

14  
24  
302827

# UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C.

ESCUELA DE QUIMICA  
CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ALTERACIONES HISTOPATOLOGICAS EN  
RATAS INOCULADAS CON DIFERENTES  
CEPAS DE GIARDIA LAMBLIA Y SU RELACION  
CON LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA  
LACTASA

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A:  
LAURA LETICIA ROMAN MARIN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1991



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## I N D I C E

	Pág
CAPITULO I.- INTRODUCCION .....	1
CAPITULO II.- INFORMACION GENERAL SOBRE EL TEMA .....	5
CAPITULO III.- PARTE EXPERIMENTAL .....	8
3.1.- Diseño experimental .....	8
3.2.- Material, Equipo y Reactivos .....	9
3.2.1.- Material Biológico .....	9
3.2.2.- Material de Laboratorio .....	9
3.2.3.- Equipo de Laboratorio .....	10
3.2.4.- Reactivos .....	11
3.2.4.1.- Preparación de reactivos ....	12
3.3.- Metodología .....	20
3.3.1.- Aislamiento de treinta y cinco cepas de Giardia lamblia.....	20 20
3.3.2.- Preparación de las ratas .....	20
3.3.3.- Obtención de 304 crías con un peso prome dio de 40 g. ....	20 20
3.3.4.- Inoculación de las cepas de Giardia lam blia en los animales experimentales ....	21 21
3.3.5.- Cuantificación de los quistes de Giardia lamblia para su inoculación en los anima les experimentales .....	21 21
3.3.6.- Demostración de Giardia lamblia en las -	

	Pág.
heces fecales y su incremento de peso ..	22
3.3.7.-Reacción Inmunológica de los animales -- inoculados con <u>Giardia lamblia</u> , determina da por el título de anticuerpos del sue- ro contra Giardia (cepa homóloga y - -- Portland) .....	22
3.3.8.-Observación del protozooario en la pared luminal mediante improntas de las ratas experimentales y testigo, vistas al mi-- croscopio de Fases .....	23
3.3.9.-Cuantificación de la actividad de la lac tasa en el intestino de los animales ino culados con las 35 cepas de <u>Giardia lam- blia</u> .....	23
3.3.10.Demostración de la virulencia de las 35 cepas de <u>Giardia lamblia</u> de acuerdo a -- las alteraciones histopatológicas en el duodeno de las ratas inculadas y contro les, observadas al microscopio óptico ..	26
3.3.11.Observación al microscopio Electrónico .	27
3.4.- Análisis Estadístico .....	28
CAPITULO IV.- RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	29
4.1.- Resultados .....	29

<b>4.2.- Discusiones .....</b>	<b>Pág</b> <b>51</b>
<b>CAPITULO V.- CONCLUSIONES .....</b>	<b>56</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>58</b>

**CAPITULO I**

## I N T R O D U C C I O N

El síndrome de mala absorción ocasionado por Giardia lam-  
blia en el hombre, es una consecuencia de la adherencia y proba-  
blemente invasión del protozoario a las estructuras de la mucosa  
intestinal (18,20,22).

La colonización (24) produce alteraciones en las microve-  
llosidades, criptas y/o muscularis mucosa, ocasionando el apla-  
namiento y acortamiento de ellas (7,9,15,41,44) entre otras al-  
teraciones.

Por otro lado también se puede presentar la reacción infla-  
matoria causada por los leucocitos polimorfonucleares, así como  
una hiperplasia linfática (5,19,31), lo cual habla de la presen-  
cia de estímulos antigénicos del protozoario.

Todos estos eventos coadyuvan a una deficiente absorción -  
de: a) Grasas, b) Vit A y Vit B-12, c) D-xilosa y Protefnas (23,  
27,30,43).

Como resultado de las modificaciones histológicas, también  
se producen alteraciones bioquímicas, específicamente de las di-  
sacaridas; lactasa, maltasa y sacarosa (28), presentes en las -  
células intestinales, modificando la absorción de glucosa, mal-  
tosa y fructuosa.

Al presentarse esta parasitosis en los niños, de manera -

crónica, los resultados son: una deficiente absorción intestinal de los nutrientes necesarios, para un adecuado crecimiento, desarrollo y consecuente aprendizaje en la edad escolar (4,6,11, 17,29,44).

La eliminación del parásito con el tratamiento convencional da como resultado el restablecimiento de las estructuras dañadas y de la absorción intestinal. Sin embargo el daño ocasionado en esta etapa de desarrollo podría dejar deficiencias irreversibles (38).

Por otro lado en este protozoario se han descrito diferentes niveles de virulencia (14,25), planteando las posibilidades de reinfecciones con cepas que contengan epítopos distintos; - por lo que la inmunidad adquirida al padecer la enfermedad no siempre es igual. Sin dejar de considerar otro parámetro como - la relación huésped-parásito muy importante de incluir (2).

En un trabajo previo realizado en el Laboratorio de Investigación en Parasitología del Hospital Infantil de México (Botello, 1988), se demostró la variación en virulencia de 10 cepas de Giardia lamblia. El autor en su trabajo utilizó como marcadores de diferencia en patogenicidad a:

- a) Pérdida de peso durante la infección aguda
- b) Variación del título de anticuerpos
- c) Estudio histopatológico.

Las diferencias mostradas por las 10 cepas probadas en el estudio fueron significativas por lo que se determinó la existencia de diferencias de patogenicidad de las cepas. Sin embargo para establecer este hecho se debe aumentar el número de cepas a ensayar así como el número de animales usados como modelo experimental, además de involucrar más marcadores de las diferencias en patogenicidad.

En el presente ensayo se utilizaron la obtención de 35 cepas de G. lamblia, así como un mayor número de crías (cinco veces más) además de involucrar el parámetro de la determinación en las alteraciones de la actividad enzimática (lactasa) del epitelio de los animales infectados, como también la utilización de la técnica de Pass-Shiff para evidenciar la presencia de los trofozoitos adheridos en el epitelio intestinal de los animales experimentales.

El objetivo de este estudio fue determinar experimentalmente en animales de laboratorio diferencias en la capacidad invasora de 35 cepas de Giardia lamblia, mostradas por las alteraciones histológicas y enzimáticas de la mucosa intestinal, incluyendo la respuesta humoral a sus epítomos.

La hipótesis del presente trabajo fue considerar que la capacidad invasora de 35 cepas de Giardia lamblia se manifestaba por las alteraciones histopatológicas del intestino delgado así como una disminución en la actividad de las disacaridasas y la

respuesta humoral determinada por el título de anticuerpos en el suero de tal manera que una de las modificaciones en la absorción intestinal era consecuencia de la ganancia o pérdida de peso de los animales inculados comparados con los animales sin inocular.

CAPITULO II

## INFORMACION GENERAL SOBRE EL TEMA

Giardia lamblia es un protozoo flagelado de la clase -- Mastigosphora descubierto en 1681, su habitat es el lumen del - intestino delgado del hombre (8,10). Sin embargo igualmente se le puede encontrar en ratas, castores o perros (14,16).

La infección de este protozoo generalmente se lleva a - cabo al ingerir aguas contaminadas o bien una transmisión directa al llevarse a la boca objetos con restos de heces contaminadas con quistes (33,37,42).

Numerosos reportes indican que Giardia lamblia se aisla -- frecuentemente en niños sin importar el sexo, desarrollándose - en ellos patología digestiva como: diarrea, vómito y mala absorción. Afectando también peso, talla y en general el estado nutricional del huésped (2), además de otras complicaciones al localizarse en la vesícula biliar (15,19,32).

Por otro lado, en ocasiones no se presenta ninguna síntomatología, lo cual hace suponer que existen diferencias en cuanto a patogenicidad en este protozoo y/o que la relación huésped parásito es determinante para que se manifieste en forma patogénica como se ha demostrado experimentalmente, en donde la función inmunológica juega un papel importante (1,12,20,33,37).

Inicialmente se demostró la invasión del protozoo a la

mucosa intestinal (1,21), posteriormente se observó como este protozoario se adosaba por medio del disco suctorio formando una barrera mecánica que impedía la absorción de estos, aún - en ausencia de diarrea (22,34,38,40).

Por razones no conocidas el protozoario se desprende - de la mucosa y de esta manera es excretado con las heces fecales, comenzando su fase de enquistamiento. Esta forma de resistencia al ser ingerido por otro huésped reinicia su ciclo biológico (40)

Sin embargo existen algunos factores que determinan a la infección ya que en animales de laboratorio se ha demostrado cierta resistencia a la infección con este protozoario --- (36) lo que supone, que existe algún factor genético que determina experimentalmente la infección.

Por otro lado se ha demostrado que Giardia lamblia se - ve afectada por la acción de las lipasas de la leche humana - inhibiendo el desarrollo y colonización del protozoario, por lo que en los niños lactantes alimentados por la madre, es poco probable la infección.

No obstante hay modelos experimentales en los que la - infección con Giardia lamblia es relativamente fácil (12,14), en el presente caso al utilizar ratas Long-Evans no se tuvo - dificultad para llevar a cabo el trabajo.

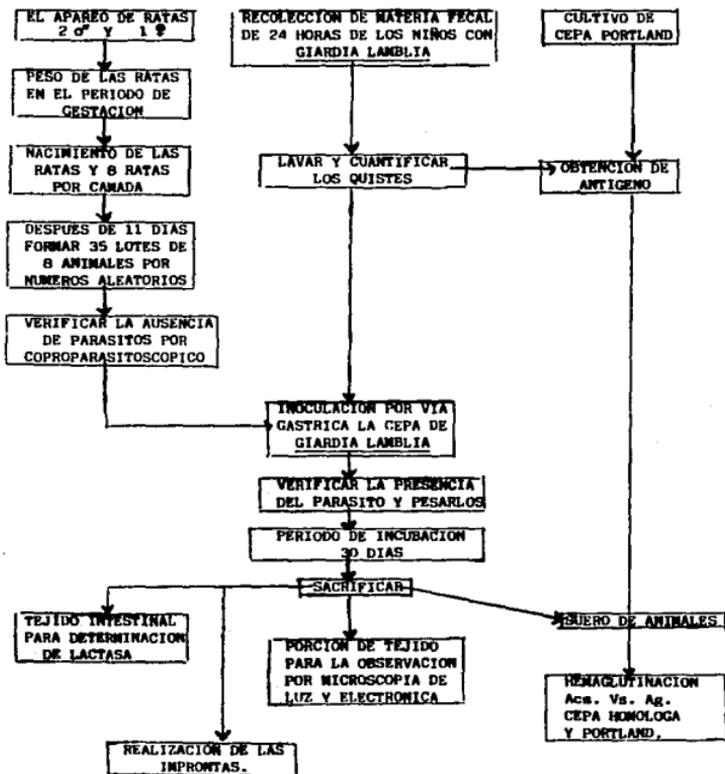
En los niños la importancia de diagnosticar Giardia lamblia

esta basada en dos aspectos determinantes; primero la frecuencia con que se presenta este protozooario en esta edad y segundo por que al causar deficiente absorción intestinal, esto repercute - en forma importante en su crecimiento y desarrollo.

