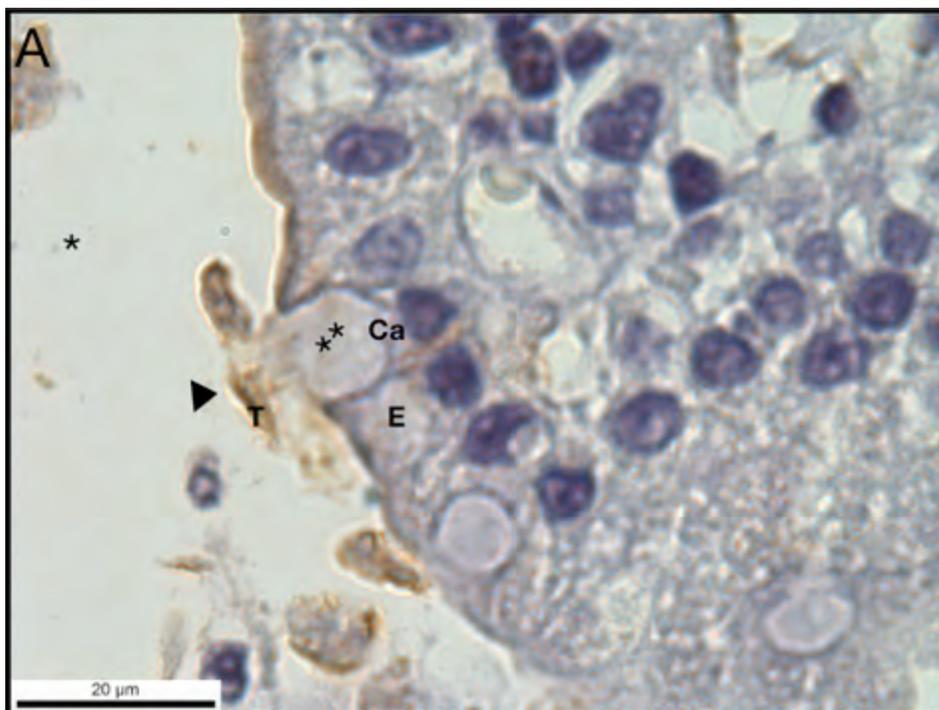


Figura 73. IHQ. Corte transversal del yeyuno de un jervo de 10 dpi. En este acercamiento se observa un trofozoíto adherido a un enterocito suelto (flecha), atrofia de las microvellosidades y un trofozoíto embebido en el tejido (cabeza de flecha). En la zona inferior derecha otro trofozoíto adherido a restos de un enterocito (flecha) 100x.



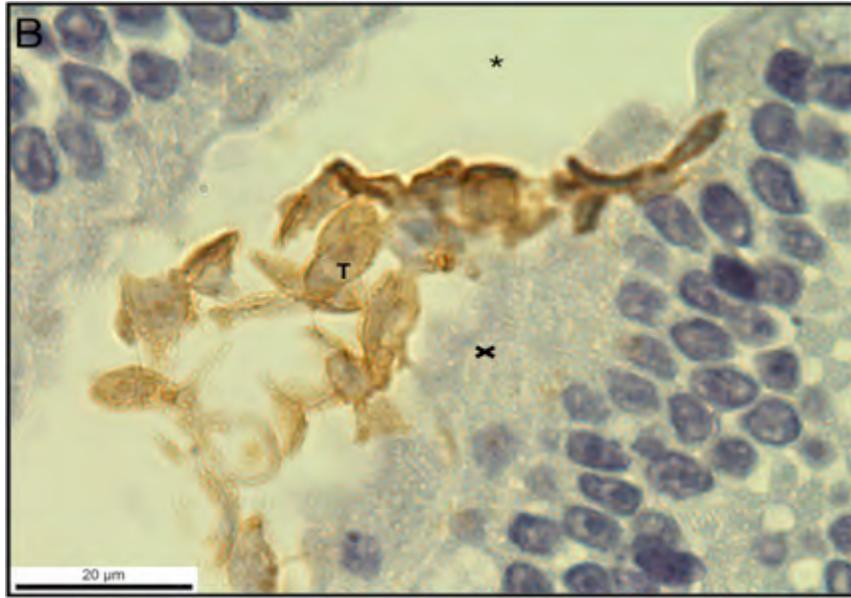


Figura 74. IHQ. Corte transversal del yeyuno de un jervo de 10 dpi. A: en el acercamiento se observa el ataque de las células caliciformes (Ca**) a los trofozoítos (T) (cabeza de flecha). B: Se aprecia la atrofia focal de microvellosidades intestinales (X), linfocito, cúmulo de trofozoítos (T) y lumen (*) 100x.

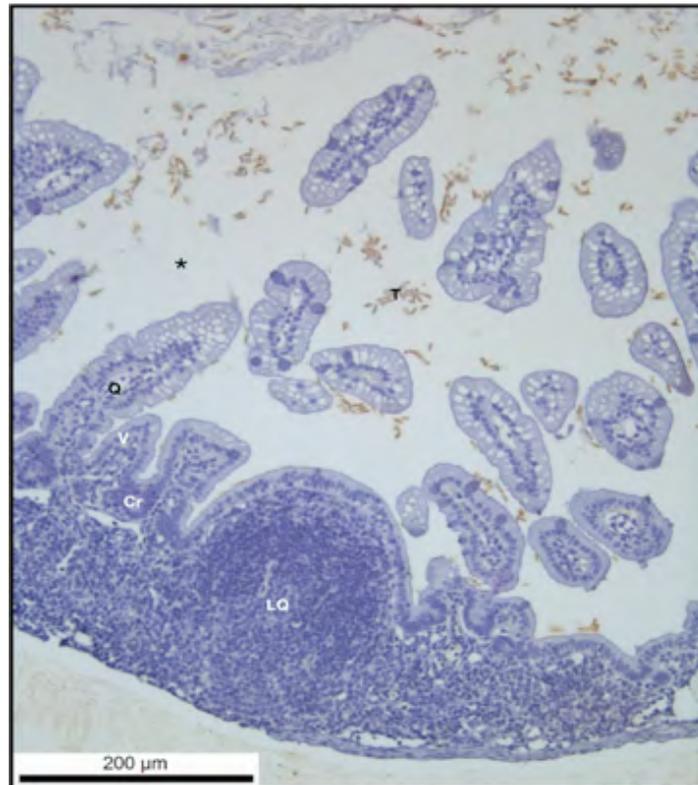


Figura 75. IHQ. Corte transversal de una microfotografía panorámica del yeyuno de un jervo a los 10 dpi. Se observan algunos trofozoítos adheridos a la placa de Peyer (LQ) 10x. Trofozoítos en el lumen (T) o adheridos a las vellosidades. Cripta (Cr), vellosidad (V), quilífero (Q), luz intestinal (*).

Íleon de jerbos de 15 días de edad

El íleon se encontraron trofozoítos en los diferentes cortes histológicos, la pared intestinal estuvo íntegra. En algunas zonas se observó acortamiento de las vellosidades, y atrofia de las microvellosidades. Las células caliciformes secretando mucinas. Fueron evidentes los nódulos linfoides. Fig. 76-79.

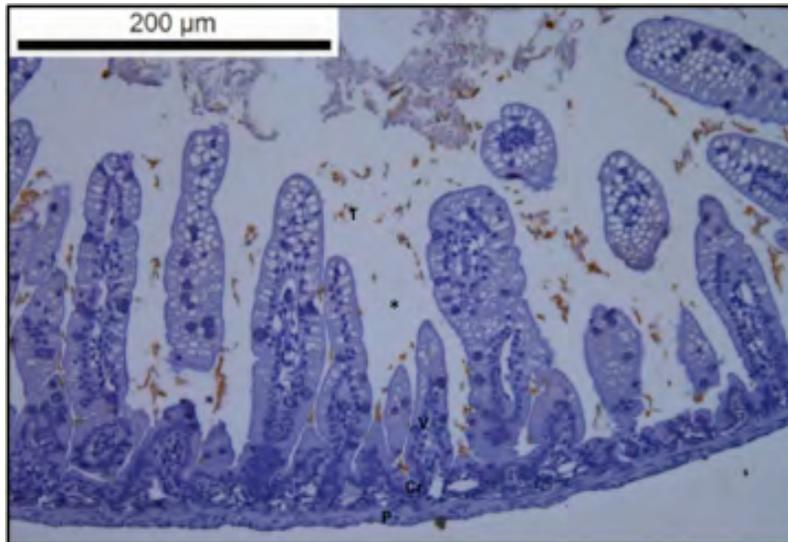


Figura 76. IHQ: Corte transversal del íleon de un jervo de 10 días post inoculación en vista panorámica. Se observa la integridad de la pared intestinal (P), criptas (Cr), vellosidades (V), y trofozoítos (T) adheridos al epitelio o en el lumen (*) 10x.

