

63
m



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
PLANTEL: ZARAGOZA**

**DETERMINACION DE LA ANTIGENICIDAD
DE LAS PROTEINAS DE
Giardia lamblia**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLGO
P R E S E N T A :
MARIA ANTONIETA SUAREZ SOUTO



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D.F.

FEBRERO 1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DETERMINACION DE LA ANTIGENICIDAD DE LAS PROTEINAS DE
Giardia lamblia.

*Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación en
Parasitología del Hospital Infantil de México "Federico Gómez"
bajo la dirección de la Dra. Enedina Jiménez Cardoso.*

Mi profundo agradecimiento al profesor Rubén Marroquín Segura por su colaboración en la realización de este trabajo.

A las profesoras Martha Sánchez Rodríguez y Mercedes Zamudio Durán por sus consejos y enseñanzas.

A las profesoras Isabel Soto Cruz y Carolina Sauer Ramirez por sus valiosas observaciones y sugerencias.

A la Dra. Enequina Jiménez Cardoso por haberme dado la oportunidad de desarrollar este trabajo en su laboratorio.

A mis padres por haber contado siempre con su gran apoyo en todos los aspectos.

INDICE

	páginas
Resumen	1
Introducción	2
Marco teórico	3
Justificación	23
Planteamiento del problema	24
Objetivos e hipótesis	25
Material	26
Metodología	29
Resultados	34
Discusión	42
Conclusiones	48
Propuestas	49
Bibliografía	50

RESUMEN

Considerando que el disco ventral de *Giardia lamblia* participa de manera importante en el mecanismo de patogenicidad del parásito, el presente trabajo tuvo por objeto la obtención de las proteínas que lo integran, fundamentalmente giardinas y tubulinas, y el análisis de su antigenicidad. Para ello se llevó al cabo el aislamiento de proteínas totales de citoesqueleto por el método de Holberton y Ward¹⁴, a partir de las cuales se seleccionaron las proteínas de interés mediante separación isoelectrónica y electroforética. Con las diferentes fracciones isoelectroenfocadas de giardinas y tubulinas se inmunizaron gerbos (*Meriones unguiculatus*) y se demostró que los anticuerpos reconocieron predominantemente los polipéptidos de peso molecular mayor y en menor grado a las giardinas y a las tubulinas. El marcaje con biotina de las proteínas de membrana reveló que los antígenos de elevado peso molecular se encuentran expuestos en la superficie del parásito de igual manera que las giardinas y las tubulinas, pero en concentración pequeña o bien, exteriorizando algunos epitopos. La técnica de inmunofluorescencia indirecta corroboró lo anterior al poner de manifiesto el reconocimiento de anticuerpos anti-fracciones proteicas del citoesqueleto hacia antígenos somáticos y de la periferia del disco ventral. Con base en los resultados obtenidos se concluye que existen especies de giardinas y tubulinas que además de constituir el disco ventral de *Giardia lamblia* se localizan extrínsecamente en la membrana del trofozoito, por lo que pudieran participar activamente en el proceso de adherencia del parásito a la mucosa duodenal del huésped.

INTRODUCCION

A pesar de los avances en el desarrollo económico, de las expectativas de vida y de diversos programas de salud, las enfermedades producidas por parásitos siguen siendo un gran problema de salud en América Latina. La giardiasis o lambliasis en nuestro país presenta características endémicas que obedecen en gran medida a las condiciones medioambientales o socioeconómicas, estado nutricional, hábitos higiénicos y de manera especial a factores relacionados con el parásito y la dinámica de su transmisión. *Giardia lamblia* es el agente causal de esta enfermedad y es considerado como uno de los eucariontes evolutivamente más primitivos capaz de desarrollar procesos de adaptación muy eficientes que le permiten coexistir con su huésped, de tal manera que en función de esta relación huésped-parásito, la enfermedad puede ser asintomática en algunos individuos o bien manifestar cuadros agudos y crónicos asociados a episodios diarreicos y síndrome de malaabsorción intestinal.

La asociación de la giardiasis con alteraciones importantes en el desarrollo nutricional del niño en etapa preescolar, así como la ineficacia de métodos para el diagnóstico y tratamiento de esta infección, son algunos de los factores que han propiciado una ardua labor de investigación en las dos últimas décadas. Entre las aportaciones más relevantes de estos estudios está el conocimiento de antígenos de membrana y citoesqueleto del parásito destacando entre estos últimos aquellos que constituyen el disco ventral. Se sabe que gran parte de los antígenos de membrana y algunas especies de tubulinas son antigénicas, pero no se sabe con certeza si las giardinas y tubulinas del disco ventral de *Giardia* también lo sean. La importancia de estas proteínas radica en su posible participación en el fenómeno de adherencia del protozoario, y al ser inmunogénicas si son capaces de conferir protección.

MARCO TEORICO

GENERALIDADES

La giardiasis es una enfermedad de distribución cosmopolita y es considerada en años recientes como una causa importante de diarrea¹⁻³. El agente etiológico es un protozooario entérico flagelado llamado *Giardia lamblia* cuyo término rinde homenaje a dos científicos europeos del siglo XIX que se dedicaron a su estudio: el francés Alfred Giard y el checoslovaco Vilem Lambi⁴.

Morfología. Adopta dos formas, una de quiste que es infectante y una de trofozoito que es patógena. El trofozoito tiene forma de pera, mide de 9 a 21 μ de largo por 5 a 15 μ de ancho y 2 a 4 μ de espesor, es redondeado en su porción anterior y afilado en la posterior. La superficie dorsal es convexa y tres cuartas partes de la superficie ventral anterior están ocupadas por un disco adhesivo cóncavo el cual semeja a una ventosa que sirve de anclaje al organismo⁵ (figura 1). Los dos núcleos situados uno a cada lado de la línea media en la región anterior son ovoides y contienen un cariosoma central formado por una masa densa de cromatina; la membrana nuclear está parcialmente cubierta con ribosomas⁶⁻⁷. A partir de cuatro pares de blefaroplastos (kinetosomas o cuerpos basales) localizados entre los núcleos a ambos lados de la línea media se originan cuatro pares de axonemas (intracitoplasmáticos) los que dan lugar a los flagelos y éstos se designan de acuerdo a su disposición: anterior, posterior, ventral y caudal⁸⁻⁹. El trofozoito tiene también otras estructuras:

- a) los cuerpos parabasales (cuerpo medio) que son estructuras microtubulares en forma de media luna situados dorsalmente a los axonemas caudales.
- b) el funis constituido por microtúbulos que acompañan a los axonemas caudales en su posición ventral y dorsal (figura 2).

c) estructuras citoplasmáticas como ribosomas, gránulos de glucógeno, retículo endoplásmico rugoso, vacuolas lisosomales distribuidas a lo largo de la superficie ventral y dorsal con actividad de hidrolasa, entre éstas: fosfatasa ácida, DNAasa, RNAasa, proteínas tior dependientes(cisteína) y tior independientes. No se han identificado mitocondrias, peroxisomas, retículo endoplásmico liso ni nucleolos^{9,10}. Probablemente el aparato de Golgi si esté presente en el trofozoito debido a que se ha demostrado un transporte organizado de proteínas hacia los lisosomas y superficie del protozoario.

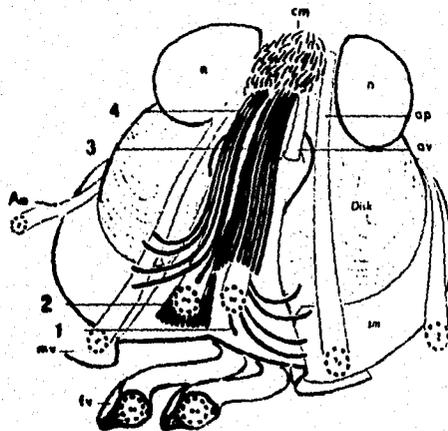


Fig. 1. Reconstrucción perspectiva del disco ventral, visto por detrás de la membrana dorsal. Axonemas anterior(Aa), ventral(Av), posterolateral(Ap). Membrana ventral(mv). Microtúbulos que rodean a los axonemas caudales(1-4). Cuerpo medio(cm), flagelo ventral(fv). Fuente: Holberton D.V. (1973)

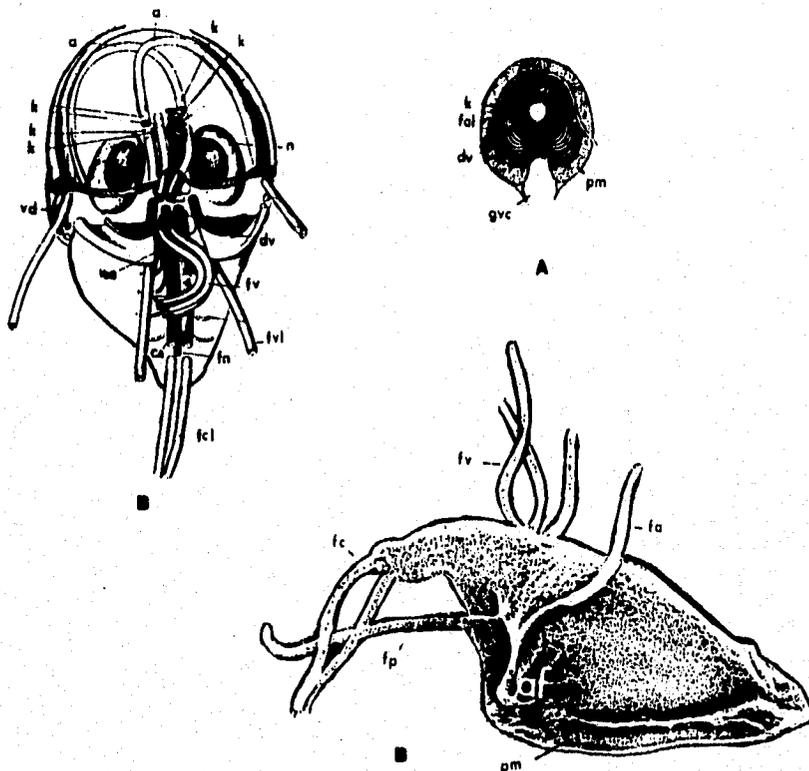


Fig 2. Ultraestructura del trofozoito de *Giardia lamblia*. A) Vista ventral. Kinetosomas(k), núcleos(n), axonemas(a), funis(fn), disco ventral(dv), flagelo ventral(fv), grieta ventrocaudal(gvc), vacuolas digestivas(vd), flanco ventrolateral(vlf), flagelo caudal(fcl). B) Vista dorsal. Placas marginales(pm), flagelos: anterior(fa), posterior(fp), caudal(fc) y ventral(fv). Fuente: Kreister JP (1972), Feely DE (1982).

El quiste es ovoide y mide de 8 a 12 μ de largo por 7 a 10 de ancho, está envuelto por una pared quística integrada por una capa externa filamentosa y una interna membranosa. Contiene en su interior vacuolas, ribosomas, axonemas flagelares, funis y cuerpos parabasales^{9,11}.

Ciclo de vida. La forma infectiva es el quiste maduro que debe ser ingerido por vía oral. Una vez que el quiste llega al estómago, se inicia el proceso de desenquistamiento que concluye en el duodeno; durante dicho proceso un trofozoito tetranucleado se mueve dentro del quiste lo rompe por su parte posterior y sale. Al quedar libre, su citoplasma se divide mediante fisión binaria longitudinal, llevándose a cabo la distribución de núcleos, axonemas y estructuras que formarán el disco ventral, y finalmente, por citocinesis resultarán dos trofozoitos hijos. (figura 3).