**C A P I T U L O      I I I**

PARTE EXPERIMENTAL

3.1.- Diseño experimental.



### 3.2.- Material, Equipo y Reactivos

#### 3.2.1.- Material biológico

Recolección de materia fecal de 24 horas de los niños -  
estudiados que presentaron Giardia lamblia.

Suero de las ratas con giardiasis.

Cepa de Giardia lamblia.

Cepa de Giardia lamblia Portland cultivada en medio de  
cultivo TYI-S-33 suplementado con bilis.

Animales de experimentación.

#### 3.2.2.- Material de laboratorio

Micropipetas de 10, 20, 50, 100 microlitros (Sigma-Chemi-  
cal).

Papel filtro Whatman No. 1 cualitativo

Jeringas de vidrio de 20 ml.

Jeringas de insulina, de 6 ml desechables.

Agujas Yale calibre 18 x 30 mm desechable

Filtros milipore de 0.22 mm

Gradilla

Pizeta de 500 ml

Mallas de alambre

Mechero

Tela de asbesto

Frasco de recolección de materia fecal

Pipetas Pasteur

**Matraces Erlenmeyer**

**Tubos de plástico para centrifugar con tapón de rosca**

**Vasos de precipitados de 250 y 500 ml**

**Tubos de vidrio de 15 x 125 mm con tapón de rosca**

**Tubos de vidrio de 13 x 100 mm**

**Probetas de 100, 500 y 1000 ml**

**Pipetas de 1, 5 y 10 ml**

**Varillas de vidrio**

**Embudos de talle largo**

**Portaobjetos**

**Cubreobjetos**

**Densímetro**

**3.2.3.- Equipo de laboratorio**

**Incubadora (Medi-Lab, Marck No. 415)**

**Balanza analítica (P-115 Bosch)**

**Centrifuga clínica (Modelo C-1)**

**Centrifuga sorval con refrigeración (Modelo RC-5)**

**Potenciómetro Corning (Modelo pH meter)**

**Microscopio óptico**

**Refrigerador (Marca Whirpool)**

**Microscopio electrónico**

**Procesador American Optical (No. 8000)**

### 3.2.4.- Reactivos

Medio TYI-S-33 suplementado con bilis para 500 ml	
Biosate (Lev. Cascina)	15 g
Glucosa (Dextrosa)	5 g
Cloruro de Sodio	1 g
Fosfato dibásico de potasio	500 mg
Fosfato monobásico de potasio	500 mg
L-Cisteína HCl	1 g
Acido L Ascórbico	100 mg
<b>Hemaglutinación Indirecta</b>	
Glucosa	2.05 g
Citrato de sodio	0.8 g
Acido cítrico	0.08 g
Cloruro de sodio	0.42 g
Fosfato de potasio monobásico	10.20 g
Fosfato de sodio dibásico	20.15 g
<b>Pass - Schiff</b>	
Acido Peryódico	0.15 g
Agua destilada	100 ml
Fusina básica	1 g
HCl 1 N	20 ml
Bisulfito de sodio	1 g
Carbón activado	1 g
Agua destilada	200 ml

### 3.2.4.1.- Preparación de reactivos

Medio TYI-S-33 suplementado con bilis: Resuspender todos los reactivos en el orden indicado con 300 ml. de agua destilada y ajustar a un pH de 7.0 - 7.02 con NaOH 1N (34 gotas aproximadamente), posteriormente agregar 11.5 mg de citrato férrico de amonio y ajustar a un volumen de 425 ml. con agua desionizada, esterilizar en autoclave por 15 min. a 15 libras.

Ya esterilizado, añadir 25 ml. de bilis bovina (10 mg/10 ml) filtrar por milipore, a continuación añadir 50 ml de suero bovino inactivado a 56°C por 30 min. y por último agregar penicilina y estreptomicina de 2500 UI.

Prueba de esterilidad: La prueba de esterilidad se efectúa para determinar la existencia de una posible contaminación por bacterias; para esto, incubar el medio TYI-S-33 suplementado con bilis durante 24 horas a 37°C. En esta prueba no se debe presentar el desarrollo de microorganismos.

Inoculación de los trofozoitos al medio TYI-S-33 suplementado con bilis: La cepa de Giardia lamblia Portland se cultiva en el Laboratorio de Investigación en Parasitología del Hospital Infantil de México, S.S.A.

Llenar en forma estéril tubos de ensaye con tapón de rosca, empleando 12 ml. del medio TYI-S-33 suplementado con bilis. Enfriar los tubos con crecimiento óptimo en baño de hielo por 5 minutos para desprender las células de la pared del tubo, inver

tir 10 veces para su homogeneización y resembrar en tubos y cajas de cultivo.

Recolección, lavado y cosecha de los trofozoitos: Después de obtener un buen desarrollo a las 72 horas, colocar los tubos y cajas de cultivo en baño de hielo para ayudar al desprendimiento de las células, ponerlos en tubos con tapón de rosca 50 ml - para centrifugar a 500 xG durante 15 min. con solución reguladora de fosfatos pH 7.0 repetir 3 veces. Al terminar se concentra el paquete de trofozoitos para obtener la cosecha de los mismos y congelar a 0°C hasta su uso.

Hemaglutinación Indirecta:

Solución de Alsevers.- Pesar 2.05 g de glucosa, 0.8 g de citrato de sodio, 0.08 g de ácido cítrico y 0.42 g de cloruro de sodio, disolver en agua destilada y llevar a un volumen de 100 ml de agua destilada, esterilizar durante 10 min. a 10 libras.

· Solución amortiguadora de fosfatos salinos con pH 7.2:

Solución de fosfato de potasio monobásico 0.15 M.- Pesar 10.20 g de fosfato de potasio monobásico y disolver en 500 ml. de agua destilada.

Solución de fosfato de sodio dibásico 0.15 M.- Pesar 20.15 g de fosfato de sodio dibásico y disolver en 500 ml de agua destilada. Mezclar 76 ml de la solución de fosfato de sodio dibásico y 100 ml de la solución salina isotónica 0.9% con 24 ml de -

la solución de fosfato de potasio monobásico, y medir el pH.

Solución amortiguadora de fosfato salino con pH 6.4

Preparar de igual manera que la de fosfato salino sólo que mezclar 67.8 ml de la solución de fosfato de potasio monobásico con 32.2 ml de la solución de fosfato de sodio dibásico y 100 ml de la solución salina isotónica 0.9% y medir su pH.

Solución de ácido tánico al 1%.- Pesar 1 g de ácido tánico y adicionar 99 ml de solución isotónica 0.9%, guardar en refrigeración a 4°C, de esta solución hacer dilución 1:200 para tener la solución final de trabajo de ácido tánico 1:20,000.

Suspensión de glóbulos rojos de carnero.- Colocar un volumen igual de glóbulos rojos de carnero a la solución de Alsevers ya preparada y guardar en refrigeración a 4°C durante 10 días para su maduración.

Preparación del antígeno.- Colocar 1 ml de todas y cada una de las cepas de quistes de Giardia y homogeneizar, así también - 1 ml de trofozoitos de Giardia obtenidos por cultivo axénico de la cepa Portland. El sobrenadante constituye el antígeno.

Suero de conejo inactivado.- Extraer, por punción cardíaca la sangre de un conejo de raza Nueva Zelanda con peso aproximado de 3 kg y centrifugar a 500 xG durante 15 minutos, separar el suero almacenándolo en un frasco para ser inactivado a 56°C durante 30 minutos en baño María.

Adsorción de los glóbulos rojos de carnero.- Tomar 3 ml de glóbulos rojos de carnero almacenados en solución de Alsevers - estéril, lavar 3 veces con solución salina y preparar una suspensión al 2% de glóbulos rojos de carnero. Después añadir 3 ml de suero normal de conejo inactivado y dejar reposar toda la noche en refrigeración a 4° C. Al día siguiente centrifugar a 500 xG durante 15 minutos y separar el suero de conejo diluido 1:100.

Tomar el paquete de glóbulos rojos de carnero y añadir 3 ml de ácido tánico diluido 1:20 000, incubar en la estufa a 37° C durante 10 min. con este procedimiento se obtienen glóbulos rojos de carnero tanizados. Posteriormente centrifugar a 500 xG durante 15 minutos, decantar el sobrenadante y volver a lavar con solución amortiguadora de fosfatos salinos pH 6.4.

A los glóbulos rojos de carnero tanizados adicionar 4 ml de la solución amortiguadora de fosfatos salinos pH 6.4 y 1 ml de antígeno, centrifugar a 500 xG durante 15 minutos, decantar el sobrenadante y añadir 2 ml de suero normal de conejo diluido 1:100.

Preparar un control negativo con 1 ml de glóbulos rojos de carnero tanizados al 1% más 4 ml de la solución amortiguadora de fosfato salino pH 6.4 en ausencia de antígeno.

Utilizando placas de Limbro llevar a cabo diluciones de los sueros obtenidos de las ratas con Giardia en proporción lo-

garfítmica es decir 1:2, 1:4, 1:8, etc., teniendo como diluyente el suero de conejo absorbido y diluido 1:100, posteriormente - añadir 50 lambdas de glóbulos rojos de carnero tanizados al 1% forrados con los diferentes antígenos y dejar durante 24 horas.