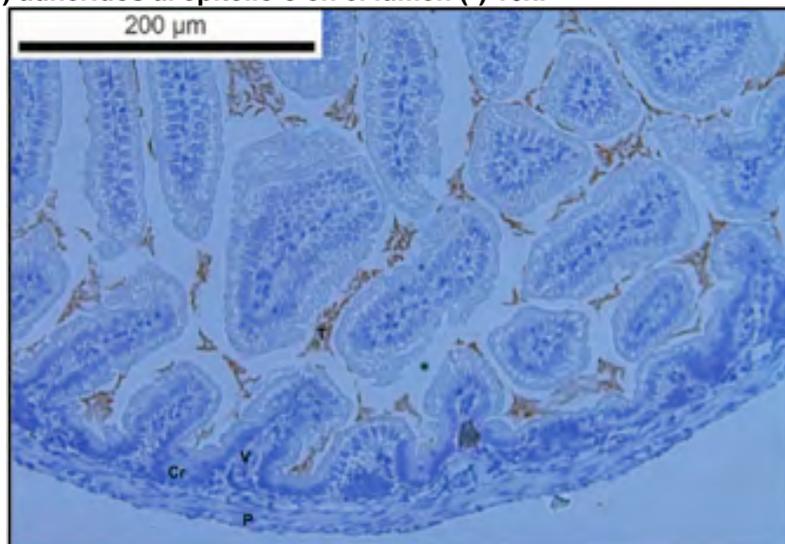


Figura 77. IHQ: Corte transversal del íleon de un jervo de 10 días post inoculación en vista panorámica. Se observa la integridad de la pared intestinal (P), criptas (Cr) y vellosidades (V) con el ápice ancho. Cúmulos de trofozoítos (T) adheridos al epitelio o en el lumen (*) 10x.

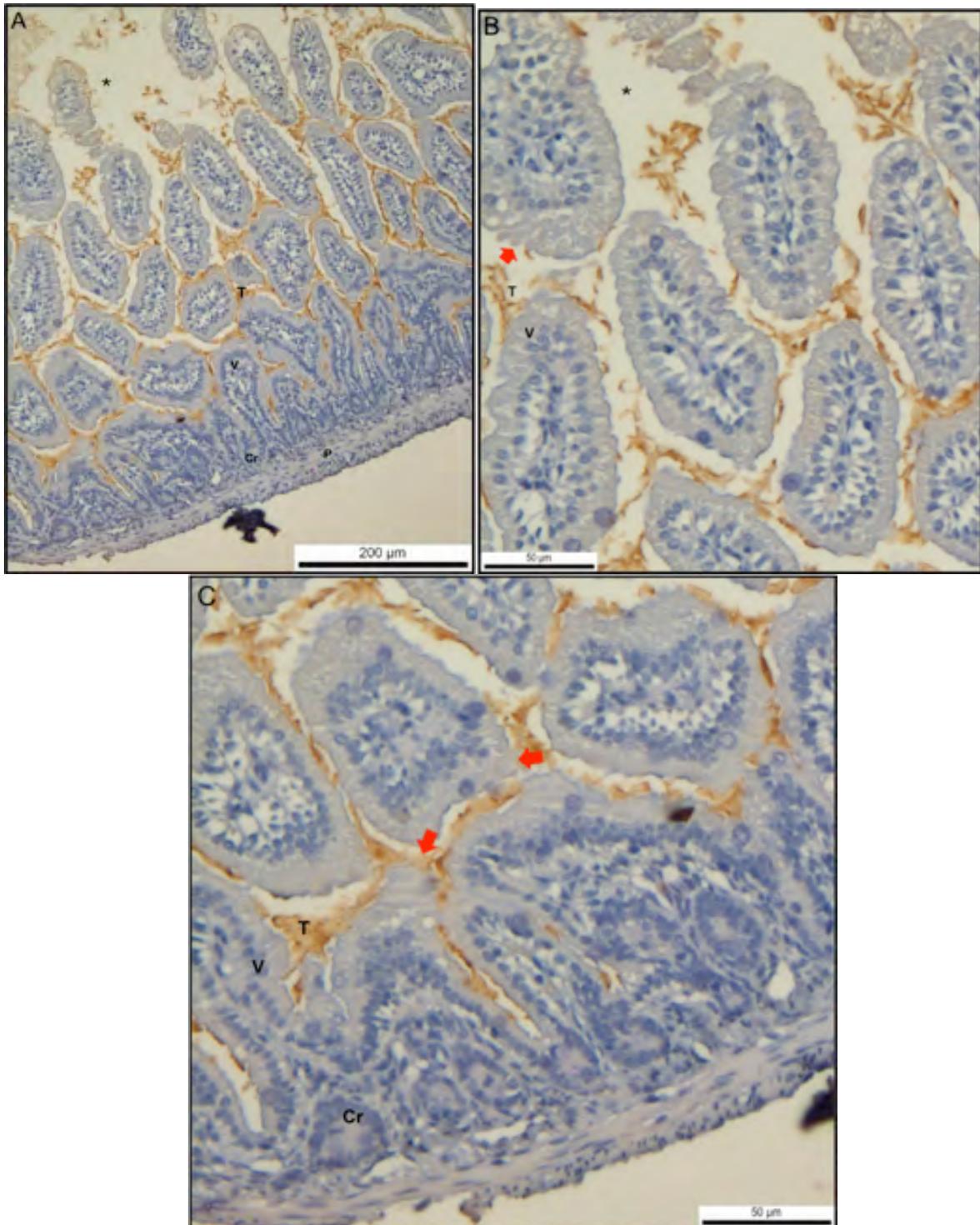


Figura 78. A. Panorámica en corte transversal del íleon de un jervo de 15 días de edad infectado con 25, 000 trofozoítos 10x, B y C. Acercamientos a vellosidades. Se observan abundantes trofozoítos (T) adheridos a los enterocitos. Pérdida de la continuidad y daño del epitelio (flecha), vellosidades (V) con el ápice ancho. Pared intestinal (P), cripta (Cr), luz intestinal (*) 40x.



Figura 79. IHQ. Panorámica del íleon de un jerbo de 15 días de edad, infectado con 25, 000 trofozoítos. Se observan las placas de Peyer ó nódulos linfoides (N), algunos trofozoítos adheridos al epitelio (T). Se observan quistes y trofozoítos en el lumen (*). Pared intestinal (P), cripta (Cr), vellosidad (V) 4x.

Finalmente, se muestra un resumen de la relación cripta/vellosidad y el número de células caliciformes que se encontraron en los jerbos de 10 y 15 días de edad. Figura 80 y 81. Y la detección de trofozoítos dentro del epitelio del duodeno y yeyuno. Tabla 59.

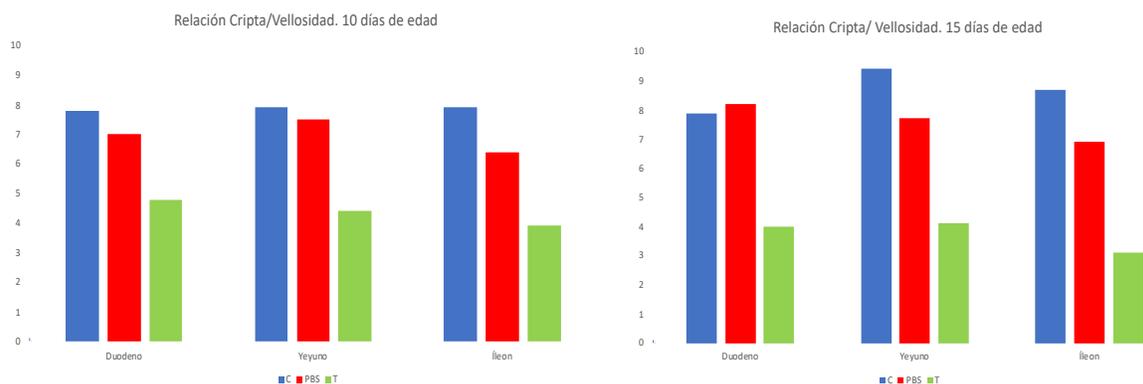


Figura 80. Relación cripta vellosidad de jerbos de 10 y 15 días de edad. C: control; PBS: control con PBS; T: infectados con trofozoítos.

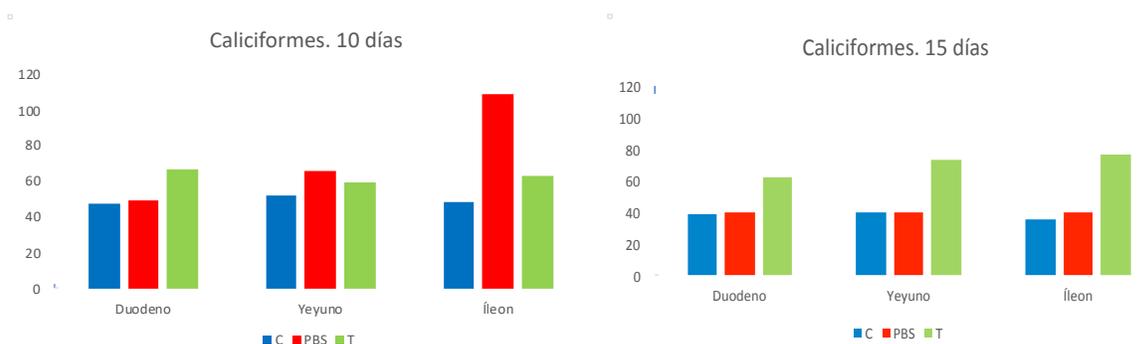


Figura 81. Número de células caliciformes en jerbos de 10 y 15 días de edad. C: control; PBS: control con PBS; T: infectados con trofozoítos.

