

11261

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
FACULTAD DE MEDICINA

**ANALISIS DE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA DE
CELULAS LINFOIDES DE JERBOS INFECTADOS CON
*Giardia lamblia***

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
AREA: INMUNOLOGIA

P R E S E N T A
Q.F.B. MARIA ELISA DRAGO SERRANO

MEXICO D.F., MAYO 1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACION
Subdivisión de Maestrías y Doctorados

Of. No. 083/EJG/MEMK/XI/96.

DR. MAURICIO FORTES BESPROSVANI
Coordinador General de Estudios
de Posgrado, U.N.A.M.
P r e s e n t e

At'n: Unidad de Registro e Información.

Informo a usted que el (la) C. MA. ELISA DRAGO SERRANO
aspirante al grado de MAESTRA EN CIENCIAS BIOMEDICAS (INMUNOLOGIA)
con la tesis titulada "ANALISIS DE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA DE CELULAS
LINFOIDES DE JEBOS INFECTADOS CON Giardia lamblia".

será examinado (a) en el aula de exámenes de grado "Dr. Luis Castelazo Ayala" (Edificio de la Unidad de Posgrado, primer piso, costado sur de la Torre II de Humanidades) por el jurado constituido por los siguientes sinodales:

PRESIDENTE:	DRA. GUADALUPE ORTEGA PIERRES
SECRETARIO:	DR. VICTOR TSUTSUMI FUJIYOSHI
PRIMER VOCAL:	DRA. CECILIA XIMENEZ GARCIA (TUTOR)
SEGUNDO VOCAL:	
TERCER VOCAL:	
SUPLENTE:	DR. RUBEN DARIO MARTINEZ PEREZ
SUPLENTE:	DRA. EMMA I. MELENDRO LOZANO

En cumplimiento con los Artículos 18 y 19 del Capítulo I, Título II, del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la U.N.A.M.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cd. Universitaria, D. F., a 19 de noviembre de 1996.

Vo. Bo.

DR. HUGO ARECHIGA U.
Jefe de la División de Estudios
de Posgrado e Investigación

Vo. Bo.

DR. ALEJANDRO CRAVIOTO QUINTANA
Director de la Facultad
de Medicina

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM bajo la tutoría de la Dra. Cecilia Ximénez García y la Co-tutoría de la Dra. Guadalupe Ortega Pierres del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN.

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, institución en la cual laboro como profesora, el apoyo económico que me brindó durante el periodo de Noviembre de 1992 a Noviembre de 1993, a través del programa de becas para realizar estudios de posgrado.

Agradecimientos

A la Dra. Cecilia Ximénez García y a la Dra. Guadalupe Ortega Pierres por todas las facilidades brindadas para realizar este trabajo.

A todos mis compañeros del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM, encabezado por el Dr. Ruy Pérez Tamayo, quienes participaron de alguna forma u otra en la realización de esta tesis.

A los integrantes del jurado: Dra. Guadalupe Ortega Pierres, Dr. Víctor Tsutsumi Fujiyoshi, Dra. Cecilia Ximénez García, Dr. Rubén Darío Martínez Pérez y Dra. Emma I. Melendro Lozano, por sus valiosas observaciones, comentarios y críticas que hicieron posible mejorar la calidad de este trabajo.

A mi familia y amistades por su inestimable apoyo e interés manifestado durante el desarrollo y culminación de esta tesis.

Contenido

Abreviaturas	6
Indice de Tablas y Figuras	9
Resumen	11
Introducción	12
Material y Métodos	
Obtención de parásitos	26
Cultivo de trofozoitos	26
Animales de experimentación	26
Infección experimental	27
Cuantificación de quistes eliminados por los animales infectados	27
Preparación del Extracto Crudo de Membrana de trofozoitos de <i>G. lamblia</i>	28
Electroforésis y Electrotransferencia	28
Preparación de antígenos unidos a partículas de papel de nitrocelulosa	30
Ensayo celular de reconocimiento antigénico	30
Estadística	31
Resultados	
Cinética de eliminación de quistes	32
Análisis del perfil protéico de los trofozoitos de <i>G. lamblia</i> de la cepa UAM-II y de la clona C5	33
Activación de células linfoides por fracciones antigénicas de <i>G. lamblia</i>	33
Discusión	50
Bibliografía	55
Anexos	68

Abreviaturas

- ABO:** Antígenos de los grupos sanguíneos humanos del sistema ABO
- Ag.tot.:** Antígeno total
- C:** Control
- CD:** Células Dendríticas
- cm:** centímetros
- CO₂:** Dióxido de Carbono
- CPH:** Complejo Principal de Histocompatibilidad
- CPM:** cuentas por minuto
- CPS:** Coproparascitoscópico
- D-MALT:** Tejido Linfoide Difuso Asociado a Mucosas (Diffuse Mucosal Associated Lymphoid Tissue)
- DMSO:** Dimetilsulfóxido
- DS:** Desviación Estándar
- E:** Experimental
- ECM:** Extracto Crudo de Membrana
- EDTA:** Etilén Diamino Tetra Acético
- ELISA:** Ensayo Enzimático Inmunoabsorbente (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
- FAE:** Epitelio Asociado al Folículo (Follicle Associated Epithelium)
- FDC:** Células Foliculares Dendríticas (Follicular Dendritic Cells)
- g:** fuerza centrífuga relativa
- G. lamblia C5:** *G.lamblia* de la clona C5
- G. lamblia UAM-II:** *G.lamblia* del aislado UAM-II
- G. muris:** *Giardia muris*
- gr:** gramos
- HBSS:** Solución Salina Balanceada de Hank (Hank's Balanced Saline Solution)
- Hepes:** ácido 4-(2-hidroxietil)-1- piperazinaetanosulfónico
- HEV:** Vénulas de Endotelio Alto (High Endothelial Venules)
- HLA:** Antígenos del CPH de humanos (Human Lymphocytes Antigens)
- IDC:** Células Interdigitales (Interdigitating cells)
- I.E. :** Índice de Estimulación

Abreviaturas

IEL: Linfocitos Intraepiteliales (Intraepithelial lymphocytes)

i.g. : intragástrica

IgA: Inmunoglobulina A

IgD: Inmunoglobulina D

IgE: Inmunoglobulina E

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

IL-4: Interleucina 4

IL-5: Interleucina 5

IL-6: Interleucina 6

kDa: kiloDaltones

Linfoblastos B cIgA+: Linfoblastos B con IgA citosólica

Linfocitos B mIgA+: Células B que expresan inmunoglobulina A en la membrana

Linfocitos B mIgM+/IgD+: Células B que expresan inmunoglobulina M y D en la membrana

Linfocitos T CD3+CD8+: Linfocitos T humanos citotóxicos

Linfocitos T CD3+ CD4+: Linfocitos T humanos cooperadores

Linfocitos T h2 : Linfocitos T cooperadores de la subpoblación 2

Linfocitos T $\gamma\delta^+$ CD8+ $\alpha\alpha^+$: Linfocitos T citotóxicos con RLT con cadenas $\gamma\delta$ y con CD8 formado por dos cadenas α .

M: Molar

MadCAM: Molécula de adhesión celular con afinidad hacia las mucosas (Mucosal addressin Cell Adhesion Molecule)

MALT: Tejido Linfoide Asociado a Mucosas (Mucosal Associated Lymphoid Tissue)

mAmp: miliampers

mg: miligramos

ml: mililitro

MM: Metil Maleimida

mm: milímetros

mm²: milímetros cuadrados

mM: miliMolar

Mr: Peso Molecular relativo

μ Ci: microcuries

μ g: microgramos

μ l: microlitros

μ m: micras (10^{-6} metros)

NC: Nitrocelulosa

Abreviaturas

- NK:** Células Asesinas Naturales (Natural Killer Cells)
- O-MALT:** Tejido Linfoide Organizado Asociado a Mucosas (Organized Mucosal Associated Lymphoid Tissue)
- PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
- PBS:** Amortiguador salino de fosfatos (Phosphate Buffered Saline)
- p.i.:** postinfección
- PMSF:** Fenil-Metil-Sulfonil-Fluoruro (Phenyl-Methyl-Sulphonyl-Fluoride)
- PP:** Placas de Peyer
- % p/v:** Porcentaje peso/volumen
- r.f.:** movilidad relativa (relative mobility)
- SDS:** Dodecil sulfato de sodio (Sodium Dodecyl Sulphate)
- SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
- SSI:** Solución Salina Isotónica
- TBS:** Solución amortiguadora salina de Tris/HCl (Tris Buffer Saline) Tris-HCl-NaCl
- temed:** tetrametiletilendiamina
- TGF- β :** Factor Transformador de Crecimiento β (Transforming Growth Factor- β)
- timidina [3 H]:** timidina tritiada
- tris/HCl:** Hidrocloruro de tris(hidroximetil)aminometano
- % v/v:** Porcentaje volumen/volumen
- VSPs:** proteínas de superficie de variación antigénica (variant surface proteins)
- X:** Promedio

Índice de Tablas y Figuras

Figuras

Figura 1 Circulación de los linfocitos en el sistema linfoide asociado a mucosas (MALT).	15
.....	
Figura 2 Organización histológica de las placas de Peyer.	16
.....	
Figura 3 Organización histológica de un folículo linfoide.	17
.....	
Figura 4 Migración asincrónica de las células precursoras IgA generadas en las placas de Peyer.	19
.....	
Figura 5 Transporte de la IgA dimérica del espacio extracelular hacia el lumen intestinal.	20
.....	
Figura 6 Cinética de eliminación de quistes por jerbos no singénicos infectados con trofozoítos de <i>G. lamblia</i> del aislado UAM-II.	36
.....	
Figura 7 Cinética de eliminación de quistes por jerbos no singénicos tratados i.g. con PBS estéril.	37
.....	
Figura 8 Cinética de eliminación de quistes por jerbos singénicos infectados con trofozoítos de <i>G. lamblia</i> de la clona C5.	38
.....	
Figura 9 Cinética de eliminación de quistes por jerbos singénicos tratados i.g. con PBS estéril.	39
.....	
Figura 10 Análisis electroforético y electrotransferencia del ECM de los trofozoítos de <i>G. lamblia</i> .	40
.....	
Figura 11 Patrón de antigénico del ECM de trofozoítos de <i>G. lamblia</i> obtenidos por electrotransferencia a papel de NC.	41
.....	
Figura 12 Índices de estimulación de cultivos de células linfoides de bazo de jerbos no singénicos obtenidos al adicionar fracciones antigénicas de trofozoítos de <i>G. lamblia</i> UAM-II.	44
.....	

Índice de Tablas y Figuras

Figura 13 Índices de estimulación de cultivos de células de nódulos linfoides mesentéricos de jerbos no singénicos obtenidos al adicionar fracciones antigénicas de trofozoitos de *G. lamblia* UAM-II. **45**

Figura 14 Índices de estimulación de cultivos de células linfoides de placas de Peyer de jerbos no singénicos obtenidos al adicionar fracciones antigénicas de trofozoitos de *G. lamblia* UAM-II. **46**

Figura 15 Índices de estimulación de cultivos de células linfoides de bazo de jerbos singénicos obtenidos al adicionar fracciones antigénicas de trofozoitos de *G. lamblia* de la clona C5. **47**

Figura 16 Índices de estimulación de cultivos de células de nódulos linfoides mesentéricos de jerbos singénicos obtenidos al adicionar fracciones antigénicas de trofozoitos de *G. lamblia* de la clona C5. **48**

Figura 17 Índices de estimulación de cultivos de células linfoides de placas de Peyer de jerbos singénicos obtenidos al adicionar fracciones antigénicas de trofozoitos de *G. lamblia* de la clona C5. **49**

Tablas

Tabla 1 Respuesta proliferativa de las células linfoides de jerbos no singénicos estimuladas con fracciones antigénicas de trofozoitos de *G. lamblia* del aislado UAM-II. **42**

Tabla 2 Respuesta proliferativa de las células linfoides de jerbos singénicos estimuladas con fracciones antigénicas de trofozoitos de *G. lamblia* de la clona C5. **43**

Resumen

Giardia lamblia es un parásito intestinal capaz de liberar moléculas derivadas de su mosaico antigénico, algunas de las cuales estimulan una respuesta proliferativa de las células linfoides intestinales. Esta respuesta está implicada en la eventual erradicación del parásito del intestino del huésped. El objetivo de este trabajo fue analizar las fracciones antigénicas de los trofozoítos de *G. lamblia* que inducen una respuesta proliferativa *in vitro* de las células linfoides intestinales de las placas de Peyer (PP) obtenidas de jerbos (*Meriones unguiculatus*) infectados con este parásito. Esta respuesta se comparó con la de otras células linfoides sistémicas obtenidas del bazo y de los nódulos linfoides mesentéricos (NLM) de estos animales.

Para lograr dicho objetivo, se infectaron por vía intragástrica a jerbos machos previamente desparasitados no singénicos y singénicos con trofozoítos de *G. lamblia* del aislado UAM-II y de la clona C5 respectivamente. A los jerbos del grupo control correspondiente se les administró por la misma vía PBS estéril. Setenta y cinco días después de la infección parasitaria, se obtuvieron células linfoides de bazo, NLM y PP provenientes de los jerbos no singénicos y singénicos. Estas células fueron cultivadas en presencia de 15 fracciones antigénicas de los trofozoítos de *G. lamblia* del aislado UAM-II y de la clona C5 con diferentes rangos de peso molecular relativo, asociadas a partículas de papel de nitrocelulosa (NC). Las fracciones del aislado UAM-II se adicionaron a los cultivos de células linfoides de los jerbos no singénicos, mientras que las fracciones de la clona C5 se adicionaron a los cultivos de las células linfoides de los jerbos singénicos. Los controles de los cultivos celulares fueron NC pura particulada y el extracto crudo de membrana de los trofozoítos asociado a partículas de papel de NC. Estos cultivos se incubaron durante 7 días a 37°C y 16 horas antes de cosechar las células se les adicionó timidina [³H]. La proliferación de las células linfoides se evaluó midiendo las cpm de la radioactividad incorporada durante la incubación de los cultivos.

Los resultados preliminares indican que las fracciones con peso molecular de 40-33 kilodaltones (kDa) y de 33-28 kDa del aislado UAM-II y de la clona C5 estimularon a las células linfoides de todos los órganos estudiados de los jerbos infectados de la cepa no singénica y singénica respectivamente. Las fracciones de 73-62 kDa y de 46-40 kDa de la clona C5 estimularon a las células linfoides de todos los órganos estudiados de los jerbos singénicos infectados. Las fracciones de 87-73 kDa y de 62-54 kDa de la clona C5, estimularon respectivamente a las células del bazo y NLM de los jerbos singénicos infectados. Las fracciones de 28-23, 23-20 y 20-17 kDa de la clona C5 estimularon a las células linfoides de las PP de los jerbos singénicos del grupo control e infectados. La fracción de 20-17 kDa de la clona C5 estimuló además a las células linfoides de los nódulos mesentéricos de los jerbos singénicos del grupo experimental. Finalmente, las fracciones de 87-73 kDa y 23-20 kDa del aislado UAM-II estimularon a las células linfoides de las PP de los jerbos no singénicos del grupo control e infectados.

Con base en estos resultados investigaciones futuras podrán enfocarse a evaluar si todas las fracciones anteriores, en especial las de 40-33 kDa y de 33-28 kDa, aparentemente inmunodominantes, tiene un papel en la erradicación intestinal del parásito.

Introducción

Dentro de los agentes patógenos causantes de infecciones entéricas que tienen un interés en salud pública a nivel mundial (1) debido a sus implicaciones en el desarrollo infantil, destaca el protozooario *Giardia lamblia*, agente etiológico de la giardiosis en humanos y en varias especies animales (2).

La giardiosis es una de las parasitosis de mayor prevalencia en países ubicados en Asia, África y América Latina (2). En estas regiones y en ciertas zonas de Canadá y Australia Occidental, la presencia de esta parasitosis es endémica puesto que la transmisión orofecal de quistes (estado infectante del parásito) ocurre durante todo el año (3) y se lleva a cabo comúnmente a través de alimentos, o bebidas contaminadas con quistes que fueron excretados al medio ambiente por la materia fecal humana (2).

Aún cuando el número de individuos infectados por *G. lamblia* es menor en naciones industrializadas como Estados Unidos, se le ha señalado a este parásito como responsable de brotes epidémicos originados por la ingestión de agua contaminada con quistes provenientes tanto de heces de origen humano como de otras especies animales silvestres (4,5).

En México *G. lamblia* se ubica entre los protozoarios que ocasionan las tasas más elevadas de morbilidad (6), sobre todo en niños (7) de poblaciones marginadas, donde la desnutrición (8), la pobreza, el bajo nivel de escolaridad, el hacinamiento y la carencia de servicios sanitarios básicos promueven la propagación de este parásito (9,10), cuyo estado patógeno denominado trofozoíto es el responsable de diversos trastornos que afectan fundamentalmente al intestino delgado (10).

El cuadro clínico de la giardiosis es muy variable, en la mayor parte de los casos se presenta en forma asintomática en individuos de cualquier edad, residentes en zonas endémicas (10), también pueden manifestarse diarreas leves o agudas autolimitadas que son comunes en la población general de países desarrollados (1). En nuestro medio predominan las diarreas crónicas asociadas a mala absorción intestinal, que afectan sobre todo a niños en edad preescolar y escolar, las repercusiones más graves son, entre otras, la desnutrición infantil, retardo en el crecimiento y en la ganancia de peso corporal (11).

En niños bien nutridos que padecen giardiosis sintomática, *G. lamblia* puede generar mala absorción intestinal de vitamina B₁₂, vitamina A, ácido fólico, lípidos y lactosa (12) además restringe la absorción intestinal de proteínas (13). Estas alteraciones nutricionales son aún más graves en niños provenientes de familias de escasos recursos, quienes padecen de desnutrición primaria, la cual puede exacerbarse a causa de las diarreas crónicas y a la mala absorción intestinal provocadas por dicho parásito, debido a lo anterior estos pacientes representan el grupo de mayor riesgo entre la población (10).

Introducción

Puesto que *G. lamblia* es capaz de inducir alteraciones nutricionales en una edad crítica en la cual se gesta el desarrollo físico e intelectual del individuo, en México se le considera como un agente etiológico de importancia en salud pública (6).

Los diversos factores que confluyen en la relación huésped-parásito en la giardiosis, dan como resultado el amplio espectro de manifestaciones clínicas, las cuales pueden depender por un lado, de la existencia de cepas de *G. lamblia* con capacidad patógena variable (14), y por otro de la resistencia o susceptibilidad intrínseca del huésped contra la infección, en la que pueden estar implicados factores inespecíficos (15), genéticos (16), así como de la respuesta inmune específica (17).

La interacción de *G. lamblia* con diversos componentes inespecíficos de la porción proximal del intestino delgado, hábitat de este parásito, puede eventualmente influir en su eliminación, o en su establecimiento en el lumen intestinal. Estudios *in vitro* han señalado el efecto letal de la leche humana de mujeres no infectadas (18) y del fluido intestinal de individuos sanos sobre los trofozoitos de *G. lamblia* (19), debido a la acción tóxica de los ácidos grasos libres, generados por la lipólisis de triacilglicérols mediante lipasas activadas por sales biliares.

Otros estudios señalan que el parásito puede protegerse contra los efectos tóxicos del fluido intestinal dependiendo de la concentración de las sales biliares (19), estas últimas junto con otros lípidos biliares, potencializan la capacidad estimuladora de crecimiento del moco intestinal y células epiteliales humanas sobre los trofozoitos de *G. lamblia* (20). Por otra parte las sales biliares junto con ácidos grasos libres, pueden inducir la protección del parásito promoviendo el enquistamiento *in vitro* de los trofozoitos a un pH ligeramente alcalino (21).

Estas observaciones sugieren que *in vivo*, son factibles las fluctuaciones en la concentración de ácidos grasos, sales biliares, pH y enzimas en el microambiente intestinal, lo cual influye en el curso de la giardiosis (15).

Entre los factores genéticos estudiados que podrían estar implicados en la giardiosis humana se encuentran los grupos sanguíneos ABO. En estudios sobre evaluaciones clínicas realizadas en diferentes partes del mundo reportaron una alta frecuencia del grupo sanguíneo A en pacientes infectados con *G. lamblia* (23,24), sin embargo en otro estudio no se corroboró dicha relación (25). En cuanto a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) se observó que los pacientes con giardiosis tuvieron alta frecuencia de moléculas HLA-A2, HLA-B8 y HLA-B12 (26), sin embargo, después de aplicar un factor de corrección para el número de antígenos probados solo la asociación con la molécula HLA-B12 fue significativa. (16). Estos resultados sugieren que otros componentes genéticos no relacionados con el sistema ABO y CPH podrían estar implicados en la susceptibilidad del huésped ante la infección, como ocurre en relación al sexo (4), aunque al parecer esto último no influye en el establecimiento de la giardiosis en el humano.

En relación a los mecanismos de resistencia específica en la giardiosis aún no se conoce la participación sustantiva de la respuesta inmune sistémica en la protección. Aún cuando *G. lamblia* es un organismo que habitualmente reside en el lumen intestinal, es capaz de inducir la respuesta inmune sistémica a través de antígenos que al ser absorbidos por la mucosa intestinal alcanzan la circulación, para posteriormente estimular linfocitos alojados en los órganos linfoides periféricos como bazo y dar lugar a la generación de anticuerpos séricos anti-*G. lamblia*,

Introducción

cuya evaluación mediante inmunofluorescencia (27) e inmunoensayo enzimático (28), ha sido muy útil en el estudio clínico y epidemiológico de la giardiosis humana.

Empleando como marcadores de la infección a los anticuerpos específicos generados por la exposición al parásito, se ha observado que los niveles de IgG pueden mantenerse por tiempo indefinido aún después de remitir la infección aguda (28), y pueden ser más elevados en portadores asintomáticos que en pacientes con giardiosis activa (29), debido a ello su evaluación no permite distinguir esta última de una exposición previa (28) o de una recurrencia de la parasitosis (30).