#### Pass-Schiff

Solución de ácido Peryódico al 0.5%.- Pesar 0.5 g de cristales de ácido Peryódico y disolver en 100 ml de agua destilada.

Reactivo de Schiff.- Pesar 1 g de fusina básica y disolver en 200 ml de agua destilada caliente (no hervir), mezclar y dejar a temperatura ambiente para adicionar 20 ml de HCl y mezclar bien, por último adicionar 1 g de bisulfito de sodio, filtrar y guardar en un frasco en refrigeración por 24 horas.

Realizar a las laminillas el proceso de desparafinación, - deshidratación, posteriormente teñirlas con Pass, lo cual consiste en: lavar 3 veces con agua destilada y dejar secar, introducirlas en la solución peryódica por 10 minutos, secarlas y lavarlas dos veces con agua destilada, introducirlas en el reactivo de Schiff por 15 minutos al terminar lavar una vez y pasarlas a una solución de Hematoxilina de Harris por 10 minutos; - después lavar con alcohol ácido y virar con agua amoniacal e introducirlas en agua corriente por 1 minuto. Dejar secar y realizar el montaje de resina sintética, colocando un cubreobjetos - de 24 x 40 mm para su estudio al microscopio de luz.

Actividad enzimática.

Solución Buffer de Maleato 0.1 M pH 5.8.- Pesar 4 g de NaOH y disolver en 100 ml de agua destilada. Hecho esto pesar 1.16 g de ácido maleico y agregar 14.2 ml de NaOH disolver hasta ajustar a 100 ml con agua destilada, ajustar el pH a 5.8.

Solución Reguladora de Sustrato.- Pesar 200 mg de lactosa y disolver en 10 ml de la solución Buffer de maleato, posteriormente agregar una gota de Tolueno y guardar a 4°C.

Solución Concentrada de Glucosa.- Pesar 10 mg de glucosa y 0.25 mg de ácido benzóico y disolver en 100 ml de agua destilada. Esta solución es viable entre 2-5°C durante 2 meses.

Solución Reguladora de Tris 0.5 M pH 7.0.- Pesar 12.11 g de Tris base y disolver en 85 ml de HCl 5 N, disolver con agua destilada hasta 100 ml, y ajustar el pH 7.0 si fuese necesario.

Microscopía de Luz.

Solución de formol al 10%.- Tomar la densidad del formol y de acuerdo a ésta calcular las necesidades requeridas de formol y agua para tener una solución al 10%, tomar 100 ml de ésta, -- adicionar 4 g de fosfato de sodio monobásico y 6.5 g de sodio dibásico y llevar a un volumen total de 1000 ml de agua destilada.

Preparación de los tejidos.- Hacer cortes de los intesti--

nos de las ratas controles e inculadas con la ayuda del bisturí colocar éstos en formol al 10% para llevar a cabo el estudio histopatológico.

Procesado de los tejidos.- Las porciones de tejido son sometidas a deshidratación en un procesador de tejidos.

Deshidratación, aclaramiento e inclusión.- Deshidratar los tejidos con 3 alcoholes etílicos al 96%. El aclaramiento se lleva a cabo con una mezcla de xilol-xileno y se incluyen 3 parafinas, utilizando una más fina para hacer la inclusión de los tejidos y formar el cubo para el corte.

Corte de los tejidos.- Realizar los cortes en Ultramicrotomo con un espesor de 3 micras. Posteriormente colocar los cortes en un baño de flotación a temperatura de 46°C de ahí pasar los cortes a un portaobjetos y llevar a una estufa a temperatura de 50°C.

Tinción de Hematoxilina-eosina.- Después de llevar a cabo el proceso de desparafinación e hidratación, teñir con hematoxilina-eosina.

Posteriormente deshidratar con tres alcoholes al 96%, tres alcoholes absolutos, y un alcohol-xilol en partes iguales y tres agentes aclarantes (xilol), y proceder a agregar la resina sintética y colocar un cubreobjetos de 24 x 40 mm para su estudio al microscopio óptico.

Observación al microscopio óptico.- El estudio se llevó a cabo tomando en cuenta los siguientes parámetros; presencia de nódulos, presencia de Giardia, linfocitos y alteraciones de las vellosidades, alteraciones de la lámina e hiperplasia linfática.

Microscopio Electrónico.

Solución de glutaraldehído al 2%.- Tomar 2 ml de glutaraldehído y adicionar 98 ml de agua destilada.

Solución de fosfato de sodio monobásico 0.1 M.- Pesar 2.84 g de fosfato de sodio monobásico y disolver en 100 ml de agua destilada.

Solución de fosfato de sodio dibásico 0.1 M.- Pesar 2.76 g de fosfato de sodio dibásico y disolver en 100 ml de agua destilada. De la solución de glutaraldehído al 2% tomar 40.5 ml y 9.5 ml de la solución amortiguadora de fosfato salino 0.1 M y llevar a un volumen final de 100 ml de agua destilada.

Solución de Cloruro de Calcio al 1%.- Pesar 1 g de cloruro de calcio y adicionar 99 ml de agua destilada. Posteriormente tomar 12 ml de la solución de glutaraldehído al 2% y adicionar 88 ml de la solución amortiguadora de fosfato salino 0.1 M y 10 gotas de la solución de cloruro de calcio al 1%. Después de cumplido el tiempo en la solución de glutaraldehído el fragmento del tejido éste fue pasado a una solución lavadora en la cual puede dejarse hasta una semana.

La técnica del proceso de los tejidos para la observación al microscopio electrónico es la utilizada usualmente por lo que no se describe.

### 3.3.- Metodología.

#### 3.3.1.- Aislamiento de treinta y cinco cepas de *Giardia lamblia*.

Durante 8 meses se estudiaron las heces de 705 niños que asistieron a las estancias infantiles de la Delegación Benito Juárez, investigándose en sus heces la presencia del parásito, aislándose 35 cepas de quistes de *Giardia lamblia* por el método de Faust.

#### 3.3.2.- Preparación de las ratas

Formar 35 ratas hembras y 18 machos para su preñamiento con un peso promedio de 200 a 250 g. La presencia de parásitos en sus heces, es eliminada con metronidazol (36) en dosis de 40 mg/kg de peso durante tres días consecutivos.

Transcurridas las 72 horas del apareamiento, los animales se pesaron y separaron en jaulas individuales. Se les alimentó y registró su peso cada tercer día durante el tiempo de gestación.

#### 3.3.3.- Obtención de 304 crías con un peso promedio de 40 g.

En todos investigar la presencia del parásito por coproparasitoscópico de Faust, y en caso de estarlo desparasitar con-

metronidazol.

Después de comprobar que las ratas no están parasitadas, - separarlas y marcarlas para formar 35 grupos de 8 animales cada uno mediante números aleatorios con las letras HLM-1; HLM-35, - así como 3 lotes del mismo número de ratas que constituyeron - el grupo control.

### 3.3.4.- Inoculación de las cepas de Giardia lamblia en los animales experimentales.

Los quistes de las diferentes cepas se lavan con agua destilada y se determina su número mediante la cámara de Neubauer, inocular  $1.25 \times 10^6$  quistes en cada animal mediante una sonda - gástrica. En los lotes testigo sólo administrar agua destilada siguiendo el mismo procedimiento.

### 3.3.5.- Cuantificación de los quistes de Giardia lamblia para su inoculación en los animales experimentales.

Contar el número de quistes mediante una cámara de Neuba-  
wer y una pipeta para glóbulos blancos, con los siguientes -  
cálculos:

$$\frac{A \times B \times C}{D} \times E = \text{Quistes por ml}$$

Donde:

A = Suma de los cuatro cuadrantes grandes de la cámara de  
Neubauer.

B = Dilución de la pipeta 1:20

C = Factor para determinar el valor por  $\text{mm}^3$  (10)

D = Número de cuadrantes

E = Factor para determinar el valor por ml (1000)

Ejemplo:

$$\frac{A \cdot 20 \cdot 10}{4} \times 1000 = 50 \text{ células/ml}$$

3.3.6.- Demostración de Giardia lamblia en las heces fecales y su incremento de peso.

A los animales inoculados recolectar sus heces, para determinar por coproparasitoscópico de Faust la presencia del parásito así mismo pesar cada tercer día.

3.3.7.- Reacción Inmunológica de los animales inoculados con Giardia lamblia, determinada por el título de anticuerpos del suero contra (cepas homóloga y Portland).

Anestesiarse a los animales y llevar a cabo una punción cardiaca para la extracción de 2 ml de sangre, el suero obtenido separar por centrifugación e inactivar a 56°C durante 30 minutos, después determinar el título de anticuerpos, utilizando la técnica de Hemaglutinación Indirecta; emplear como antígeno de la cepa homóloga, es decir, los quistes de las heces de las ratas que presentaron Giardia lamblia, también determinar el título de anticuerpos del suero utilizando el antígeno obtenido de Giardia lamblia cultivado en el medio axénico TYI-S- 33 suplementado con bilis.

3.3.8.- Observación del protozoario en la pared luminal mediante improntas de las ratas experimentales y testigo, vistas al microscopio de Fases.

Realizar una laparatomía en los animales experimentales y testigos para observar alteraciones macroscópicas, así como la presencia del protozoario en la pared luminal del intestino delgado. Tomar una fracción duodenal y cortarla para dejar una impresión de la mucosa en un portaobjetos, secar posteriormente, proceder a la fijación en alcohol al 90%, después proceder a la tinción de Pass-Schiff buscando la presencia del protozoario.

3.3.9.- Cuantificación de la actividad de la lactasa en el intestino de los animales inoculados con las 35 cepas de *Giardia lamblia*.

La estimación de la enzima se lleva a cabo de acuerdo al método de Dalquist (13). Considera que una unidad enzimática de lactasa es igual a la transformación de un micromol de sustrato por minuto.

Realización de la curva.

Rotular 6 tubos conteniendo una dilución de glucosa entre 0 y 10  $\mu$ g para la realización, además de 2 tubos más que constituyen los blancos.