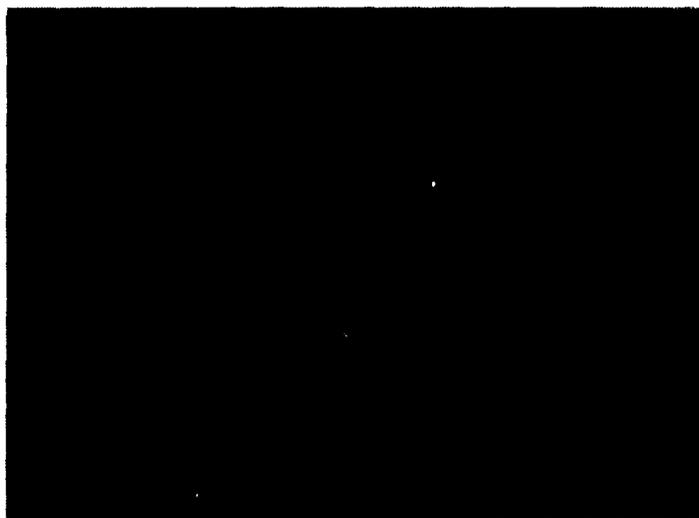


Fig. 3 División de trofozoitos de *Giardia lamblia* mediante fisión binaria longitudinal. Microscopía de contraste de fases (100 x). Fuente: Lab. de Inv. en Parasitología. Hosp. Infantil de México.

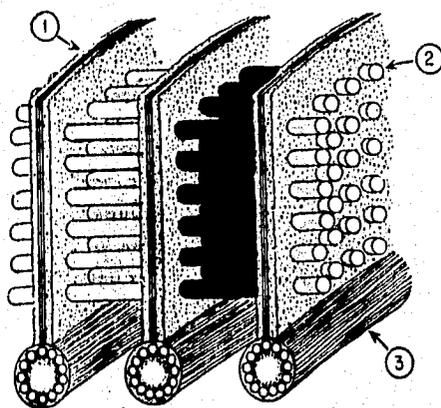
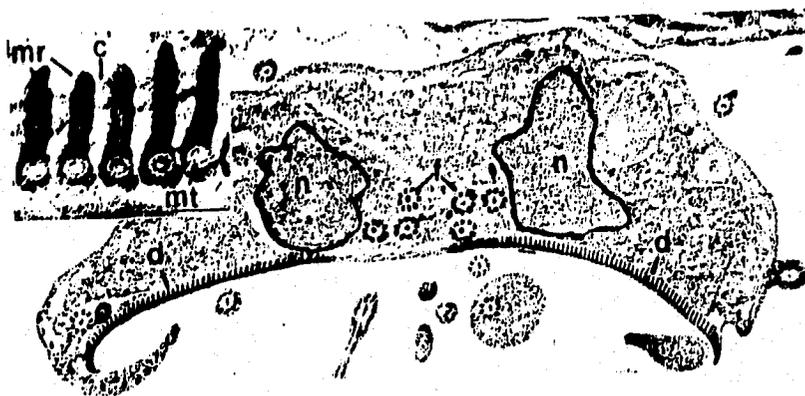
Debido al rápido movimiento de sus flagelos, el trofozoito se desplaza activamente de un lugar a otro y cuando aplica su disco ventral sobre el epitelio duodenal se fija firmemente a éste; simultáneamente ocurre la división nuclear y celular que generará otros dos trofozoitos y así sucesivamente. Algunos de ellos permanecen

adheridos a las microvellosidades y otros son arrastrados por el tránsito intestinal. Al llegar a la parte media a baja del yeyuno se produce el enquistamiento, sin embargo en ocasiones no se logra, particularmente cuando el peristaltismo está acelerado. Durante el enquistamiento los flagelos se retraen, el disco ventral y los cuerpos medios se desorganizan, el citoplasma se condensa, se secreta una membrana fina y hialina (pared quística) y los núcleos se dividen^{9,11-13}.

Disco ventral y mecanismo de adherencia. El sitio de adherencia del trofozoito a la mucosa intestinal del huésped es el disco ventral. Esta estructura está constituida básicamente de microtúbulos situados en posición adyacente a la membrana plasmática y perpendicularmente a ellos emergen las microtiras hacia el interior del citoplasma. Estas últimas están interconectadas por puentes cruzados y considerándose que dichos puentes le dan rigidez al disco, contribuyen a una de sus principales funciones como parte del citoesqueleto del parásito (figura 4). Estudios de microscopía electrónica muestran la disposición de las microtiras enrolladas concéntricamente a manera de espiral hacia un centro común, su origen es de la orilla más externa del disco terminando en un punto distal sobre el margen interno¹⁴ (figura 5).

El componente principal de los microtúbulos es la tubulina, heterodímero de 110 a 120 KDa. en promedio, formado por dos monómeros del mismo peso molecular (55 KDa.), alfa y beta tubulina¹⁵. La tubulina que integra los diferentes organelos microtubulares de citoesqueleto (flagelos, disco, cuerpo medio y funis) no es la misma para cada uno de ellos sino que difiere en la composición de algunos aminoácidos, o bien, en algunas especies se han generado otros por modificación de cadenas laterales (reacciones de glicosilación, fosforilación, etc); de ahí que estas especies de tubulina posean distintos puntos isoeléctricos y/o pesos moleculares. Se ha encontrado que la tubulina que integra el disco ventral se constituye a su vez de 5 variantes isoeléctricas con rango entre 5.6 y 5.75. Las microtiras se componen de giardinas que son un grupo de proteínas con pesos

moleculares entre 28 y 39 kDa. y con punto isoelectrico de 5.8 a 6.2, contiene una cantidad elevada de leucina, la que le confiere una estructura terciaria de tipo helicoidal elongada¹⁶. Se ha sugerido que las giardinas se presentan en las microtiras en una concentración superior al 40% y copolimerizan con la tubulina en forma laminar en una relación de 2 a 3 moléculas de giardinas por cada dimero de tubulina, incluyéndose su interacción con otras proteínas como las MAP's (proteínas asociadas a microtúbulos). Sin embargo mediante inmunocitoquímica con anticuerpos antitubulina y anti giardina se pone de manifiesto que la tubulina se localiza solamente en los microtúbulos pero no en las microtiras y se muestran anticuerpos anti giardina enlazados claramente a las orillas de las microtiras, extendiéndose de la superficie citoplasmática al microtúbulo basal. Probablemente la interacción giardina-tubulina es tal que la cara externa de la microtira corresponde a la superficie interna del microtúbulo¹⁷.



1. MICROTUBULOS
2. PUENTES CRUZADOS
3. MICROTUBULOS

Fig.4. A) Fotografía en microscopio de transmisión electrónica de un trofozoito de *Giardia lamblia* intacto en sección transversal. Se observan: flagelos(f), núcleos(n) y disco ventral(d). En el cuadro superior izquierdo se muestran estructuras del disco ventral fijadas con ácido tánico: microtubulos(mt), microtubulos(mr) y puentes cruzados (c). **B)** Esquema que enfatiza las principales estructuras del disco ventral. Fuente: Crossley R. (1993).

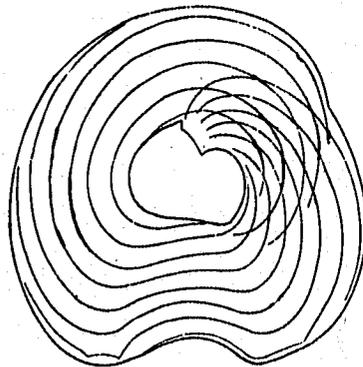


Fig. 6. Microfilas del disco ventral enrolladas concéntricamente a manera de espiral hacia un centro común. Fuente: Hoiberton DV. (1981).

La función del disco en el mecanismo de adherencia no es clara, para explicarlo se han propuesto diferentes modelos:

- **Flexibilidad de las orillas del disco ventral** donde se han localizado proteínas contráctiles: actina, alfa actinina, miosina y tropomiosina. Por microscopía electrónica se observa como las orillas del disco ventral interdigitan con las microvellosidades de la célula huésped y las deforma dejando una imagen en espejo de estas orillas sobre los microvellos¹⁸.
- **Fuerza de succión generada por el movimiento sincrónico sinusoidal del flagelo ventral**, el cual induce a un fuerte flujo de fluidos a través de los canales laterales y la grieta ventrocaudal. Dicho flujo resulta en una progresiva acumulación de fuerza viscosa la cual es máxima cerca del portal, en la "garganta" de la grieta ventrocaudal, lo que indica que la fuerza de succión alcanza un valor máximo en este sitio, dicha fuerza es comunicada hidrostáticamente a través del portal a la cámara ventral^{9,10} (figura 6).

- **Interacciones mediadas por receptor.** Se demostró que trofozoitos de *Giardia lamblia* cepa P-1 se adhieren a eritrocitos de conejo mediante una lectina asociada a membrana con afinidad específica hacia residuos glucosil y manosil; si bien es cierto que los primeros no están presentes sobre las células de epitelio intestinal humano, los residuos D-manosil sí lo están y pueden servir como posibles sitios receptores para dicha lectina, además éstos se encuentran principalmente en células pobremente diferenciadas (inmaduras) de las criptas de Lieberkum, que son producto de recambio celular incrementado a este nivel por la presencia del parásito. Quizá esta lectina participe de manera complementaria en la adhesión mediada por el disco ventral y que incluso contribuya a un daño funcional y/o morfológico en el intestino delgado de algunos pacientes con giardiasis, semejante a lo que ocasionan algunas lectinas vegetales en intestino delgado de mamíferos²⁰.
- **Possiblemente la carga iónica localizada en la superficie del trofozoito de *Giardia lamblia* esté involucrada en la adhesión a células epiteliales de intestino delgado.** Sin embargo poco se sabe sobre la estructura de la superficie celular de este protozoo; análisis citoquímicos ponen de manifiesto una prominente cubierta superficial que se tinte con colorantes catiónicos tales como rojo de rutenio y ferritina catiónica, sugiriendo la existencia de una carga negativa completa la cual también es demostrada por electroforesis celular²¹.

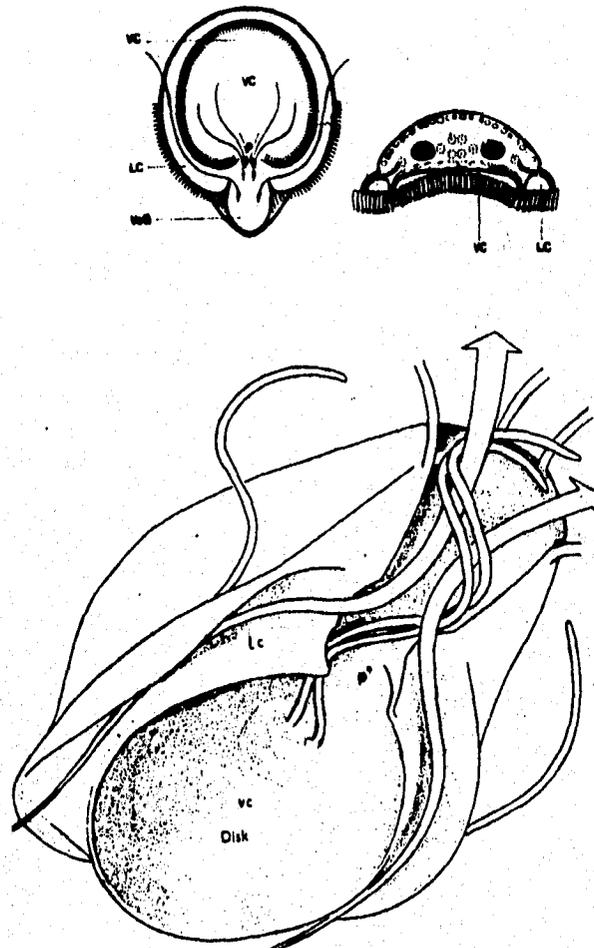


Fig 6. Adherencia del trofozoito de *Giardia lamblia*. El movimiento sinusoidal del flagelo ventral induce un flujo de fluidos a través del canal lateral(LC) y la grieta ventrocaudal(VcG, flechas largas). La fuerza de succión generada por este flujo es transmitida a través del portal(P) hacia la cámara(VC) del disco adhesivo(flechas pequeñas). A) Las áreas sombreadas indican el contacto de adhesión de Giardia con el sustrato. Fuente: Kreister JP. (1972), Holberton DV. (1973).