En encuestas epidemiológicas se ha mostrado que la prevalencia de los anticuerpos IgM, es más elevada en niños inclusive en zonas no endémicas (30). En el caso de adultos con giardiosis activa los títulos de IgM aumentan rápidamente al inicio de la infección y decaen 2 ó 3 semanas después (28), debido a esto último su evaluación puede apoyar el diagnóstico de giardiosis sintomática en zonas no endémicas (31).

En las regiones donde ocurren brotes epidémicos el aumento de los niveles séricos de IgA puede asociarse con la giardiosis activa (32), mientras que en zonas endémicas la presencia de IgA sérica en portadores asintomáticos (29,30) sólo indica exposiciones recurrentes al parásito (30).

Aún cuando la disminución del nivel sérico de IgE total se ha correlacionado con la curación de pacientes con giardiosis sintomática (29), se ha considerado que la respuesta inmune humoral es quizás más relevante en la protección de la infección que en la erradicación del parásito (33).

Varios estudios han puesto de manifiesto la importancia de la respuesta inmune humoral en la protección del huésped contra la infección. Así en pacientes hipogammaglobulinémicos se ha observado que sufren giardiosis sintomática recurrente (34). Por otra parte, la baja frecuencia de giardiosis en niños menores de 6 meses se atribuyó a la protección conferida por la transferencia placentaria de IgG (35), presente en la sangre del cordón umbilical (30). En zonas endémicas la exposición recurrente a la *G. lamblia* durante la infancia induce resistencia específica ante la giardiosis sintomática del individuo en la edad adulta (17). Aún cuando esto último no ha sido confirmado, los estudios epidemiológicos muestran que sujetos adultos residentes de zonas no endémicas, quienes visitan zonas de alto riesgo al contagio con *G. lamblia*, tienen más probabilidad de sufrir de diarreas agudas ocasionadas por este parásito que los nativos radicados en esas zonas (5).

Tomando en cuenta que la presencia de anticuerpos séricos específicos no revela lo que ocurre a nivel intestinal (36) y considerando que *G. lamblia* es un parásito no invasor que coloniza preferentemente el intestino delgado, el cual junto con las glándulas mamarias forma parte del sistema inmune secretor asociado a mucosas (37) una manera apropiada de valorar la respuesta del huésped ante la infección, es evaluar los niveles de anticuerpos en la leche implicados en la protección. Así, la baja frecuencia de giardiosis sintomática en lactantes menores de 6 meses (38) se atribuyó a la alimentación con leche materna (39). En otro estudio se encontró una asociación significativa entre la protección contra la giardiosis en los niños alimentados con leche materna y la presencia de IgA anti *G. lamblia* en esta muestra (40). Esto último fué corroborado en un estudio longitudinal en el cual se demostró el efecto protector de la IgA presente en la leche materna contra la giardiosis sintomática pero no contra la infección (41). De acuerdo a lo anterior se puede sugerir que *G. lamblia* es capaz de inducir la formación

de anticuerpos presentes en el suero y en la leche cuyo papel principal es aparentemente la protección contra la enfermedad.

Por otra parte, el establecimiento de *G. lamblia* en el lumen intestinal puede generar subsecuentemente la producción de la IgA secretora específica que participa al parecer, en la depuración del parásito del lumen intestinal. Dicha respuesta humoral local está mediada a su vez por la activación de las células que pertenecen al tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) (43). Considerando la importancia de este sistema secretor común, se describirán sus características más relevantes en el contexto del sistema digestivo.

Anatómicamente y funcionalmente el MALT (Figura 1) se puede dividir en una rama aferente, o inductora, en donde los componentes celulares están estructurados en folículos y forman el denominado tejido linfoide organizado asociado a mucosas (O-MALT), que en el caso particular del intestino delgado está representado por las placas de Peyer. Por otra parte la rama eferente, o efectora, es rica en células en etapa terminal de diferenciación dispersas en glándulas salivales, mamarias, lámina propia intestinal, compartimiento intraepitelial de linfocitos (IEL), aparato genito-urinario y tracto respiratorio, todos estos integran el tejido linfoide difuso asociado a mucosas (D-MALT) (43).

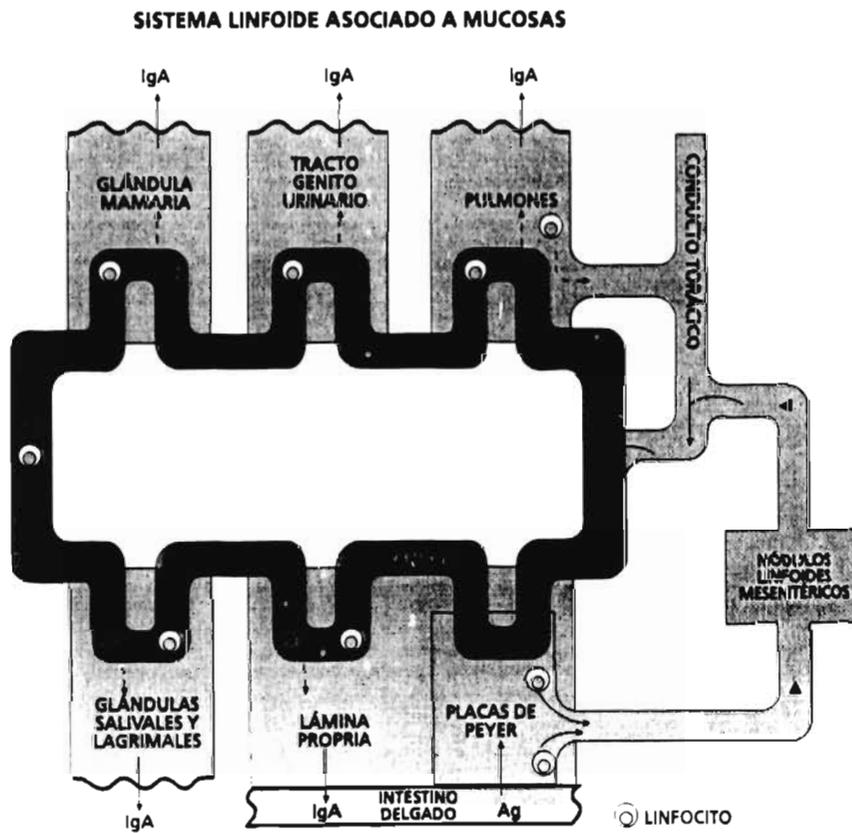


Figura 1. Circulación de linfocitos a través del sistema linfoide asociado a mucosas (MALT) (159)

Introducción

El principal compartimiento inductor de la respuesta inmune asociado al MALT lo constituye las placas de Peyer (PP) (44), puesto que es el sitio donde se generan las células B (45), que al migrar hacia los compartimientos pertenecientes D-MALT, como glándulas mamarias o la lámina propia intestinal, pueden madurar y establecerse como células plasmáticas productoras de IgA secretora (77).

Las placas de Peyer están formadas por un conjunto de folículos linfoides localizados en el seno de la lámina propia intestinal que infiltran la capa submucosa del intestino delgado y proyectan su cara luminal a modo de cúpula (47) (Figura 2).

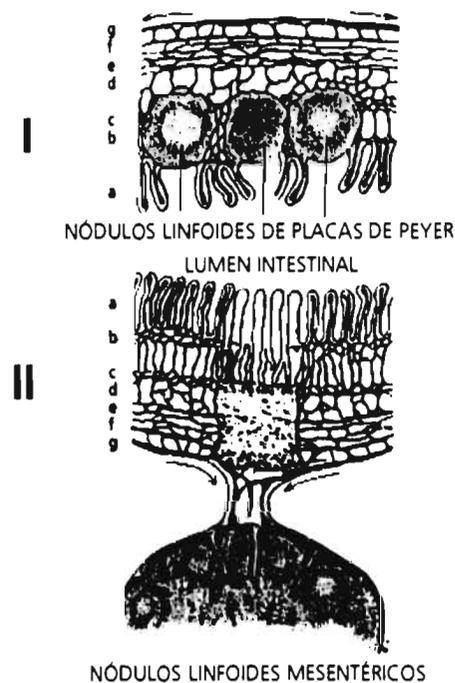


Figura 2. Organización histológica de las placas de Peyer. La red de los vasos linfáticos está remarcada en negro y las flechas indican la dirección del flujo del quilo y linfa hacia los nódulos linfoides mesentéricos (160).
a) Vellosidades intestinales. b) Lámina propia. c) Mucosa. d) Submucosa. e) Capa muscular circular.
f) Capa muscular longitudinal. g) Serosa.

La estructura básica de las PP está organizada en folículos linfoides en los cuales se observa una zona periférica y un centro germinal (Figura 3). Estos folículos están separados entre sí por áreas interfoliculares, en donde se distinguen vénulas postcapilares (48) de endotelio alto (HEV) a través de las cuales los linfocitos de sangre periférica, que expresan sobre su membrana moléculas de adhesión específicas (85), se introducen en las PP (50). El conjunto de folículos está separado del lumen por una región con forma de domo denominada corona, recubierta por un epitelio asociado al folículo (FAE) que carece de vellosidades formado por células M (51), las cuales tienen un papel importante en el transporte de antígenos luminales hacia el interior de las PP (52).

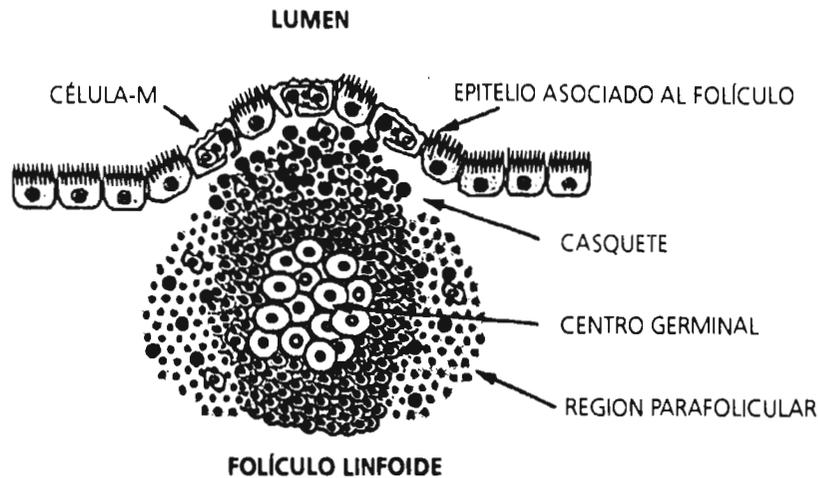


Figura 3. Organización histológica del folículo linfóide en el cual se distingue un centro germinal, una región parafolicular, un casquete y un epitelio asociado al folículo formado principalmente por células M, especializadas en el transporte de antígenos (43).

En las PP de ratón se ha observado que el centro germinal aloja entre un 70 a 85% de linfocitos B que expresan IgA sobre la membrana (linfocitos B mIgA+) (53). En esta zona se ubican células foliculares dendríticas (FDC) (54) y de 1 a 3% de los linfocitos T CD3+ CD4+ (cooperadores) (53). En la rata se ha demostrado también la presencia de células dendríticas (CD) (55).

En los espacios interfoliculares se distingue la presencia predominante de linfocitos T (56), en la rata también se han observado células interdigitales (IDC) foliculares (55); En la región parafolicular de las PP de ratón es abundante la presencia de linfocitos T CD3+CD8+ (citotóxicos) y T CD3+ CD4+ (43). En las zonas donde predominan los linfocitos T se ha reconocido la presencia de una subpoblación de linfocitos T CD3+ CD4- CD8- con propiedades citotóxicas y quizás reguladoras de la respuesta inmune, que expresan el receptor γ/δ y representan un porcentaje menor al 5% de los linfocitos T CD3+ presentes en las placas de Peyer (42).

En la región subepitelial del domo se observan macrófagos, linfocitos T CD4+, linfocitos B y en el epitelio del domo se localizan células T CD4+, T CD8+ y células B (56), estas últimas se distribuyen también en la periferia de los folículos y expresan IgM+/ IgD+ en la membrana (linfocitos B mIgM+/IgD+) (43). En la corona se observan macrófagos y células B mIgM+/IgD+ (43) las cuales constituyen las células vírgenes que participan en la respuesta primaria (58).

Como puede observarse las PP albergan a las células inmunocompetentes necesarias en la respuesta inmune local (59), las cuales pueden activarse con el contacto de los antígenos o moléculas derivadas de diversos organismos. Aún cuando no se conocen del todo los mecanismos de transporte de antígenos luminales se ha propuesto que la porosidad de la membrana basal del epitelio que recubre las PP (60), facilita la entrada de los antígenos derivados de diversos microorganismos (61). Otra vía alternativa de acceso lo constituye las células M las cuales captan antígenos solubles, o particulados y los translocan hacia el interior del folículo (43), para ser subsecuentemente procesados por las células presentadoras de antígeno (CPA), como los macrófagos, localizadas en la región subepitelial de la corona (56).

Introducción

En la rata se ha demostrado que las células dendríticas son las CPA más eficientes para presentar *in vivo* a los linfocitos T CD4+ vírgenes, péptidos derivados de antígenos solubles administrados por vía oral (62). Además de ser las CPA más potentes para evocar respuestas inmunes primarias y secundarias (63), las células dendríticas presentes en PP (64) inducen preferencialmente la secreción policlonal de IgA de células B aisladas de bazo y PP (65); además se les ha atribuido un papel relevante en el cambio de isotipo IgM \Rightarrow IgA en las células precursoras B (65).

Una vez que ha ocurrido el procesamiento de antígenos estos son presentados en forma de péptidos en el contexto de moléculas de clase II del CPH a los linfocitos TCD4+ que subsecuentemente se activan y proliferan liberando interleucinas (ILs) que promueven la producción de IgA en secreciones (57).

En modelos murinos se ha observado que la administración oral de antígenos T dependientes como glóbulos rojos de carnero induce la activación de linfocitos Th2 presentes en las PP (66). Estas células Th2 conforman aparentemente la población denominada inicialmente como linfocitos T "switch" (Ts) (67), ya que secretan IL-4, IL-5, IL-6 (68) y factor transformador de crecimiento β (TGF- β) (43). Estas ILs pueden eventualmente actuar sobre las células B mlgM+ induciendo el cambio de isotipo IgM \Rightarrow IgA para dar lugar a las células B mlgA+ precursoras de las células plasmáticas (45). Además de influir en el cambio de isotipo, la IL-5 promueve la proliferación de linfocitos B precursores (69) y junto con la IL-6 induce la diferenciación terminal de las células precursoras B en células plasmáticas (43). El TGF- β actúa aditivamente con la IL-5 en la producción de IgA secretora (70).

Por otra parte los antígenos T dependientes, además de inducir la activación y proliferación de células B y T, evocan la generación concomitante de las correspondientes células de memoria (71), cuya sobrevivencia demanda la estimulación antigénica persistente (72), por células tales como las foliculares dendríticas (FDC) que poseen la capacidad de captar y acumular por tiempo prolongado complejos antigénicos (63,73). Las FDC forman un entramado celular dentro del centro germinal (54), en donde se generan las células B de memoria y que en el caso particular de las PP se cree que correspondan a las células B mlgA+ (74), las cuales junto con los linfocitos T de memoria pueden eventualmente recircular de 2 a 3 semanas después del primer contacto antigénico y/o permanecer durante largos periodos dentro de las PP (71).

Una vez que ha ocurrido su activación antigénica, las células B pueden salir las PP por los linfáticos aferentes para llegar a los nódulos linfoides mesentéricos (46) y de ahí dirigirse al conducto torácico, pasando a la circulación sanguínea y distribuirse a diversos órganos del compartimento sistémico como el bazo (75). Así mismo, pueden migrar a través de vasos sanguíneos especializados análogos a los del endotelio alto (76) y distribuirse preferencialmente a los sitios pertenecientes al D-MALT como la lámina propia en donde al diferenciarse terminalmente a células plasmáticas productoras de IgA de secreción se establecen por el resto de sus vidas (77).

Con base en los resultados obtenidos en diferentes protocolos experimentales, se ha propuesto que dependiendo de su estadio de diferenciación, o activación, las células B manifiestan un patrón heterogéneo de migración y establecimiento en diversos sitios dando lugar a lo que se conoce como diferenciación asincrónica (79) (Figura 4).

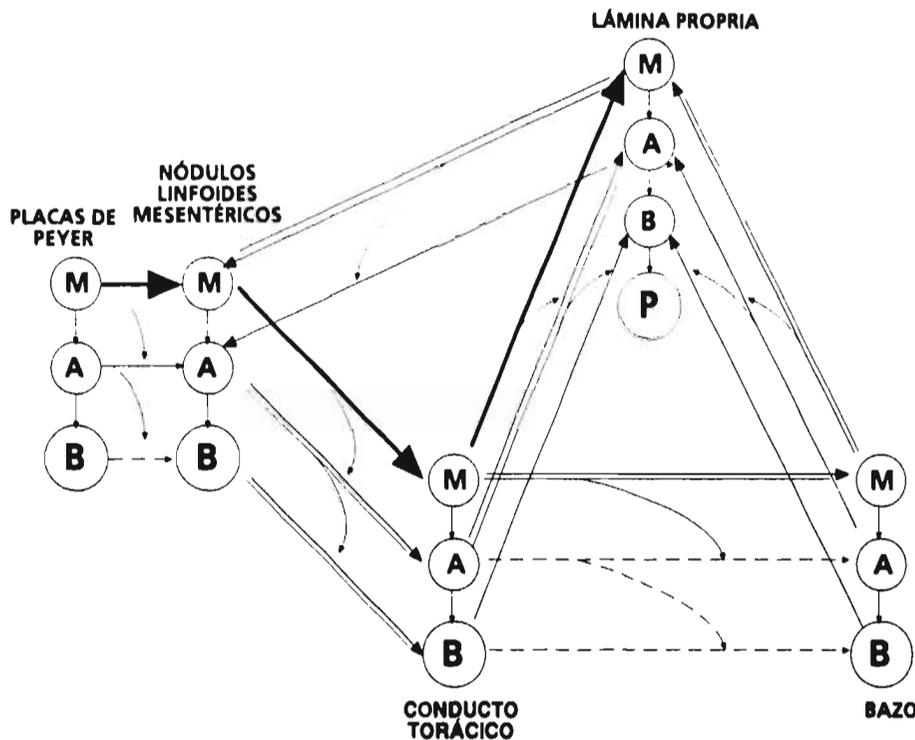


Figura 4. Ruta de migración asincrónica de las células precursoras IgA generadas en las placas de Peyer (75). La diferenciación de linfocitos B₁M⁺ → linfocitos B₁A⁺ → linfoblastos I₁A⁺ ocurre asincrónicamente durante su migración hacia la lámina propia intestinal. Abreviaturas: M= Linfocitos B con I₁M de membrana
A= Linfocitos B con I₁A de membrana
B= Linfoblastos con I₁A citosólica
P= Células Plasmáticas.

Por otra parte, se han reconocido perfiles migratorios y de establecimiento diferentes no solo en relación a las células T y B (80) sino entre las subpoblaciones TCD8⁺ y TCD4⁺ (81). El número de células B en los nódulos linfoides mesentéricos, PP y bazo es mayor que de células T (80) y en cuanto a las diferentes subpoblaciones se ha observado que, en las PP de ratón, la proporción de linfocitos TCD4⁺ es mayor que el de las células TCD8⁺ (81), mientras que estas últimas predominan en el compartimento intraepitelial de linfocitos (84).

La ubicación preferencial de linfoblastos IgA⁺ en la lámina propia (82) está mediado entre otros factores por ciertas moléculas expresadas en la membrana como la integrina $\alpha 4\beta 7$ (85) que al unirse a su ligando correspondiente, una adhesina denominada MadCAM-1, expresada en el endotelio plano que recubre las arterias y vénulas que irrigan la lámina propia (85,86), facilita la extravasación de estas células en el seno de la misma. La presencia de estas moléculas mediadoras tanto de la migración y establecimiento varía, no solo en las diferentes poblaciones celulares T (86, 87) y B (88) sino también en sus diferentes estadios de activación y diferenciación (86, 87, 88, 89) y al igual que las adhesinas del endotelio vascular, su expresión está regulada por factores tales como el flujo vascular, hormonas, citocinas y factores quimiotácticos (90). Aún cuando la presencia de antígenos luminales no determina la migración preferencial de los linfoblastos B precursores de las células plasmáticas hacia los sitios efector del D-MALT tales

Introducción

como la lámina propia (91), puede influir en la localización, magnitud y persistencia de las células establecidas en dichos compartimentos (92).

La lámina propia junto con los linfocitos intraepiteliales constituyen los sitios efectores del D-MALT a nivel intestinal cuyos componentes celulares se diseminan a lo largo de estas zonas.

La región intraepitelial es una zona rica en células asesinas naturales (natural killer cells ó NK cells) y en linfocitos T CD8+ citotóxicos, pero escasa en linfocitos T CD4+ (84). Una de las principales funciones de los linfocitos intraepiteliales es al parecer asegurar la integridad del epitelio intestinal eliminando las células dañadas, o infectadas por virus (43).

En la lámina propia se alojan diversas estirpes celulares como células NK, eosinófilos, células cebadas, macrófagos, fibroblastos, células epiteliales, células plasmáticas secretoras de IgA e IgM y células B. De estas un 60% de linfocitos T corresponden al fenotipo CD3+CD4+ y un tercio expresa los marcadores CD3+CD8+ (78). Todas estas células participan en mecanismos efectores de respuesta inmune celular a nivel local, cuyo papel central es erradicar diversos organismos patógenos del lumen intestinal pero también pueden mediar los procesos inflamatorios que inducen daño a las células del huésped (84).

Por otra parte la lámina propia intestinal es el escenario donde culmina la maduración de las células plasmáticas, que sintetizan dímeros de IgA unidos por una cadena polipeptídica (J), los cuales son secretados hacia el lumen intestinal junto con su receptor ubicado en el espacio extracelular de la membrana de las células epiteliales (93) (Figura 5).