CURVA ESTANDAR

Tubo	Agua (ml)	Estándar (ml)	Glucosa (concentración $\mu$ g)
0	1.0	0	0
1	0.8	.2	.02
2	0.6	.4	.04
3	0.4	.6	.06
4	0.2	.8	.08
5	0	1	.10

Los tubos que constituyen los blancos y los de la concentración estándar se incuban a 37°C durante 60 minutos, transcurrido este tiempo adicionar 100  $\mu$ l de agua y 600  $\mu$ l del reactivo de O-Toluidina e incubar en baño María por 7 minutos, después leer la densidad óptica de los tubos contra los blancos a 420 nm y preparar la curva estándar graficando la densidad óptica de los tubos 0 a 5 contra la concentración de glucosa en cada tubo.

Preparación del homogeneizado:

Colocar el tejido obtenido en una solución isotónica de NaCl inmediatamente después colocar el recipiente en un baño con hielo. Posteriormente quitar el exceso de la solución salina del tejido y colocar en un vidrio de reloj para proceder a pesar en una balanza de precisión.

Transferir el espécimen a un tubo homogeneizador de Pother y añadir 1 ml de agua destilada por cada 20 mg de peso del tejido. Una vez homogeneizado el tejido colocar en un tubo pequeño y congelar a -20° C hasta su análisis.

**Desarrollo del método:**

El homogeneizado se diluye en la forma siguiente:

Para Lactasa usar la dilución 1:10

Rotular los tubos L, Mo, Lo, L1, 12.

L = Lactasa

M, L (o) Tubos blancos

L (1,2) = Muestras por duplicado de los tubos a analizar.

Una vez rotulados los tubos depositar 0.1 ml de la dilución del homogeneizado previamente indicado para el azúcar por investigar. Colocar luego para los tubos 11, 12, en baño María a - 37° C añadir 0.025  $\mu$ l de la solución reguladora de sustrato previamente calentado a 37° C y mezclar bien.

Exactamente 60 minutos después añadir 2.8 ml del reactivo - de O-Toluidina, mezclar bien y colocar los tubos a ebullición - durante 7 minutos; posteriormente dejar enfriar y leer a una longitud de onda de 420 nm.

**Cálculo de las disacaridasas:**

$$\text{Disacaridasas en unidades/ml} = \frac{a \times d \times 40}{n \times 60 \times 180}$$

Donde:

- a) Cantidad de glucosa (promedio de los duplicados) producida en 60 minutos, en 25  $\mu$ l del homogeneizado diluido.
- d) Factor de dilución de la lactasa; d = 10
- n) Número de moléculas de glucosa producida durante la hidrólisis de las disacaridasas.

Para lactasa n = 1

180 = al peso molecular de la glucosa

60 = tiempo de incubación

40 = factor de dilución de la alícuota tomada por mililitro del homogeneizado,  $\frac{1000}{25} = 40$

U/ml = micromoles de sustrato hidrolizado por minuto.

Ejemplo:

Como ejemplo del cálculo para estimar la actividad de lactasa se tiene la siguiente ecuación:

$$\text{Lactasa} = \frac{.85 \times 10 \times 40}{1 \times 60 \times 180} = 0.03148 \text{ U/ml}$$

3.3.10.- Demostración de la virulencia de las 35 cepas de Giardia lamblia de acuerdo a las alteraciones histopatológicas en el duodeno de las ratas inoculadas y controles, observadas al microscopio óptico.

Colocar un fragmento de tejido de las ratas experimentales y testigo en una solución de formol neutro al 10%. Posteriormente

te se traslado a la Unidad de Microscopía de la Facultad de Medicina en donde se llevó a cabo su estudio.

### 3.3.11.- Observación al Microscopio Electrónico.

Un fragmento de 0.9 mm de tejido fue colocado en una solución fijadora para ser trasladado a la Unidad de Microscopía - Electrónica de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M., en donde se realizó su procesamiento bajo la dirección del Dr. Juan M. Cardoso.

En la observación microscópica, no hubo necesidad de hacer tinción cromática, ya que en microscopía electrónica se usa un haz de electrones. No se puede dar un límite de tiempo para hacer la observación ya que éste puede variar desde horas, días o bien meses, de acuerdo a la complejidad del problema. Una vez localizados los campos, tomar la fotografía e interpretar.

En las observaciones microscópicas determinar los grados de Rubin con los criterios siguientes:

Grado I.- Vellosidades con variación en su forma y altura, el epitelio es generalmente columnar. Hay edema moderado y aumento de linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia.

Grado II.- Observar vellosidades con ensanchamiento y disminución de la altura de las microvellosidades, aumento

de células plasmáticas, linfocitos; el epitelio se encuentra menos columnar.

Grado III.- Aplanamiento de las vellosidades y desaparición del borde del cepillo del epitelio el cual es cuboidal, con el núcleo irregular en forma, tamaño y afinidad tintorial. Hay edema, aumento de linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia.

#### 3.4.- Análisis Estadístico:

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo determinando el coeficiente de correlación lineal de Pearson entre las variables de tiempo y ganancia de peso, así como la pendiente entre estos dos. Se utilizó  $\chi^2$  en donde se consideró que había diferencias estadísticamente significativas cuando el valor de  $p \leq 0.05$ .

Los cálculos fueron realizados en computadora.

CAPITULO IV

#### 4.1.- RESULTADOS

En las heces de las 35 ratas experimentales utilizadas para la etapa prenatal, el coproparasitoscópico de Faust dio como resultado G. muris 20/35 (57%), G. lamblia 14/35 (40%); Amibas 16/35 (46%). Sin embargo, después del tratamiento antiparasitario con metronidazol 40 mg/kg de peso, el análisis coproparasitoscópico de sus heces fue negativo manteniéndose así durante 8 días.

Por otro lado en el coproparasitoscópico de las crías se observó G. muris en 179/280 (64%); así nuevamente la presencia de este parásito fue eliminado con el tratamiento antiparasitario ya mencionado, de tal manera que después de 8 días no se observó en ninguna de las heces la presencia de este parásito y la inoculación experimental con Giardia lamblia no pareció estar influida por este hecho, pues al noveno día posterior a la inoculación por vía gástrica el parásito apareció en sus heces.

El incremento del peso en los animales durante el tiempo de gestación puede observarse en la Tabla 1, así como en la Figura 1. En ellas se aprecia desde el punto de vista estadístico que el valor de  $r^2$  varió entre 0.9613 y 0.9981, con pendientes de 3.28 y 7.34. Lo cual indica que a pesar de tener una pendiente diferente, el incremento en el peso fue parecido considerando la similitud del índice de correlación lineal.

En las crías al correlacionar la absorción intestinal con la ganancia o pérdida de peso (en los animales inoculados con las 35 cepas de Giardia lamblia, así como en los testigos), los resultados obtenidos mostraron que a partir del día quinto se desarrolló una pérdida de peso importante, comparativamente con los animales no inoculados o testigos.

La respuesta inmune humoral a los diferentes epítomos de las distintas cepas de Giardia lamblia inoculadas; se presenta en la Tabla II. En ella se observa una mayor frecuencia en el título de anticuerpos de 1:4 a 1:8 cuando se determinó utilizando como antígeno a la cepa homóloga y sólo en dos casos el título de anticuerpos fue de 1:64 y 1:256. Aunque los resultados más altos se obtuvieron cuando se utilizó como antígeno a la cepa Portland de Giardia lamblia llegando hasta 1:512. Sin embargo la mayor frecuencia fue con el título de 1:4

Al llevar a cabo la necropsia de los animales las alteraciones más importantes fueron: la aerofagia, nódulos blanquecinos, plegamiento del intestino, adherencia a la serosa. Estos resultados se presentan en la Tabla III, en ella se observa que la aerofagia se presentó en 82/280 (29%), los nódulos blanquecinos en 72/280 (26%) y el plegamiento del intestino fue menos importante pues se observó en 36/280 (13%) y la adherencia a la serosa de igual manera de 37/280 (13%).

La capacidad de adherencia en las diferentes cepas de Giar-

dia lamblia a las células epiteliales del intestino delgado de terminada por la presencia del protozooario por medio de imprints, sólo 44 fueron positivas. Sin embargo esto no quiere decir que no se haya adosado a la pared intestinal pues como es bien sabido Giardia lamblia pudo desprenderse con facilidad.

Las alteraciones microscópicas determinadas en las vellosidades, así como la hiperplasia linfática y los grados de Rubin en los animales inoculados se presenta en la Tabla IV. En ella se observa que 62/280 (22%) desarrollaron alteraciones de las vellosidades y éstas fueron muy importantes porque de acuerdo a la clasificación de Rubin, éstos oscilaron entre los grados I, II y III.

De acuerdo a la frecuencia de estas alteraciones en orden de importancia expresada en porcentaje, se encuentra que cuatro cepas de Giardia lamblia desarrollaron en el 50% de ellos, y la mayoría se encontró en el 10 y 20%.

La actividad enzimática de lactasa desarrollada en el intestino de los animales inoculados con las distintas cepas de G. lamblia fue baja en 24 de ellas, desarrollándose una actividad menor de 5 U/mg de proteínas, aunque también hubo algunas cepas cuya inoculación desarrolló actividad de lactasa alta.

Los resultados de las alteraciones histopatológicas y la actividad enzimática desarrollada por las 35 cepas de Giardia lamblia en los animales se presenta en la Tabla V.

La expresión gráfica de la correlación entre las alteraciones en las microvellosidades intestinales y las cepas obtenidas se observó que 18 cepas provocaron alteraciones en las microvellosidades coincidiendo con la actividad enzimática baja.

Por otro lado, actividades enzimáticas altas se observaron en los animales inoculados con 8 cepas de Giardia lamblia, en donde coincidió una menor presencia de alteraciones en las microvellosidades intestinales. Sin embargo esta relación no se observó siempre constante pues hubo 6 cepas donde la actividad enzimática fue baja así como las alteraciones histopatológicas, y por lo tanto 3 cepas presentaron actividad enzimática en igual proporción que las alteraciones histopatológicas. El análisis estadístico de estos resultados presentó un valor de probabilidad de  $P=0.01063$ .