El mecanismo de adherencia depende del metabolismo activo y es inhibido por oxígeno, temperatura y concentraciones de cisteína reducidas^{22,23}, así como agentes farmacológicos. Se cree que los benzimidazoles interaccionan con la beta tubulina del disco, pero no la que se encuentra en flagelos lo que sugiere que esta última no posee el sitio de enlace para benzimidazoles y es una evidencia más de que el disco y los flagelos contienen distintas tubulinas, lo que demuestra también que el movimiento flagelar no es suficiente para que la giardia se adhiera¹⁰.

Epidemiología. La giardiasis es de distribución cosmopolita con cifras de frecuencia muy variable dependiendo, principalmente, de las condiciones sanitarias y el nivel educativo de cada región. En climas cálidos su prevalencia es mayor, no obstante, se han sucedido epidemias en regiones montañosas de clima frío, transmitidas por agua que ha sido purificada por un sistema inadecuado. La infección es más frecuente en edades pediátricas que en el adulto; se puede presentar desde la lactancia pero tiene sus picos máximos de prevalencia en los preescolares y escolares. El mecanismo de transmisión más común es a través de agua y alimentos contaminados con quistes. Se da también por transmisión interpersonal en grupos con mala higiene fecal-oral, como niños pequeños en guarderías, homosexuales masculinos sexualmente activos y personas en instituciones de custodia. Algunos animales salvajes infectados, castores y animales domésticos también pueden ser portadores de la infección^{7,13,24}.

Patogenia. Los mecanismos por los cuales *Giardia lamblia* ejerce su acción patógena pueden ser explicados por las siguientes teorías^{25,26}:

- Obstrucción mecánica. Ocasionada por una cantidad masiva de parásitos que recubren la mucosa intestinal provocando mala absorción.
- Daño a la mucosa. Los trofozoitos al adherirse al epitelio intestinal acortan las microvellosidades lo que resulta en irritación de la mucosa causando una

producción excesiva de moco, alteración en el proceso de maduración de las células, así como disminución en la actividad de disacaridasas y otras enzimas presentes en el borde en cepillo de las células epiteliales. También se presentan focos inflamatorios en las criptas y lámina propia. Con muy poca frecuencia se han encontrado escasos parásitos en el interior de las células de la mucosa, bases de criptas y submucosa.

- **Interacción parásito-huésped.** Existe una competencia por nutrientes entre el flagelado y la mucosa intestinal, los cuales son necesarios tanto para la función celular epitelial como para el metabolismo del protozooario. Algunos síndromes de deficiencias inmunitarias se han relacionado con la giardiasis, como es el caso de la hipogammaglobulinemia, particularmente de las clases IgA e IgM. Otros factores que influyen son: la hipoclorhidria, mala absorción de lactosa y malnutrición.
- **Proliferación de bacterias.** *Giardia lamblia* favorece la colonización del duodeno por bacterias lo que trae como consecuencia deconjugación de sales biliares provocando mala absorción de grasas.

Immunología. La importancia de la participación del sistema inmune del huésped se ve reflejada en la elevada susceptibilidad a la giardiasis que presentan individuos con inmunodeficiencias o malnutrición, por otro lado a la baja incidencia de la enfermedad en sujetos expuestos repetidamente a *Giardia lamblia* y en niños cuyas madres han sido infectadas por el parásito^{10,27}.

Se ha demostrado que los principales mecanismos inmunológicos del huésped que contribuyen a la erradicación del parásito son: fagocitosis, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) y fijación de complemento²⁸, en los cuales participan ambos tipos de respuesta, humoral y celular. Los estudios que dieron a conocer lo anterior fueron, en su mayoría, realizados "in vitro", de manera que para inferir cómo se manifiestan estos procesos a nivel duodenal es necesario estudiar el ambiente inmunológico de dicha región (figura 7).

El tejido linfoide del intestino constituye el 25% de la mucosa del mismo y está integrado por^{29,30}:

1. Placas de Peyer: agrupación organizada de folículos linfoides no encapsulados que se encuentran separados del contenido luminal por células epiteliales membranosas llamadas "células M", que carecen de microvellos sobre su superficie, son pinocíticas y transportan macromoléculas y material particulado del lumen intestinal a las placas de Peyer.
2. Células linfoides de la lámina propia: linfocitos B, T, células plasmáticas, macrófagos, mastocitos y eosinófilos.
3. Linfocitos intraepiteliales.
4. Nódulos linfoides mesentéricos.

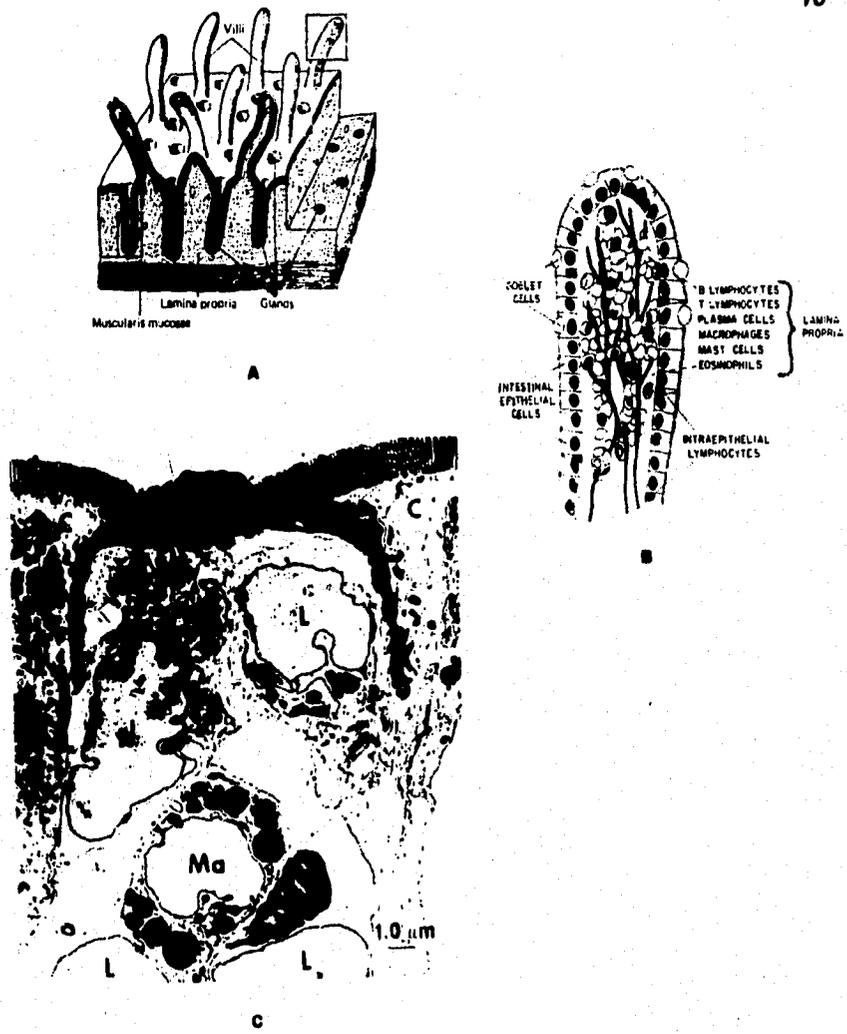


Fig. 7. A. Diagrama macroscópico de la mucosa duodenal . B. Sección transversal de un vello del intestino delgado el cual muestra sus células constituyentes C. Superficie del epitelio a nivel de lámina propia que enmarca la posición de las células "M" como puerta de entrada para que el antígeno llegue a las placas de Peyer. Fuente: Sircus SW (1983), Shorter RG. (1985).

El procesamiento de antígenos y los eventos celulares iniciales de la respuesta inmune ocurren en las placas de Peyer. Estudios "in vitro" que evalúan la respuesta de dichas placas a la infección por *G. muris* revelan que en ratones infectados el número de leucocitos fue más del doble entre el séptimo y décimo día postinoculación de quistes, observándose que las proporciones de las células T cooperadoras y supresoras no variaron, no así en las células B, pues las productoras de IgM rápidamente proliferaron alcanzando un máximo al séptimo día y las IgA llegaron a niveles máximos entre el onceavo y catorceavo día postinoculación; subsecuentemente las células productoras de IgM llegaron en forma gradual a niveles basales mientras que las productoras de IgA permanecieron elevadas. Transcurridas cinco semanas ambas células B se encontraron en niveles normales^{31,32}.

Se ha demostrado que los macrófagos fagocitan en forma espontánea al parásito³³. Algunos autores señalan que los granulocitos sólo lo hacen en presencia de anticuerpos, es decir, su participación se da por CCDA^{34,35}. La IgG es el isotipo de inmunoglobulina que interviene predominantemente en este mecanismo ya que, en ausencia de la misma, la citotoxicidad de granulocitos se reduce hasta un 80-90%, el porcentaje restante refiere la posible participación de otras inmunoglobulinas como IgM e IgA³⁶.

La destrucción del parásito vía fijación de complemento, puede llevarse a cabo por vía clásica o alterna. En la primera participan IgG e IgM y de manera importante los factores C₁, C₂ y C₄; se encontró que en suero de individuos no infectados deficientes de C₂ y C₄ la lisis de los trofozoítos disminuyó un 36 y 46% respectivamente mientras que la depleción de C₁ anuló el efecto lítico. En la vía alterna destaca la participación de B, debido a que en suero humano depletado de éste y deficiente de C₂ no ocurrió la lisis. En la presencia de C₃ la destrucción del parásito se da en un 56% pero aunado a C₉ aumenta a 98%^{37,38}.

Posiblemente la función principal de la IgA en el lumen intestinal sea bloquear la adherencia del trofozoíto al epitelio^{29,30,39} y quizá participe en fijación de complemento por vía alterna.

Se han realizado tres planteamientos respecto a la interacción que ocurre entre el parásito y las células inmunes del huésped a nivel duodenal:

- Los antígenos a través de las células M, llegan a placas de Peyer en donde son procesados por células presentadoras de antígeno mostrándolo al linfocito T, el que por medio de linfocinas activa otras células, como las células B y citotóxicas que participan en CCDA. Tal vez dichos antígenos sean productos de excreción y secreción del parásito⁴⁰ debido a que es imposible que el trofozoito penetre la célula M (figura 8).
- Los trofozoitos de *G. lamblia* quizá sean capaces de penetrar por diapédeas células epiteliales a nivel de sitios de descamación después de lo cual se enfrentan a células del sistema inmune⁴¹. Por otra parte se ha demostrado que productos de lisis del parásito son quimiotácticos para neutrófilos y macrófagos lo que potencia la respuesta inmune local⁴¹ (figura 9).
- Se ha observado que linfocitos intraepiteliales salen al lumen intestinal y son capaces de adherirse a la superficie dorsal del parásito⁴¹; se desconoce su naturaleza pero un dato importante es que pudiera tratarse de un linfocito T citotóxico que interaccionara con la lectina del parásito²⁰ (figura 10).



Fig. 8. Trofozoito de *Giardia muris* (G) adherido a los microvellos de las células epiteliales. Nótese la presencia de células "M" cuya superficie no presenta vellos, así como la imagen "en espejo" del disco adhesivo (flecha) (x 4,109). Fuente: Owen RL. (1979).



Fig. 9. Trofozoito de *Giardia muris* que se introduce por diapidesis en el surco de la mucosa situado lateralmente a un vello intestinal (x 5,282). Fuente: Owen RL. (1979).