La IgA de secreción es la molécula efectora de la respuesta inmune humoral local, que participa en la eliminación de microorganismos patógenos intestinales, mediante diversos mecanismos entre los que se incluyen a la inhibición de la adherencia a la superficie de la mucosa intestinal (93).

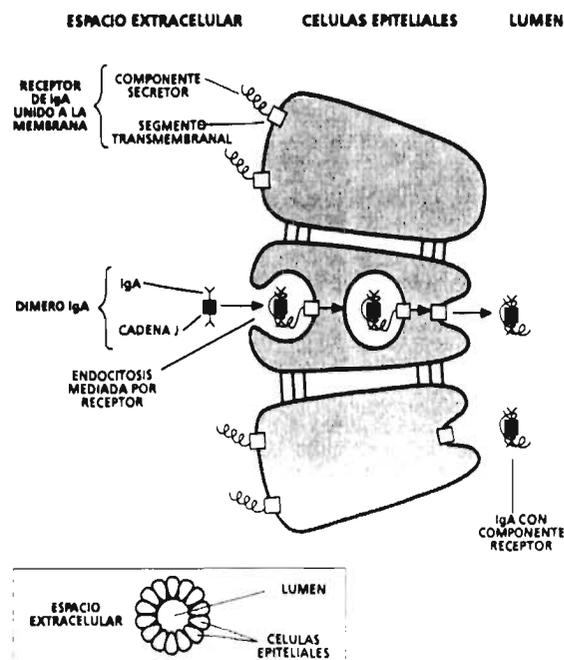


Figura 5. Transporte de la IgA dimerica del espacio extracelular hacia el lumen intestinal a través del componente secretor ubicado en la membrana de las células epiteliales del intestino (161).

Introducción

De acuerdo a lo anterior es posible ubicar el contexto de la respuesta inmune local en la giardiosis humana tomando en cuenta que, *G. lamblia* es un organismo que habitualmente se establece en la mucosa intestinal del huésped y como consecuencia de esto, es capaz de evocar una respuesta inmune local implicada en la erradicación del *G. lamblia* del lumen intestinal, en la protección del huésped contra la giardiosis sintomática y en el control de la invasión del parásito (100).

El inicio de la respuesta inmune local en la giardiosis generada como consecuencia del establecimiento de *G. lamblia* en la mucosa intestinal del huésped, ocurre una vez que este último ingiere materia fecal que contiene quistes, que al llegar al estómago inician su desenquistamiento facilitado en gran parte, por el pH ácido del jugo gástrico y se convierten en trofozoitos flagelados móviles los cuales al migrar y adherirse a las células del epitelio intestinal, se dividen por fisión binaria y dan lugar a la colonización del duodeno y yeyuno (95).

Un aspecto crítico en el establecimiento del parásito lo constituye su capacidad para adherirse a las células del epitelio intestinal (96). Se han identificado lectinas de peso molecular promedio de 57-78 kDa (113) y otras denominadas taglinas de 28-30 kDa (134) que al parecer están implicadas en la adherencia del parásito sobre el epitelio intestinal. Sin embargo la mayor parte de evidencias indican que la fuerza de succión generada entre el disco ventral y el epitelio intestinal es el mecanismo de adherencia más relevante del parásito (96). Se han caracterizado proteínas microtubulares que forman parte de la estructura del disco ventral denominadas giardinas de 29 a 38 kDa de peso molecular (150) que podrían participar en el mecanismo de adherencia.

Observaciones de la mucosa intestinal de ratones infectados con *G. muris* mediante microscopía electrónica indicaron que la adhesión de los trofozoitos, ocurre cerca de la base de las vellosidades que rodean las PP y dentro de estas últimas. La presencia de los trofozoitos en el interior de las placas de Peyer sugiere que, fueron capaces de remontar la barrera epitelial que recubre los folículos linfoides de las PP, a través de resquicios generados como consecuencia del daño a este epitelio (97). Esta última podría ser una vía mediante la cual el parásito al liberar *in situ* moléculas de excreción-secreción (98) sería capaz de evocar la respuesta inmune humoral local mediada por la IgA de secreción.

La participación de la IgA en mecanismos efectores de la inmunidad humoral local en la giardiosis muestra que *in vitro*, la adherencia de los trofozoitos de *G. muris* sobre neutrófilos y macrófagos peritoneales murinos, se favorece en presencia de leche inmune anti-*G. muris* y de la correspondiente fracción IgA específica de secreción láctea, a su vez la capacidad fagocítica de los macrófagos aumenta después de incubar a los trofozoitos con suero o leche inmune (99).

Se ha sugerido que otro mecanismo efector en el cual podría estar implicada la IgA secretora junto con el complemento, es en la lisis de los trofozoitos establecidos a nivel de mucosa intestinal, sin embargo, es probable que el papel de la IgA en la citolisis de los trofozoitos no sea muy relevante a pesar de ser el anticuerpo que predomina en secreciones intestinales (101) debido a su baja capacidad de fijar complemento en comparación con la IgG e IgM (102).

Otros mecanismos efectores estudiados *in vivo* en los que participan los anticuerpos secretores de la leche revelan que estos últimos, disminuyen la infectividad de los trofozoitos de *G. muris* al ser administrados oralmente a ratones neonatos junto con neutrófilos o macrófagos (99). Aún está por esclarecerse el papel de la IgA secretora en la depuración de la giardiosis, puesto

Introducción

que en un estudio experimental de giardiosis en humanos (14) y otro en ratones (103) se observó que su presencia en secreciones no se correlacionó con la eliminación intestinal del parásito, sin embargo, otros trabajos si apoyan lo anterior (101, 104,105). La evaluación de la respuesta protectora contra la giardiosis en niños (39) y en ratones lactantes (106), sugiere que el efecto primordial de la IgA de la leche es prevenir más que erradicar la infección ya establecida (39).

En teoría el efecto protector de la transferencia pasiva de IgA presente en la leche (39,106) o la capacidad depuradora de la IgA (105) de secreciones intestinales producida activamente por el huésped en respuesta a la infección, podría fundamentarse en su facultad para opsonizar los trofozoitos, y facilitar su ingestión por parte de los macrófagos o granulocitos presentes en el lumen intestinal del huésped (102). Sin embargo es poco probable que esto ocurra debido a la baja proporción de estas células *in situ* (107). Otro mecanismo sugiere que la IgA al inducir la inmovilización del trofozoito (108), podría inhibir su adherencia sobre el epitelio intestinal y con ello promover la expulsión del parásito mediante el peristaltismo intestinal (102). Si bien este mecanismo de exclusión inmune en la giardiosis puede ser factible *in vitro*, aún no se han obtenido las evidencias que lo demuestren contundentemente, pero mediante análisis inmunocitoquímicos se ha demostrado que, sobre la superficie de trofozoitos de *G. lamblia* se observa la presencia de IgA anti-*G. lamblia* secretada en leche (109). Esta interacción podría ocurrir a través de antígenos expresados en la membrana del parásito.

En un estudio preliminar enfocado a evaluar mediante inmunoelectrotransferencia e inmunoprecipitación las moléculas de *G. muris* reconocidas por la IgA obtenida de secreciones intestinales de animales infectados con este parásito, se observó que estos anticuerpos fueron capaces de reconocer específicamente a un grupo de proteínas de 30 kDa expresadas en la superficie del trofozoito (110). Sin embargo en un estudio posterior en el cual se trabajó con el mismo modelo experimental se reportó que las moléculas reconocidas por la IgA secretora tenían un peso molecular de 80 kDa (111). Aún cuando no se contó con las evidencias experimentales, se propuso que las divergencias en los resultados se obtuvieron debido a que el extracto antigénico del trofozoito no se calentó a ebullición antes de ser sometido a la electroforesis (111). En otro modelo experimental se observó que la transferencia de células linfoides de PP de animales inmunocompetentes infectados con una clona de *G. lamblia*, en ratones atímicos infectados con el mismo parásito, daba lugar a la reducción significativa de la carga de parásitos en el lumen intestinal de estos ratones inmunodeficientes y a la generación de linfocitos B obtenidos de PP capaces de sintetizar *in vitro* anticuerpos IgA y capaces de reconocer predominantemente antígenos de superficie de 72 kDa de la clona en cuestión (112).

Aún falta por discernir si las moléculas de membrana del trofozoito de *Giardia* spp. mencionadas anteriormente que son reconocidas por la IgA, evocan sustantivamente una respuesta protectora humoral a nivel local mediada por la IgA secretora puesto que las glicoproteínas de membrana del trofozoito con pesos moleculares de 70 kDa, o mayores, pudiesen ser moléculas homólogas a las proteínas de superficie de variabilidad antigénica (variant specific surface protein VSPs), implicadas en la evasión de la respuesta inmune del huésped (111).

El papel de la respuesta inmune celular local en la giardiosis se ha evaluado en su mayor parte, en modelos murinos de giardiosis experimental empleando como agente infectante *G. muris*. Se ha reportado que en ratones infectados con *G. muris*, el aumento en los niveles de linfocitos intraluminales (97) de la población T (107) coincidió con la disminución de los trofozoitos del lumen intestinal. Análogamente el incremento de linfocitos T en el compartimento intraepitelial

Introducción

y en la lámina propia en ratones infectados con quistes de *G. lamblia*, se correlacionó también con la depuración concomitante de los trofozoitos (114). Este efecto depurador se atribuyó a la actividad lítica de linfocitos T citotóxicos, aunque estos últimos no poseen un papel relevante en la erradicación del parásito *in vivo* (115).

Al igual que los linfocitos T citotóxicos, las células NK no participan aparentemente *in vivo* en la eliminación de los trofozoitos del lumen intestinal, ya que ratones *beige* deficientes en células NK infectados con *G. muris* resuelven la infección en un periodo similar a lo observado en los ratones inmunocompetentes infectados (116).

Estudios experimentales *in vivo* (117) e *in vitro* (118), sugieren que los macrófagos presentes en PP de ratones con giardiosis, participan en la depuración luminal del *G. lamblia* mediante la fagocitosis, la cual aumenta en presencia de suero inmune específico (118). Este efecto giardicida acrecentado por la presencia de anticuerpos específicos, se observó también con macrófagos peritoneales (119, 120). En un estudio *in vitro* se observó que la acción conjunta del interferón γ y el LPS bacteriano de *E. coli*, mejoró la capacidad fagocítica de los macrófagos de médula ósea sobre los trofozoitos de *G. lamblia* (121). Aparte de su papel efector, los macrófagos puede participar además como células presentadoras de antígenos (117).

Por otra parte, la mayor celeridad de eliminación intestinal de *G. muris* observada en ratones inmunocompetentes infectados con este parásito (120) se ha vinculado con su capacidad para reclutar macrófagos en la cavidad peritoneal (122). Es factible que en estos ratones exista una relación entre la capacidad de montar una respuesta inflamatoria con la habilidad de enfrentar la infección (122). Al parecer este proceso inflamatorio es importante en el control de la invasión por el parásito (100).

En relación a lo anterior, se ha reportado que la ciproheptadina, un potente inhibidor de los mediadores de la inflamación tales como histamina y serotonina, al ser administrada a ratones inmunocompetentes infectados con *G. muris*, provoca una infección crónica en estos animales (100). Considerando que las células cebadas son las que liberan dichos mediadores, se ha observado que su deficiencia congénita en ratones *Wf/Wf* con giardiosis, los incapacita para resolver la infección (100). Es probable que esta respuesta inmune inflamatoria, además de contribuir a controlar la invasión por parte del parásito, pueda a su vez, inducir el daño a la mucosa intestinal del huésped (17) (100).

A diferencia de la actividad efectora de los macrófagos y mastocitos sobre los trofozoitos de *Giardia* spp., las células linfoides tienen un papel crucial en la regulación de la respuesta inmune humoral a nivel local. Aún cuando no se conoce completamente su significado biológico, se ha demostrado que el número total de leucocitos en PP (83, 123), o intraluminales (115), en ratones inmunocompetentes infectados con *G. muris* aumenta en respuesta a la infección y retornan a sus niveles normales en la fase de resolución de la misma (83, 123). En base a los resultados obtenidos al cuantificar las diversas subpoblaciones de linfocitos T en PP de ratones atímicos, se sugirió que su incapacidad para resolver la infección estaba asociada al bajo nivel de linfocitos T CD4⁺ de PP (115), más tarde se reportó que la eliminación selectiva *in vivo* de estas células en ratones neonatos inmunocompetentes mediante la administración de anticuerpos anti-CD4 impide que estos animales adultos una vez infectados con *G. muris* puedan resolver la infección (124). Lo anterior fué reafirmado en un estudio comparativo donde se evaluaron los niveles totales de linfocitos y de subpoblaciones T en sangre periférica, bazo y PP

Introducción

de ratones infectados inmunocompetentes e inmunodeficientes y en el cual se concluyó que, en este último grupo de animales, el número de linfocitos T CD8+ y de linfocitos totales estaba deprimido pero especialmente, la subpoblación de linfocitos T CD4+ (125). Todas estas observaciones indican que la presencia de linfocitos T CD4+ es fundamental para los mecanismos de depuración intestinal del parásito (126). Es posible que mediante la liberación de ILs los linfocitos T CD4+ participen en la regulación de la respuesta inmune humoral y celular, las cuales conjuntamente pudieran contribuir a la protección contra la infección y a la eliminación del parásito en el lumen intestinal del huésped.

Los linfocitos B presentes en PP (123), o en lámina propia (127), de ratones con giardiosis constituyen los precursores de las células plasmáticas residentes en lámina propia, cuyo papel fundamental es la producción de anticuerpos específicos presentes en secreciones intestinales. Existe una correlación entre el cambio secuencial de los niveles de linfocitos B mIgM+ de PP (123) y lámina propia (127) respecto a la fase de la infección, ya que los niveles aumentan durante el establecimiento de la misma y dos semanas después su disminución, va acompañada de un aumento concomitante de las células B mIgA+, ambas poblaciones retornan a sus niveles normales en la fase de resolución.

La presencia de células B IgM+ en las diferentes etapas de la infección refleja su participación en la formación de anticuerpos secretores, pues su eliminación *in vivo* en ratones neonatos induce subsecuentemente, la disminución de anticuerpos IgM, IgG e IgA en secreciones intestinales en estos animales infectados con *G. muris*, en su etapa adulta (128).

Por otra parte, la disminución de carga parasitaria en el lumen intestinal de ratones atímicos infectados con *G. lamblia*, se asoció con la transferencia de células linfoides de ratones inmunocompetentes infectados con *G. lamblia* obtenidas de las PP, (112) en donde es probable que las células linfoides sean activadas por antígenos derivados de este protozoario (117, 129).

El número de estudios relacionados con los antígenos de la *Giardia* spp. que son reconocidos por anticuerpos séricos y secretores resulta extenso, en comparación con los enfocados a valorar los antígenos reconocidos por los linfocitos implicados en la regulación de la respuesta inmune local en la giardiosis (36). La información actual relativa a este último aspecto se ha obtenido en modelos experimentales de giardiosis como este, en el cual se demostró que, la adición de un extracto crudo de trofozoitos de *G. muris* a cultivos de linfocitos de PP de ratones infectados con dicho protozoario, promovió una respuesta linfoproliferativa relacionada con la eliminación del parásito del lumen intestinal (129). En otro estudio experimental, se observó que las células T aisladas de las PP de ratones neonatos infectados con una clona de *G. lamblia*, manifestaron una respuesta proliferativa ante fracciones antigénicas de peso molecular menor a 50 kDa y con fracciones de peso molecular entre 200 kDa y 75 kDa, sin embargo, también se observó una respuesta inespecífica en células de PP de los animales control hacia ciertas fracciones antigénicas de 80 kDa, 30 kDa y 17 kDa (130).

Aún falta mucho por comprender el significado biológico de la respuesta proliferativa de las células linfoides ante antígenos del parásito. Es posible que los péptidos derivados de antígenos de este parásito, al ser reconocidos por los linfocitos T CD4+ cooperadores pudieran evocar una respuesta humoral protectora mediada por la IgA de secreciones y por otro lado una respuesta celular cuya función primordial es quizás controlar la invasión del parásito (100).

Introducción

Actualmente el empleo de jerbos adultos (*Meriones unguiculatus*) infectados con trofozoitos de *G. lamblia*, es el modelo de giardiosis experimental mediante el cual puede ser posible avanzar en el conocimiento de la inmunidad local en la giardiosis. Aún cuando se ha implementado el modelo de giardiosis utilizando ratones adultos infectados con *G. lamblia* (135), se ha observado que el establecimiento de la infección con el mismo parásito es más eficiente en ratones neonatos (132). Debido a lo anterior, la ventaja principal del modelo experimental de giardiosis de jerbos reside en que, la susceptibilidad de estos animales a la infección con *G. lamblia* no depende de la edad. Por otra parte, aún cuando *G. muris*, utilizado como agente infectante en el modelo de giardiosis murina (94), es un parásito filogenéticamente relacionado con *G. lamblia*, manifiesta diferencias genotípicas y fenotípicas que podrían repercutir en la respuesta inmune del huésped infectado, lo cual sería una desventaja al intentar comparar esta última con la ocasionada por *G. lamblia*.

Con base en todo lo anterior, este trabajo tuvo como objetivo analizar las moléculas de trofozoitos de *G. lamblia* capaces de evocar una respuesta proliferativa de células linfoides presentes en las PP, implicada en la depuración del parásito a nivel intestinal (83), (123), (125), (129). Dicha respuesta se comparó, con la de otras células linfoides extraintestinales ubicadas en el bazo y en los nódulos mesentéricos para determinar prospectivamente, la participación de estas moléculas derivadas del parásito en dicho mecanismo depurador, empleando como modelo experimental a jerbos (*Meriones unguiculatus*) infectados con trofozoitos de *G. lamblia* (131).

Material y Métodos

Obtención de Parásitos

En este trabajo se emplearon trofozoitos de *G. lamblia* UAM-II obtenidos por desenquistamiento de quistes aislados de las heces de un paciente con giardiosis sintomática así como trofozoitos de *G. lamblia* de la clona C5 obtenidos por dilución limitante de trofozoitos de la cepa WB, la cual fué gentilmente donada por el Dr. Weinbach del Laboratorio de Enfermedades Parasitarias, National Institute of Health, Bethesda, USA.

Cultivo de trofozoitos

Los parásitos se cultivaron en medio axénico TYI-S-33 descrito por Diamond y modificado por Keister (1954). En este medio de cultivo se sembró una alícuota de 100 µl de un subcultivo confluyente de trofozoitos en 20 ml de medio estéril TYI-S-33 suplementado con biilis bovina deshidratada (Bioxon de México) y con suero bovino (Hyclone Laboratories Inc. Logan Utha USA) de acuerdo a lo señalado en el **Anexo** de preparación de reactivos. Los tubos que contenían a los trofozoitos subcultivados se incubaron a 37°C de 72 a 96 horas y se revisaron en el microscopio invertido (American Optical Biostar) para evaluar el crecimiento confluyente del cultivo. Una vez que se corroboró esto último los trofozoitos se cosecharon sumergiendo los tubos en baño de hielo durante 20 minutos, transcurrido este lapso se resuspendió el cultivo y se transfirió a tubos de polipropileno con tapón de rosca estériles de 50 ml (Costar Cambridge MA. USA), posteriormente se centrifugó a 650 g durante 10 minutos a 4°C (Centrífuga Beckman Mod. TS-6). El paquete celular obtenido se lavó tres veces mediante resuspensión en PBS frío y centrifugación en las condiciones antes mencionadas. Estos lavados se realizaron en esterilidad y los trofozoitos se mantuvieron en baño de hielo durante todo el tiempo que duró este proceso.

Después del último lavado el paquete celular se resuspendió en un volumen conocido de PBS y se contó en el microscopio (Irocode) el número de trofozoitos viables empleando una cámara de Neubauer (Boeco) y azul tripano (Gibco) diluido 1:20 con PBS estéril para ajustar la concentración de las suspensiones de trofozoitos de *G. lamblia* empleadas para diferentes fines.

Animales de experimentación.

En este trabajo se empleó un lote de 23 jerbos (*Meriones unguiculatus*) machos de 4 a 6 semanas de edad, con un peso promedio de 45 gr de una cepa no singénica y otro lote de 25 animales con las mismas características físicas pero de una cepa singénica. Estos animales fueron alimentados *ad libitum* con tabletas de purina (Purina de México, S.A.) y para preservarlos en las mejores condiciones de higiene posibles, se les mantuvo en cajas lavadas con fenol al 5% en las cuales se colocó viruta estéril y se les proporcionó agua envasada en condiciones estériles.

Todos los implementos utilizados se cambiaron cada tercer día, y también se esterilizaron las

Material y Métodos

rejas metálicas sobre las cuales se colocaron cubiertas de papel filtro, con el fin de disminuir la exposición de los animales y del alimento, hacia los contaminantes del medio ambiente del bioterio.

Los jerbos fueron desparasitados administrando por vía intragástrica (i.g.) una dosis de 30 mg de metronidazol (Flagyl Rhône-Poulenc, 5 mg/ml) repartida en 3 días consecutivos (137). Posteriormente se les dejó descansar una semana después de la cual se procedió a evaluar la eficiencia del tratamiento, a través de exámenes coproparasitoscópicos (CPS) cualitativos, realizados durante 4 días consecutivos y para corroborar los resultados de estos últimos, se buscó la presencia de parásitos en el contenido del lavado intestinal obtenido (132) como se indica a continuación. De cada lote de animales se eligió al azar un jervo, el cual fué anestesiado con éter y sacrificado por dislocación cervical, posteriormente se abrió la cavidad abdominal para diseccionar el intestino delgado, el cual fué cortado longitudinalmente y sumergido en 5 ml de amortiguador salino de fosfatos pH 7.4 frío (PBS) (Ver **Anexo**), contenidos en un tubo de borosilicato con tapón de rosca, posteriormente este último se agitó vigorosamente durante 10 segundos (VWR Vortex 2 USA). Se tomaron dos alícuotas de la suspensión obtenida, y cada una se tiñó con azul tripano (Gibco Lab. Grand Island N.Y. USA) diluido 1:20 con PBS estéril y con lugol parasitológico (Ver **Anexo**) diluido 1:5 con agua destilada, y se colocaron en una cámara de Neubauer (Boeco Germany) para cuantificar los parásitos, (tanto trofozoitos como quistes) empleando un microscopio óptico (Irocode V-7HPL USA).