En la correlación entre la hiperplasia linfática y las cepas obtenidas de Giardia lamblia se observa que 3 cepas no presentaron la hiperplasia linfática comparadas con las demás que sí obtuvieron esta alteración.

La actividad enzimática se desarrolló en 24 cepas obteniendo valores bajos y apreciando una hiperplasia linfática alta, en el tratamiento estadístico de estos dos se determinó que la probabilidad fue de  $P=0.0063$ .

La microfotografía al microscopio de fases que muestra la Figura II, corresponde a una impronta, en donde se observó un tro

fozoito de Giardia. En ella se muestra claramente el disco --  
suctorio. La imagen más frecuente en los cortes de intestino  
delgado, fue de abundantes células epiteliales con cromatina -  
densa y dispersa, se observa en las Figuras III y IV.

La microfotografía de las vellosidades se observa en la -  
Figura V con una hiperplasia linfática de las vellosidades in-  
testinales normales en un aumento de 100 X. Así mismo en la -  
Figura VI se aprecia un aclaramiento e infiltrado inflamatorio  
de las vellosidades anormales en un aumento de 4100 X. Estas  
alteraciones fueron las más frecuentes e importantes al compa-  
rarse con las microvellosidades normales.

Otra de las observaciones en los cortes de intestino del-  
gado de las ratas fue un aumento de linfocitos como se observa  
en la Figura VII, en un aumento de 250 X. También la hiperpla-  
sia linfática fue otra de las alteraciones que se apreció con-  
juntamente con las células epiteliales como lo muestra la Figu-  
ra VIII en un aumento de 4000 X.

TABLA I

Coefficiente de correlación de Pearson  $r$  entre el peso de las ratas en gramos, y el período de gestación

Núm. de ratas	Coefficiente de determinación $r^2$	Pendiente	Núm. de Crías
1	0.9384	7.10	14
2	0.9897	7.10	15
3	0.9923	6.09	13
4	0.9923	6.09	11
5	0.9622	7.34	13
6	0.9926	7.34	11
7	0.9759	5.00	10
8	0.9806	5.34	11
9	0.9891	4.05	10
10	0.9609	5.20	10
11	0.9609	5.20	9
12	0.9732	4.01	8
13	0.9795	3.28	8
14	0.9922	4.49	10
15	0.9866	4.58	9
16	0.9981	4.56	8
17	0.9946	4.45	8
18	0.9936	3.81	7

TABLA I  
(Continuación)

Núm. de ratas	Coefficiente de determinación $r^2$	Pendiente	Núm. de Crías
19	0.9613	3.65	6
20	0.9924	3.74	6
21	0.9523	3.12	9
22	0.9892	3.62	10
23	0.9873	4.47	11
24	0.9967	4.91	9
25	0.9749	4.58	8
26	0.9960	3.70	9
27	0.9960	3.70	9
28	0.9948	3.80	7
29	0.9981	4.25	10
30	0.9884	3.43	7
31	0.9826	5.40	13
32	0.9790	5.92	9
33	0.9910	5.03	7
34	0.9952	5.17	6
35	0.9915	6.05	14

**FIGURA 1**  
**PESO EN LAS RATAS DURANTE EL TIEMPO**  
**DE GESTACION**

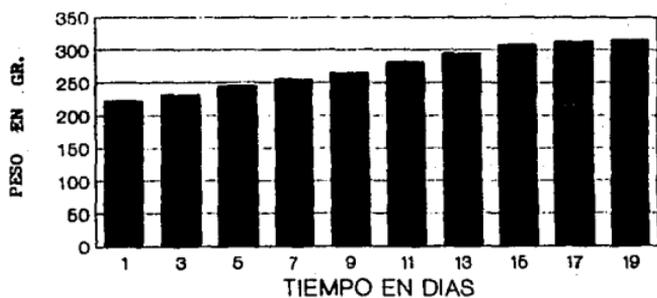


TABLA II

TITULO DE ANTICUERPOS DE 280 SUEROS DE RATAS CON GIARDIASIS  
 INTestinal VS. CEPA HOMOLOGA Y CEPA PORTLAND

TITULO DE ANTICUERPOS	FRECUENCIA CON CEPA HOMOLOGA	FRECUENCIA CON CEPA PORTLAND
1:2	51	36
1:4	64	54
1:8	70	52
1:16	57	44
1:32	16	21
1:64	4	24
1:128	12	22
1:256	7	13
1:512	0	14

TABLA III  
OBSERVACIONES MACROSCOPICAS

CEPA	AEROFAGIA		NODULOS BLANQUECINOS		PLEGAMIENTO DEL INTESTINO		ADHERENCIA A SEROSA		IMPRESITAS CELULAS EPITELIALES		SIN ALTERACIONES	
	n=8	(%)	n=8	(%)	n=8	(%)	n=8	(%)	n=8	(%)	n=8	(%)
HLM-1	4/8	50	2/8	25	0/8	0	0/8	0	2/8	25	2/8	25
HLM-2	3/8	37.5	3/8	37.5	1/8	12.5	0/8	0	0/8	0	1/8	12.5
HLM-3	3/8	37.5	3/8	37.5	1/8	12.5	0/8	0	1/8	12.5	1/8	12.5
HLM-4	1/8	12.5	2/8	25	2/8	25	1/8	12.5	1/8	12.5	2/8	25
HLM-5	3/8	37.5	1/8	12.5	2/8	25	1/8	12.5	0/8	0	1/8	12.5
HLM-6	1/8	12.5	4/8	50	1/8	12.5	1/8	12.5	0/8	0	1/8	12.5
HLM-7	2/8	25	3/8	37.5	0/8	0	2/8	25	0/8	0	1/8	12.5
HLM-8	4/8	50	2/8	25	1/8	12.5	1/8	12.5	4/8	50	0/8	0
HLM-9	3/8	37.5	2/8	25	0/8	0	0/8	0	0/8	0	0/8	0
HLM-10	2/8	25	3/8	37.5	2/8	25	0/8	0	1/8	12.5	1/8	12.5
HLM-11	3/8	37.5	2/8	25	0/8	0	2/8	25	1/8	12.5	3/8	37.5
HLM-12	3/8	37.5	1/8	12.5	0/8	0	2/8	25	2/8	25	2/8	25
HLM-13	4/8	50	2/8	25	0/8	0	0/8	0	1/8	12.5	2/8	25
HLM-14	2/8	25	3/8	37.5	3/8	37.5	0/8	0	0/8	0	0/8	0
HLM-15	3/8	37.5	1/8	12.5	0/8	0	0/8	0	2/8	25	4/8	50
HLM-16	2/8	25	2/8	25	0/8	0	1/8	12.5	0/8	0	3/8	37.5
HLM-17	3/8	37.5	2/8	25	2/8	25	0/8	0	0/8	0	1/8	12.5
HLM-18	1/8	12.5	2/8	25	0/8	0	1/8	12.5	1/8	12.5	3/8	37.5
HLM-19	1/8	12.5	2/8	25	0/8	0	3/8	37.5	2/8	25	2/8	25
HLM-20	2/8	25	3/8	37.5	1/8	12.5	0/8	0	3/8	37.5	2/8	25
HLM-21	3/8	37.5	0/8	0	1/8	12.5	2/8	25	2/8	25	2/8	25
HLM-22	2/8	25	2/8	25	1/8	12.5	2/8	25	1/8	12.5	1/8	12.5
HLM-23	1/8	12.5	2/8	25	3/8	37.5	1/8	12.5	0/8	0	1/8	12.5
HLM-24	3/8	37.5	3/8	37.5	2/8	25	0/8	0	2/8	25	0/8	0
Testigo para las cepas del 1 al 24	0/8	0	0/8	0	0/8	0	0/8	0	0/8	0	0/8	0

n = número de ratas experimentales.

TABLA III  
(Continuación)

CEPA	AEROFAGIA		NODULOS BLANQUECINOS		PLEGAMIENTO DEL INTESTINO		ADHERENCIA A SEROSA		IMPRESIONES CELULAS EPITELIALES		SIN ALTERACIONES	
	n=8	(%)	n=8	(%)	n=8	(%)	n=8	(%)	n=8	(%)	n=8	(%)
HLM-25	2/8	25	2/8	25	1/8	12.5	3/8	37.5	2/8	25	0/8	0
HLM-26	2/8	25	3/8	37.5	2/8	25	1/8	12.5	0/8	0	0/8	0
HLM-27	3/8	37.5	0/8	0	0/8	0	3/8	37.5	0/8	0	2/8	25
HLM-28	2/8	25	3/8	37.5	0/8	0	0/8	0	1/8	12.5	3/8	37.5
HLM-29	3/8	37.5	1/8	12.5	1/8	12.5	2/8	25	1/8	12.5	1/8	12.5
HLM-30	1/8	12.5	2/8	25	1/8	12.5	0/8	0	4/8	50	4/8	50
HLM-31	2/8	25	0/8	0	2/8	25	2/8	25	3/8	37.5	2/8	25
HLM-32	1/8	12.5	2/8	25	3/8	37.5	1/8	12.5	2/8	25	1/8	12.5
HLM-33	2/8	25	3/8	37.5	0/8	0	0/8	0	0/8	0	3/8	37.5
HLM-34	2/8	25	2/8	25	0/8	0	3/8	37.5	1/8	12.5	1/8	12.5
HLM-35	2/8	25	2/8	25	1/8	12.5	2/8	25	4/8	50	1/8	12.5
Testigo para las cepas del 25-35	0/8	0	0/8	0	0/8	0	0/8	0	0/8	0	0/8	0

n = número de ratas experimentales.