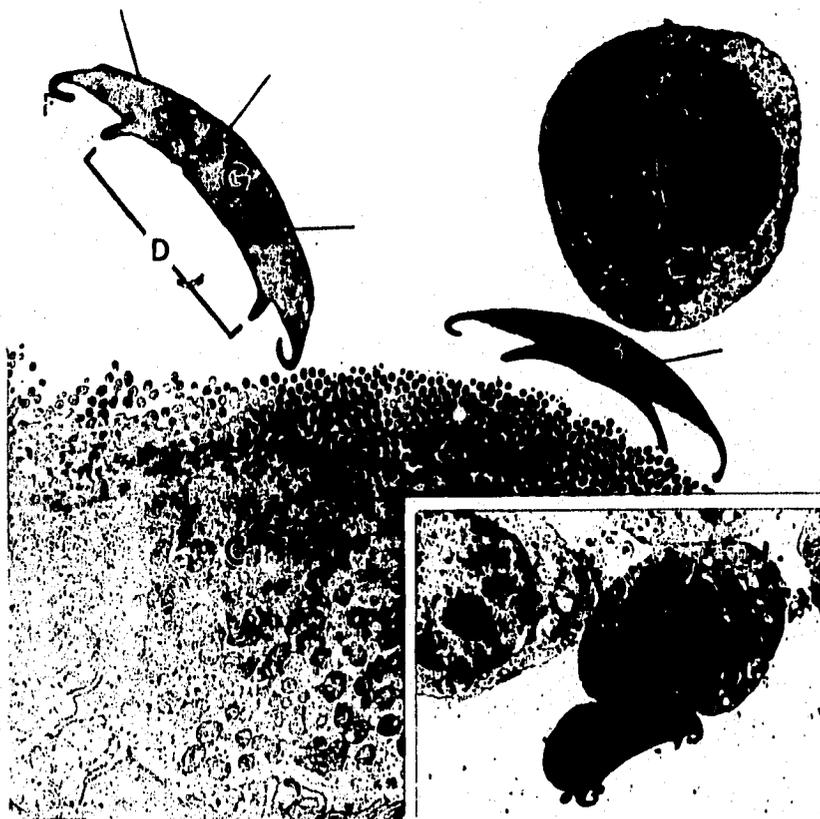


Fig. 10 .Dos trofozoitos de *Giardia* (G) en sección sagital y un linfocito pequeño (L) sobre el borde de los microvellos de células epiteliales (C). Disco adhesivo (D), flanco citoplasmático (F) (x 7,421). En el cuadro inferior derecho un linfocito se encuentra adherido a la superficie dorsal del parásito (x 7,200). Fuente: Owen RL. (1979).

La participación en forma masiva de todas las células involucradas en la respuesta inmune a nivel duodenal es la responsable del proceso inflamatorio que presentan individuos con giardiasis

Cuadro clínico. La manifestación clínica de la giardiasis puede variar desde una infección asintomática hasta una diarrea crónica con malabsorción, lo cual se atribuye a factores del huésped (estado nutricional y/o inmunológico) y a la patogenicidad del parásito (tipo de cepa y ciertos antígenos de superficie), puede durar días o incluso meses. El período de incubación dura en promedio de una a dos semanas. Durante la etapa aguda las evacuaciones son diarreicas, explosivas, acuosas, grasosas, de olor fétido, amarillas con moco; cursando el paciente con distensión abdominal, náusea, vómito o disminución del apetito, pérdida de peso, retraso en el crecimiento corporal y en algunos casos fiebre y cefalea. En la fase crónica se encuentran los síntomas exacerbados además de mialgias y cuadros alérgicos. Las manifestaciones extraintestinales son muy raras pero cuando ocurren tienen complicaciones de tipo inmunológico como urticaria con eosinofilia, y rash eritematoso, entre otros⁴².

Diagnóstico. Suele hacerse mediante examen microscópico con el hallazgo de quistes en las heces formadas obtenidos por métodos coproparasitológicos (CPS) de concentración en serie de tres o más, empleando sulfato de zinc o formalina-éter. Cuando las evacuaciones son líquidas, es recomendable realizar un frotis en fresco para la búsqueda de trofozoitos. El diagnóstico de giardiasis en pacientes con diarrea crónica que muestran análisis CPS negativos puede ser establecido por examen de contenido duodenal mediante uso de la cápsula de gelatina de Beal o por aspiración duodenal; en casos extremos la biopsia puede ser necesaria. Existen otras técnicas de gran sensibilidad y especificidad como son: ELISA, inmunofluorescencia y contraelectroforesis, por medio de las cuales es posible detectar antígenos de Giardia en heces utilizando anticuerpos totales o monoespecíficos⁴³⁻⁴⁶.

Tratamiento. Los agentes efectivos para el tratamiento de pacientes con giardiasis son^{7,10,12}:

- **Quinacrina.** El mecanismo de acción posiblemente es debido a su efecto sobre componentes de la respiración del parásito como la flavoproteína y quinona. Algunos de los efectos colaterales en el paciente incluyen vómito, cefalea, trastornos intestinales, coloración amarilla de piel, rara vez psicosis tóxica de excitación o depresión.
- **Metronidazol.** Se ha propuesto una interacción con el DNA del parásito así como de las enzimas involucradas en la respiración del mismo, es mutagénico en bacterias y carcinógeno en ratones a dosis elevadas y por períodos prolongados; de manera ocasional, en el paciente puede provocar cefalea, náusea, vértigo, diarrea, sabor metálico, etc.
- **Furazolidona.** Probablemente actúa por inhibición de la respiración anaeróbica del protozoario. Las reacciones secundarias son: náuseas, fiebre, diarrea y vómito.
- **Mebendazol.** Se cree que su interacción es a nivel de beta-tubulina particularmente, microtúbulos del disco ventral, evitando con ello la adherencia del parásito. Los efectos secundarios en dosis elevadas incluyen reacciones alérgicas, alopecia y neutropenia reversible. Se han observado efectos embriotóxicos y teratogénicos en ratas preñadas.

JUSTIFICACION

La giardiasis es una enfermedad de gran importancia epidemiológica debido a su elevada prevalencia en la población infantil y es provocada por el flagelado *G. lamblia*^{1,5,10}. Este protozoo se adhiere a las microvellosidades de las células epiteliales de la mucosa intestinal por medio de una estructura denominada disco ventral o adhesivo, originando una serie de alteraciones morfológicas que traen como consecuencia un síndrome de malabsorción, que a su vez retarda el crecimiento y desarrollo del huésped^{9,11,19}. Por tal motivo en años recientes el estudio del disco ventral se ha convertido en un tema de investigación de gran relevancia. Cabe señalar que dicha estructura constituye la parte medular del citoesqueleto de *Giardia lamblia* y que se integra predominantemente por giardinas y tubulinas, proteínas que se encuentran distribuidas en todo el disco formando parte de microtiras y microtúbulos respectivamente^{14,16}.

El hallazgo de especies de tubulinas diferentes a las de citoesqueleto, sobre la membrana del parásito⁴⁸⁻⁴⁹, constituye un dato de particular importancia debido a que correlaciona perfectamente con los antígenos inmunodominantes de 54 y 58 kDa encontrados por Char y cols.⁵⁰ en individuos con giardiasis, esto puede adjudicarse a la posición adyacente que guardan los microtúbulos respecto a la membrana del parásito. También se ha reportado la existencia de proteínas antigénicas con pesos moleculares iguales a los de algunas especies de giardinas, sin embargo se desconoce si corresponden a las mismas proteínas que han sido localizadas en la superficie del flagelado^{48,50-51}.

Bajo esta premisa surgió el interés de esclarecer si existen especies inmunodominantes de giardinas y tubulinas que además de integrar el citoesqueleto de *Giardia* estén situadas en la membrana del parásito. Este estudio tiene una importancia trascendental debido a que las giardinas y tubulinas pudieran ser proteínas serodiagnósticamente útiles para pacientes con giardiasis y desde el punto de vista profiláctico, emplearse como vacunas para que anticuerpos específicos producidos contra las mismas bloqueen la adherencia del parásito al epitelio duodenal, impidiendo así que la enfermedad se manifieste.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las giardinas y tubulinas son proteínas constituyentes del disco ventral de *Giardia lamblia* con posible actividad antigénica⁵⁰⁻⁵², por lo que tal vez confieran una respuesta inmune protectora en individuos infectados por este parásito. Son varias las proteínas incluidas en este grupo^{16,17}, por lo que algunos investigadores se han interesado en separarlas y ver cuales son las proteínas que específicamente son antigénicas. Para ello se ha descrito un método de separación de proteínas por cromatografía en filtración en gel^{14,16} con resultados no muy alentadores; por lo que se propone el sustituir esta técnica por la de isoelectroenfoque en rotofor con la finalidad de obtener giardinas y tubulinas con mayor selectividad y resolución. Una vez identificadas, se pretende analizar su inmunogenicidad y localización en el trofozoito de *Giardia*.

OBJETIVOS

- **Seleccionar giardinas y tubulinas a partir de proteínas totales del citoesqueleto de *Giardia lamblia* en función de su punto isoelectrónico y peso molecular.**
- **Obtener diferentes variantes isoelectrónicas de giardinas y tubulinas mediante isoelectroenfoque en rotófor.**
- **Estudiar la antigenicidad de las diversas especies de giardinas y tubulinas obtenidas.**

HIPOTESIS

- **Las giardinas y tubulinas que integran el citoesqueleto de *Giardia lamblia* pueden ser seleccionadas a partir de proteínas totales de citoesqueleto con base en sus diferencias de punto isoelectrónico y peso molecular.**
- **Se obtendrán anticuerpos dirigidos contra giardinas y tubulinas capaces de reconocer dichas proteínas sobre la membrana del trofozoito.**

MATERIAL BIOLÓGICO

- gerbos con peso de 20 a 60 g
- trofozoitos de *Giardia lamblia* cepa Portland-1

MATERIAL

- tubos Falcon de 15 y 50 ml
- micropipetas Gilson de 10, 100, 1000 μ l
- centricones Amicon-30 CF-25
- tubos Eppendorf
- jeringa Robbins de 25 μ l
- jeringas desechables de 1, 3 y 5 ml
- tubos de ensayo de 13 x 100
- pipetas graduadas
- vasos de precipitado
- matraces volumétricos
- botella para cultivo de giardias.

EQUIPO

- centrifuga Sorvall-RT600B-Dupon LKB
- ultracentrifuga TL-100 Beckman
- rotoforTM preparativo BIO-RAD
- espectrofotómetro U:V: DU 640 Beckman
- fuente de poder LKB
- cámara de electroforesis Mini Protean II BIO-RAD
- cámara de transferencia TE 22 Mini Trasphor Hoefer
- potenciómetro 12 pH/ ISE Meter Beckman
- microcentrifuga Nanofuge Hoefer

- vortex Fisher Scientific Genie 2
- reciclador Multitemp II LKB
- microscopio de contraste de fases BH-2 Olympus
- balanza analítica Mettler AE 163
- autoclave Medi-Lab
- estufa de CO₂
- potenciómetro 12 pH/ISE Meter Beckman
- microcentrifuga Nanofuge Hofer

REACTIVOS Y SOLUCIONES

- Inhibidores enzimáticos: p-hidroximercuril ácido benzoico (PHMB) y fluoruro de fenilmetil sulfonio (PMSF)
- amortiguador de fosfatos salino (PBS)
- amortiguador de fosfatos salino + tween 20 (PBST)
- solución TEDAMP (Tris-HCl 10 mM, EDTA 2mM, ditioneitol 2 mM, ATP 1 mM, MgSO₄ 2 mM, KCl 150 mM) pH final 7.8
- solución TEDAMP + 0.5% de tritón X-100
- dodecilsulfato de sodio (SDS) al 1.5 y 10%
- anfolinas LKB con pH de 6 a 8 y de 3 a 10
- acrilamida-bisacrilamida al 30%
- solución Tris-HCl pH 6.8
- solución Tris-HCl pH 8.8
- N,N,N-tetrametiletildiamina (TEMED)
- persulfato al 10%
- solución tefidora para geles (azul de Coomassie/ácido acético/ metanol)
- solución decolorante (ácidoacético/metanol)
- amortiguador para electroforesis (Tris/SDS/glicina)
- amortiguador de Towbin (Tris/glicina/metanol)

- kit para inmunotransferencia e inmunocitoquímica (anti-IgG biotinilado de ratón, complejo estreptavidina-peroxidasa de rábano, peróxido de hidrógeno al 3% y 4-cloro-1-naftol) SIGMA
- solución diamino de plata (NaOH al 36%, NH₄OH al 35% y AgNO₃ al 20%)
- solución reductora (ácido cítrico al 1% y formaldehído al 36%)
- solución fijadora (ácido tricloroacético al 20%)
- metanol al 50%
- solución de ácido cítrico al 10% y metanol al 45%
- anti-IgG fluoresceinado de ratón SIGMA
- tiras reactivas de pH con rango de 0-14 y de 5-10 MERCK

METODOLOGIA

Obtención de proteínas del citoesqueleto.