Realizado lo anterior, se seleccionaron los jerbos que no eliminaron quistes después del tratamiento con metronidazol, para llevar a cabo la infección con el parásito la cual se llevó a cabo a la semana siguiente dividiendo cada lote de animales en un grupo control y un experimental.

Infección experimental

Dos semanas después del tratamiento con metronidazol se inició la infección experimental de los animales administrando por vía i.g. 0.2 ml de PBS estéril a los jerbos no singénicos y singénicos del grupo control mientras que los jerbos no singénicos del grupo experimental fueron infectados por la misma vía con 2×10^6 de trofozoitos de *G. lamblia* del aislado UAM-II (133) mientras que los jerbos singénicos se infectaron con 1×10^6 (131) de trofozoitos de *Giardia lamblia* de la clona C5. Estas fueron las concentraciones óptimas de trofozoitos con las cuales se estableció la infección en estos animales.

Cuantificación de quistes eliminados por los animales infectados

A partir del inicio de la infección experimental se practicaron 3 exámenes CPS cuantitativos cada tercer día durante 5 semanas, a fin de llevar a cabo el monitoreo sobre la eliminación de quistes tanto en los jerbos del grupo experimental como en el control.

La cuantificación de quistes se realizó mediante la técnica de flotación de Faust (140) con algunas modificaciones. Para ello tanto los animales del grupo control como experimental fueron colocados individualmente durante dos horas (10:00 a.m. a 12:00 p.m.) en frascos de vidrio con tapa de rosca horadada, con el fin de coleccionar las deyecciones expulsadas en este lapso. Estas últimas fueron recogidas, pesadas y resuspendidas en 8.0 ml de solución salina isotónica (SSI) (Ver **Anexo**) y se incubaron a temperatura ambiente de 20 a 30 minutos, después se disgregaron con un aplicador de madera para obtener una suspensión uniforme de materia

Material y Métodos

fecal, la cual se centrifugó a 650 g durante 3 minutos a 4° C (centrifuga Beckman Mod. TS-6). Posteriormente se decantó el sobrenadante y el paquete de materia fecal obtenido se lavó una vez en las condiciones antes descritas, realizado esto último se descartó el sobrenadante.

La muestra empaquetada en el fondo del tubo se resuspendió en 2.5 ml de solución acuosa de Zn SO₄ (Ver **Anexo**) ajustada a una densidad de 1.185 g/ml y se centrifugó a 650 g durante 3 minutos a 4° C. El sobrenadante obtenido se vertió a un tubo de 16 x 150 y se reconstituyó con 10 ml de una solución de formol diluido en SSI (Ver **Anexo**). Posteriormente la suspensión se centrifugó a 400 g durante 3 minutos a 4°C, después de esto se eliminó el sobrenadante por decantación y con el diluyente escurrido por las paredes del tubo se resuspendió el botón empaquetado en el fondo. El volumen aproximado de esta suspensión fue de 0.3 ml. Posteriormente se añadieron 30 µl de lugol parasitológico (diluido 1:5 con agua destilada) y en esta suspensión teñida, se procedió a contar microscópicamente el número de quistes/ml en la cámara de Neubauer (Boeco) para después calcular el número de quistes/g de heces.

Preparación del Extracto Crudo de Membrana de trofozoitos de *G. lamblia*.

Los trofozoitos cultivados y cosechados como se describió anteriormente se resuspendieron añadiendo por cada 50 x 10⁶ de trofozoitos 1 ml de amortiguador tris (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo.) 10 mM pH 8.0 adicionado con inhibidores de proteasas (ver **Anexo**). Posteriormente esta suspensión se homogeneizó manualmente colocando el tubo en baño de hielo durante todo el tiempo que duró el proceso. La suspensión obtenida se vertió en un tubo con tapa de rosca de 10 ml (Costar) y se centrifugó a 7x10³ g durante 20 minutos a 4°C (Centrifuga Beckman, Modelo J2-21, rotor JA-20.1). El botón empaquetado en el fondo del tubo se resuspendió en un volumen mínimo de amortiguador tris (Sigma) 10 mM pH 8.0 con inhibidores de proteasas. La concentración de proteínas en el extracto crudo de membrana (ECM) se determinó mediante el método de Lowry (155). Una vez hecho esto se prepararon alícuotas de este ECM y se almacenó a -70° C hasta su uso.

Electroforésis y Electrotransferencia.

La electroforésis en el gel de poliacrilamida (PAGE) se llevó a cabo en un sistema amortiguador discontinuo (156) separando la muestra en un gel de corrimiento al 10% de acrilamida (Ver **Anexo**) en condiciones reductoras de acuerdo a lo siguiente: un volumen equivalente a 70 µg de proteína del ECM se resuspendió en amortiguador de muestra hasta ajustar un volumen máximo de 20 µl, posteriormente se llevó a ebullición durante 5 minutos y se colocó en un pozo del gel concentrador al 5% de acrilamida (Ver **Anexo**). Los marcadores de peso molecular (PM) bajo (Bio-Rad) (Ver **Anexo**) incluidos en cada corrida se procesaron de la misma manera, resuspendiendo 2 µl de esta mezcla de proteínas en 18 µl de amortiguador de muestra (Ver **Anexo**) y calentando a ebullición durante 5 minutos. En los pozos restantes se adicionaron 20 µl del mismo amortiguador sin antígeno. El corrimiento se llevó a cabo dentro de una minicámara de electroforésis (Bio-Rad) la cual contenía el amortiguador de corrida (Ver **Anexo**) y se aplicó un voltaje constante de 10 mAmp por minigel hasta observar que el frente de corrida formado por el azul de bromofenol llegaba al borde inferior del mismo.

Las bandas separadas en los geles tanto de los marcadores de peso molecular como del ECM fueron teñidas para visualizar su corrimiento electroforético, con una solución de azul de

Material y Métodos

Coomasie (Ver **Anexo**). Por otro lado los geles se transfirieron a papel de nitrocelulosa (NC) (Bio-Rad 0.45 μm) de acuerdo al método descrito por Towbin (157) utilizando una minicámara de electrotransferencia (Bio-Rad) que contenía una solución amortiguadora de tris 0.0198 M pH 8.3 (Ver **Anexo**) y aplicando una corriente constante de 350 mAmp durante 60 minutos. Transcurrido este lapso el papel se enjuagó con agua destilada y se guardó toda la noche a 4°C en amortiguador TBS (Ver **Anexo**). Al día siguiente se procedió a teñirlo con el método más adecuado al uso posterior al cual iba a ser destinado.

Con el objeto de contar con un patrón de referencia para comparar los resultados de las transferencias subsecuentes, el papel de NC con las bandas transferidas de los marcadores de peso molecular conocido y las del ECM, se tiñó permanentemente con una solución de amido negro (Ver **Anexo**) durante 5 minutos después de los cuales se aclaró colocando el papel en una solución aclaradora (Ver **Anexo**) de hasta observar las bandas bien definidas.

Sobre el carril donde se transfirieron las bandas del ECM al papel de NC (cuya longitud fué de 6 cm por 0.5 cm de ancho) se hicieron marcas cada 4 mm a lo largo del papel con la punta de una espátula y se obtuvieron 15 diferentes secciones con un área aproximada de 20 mm². Realizado lo anterior este patrón de transferencia se colocó dentro de un tubo con tapón de rosca que contenía una solución de TBS con 0.01% p/v de azida sódica (Gibco) y se mantuvo a 4°C.

El rango de peso molecular de cada sección se calculó en base a la regresión lineal de una curva estándar obtenida al graficar la movilidad relativa (rf) versus el logaritmo del peso molecular conocido de las proteínas contenidas del control (158).

El papel de NC destinado para preparar los antígenos unidos a partículas de nitrocelulosa se tiñó con una solución de amido negro (Gibco) al 0.01% p/v (Ver **Anexo**) con el fin de visualizar los carriles donde se transfirieron las bandas del ECM al papel. El papel donde se transfirió cada carril se cortó longitudinalmente con el objeto de obtener tiras de 6 cm de largo por 0.5 cm de ancho, a lo largo de las cuales se hicieron marcas cada 4 mm con la punta de una espátula tomando como referencia el patrón de transferencia de los marcadores y del ECM obtenido como se indicó en el párrafo anterior. Realizado esto último las tiras se lavaron exhaustivamente sumergiéndolas en un recipiente con agua destilada y agitándolas suavemente en un agitador horizontal (American rotator V R4140) a 4°C a fin de eliminar totalmente el colorante. Posteriormente cada tira se cortó sobre las marcas hechas previamente a lo largo del papel para obtener 15 secciones de 20 mm² de superficie, las cuales se empacaron por separado entre dos hojas de papel filtro envueltas con papel aluminio y se guardaron a -70°C por tiempo máximo de 30 días.

Las tiras de papel de NC obtenidas en la transferencia de los carriles de la PAGE donde solo se corrió el amortiguador de muestra, se cortaron para obtener secciones de 4 mm² las cuales se guardaron a -70°C envueltas en papel filtro y papel aluminio. A partir de estas secciones se preparó el control de NC particulada incluido en el ensayo celular de reconocimiento antigénico.

El control de antígeno total (Ag. tot.) unido a partículas de papel de NC se obtuvo de la siguiente manera: se prepararon diluciones del ECM con 5, 10 y 15 μg de proteína disueltas en el amortiguador de muestra utilizado en la PAGE sin azul de bromofenol y se calentaron a ebullición durante 5 minutos, posteriormente cada una de ellas se descargó en un área de 20 mm² de

Material y Métodos

papel de NC previamente lavado en TBS estéril. Una vez adsorbidas las muestras en el papel se dejaron secar a temperatura ambiente y se guardaron, al igual que las muestras anteriores, a -70°C envueltas en papel filtro y papel aluminio.

Preparación de antígenos unidos a partículas de papel de nitrocelulosa

Para llevar a cabo el ensayo celular de reconocimiento antigénico descrito por Abou-Zeid (143) fué necesario preparar previamente los antígenos unidos a partículas de papel de NC de acuerdo a lo siguiente: cada sección de 20 mm^2 papel de NC se colocó dentro de tubos estériles de 13×100 con tapón de rosca y se disolvió con $250\ \mu\text{l}$ de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma), la muestra se dejó incubar 1 hora en la campana de flujo laminar y se agitó cada 15 minutos en el vortex (VWR Vortexer 2 USA) para favorecer su disolución y asegurar su esterilidad. Transcurrido este tiempo se procedió a particular el papel de NC añadiendo $250\ \mu\text{l}$ de amortiguador estéril de carbonato/bicarbonato de sodio 0.05M ajustado a un pH de 9.6 (Ver **Anexo**).

El precipitado obtenido se transfirió a microtubos estériles (Elkay Boston Ma.) y se centrifugó (Microfuge 12 Beckman USA) a $5 \times 10^3\text{ g}$ durante 3 minutos a 4°C para eliminar el DMSO. El botón obtenido se lavó 4 veces al resuspenderlo en 1 ml de RPMI-1640 incompleto (Ver **Anexo**) y centrifugarlo en las condiciones antes mencionadas. Después de la última centrifugación el precipitado se resuspendió en 1 ml RPMI-1640 incompleto y se almacenó a -70°C .

Ensayo celular de reconocimiento antigénico.

Cuatro semanas después de que no se detectó la expulsión de quistes en los jerbos del grupo experimental, los animales de ambos grupos se anestesiaron con éter y se sangraron por punción cardíaca antes de sacrificarlos por dislocación cervical, posteriormente se disecaron varios órganos en el siguiente orden, el bazo, los nódulos linfoides mesentéricos y las placas de Peyer en condiciones de esterilidad, manteniendo las células y diluyentes en baño de hielo durante todo el tiempo que duró este proceso.

Después de realizar la disección, cada órgano se colocó en una caja de Petri que contenía 15 ml de solución salina balanceada de Hank ajustada a pH 7.4 (HBSS) (ver **Anexo**).

Con el fin de preparar las suspensiones de células linfoides se procedió a perfundir el bazo con HBSS fría con una jeringa hipodérmica estéril. Los nódulos linfoides mesentéricos y las placas de Peyer se disgregaron suavemente con la punta de unas agujas hipodérmicas. Una vez obtenidas las suspensiones de células se trasvasaron con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril de punta larga (Costar) a tubos cónicos de 50 ml estériles con tapón de rosca (Costar) y el volumen se ajustó a 45 ml añadiendo HBSS fría.

Cada suspensión se dejó reposar 10 minutos para sedimentar detritus celulares gruesos y posteriormente el sobrenadante obtenido se transfirió nuevamente a otros tubos de 50 ml cónicos limpios, a continuación se centrifugó a 250 g durante 10 minutos a 4°C , el paquete celular resultante se lavó una sola vez al resuspendiendo con HBSS fría y al centrifugarlo bajo las mismas condiciones.

Material y Métodos

El botón obtenido se resuspendió en un volumen conocido de RPMI-1640 frío incompleto, se tiñó una alícuota de la suspensión con azul tripano (Gibco) diluido 1:20 con PBS estéril y se colocó en una cámara de Neubauer (Boeco) para contar el número de células viables/ml empleando para ello un microscopio óptico (irocode), la concentración de dichas células se ajustó a 2×10^5 por cada 0.2 ml de RPMI-1640 suplementado (Ver **Anexo**).

Las suspensiones de células linfoides de bazo, nódulos linfoides mesentéricos y de placas de Peyer provenientes tanto de los jerbos del grupo control como del experimental se colocaron en placas de microcultivo de 96 pozos (Costar) a razón de 2×10^5 células por pozo y a cada uno de éstos se les adicionaron 20 μ l de la suspensión de los antígenos unidos a partículas de nitrocelulosa, los controles de Ag.tot. y de NC pura y un control adicional de RPMI incompleto, cada condición probada se hizo por triplicado.

Posteriormente las placas se incubaron (Napco CO₂ incubator Mod 302) durante 7 días a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% colocando cada placa en un ángulo de 45° durante los primeros 3 días de incubación y los 4 restantes en posición horizontal. Dieciocho horas antes de concluir el último día de incubación se añadieron a cada pozo 0.1 μ Ci de timidina [³H] con una actividad específica de 6.7 μ Ci/mM (New England Nuclear Boston Ma.) como marcador de la proliferación celular.

Concluido el período de incubación las células se cosecharon (Cell Harvester Brandel M-24R Mod. 20877 Gaithersburg USA) sobre papel de fibra de vidrio (Whatman 934-AH) el cual después de secarse, se sumergió en 6 ml de líquido de centelleo (Beckman) envasados en un frasco vial para posteriormente evaluar su radioactividad en cuentas por minuto (cpm) en un contador de centelleo (Beckman).

Estadística.

Los resultados obtenidos fueron analizados empleando la prueba de t de Student o la U de Mann-Whitney para grupos no pareados con el fin de comparar los resultados obtenidos en la cinética de eliminación de quistes de los animales del grupo control y experimental.

Los resultados de los ensayos de proliferación *in vitro* se expresaron como la media del triplicado de las cpm (X) de todas las fracciones ensayadas más su desviación estándar (DS), y el valor máximo de la DS tolerado fué de un 35% con respecto al valor del promedio (130). También se reportaron en forma de Índice de estimulación (I.E.), el cual se calculó dividiendo el promedio de cpm del triplicado de cada fracción antigénica entre el promedio de cpm del triplicado del control de NC. Un valor promedio de cpm (X) de cada fracción probada, mayor al promedio de cpm del control de NC más 4 DS de este mismo y un I.E. igual o mayor a 2 (130), fueron los dos criterios considerados para decidir si las fracciones inducían una respuesta proliferativa positiva. Ambos sistemas coincidieron en la evaluación de las fracciones antigénicas que indujeron dicha respuesta.

A fin de observar diferencias significativas entre las cpm de las células linfoides del grupo control y experimental de cada cepa de jerbos, se aplicó la prueba de la U de Mann-Whitney. Los valores de p menores o iguales a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos. Los cálculos se hicieron con la ayuda del paquete estadístico statgraf.

Resultados

Cinética de eliminación de quistes.

Los resultados obtenidos en la cinética de eliminación quistes de los jerbos no singénicos infectados por vía i.g. con los trofozoitos de *G. lamblia* del aislado UAM-II se observan en la Figura 6. En esta se puede ver que 2 (23%) de los 9 animales infectados expulsaron quistes en el día 5 postinfección (p.i.), después del cual se alcanzó el periodo de latencia (138) en el cual más del 50% de los animales infectados expulsaron quistes en las heces (día 7 p.i.). En este período 8 (89%) animales infectados expulsaron quistes en cantidades significativamente mayores ($p < 0.001$) que lo observado en los animales del grupo control (Figura 7).

Durante la fase aguda de la infección, la eliminación de quistes observada en los jerbos infectados ocurrió en forma intermitente, ya que en los días 8, 14 y 16 p.i. no fué significativa ($p > 0.001$) en relación al grupo control, sin embargo, en los días 12, 19 y 21 p.i. se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$).

La máxima descarga de quistes se observó en el día 19 p.i. en el cual el promedio de quistes por gramo de heces expulsados por todos los animales fué de 88167. Después del día 23 p.i. se inició la fase de resolución (139) durante la cual más del 50% de los animales infectados dejaron de eliminar quistes en las heces lo que ocurrió entre los días 35 y 37 p.i. (0% de eliminación de quistes).

Respecto a los resultados obtenidos en el grupo control, se observó que 3 (33.33%) de los 9 jerbos expulsaron quistes de *Giardia* spp. durante el transcurso de la infección (Figura 7), mientras que en los 6 restantes (66.66%) no se observó esto.

La cinética de eliminación de quistes observada en los jerbos singénicos infectados i.g. con trofozoitos de *G. lamblia* de la clona C5, fué diferente a la anterior en relación al perfil y a la cantidad de quistes eliminados en las heces como se muestra en la Figura 8. En esta gráfica se observa que 2 (23%) de los 9 animales infectados empezaron a expulsar quistes el día 2 p.i. y en el día 4 p.i. se alcanzó el periodo de latencia en el cual 5 (55.55%) animales eliminaron quistes. Durante la fase aguda los 9 (100%) jerbos infectados expulsaron quistes en los días 7, 9, 11 y 14 p.i. en forma significativa ($p < 0.001$), para posteriormente disminuir en el día 16 p.i., pero las diferencias continuaron siendo significativas ($p < 0.035$).

La eliminación de quistes en esta fase fué relativamente uniforme, aunque se observó un ligero repunte hacia el día 9 p.i. en el cual el promedio de quistes por gramo de heces de todos los animales fué de 167812.5. Para el día 18 p.i. 7 (78%) animales continuaron eliminando

quistes ($p < 0.008$) y después de este día se inició la fase de resolución, la cual se presentó entre los días 21 al 30 p.i.. A partir del día 32 y hasta el día 37 p.i. no se observaron quistes en las heces de los animales del grupo experimental. Tres de los 9 jerbos del grupo control expulsaron quistes de *Giardia* spp. durante el tiempo que duró el estudio de la cinética de expulsión de quistes (Figura 9).

Análisis del perfil protéico de los trofozoítos de *G. lamblia* de la cepa UAM-II y de la clona C5.

El perfil de las proteínas del ECM de los trofozoítos de *G. lamblia* de la clona C5 separadas por PAGE-SDS se muestra en la Figura 10 (carril B). En este se reveló la presencia de múltiples proteínas con pesos moleculares entre 172 y 16 kDa, 12 de las cuales con pesos moleculares de 96, 93, 87, 75, 55, 45.0, 41, 32, 30, 27, 25 y 24 kDa fueron fácilmente observables, siendo 4 de las ellas con pesos moleculares de 55, 45, 41 y 27 kDa las más prominentes. Así mismo entre estas 12 proteínas se separaron otras, cuyas bandas fueron tan finas y tenues que fué difícil distinguirlas, esto mismo ocurrió con las proteínas de peso molecular mayor a los 96 kDa y menor a 24 kDa. El patrón de migración electroforética de las proteínas de la clona C5 fué aparentemente similar al obtenido con el ECM de los trofozoítos de *G. lamblia* del aislado UAM-II (carril C) puesto que no se observaron diferencias en la expresión de las proteínas entre este último y la clona.

La electrotransferencia a papel de NC de las proteínas del ECM de los trofozoítos de *G. lamblia* de la clona C5 y del aislado UAM-II, se muestra en el carril D y E respectivamente de la Figura 10. Los resultados revelaron que el perfil de las proteínas transferidas fué similar en ambas preparaciones antigénicas ya que no se observaron diferencias relevantes en la expresión de proteínas entre el aislado UAM-II y la clona C5.

En la Figura 11 se muestra la electrotransferencia a papel de NC de las proteínas del ECM separadas en los geles de poliacrilamida, tanto de los trofozoítos de la clona C5 como del aislado UAM-II. En esta figura se señala el rango de peso molecular relativo (Mr) de cada fracción antigénica, que fué calculado con base en la regresión lineal ($r = -0.9874$) de la curva estándar, obtenida al graficar la movilidad relativa (rf) vs el log del peso molecular de los marcadores de peso molecular conocido.

Activación de células linfoides por fracciones antigénicas de *G. lamblia*

Los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación *in vitro* se reportaron de acuerdo a lo descrito en Material y Métodos. En las Tablas 1 y 2 se muestran las fracciones antigénicas de los trofozoítos de *G. lamblia* que dieron lugar a la estimulación de las células linfoides de los jerbos no singénicos y singénicos del grupo experimental. Al comparar los valores del triplicado de las cpm obtenidos en los cultivos de las células linfoides del grupo experimental y del control de ambas cepas de jerbos, se observó que hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) excepto con las fracciones de *G. lamblia* del aislado UAM-II de 87-73 kDa y de 23-20 kDa, que indujeron la proliferación de las células linfoides de las placas de Peyer de los jerbos no singénicos del grupo control y experimental (Tabla 1) y con las fracciones antigénicas de

Resultados

G. lamblia de la clona C5 de 28-23 kDa, 23-20 kDa y de 20-17 kDa, que promovieron la proliferación en las células linfoides de las placas de Peyer de los jerbos singénicos del grupo control y experimental (Tabla 2).