Tabla 61. Trofozoítos dentro del epitelio en diferentes regiones del intestino de diferentes jerbos de 10 y 15 días de edad.

Edad (días)	Duodeno	Yeyuno	Íleon
10	1	0	0
15	2	1	0

10. DISCUSIÓN

Este es el primer reporte que muestra hiperplasia de las criptas y aplanamiento de las vellosidades de jerbos lactantes inoculados con una baja cantidad de trofozoítos (25,000). Los reportes en muestras de duodeno de humanos mencionan que la relación vellosidad: cripta está entre 3:1 - 5:1 (Ferrufino *et al.*, 1996). Hasta donde sabemos no hay reportes de la relación cripta: vellosidad del intestino delgado de jerbos de 10 y 15 días de edad, [REVISIÓN EN PUBMED 25/08/2020, 16:11. MeSH (*Giardia*, Relation crypts and villi, small intestine) = 0].

En este trabajo se encontró que la relación cripta: vellosidad del duodeno, de jerbos de 10 días de edad, del grupo control, fue de 7.86:1. Completamente diferente a la observada en los jerbos infectados con *Giardia* (4.82:1) (Tabla 10), encontrándose diferencias significativas entre estos dos grupos ($p < 0.01$). El resultado es interesante porque se demostró cuantitativamente que los jerbos infectados con *Giardia* presentaron hiperplasia de las criptas.

Resultados semejantes a los encontrados en el duodeno, también los encontramos en el yeyuno [en el grupo control la relación cripta: vellosidad fue de 7.93:1, en el grupo con *Giardia* fue de 4.37:1 ($p < 0.01$)] y en el íleon [en el grupo control 7.85:1 y en el grupo inoculado con *Giardia* 3.87:1 ($p < 0.01$)] (Tabla 16).

Consideramos que las diferencias encontradas en el yeyuno entre el grupo control y el grupo infectado con *Giardia* fueron debidas a una abundancia de trofozoítos en esta región anatómica. Se ha documentado que *Giardia* también coloniza el yeyuno (Oberhuber *et al.*, 1997, O'handley *et al.*, 2001, Pecková *et al.*, 2018). Rosekrans *et al.* (1981) reportaron atrofia de las vellosidades y disminución de la relación vellosidad: cripta en biopsias de yeyuno de pacientes con giardiasis.

Para nosotros fue impactante encontrar diferencias significativas entre el grupo control y el grupo infectado con *Giardia* en el íleon, porque en algunas zonas del íleon hubo escasos trofozoítos; pero, podemos especular que los trofozoítos de la clona son muy agresivos, dado que proceden de un aislado de *Giardia* con capacidad invasiva (Martínez-Gordillo MN *et al.*, 2014; Reynoso *et al.*, 2015).

Entonces, aunque hubiera escasos trofozoítos, éstos alteran la arquitectura intestinal.

Con relación a la longitud de las vellosidades del intestino de los jerbos, de 10 días de edad, del grupo control, se observaron vellosidades digitiformes con dimensiones mayores [duodeno (198-246 μm), yeyuno (161-256 μm), íleon (160-200 μm) (Tablas 7, 13 y 19)] a las observadas en el grupo de jerbos infectados con *Giardia* [duodeno (137-152 μm), yeyuno (121-136 μm), e íleon (85-118 μm). (Fig.17, 20 y 23)]. El acortamiento de las vellosidades del duodeno de pacientes con giardiasis ha sido reportado en algunos estudios, se ha mostrado que la colonización de los trofozoítos en el epitelio intestinal provoca un acortamiento en la altura de las vellosidades intestinales, atrofia de microvellosidades y reducción en la actividad de las disacaridasas y las proteasas (Erlandsen & Chase., 1974, Daniels & Belosevic., 1992, Seow *et al.*, 1993, Scott *et al.*, 2004).

Nosotros encontramos aplanamiento de las vellosidades de las tres regiones del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) de jerbos de 10 días de edad. Es necesario decir que en la mayoría de los cortes analizados del duodeno y yeyuno se encontraron abundantes trofozoítos adheridos al epitelio, a lo largo de las vellosidades o en el ápice de éstas. También fue interesante encontrar cúmulos de trofozoítos muy cerca de las criptas. En el íleon hubo trofozoítos; en algunos cortes la cantidad (observaciones cualitativas) fue menor que en el duodeno y yeyuno (Fig. 23). El resultado es importante porque los jerbos de 5 días de edad fueron inoculados solamente con 25,000 trofozoítos.

Otros estudios que también evaluaron estos parámetros arrojaron diferentes resultados, por ejemplo, Buret *et al.*, (1992) inocularon 2×10^5 trofozoítos (obtenidos de un niño sintomático) a 51 jerbos de 6-7 semanas de edad y los sacrificaron 6 días post inoculación. Ellos encontraron hiperplasia de criptas, más evidenciado en duodeno, seguido el yeyuno y en menor proporción en íleon.

Por otro lado Araújo *et al* (2008) utilizaron 72 jerbos (hembras y machos) de 8 semanas de edad, libres de patógenos y los dividieron en seis grupos: A) grupo

control inoculado con PBS y cinco experimentales B-F) inoculados con el aislado Portland-1 (ATCC 30888), Ensamble A, B) 10 trofozoítos, C) 10^2 , D) 10^3 , E) 10^4 y F) 10^5 ; todos los animales fueron positivos a la infección. Los sacrificaron a los 5, 17, 23 y 35 dpi.

A los 5 dpi encontraron disminución en la relación cripta: vellosidad en los grupos C: 20% y E: 45 %. A los 17 dpi la reducción fue en el grupo D del 38% y el grupo F del 14%. A los 23 dpi la disminución fue del grupo B: 18% y el grupo C: 25%.

Bouza *et al* (2000), inocularon 2×10^6 trofozoítos de diferentes aislados obtenidos de humanos (C17, C8, C10, C20, C5, C6 y C25) a jerbos machos de 6 a 10 semanas de edad. En todos se encontraron quistes de *Giardia* en materia fecal. Los jerbos sacrificados a los 25 dpi no tuvieron trofozoítos en el intestino C17 (0/13 jerbos) y C5 (0/15). Jerbos sacrificados a los 40 dpi que tuvieron trofozoítos en el intestino: C6 (4/13), C8 (1/12) y C10 (10/11). De los jerbos sacrificados a los 60 dpi, solo uno tuvo trofozoítos en el intestino: C20 (0/15) y C25 (1/10).

Con respecto a los jerbos del grupo control, de 15 días de edad, fue importante encontrar que las dimensiones de las criptas fueron menores (duodeno de 21.75-30.45 μm ; yeyuno 21.95- 34.15 μm ; íleon 20.9-26.35 μm) que las observadas en el grupo de jerbos infectados con *Giardia* (duodeno 24.6-46.9 μm ; yeyuno 23.75-43.55 μm ; íleon 23.35-49.55 μm).

Lo contrario se observó en la altura de las vellosidades; en el grupo control fue mayor (duodeno 173.5-256.7 μm ; yeyuno 170-345.35 μm ; íleon 178.25-237.15 μm) que en el grupo infectado con *Giardia* (duodeno 115.2-160.4 μm ; yeyuno 131.3-162.8 μm ; íleon 99.6-133.8 μm). Por tales motivos, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.01$) en la relación cripta: vellosidad entre los dos grupos: duodeno del grupo control 7.91:1 y grupo infectado con *Giardia* 4.04:1. Yeyuno (9.37 vs 4.05) e íleon (8.71 vs 3.08). Hasta dónde sabemos no hay reportes de la relación C:V en jerbos de 10 y 15 días de edad.

Recapitulando, en los jerbos de 10 y 15 días de edad, infectados con 25,000 trofozoítos por vía oral, se encontraron alteraciones en la relación cripta: vellosidad.

En el grupo infectado con *Giardia*, las criptas fueron mayores y las vellosidades fueron menores; en todos los casos la infección fue evidente en los cortes histológicos, es decir el 100 % de los jerbos se infectó. Los daños provocados con la dosis baja de inóculo mostraron alteraciones histológicas en el epitelio intestinal, Reynoso *et al.*, 2015 encontraron que la infección se autocontroló a los 60 días de edad.