Cultivar los trofozoitos de *Giardia lamblia* cepa Portland-1 axénicamente a 37°C en medio TYI-S-33 suplementado con biliar⁵³⁻⁵⁶. A las 72 hrs cosechar aproximadamente 1×10^8 organismos/ml por centrifugación a 1500 x g, 30 min y lavar tres veces con PBS pH 7.4; en seguida adicionar una mezcla de inhibidores enzimáticos, PHB (p-hidroximercuril ácido benzoico) y PMSF (fluoruro de fenilmetil sulfonilo). Resuspender los trofozoitos en 2 ml de solución TEDAMP, agitar vigorosamente en vórtex durante 2 min. Tomar una muestra de esta suspensión para observar al microscopio de contraste de fases los citoesqueletos aislados. Si los trofozoitos aún permanecen íntegros, prolongar el tiempo de incubación de éstos en TEDAMP+triton hasta corroborar por microscopía la presencia de citoesqueletos libres de membrana; sólo después de ello centrifugar a 22,000 rpm. 15 min a 4°C. Lavar la pastilla 2 veces con TEDAMP libre de triton y centrifugar bajo las condiciones ya mencionadas. Solubilizar la pastilla con 2 ml de SDS al 1.5% sometiendo a ebullición durante 8 min y centrifugar a 35,000 rpm. durante 1 hr a 4°C.

Separación de las proteínas por isoelectroenfoque.

Adicionar anfocinas al 2% a las proteínas del citoesqueleto presentes en el sobrenadante de la última centrifugación para establecer un intervalo de pH de 3 a 10 y llevarlas a un volumen de 50 ml. Colocar dicha mezcla en el rotor en condiciones de 12 watts, voltaje y milamperaje abierto. Se deja transcurrir el tiempo necesario para que la lectura llegue a un valor constante (4 hrs aproximadamente) de manera que se establezca el gradiente de pH y las proteínas se electroenfoquen de acuerdo a su punto isoelectrónico. Determinar el pH de las 20 fracciones obtenidas y la concentración por espectrofotometría de

U.V.; en seguida concentrar y desalar con centricones-30^{*}, centrifugar hasta que el volumen retenido sea aproximadamente de 50 μ l y determinar nuevamente la concentración de proteínas.

Someter nuevamente a isoelectroenfoque las fracciones con pH entre 5.0 y 7, esta vez utilizando anfolinas con rango de pH entre 6 y 8. Determinar la concentración de las fracciones obtenidas antes y después de ser pasadas por centricones.

Esquema de inmunización

Seleccionar 72 gerbos (*Meriones unguiculatus*)⁵⁷ machos y hembras cuyo peso fluctúe entre 25 y 50 g, distribuirlos aleatoriamente en 18 lotes de 4 animales cada uno (9 lotes de gerbos machos y 9 de gerbos hembras); confirmar en sus heces la ausencia de parásitos por medio de un coproparasitoscópico seriado realizado por el método de Faust. Inmunizar cada animal por vía intraperitoneal con 20 μ g de fracción proteica de reiselectroenfoque en 100 μ l de solución salina mezclada con adyuvante completo de Freund en proporción 1:1. El grupo control negativo se forma con dos animales a los cuales no se les administra antígeno. Aplicar 5 refuerzos con intervalos de 20 días en promedio y sangrar a los animales 30 días postinoculación por vía intracardiaca; separar el suero y almacenarlo a -10°C.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Llevar a cabo la electroforesis por el método de Laemmli⁵⁸, empleando un gel acomodador de acrilamida al 4% y un separador del 10%. Mezclar 12 μ l de cada una de las fracciones proteicas desaladas y concentradas con 3 μ l de solución amortiguadora para tratamiento de muestra 5x, y colocar a ebullición 5 minutos. Las condiciones de corrimiento fueron 120 volts y 35 mA durante 90 minutos.

* su membrana retiene moléculas con P.M. de 30 kDa. en adelante

Tefir los geles con azul de Coomassie R-250 al 0.1% durante una hora, dejándolos por 24 hrs en una mezcla metanol-ácido acético 40/7 v/v. Para realizar la tinción argéntica⁵⁰ colocar el gel en una solución fijadora de ácido tricloroacético al 20% por 2 hrs. Lavar dos veces con metanol al 50% 30 minutos con agitación y otras dos con agua 20 minutos para rehidratar el gel y remover el metanol. Adicionar al gel la solución diamino de plata recién preparada, dejándolo 15 minutos con agitación suave. Hacer dos lavados de 5 minutos con agua seguidos de incubación en solución reductora durante 10 minutos, una vez que se observan las bandas retirar dicha solución y remover el gel a un recipiente con metanol al 45% y ácido cítrico al 10% para detener la reacción.

Inmunocitoquímica.

Inmunofluorescencia indirecta (IFI)⁵⁰. Colocar en un tubo Eppendorf 20µl de una suspensión de 1×10^4 trofozoitos de *G. lamblia* y adicionar 100µl de suero de gerbo inmunizado a una dilución 1:20, incubar 1 hr a 4°C. Posteriormente centrifugar a 5000 rpm durante 2 minutos y lavar dos veces con PBS pH 7.4. Resuspender el botón en 100µl de anti-IgG de rata conjugado a isotiocianato de fluoresceína diluido 1:1000 en PBS e incubar 1 hr a 4°C. Pasado este tiempo centrifugar los trofozoitos y lavar dos veces con PBS. Colocar en una laminilla 3µl de esta suspensión y 5µl de colorante de contraste (azul de Evans), observar en microscopio de fluorescencia con objetivo 100x.

Sistema biotina-avidina-peroxidasa. En 20 laminillas previamente desengrasadas depositar 30 µl de una suspensión de trofozoitos de *G. lamblia* (1×10^4 organismos/ ml de PBS). Una vez que se han secado las preparaciones a 37°C introducir las en una cámara de Coplin con acetona por 15 minutos a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo lavar dos veces con PBS por 5 minutos y secar al aire. Sumergir las preparaciones en peróxido de hidrógeno al 3% 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente eliminar éste con un lavado de 2 minutos en PBS. Una vez secas adicionar 100µl de suero de gerbo

inmunizado con fracciones proteicas de citoesqueleto dilución 1:50 en 1% de BSA en PBS en cámara húmeda a temperatura ambiente por dos horas, lavar las laminillas y secarlas. En seguida incubar cada una con 100 μ l de anti-IgG de ratón biotinilado diluido 1:20 durante 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Después de lavar las preparaciones se hacen reaccionar 30 minutos con 100 μ l de extravidin-peroxidasa dilución 1:20 en 1% de BSA en PBS, a temperatura ambiente en cámara húmeda. Enjuagar las preparaciones con PBS y poner de manifiesto la reacción con 2 mg de 3,3'-diaminobencidina en 2ml de PBS y 50 μ l de peróxido de hidrógeno al 30%, incubando a temperatura ambiente en cámara húmeda. Nuevamente lavar las laminillas y ya secas observar en microscopio a inmersión.

Immunoelectrotransferencia.

Transferir a papeles de nitrocelulosa las fracciones proteicas del isoelectroenfoco así como las proteínas del citoesqueleto separadas por electroforesis durante 90 minutos a 140 volts, 300 mA⁶¹. Comprobar la presencia de bandas sobre el papel mediante tinción con rojo de Ponceau decolorando con agua. Bloquear con 1% de BSA en PBST toda la noche a 4°C. y poner cada una de las fracciones del papel de nitrocelulosa en contacto con su correspondiente suero (dilución 1:250) toda la noche a 4°C. Por otra parte, incubar los papeles que contengan proteínas del citoesqueleto con cada una de los diferentes sueros bajo las mismas condiciones. Revelar cada uno con un anti-IgG de ratón acoplado a biotina (dilución 1:1000) durante 1 hr a temperatura ambiente, seguido de dos lavados de 15 minutos cada uno con PBST. En seguida adicionar estreptavidina-peroxidasa (1:500) y dejar reaccionar 1 hr a temperatura ambiente, lavar con PBST 15 minutos 2 veces. Para el desarrollo del color agregar 30 mg de 4-cloro-1-naftol en metanol-PBS y 30 μ l de peróxido de hidrógeno al 3%.

Biotinización de trofozoitos.

Resuspender en un tubo falcon con 0.5 ml de NaHCO_3 y 0.5 ml de NaCl al 0.8% 1×10^6 trofozoitos y se adicionaron 0.5 mg de éster de N-hidroxisuccinimida biotina previamente disuelto en $12 \mu\text{l}$ de dimetilsulfóxido. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente con agitación suave; y realizar tres lavados con PBS pH 7.4 centrifugando a 2500 rpm. Aislar las proteínas de citoesqueleto por el método de Holberton¹⁴, someterlas a SDS-PAGE y transferir a papel de nitrocelulosa para revelar posteriormente con avidina-peroxidasa.

RESULTADOS.

El aislamiento de citoesqueletos de *Giardia lamblia* libres de membrana se corroboró mediante microscopía en contraste de fases como lo muestra la figura 11. En ella se observa claramente el disco ventral y los axonemas (flecha sencilla) así como fragmentos de membrana y flagelos desprendidos del trofozoito (doble flecha).

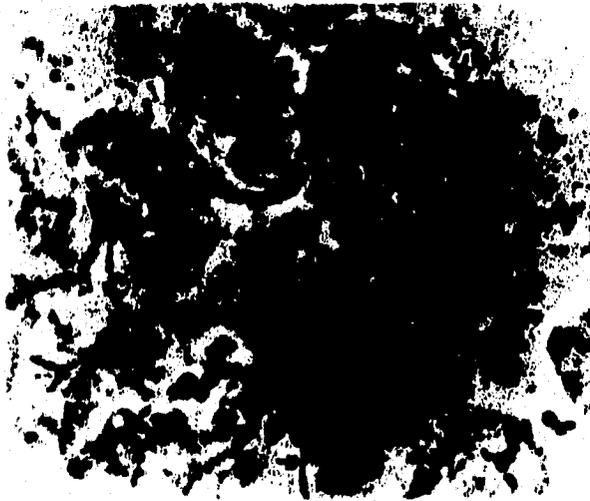


Fig. 11. Extracción del citoesqueleto de *Giardia lamblia* con tritón X-100. Microscopía de luz en contraste de fases con objetivo 100 x.

Los valores de pH isoelectrico para las fracciones del primer y segundo isoelectroenfoques se especifican en la tabla 1.

fracción no.	pH 3 a 10	pH 6 a 8
	isoelectroenfoque	reisoelectroenfoque
1	3.0	5.0
2	3.5	5.0
3	3.5	6.0
4	4.0	6.0
5	4.5	6.5
6	5.0	6.5
7	5.5	6.5
8	6.0	7.0
9	6.0	7.0
10	6.5	7.0
11	7.0	7.0
12	7.5	7.0
13	8.0	7.5
14	8.5	7.5
15	9.5	7.5
16	9.5	7.5
17	10.0	8.0
18	10.0	9.5

Tabla 1. Separación de las proteínas del disco ventral de *G.jamblia* de acuerdo a su punto isoelectrico.