En la Tabla 1 se muestran los rangos de Mr de las fracciones antigénicas preparadas a partir del ECM de los trofozoitos de *G. lamblia* UAM-II que estimularon a las células linfoides provenientes de los jerbos no singénicos infectados con los trofozoitos de *G. lamblia* del aislado UAM-II, así mismo se muestra el efecto de estos antígenos sobre las células linfoides de los jerbos no infectados del control.

En esta tabla puede observarse que hubo una respuesta linfoproliferativa en las células linfoides de bazo y de los nódulos linfoides mesentéricos de los jerbos del grupo experimental, ante las mismas fracciones antigénicas de Mr de 40-33 kDa, 33-28 kDa, 28-23 kDa y 23-20 kDa. En el caso de las células linfoides de los animales del grupo control, no se observó una respuesta proliferativa frente a estas mismas fracciones.

Al igual que las células del bazo y de los nódulos linfoides mesentéricos, las células linfoides de las placas de Peyer del grupo experimental de jerbos, respondieron ante las fracciones de Mr de 40-33 y 33-28 kDa. Puede observarse que la fracción de 23-20 kDa indujo una respuesta proliferativa de las células linfoides de las placas de Peyer, tanto en los animales del grupo control como del experimental. Este efecto se observó con la fracción de 87 a 73 kDa la cual también estimuló a las células de las placas de Peyer de ambos grupos estudiados. Cabe destacar que las fracciones de 40-33 kDa y de 33-28 kDa solo estimularon a las células del bazo, nódulos linfoides mesentéricos y de las placas de Peyer de los jerbos del grupo experimental.

En la Tabla 2 se muestra la respuesta proliferativa *in vitro* inducida por diferentes fracciones antigénicas de los trofozoitos de *G. lamblia* de la clona C5 sobre de las células linfoides provenientes de jerbos singénicos infectados con los trofozoitos de *G. lamblia* de la clona C5, así mismo se muestra el efecto de estas fracciones sobre las células linfoides de los animales del grupo control.

Puede observarse que hubo 4 fracciones de 73-62 kDa, 46-40 kDa, 40-33 kDa y de 33-28 kDa que estimularon a las células linfoides de los tres órganos ensayados provenientes de los jerbos del grupo experimental. Las fracciones de 40-33 kDa y de 33-28 kDa fueron al parecer inmunodominantes, ya que se expresaron tanto en el aislado UAM-II como en la clona C5 y además estimularon solo a las células linfoides de los jerbos singénicos y no singénicos del grupo experimental respectivo.

También se puede observar que la fracción de 87-73 kDa estimuló a las células linfoides del bazo provenientes de los animales del grupo experimental, otra fracción de 62-54 kDa estimuló a las células de los nódulos linfoides mesentéricos de este mismo grupo de animales.

Por otra parte la fracción de 20-17 kDa indujo una respuesta proliferativa en las células de los nódulos linfoides mesentéricos y de las placas de Peyer de los jerbos singénicos infectados, sin embargo, también estimuló a las células linfoides de las placas de Peyer de los jerbos del grupo control correspondiente.

Resultados

En cuanto a las fracciones de 28-23 kDa y de 23-20 kDa puede observarse que estimularon a las células linfoides provenientes de las placas de Peyer de los jerbos singénicos tanto del grupo control como del experimental.

En las Figuras 12 a 17 se muestran los índices de estimulación de las células linfoides aisladas de los jerbos del grupo control y experimental, ante la adición de las 15 fracciones antigénicas de los trofozoitos de *G. lamblia* unidas a partículas de papel de nitrocelulosa, y se incluye el valor del índice de estimulación obtenido con 10 µg de proteína del control de Ag. tot. particulado. Se puede ver que los resultados expresados en forma de índices de estimulación de las fracciones que dieron lugar a una respuesta proliferativa coinciden con los presentados en las Tablas 1 y 2 en forma de promedios de cpm.

El valor promedio de los índices de estimulación de las fracciones que no dieron lugar a una respuesta proliferativa, en las células linfoides del grupo experimental y control de ambas cepas de jerbos fué de 1 y en contra de los resultados esperados, en ningún caso se observó una respuesta proliferativa en las células linfoides de las dos cepas de jerbos analizadas con el antígeno total puesto que, el índice de estimulación obtenido con dicho antígeno fué consistentemente menor a 2 en todos los casos. (Figuras 12 a 17).

En la Figura 14 puede observarse que las fracciones de 87-73 kDa y de 23-20 kDa de los trofozoitos de *G. lamblia* del aislado UAM-II, dieron lugar a un índice de estimulación en las células linfoides de las placas de Peyer de los jerbos no singénicos del grupo control de mayor magnitud, que el obtenido en las células de los jerbos del grupo experimental. Sin embargo en la Tabla 1 se puede ver que, el promedio de cpm obtenido en las células linfoides de las placas de Peyer de los jerbos del grupo control y experimental, ante la adición de la fracción de 87-73 kDa fué respectivamente de 18073 y 19920, es decir son valores muy cercanos, lo mismo se observó con la fracción de 23-20 kDa con la cual se obtuvieron valores promedio de cpm de 7662 y 8900 que respectivamente correspondieron a las células del grupo control y experimental. Estos resultados aparentemente contradictorios residen en que, el valor promedio de cpm obtenido en el control de NC de las células linfoides de las placas de Peyer de los jerbos no singénicos del grupo control fué menor ($X=640$ Tabla 1), que el obtenido con los jerbos del grupo experimental cuyo valor del control de NC fué de 2785 (Tabla 1), dando como resultado que, el valor del índice estimulación en las células linfoides de dichos animales del grupo control, calculado como la relación del promedio (X) de las cpm de las fracciones probadas entre el valor X de cpm del control de NC correspondiente, fuere mayor que el índice de estimulación obtenido en las células de los jerbos del grupo experimental. Lo anterior también se observó con la fracción antigénica de 20-17 kDa de los trofozoitos de *G. lamblia* de la clona C5 sobre las células linfoides de las placas de Peyer de los jerbos del grupo control (Figura 17), cuyo valor X de cpm del control de NC (Tabla 2) fué de 634, mientras que el correspondiente al grupo experimental fué de 1400 (Tabla 2).

Resultados

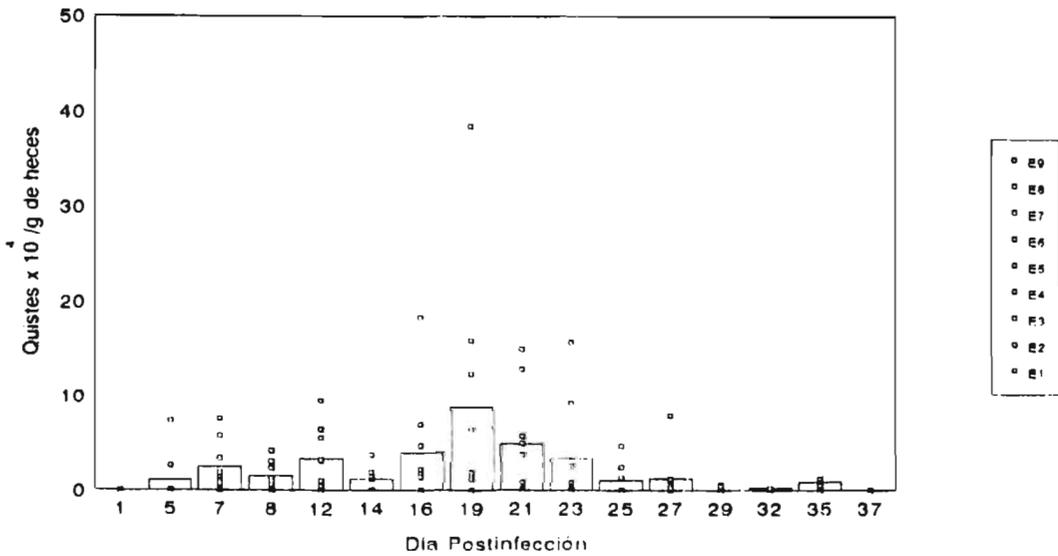


Figura 6. Cinética de eliminación de quistes por jerbos infectados con trofozoitos de *G. lamblia* del aislado UAM-II. Jerbos mongólicos machos no singénicos de 4 a 6 semanas de edad fueron infectados por vía i.g. con 2×10^6 trofozoitos de *G. lamblia* del aislado UAM-II. A diferentes tiempos después de la infección se cuantificaron los quistes expulsados en las heces de acuerdo a lo descrito en Material y Métodos. Cada punto representa el resultado del exámen CPS cuantitativo obtenido de las heces de los animales y el tope de las barras indica el promedio de quistes eliminados en el día postinfección correspondiente.

Resultados

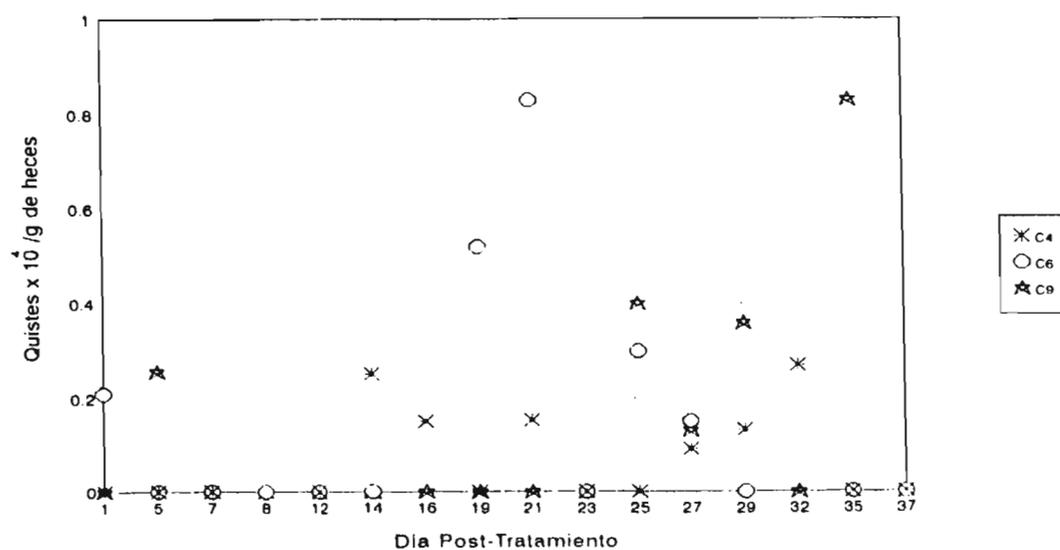


Figura 7. Cinética de eliminación de quistes por 3 jerbos no singénicos del grupo control infectados con *Giardia* spp. Jerbos mongólicos machos no singénicos de 4 a 6 semanas de edad fueron tratados por vía i.g. con PBS estéril. A diferentes tiempos después del tratamiento se cuantificaron los quistes expulsados en las heces de acuerdo a lo descrito en Material y Métodos. Cada punto representa el resultado del examen CPS cuantitativo obtenido en las heces de los animales y el tope de las barras indica el promedio de quistes eliminados en el día postinfección correspondiente.

Resultados

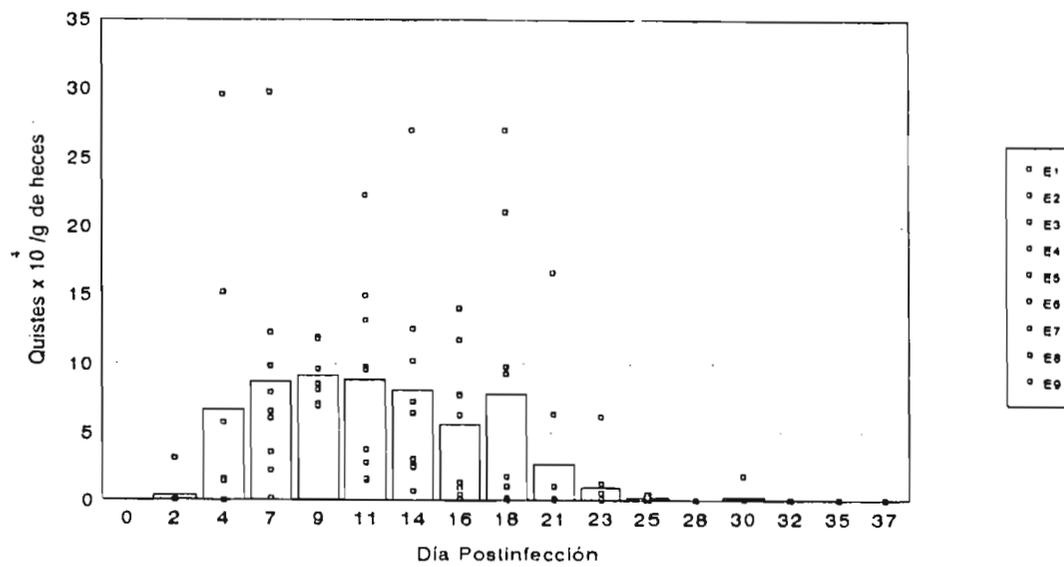


Figura 8. Cinética de eliminación de quistes por jerbos infectados con trofozoitos de *G. lamblia* de la clona C5. Jerbos mongolicos machos singénicos de 4 a 6 semanas de edad fueron infectados por via i.g. con 1×10^6 trofozoitos de *G. lamblia* de la clona C5. A diferentes tiempos después de la infección se cuantificaron los quistes expulsados en las heces de acuerdo a lo descrito en Material y Métodos. Cada punto representa el resultado del examen CPS cuantitativo obtenido de las heces de los animales y el tope de las barras indica el promedio de quistes eliminados en el día postinfección correspondiente.

Resultados

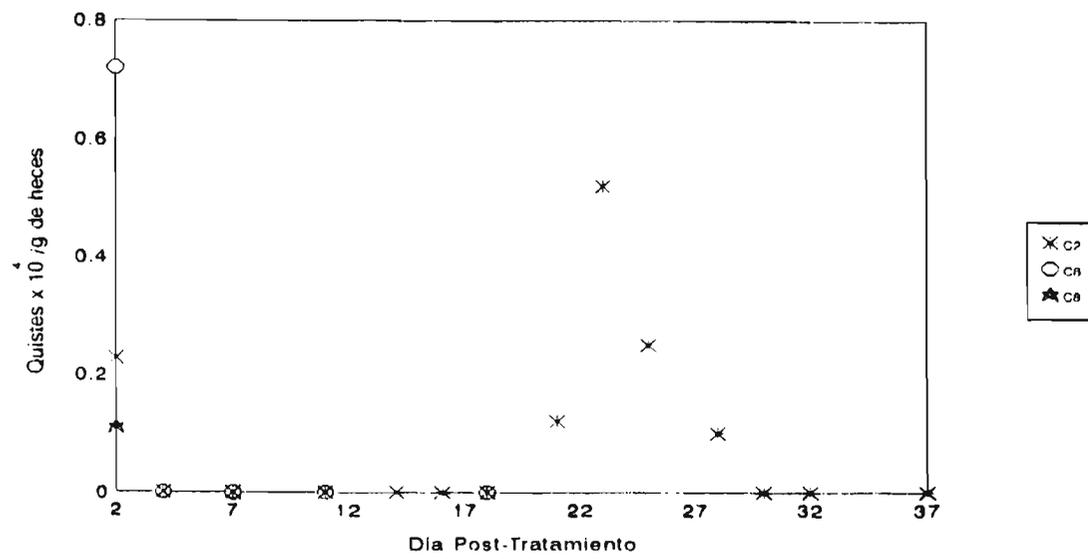


Figura 9. Cinética de eliminación de quistes por 3 jerbos singénicos del grupo control infectados con *Giardia* spp. Jerbos mongólicos machos singénicos de 4 a 6 semanas de edad fueron tratados por vía i.g. con PBS estéril. A diferentes tiempos después del tratamiento se cuantificaron los quistes expulsados en las heces de acuerdo a lo descrito en Material y Métodos. Cada punto representa el resultado del examen CPS cuantitativo obtenido en las heces de los animales y el tope de las barras indica el promedio de quistes eliminados en el día postinfección correspondiente.

Resultados

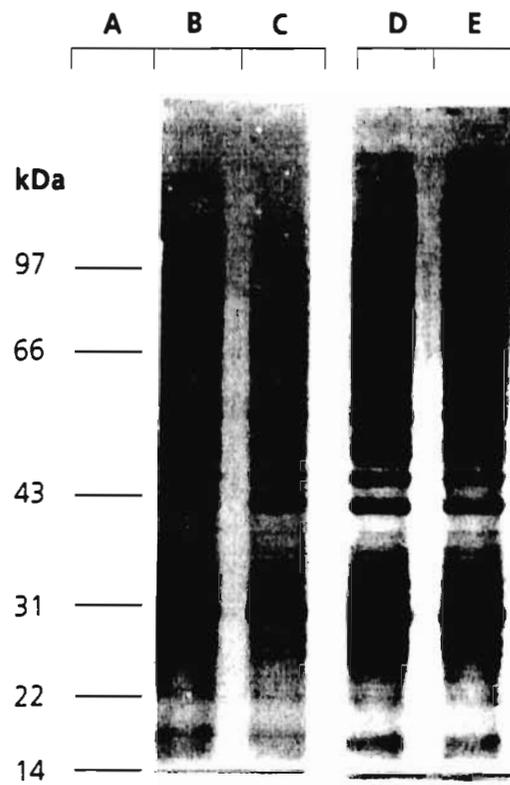


Figura 10. Análisis electroforético del ECM de trofozoitos de *G. lamblia*. Los ECM de *G. lamblia* de la clona C5 (carril B) y del aislado UAM-II (carril C) fueron obtenidos de acuerdo a lo descrito en Material y Métodos. Estos extractos se analizaron por PAGE-SDS en geles de poliacrilmida al 10%. En la figura se muestra también la electrotransferencia a papel de NC del ECM de los trofozoitos de *G. lamblia* de la clona C5 (carril D) y del aislado UAM-II (carril E). El peso molecular expresado en kilodaltones (kDa) de las proteínas empleadas como estándares se muestra a la izquierda de la figura.

Resultados

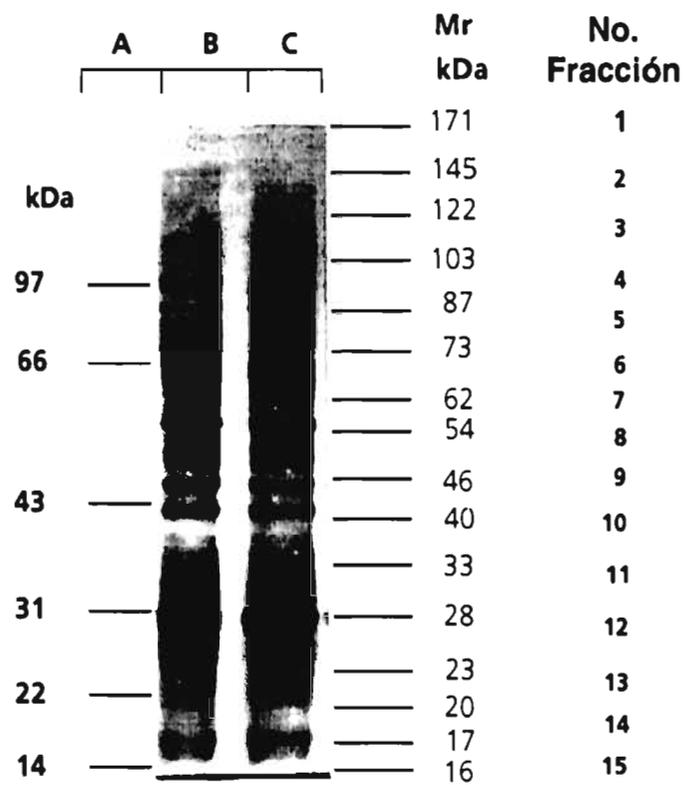


Figura 11. Patrón antigénico del ECM de trofozoitos de *G. lamblia* obtenidos por electrotransferencia a papel de NC. Los ECM de *G. lamblia* de la clona CS (carril B) y del aislado UAM-II (carril C) fueron obtenidos de acuerdo a lo descrito en Material y Métodos. El perfil de proteínas de la clona CS (carril B) y del aislado UAM-II (carril C) se dividió en varias fracciones (1 a 15) considerando los rangos de peso molecular relativo (Mr) expresado en kilodaltones (kDa). Los pesos moleculares de las proteínas empleadas como controles se indican a la izquierda de la figura

Bazo

Fracción Rango Mr kDa	Control		Experimental	
	X CPM	DS	X CPM	DS
40-33	1315	291	10563	2320
33-28	1948	622	14240	1574
28-23	1362	351	17363	3546
23-20	2883	993	15434	2243
NC	1584	340	3098	708
RPMI	1077	75	1723	496

Nódulos linfoides mesentéricos

Fracción Rango Mr kDa	Control		Experimental	
	X CPM	DS	X CPM	DS
40-33	457	98	12412	3882
33-28	476	104	13361	2130
28-23	470	102	13808	2313
23-20	1202	398	19013	5182
NC	626	145	2638	850
RPMI	399	89	1419	303

Placas de Peyer

Fracción Rango Mr kDa	Control		Experimental	
	X CPM	DS	X CPM	DS
87-73	18073	3235	19920	4259
40-33	460	103	23400	8275
33-28	774	266	6910	302
23-20	7662	2430	8900	2108
NC	640	134	2795	858
RPMI	425	102	1516	172

Tabla 1. Respuesta proliferativa inducida por las fracciones antigénicas de los trofozoitos de *G. lamblia* del aislado UAM-II, sobre las células linfoides de los jerbos no singénicos sin infectar (CONTROL) y de los jerbos no singénicos infectados i.g. con trofozoitos de *G. lamblia* de dicho aislado (EXPERIMENTAL). Las células se obtuvieron 75 días después de iniciar el experimento y los resultados muestran el promedio (X) del triplicado de las cpm y la desviación estándar (DS), obtenidas al incubar los cultivos durante 18 horas con timidina [³H] usada como marcador de proliferación celular. Así mismo se muestran los valores basales de la radioactividad del control de papel de nitrocelulosa (NC) y del medio de cultivo RPMI, así como, el rango de peso molecular relativo (Mr) expresado en kilodaltones (kDa) de las fracciones antigénicas que evocaron la respuesta proliferativa de las células linfoides de bazo, nódulos linfoides mesentéricos y de las placas de Peyer. Esta respuesta fue considerada positiva si el valor X de la fracción fue mayor al valor de X más 4 DS del control de NC respectivo. Sólo se tomaron en cuenta aquellas fracciones cuyo valor de DS fue igual o menor al 35% de su valor X (130).