¿Por qué hicimos el estudio en *Meriones unguiculatus* (jerbos)? Nos basamos en evidencias científicas, ya que se ha documentado que el jerbo es un muy buen modelo experimental para el estudio de la patogenia producida por *Giardia intestinalis* (Amorin *et al.*, 2010, Belosevic *et al.*, 1983, Buret *et al.*, 1991, Buret *et al.*, 1992, Buret., 2008, Cotton *et al.*, 2011, Halliez *et al.*, 2013, Mohamed & Faubert, 1995). Adicionalmente, el grupo de investigación del Laboratorio de Parasitología experimental del INP también han realizado estudios de *Giardia* en jerbos (Reynoso *et al.*, 2015).

Con respecto a las células caliciformes, fue interesante encontrar aumento de estas células en el duodeno de los jerbos infectados con *Giardia*. ¿Por qué consideramos que fue interesante? porque los jerbos tenían 10 días de edad, porque la cuantificación de células caliciformes fue en 100,000 μm^2 , porque el inóculo fue sólo de 25,000 trofozoítos, porque hubo diferencias significativas con respecto al grupo control ($p < 0.05$) y porque hubo control del ambiente de biofero.

Mahmoud *et al* (2014) cuantificaron células caliciformes de ratas de cinco semanas de edad y no encontraron diferencias significativas entre el grupo de ratas infectadas y el grupo control. Ponce-Macotella *et al* (2008) reportaron aumento de células caliciformes en muestras de duodeno de canidos eutanasiados en un centro de control canino e hipotetizaron que los trofozoítos podrían aprovechar la disrupción epitelial para invadir el tejido.

Por otro lado, se ha documentado hiperplasia de las células caliciformes producida por los nematodos: *Ascaridia galli*, *Trichinella spiralis*, *Nippostrongylus brasiliensis* y *Trichuris muris* (Janice & Waliul., 2013) además observaron un aumento en la

mucina Muc 2 exclusivamente en ratones resistentes que se correlacionó con la expulsión del gusano después de la infección por *T. Muris* (Janice & Waliul., 2013). Araujo *et al* (2008) mencionan que por medio de la microscopía electrónica de barrido encontraron, un aumento en la cantidad de moco en los animales inoculados en relación a los del grupo control, independientemente del inóculo, hasta el día 23 post inoculación. Se encontraron trofozoítos agrupados en racimos en la parte superior y la base de las vellosidades. También observaron marcas en el epitelio de algunas vellosidades, similares a las resultantes del desprendimiento del disco suctor del trofozoíto. En el día 35 post inoculación no observaron alteraciones en la producción de moco, ni trofozoítos presentes en los intestinos de los animales control e inoculados. También se ha postulado que las cistein proteasas de *Entamoeba histolytica* rompen a la mucina Muc 2, lo que conlleva a una alteración de las capas de moco, que es aprovechado por los trofozoítos para adherirse a las células epiteliales y para invadir el tejido del intestino grueso (Janice & Waliul., 2013). En esta tesis encontramos una gran cantidad de moco y los trofozoítos estaban sobre el moco, en cúmulos entre el moco y adheridos al epitelio; debido a que *Giardia* tiene proteasas de cisteína, quizá este sea uno de los mecanismos que los trofozoítos utilizan para romper a las glicoproteínas formadoras del moco para llegar hasta el epitelio intestinal. (Fig. 36)

Como ya se había comentado con anterioridad, las células caliciformes producen y secretan mucinas. Las capas de moco son importantes para evitar la deshidratación del epitelio intestinal y para impedir que los agresores (alimentos, bacterias y parásitos) se adhieran a la mucosa y puedan invadir a las células o al tejido. Es decir, las capas de moco son un medio de defensa innata del hospedero (Janice & Waliul., 2013), y además de mejorar la barrera mucosa, pueden desempeñar un papel en la activación inmunitaria al presentar antígenos luminales a las células dendríticas de la lámina propia (Mc-Dole *et al.*, 2012)

¿Por qué en el íleon no encontramos diferencias significativas entre el grupo control (PBS) y el grupo infectado con *Giardia*? Una hipótesis es que en el grupo con PBS las vellosidades fueron más largas y digitiformes que en el grupo

infectado con *Giardia*, por lo que, al ser más largas hay más presencia de células caliciformes (Fig.38).

Con relación a los jerbos de 15 días de edad, encontramos aumento de células caliciformes en las tres secciones del intestino delgado y en éstas encontramos diferencias significativas ($p < 0.05$) con relación a los grupos control. González-González-Maciél *et al* (2017) analizaron el número de células caliciformes en el duodeno de jerbos de 14, 21 y 30 días de edad, con un inóculo de 1×10^6 trofozoítos del aislado invasor (HGINV). Los autores buscaron caliciformes con mucinas neutras, ácidas y mixtas; ellos detectaron mayor número de caliciformes con mucinas neutras en el grupo de jerbos control de 14 días de edad. Pero, encontraron mayor número de caliciformes con mezcla de mucinas y mucinas ácidas en los jerbos infectados con *Giardia* en los tres grupos de 14, 21 y 30 días de edad. En esta tesis no cuantificamos células caliciformes con mucinas ácidas; pero, debido a que encontramos aumento de las caliciformes con mucina neutra, podemos hipotetizar que los trofozoítos de la clona invasiva procedente del aislado HGINV responden diferente a los trofozoítos del aislado invasor HGINV. Adicionalmente, es importante resaltar que quizá no vimos disminución de las células caliciformes en los jerbos con *Giardia* porque fueron jerbos de 15 días de edad; es decir, eran jerbos que todavía no autocontrolaban la infección, el autocontrol de la enfermedad va encaminado con la respuesta inmune del hospedero, que puede variar dependiendo de su estado fisiológico, la respuesta inmune innata es la primera línea de defensa, la conforman barreras de las mucosas intestinales, cuenta con diversas poblaciones de células, algunas con gran capacidad fagocítica como macrófagos, y de producción de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico, como neutrófilos y eosinófilos. Además, en la respuesta innata participan células especializadas en la presentación de antígenos, como las células dendríticas, que se caracterizan por la expresión de proteínas específicas a las que se les considera clave en la integración de las respuestas innatas y adaptativas (Janeway *et al.*, 2002). Entre los mecanismos específicos se encuentran las respuestas inmunitarias basadas en mecanismos dependientes de células B y T (Singer & Nash., 2000). Las respuestas inespecíficas están

parcialmente respaldadas por el óxido nítrico, los péptidos antimicrobianos y otros (Eckmann., 2003), así como por las células caliciformes secretoras de moco que protegen el intestino al estratificar el epitelio (Ho *et al.*, 1995). Se ha reportado que en infecciones con *Nippostrongylus brasiliensis* las células caliciformes cambian de neutras a ácidas durante el proceso de expulsión del parásito (Janice & Waliul., 2013).

Por otro lado, es importante señalar que en varios cortes histológicos se encontraron posibles linfocitos entre el epitelio (Fig. 26c, 30b, 52, 53, 62, 66g, 68, 70, 71a). Otros autores también han encontrado aumento de linfocitos en muestras con *Giardia* (Singer & Nash., 2000, Farthing., 1997, Buret., 2008, Cotton *et al.*, 2011)

Debido a que *Giardia* no sintetiza *de novo* sus nutrientes, se ha documentado que este parásito compete con el hospedero por éstos (Keister., 1983; Ponce-Macotella *et al.*, 1990). *Giardia* interactúa con una triple barrera intestinal (microbiota, moco, epitelio). Los comensales se organizan principalmente en biopelículas a lo largo del tracto gastrointestinal. Se ha observado que esta microbiota residente juega un papel en la susceptibilidad del hospedero a la infección por *Giardia* (Thibault., *et al* 2017). Actualmente se ha descrito que los trofozoítos de *Giardia* compiten con el microbioma intestinal por el nutriente y por el nicho ecológico, por lo que la infección por *Giardia* se asocia con una disbiosis significativa dentro del intestino delgado anterior y posterior del ratón (Barash *et al.*, 2017). *Giardia* modifica indirectamente la disponibilidad de los recursos para otras especies de organismos en el mismo microambiente excretando nuevos productos de desecho como alanina y algunos lípidos, que pueden ser metabolizados por bacterias comensales; incluso la evidente ausencia de respuesta inflamatoria en la histopatología, la giardiasis se asocia con una alteración en las células, por ejemplo, el estrés oxidativo que a la vez da como resultado la muerte celular (Cotton *et al.*, 2015).

En la giardiasis se asocia un aumento de la tensión de oxígeno en ese entorno que generalmente es bajo en oxígeno y se sugiere que las alteraciones en el potencial redox están asociadas con niveles marcadamente más bajos de metabolismo anaeróbico por parte de la microbiota del hospedero. (Barash *et al.*, 2017).

También se manifiesta una disminución de la diversidad y abundancia de anaerobios obligados, por ejemplo: *Lactobacillaceae*, *Eryipelotichaeae*, *Ruminococcus* y *Clostridia* (Gevers *et al.*, 2014).