El corrimiento electroforético bajo condiciones reductoras de las fracciones proteicas con pH entre 3 y 10 puso de manifiesto, mediante tinción con azul de Coomassie, bandas de peso molecular alrededor de 65, 97 y 110-115 kDa compartidas en todas las fracciones, de 45 kDa (tubulinas) en las fracciones 8 a 17 con rango de pH entre 6 y 10 y bandas de 30 a 35 kDa (giardinas) en las fracciones 10 y 11 con pH de 6.5 y 7, respectivamente (figura 12), las cuales resaltan respecto a aquellas que aparecen en las fracciones 13 a 17. Otras bandas que se aprecian débilmente se encuentran entre 15 y 20 kDa en las fracciones 12,15 v 17.

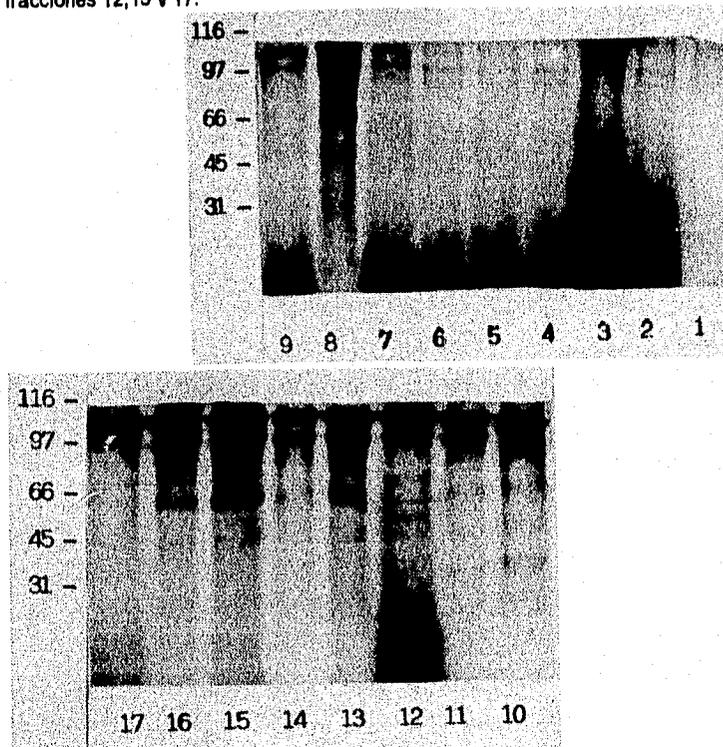


Fig. 12. Separación electroforética de las proteínas del citoesqueleto isoelectroenfocadas entre pH 3 y 10. Los carriles 1 a 17 corresponden a las 17 primeras fracciones proteicas.

La comparación electroforética de las proteínas totales del disco ventral de *G. lamblia* reveladas por dos técnicas de tinción diferentes, técnica de Coomassie y tinción argéntica, se aprecia en la figura 13. La tinción argéntica a diferencia de la técnica de Coomassie reveló notablemente las bandas carcanas a 45 y 31 kDa. (correspondientes a giardinas y tubulinas).

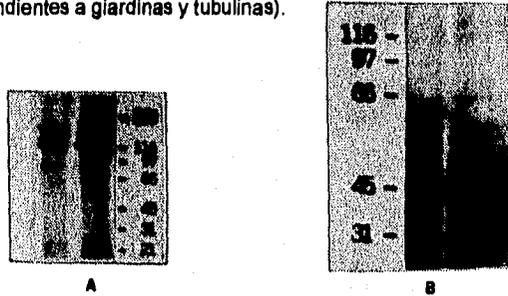


Fig. 13. A. Electroforesis de proteínas del citoesqueleto de *Giardia lamblia* teñidas con azul de Coomassie. **B.** Electroforesis de fracciones proteicas del citoesqueleto de *G. lamblia* teñidas con solución diamino de plata.

La electroforesis de las proteínas del reisoelectroenfoque, reveladas con la técnica de Coomassie, mostró nuevamente las bandas de 65, 97 y 110-115 kDa así como de 45 kDa en las fracciones 2 a 18 (pH 5 a 9.5) y de 31-35 kDa en las fracciones 4 a 16 con pH entre 6 y 7.5 (figura 14).

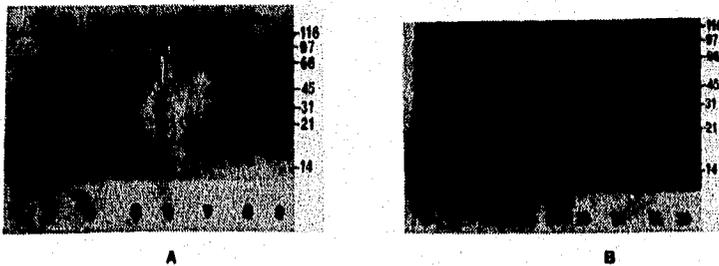


Fig. 14. Geles con proteínas del citoesqueleto sometidas a refraccionamiento isoeléctrico con pH de 6 a 6. **A** Fracciones 2 a 9. **B** Fracciones 10 a 18.

Debido a que las bandas de interés con peso molecular cercano a 45 y 30 kDa fueron muy tenues se decidió revelar los geles de la segunda separación con solución diamino de plata por ser una técnica con mayor sensibilidad que la técnica de Coomassie. De esta manera dichas bandas fueron más intensas apreciándose en las fracciones 3 a 18 (figura 15).

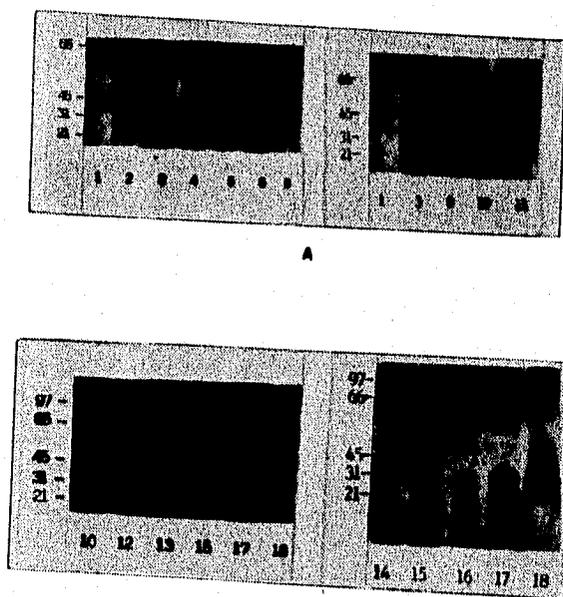


Fig. 15. Electroforesis de fracciones proteicas de reisoelectrofoque teñidas con solución diamino de plata. A. Fracciones 1 a 11. B. Fracciones 10 a 18.

Transcurridos 8 meses aproximadamente, las proteínas de citoesqueleto recién aisladas y reisoeléctroenfocadas mostraron mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie, bandas sobresalientes de 45 y 31-35 kDa (figura 17).

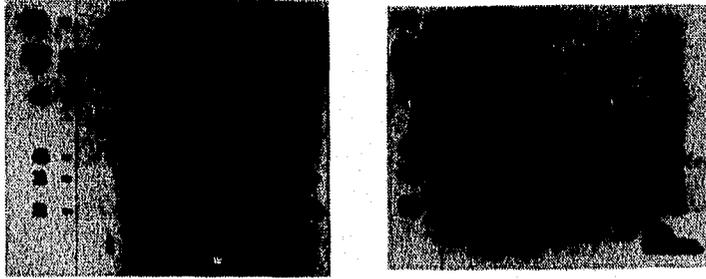


Fig. 17. Electroforesis de fracciones proteicas teñidas con azul de Coomassie. Fracciones 1,2,6,7,8 y 10 a 15. Ultimo carril, proteínas del citoesqueleto.

La biotinización de trofozoitos de *Giardia lamblia* demostró que los péptidos de 110, 95.65,45 y 31 kDa en promedio, que integran el citoesqueleto, se ubican en la membrana del protozooario (figura 18).



Fig. 18. Proteínas del citoesqueleto marcadas con biotina.

La técnica de inmunoelectrotransferencia puso de manifiesto la antigenicidad de los péptidos de 110, 95 así como los de 45-50 y 31 kDa que corresponden muy probablemente a tubulinas y giardinas (figura 19).

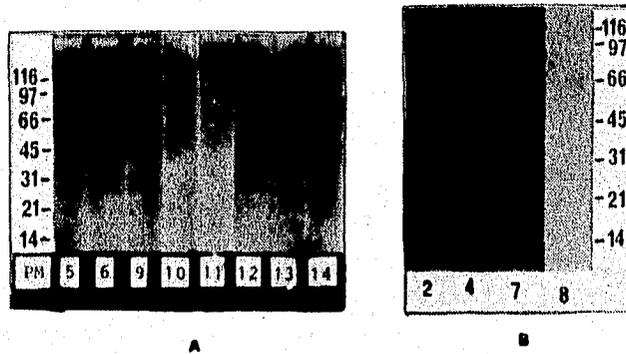


Fig. 19. Inmunoelectrotransferencia de fracciones proteicas de reisoelectrofoque. A. Fracciones 5,6 y 4 a 9. B. Fracciones 2,4,7 y 8.

Para localizar a las proteínas del reisoelectrofoque en trofozoítos de *Giardia lamblia* se realizaron dos técnicas inmunocitoquímicas; Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y revelado con biotina-avidina-peroxidasa. En la figura 20 se pone de manifiesto la técnica de IFI donde se observa que los anticuerpos dirigidos contra dichas proteínas reconocen proteínas de membrana, incluidas las que se encuentran adyacentes al disco ventral. Con el revelado biotina avidina no fue posible apreciar claramente las estructuras marcadas debido al daño que sufrieron con la técnica de fijación.

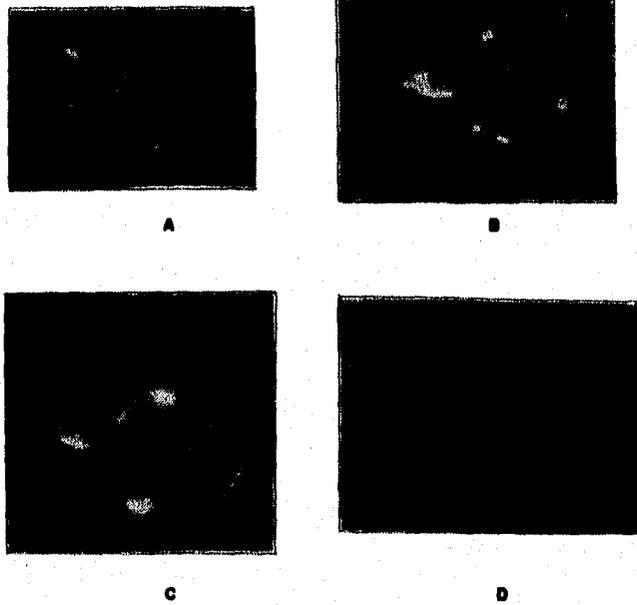


Fig. 20. Inmunofluorescencia indirecta de trofozoitos de *G. lamblia*, cepa P-1, utilizando sueros anti-fracciones proteicas de reisoelectrofoque. **A.** Suero dirigido contra la fracción 5. **B.** Antisuero de fracción 9. **C.** Suero anti-fracción 11. **D.** Control negativo.