TABLA IV  
OBSERVACIONES MICROSCOPICAS

CEPAS	ALTERACIONES EN LAS VELLOSIDADES		HIPERPLASIA LINFATICA		SIN ALTERACIONES		GRADOS DE RUBIN		
	n=8	(%)	n=8	(%)	n=8	(%)	I	II	III
HLM-1	4/8	50	1/8	12,5	3/8	37,5	4/8	1/8	-
HLM-2	0/8	0	2/8	25	6/8	75	---	2/8	-
HLM-3	2/8	25	2/8	25	4/8	50	2/8	2/8	-
HLM-4	3/8	37,5	3/8	37,5	2/8	25	3/8	3/8	-
HLM-5	1/8	12,5	2/8	25	5/8	62,5	1/8	2/8	-
HLM-6	3/8	37,5	2/8	25	2/8	25	3/8	-	2/8
HLM-7	0/8	0	0/8	0	8/8	100	-	-	-
HLM-8	4/8	50	2/8	25	2/8	25	-	4/8	2/8
HLM-9	0/8	0	0/8	0	8/8	100	-	-	-
HLM-10	0/8	0	2/8	25	6/8	75	2/8	-	-
HLM-11	1/8	12,5	3/8	37,5	4/8	50	1/8	3/8	-
HLM-12	1/8	12,5	1/8	12,5	6/8	75	1/8	1/8	-
HLM-13	2/8	25	3/8	37,5	3/8	37,5	1/8	3/8	-
HLM-14	3/8	37,5	3/8	37,5	2/8	25	3/8	3/8	-
HLM-15	3/8	37,5	2/8	25	2/8	37,5	3/8	2/8	-
HLM-16	1/8	12,5	4/8	50	4/8	50	-	-	4/8
HLM-17	1/8	12,5	2/8	25	5/8	62,5	1/8	2/8	-

n = número de ratas experimentales.

TABLA IV  
(Continuación)

CEPAS	ALTERACIONES EN LAS VELOSIDADES		HIPERPLASIA LINFÁTICA		SIN ALTERACIONES		GRADOS DE RUBIN		
	n=8	(%)	n=8	(%)	n=8	(%)	I	II	III
HLM-18	0/8	0	6/8	75	2/8	25	-	-	6/8
HLM-19	2/8	25	5/8	62.5	1/8	12.5	-	-	5/8
HLM-20	2/8	25	4/8	50	2/8	25	2/8	4/8	-
HLM-21	4/8	50	2/8	25	2/8	25	4/8	2/8	-
HLM-22	3/8	37.5	3/8	37.5	2/8	25	3/8	3/8	-
HLM-23	1/8	12.5	3/8	37.5	4/8	50	1/8	3/8	-
HLM-24	0/8	0	4/8	50	4/8	50	-	4/8	-
HLM-25	2/8	25	1/8	12.5	5/8	62.5	2/8	1/8	-
HLM-26	1/8	12.5	5/8	62.5	2/8	25	2/8	3/8	3/8
HLM-27	4/8	50	3/8	37.5	1/8	12.5	4/8	4/8	-
HLM-28	3/8	37.5	5/8	62.5	0/8	0	5/8	3/8	-
HLM-29	0/8	0	3/8	37.5	5/8	62.5	2/8	4/8	2/8
HLM-30	2/8	25	4/8	50	2/8	25	3/8	4/8	1/8
HLM-31	0/8	0	0/8	0	8/8	100	8/8	-	-
HLM-32	2/8	25	1/8	12.5	5/8	62.5	4/8	4/8	-
HLM-33	3/8	37.5	2/8	25	3/8	37.5	5/8	3/8	-
HLM-34	3/8	37.5	3/8	37.5	2/8	25	3/8	3/8	2/8
HLM-35	1/8	12.5	1/8	12.5	6/8	75	2/8	-	-
Testigo	0/8	0	0/8	0	0/8	0	-	-	-

n = número de ratas experimentales.

TABLA V  
ALTERACIONES HISTOPATOLOGICAS Y ACTIVIDAD ENZIMATICA.  
DE LOS ANIMALES INOCULADOS CON LAS 35  
CEPAS DE GIARDIA LAMBLIA

CEPAS	ACTIVIDAD ENZIMATICA		ALTERACIONES HISTOPATOLOGICAS					
	LACTASA U/mg DE PROTEINAS		EN MICROVELLOSIDADES		HIPERPLASIA LINFATICA		SIN ALTERACIONES	
	$\bar{X}$	$\pm$ DS	n=8	(%)	n=8	(%)	n=8	(%)
HLM-1	38.114	32.166	0/8	0	1/8	12.5	3/8	37.5
HLM-2	54.303	21.144	0/8	0	2/8	25	6/8	75
HLM-3	58.271	20.597	2/8	25	2/8	25	4/8	50
HLM-4	24.961	15.554	3/8	37.5	3/8	37.5	2/8	25
HLM-5	2.188	1.107	1/8	12.5	2/8	25	5/8	62.5
HLM-6	3.294	1.909	3/8	37.5	2/8	25	3/8	37.5
HLM-7	3.073	1.448	0/8	0	0/8	0	8/8	100
HLM-8	2.235	0.874	4/8	50	2/8	25	2/8	25
HLM-9	3.531	2.109	0/8	0	0/8	0	8/8	100
HLM-10	3.236	1.752	0/8	0	2/8	25	6/8	75
HLM-11	2.815	1.505	1/8	12.5	3/8	37.5	4/8	50
HLM-12	2.349	0.864	1/8	12.5	1/8	12.5	6/8	75
HLM-13	3.933	2.481	2/8	25	3/8	37.5	3/8	37.5
Testigo	39.137	28.003	0/8	0	0/8	0	0/8	0
HLM-14	3.839	1.794	3/8	37.5	3/8	37.5	2/8	25
HLM-15	3.566	3.201	3/8	37.5	2/8	25	3/8	37.5
HLM-16	3.671	1.677	1/8	12.5	0/8	0	7/8	87.5
HLM-17	2.756	0.864	1/8	12.5	2/8	25	5/8	62.5
HLM-18	4.714	1.752	0/8	0	0/8	0	8/8	100
HLM-19	3.698	1.704	0/8	0	0/8	0	8/8	100
HLM-20	4.271	3.259	1/8	12.5	2/8	25	5/8	62.5

TABLA V  
(Continuación)

CEPAS	ACTIVIDAD ENZIMATICA		ALTERACIONES HISTOPATOLOGICAS					
	LACTASA U/mg DE PROTEINAS		EN MICROVELLOSIDADES		HIPERPLASIA LINFATICA		SIN ALTERACIONES	
	$\bar{X}$	$\pm$ DS	n=8	(%)	n=8	(%)	n=8	(%)
HLM-21	3.194	$\pm$ 1.452	4/8	50	2/8	25	2/8	25
HLM-22	3.239	$\pm$ 1.154	3/8	37.5	3/8	37.5	2/8	25
HLM-23	3.636	$\pm$ 3.438	1/8	12.5	3/8	37.5	4/8	50
HLM-24	4.935	$\pm$ 2.816	0/8	0	4/8	50	4/8	50
Testigo	52.136	$\pm$ 45.002	0/8	0	0/8	0	0/8	0
HLM-25	1.452	$\pm$ 0.265	2/8	25	1/8	12.5	5/8	62.5
HLM-26	4.658	$\pm$ 4.094	1/8	12.5	5/8	62.5	2/8	25
HLM-27	13.720	$\pm$ 9.574	4/8	50	3/8	37.5	1/8	12.5
HLM-28	28.650	$\pm$ 11.466	3/8	37.5	5/8	62.5	0/8	0
HLM-29	23.760	$\pm$ 14.650	0/8	0	3/8	37.5	5/8	62.5
HLM-30	25.860	$\pm$ 16.521	2/8	25	4/8	50	2/8	25
HLM-31	25.434	$\pm$ 17.713	0/8	0	0/8	0	8/8	100
HLM-32	4.071	$\pm$ 3.648	2/8	25	1/8	12.5	5/8	62.5
HLM-33	2.53	$\pm$ 1.65	3/8	37.5	2/8	25	3/8	37.5
HLM-34	10.283	$\pm$ 6.832	3/8	37.5	3/8	37.5	2/8	25
HLM-35	21.321	$\pm$ 16.552	1/8	12.5	1/8	12.5	6/8	75
Testigo	47.315	$\pm$ 38.202	0/8	0	0/8	0	0/8	0

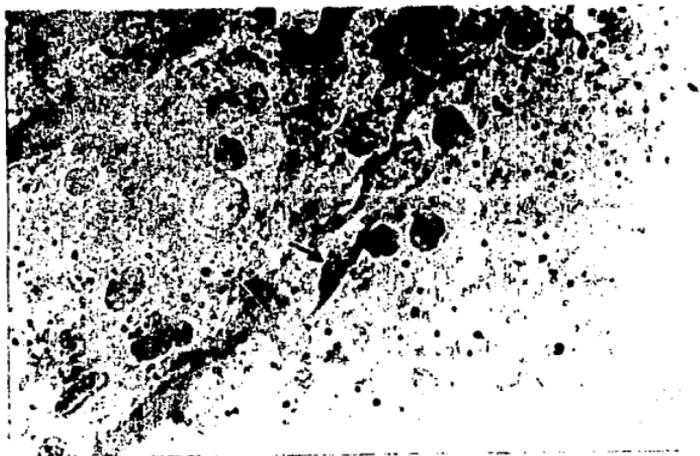


FIGURA II.- Fotografía de la impronta realizada, se observan pocas células epiteliales, algunos eritrocitos y una Giardia lamblia. (Pass-Schiff 100 X)

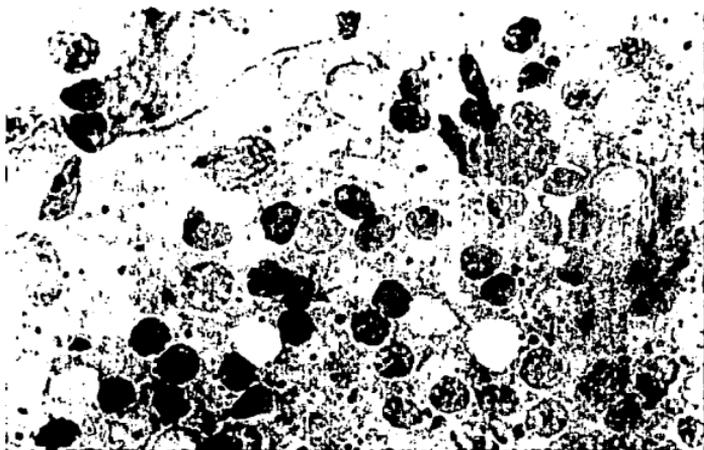


FIGURA III.- Fotografía de un corte de intestino delgado, se observan dos tipos de células epiteliales con la cromatina densa y dispersa y un aumento de eritrocitos. (Pass-Schiff. 400 X).