Resultados

Bazo

Fracción Rango Mr kDa	Control		Experimental	
	X CPM	DS	X CPM	DS
87-73	1580	261	11620	2971
73-62	2080	726	7964	893
46-40	1076	94	14460	4407
40-33	1491	201	10048	1830
33-28	463	124	13340	4094
NC	1269	186	3273	946
RPMI	908	178	1558	258

Nódulos linfoides mesentéricos

Fracción Rango Mr kDa	Control		Experimental	
	X CPM	DS	X CPM	DS
73-62	739	205	10843	1599
62-54	808	206	7040	1405
46-40	862	270	5630	360
40-33	714	162	8975	1289
33-28	869	215	6787	1692
20-17	739	203	6040	763
NC	616	201	2606	618
RPMI	309	95	323	101

Placas de Peyer

Fracción Rango Mr kDa	Control		Experimental	
	X CPM	DS	X CPM	DS
73-62	399	112	6405	1157
46-40	608	113	6796	1327
40-33	450	104	7697	1290
33-28	589	182	6678	1871
28-23	1407	177	4816	1233
23-20	1414	209	4592	1001
20-17	2048	293	3780	719
NC	634	127	1400	406
RPMI	327	106	1207	309

Tabla 2. Respuesta proliferativa inducida por las fracciones antigénicas de los trofozoitos de *G. lamblia* de la clona C5, sobre las células linfoides de los jerbos singénicos sin infectar (CONTROL) y de los jerbos singénicos infectados i.g. con trofozoitos de *G. lamblia* de dicha clona (EXPERIMENTAL). Las células linfoides se obtuvieron 75 días después de iniciar el experimento y los resultados muestran el promedio (X) del triplicado de las cpm y la desviación estándar (DS), obtenidas al incubar los cultivos durante 18 horas con timidina [³H] usada como marcador de proliferación celular. Así mismo se muestran los valores basales de la radioactividad del control de papel de nitrocelulosa (NC) y del medio de cultivo RPMI, así como, el rango de peso molecular relativo (Mr) expresado en kilodaltones (kDa) de las fracciones antigénicas que evocaron la respuesta proliferativa de las células linfoides de bazo, nódulos linfoides mesentéricos y de las placas de Peyer. Esta respuesta fue considerada positiva si el valor X de la fracción fue mayor al valor de X más 4 DS del control de NC respectivo. Sólo se tomaron en cuenta aquellas fracciones cuyo valor de DS fue igual o menor al 35% de su valor X (130).

Resultados

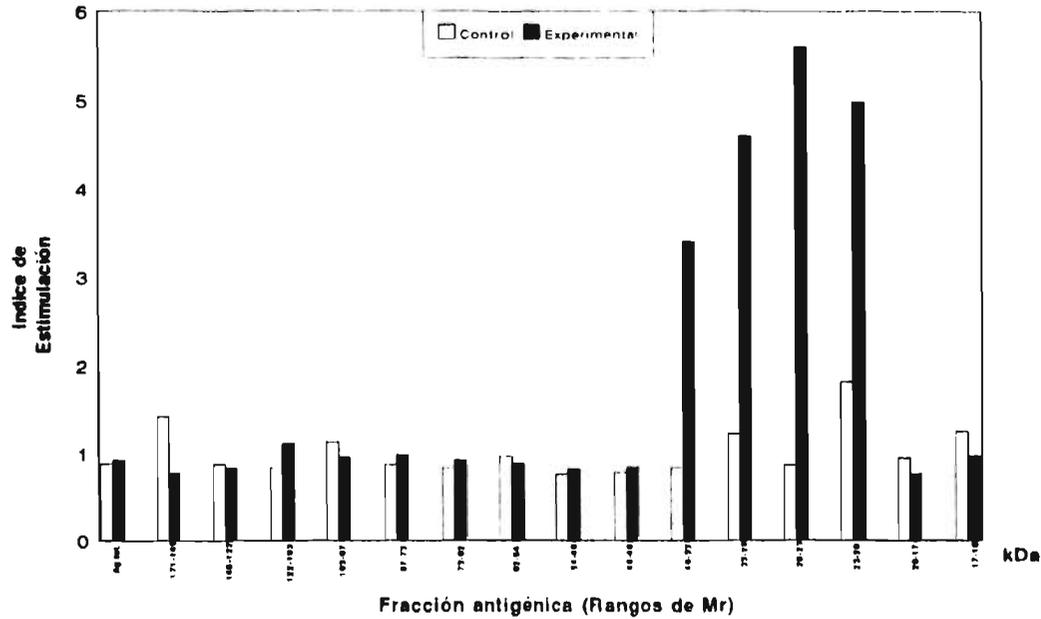


Figura 12. Índices de estimulación de cultivos de células linfoides de bazo de jerbos no singénicos, obtenidos al adicionar fracciones antigénicas de trofozoitos de *G. lamblia* UAM-II. En el eje de las ordenadas se señala el índice de estimulación (I.E.) y en el eje de las abscisas el rango de peso molecular relativo (Mr) expresado en kilodaltones (kDa) de las 15 fracciones ensayadas. El tope de las barras señala el I.E. de las células de los jerbos del grupo control (barras blancas) y del grupo experimental (barras negras) obtenido al probar individualmente las 15 fracciones y el control de Ag. tot. El valor del I.E. de este último corresponde a la concentración de 10 μ g de proteína del ECM de los trofozoitos. Todos los antígenos probados fueron preparados de acuerdo a lo descrito en Material y Métodos.

Resultados

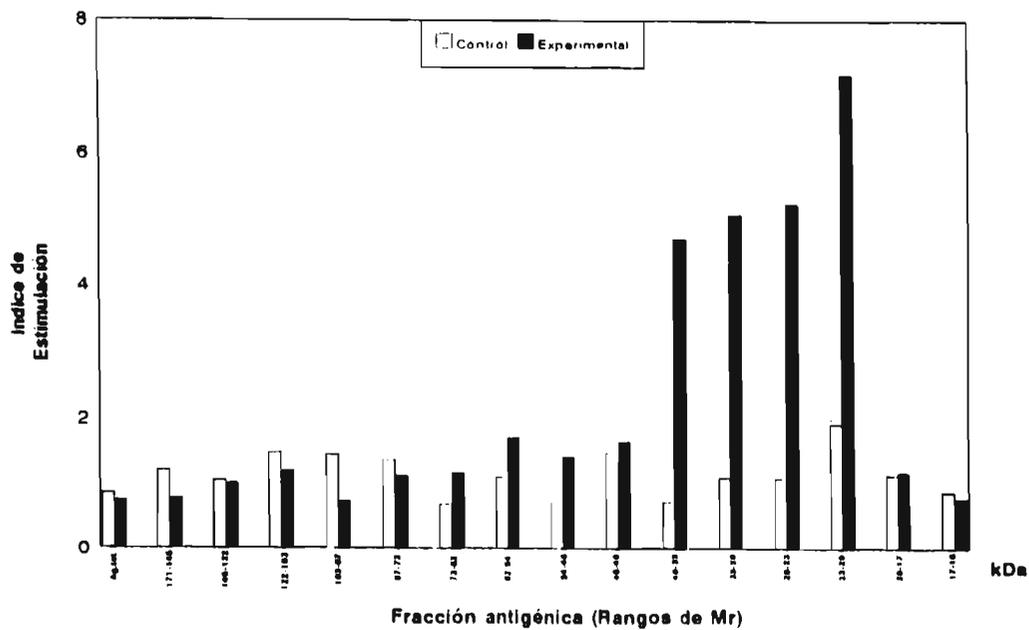


Figura 13. Índices de estimulación de cultivos de células de nódulos linfoides mesentéricos de jerbos no singénicos, obtenidos al adicionar fracciones antigénicas de trofozoitos de *G. lamblia* UAM-II. En el eje de las ordenadas se señala el índice de estimulación (I.E.) y en el eje de las abscisas el rango de peso molecular relativo (Mr) expresado en kilodaltones (kDa) de las 15 fracciones ensayadas. El tope de las barras señala el I.E. de las células de los jerbos del grupo control (barras blancas) y del grupo experimental (barras negras) obtenido al probar individualmente las 15 fracciones y el control de Ag.tot. El valor del I.E. de este último corresponde a la concentración de 10 μ g de proteína del ECM de los trofozoitos. Todos los antígenos probados fueron preparados de acuerdo a lo descrito en Material y Métodos.

Resultados

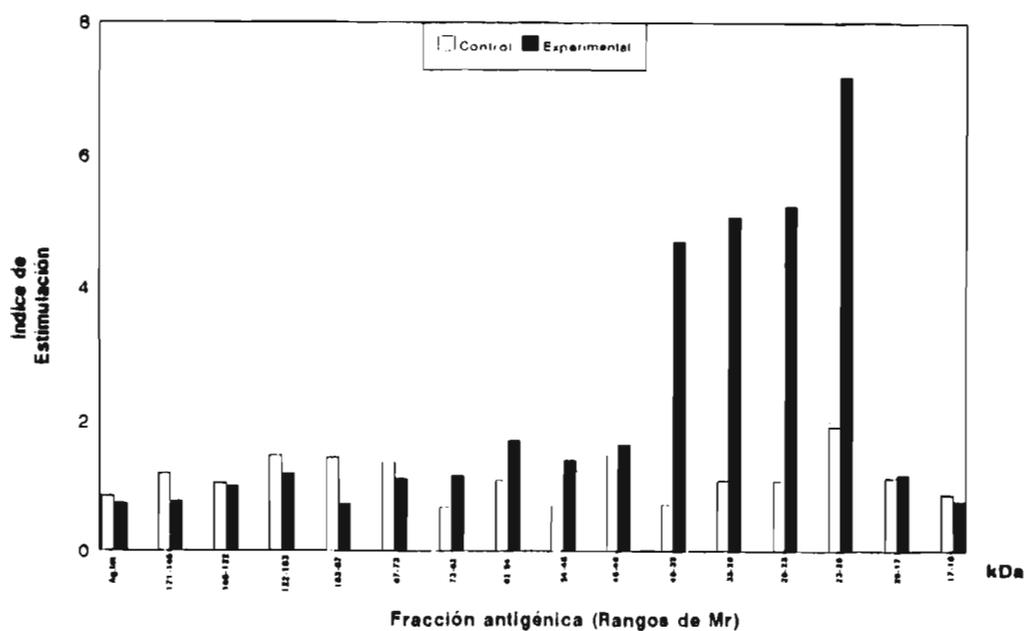


Figura 13: Índices de estimulación de cultivos de células de nódulos linfoides mesentéricos de jerbos no singénicos, obtenidos al adicionar fracciones antigénicas de trofozoitos de *G. lamblia* UAM-II. En el eje de las ordenadas se señala el índice de estimulación (I.E.) y en el eje de las abscisas el rango de peso molecular relativo (Mr) expresado en kilodaltones (kDa) de las 15 fracciones ensayadas. El tope de las barras señala el I.E. de las células de los jerbos del grupo control (barras blancas) y del grupo experimental (barras negras) obtenido al probar individualmente las 15 fracciones y el control de Ag.tot. El valor del I.E. de este último corresponde a la concentración de 10 µg de proteína del ECM de los trofozoitos. Todos los antígenos probados fueron preparados de acuerdo a lo descrito en Material y Métodos.

Resultados

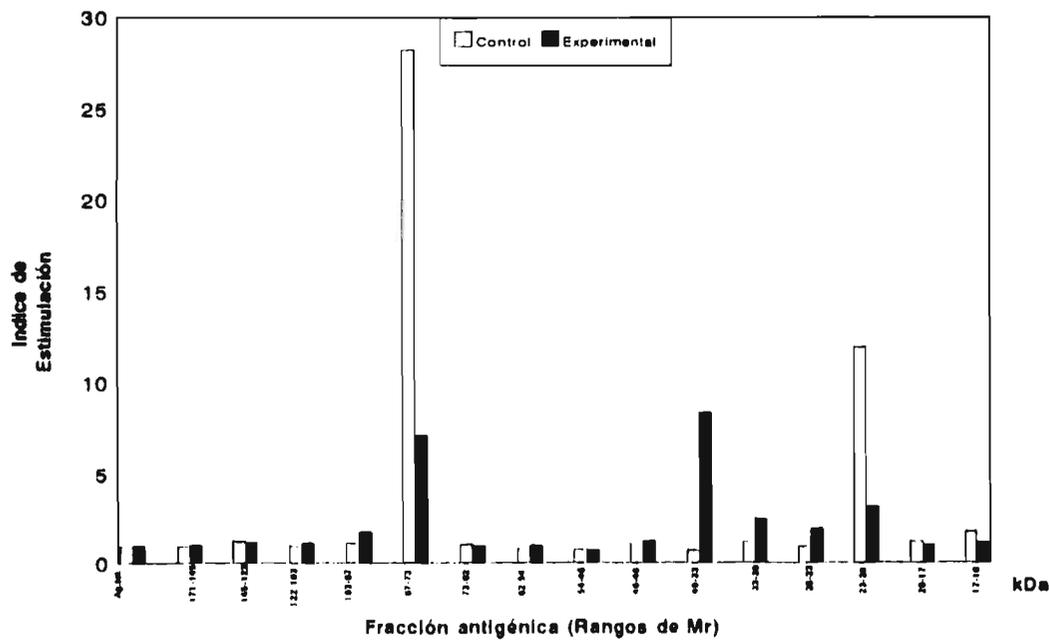


Figura 14. Índices de estimulación de cultivos de células linfoides de placas de Peyer de jerbos no singénicos, obtenidos al adicionar fracciones antigénicas de trofozoitos de *G. lamblia* UAM-II. En el eje de las ordenadas se señala el índice de estimulación (I.E.) y en el eje de las abscisas el rango de peso molecular relativo (Mr) expresado en kilodaltones (kDa) de las 15 fracciones ensayadas. El tope de las barras señala el I.E. de las células de los jerbos del grupo control (barras blancas) y del grupo experimental (barras negras) obtenido al probar individualmente las 15 fracciones y el control de Ag.tot. El valor del I.E. de este último corresponde a la concentración de 10 µg de proteína del ECM de los trofozoitos. Todos los antígenos probados fueron preparados de acuerdo a lo descrito en Material y Métodos.

Resultados

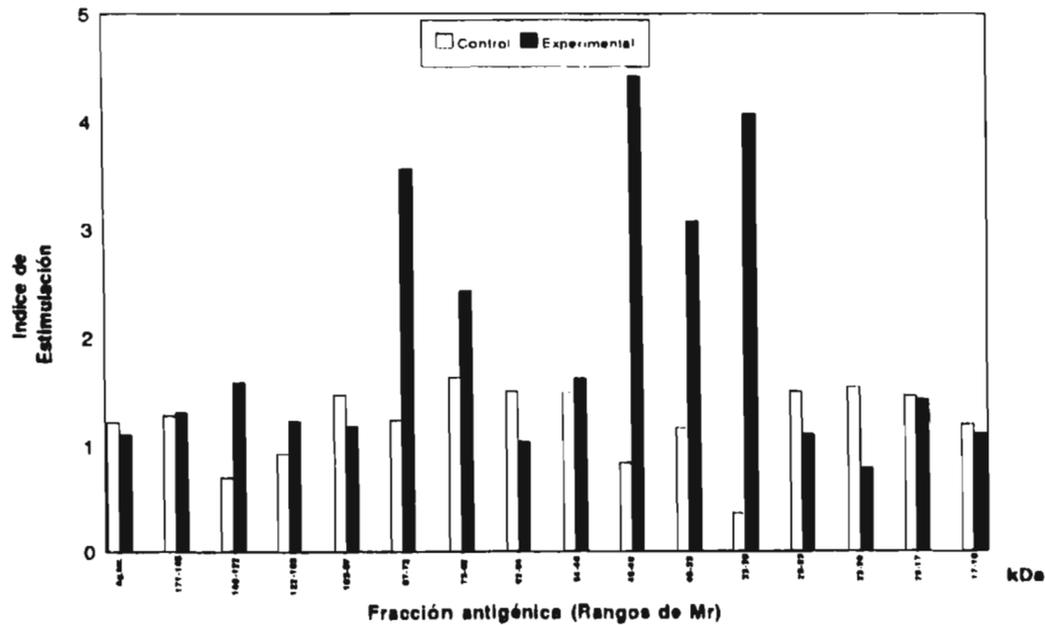


Figura 15. Índices de estimulación de cultivos de células linfoides de bazo de jerbos singénicos, obtenidos al adicionar fracciones antigénicas de trofozoitos de *G. lamblia* de la clona C5. En el eje de las ordenadas se señala el índice de estimulación (I.E.) y en el eje de las abscisas el rango de peso molecular relativo (Mr) expresado en kilodaltones (kDa) de las 15 fracciones ensayadas. El tope de las barras señala el I.E. de las células de los jerbos del grupo control (barras blancas) y del grupo experimental (barras negras) obtenido al probar individualmente las 15 fracciones y el control de Ag.tot. El valor del I.E. de este último corresponde a la concentración de 10 µg de proteína del ECM de los trofozoitos. Todos los antígenos probados fueron preparados de acuerdo a lo descrito en Material y Métodos.

Resultados

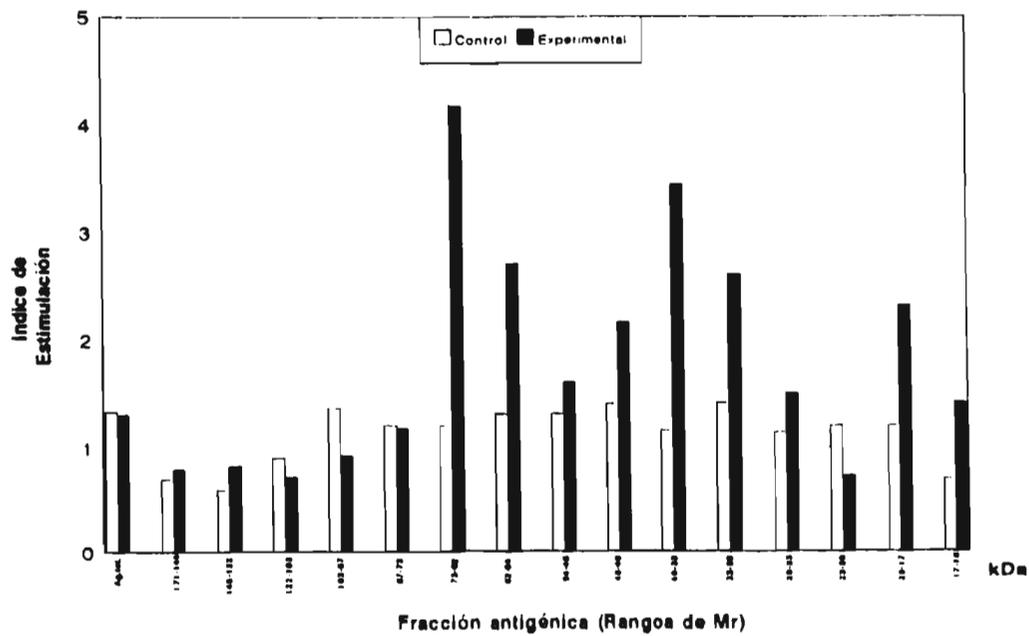


Figura 16. Índices de estimulación de cultivos de células de nódulos linfoides mesentéricos de jerbos singénicos, obtenidos al adicionar fracciones antigénicas de trofozoitos de *G. lamblia* de la clona C5. En el eje de las ordenadas se señala el índice de estimulación (I.E.) y en el eje de las abscisas el rango de peso molecular relativo (Mr) expresado en kilodaltones (kDa) de las 15 fracciones ensayadas. El tope de las barras señala el I.E. de las células de los jerbos del grupo control (barras blancas) y del grupo experimental (barras negras) obtenido al probar individualmente las 15 fracciones y el control de Ag.tot. El valor del I.E. de este último corresponde a la concentración de 10 µg de proteína del ECM de los trofozoitos. Todos los antígenos probados fueron preparados de acuerdo a lo descrito en Material y Métodos.