DISCUSION

La obtención de giardinas y tubulinas, se realizó con base en la técnica descrita por Holberton y Ward¹⁴ para extracción de proteínas totales de citoesqueleto, de manera que no sólo se obtienen proteínas del disco ventral, sino también aquellas que integran los flagelos, específicamente, la porción intracitoplasmática de los mismos (axonemas). Esta técnica se basa en la insolubilidad del citoesqueleto en el detergente no iónico tritón X-100 y en la solubilidad de las proteínas que lo integran en el detergente aniónico dodecilsulfato de sodio (SDS). El tritón también modifica gradualmente la estructura del disco al solubilizar los puentes cruzados que separan a microtiras y microtúbulos, adquiriendo una forma completamente plana. (figura 21)

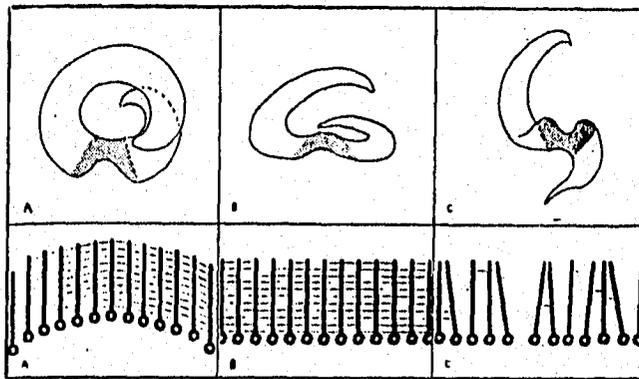


Figura 21. Cambios en la forma de los discos aislados con TEDAMP + tritón (cuadros superiores): a. Disco recién aislado; b. disco después de 1-2 horas de extracción, c. disco después de 1-2 días de extracción. Cambios ultraestructurales correspondientes (cuadros inferiores). Fuente: Holberton DV. (1981).

El tiempo de extracción que se reporta en la bibliografía no fue suficiente para aislar los citoesqueletos libres de membrana, por lo que fue necesario prolongarlo hasta 48 hrs., incubando a 4° C, tomando en cuenta que la estructura del disco ventral es estable incluso después de 1 o 2 días de permanecer en TEDAMP + tritón a 4°C.

Se sabe que las giardinas y tubulinas, cuando son separadas en función de su peso molecular, aparecen como dobletes polipeptídicos de 30-31 y 53-58 kDa respectivamente^{14,16}. Sin embargo mediante enfoque isoelectrico se ha demostrado que dichos polipéptidos corresponden en realidad a diversas especies de giardinas y tubulinas^{16,17}. Holberton y colaboradores¹⁸ han establecido experimentalmente por isoelectroenfoque en gel y electroforesis unidimensional, la existencia de 5 especies de tubulinas y 8 de giardinas con punto isoelectrico de 5.6 a 5.75 y 5.8 a 6.2, respectivamente. Por otra parte Peattie y cols.¹⁷ han estudiado la separación de giardinas mediante electroforesis bidimensional encontrando 23 variantes isoelectricas en un rango de pH de 5.16 a 6.52. Estos estudios fueron de gran utilidad debido a que el rango de punto isoelectrico de giardinas y tubulinas que reportaron constituyó un parámetro importante para aislar selectivamente estas proteínas, a partir de aquellas que constituyen el citoesqueleto de Giardia. Para ello se decidió emplear el isoelectroenfoque en rotofor, técnica que además de ofrecer un gran poder resolutivo, permite recuperar fácilmente las fracciones proteicas por encontrarse en solución, sin la necesidad de ser eluidas de una matriz sólida como en el caso del isoelectroenfoque en gel. Considerando esta ventaja, las proteínas de interés se sometieron a un segundo fraccionamiento a manera de incrementar la resolución de las giardinas y tubulinas y con ello, el número de variantes isoelectricas de las mismas.

Un inconveniente del reiselectroenfoque en rotofor fue que por el volumen tan pequeño de algunas fracciones la lectura de pH tuvo que realizarse con tiras reactivas y no potenciométricamente como era lo apropiado. No obstante la limitada sensibilidad de las tiras reactivas (0.5 unidades de pH), se infirió con

base en la gran resolución de la técnica, que las fracciones proteicas con valores de pH isoelectrico repetidos corresponden en realidad a especies diferentes.

Holberton y cols^{14,16} han establecido experimentalmente el patrón electroforético de las proteínas que integran el citoesqueleto de *Giardia* en el que destacan tres grupos de bandas: las que aparecen alrededor de 70 kDa y por encima de este peso, aquellas con peso molecular cercano a 50 kDa (monómeros de tubulinas) y las que presentan peso molecular entre 29 y 38 kDa (giardinas). Con base en ello, se infiere que las bandas obtenidas alrededor de 45 y 31 kDa corresponden a tubulinas y giardinas, respectivamente. Sin embargo, estas proteínas presentaron un rango de pH isoelectrico más amplio, con valores ligeramente superiores a los que se reportan en la literatura. Cabe la posibilidad que se trate de otras variantes isoelectricas de tubulinas y giardinas que no han sido reportadas, sobre todo aquellas con pH isoelectrico muy alto, o bien que no constituyan propiamente el citoesqueleto, como sucede con isotipos de tubulina ajenos a microtúbulos que han sido identificados en la membrana del parásito. Esto implica que algunas especies de tubulinas situadas en citoesqueleto estén tan íntimamente unidas a tubulinas de membrana que resulta imposible eliminarlas en la técnica de aislamiento^{40,49}. En lo que se refiere a giardinas sólo un hallazgo reciente ha demostrado la presencia de la alfa-1-giardina de las microtiras en la superficie del trofozoito⁵².

Contrariamente a lo reportado por Holberton et. al.^{14,16} se encontró que las bandas de 31 y 45 kDa resultaron mas tenues que el resto de proteínas del citoesqueleto. Esto se atribuyó principalmente a la técnica de ultracentrifugación utilizada para concentrar y desalar proteínas, ya que pudo haber ocurrido una retención parcial de aquellas que tienen un tamaño muy aproximado al poro de la membrana, caso particular de las proteínas de 30 kDa cuyo tamaño es el mínimo que retienen los centricones utilizados (Amicon-30). La pérdida de proteínas por pasaje a través de la membrana también puede deberse a la forma que presenten, de manera que, tal vez las proteínas tubulares (como giardinas y tubulinas) atraviesen la membrana con mayor facilidad que las globulares, a pesar de que su peso molecular sea el mismo^{50,52}.

El hecho de que las bandas de 31 y 45 kDa no fueran mas intensas también se le ha atribuido a la baja afinidad del colorante azul de Coomassie hacia giardinas y tubulinas debido a que ambos poseen la misma naturaleza ácida¹⁴. Por este motivo se decidió sustituir esta técnica por la tinción argéntica, cuya sensibilidad* supera 100 veces a la técnica de Coomassie.

En contraste con la técnica de Coomassie, la tinción de plata reveló notablemente la banda de 31 kDa. en un amplio rango de fracciones (3 a 18) , lo que corrobora lo descrito en el párrafo anterior. Sin embargo, las proteínas de citoesqueleto que fueron aisladas y sometidas a electroforesis 8 meses después, mostraron por técnica de Coomassie, bandas intensas de 45 y 31 kDa. Estos resultados refieren que tal vez ocurra una expresión periódica de estas proteínas, es decir, que estén involucradas en el fenómeno de variación antigénica que experimenta el parásito⁶³⁻⁶⁵. Una importante explicación de este proceso es el hecho de que se generen organismos con antígenos de superficie diferentes a los que poseen sus propios progenitores. Se ha observado que algunos antígenos localizados en la superficie del trofozoito sufren variación antigénica, particularmente, se ha reportado el reemplazamiento de un péptido de 170 kDa. por otros de 65 y 92 kDa^{66,67}. La manifestación de dicho fenómeno tal vez no resulte lógica para el caso de proteínas del citoesqueleto pero sí puede serlo para aquellas que además de formar parte de él se encuentren expuestas en la membrana del protozoario.

Inicialmente se pensó que las bandas con P.M. cercano a 110 kDa aparecían mucho más marcadas que las de 45-50 kDa debido a que la tubulina, pese a las condiciones desnaturizantes⁶⁰, había permanecido como dímero; no obstante al aumentar el tiempo de ebullición y la concentración de mercaptoetanol, la banda de 110-115 kDa persistió, sugiriendo que se trataba de una proteína diferente.

Teniendo en cuenta que el citoesqueleto de *Giardia* está constituido en su mayoría por tubulinas (en disco ventral y flagelos) y giardinas (en disco ventral),

* 10 ng. De proteína/banda

se pensó que los péptidos con P.M. superior a 60 kDa que aún no han sido caracterizados, posiblemente procedieran de la membrana del parásito, pero que por encontrarse estrechamente enlazados a proteínas de citoesqueleto no fueron eliminados en la técnica de aislamiento; de hecho, de acuerdo a la bibliografía, hay polipéptidos de membrana que presentan estos pesos moleculares, incluidos los que se reportan para giardinas y tubulinas^{40,60}. Para esclarecer lo anterior se decidió realizar una técnica de marcaje para proteínas de membrana, la cual se reforzaría con lo observado en las técnicas inmunocitoquímicas.

La biotización de trofozoítos de *Giardia* mostró, inesperadamente, bandas iguales a las que aparecieron en las electroforesis de proteínas del citoesqueleto, contrastando notablemente los péptidos de 110-115 y 95 kDa respecto a los de 65,45 y 31 kDa. estos resultados hicieron inferir que sí hay especies de giardinas y tubulinas en la superficie del parásito, quizá en una concentración muy pequeña, o bien exteriorizando algunos determinantes antigénicos.

Con el ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) realizado sobre trofozoítos vivos se corroboró la presencia de antígenos de membrana ubicados tanto en la periferia del cuerpo del trofozoíto como del disco ventral⁶⁰. Correlacionando ésto con lo observado en la biotización de proteínas de membrana puede suponerse que los péptidos de 65,95 y 110 kDa son aquellos que se localizan en el cuerpo del parásito mientras los de 45 y 31 kDa (tubulinas y giardinas, respectivamente) son los que se encuentran en la periferia del disco ventral. De manera que al igual que como ocurre con especies de tubulinas, isotipos de giardinas diferentes a los que integran el citoesqueleto pueden encontrarse sobre la membrana del trofozoíto; esto es confirmado por localización de una alfa giardina en la superficie del parásito⁶².

Por inmunoelectrotransferencia se puso de manifiesto la antigenicidad de algunos péptidos que integran el citoesqueleto de *Giardia*, entre éstos, los de 31 y 45 kDa (giardinas y tubulinas, respectivamente). El marcaje tenue de estos polipéptidos no refiere que su inmunogenicidad sea baja, más bien, se atribuye a la poca afinidad del segundo anticuerpo empleado (anti- γ de ratón) hacia el primero (de gerbo) por proceder de especies filogenéticamente diferentes, no obstante que la

sensibilidad de la determinación se haya incrementado mediante una técnica de "doble sandwich".

Cabe mencionar que las técnicas de biotinización e inmunoelectrotransferencia se reportan para el caso de proteínas totales de citoesqueleto y no para las fracciones obtenidas por reisoelectroenfoque, debido a que en estas últimas difícilmente se puso de manifiesto la reacción antígeno-anticuerpo, apreciándose únicamente bandas muy tenues de 95 y 110-115 kDa. Esto fue contemplado desde el momento en que solo dichos péptidos se hicieron visibles (por tinción con rojo de Ponceau's) en el papel de nitrocelulosa; a pesar de ello se consideró la posibilidad de que giardinas y tubulinas también se hubiesen transferido pero en una concentración tan pequeña que no fue posible detectarlas por el método de tinción mencionado.

Con base en los hallazgos anteriores se planteó la posibilidad de que aquellos antígenos inmunodominantes de membrana encontrados por Char y cols⁵⁰, en individuos con giardiasis correspondan propiamente a giardinas y tubulinas.

CONCLUSIONES

Finalmente se llegó a las siguientes conclusiones:

Las giardinas y tubulinas seleccionadas por isoelectroenfoque a partir de proteínas totales del citoesqueleto de *Giardia lamblia* se encontraron asociadas a proteínas de membrana cercanas a 65, 95 y 110 kDa, obteniéndose diferentes especies isoelectrónicas de giardinas y tubulinas en un rango de pH entre 6 y 9.

Se demostró que existen giardinas y tubulinas localizadas sobre la membrana del trofozoito o bien que pertenecen al citoesqueleto y por su proximidad a la membrana exponen determinantes antigénicos.

Las giardinas y tubulinas son antigénicas por lo que pueden ser equivalentes a los péptidos inmunodominantes previamente reportados en pacientes con giardiasis.