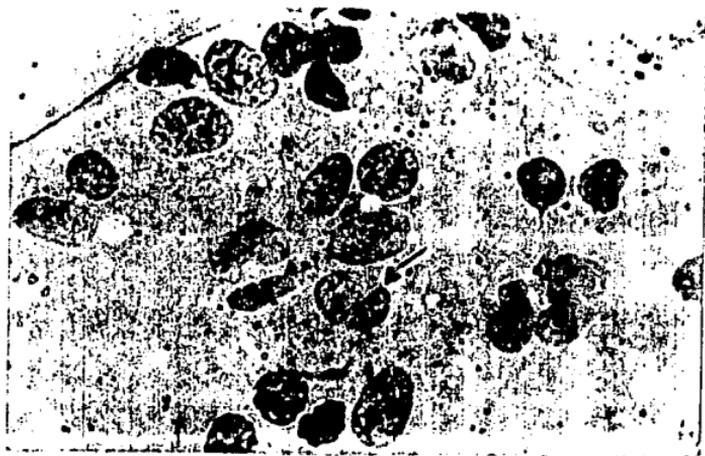


FIGURA IV.- Fotografía de intestino delgado, se observa mayor tamaño de células epiteliales, observándose su núcleo y cromatina (3000 X).



FIGURA V.- Microfotografía de Fases. Se observa la hiperplasia linfática de las microvellosidades intestinales normales. (Hematoxilina-eosina 100 X).



FIGURA VI.- Microfotografía electrónica. Se observan microvellosidades intestinales alteradas (4100 X).

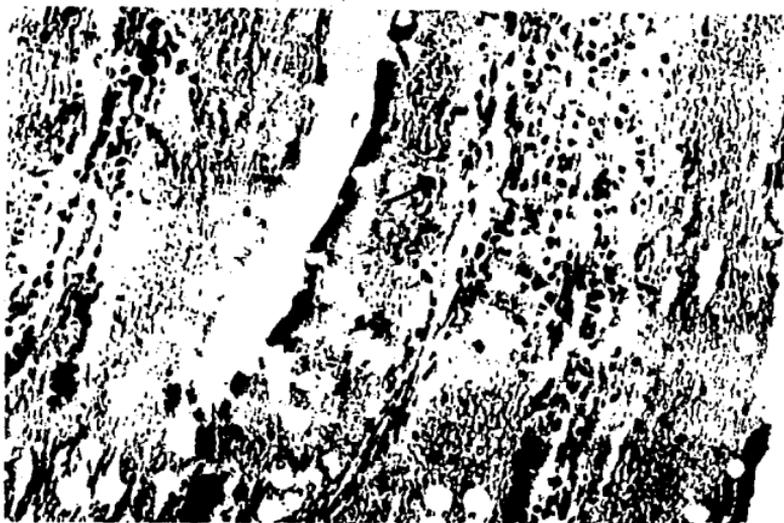


FIGURA VII.- Microfotografía de un corte de mucosa de intestino delgado en la que se observa un aumento de linfocitos. (Hematoxilina-eosina. 250 X).

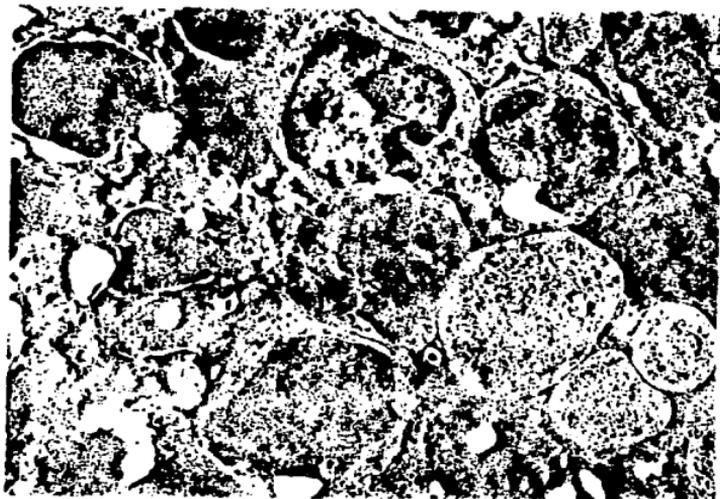


FIGURA VIII.- Microfotografía electrónica. Se observa la hiperplasia linfática con numerosos linfocitos con el núcleo. (4000 X).

#### 4.2.- DISCUSIONES

La patología digestiva en la *Giardia* varía mucho, se dice - que ésta depende del huésped (2), pero a nuestro juicio el parásito interviene en forma determinante para el desarrollo de la enfermedad. De esta manera las diferentes cepas del protozoario desarrollan un papel relevante manifestándose por producir una diferente sintomatología en el huésped particular para cada cepa.

En el presente estudio se tuvo cuidado de trabajar con animales sin parásitos y en caso de encontrarlos se les desparasitó incluso a los utilizados en la etapa prenatal.

Se consideró que el corte de los animales fue homogéneo de acuerdo al valor de coeficiente de Pearson, obtenido al relacionar los días de gestación con la ganancia del peso de ellos, y aunque las pendientes de esta relación no fueron iguales, las diferencias se atribuyeron al número de crías.

Este parámetro en el trabajo era muy importante, porque en caso de utilizar animales desnutridos en la etapa prenatal, las crías estarían determinadas por él. Pues se ha reportado (9) - que hay predisposición a parasitarse o bien tener un giardiasis más grave manifestándose en los diferentes niveles de absorción intestinal reflejada por la ganancia o pérdida de peso.

De esta manera el huésped estaría contribuyendo en forma -

importante y no se podría valorar el daño causado por las diferentes cepas de Giardia lamblia per se.

Con los resultados aquí mostrados se tiene seguridad de que los animales utilizados (crías) mantuvieron las mismas condiciones y que cualquier variación en el parámetro se debía exclusivamente a la patogenicidad del parásito.

La inoculación experimental con las distintas cepas de G. lamblia dió como resultado que aproximadamente en el día noveno el parásito apareciera en las heces fecales. Sin embargo, se infiere que éste colonizó en el intestino delgado en el día quinto, ya que ese día se presentó una disminución en el peso de los animales inoculados con una mayor o menor importancia, esto como resultado de una deficiente absorción intestinal.

Al compararse estos resultados con los de otros autores (5,33,36) en estudios experimentales semejantes, se observa que fueron diferentes, pues ellos obtuvieron resultados muy distintos entre el día 2 y 12, por lo que se infiere que se debe a la variación a la metodología.

La respuesta inmune humoral en giardiasis ha sido estudiada experimentalmente (26,41) en donde se ha demostrado que la producción de anticuerpos se lleva a cabo como resultado de la fagocitosis de los fragmentos de Giardia lamblia, por los macrófagos, los que aproximadamente en 15 minutos destruyen al protozoario y procesan al antígeno para presentarlo a los linfocitos

T y B, iniciándose la proliferación de linfocitos B sensibilizados, para de esta manera, llegar hasta células plasmáticas y producir anticuerpos específicos de la clase IgM, IgC e IgA (3).

La respuesta inmune humoral en este estudio mostró que hubo especificidad de cepa, pues el título de anticuerpos fué más alto cuando se utilizó como antígeno la cepa Portland, aunque mostró epítomos comparativos con otras cepas, a pesar de que éstos fueron bajos. Lo que coincide con lo ya reportado por otros autores (28) pues se ha demostrado que inmunogénicamente G. lamblia no siempre es capaz de desarrollar una respuesta inmune humoral importante.

Al llevar a cabo la necropsia en los animales las alteraciones macroscópicas correspondieron a: nódulos blanquecinos (grasa) aerofagia y el plegamiento del intestino.

Toda esta patología corresponde a lo referido en las parasitosis por Giardia en humanos (6,7,17,18). Sin embargo, esto no se presentó en todos los casos; la mayor proporción encontrada de estos parámetros fue del 50%, relacionándose con el hallazgo de observar al parásito en las improntas como sucedió con las cepas HLM-8, HLM-20, HLM-30 y HLM-35.

Las alteraciones en las microvellosidades determinadas por el índice de Rubin para demostrar el nivel de lesión ocasionado por Giardia lamblia mostró diferencias entre las cepas estudiadas, en donde la cepa HLM-6 y HLM-8 desarrollaron el nivel III,

así como las cepas HLM-16, HLM-18 y HLM-19 mostrándose capaces de producir niveles I, II y III en la mayoría de los animales inoculados con estas cepas de Giardia lamblia.

Igualmente en todos se observó hiperplasia linfática también señalada por los autores (20,23) como la alteración del intestino más común por Giardia lamblia.

La actividad específica de lactasa fue baja en los animales inoculados con 24 cepas de Giardia lamblia, se obtuvieron valores menores de 5 U/mg de proteínas y sólo tres de ellos tuvieron una actividad de lactasa de más de 30 U/mg de proteína, cifras semejantes a las obtenidas en el grupo testigo.

Si se considera que las enzimas se localizan en las células de las microvellosidades intestinales se podría inferir que la alteración morfológica en ellas trajo como consecuencia una modificación enzimática.

Al tratar estadísticamente estos dos parámetros los resultados obtenidos fue una probabilidad de  $P = 0.010$ , con lo que se demostró la correlación entre estas dos alteraciones, a pesar de que no todas las cepas tuvieron el mismo comportamiento.

La otra determinación que se presentó con mucha frecuencia en este estudio fue la hiperplasia linfática correspondiente a un incremento de células linfoides, en donde algunos coincidieron con una actividad enzimática de lactasa baja. Al tratar es-

tos resultados mostraron un valor de  $P = 0.0063$ , con lo que se deduce que sí hubo diferentes niveles de patogenicidad en las cepas de Giardia lamblia estudiadas.