La microbiota intestinal puede limitar el inicio o el grado de la colonización por *Giardia* mediante un mecanismo conocido como resistencia a la colonización (Sharma *et al.*, 2013, Flavia *et al.*, 2015, Mooney *et al.*, 2015). Este mecanismo va referido a que la respuesta inmune y la composición de la microbiota intestinal están altamente vinculadas entre sí, protegiendo al epitelio de agentes patógenos (Fink & Singer., 2017).

Se cree que los miembros de la microbiota intestinal antagonizan a los patógenos, mediante la producción de bacteriocidinas ó peroxidasas que pueden matar bacterias patógenas, por ejemplo *Enterococcus* que es uno de los principales componentes del intestino delgado, produce radicales superóxido, posiblemente como mecanismo de defensa (Barash *et al.*, 2017). El metabolismo de la arginina de *Giardia spp* podría afectar directamente al metabolismo microbiano comensal (Barash *et al.*, 2017).

Barash *et al* (2017) encontraron que la giardiasis era menos severa en ratones sin bacterias y que los ratones con bacterias se agravaban la infección. Es importante señalar que en los cortes histológicos que se revisaron en esta tesis no se encontraron bacterias.

Finalmente, con la inmunohistoquímica se evidenciaron con mayor nitidez los trofozoítos. Esta técnica favoreció la detección de varios acontecimientos en el nicho intestinal. Fue interesante observar el intenso ataque de las células caliciformes sobre los trofozoítos (Fig. 72B), en varias zonas realmente parecía una estrategia ofensiva muy bien estructurada en contra del parásito; se vieron células caliciformes descargando sus gránulos de mucina, dando la impresión de un dragón vomitando fuego con gran fuerza para enviar al moco lo más lejos posible del epitelio intestinal y para alejar a los trofozoítos, quizá también para dañarlos (Fig. 71C).

Se evidenció el probable grosor del moco y a los trofozoítos formando hileras sobre esta capa; fue impresionante observar a los trofozoítos que parecían atrapados

entre ambas capas de moco, es decir, en el moco de dos vellosidades (Fig. 53). Pero fue más interesante observarlos entre el moco porque los trofozoítos logran romper a las glicoproteínas del moco; se ha documentado que *E histolytica* tiene cistein proteasas que rompen el moco (Janice & Waliul., 2013), *Giardia* también tiene cistein proteasas (Nash & Mowatt 1993; Luján *et al.*, 1995) y quizá estas proteasas jueguen un papel importante en la desintegración del moco para llegar hasta las células epiteliales. En varias zonas se detectaron trofozoítos en zig-zag hasta llegar al borde en cepillo (Fig. 54 B).

También fue evidente el daño epitelial producido por los trofozoítos, en algunas zonas con pérdida de la continuidad del epitelio, desorganización del epitelio, desprendimiento de células epiteliales, deformación de las vellosidades y en algunos cortes con fragmentos tisulares. Ceballos *et al* (1995) compararon la respuesta del hospedero ante dos cepas de *Giardia duodenalis*: (BRIS / 83 / HEPU / 106 aislada de humano y BRIS / 95 / HEPU / 2041 aislada de una *Cacatúa galerita*) que inocularon a ratas recién nacidas. Encontraron que había diferencias marcadas en la dinámica de la infección y en las respuestas histopatológicas 10 días post inoculación; la infección con la cepa de aves fue más intensa y persistió más tiempo, provocando atrofia de vellosidades intestinales e hiperplasia de células caliciformes. En algunas zonas vieron linfocitos epiteliales. Farthing (1997), Buret (2008) & Cotton *et al* (2011) también han descrito el aumento de linfocitos epiteliales en la giardiasis.

Por otro lado, en algunos cortes se observaron vellosidades muy semejantes a las reportadas en la enfermedad celiaca, es decir, vellosidades con el ápice ancho y con aumento del tamaño de las criptas que produce mala absorción intestinal (Lee *et al.*, 2019).

El plus fue, observar en varios cortes a los trofozoítos dentro del epitelio: entre la célula caliciforme, entre los enterocitos y en las criptas. Este resultado fue muy interesante porque se comprobó que los trofozoítos de la clona INP-HGInvC3a procedentes de una tercera clonación de trofozoítos de un aislado con capacidad invasiva (Martínez-Gordillo *et al.*, 2104; Reynoso *et al.*, 2015), conservaron su

potencial invasor. Como se mencionó anteriormente, los trofozoítos tienen que enfrentarse a varios obstáculos para llegar al epitelio y de allí poder pasar la barrera epitelial. Mediante estudios de transcriptoma se ha documentado que *Giardia* incrementa sus genes de: a) VSP (ricas en cisteína) que le confieren resistencia a la membrana celular y que le sirven para evadir la respuesta inmune; b) giardinas, proteínas estructurales; c) proteasas de cisteína quizá para romper a las glicoproteínas del moco y del epitelio; d) proteínas involucradas en la liberación de especies reactivas de oxígeno para dañar al epitelio; e) proteasa semejante a la catepsina B, importante porque rompe a la IL8 (quimiocina proinflamatoria) para inhibir el infiltrado de neutrófilos (DuBois *et al.*, 2006, Cotton *et al.*, 2014, Bhargava *et al.*, 2015, Emery *et al.*, 2016, Allain *et al.*, 2017).

11. CONCLUSIONES

- Se demostró que en la infección inducida con la clona INP-HGInvC3a hubo disminución en la relación cripta/vellosidad de jerbos de 10 y 15 días de edad infectados con 25,000 trofozoítos de *Giardia* con relación a los grupos de jerbos no infectados
- Se encontró hiperplasia de las células caliciformes en el intestino delgado de los jerbos inoculados con trofozoítos; excepto, en el yeyuno e íleon de los jerbos de 10 días de edad.
- Los trofozoítos de la clona INP-HGInvC3a invaden el epitelio intestinal.
- Se encontraron alteraciones en la arquitectura de la mucosa quizá debidas a apoptosis inducida por los trofozoítos de *Giardia*
- Es el primer estudio donde se utiliza como modelo biológico a *Meriones unguiculatus* de 10 y 15 días de edad inoculados con 25, 000 trofozoítos.

12. PERSPECTIVAS

- Demostrar sí el daño estructural es por apoptosis celular inducida por los trofozoítos de *Giardia* de la clona INP-HGInvC3a.
- Realizar un marcaje de linfocitos CD4 y CD8.
- Demostrar la invasión de los trofozoítos al epitelio intestinal mediante microscopia electrónica de transmisión.
- Determinar el predominio de las mucinas (ácidas, neutras o mixtas) ante la infección con trofozoítos de la clona INP-HGInvC3a y en función del tiempo.

13. REFERENCIAS

- Abe N & Teramoto I. Molecular evidence for person-to-person transmission of a novel subtype in *Giardia duodenalis* assemblage B at the rehabilitation institution for developmentally disabled people. *Parasitol Res.* 2012 110;1025–1028.
- Adam R D. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14:447-475.
- Adam R D, Nigam A, Seshadri V, Martens A C, Farneth A G, Morrison G H, Nash E T, Porcella F S & Patel R. The *Giardia lamblia* vsp gene repertoire: characteristics, genomic organization, and evolution. *BMC Genomics.* 2010; 11, 424
- Adam E A, Yoder J S, Gould L H, Hlavsa M C & Gargano J W. Giardiasis outbreaks in the United States, 1971-2011. *Epidemiol Infect.* 2016; 144(3), 1-12.
- Al-Waili N S, al-Waili B H, Saloom K Y. Therapeutic use of mebendazole in giardial infections. 1988. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82, 438.
- Allain T, Amat C B, Motta J P, Manko A & Buret A G. Interactions of *Giardia sp.* with the intestinal barrier: Epithelium, mucus, and microbiota. *Tissue barriers.* 2017;5(1), e1274354.
- Álvarez A R. Los protozoos. Características generales y su rol como agentes patógenos. *Ciencia veterinaria.* Vol 8, 2006. ISSN: 1515-1883.
- Amorim R M, Silva D A O, Taketomi A E, Morato A V G M, Mundim S J M, Ribeiro P D, Oliveira C T, Viana C J, Gomes A M & Cury C M. *Giardia duodenalis*: kinetics of cyst elimination and the systemic humoral and intestinal secretory immune responses in gerbils (*Meriones unguiculatus*) experimentally infected. *Exp Parasitol.* 2010;125, 297–303.
- Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, SvÄrd S G. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. 2010. *Nat Rev Microbiol.* 8:413-422.
- Araújo S N, Mundim J S M, Gomes A M, Amorim M R R, Viana C J, Queiroz P R, Rossi A M & Cury C M. *Giardia duodenalis*: Pathological alterations in gerbils, *Meriones unguiculatus*, infected with different dosages of throzoites. *Exp Parasitol.* 2008;118; 449-457.
- Argüello R, Leitsch D, Skinner-Adams T & Ortega-Pierres M G. Drug resistance in *Giardia*: Mechanisms and alternative treatments for giardiasis. 2020. *Advances in Parasitology*; ISSN 0065-308X.
- Ballweber L R, Xiao L, Bowman D D, Kahn G & Cama V A. Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. *Trends Parasitol.* 2010;26 (4), 180–189.
- Barash N R, Maloney J G, Singer S M & Dawson S C. *Giardia* alters commensal microbial diversity throughout the murine gut. *Infect Immun.* 2017;85:e00948-16.
- Bassily S, Farid Z, Mikhail J W, Kent D C, Lehman J S J. The treatment of *Giardia lamblia* infection with mepacrine, metronidazole and furazolidone. 1970. *J. Trop. Med. Hyg.* 73, 15–18.
- Bassily S, Farid Z, el-Masry N A, Mikhail E M. Treatment of intestinal *E. histolytica* and *G. lamblia* with metronidazole, tinidazole and ornidazole: a comparative study. 1987. *J. Trop. Med. Hyg.* 90, 9–12.
- Bhargava A, Cotton J A, Dixon B R, Gedamu L, Yates R M & Buret A G. *Giardia duodenalis* surface cysteine proteases induce cleavage of the intestinal epithelial cytoskeletal protein villin via myosin

light chain kinase. PLoS one. 2015;10(9): e0136102.