Resultados

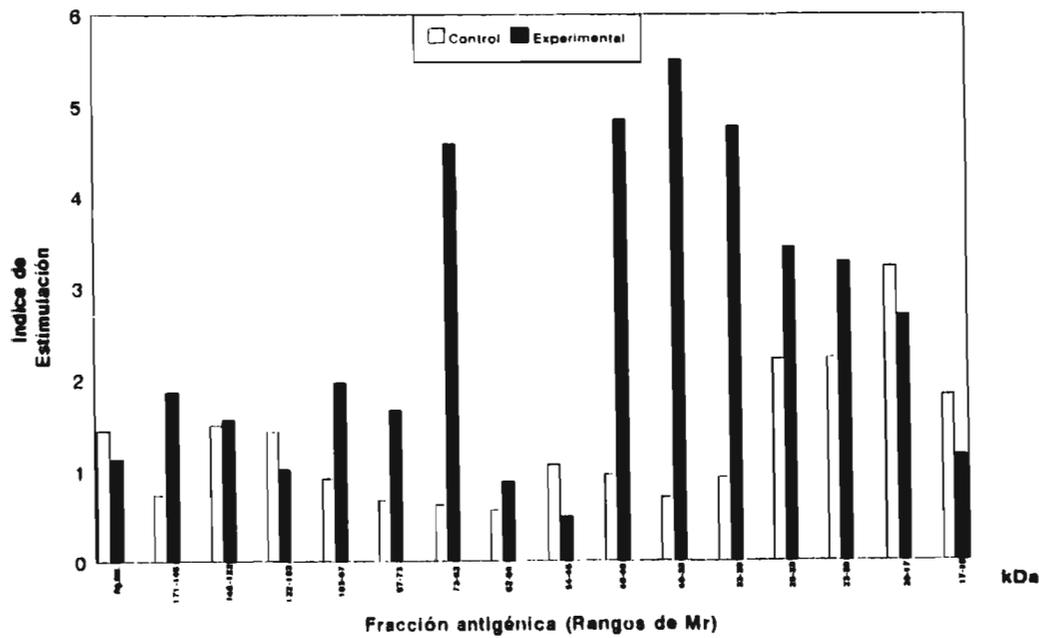


Figura 17. Índices de estimulación de cultivos de células linfoides de placas de Peyer de jerbos singénicos, obtenidos al adicionar fracciones antigénicas de trofozoitos de *G. lamblia* de la clona C5. En el eje de las ordenadas se señala el índice de estimulación (I.E.) y en el eje de las abscisas el rango de peso molecular relativo (Mr) expresado en kilodaltos (kDa) de las 15 fracciones ensayadas. El tope de las barras señala el I.E. de las células de los jerbos del grupo control (barras blancas) y del grupo experimental (barras negras) obtenido al probar individualmente las 15 fracciones y el control de Ag.tot. El valor del I.E. de este último corresponde a la concentración de 10 µg de proteína del ECM de los trofozoitos. Todos los antígenos probados fueron preparados de acuerdo a lo descrito en Material y Métodos.

Discusión

Como resultado de diversos mecanismos de adaptación en el huésped desarrollados a lo largo de su proceso evolutivo (97), *G. lamblia* se caracteriza por ser un parásito habitualmente no invasor que se establece de manera preferencial en el lumen del intestino (136). Esta capacidad colonizadora circunscrita al intestino delgado contribuye a que este organismo patógeno induzca predominantemente una respuesta inmune local implicada en mecanismos de la erradicación intestinal de dicho parásito. (17, 100). Estos mecanismos que al parecer dependen de la activación y proliferación *in vivo* de células linfoides intestinales inducidas por moléculas derivadas por *G. lamblia* (123, 129), pueden estudiarse en el modelo de giardiasis experimental usando jerbos (131), ya que estos animales al igual que el humano, son susceptibles a la infección con *G. lamblia* y además son capaces de resolverla eficientemente (136).

Con base en el modelo de giardiasis experimental en el jervo, en el presente trabajo se logró evaluar en forma comparativa, las fracciones antigénicas de los trofozoitos de *G. lamblia* de la clona C5 y del aislado UAM-II, que estimularon respectivamente una respuesta proliferativa *in vitro* de las células linfoides de jerbos singénicos y no singénicos, que fueron capaces de resolver la giardiasis inducida con los trofozoitos cuyas fracciones antigénicas se probaron en los ensayos de proliferación.

De acuerdo a los resultados presentados en las Figuras 12 a 17 se puede ver que no hubo respuestas proliferativas alogénicas (148), debidas a las diferencias antigénicas de las moléculas del CPH expresadas en las células linfoides de los jerbos no singénicos, puesto que la incorporación de timidina [³H] en el control de RPMI así como en varias fracciones particuladas fue baja (Tablas 1 y 2). Tampoco se observó proliferación de las células linfoides provenientes de los jerbos infectados con ninguno de los controles de antígeno total probados. Aún cuando la ausencia de la respuesta proliferativa del control de antígeno total pudo ser el resultado de un efecto de concentración de dicho antígeno, es posible que esta falta de respuesta haya sido generada por la mayor representación de moléculas que promovieron la inhibición de respuestas proliferativas en relación con aquellas que evocaron proliferación dando como resultado final un efecto predominantemente supresor de dicho control (comunicación personal de la Dra. Emma I. Melendro).

En contraste con la ausencia total de la respuesta linfoproliferativa de las células ante el control de antígeno total particulado, se pudo observar que las fracciones de 40-33 kDa y 33-28 kDa de los trofozoitos de *G. lamblia* del aislado UAM-II y de la clona C5, estimularon la proliferación de las células de todos los órganos linfoides aislados de los jerbos del grupo experimental correspondiente (Tablas 1 y 2). Esto sugiere que dichas fracciones contenían moléculas de la misma especificidad antigénica, al parecer inmunodominantes, expresadas tanto en los trofozoitos de *G. lamblia* del aislado UAM-II como en la clona C5.

Con excepción de las fracciones antigénicas de 40-33 kDa y 33-28 kDa, que dieron lugar a una respuesta linfoproliferativa que coincidió en ambas cepas de jerbos infectados, se observó una

gran diversidad de la respuesta linfoproliferativa entre el aislado UAM-II y la clona C5, que se reflejó no solo en cuanto al número de fracciones que dieron lugar a la estimulación sino en otros aspectos como 1) la estimulación selectiva de las células linfoides de bazo y nódulos mesentéricos de los jerbos singénicos infectados con las fracciones de la clona C5 de 87-73 kDa y de 62-55 kDa respectivamente; 2) la estimulación de las células linfoides aisladas de los jerbos infectados con las fracciones de 73-62 kDa y de 46-40 kDa de la clona C5 (Tabla 2) las cuales contribuyeron a que un mayor número de éstas promovieran una respuesta proliferativa sobre todas las células linfoides de los jerbos singénicos infectados en comparación con las dos únicas fracciones de 40-33 kDa y 33-28 kDa (Tabla 1) del aislado UAM-II que dieron lugar a la estimulación de las células de jerbos no singénicos infectados.

Esta gama de respuesta observada entre estos dos grupos de jerbos infectados fue generada quizás por la diversidad antigénica de las moléculas del CPH que pudieron contribuir a que la representación de los linfocitos T no respondedores de los animales no singénicos del grupo experimental fuese mayor que la población de linfocitos reactivos dando como resultado final una respuesta proliferativa predominantemente negativa ante las fracciones antigénicas que si estimularon la respuesta de las células linfoides de los jerbos singénicos infectados (Tabla 1 y 2).

Por otro lado, pudo ser el resultado de las diferencias en la concentración y/o expresión de antígenos contenidos en las fracciones antigénicas, puesto que se han demostrado cambios en la expresión de antígenos de *G. lamblia* *in vitro* (142) e *in vivo* (147). Estas divergencias en la expresión de antígenos se manifestaron al parecer en el ensayo de proliferación, pero no se pudieron observar en el gel donde se separaron electroforéticamente los ECM de los trofozoitos de *G. lamblia* del aislado UAM-II y de la clona C5 (Figura 10). Esto último pudo deberse a que el método de tinción con azul de Coomassie de las bandas separadas no fue lo suficientemente sensible para revelar las diferencias en la expresión de proteínas de dichos parásitos, las cuales pudieron haber sido detectadas al utilizar el método de tinción argéntica, mediante el cual ha sido posible distinguir perfiles de expresión de proteínas diferentes entre dos clones de trofozoitos de *G. lamblia* (141). Además cabe la posibilidad de que aún cuando las proteínas presentes en estas fracciones se expresaron en forma similar es factible que hayan sido antigénicamente diferentes.

Junto con la diversidad antigénica tanto del CPH como de los trofozoitos, la reactividad heterogénea de las células linfoides de los órganos estudiados en ambas cepas de jerbos del grupo experimental pudo surgir también como consecuencia de la absorción diferencial de antígenos de los trofozoitos de *G. lamblia* del aislado y de la clona en el intestino de los animales de las dos cepas estudiadas. Esto último se basa en que, a pesar de ser un parásito eminentemente no invasor, *G. lamblia* puede evocar la respuesta sistémica del huésped al liberar en el lumen intestinal, moléculas de su mosaico antigénico que al absorberse a nivel de la mucosa, pueden alcanzar la circulación (35) a través de la vena porta, hasta llegar a los órganos linfoides periféricos como bazo, para dar lugar a la activación y proliferación de las células presentes en dichos órganos.

Otro proceso fisiológico que pudo contribuir también a la diversidad de la respuesta proliferativa de las células linfoides de los jerbos infectados en ambas cepas, implica la migración y localización diferencial de las células de memoria generadas en las placas de Peyer, como consecuencia de la estimulación primaria *in vivo* de células linfoides con antígenos lumbales liberados en el microambiente, una vez ocurrido el establecimiento de *G. lamblia* en el intestino de los animales infectados (71). Aunque existen datos contradictorios, se ha propuesto que en términos generales, los antígenos lumbales liberados por organismos habitualmente no invasores como *G.*

lamblia, inducen predominantemente la activación de las células linfoides de las placas de Peyer en donde se generan células de memoria las cuales pueden circular indefinidamente dependiendo de las condiciones del microambiente intestinal. Se ha observado que estas células de memoria empiezan a circular tres semanas después de su generación (71) y eventualmente migran hacia los nódulos linfoides mesentéricos para establecerse de modo preferencial en la lámina propia de los órganos mesentéricos (49). De acuerdo a esto último, se podría sugerir que como consecuencia de la migración de las células de memoria generadas en las placas de Peyer ocurrida alrededor del 75 día p.i., se redujo el número de estas poblaciones celulares presentes en las placas de Peyer de los animales infectados. Esto daría lugar a que un menor número de fracciones antigénicas indujera la respuesta proliferativa *in vitro* de las células linfoides de las placas de Peyer. En comparación con lo anterior, puede observarse que las células de bazo y nódulos linfoides mesentéricos de estos jerbos no singénicos infectados fueron estimuladas con una mayor cantidad de fracciones antigénicas del aislado UAM-II (Tabla 1) lo cual sugiere que las poblaciones celulares de memoria reactivas contra esas fracciones se establecieron eficientemente en dichos órganos alrededor del 75º día p.i.

Esto último contrasta con los datos presentados en la Tabla 2 en la cual puede observarse que las células de las placas de Peyer de los jerbos singénicos infectados respondieron a las fracciones de la clona C5 que estimularon la respuesta proliferativa de las células linfoides del bazo y nódulos solamente del grupo de jerbos infectados. Lo anterior sugiere que aparentemente hacia el 75 día p.i. había células de memoria reactivas hacia estas fracciones de la clona C5 en las placas de Peyer de estos animales singénicos y además su migración y establecimiento hacia el bazo y nódulos linfoides mesentéricos fue eficiente.

Por otra parte, en este trabajo se observó una respuesta proliferativa de las células linfoides de las placas de Peyer del grupo control de jerbos de ambas cepas lo cual coincide con lo reportado en otro trabajo basado en el modelo murino de giardiasis neonatal, en el cual se encontró una respuesta proliferativa de linfocitos T CD4+ aislados de las placas de Peyer de los ratones del grupo control ante fracciones de 80, 30 y 17 kDa obtenidos de trofozoitos de *G. lamblia* de la clona GS (130). Es importante hacer notar que cuando los resultados se expresaron como índices de estimulación, el efecto de las fracciones de 20-17 kDa de la clona C5 (Figura 17) y de 87-73 kDa y de 23-20 kDa de la cepa UAM-II (Figura 14) parece mucho mayor sobre las células de las placas de Peyer de los animales control respecto a los infectados, pero cuando se comparan las cpm obtenidas en estos dos grupos (Tabla 1 y 2) se observa que son similares. Esto se debe a que las cpm basales (en presencia de RPMI o nitrocelulosa solo) de las células linfoides provenientes de los jerbos infectados de ambas cepas fueron más altas que las obtenidas en las células de los animales del grupo control, debido a que las células de los jerbos infectados fueron al parecer estimuladas *in vitro* e *in vivo* por antígenos de *Giardia* que no fueron eliminados por dichos animales antes de llevarse a cabo el ensayo de proliferación. Esta respuesta proliferativa limitada a las células linfoides de las placas de Peyer de los jerbos no infectados, pudo ser el resultado de una escasa o nula migración hacia el bazo y nódulos linfoides mesentéricos de linfocitos sensibilizados con antígenos de reacción cruzada (148) o por la presencia de linfocitos T γ/δ + CD8+ $\alpha\alpha$ + presentes en las placas de Peyer (78) que al diferenciarse pierden la capacidad de recircular a otros órganos (153). Estas células son capaces de reconocer antígenos sin que medie la restricción de las moléculas del CPH (152) y es por ello que reconocen antígenos altamente conservados como ocurre con las proteínas de choque térmico. Los cambios se han demostrado en cultivos de trofozoitos de *G. lamblia* sometidos a cambios bruscos de temperatura de incubación (145, 146) y cuyos pesos moleculares de 30, 65, 70 83 y 100 kDa, que parecen ser de las fracciones antigénicas observadas del aislado y de la clona C5, que estimularon a las células de placas de Peyer de los jerbos del grupo control de ambas cepas.

Discusión

Otros resultados que coinciden con los reportados por otros autores muestran que análogamente a lo observado en este trabajo en donde se observó una respuesta proliferativa con fracciones de cuyo peso molecular máximo fue de 87 kDa, B. Gottstein y cols. (22) reportaron que el peso molecular de las fracciones antigénicas de trofozoitos de *G. lamblia* que promovieron una respuesta proliferativa de los linfocitos de sangre periférica de individuos infectados con *G. lamblia* fue menor a 85 kDa, y al igual a lo observado con el aislado UAM-II y la clona C5, estos autores reportaron que la reactividad de las fracciones antigénicas entre dos clones de trofozoitos de *G. lamblia* fue muy variable.

Por otra parte, otros resultados de la presente investigación difieren de los encontrados en el modelo de giardiasis murina neonatal, utilizando como agente infectante a trofozoitos de *G. lamblia* de la clona GS (130), en cuanto a que en los ratones no hubo una respuesta proliferativa de células linfoides de bazo y nódulos linfáticos periféricos, solamente las células linfoides de las placas de Peyer, fueron capaces de proliferar con fracciones antigénicas de los trofozoitos de *G. lamblia* de dicha clona con fracciones antigénicas de peso molecular entre 200-75 kDa y menores a 50 kDa. Es probable que la ausencia de proliferación de las células linfoides de bazo y nódulos linfoides mesentéricos de los ratones neonatos infectados, haya ocurrido debido a la escasa o nula migración de las células de memoria generadas en las placas de Peyer de estos animales o bien a una deficiente absorción antigénica a nivel intestinal de estos ratones neonatos. Sin embargo, no puede descartar que la especie y edad de los animales influyó en la respuesta proliferativa limitada a las placas de Peyer de los ratones neonatos infectados, ya que en términos generales las células linfoides aisladas en la edad temprana responden menos a la estimulación antigénica en relación con las células obtenidas en la edad adulta.

En contraste con lo observado en las fracciones antigénicas de la clona de trofozoitos de *G. lamblia* GS utilizada en el modelo murino neonatal (130), en el presente trabajo no se encontró una respuesta a fracciones de 200 kDa de peso molecular debido quizás a la variación antigénica que influyó para que la expresión de estas moléculas de 200 kDa en la clona GS haya sido mayor que lo observado en la clona C5 y en aislado UAM-II.

De acuerdo a los resultados preliminares obtenidos en el presente trabajo se puede decir que con base en dos diferentes sistemas de infección experimental utilizando al jervo como animal de experimentación y como agentes infectantes a los trofozoitos de *G. lamblia* del aislado UAM-II y a la clona C5, fue posible observar que las fracciones antigénicas de estos cultivos de trofozoitos, dieron lugar a diferentes perfiles de estimulación de las células linfoides aisladas de varios órganos. También fue posible observar que dos fracciones 40-33 kDa y de 33-28 kDa de los trofozoitos de *G. lamblia* del aislado y de la clona, estimularon la respuesta proliferativa de las células linfoides de tres órganos analizados provenientes de los jervos infectados de ambas cepas.

Estudios futuros podrían ayudar a definir si dentro de este grupo de moléculas de 40-33 kDa y de 33-28 kDa, están presentes antígenos que sean capaces de generar una respuesta de memoria de larga duración tal y como se observó con un antígeno de 31 kDa de los trofozoitos de *G. lamblia* de la clona GS que fue capaz de inducir una respuesta proliferativa de las células T CD4+ de sangre periférica de un sujeto sano adulto, quién adquirió en forma natural una gastroenteritis causada por *G. lamblia* 6 años antes del estudio (22).

También sería interesante evaluar si dichas moléculas inmunodominantes de 40-33 kDa y de 33-29 kDa tienen alguna relación con ciertos antígenos comunes de 33 kDa (151) y de 32 kDa (144) presentes en diversos aislados de trofozoitos de *G. lamblia* que podrían pertenecer a un grupo de moléculas inmunodominantes denominadas giardinas (149) cuyo peso molecular se ubica entre los 29-38 kDa (150).

Discusión

Por otra parte, sería relevante estudiar si estas dos fracciones antigénicas inmunodominantes expresadas en el aislado UAM-II y de la clona C5, están implicadas en la generación de una respuesta inmune humoral local. Si bien en humanos el papel de esta respuesta local humoral en la erradicación luminal del parásito no está muy clara, en ratones infectados con *G. muris* se ha observado que la eliminación intestinal de los trofozoitos está asociada con la presencia de IgA en secreciones intestinales de estos ratones infectados, dirigida contra un antígeno de 30 kDa del parásito (110) cuyo peso molecular se podría ubicar dentro del rango de peso molecular de las fracciones inmunodominantes de 44-33 y 33-28 kDa reportadas en el presente trabajo.

De acuerdo a todo lo antes comentado, se puede concluir que el modelo de giardiasis experimental en jerbo empleado en el presente trabajo, fue útil para evaluar la respuesta linfoproliferativa de células linfoides de los animales infectados ante fracciones antigénicas de los trofozoitos de *G. lamblia*. Estas últimas podrían ser analizadas para caracterizar a la(s) molécula(s) al parecer inmunodominantes, implicadas en inducir la respuesta linfoproliferativa, y prospectivamente estudiar a los genes responsables de la codificación de dicha(s) molécula(s), para confirmar a nivel molecular su papel en la proliferación de las células linfoides implicadas en la reducción parasitaria a nivel intestinal y en la generación de una respuesta de memoria que al parecer participa en protección del huésped frente a la giardiasis sintomática.

Bibliografía

1. Pezzarossi, H.E., y R.A. Blanco. Infecciones entéricas en países en vías de desarrollo. *Enf. Infec. Microb.* 1994; 14:371-382.
2. Cedillo-Rivera, R. ¿Es la giardiasis un problema real? *Bol. Mens. Epidemiol.* 1989; 4:1-6.
3. Bernal, R.M. Giardiasis Cap.6 p. 317-324. En: *Enfermedades Tropicales en México*. INDRE. SSA. México D.F. 1994.
4. Moore, G.T., W.M. Cross, D. McGuire, C.S. Mollohan, N.N. Gleason, G.R. Healy, & L.H. Newton. Epidemic giardiasis at a sky resort. *New. Engl. J. Med.* 1969; 281: 402-407.
5. Istre, G. R., T.S. Dunlop, G.B. Gaspard, & R.S. Hopkins. Waterborne giardiasis at a mountain resort: evidence of acquired immunity. *Am. J. Pub. Health.* 1984; 74: 602-604.
6. Atlas Epidemiológico del IMSS 1985-1990.
7. Tay, J., P.M. Salazar-Schettino, I. de Haro, y A.L. Ruiz. Frecuencia de las protozoosis en México. *Sal. Pub. Méx.* 1978; 20: 297-337.
8. Segura, J., H. Bourges, A. Chávez, R. Ramos, y A. Ysunza. Desnutrición. *Rev. Fac. Med. Méx.* 1978; 21: 4-16.
9. Carrada, T. B. Las parasitosis humanas en México. *Bol. Med. Hosp. Infant. Méx.* 1985; 42: 73-78.
10. Kumate, J. Parasitosis Intestinales. p: 99-109. En: Kumate, J., Gutiérrez, G., Muñoz, O y J.I. Santos (Eds). *Manual de Infectología. Manual Moderno. México D.F. 1990.*
11. Ramirez-Mayans, J., M. Rivera-Echegoyen, M.A. Mora, y L. Saucedo. Principales manifestaciones gastrointestinales de la giardiasis en niños. *Bol. Med. Hosp. Infant. Méx.* 1983; 40: 571-576.
12. Vega-Franco, L. Absorción intestinal en niños con giardiasis. *Bol. Med. Hosp. Infant. Méx.* 1983; 40:598-603.

Bibliografía

13. Vega-Franco, L., E. L. Alvarez, G. Romo, y R. M. Bernal. Absorción de proteínas en niños con giardiasis. Bol. Méd. Hosp. Infant. Méx. 1982; 39 : 19-22
14. Nash, T.E., D.A.Herrington, G.A.Losonsky, & M.M.Levine. Experimental human infections with *Giardia lamblia*. J.Infect. Dis. 1987; 156: 974-984.
15. Gillin, F.D., R.W.Cooper, D.S.Reiner, & S. Das. Secretory defenses against *Giardia lamblia*. Adv. Exp. Med. Biol. 1991; 310: 227-233.
16. Roberts-Thomson, I.C. Genetic studies of human and murine giardiasis. Clin. Infect. Dis. 1993; 16(Suppl 2): S98-S104.
17. Farthing, M.J.G. Host-parasite interactions in human giardiasis. Q.J. Med. 1989; 70: 191-204.
18. Reiner, D.S., Ch.S.Wang, & F.D.Gillin. Human milk kills *Giardia lamblia* by generating toxic lipolytic products. J. Infect. Dis. 1986; 154: 825-832.
19. Das, S., D.S. Reiner, J. Zenian, D.L.Hogan, M.A.Koss, Ch-S.Wuang, & F.D.Gillin. Killing of *Giardia lamblia* trophozoites by human intestinal fluid in vitro. J. Infect. Dis. 1988; 157: 1257-1260.
20. Gault, M.J., F.D.Gillin, & A.J.Zenian. *Giardia lamblia*: Stimulation of growth by human intestinal mucus and epithelial cells in serumfree medium. Exp. Parasitol. 1987; 64: 29-37.
21. Gillin, F.D., D.S.Reiner, & S.E.Boucher. Small-Intestinal factors promote encystation of *Giardia lamblia* In vitro. Infect. Immun. 1988; 56: 705-707.
22. Gottstein, B., N.I. Stocks, G.M. Shearer, & T.E. Nash. Human cellular immune response to *Giardia lamblia*. Infect. 1991; 19: 421-426.
23. Barnes, G.L., & R. Kay. Blood-groups in giardiasis. Lancet 1977; 1: 808.
24. Zisman, M. Blood-Group A and giardiasis. Lancet. 1977; 2: 1285.
25. Roberts-Thomson, I.C., G.F. Mitchell, R.F.Anders, B.D.Tait, P. Kerlin, A. Kerr-Grant, & P. Cavanagh. Genetic Studies in human and murines giardiasis. Gut. 1980; 21: 397-401.
26. Abaza, H., G. Hilal, L. Asser, L. Abdo, & M. El-Sawy. Histocompatibility and immunological studies in giardiasis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 1988, 82:437.