De acuerdo a las observaciones microscópicas el diferente nivel de patogenicidad se correlacionó con el aplaneamiento o en sanchamiento de las microvellosidades, lo cual fue observado en 11 cepas de Giardia lamblia (HLM-1, HLM-4, HLM-6, HLM-8, HLM-14, HLM-15, HLM-21, HLM-22, HLM-27, HLM-28, HLM-33 y HLM-34), confirmando esto con el microscopio electrónico, en donde se obtuvo -- una visión más detallada de esta alteración.

De igual manera la hiperplasia linfática fue observada, aun que se presentaron niveles desde 12.5 hasta 75%.

Por lo que se infiere que las cepas de Giardia lamblia estudiadas, presentaron diferentes niveles de patogenicidad, lo cual podría responder a la diferente sintomatología que se observa -- cuando un individuo porta Giardia lamblia en su intestino.

## CAPITULO V

## CONCLUSIONES

- 1.- Se estudiaron diferentes parámetros entre los cuales se incluyeron ganancia de peso, respuesta humoral, alteraciones macroscópicas, presencia del protozooario en improntas, alteraciones en las microvellosidades intestinales, hiperplasia linfática, así como su correlación entre ellas. Para determinar diferencias de patogenicidad en animales experimentales inoculados con 35 cepas de Giardia lamblia.
- 2.- Después del noveno día de inoculación, se observó al protozooario en las heces de los animales, coincidiendo todos en la pérdida de peso. Sin embargo, las alteraciones en las microvellosidades intestinales no siempre se observó.
- 3.- La actividad de lactasa fue baja en la mayoría de ellos, coincidiendo con el aplanamiento de las microvellosidades intestinales, su correlación fue estadísticamente significativa y sólo en las cepas HLM-1, HLM-2 y HLM-3, se presentaron niveles enzimáticos comparables con el testigo, correlacionándose a su vez con la falta de alteraciones microscópicas.
- 4.- La hiperplasia linfática igualmente se manifestó en el 60% de los animales y su correlación con la actividad enzimática fue estadísticamente significativa.

5.- De acuerdo a estos hallazgos se infiere que existe una relación entre patogenicidad y cepa. En este caso la mayoría corresponde a cepas patógenas, aunque la relación inmunológica no fuera importante, pudiendo ser esto una explicación a lo que sucede en el individuo cuando porta Giardia lamblia en donde en ocasiones puede estar asintomático, pero las alteraciones intestinales pudieran estar presentes sin manifestarse.

## B I B L I O G R A F I A

- 1.- Anand, B.S., Chaudhary R. Jyothi A., Yadeu and Baveja V.D. Experimental examination of the direct damaging effects - of Giardia lamblia on intestinal mucosal scraping of mice. Rev. Trans. R. Soc. Trop, Méd. Hyg. Vol. 79. 613-617. 1985.
- 2.- Ament M. E., Ochs H.D., Daus S.D. Structure and function of the gastrointestinal tract in primary immunodeficiency syndromes: A study of 39 patients. Medicine. Vol. 52. 227 248. 1973.
- 3.- Barbara S., Kaplan Shigehilo Uni Masamichi. Efector mechanism of host resistaine in murine Giardiasis: Specific IgC and IgA cel-Mediated toxicity. The Journal Inmunology. Vol. 134. (3) 1985.
- 4.- Beabieri D., De Brito T., Hoshino S., Nacimiento O., Martin Campos J.D. Giardiasis and Chilhood. Arch Dis Child - Vol. 45. 466-472. 1970.
- 5.- Belosevis M., Faubert G., M, Comparative estudies of inflammatory responses in suceptible and resistant mice infec-- tion with Giardia muris. Clin Exp. Inmunology. Vol. 65. -- 622-630. 1986.
- 6.- Burke J. S., Giardiasis in Chilhood. Am. J. Dis. Child. - Vol. 129. 1304-1310. 1975.
- 7.- Brooks E., Audretsch J. Electromicroscopy of Giardia Lamblia in human jejunal biopsies. J. Méd. Microbiology. Vol.

3. 196-199. 1970.
- 8.- Campos R., Luis de S.F. Giardiasis. Rev. Inv. Méd. Internal. 10/5. 50-57. 1985.
- 9.- Cantor D., Biempica L., Toccalino Y., O Donnell J.C. Small intestine studies in Giardiasis. Rev. Am. J. Gastroenterology. Vol. 4. 322-334. 1986.
- 10.- Carrol F.E., Farr R.P., Clifton J.R. Parasitología Clínica Salvat Mexicana de Ediciones, S.A. de C.V. 1981.
- 11.- Coello R.P., Medina Huerta L. A., Etiología de la diarrea prolongada en niños. Bol. Méd. Hosp. Inf. Méx. Vol. 41. 605-610. 1984.
- 12.- Craff Carls J. Experimental infection with Giardia lamblia in rats. Am. J. Infectology. Vol. 145. 495-498. 1982.
- 13.- Dalhquist, A. Method for assay of intestinal disaccharidases. Anal. Biochem. Vol. 7. 18. 1964.
- 14.- De Carneri., I., Trane F., Mandelli V. Giardia muris with one trophozoite and generation time in mice. Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg. Vol. 71. 438. 1977.
- 15.- Erlandsen, S.L. Chase, D.G. Morphological alterations in the microvillous border of villus epithelial cells produced by intestinal microorganisms. Rev. Am. J. Clin. Nutr. - Vol. 27. 1277-1286. 1984.

- 16.- Ferguson A., Muro G. H. Giardia muris infection in mice - with conceoret graft-versus host reaction. Parasita Inmuno  
nology Vol. 10 589-592. 1988.
- 17.- García Melgar M., Larracilla Alegre J. Giardia intestinal estudio de 100 casos y revisión del tema. Bol. Méd. Hosp. Inf. Méx. Vol. 40. 372-374. 1979.
- 18.- Hartong W. A., Gourley W.K., and Arvenitakis C. Giardia-- sis: Clinical spectrum and funtional-structural abnormali tes of the small intestine mucosal Gastroenterology Vol. - 77. 61-69. 1979.
- 19.- Hermans P.E., Huizeng K., A., Hoffman H.N. Dysgammaglobu- linemis asociated with nodular lymphoid hiperplasia of the small intestine Am. J. Méd. Vol. 40. 78-89. 1986.
- 20.- Hoskins L.C., M.D.S.J., Wimawer M.D., A. Broltman. Clini-- cal Giardiasis and intestine malabsorption. Gastroentero-logy Vol. 66. 16. 44. 1980.
- 21.- Kumate J., Gutiérrez G. Manual de Infectología 7a. ed. Méx Ed. Medicas del Hospital. Inf. Méx. 34-44. 1980.
- 22.- Lloyd L., Brandborg A.B., Charlette B., Tankersley Stract Gottlerb., M.D., Maurine Barancik, M.D. and Victor E. His- tological demostration of mucosa invasion by Giardia lam-- blia in mem. Gastroenterology. Vol. 74.496-500. 1978.

- 23.- Marvin E.A., Cyrus E., Rubin M.D. Relation of Giardiasis - to abnormal intestinal structure and function in gastrointestinal immunodeficiency syndromes. Gastroenterology. -- Vol. 62.216.226. 1972.
- 24.- Michael J.G. Giardia lamblia mecanismo de colonización patogénica de la enfermedad diarreica. Rev. Infectología - Vol. 2. 79-90. 1983.
- 25.- Mintyre P., M.B.B.S. Peter F. Broreham., Ph. D., Rex. E., - Shepherd., M. D. Quimiotherapy in giardiasis clinical response and vitro drug sensivity of human isolaters in axenic cultive. Am J. Pedriatrics. Vol. 108-1005-1010. 1986.
- 26.- Nash T., E. Keisters D.B. Diferences in Excretory-secretory products and surface antigens among 19 isolates of giardia. J. Am. Infect. Dis Vol. 52. 116-1171. 1985.
- 27.- Notis W. H. Giardiasis and Vit B-12 malabsorption. Gastroenterology Vol. 63. 1085. 1972.
- 28.- Olle Hernell., Honorine W., Lars Blackberg Miercio E., A. Pereira. Killing of Giardia lamblia by human lik lipase. - An effect mediated by lipolysis of milk lipids. J. Infec. Dis. Vol. 153. 715-720. 1986.
- 29.- Ramírez Mayans., Cols. Frecuencia de Giardia en las heces de 100 niños con diarrea crónica. Bol. Méd. Hosp. Inf. Méx. Vol. 41. 1734-736. 1985.

- 30.- Ramírez Mayans J.A. Roberto Calva R., Mariano Rivera R. - Raúl Limón G. Evaluación de la prueba de D-xilosa como indicador de daño de la mucosa intestinal. Bol. Méd. Hosp. - Inf. Méx. Vol. 40. 131-134. 1983.
- 31.- René Espinet J.M., Font Alonso., J.M. Farré Farran., Caballero R. Comovariable hipogammaglobulinemia with intestinal nodular hyperplasia. Rev. Esp. Enf. Ap. Digest. Vol. - 73,s-1. 1985.
- 32.- Seghal A. K. Grewall M. S. Chakraveti R.N., Broor S. L. - Deka N.C., Chuttani P.N. Experimental giardiasis in albino rats. Indian J. Méd. Res. Vol. 64. 1015-1018. 1976.
- 33.- Steve H. Giardiasis y Giardiasis (primera parte) Rev. ---- Infect. Vol. 12. 613-621. 1983.
- 34.- Stave H., Monroy, A. Giardiasis y Giardiasis (segunda parte) Rev. Infect. 4/1. 16-22. 1984.
- 35.- Stephen J.L. Richard A.W. Tratament of Giardiasis. Rev. -- Depto. of Pedriatric and Medical Mficrobiology. 21/7. 409 - 415. 1982.
- 36.- Stevens D. Mahmoud A. F. Kanneth S., Warren M.D. Giardiasis in the mouse an animal model. Gastroenterology Vol. 71 57- 61. 1976.
- 37.- Stevens D. Mahmoud A. F. Warren K.S. Arquired resintence to infection in animal model of giardiasis. J. Immunology Vol. 117. 2036-2037. 1976.