Belosevic M, Faubert G M, MacLean J D, Law C & Croll N A. *Giardia lamblia* infections in Mongolian gerbils: an animal model. Journal of Infectious Diseases. 1983;147, 222–226.

Belosevic M, Faubert G M & MacLean J D. Disaccharidase activity in the small intestine of gerbils (*Meriones unguiculatus*) during primary and challenge infections with *Giardia lamblia*. Gut. 1989;30:1213–1219.

Booth C & Potten C. Gut instincts: Thoughts on intestinal epithelial stem cells. J Clin Invest. 2000;105:1493-9.

Bouza M, Maciques I, Torres D & Núñez A F. *Giardia lamblia* in Mongolian Gerbils: Characteristics of Infection Using Different Human Isolates. Exp Parasitol. 2000;96, 43–46.

Bouzid M, Steverding D & Tyler K M. Detection and surveillance of waterborne protozoan parasites. Curr Opin Biotechnol. 2008;19, 302-306.

Brandborg L L, Tankersley C B, Gottlieb S, Barancik M & Sartor V E. Histological demonstration of mucosal invasion by *Giardia lamblia* in man. Gastroenterol. 1967; 52, 143–150.

Buret A, Gall D G & Olson M E. Growth, activities of enzymes in the small intestine and ultrastructure of microvillous border in gerbils infected with *Giardia duodenalis*. Parasitol Res. 1991;77, 109–114.

Buret A, Hardin J A, Olson M E & Gall G. Pathophysiology of the small intestinal malabsorption in gerbils infected with *Giardia lamblia*. Gastroenterol. 1992;103, 506–513.

Buret A. Mechanisms of epithelial dysfunction in giardiasis. Gut. Mar. 2007; 56(3): 316–317.

Buret A. Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalis*. Parasite. 2008;15, 261–265.

Cacciò S M & Ryan U. Molecular epidemiology of giardiasis. Molecular and Biochemical Parasitology. 2008;160, 75–80.

Cacció S M, Lalle M & Sveard S G. Host specificity in the *Giardia duodenalis* species complex. Infect Genet Evol. 2018;66, 335–345.

Canete R, Escobedo A A, Gonzalez M E, Almirall P. Randomized clinical study of five days apostrophe therapy with mebendazole compared to quinacrine in the treatment of symptomatic Giardiasis in children. 2006a. World J. Gastroenterol. 12, 6366–6370.

Canete R, Escobedo A A, Gonzalez M E, Almirall P, Cantelar N. A randomized, controlled, open-label trial of a single day of mebendazole versus a single dose of tinidazole in the treatment of Giardiasis in children. Curr. Med. Res. Opin. 22, 2131–2136.

Carranza P G, Feltes G, Ropolo A, Quintana C M S, Touz C M & Luján D H. Simultaneous expression of different variant-specific surface proteins in single *Giardia lamblia* trophozoites during encystation. Infect Immun. 2002;70, 5265–5268.

Cavalier S T. Amoeboflagellates and mitochondrial cristae in eukaryote evolution: megasystematics of the new protozoan subkingdoms eozoa and neozoa. Archiv für Protistenkunde. Volume 147, issues 3-4; 1997. 237-258.

Ceballos A M, Carnaby S, James M & Farthing JG. Small intestinal injury in a neonatal rat model of giardiasis is strain dependent. Gastroenterol. 1995;109:766–773

- Cedillo R R, Leal A Y, Mulia Y L, Delgado G A, Pierres O G, Conyer T R & Muñoz O. Seroepidemiology of giardiasis in Mexico. *Am. J. Trop. Med Hyg.* 2009;80, 6–10.
- Chadee K, Ndarathi C & Keller K. Binding of proteolytically degraded human colonic mucin glycoproteins to the Gal/Gal/Nac adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *Gut.* 1990;31:890–895
- Chin A C, Teoth D A, Scott K G, Meddings J B, Macnaughton W K & Buret AG. Strain-independent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *Infect Immun.* 2002;70:3673– 3680.
- Cotton J A, Beatty J K & Buret A G. Host-parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *Int. J. Parasitol.* 2011;41, 925–933.
- Cotton J A, Bhargava A, Ferraz J G, Yates R M, Beck P L & Buret A G. *Giardia duodenalis* cathepsin b proteases degrade intestinal epithelial interleukin-8 and attenuate interleukin-8-induced neutrophil chemotaxis. *Infect Immun.* 2014;82(7):2772-87.
- Cotton J A, Amat CB, Buret AG. Disruptions of host immunity and inflammation by *Giardia duodenalis*: potential consequences for co infections in the gastrointestinal tract. 2015. *Pathogens* 4:764–792.
- Daniels C W, & Belosevic M. Disaccharidase activity in the small intestine of susceptible and resistant mice after primary and challenge infections with *Giardia muris*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 1992;46, 382–390.
- Dawson S C. An insider's guide to the microtubule cytoskeleton of *Giardia*. *Cell Microbiol.* 2010; 12:588-598.
- Dib H H, Lu S Q & Wen S F. Prevalence of *Giardia lamblia* with or without diarrhea in South East, South East Asia and the Far East. *Parasitol Res.* 2008;103, 239–251.
- Dimitrijevic B, Borozan S, Katic-Radivojevic S. Stojanovic S. Effects of infection intensity with *Strongyloides papillosus* and albendazole treatment on development of oxidative/nitrosative stress in sheep. 2012. *Vet. Parasitol.* 186, 364–375.
- Di Prisco M C, Jimenez J C, Rodriguez N, Costa V, Villamizar J, Silvera A, Carrillo M, Lira C, Zepa E, Lopez Y. Clinical trial with Secnidazole in a single dose in Venezuelan children infected by *Giardia intestinalis*. 2000. *Invest. Clin.* 41, 179–188.
- DuBois K N, Abodeely M, Sajid M, Engel J C & McKerrow J H. *Giardia lamblia* cysteine proteases. *Parasitol Res.* 2006; 99(4):313-6.
- Eckmann L. Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite Immunol.* 2003; 25:259–270.
- Eckman L & Gillin F D. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial mucosa interactions. I. Pathophysiological aspects of enteric infections with the lumen-dwelling protozoan pathogen *Giardia lamblia*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;280: G1-6.
- Emery S J, Mirzaei M, Vuong D, Pascovici D, Chick J M, Lacey E & Haynes P A. Induction of virulence factors in *Giardia duodenalis* independent of host attachment. *Scientific Rep.* 2016;6:20765.
- Erlandsen S L & Chase D G. Morphological alterations in the microvillous border of villous epithelial cells produced by intestinal microorganisms. 1974. *American Journal of Clinical Nutrition;* 27, 1277–1286.