PROPUESTAS

Implementar una técnica altamente selectiva para el aislamiento de giardinas y tubulinas del disco ventral que permita obtenerlas libres de proteínas contaminantes de membrana y citoesqueleto; así mismo, utilizar una técnica de extracción de proteínas de citoesqueleto que mejore el rendimiento de giardinas y tubulinas. Una excelente alternativa es la clonación de genes que codifican para estas proteínas de manera que su producción y pureza puede incrementarse considerablemente.

Esclarecer qué especies de giardinas y tubulinas se encuentran expuestas en la membrana del parásito o bien, cuáles son los epitopos que exteriorizan

Estudiar si las giardinas y tubulinas intervienen en forma importante en el mecanismo de adherencia del protozooario, y si lo hacen, evaluar la respuesta de anticuerpos específicos de la clase IgA, los cuales al interactuar con estas proteínas son capaces de bloquear la adherencia del trofozoito al epitelio duodenal.

BIBLIOGRAFIA

1. Ramirez JA, Rivers M, Conti E. Frecuencia de *Giardia lamblia* en las heces de 100 niños con diarrea crónica. *Biol Med Hosp Infan Mex.* 1986; 43: 247-249.
2. Gottlieb BB. Giardiasis en jardines infantiles tratamiento simultáneo de casos y contactos. *Rev Child Pediatr.* 1986;57:335-338.
3. Biagi F. Los protozoarios enteropatógenos y su impacto en la salud pública. *Invest Med Int.* 1983: 10: 7-14.
4. Meyer EA. Giardiasis. *Am J Epidemiol.* 1980: 3: 1-12.
5. Vazquez TO, Velasco CO. Giardiasis. *Infectologia.* 1987;7:169-179.
6. Brawn HW. Parasitología clínica. 4a ed. México: Interamericana, 1985:46-49.
7. Cabello R. Microbiología y Parasitología humana, bases etiológicas de las enfermedades infecciosas. México: Panamericana, 1993:512-514.
8. Friend DS. The fine structure of *Giardia muris*. *J Cell Biol.* 1966; 29:317-332.
9. Kreier JP. *Parasitic Protozoa*. vol II. intestinal flagelates. N.Y.:N.Y. Press, 1972: 69-99.
10. Rodney DA. The biology of *Giardia* sp. *Microbiol Rev.* 1991; 55: 706-732.
11. Goodwin LG. Symposium on giardiasis. *R Soc Trop Med Hyg.* 1980; 427-448.
12. Martelli EK. Parasitología médica. 6a ed. Madrid: Interamericana, 1990: 54-59.
13. Chester P. Parasitología. 2a ed. Barcelona: Salvat editores, 1986: 52-55.
14. Holberton DV, Ward AP. Isolation of the cytoskeleton from *Giardia* tubulin and a low-molecular-weight protein associated with microribbon structures. *J Cell Sci.* 1981;47:139-166.
15. Robertis, De Robertis. *Biología celular y molecular.* 11a ed. Madrid: El Ateneo, 1986:
16. Crossley R, Holberton DV. Characterization of proteins from the cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *J Cell Sci.* 1993; 59: 81-103.

17. Peattie DA, Alonso AR, Hein A, Caulfield J. Ultrastructural localization of Giardins to the edges of disk microribbons of *Giardia lamblia* and the nucleotide and deduced protein sequence of alfa-giardin. *J Cell Biol.* 1989; 109: 2323-2335.
18. Feely DE, Scholmeyer JV, Erlendson SL. *Giardia* spp: Distribution of contractile proteins in the attachment organelle. *Exp Parasitol.* 1982; 53: 145-154.
19. Holberton DV. Fine structure of the ventral disk apparatus and the mechanism of attachment in the flagellate *Giardia muris*. *J Cell Sci.* 1973; 13: 11-41.
20. Farthing MJ, Pereira Mo, Keush GT. Description and characterization of a surface lectin from *Giardia lamblia*. *Infect Immun.* 1986;51:661-667.
21. Gonzalez RA, Argüello LC, Ortega PG, Martínez PA. *Giardia lamblia*: surface charge of human isolates in culture. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 1989;83:642-43.
22. Gillin FD, Rainer DS. Attachment of the flagellate *Giardia lamblia*: role of reducing agents, serum, temperature, and ionic composition. *Mol Cell Biol.* 1982; 2: 369-377.
23. Gillin FD, Diamond LS. *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: growth responses to reducing agents. *Exp Parasitol.* 1981;51:382-391.
24. Mandell DB. *Enfermedades infecciosas, principios y prácticas.* Buenos Aires, 1991: tomo II: 2240-46.
25. Vega FL. Absorción intestinal en niños con giardiasis. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 1983;40:598-613.
26. Smith PD. Pathophysiology and immunology of giardiasis. *Ann Rev Infect.* 1985;36:295-307.
27. Lascurain RL. Prevalencia de anticuerpos contra *Giardia lamblia* en suero de cordón umbilical y en sangre periférica materna. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 1993; 50: 27-30.

28. Den-Hollander ND, Riley D, Befus D. Immunology of giardiasis. *Parasitology Today*. 1988; 4:124-131.
29. Sircus W. *Fundamentos científicos de gastroenterología*. Barcelona:Salvat, 1983: 55-71.
30. Shorter RG, Kiraner JB. *Gastrointestinal immunity for the clinician*. Orlando, Florida:Grune & Stratton, 1985: 1-15.
31. Carlson JF, Heyworth MF, Owen RL. Response of Peyer's patch lymphocyte subsets to *G. muris*. Infection in Balb/C mice. I. T-cell subsets. *Cell Immunol*. 1986, 97: 44-50.
32. Carlson JF, Heyworth MF, Owen RL. Response of Peyer's patch lymphocyte subsets to *G. muris*. Infection in Balb/C mice. II. B-cell subsets: enteric antigen exposure is associated with immunoglobulin isotype switching by Peyer's patch B-cells. *Cell Immunol*. 1986, 97: 44-50
33. Smith PD, Elson CD, Keister DB, Nash TE. Human host response to *G. lamblia*. I. Spontaneous killing by mononuclear leukocytes in vitro. *J Immunol*. 1982; 128: 1372-76.
34. Kaplan BS, Unis S, Aikawa M, Mahmoud AAF. Effector mechanism of host resistance in murine giardiasis: specific IgG and IgA cell-mediated toxicity. *J Immunol*. 1985; 134:1975-1981.
35. Radulescu S, Meyer EA. Opsonization "in vitro" of *G. lamblia* trophozoites. *Infect Immun*. 1981; 32: 852-56.
36. Smith PD, Keister DB, Elson CO. Human host response to *Giardia lamblia*. II. antibody-dependent killing in vitro. *Cell Immunol*. 1983; 82:308-315.
37. Deguchi M, Gillin FD, Gigli I. Mechanism of killing of *G. lamblia* trophozoites by complement. *J Clin Invest*. 1987; 79:1296-1302.
38. Hill DR, Burge JJ, Pearson RD. Susceptibility of *G. lamblia* trophozoites to the lethal effect of human serum. *J Immunol*. 1984; 132:2046-52.

39. Char S. Impaired IgA response to *Giardia* heat shock antigenic in children with persistent diarrhoea and giardiasis. *Gut* 1993; 34:38-40.
40. Nash TE, Gillin FD, Smith PD. Excretory-secretory products of *Giardia lamblia*. 1983; 31: 2004-2009.
41. Owen RL, Nemanic PC, Stevens DP. Ultrastructural observations on giardiasis in a murine model. *Gastroenterology*. 1979;76:757-769.
42. Meyer EA, Radulescu S. *Giardia* and Giardiasis. *Adv Parasitol*. 1979; 17: 1-147.
43. Green EL, Miles MA, Warhurst DC. Immunodiagnostic detection of *G.lamblia* antigen in faeces by a rapid visual Enzyme-linked immunosorbent assay. *Lancet*. 1985;28:691-93.
44. Hernandez JL, Santos LA. Aspectos relevantes del inmunoanálisis enzimático (ELISA). *Infectologia*. 1985: 52-56.
45. Al-tukhi MH. ELISA for detection of anti-*Giardia* specific IgM: response in serum. *J Trop Med Hyg*. 1993; 96:333-336.
46. Nash TE, Herrington DA, Levine MM. Usefulness of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Giardia* antigen in feces. *J Clin Microbiol*. 1987; 25: 1169-1171.
47. Viacesvara GS, Smith PD, Healy GR, Brown WR. An immunofluorescence test to detect serum antibodies to *Giardia lamblia*. *Ann Intern Med*. 1970; 93: 802-805.
48. Clark JT, Holberton DV. Plasma membrane isolated from *Giardia lamblia*: identification of membrane proteins. *Eur J Cell Biol*. 1986; 42: 200-206.
49. Crossley R, Marshall J, Clark JT, Holberton DV. Immunocytochemical differentiation of microtubules in the cytoskeleton of *Giardia lamblia* using monoclonal antibodies to alfa-tubulin and polyclonal antibodies to associated low molecular weight proteins. *J Cell Sci*. 1986; 80: 233-252.

50. Char S, Shetty N, Narasimha M, Elliott E, Macaden R, Farthing MJG. Serum antibody response in children with *Giardia lamblia* infection and identification of an immunodominant 57 kDa antigen. *Parasite Immunol.* 1991; 13:329-337.
51. Taylor GD, Wenmann WM. Human immune response to *Giardia lamblia* infection. *J Infect Dis.* 1987; 155:137-140.
52. Wenman WM, Meuser RU, Nyugen Q, Kiliani RT, El-Shewy K, Sherburne R. Characterization of an immunodominant *G.lamblia* protein antigen related to alpha giardin. *Parasitol Res.* 1993; 79: 587-92.
53. Keister DB. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-medium supplement with bile. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1983;77:487-488.
54. Meyer E. *Giardia lamblia*. Isolation and axenic cultivation. *Exp Parasitol.* 1976;39: 101-105
55. Farthing MJ, Varon SR, Keusch GT. Mammalian bile promotes growth of *Giardia lamblia*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1983;77:467-469.
56. Farthing MJ, Pereira ME, Keusch GT. *Giardia lamblia*: Evaluation of roller bottle cultivation. *Exp Parasitol.* 1982;54:410-415.
57. Belosevic M, Faubert GM, MacLean JD. *Giardia lamblia* infections in Mongolian Gerbils: an animal model. *J Infect Dis.* 1993; 147: 22-226.
58. Laemmli UK, Favre M. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA into microtubules. *Nature Lond.* 1975; 257:418-421.
59. Wray W. Silver staining of proteins in polyacrilamide gels. *Anal Biochem.* 1981; 118: 197-203.
60. Torian BE, Barnes RC, Stephens RS, Stibbs HH. Tubulin and High-molecular-weight polypeptides as *Giardia lamblia* antigens. *Infect Immun.* 1984; 46: 152-158.

61. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1979; 76:4350-4354.
62. Bolleg DM, Edelman SJ. *Protein methods.* New York, N.Y.: Wiley-Liss, 1991: 117-22.
63. Nash TE. Surface antigenic variability and variation in *Giardia lamblia*. *Parasitology Today.* 1992; 8: 229-234.
64. Nash TE, Aggarwal A, Adam RD, Conrad JT, Merrit JW. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *J Immunol.* 1988; 141: 636-641.
65. Pierres GO, Argüello LC. Caracterización de antígenos de superficie variables de *Giardia lamblia*. Cambios recurrentes y su relación con la adhesión del parásito a células epiteliales in vitro. *Biol Med Hosp Infan Mex.* 1991; 48:771-772.
66. Aggarwal A, Nash TE. Antigenic variation of *Giardia lamblia* in vivo. *Infection and immunity.* 1988; 56: 1420-1423
67. DeLynn MM. Antigenic variation of *Giardia lamblia* in the feces of Mongolian Gerbils. *J Clin Microbiol.* 1990; 28: 254-257.