- Erlandsen S L, Bemrick W L, Wells C L, Feely D E, Knudson L I, Campbell S R, Van Keulen H & Jarroll E L. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). J Parasitol. 1990; 76:717-24.
- Escobedo A A, Cimerman S. 2007. Giardiasis: a pharmacotherapy review. Expert Opin. Pharmacother. 8, 1885–1902.
- Farthing M J G. The molecular pathogenesis of *Giardiasis*. J Pediatric Gastroenterol Nutr. 1997;24:79-88.
- Faubert G. Immune response to *Giardia duodenalis*. Clin Microbiol Rev. 2000; 13:35–54
- Feng Y & Xiao L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. Clin Microbiol Rev. 2011;24 (1), 110–140.
- Ferrufino J C, Taxa L & Gladis A. Histología normal del intestino delgado. Rev Med Hered. 1996; 7:46-57.
- Filice F P. Studies on the cytology and the life history of a *Giardia* from the laboratory rat. Zool. 1952; 57, 53–146.
- Fink Y M & Singer M S. The intersection of Immune Responses, Microbiota, and Pathogenesis in Giardiasis. 2017. Elsevier Ltd. Trends in Parasitology.
- Flavia Nardy A, Freire-de-Lima CG, Morrot A. Immune evasion strategies of *Trypanosoma cruzi*. 2015. J Immunol Res:178947.
- Fleck S L, Hames S E & Warhurst D C. Detection of *Giardia* in human jejunum by the immuno peroxidase method. Specific and non-specific results. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1985; 79, 110–113.
- Gascon J, Moreno A, Valls M E, Miro J M, Corachan M. Failure of mebendazole treatment in *Giardia lamblia* infection. 1989. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 83, 647
- Gardner T B, Hill D R, 2001. Treatment of Giardiasis. Clin. Microbiol. Rev. 14, 114–128.
- Geurden T, Olson M. *Giardia* in pets and farm animals, and their zoonotic potential. Springer, Wien. 2011; pp 71–92.
- Gevers D, Kugathasan S, Denson LA, Vazquez-Baeza Y, Van Treuren W, Ren B, Schwager E, Knights D, Song SJ, Yassour M, Morgan XC, Kostic AD, Luo C, Gonzalez A, McDonald D, Haberman Y, Walters T, Baker S, Rosh J, Stephens M, Heyman M, Markowitz J, Baldassano R, Griffiths A, Sylvester F, Mack D, Kim S, Crandall W, Hyams J, Huttenhower C, Knight R, Xavier RJ. The treatment-naive microbiome in newonset Crohn's disease. 2014. Cell Host Microbe 15:382–392.
- Gillin F D & Diamond L S. Clonal growth of *Giardia lamblia* trophozoites in semisolid agarose medium. J Parasitol. 1980;66:350-2.
- Gilling F D, Reiner D S, Wang C S. Killing of *Giardia lamblia* trophozoites by normal human milk. J Cell Biochem. 1983; 23:47–56.
- González M A, Rosas L L E, Alfaro R A, Ponce M M & Reynoso R R. Caracterización de la población de células caliciformes y su histoquímica en duodeno en un modelo biológico con jerbos parasitados con aislados diferentes de *Giardia intestinalis*. Nueva Época Veterinaria. 2017; ISSN: 2448-6612.

- Gookin J L, Stebbins M E & Hunt E. Prevalence of and risk factors for feline *Tritrichomonas foetus* and *Giardia* infection. *J Clin Microbiol.* 2004;42:2707-10.
- Halliez M C M & Buret A G. Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World J. Gastroenterol.* 2013;19, 8974–8985.
- Hanevik K, Hausken T, Morken M H, Strand E A, Mørch K, Coll P, Helgeland L, Langeland N. Persisting symptoms and duodenal inflammation related to *Giardia duodenalis* infection. *J Infect.* 2007; 55(6):524–530.
- Harris J C, Plummer S & Lloyd D. Antigiardial drugs. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001; 57:614–619.
- Hemphill A, Muller N, & Muller Joachin. (2019). Comparative Pathobiology of the Intestinal Protozoan Parasites *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* and *Cryptosporidium parvum*. *Pathogens.* 2019;29;8(3):116.
- Hoffman P S, Sisson G, Croxen M A, Welch K, Harman W D, Cremades N, Morash M G. Antiparasitic drug nitazoxanide inhibits the pyruvate oxidoreductases of *Helicobacter pylori*, selected anaerobic bacteria and parasites, and *Campylobacter jejuni*. 2007. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 868–876.
- Ho S B, Robertson A M, Shekels L L, Lyftogt C T, Niehans G A & Toribara N W. Expression cloning of gastric mucin complementary DNA and localization of mucin gene expression. *Gastroenterol.* 1995; 109:735–747.
- Homan W L & Mank T G. Human giardiasis: Genotype linked differences in clinical symptomatology. *Int J Parasitol.* 2001;31:822-6.
- Janice J K & Waliul I K. “Goblet Cells and Mucins: Role in Innate Defense in Enteric Infections”. *Pathogens.* 2013; 2, 55-70; ISSN 2076-0817.
- Janeway C A Jr, & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 20, 197-216. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359
- Jokipii L, Jokipii A M. Treatment of Giardiasis: comparative evaluation of ornidazole and tinidazole as a single oral dose. 1982. *Gastroenterology* 83, 399–404.
- Keister D B. Xenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 1983;77:487-8.
- Kotloff K L, Nataro J P, Blackwelder W C, Nasrin D, Farag T H, Panchalingam S, Wu Y, Sow SO, Sur D & Breiman R F. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case control study. *Lancet.* 2013;382:209-222.
- Lee M, Baetman S, Luga A, YangMin H, Fleming J, Green H P, Leobwohl B & Laga M S. An association between crypt apoptotic bodies and mucosal flattening in celiac disease patients exposed to dietary gluten. *Diagnostic pathology.* 2019; 14(1), 98.
- Leitsch D. Drug resistance in the microaerophilic parasite *Giardia lamblia*. *Curr. Trop. Med. Rep.* 2, 128–135.
- Locatelli C, Pedrosa R C, De Bem A F, Creczynski-Pasa T B, Cordova C A S, Wilhelm-Filho D A. comparative study of albendazole and mebendazole induced, time dependent oxidative stress. 2004. *Redox Rep.* 9, 89–95.

- Luján H D, Mowatt M R, Wu J J, Lu Y, Lees A, Chancd M R & Nash T E. Purification of a variant-specific surface protein of *Giardia lamblia* and characterization of its metal-binding properties. *J Biol Chem*. 1995; 270: 29307-13.
- Mahmoud A, Attia R, Said S & Ibraheim Z. Ginger and Cinnamon: Can This Household Remedy Treat Giardiasis? *Parasitological and Histopathological Studies*. *Iranian J Parasitol*. Vol. 9, No. 4. 2014; pp.530-540.
- Martén O Alfredo. "Las hormonas del tubo digestivo" *Act. Méd. Cost*. 1978; Vol. 21 - No. 4, 387389.
- Martinez E R, Argüello G R, Saavedra E, Ortega P G. Albendazole induces oxidative stress and DNA damage in the parasitic protozoan *Giardia duodenalis*. 2015. *Front. Microbiol*. 6, 800.
- Martínez G M N, González M A, Reynoso R R, Montijo B E & Ponce M M. Intraepithelial *Giardia Intestinalis*: A Case Report and Literature Review. *Medicine*. 2014; 93(3):1-5.
- McDole J R, Wheeler L W, McDonald K G, Wang B, Konjufca V, Knoop K A, Newberry R D & Miller M J. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature*. 2012; 483, 345–349.
- Mohamed S R & Faubert G M. Disaccharidase deficiencies in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) protected against *Giardia lamblia*. *Parasitol Res*. 1995;81, 582–590.
- Monis P T, Andrews R H, Mayrhofer G & Ey P L. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infection Genetics and Evolution*. 2003; 3, 29–38.
- Mooney JP, Lokken KL, Byndloss MX, George MD, Velazquez EM, Faber F, Butler BP, Walker GT, Ali MM, Potts R, Tiffany C, Ahmer BM, Luckhart S, Tsolis RM. Inflammation-associated alterations to the intestinal microbiota reduce colonization resistance against non-typhoidal *Salmonella* during concurrent malaria parasite infection. 2015 *Sci Rep* 5:14603.
- Morecki R & Parker J G. Ultrastructural studies of human *Giardia lamblia* and the subjacent jejunal mucosa in a subject with steatorrhea. *Gastroenterol*. 1967;52, 151–164.
- Muller J, Wastling J, Sanderson S, Muller N, Hemphill A. A novel *Giardia lamblia* nitroreductase, GINR1, interacts with nitazoxanide and other thiazolides. 2007b. *Antimicrob. Agents Chemother*. 51, 1979–1986.
- Nain B C, Dutt P, Vinayak V K. Alterations in enzymatic activities of the intestinal mucosa during the course of *Giardia lamblia* infection in mice. *Ann Trop Med Parasitol*. 1991; 85:515–522.
- Nash T & Mowatt M. Variant-specific surface proteins of *Giardia lamblia* are zinc-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci*. 1993;90:5489-93.
- Oberhuber G, Kaster N & Stolte M. Giardiasis: a histologic analysis of 567 cases. *Scandinavian Journal of Gastroenterol*. 1997;32, 48–51.
- O'Handley R M, Buret A G, McAllister T A, Jelinski M & Olson M E. Giardiasis in dairy calves: effects of febendazole treatment on intestinal structure and function. *Int J Parasitol*. 2001; 31:73–79.
- O'Handley R M, Cockwill C, McAllister T A, Jelinski M, Morck D W & Olson M E. Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and association with diarrhea. *J Am Vet Med Assoc*. 1999;214:391–396.

- Ortega P G, Cacciò S, Fayer R, Mank T G, Smith H V & Thompson R C. “*Giardia* and *Cryptosporidium* from molecules to disease”. CAB International. 2009; pp 89-90.
- Otero N J, Martínez-Gordillo M N, Ibarra V F & Ponce-Macotela M. “Prevalencia de *Giardia intestinalis* y predominio de genotipos zoonóticos en ovinos y bovinos de traspatio de cinco estados de la República Mexicana”. Vet. Méx., 42(3) 2011.
- Parcina M, Reiter O I, Mockenhaupt F P, Vojvoda V, Gahutu J B, Hoerauf A & Ignatius R. Highly sensitive and specific detection of *Giardia duodenalis*, *Entamoeba histolytica*, and *Cryptosporidium* spp. in human stool samples by the BD MAX Enteric Parasite Panel. Parasitol Res. 2018;67: 020
- Parenti D M. Characterization of a thiol proteinase in *Giardia lamblia*. J Infect Dis. 1989; 160:1076–1080
- Ponce M M, Martínez G M N & Álvarez C F R. Obtención y cultivo de *Giardia* spp. Infectología. 1990;10:91-5.
- Ponce M M, Martínez G M N, Bermúdez C R M, Salazar S P M, Ortega P G & Ey P L. Unusual prevalence of the *Giardia intestinalis* A-II subtype amongst isolates from humans and domestic animals in Mexico. Int J Parasitol. 2002; 32: 1201-2.
- Ponce M M, Peralta A G E, Martínez G M N. *Giardia intestinalis* and other zoonotic parasites: Prevalence in adult dogs from the southern part of Mexico City. 2005. Veterinary Parasitology. 131.
- Ponce M M, González M A, Reynoso R R & Martínez G M N. Goblet cells: are they the first unspecific barrier against *Giardia intestinalis* or a gate? Parasitol Res. 2008;102; 309-13.
- Ponce M M & Martínez G M N. Giardiosis. en Becerril F M A. Editor. Parasitología médica: Tercera Edición. Editorial, MacGraw-Hill, Interamericana, México. 2011;ISBN:978-607-15-0512-5.
- Qin X, Caputo F & Xu D. Hydrophobicity of mucosal surface and its relationship to gut barrier function. Shock. 2008; 29:372-6.
- Ramírez O S, Cotte A J D, Escobedo A A & Rodríguez M A J. Prevalence of zoonotic and non-zoonotic genotypes of *Giardia intestinalis* in cats: a systematic review and meta-analysis. Infez. Med. 2017;25 (4), 326–338.
- Rayan P, Stenzel D & McDonnel A. The effects of saturated fatty acids on *Giardia duodenalis* trophozoites in vitro. Parasitol Res. 2005;97:191–200.
- Read C M, Monis P T & Thompson R C. Discrimination of all genotypes of *Giardia intestinalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. Infect Genet Evol. 2002;4:125-30.
- Reynoso R R, Ponce M M, Martínez G M N, Rosas L L E, Ramos M A & González M A. The invasive potential of *Giardia intestinalis* in an in vivo model. Scientific Reports. 2015; 5:15168.
- Rosekrans M C P, Lindeman J & Meijer M L J C. Quantitative Histological and Immunohistochemical Findings in Jejunal Biopsy Specimens in Giardiasis. Virchows Archiv (Pathol Anat). 1981; 393:145-151.
- Ross H, M & Pawlina M D W. “Histología Texto y atlas a color con Biología Celular y Molecular” USA. 5ta edición., Editorial Panamericana. 2006; pp 583-584.
- Roxström L K, Ringqvist E, Palm D & SvÄrd. *Giardia lamblia*-induced changes in gene expression in differentiated caco-2 human intestinal epithelial cells. Infect. Immun. 2005; 73, 8204–8208.

- Ruggiero M A, Gordon D P, Orrell T M, Bailly N & Burgoin T. Correction: A Higher Level Classification of All Living Organisms. Plos one. 2015; 10(6): e0130114.
- Ryan U & Cacciò S M. Zoonotic potential of *Giardia*. Int. J. Parasitol. 2013; 43 (12–13), 943–956.
- Sabchareon A, Chongsuphajaisiddhi T, Attanath P. Treatment of Giardiasis in children with quinacrine, metronidazole, tinidazole and ornidazole. 1980. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 11, 280–284.
- Saha T K & Ghosh T K. Invasion of small intestinal mucosa by *Giardia lamblia* in man. 1997. Gastroenterology.;72, 402–405.
- Sahatchai T & Scorza V. Update on the Diagnosis and Management of *Giardia spp* infections in cats and dogs. 2010; 157.
- Savioli L, Smith H & Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the ‘Neglected Diseases Initiative’. Trends Parasitol. 2006; 22, 203–208.
- Scorza A V & Lappin M R. Co-infection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in naturally infected cats, in Diagnosis and Treatment of Cryptosporidiosis and Giardiasis in Cats and Dogs in the United States. Arch Med Vet. 2007; 47, 1-6
- Scott K G, Yu L C & Buret A G. Role of CD8+ and CD4+ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. Infection and Immunity. 2004; 72, 3536–3542.
- Seow F, Katelaris P & Ngu M. The effect of *Giardia lamblia* trophozoites on trypsin, chymotrypsin and amylase *in vitro*. 1993. Parasitology;106, 233–238.
- Sharma A, Dhayal D, Singh OP, Adak T, Bhatnagar RK. Gut microbes influence fitness and malaria transmission potential of Asian malaria vector *Anopheles stephensi*. 2013. Acta Trop 128:41–47.
- Sinelnikov I, Sion V N & Shaco L R. C-kit (CD117) immunostain is useful for the diagnosis of *Giardia lamblia* in duodenal biopsies. Hum Pathol. 2009; 40:323–325
- Singer S M & Nash T E. T-cell dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. Infect Immun. 2000; 68:170–175.
- Sprong H, Caccio S M & van der Giessen J W. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. PLoS Negl. Trop. Dis. 2009; 3, e558.
- Upcroft J A, Upcroft P & Boreham P F. (1990). Drug resistance in *Giardia intestinalis*. Int J Parasitol. 1990; 20:489–496.
- Van Keulen H, Feely D E, Macechko P T, Jarroll E L & Erlandsen S L. The sequence of *Giardia* small subunit rRNA shows that voles and muskrats are parasitized by a unique species *Giardia microti*. J Parasitol. 1988; 84:294-300.
- Van-Voorhis W. Protozoan infections. Sci. Am. Med. 2014; 10.2310/7900.1015.
- Vasilopoulos R J, Mackin A J & Rickard L G. Prevalence and factors associated with fecal shedding of *Giardia spp*. in domestic cats. J Am Anim Hosp Assoc. 2006; 42:424-429.
- Vivancos V, Gonzalez A I, Bermejo M, Gonzalez A M. Giardiasis: characteristics, pathogenesis and new insights about treatment. 2018. Curr. Top. Med. Chem. 18, 1287–1303.

Watkins R R & Eckmann L. Treatment of giardiasis: current status and future directions. *Curr Infect Dis Rep.* 2014; 16:396.

Wu R Q, Zhang D F, Tu E, Chen Q M & Chen W. (2014). The mucosal immune system in the oral cavity an orchestra of T cell diversity. *Int J Oral Sci*, 6(3), 125-132. doi: 10.1038/ijos.2014.48

Xiao L, Saeed K, Herd R P. Efficacy of albendazole and febendazole against *Giardia* infection in cattle. *Vet Parasitol.* 1996; 61: 165–170.

Zhao Z, Dong H, Wang R, Zhao W, Chen G, Li S, Qi M, Zhang S, Jian F, Zhao J, Zhang L, Wang H, Liu A. 2014. Genotyping and subtyping *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* carried by flies on dairy farms in Henan, China. *Parasit. Vectors* 7, 190.

14. ANEXO

Preparación de buffer fosfato salino (PBS).

Los reactivos se pesaron en una balanza analítica, se agregó el agua y se homogeneizó con un agitador magnético. Con un potenciómetro se midió el pH, el cual tenía que ser de 7.2 – 7.4 y se aforó a 1.0 L, finalmente se llevó a esterilizar y al momento que se requería la solución, se tenía que manipular en la campana con uso de guantes y todo el material previamente esterilizado.

Reactivo	Cantidad en		Cantidad en gramos
	mM	M	
NaCl		0.137	8
Kcl	2.7		.20
KH ₂ PO ₄	1.4		.24
Na ₂ H		0.01	1.44

Preparación de formol al 60% amortiguado al 4%.

Se prepararon 500 mL de formol buferado para el envío y conservación de las muestras.

Reactivo	Cantidad en mL
Formol al 60%	20
Solución fosfato amortiguada (PBS)	480

Solución de Citratos.

Se utilizó para el desenmascaramiento antigénico. Se prepararon 400 mL con agua desionizada y se ajustó el pH a 6.0

Reactivo	Molar	Gramos
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	0.09	6.0228
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	0.06	5.671

Peróxido de hidrógeno.

Para bloquear la peroxidasa endógena se utilizó esta solución que se preparó al 3% por cada 100 mL

Reactivo	Cantidad en mL
Agua destilada	97
Peróxido de hidrógeno	3

PBS Tween 20

Se utilizó como un detergente para el lavado de las laminillas.

Reactivo	Cantidad en mL
PBS estéril	500
Solución T-20	0.5