Bibliografía

27. Visvesvara, G.S., P.D. Smith, G. R. Healy, & W. R. Brown. An immunofluorescence test to detect serum antibodies to *Giardia lamblia* Ann. Intern. Med. 1980; 93: 802-805
28. Goka, A.K.J., D.D.K. Rolston, V.I. Mathan, & M.J.G. Farthing. Diagnosis of giardiasis by specific IgM antibody enzyme-linked immunosorbent assay. Lancet. 1986;2: 184-186
29. Pérez, O. M. Lastre, F. Bandera, M. Díaz, i. Domenech, R. Fagundo, D. Torres, C. Finlay, C. Campa, & G. Sierra. Evaluation of the immune response in symptomatic and asymptomatic human giardiasis. Arch. med. Res. 1994; 25: 171-177.
30. Janoff, E.N. y D.N. Taylor, P. Echeverría, M.P. Glode, & M.J. Blaser. Serum antibodies to *Giardia lamblia* by age in populations in Colorado and Thailand. West. J. Med. 1990; 152: 253-256.
31. Gandhi, B. M., P. Buch, M. P. Sharma, M. Irshad, & S.C. Samantray. ELISA for anti-giardia IgM. Lancet 1989; 2: 685.
32. Birkhead, G., E.N. Janoff, R.L. Vogt, & P.D. Smith. Elevated levels of immunoglobulin A to *Giardia lamblia* during a waterborne outbreak of gastroenteritis. J. Clin. Microbiol. 1989; 27: 1707-1710.
33. Anonymous. Battles against Giardia in Gut mucosa. Lancet 1982; 2: 527-528.
34. Ament, M. E., & C. E. Rubin. Relation of giardiasis to abnormal intestinal structure and function in gastrointestinal immunodeficiency syndromes. Gastroenterol. 1972; 62: 216-226.
35. Miotti, P.G., R.H. Gilman, L.K. Pickering, G. Ruiz-Palacios, H.S. Park, & R.H. Yolken. Prevalence of serum and milk antibodies to *Giardia lamblia* in different populations of lactating women. J. Infect. Dis 1985; 152: 1025-1031.
36. denHollandel, N., D. Riley, & D. Befus. Immunology of Giardiasis. Parasitol. Today, 1988; 4: 124-131.
37. Mestecky, J., J.R. McGhee, S.M. Michalek, R.R. Arnold, S.S. Crago, & J.L. Babb. Concept of the local and common mucosal immune response. Adv. Exp. Med. Biol. 1978; 107: 185-191.
38. Islam, A.,B.J. Stoll, I. Ljungström, J. Biswas, H. Nazrul, & G. Hult. *Giardia lamblia* infections in a cohort of Bangladeshi mothers and infants followed for one year. J. Pediatr. 1983; 103: 996-1000.
39. Morrow, A.L., R.R. Reyes, M.S. West, M.L. Guerrero, G. M. Ruiz-Palacios, & L. K. Pickering. Protection against infection with *Giardia lamblia* by breast-feeding in a cohort of Mexican infants. J. Pediatr. 1992; 121: 363-370.

Bibliografía

40. Nayak, N., N.K. Ganguly, B.N.S. Walia, V. Wahi, S.S. Kanwar, & R.C. Mahajan. Specific secretory IgA in the milk of *Giardia lamblia*-infected and uninfected women. *J. Infect. Dis.* 1987; 155: 724-727.
41. Walterspiel, J.N., A.L. Morrow, M. L. Guerrero, G. Ruiz-Palacios, & L.K. Pickering. Secretory anti-*Giardia lamblia* antibodies in human milk: protective effect against diarrhea. *Pediatr.* 1994; 93: 28-31.
42. McGhee, J.R., J. Mestecky, M.T. Dertzbaugh, J.H. Eldridge, M. Hirasawa, & H. Kiyono. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine.* 1992; 10:75-88.
43. Kraehenbuhl J.P., & M.R. Neutra. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol. Revs.* 1992; 72: 853-879.
44. Russell, M., & J. Mestecky. Induction of the mucosal immune response. *Rev. Infect. Dis.* 1988; 10 (Suppl 2): S440-S446.
45. Craig, S.W., & J.J. Cebra. Peyer's patches: An enriched source of precursors for IgA-producing immunocytes in the rabbit. *J. Exp. Med.* 1971; 134: 188-200.
46. Roux, M.E., M. McWilliams, J.M. Phillips-Quagliata, & M.E. Lamm. Differentiation pathway of Peyer's patch precursors of IgA plasma cells in the secretory immune system. *Cell. Immunol.* 1981; 61: 141-153.
47. Wheater. Cap. 14 p: 247. En: Burkitt, H.G., Young, B., & J. W. Heath. (Eds). *Histologia Funcional*. 3ª Edición. Churchill-Livingstone. Madrid. 1993.
48. Yamaguchi, K., & G.I. Schoefl. Blood vessels of the Peyer's patch in the mouse: III. High-Endothelium venules. *Anat. Rec.* 1983; 206: 419-438.
49. Salmi, M., & S. Jalkenen. Regulation of lymphocyte traffic to mucosa-associated lymphatic tissues. *Gastroenterol. Clin. North. Amer.* 1991; 20: 495-510.
50. Ottaway, C.A., H.P. Cheng, & M.L. Bjerknes. Migration of individual lymphocytes into Peyer's patches *in vivo*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1987; 216A: 295-303.
51. Owen, R.L., & A.L. Jones. Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterol.* 1974; 66: 189-203.
52. Wolf, J.L., & W.A. Bye. The membranous epithelial (M) cell and the mucosal immune system. *Ann. Rev. Med.* 1984; 35: 95-112.

Bibliografia

- 53.** Butcher, E.C., R.V. Rouse, R.L. Coffman, C.N. Nottenburg, R.R. Hardy, & I.L. Weissman. Surface phenotype of Peyer's patch germinal center cells: implications for the role of germinal centers in B cell differentiation. *J. Immunol.* 1982; 129: 2698-2707.
- 54.** Liu, Y-J., G.D. Johnson, J. Gordon, & I.C.M. MacLennan. Germinal centers in T-cell-dependent antibody responses. *Immunol. Today.* 1992; 13: 17-21.
- 55.** Mayrhofer, G., C.W. Pugh, & N. Barclay. The distribution, ontogeny and origin in the rat of Ia-positive cells with dendritic morphology and of Ia antigen in epithelia, with special reference to the intestine. *Eur. J. Immunol.* 1983; 13: 112-122.
- 56.** Ermak, T.H., & R.L. Owen. Differential distribution of lymphocytes and accessory cells in mouse Peyer's patches. *Anat. Rec.* 1986; 215: 144-152.
- 57.** McGhee, J.R., J. Mestecky, Ch. O. Olson, & H. Kiyono. Regulation of IgA synthesis and immune response by T cells and interleukins. *J. Clin. Immunol.* 1989; 9: 175-199.
- 58.** Mackay, CH.R. Homing of naive, memory and effector lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 1993; 5: 423-427.
- 59.** Xu-Amano, J., K.W. Beagley, J. Mega, K. Fujihashi, H. Kiyono, & J.R. McGhee. Induction of T helper cells and cytokines for mucosal IgA responses. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1992; 327: 107-111
- 60.** McClugage, S.G., F.N. Low, & M.L. Zimny. Porosity of the basement membrane overlying Peyer's patches in rats and monkeys. *Gastroenterol.* 1986; 91: 1128-1133.
- 61.** Bjerke, K., P. Brandtzaeg, & O. Fausa. T cell distribution is different in follicle-associated epithelium of human Peyer's patches and villous epithelium. *Clin. Exp. Immunol.* 1988; 74: 270-275.
- 62.** Liu, L.M., & G.G. MacPherson. Antigen acquisition by dendritic cells: intestinal dendritic cells acquire antigen administered orally and can prime naive T cells in vivo. *J. Exp. Med.* 1993; 177: 1299-1307.
- 63.** Knight, S.C., & A.J. Stagg. Antigen-presenting cell types. *Curr. Opin. Immunol.* 1993; 5: 374-382.
- 64.** Spalding, D.M., W.J. Koopman, J.H. Eldridge, J.R. McGhee, & R.M. Steinman. Accessory cells in murine Peyer's patch. I. Identification and enrichment of a functional dendritic cell. *J. Exp. Med.* 1983; 157: 1646-1659.
- 65.** Spalding, D.M., S.I. Williamson, W.J. Koopman, & J.R. McGhee. Preferential induction of polyclonal IgA secretion by murine Peyer's patch dendritic cell-T cell mixtures. *J. Exp. Med.* 1984; 160: 941-946.

Bibliografia

- 66.** Xu-Amano, J., W.K. Aicher, T. Taguchi, H. Kiyono, & J.R. McGhee. Selective induction of Th2 cells in murine Peyer's patches by oral immunization. *Intern. Immun.* 1992; 4: 433-435.
- 67.** Kawanishi, H., L.E. Saltzman, & W. Strober. Mechanisms regulating IgA class-specific immunoglobulin production in murine gut-associated lymphoid tissues. I. T cells derived from Peyer's patches that switch sIgM B cells to sIgA B cells in vitro. *J. Exp. Med.* 1983; 157: 433-450.
- 68.** Mosmann, T.R., & R.L. Coffman. Two types of mouse T helper T cell clone: implications for immune regulation. *Immunol. Today.* 1987; 3: 223.
- 69.** Karasuyama, H., A. Rolink, & F. Melchers. Recombinant interleukin 2 or 5, but not 3 or 4, induces maturation of resting mouse B lymphocytes and propagates proliferation of activated B cell blast. *J. Exp. Med.* 1988; 167: 1377-1390.
- 70.** Sonada, E., R. Matsumoto, Y. Hitoshi, T. Ishii, M. Sugimoto, S. Araki, A. Tominaga, N. Yamaguchi, & N. Takatsu. Transforming growth factor β induces IgA production and acts additively with IL-5 for IgA production. *J. Exp. Med.* 1989; 170:1415-1420.
- 71.** McGhee, J.R., & H. Kiyono. Mucosal immunity to vaccines: current concepts for vaccine development and immune response analysis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1992; 327: 3-12.
- 72.** Sprent, J. Lifespans of naive, memory and effector lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 1993; 5: 433-438.
- 73.** Jeurissen, S.H.M., G. Kraal, & T. Sminia. The role of Peyer's patches in intestinal humoral immune responses is limited to memory formation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1987; 216A: 257-265.
- 74.** Lebman, D.A., P.M. Griffin, & J.J. Cebra. Relationship between expression of IgA by Peyer's patch cells and functional IgA memory cells. *J. Exp. Med.* 1987; 166:1405-1418.
- 75.** Tseng, J. Migration of Peyer's patch IgA precursor cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1987; 216 A: 287-294.
- 76.** Jeurissen, S.H.M., A.M. Duijvestijn, Y. Sontag, & Kraal. Lymphocyte migration into lamina propria of the gut is mediated by specialized HEV-like blood vessels. *Immunol.* 1987; 62: 273-277.
- 77.** McWilliams, M., J.M. Phillips-Quagliata, & M.E. Lamm. Mesenteric lymph node B lymphoblasts which home to the small intestine are precommitted to IgA synthesis. *J. Exp. Med.* 1977; 145: 866-875.
- 78.** Staats, H. F., R.J. Jackson, M. Marinaro, I. Takahashi, H. Kiyono, & J.R. McGhee. Mucosal immunity to infection with implications for vaccine development. *Curr. Opin. Immun.* 1994; 6: 572-583.

Bibliografia

- 79.** Tseng, J. A population of resting IgM-IgD double-bearing lymphocytes in Peyer's patches: The major precursor cells for IgA plasma cells in the gut lamina propria. *J. Immunol.* 1984; 132: 2730-2735.
- 80.** Stevens, S.K., I.L. Weissman, & E.C. Butcher. Differences in the migration of B and T lymphocytes: organ-selective localization *in vivo* and the role of lymphocyte endothelial cell recognition. *J. Immunol.* 1982; 128: 844-851.
- 81.** Kraal, G., I.L. Weissman, & E.G. Butcher. Differences in *in vivo* distribution and homing of T cell subsets to mucosal vs nonmucosal lymphoid organs. *J. Immunol.* 1983; 130: 1097-1102.
- 82.** Weisz-Carrington, P., S. Emancipator, & P.R. Kelemen. Specific attachment of mesenteric IgA lymphoblasts to specialized endothelium of intestinal mucosa lamina propria capillaries. *Cell. Immunol.* 1991; 132: 494-504.
- 83.** Carlson, J.R., M.F. Heyworth, & R.L. Owen. Response of Peyer's patch lymphocyte subsets to *Giardia muris* infection in BALB/c mice. I. T-cell subsets. *Cell. Immunol.* 1986; 97: 44-50.
- 84.** Targan, R.S. The lamina propria: a dynamic, complex mucosal compartment. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1992; 664: 61-68.
- 85.** Hamann, A., D.P. Andrew, D. Jablonski-Westrich, B. Holzmann, & E.C. Butcher. Role of the $\alpha 4$ integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues *in vivo*. *J. Immunol.* 1994; 152: 3282-3295.
- 86.** Picker, L.J. Control of lymphocyte homing. *Curr. Opin. Immunol.* 1994; 6: 394-406
- 87.** Mackay, Ch.R. T-cell memory: Connection between function, phenotype and migration pathways. *Immunol. Today.* 1991; 12: 189-192.
- 88.** Law, Ch.L., & E.A. Clark. Cell-cell interactions that regulate the development of B-lineage cells. *Curr. Opin. Immunol.* 1994; 6: 238-247.
- 89.** Akbar, A.N., M. Salmon, & G. Janossy. The synergy between naive and memory T cells during activation. *Immunol. Today.* 1991; 12: 184-188.
- 90.** Bienenstock, J., & A.D. Befus. Mucosal Immunology. *Immunol.* 1980; 41: 249-270
- 91.** Guy-Grand, D., C. Griscelli, & P. Vassalli. The gut-associated lymphoid system: nature and properties of the large dividing cells. *Eur. J. Immunol.* 1974; 4:435-443.
- 92.** Husband, A.J., & J.L. Gowans. The origin and antigen-dependent distribution of IgA-containing cells in the intestine. *J. Exp. Med.* 1978; 148: 1146-1160.

Bibliografia

93. Childers, N.K., M.G. Bruce, & J.R. McGhee. Molecular mechanisms of immunoglobulin A defense. *Ann. Rev. Microbiol.* 1989; 43: 503-536.
94. Roberts-Thomson, I.C., D.P. Stevens, A.A.F. Mahmoud, & K.S. Warren. Giardiasis in mice: An animal model. *Gastroenterol.* 1976; 71: 57-61.
95. Smith, P.D. Pathophysiology and immunology of giardiasis. *Ann. Rev. Med.* 1985; 36: 295-307.
96. Thompson, R.C.A., & J.A. Reynoldson. *Giardia* and Giardiasis. *Adv. Parasitol.* 1993; 32: 71-160.
97. Owen, R.L., P.C. Nemanic, & D.P. Stevens. Ultrastructural observations on giardiasis in a murine model. I. Intestinal distribution, attachment, and relationship to the immune system of *Giardia muris*. *Gastroenterol.* 1979; 76: 757-769.
98. Nash, T.E., F.D. Gillin, & P.D. Smith. Excretory-Secretory products of *Giardia lamblia*. *J. Immunol.* 1983; 131: 2004-2010.
99. Kaplan, B.S., S. Uni, M. Aikawa, & A.A.F. Mahmoud. Effector mechanism of host resistance in murine giardiasis: specific IgG and IgA cell-mediated toxicity. *J. Immunol.* 1985; 134: 1975-1981.
100. Farthing, M.J.G. Immunopathology of Giardiasis. Springer. *Semin. Immunopathol.* 1990; 12: 269-282.
101. Snider, D.P., & B.J. Underdown. Quantitative and temporal analyses of murine antibody response in serum and gut secretions to infection with *Giardia muris*. *Infect. Immun.* 1986; 52: 271-278.
102. Heyworth, M.F. Relative susceptibility of *Giardia muris* trophozoites to killing by mouse antibodies of different isotypes. *J. Parasitol.* 1992; 78: 73-76.
103. Snider, D.P., D. Skea, & B.J. Underdown. Chronic giardiasis in B-cell-deficient mice expressing the *xid* gene. *Infect. Immun.* 1988; 56: 2838-2842.
104. Heyworth, M.F., J.E. Kung, & A.B. Caplin. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Giardia*-specific IgA in mouse intestinal secretions. *Parasit. Immunol.* 1988; 10: 713-717.
105. Heyworth, M.F. Antibody response to *Giardia muris* trophozoites in mouse intestine. *Infect. Immun.* 1986; 52: 568-571.
106. Andrews, J.S., & E.L. Hewlett. Protection against infection with *Giardia muris* by milk containing antibody to *Giardia*. *J. Infect. Dis.* 1981; 143: 242-246.

Bibliografía

- 107.** Heyworth, M.F., R.L. Owen, W.E. Seaman, F.W. Schaefer, & A.L. Jones. Harvesting of leukocytes from intestinal lumen in murine giardiasis and preliminary characterization of these cells. *Dig. Dis. Sci.* 1985; 30: 149-153.
- 108.** Belosevic, M., & G.M. Faubert. Lysis and immobilization of *Giardia muris* trophozoites *in vitro* by immune serum from susceptible and resistant mice. *Parasite. Immunol.* 1987; 9: 11-19.
- 109.** O'Shea-Alvarez, M.S., A. González-Robles, B. Chávez, & R. Cedillo-Rivera. Ultrastructural localization of *Giardia lamblia* antigens by human IgA and IgG. *Arch. Med. Res.* 1994; 25: 407-412.
- 110.** Heyworth, M.F., & J. Pappo. Recognition of a 30,000 MW antigen of *Giardia muris* trophozoites by intestinal IgA from *Giardia*-infected mice. *Immunol.* 1990; 70: 535-539.
- 111.** Heyworth, M.F., & J.A. Vergara. *Giardia muris* trophozoite antigenic targets for mouse intestinal IgA antibody. *J. Infect. Dis.* 1994; 169: 395-398.
- 112.** Gottstein, B., P. Deplazes, & I. Tanner. *In vitro* synthesized immunoglobulin A from nu/+ and reconstituted nu/nu mice against a dominant surface antigen of *Giardia lamblia*. *Parasitol. Res.* 1993; 79: 644-648.
- 113.** Farthing, M.J.G., M.E.A. Pereira, & G. T. Keush. Description and characterization of a surface lectin from *Giardia lamblia*. *Infect. Immun.* 1986; 51: 661-667.
- 114.** Upadhyay, P., N.K. Ganguly, B.N.S. Walia, & R.C. Mahajan. Kinetics of lymphocyte sub-population in intestinal mucosa of protein deficient *Giardia lamblia* infected mice. *Gut.* 1986; 27: 386-391.
- 115.** Heyworth, M.F., R.L. Owen, & A.L. Jones. Comparison of leukocytes obtained from intestinal lumen of *Giardia*-infected immunocompetent mice and nude mice. *Gastroenterol.* 1985; 89: 1360-1365.
- 116.** Heyworth, H.F., J.E. Kung, & E.C. Eriksson. Clearance of *Giardia muris* infection in mice deficient in natural killer cells. *Infect. Immun.* 1986; 54: 903-904.
- 117.** Owen, R.L., C.L. Allen, & D.P. Stevens. Phagocytosis of *Giardia muris* by macrophages in Peyer's patch epithelium in mice. *Infect. Immun.* 1981; 33: 591-601.
- 118.** Hill, D.R., & R. Pohl. Ingestion of *Giardia lamblia* trophozoites by murine Peyer's patch macrophages. *Infect. Immun.* 1990; 58: 3202-3207.

Bibliografia

- 119.** Smith, P.D., D.B. Keister, S.M. Wahl, & M.S. Meltzer. Defective spontaneous but normal antibody-dependent cytotoxicity for an extracellular protozoan parasite, *Giardia lamblia*, by CH3/HeJ mouse macrophages. *Cell. Immunol.* 1984; 85: 244-251.
- 120.** Belosevic, M., & G.M. Faubert. Killing of *Giardia muris* trophozoites *in vitro* by spleen, mesenteric lymph node and peritoneal cells from susceptible and resistant mice. *Immunol.* 1986; 59: 269-275.
- 121.** Belosevic, M., & C.W. Daniels. Phagocytosis of *Giardia lamblia* trophozoites by cytokine-activated macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 1992; 87: 304-309.
- 122.** Belosevic, M., & G.M. Faubert. Comparative studies of inflammatory responses in susceptible and resistant mice infected with *Giardia muris*. *Clin. Exp. Immunol.* 1986; 65: 622-630.
- 123.** Carlson, J.R., M.F. Heyworth, & R.L. Owen. Response of Peyer's patch lymphocyte subsets to *Giardia 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: 51-58.
- 124.** Heyworth, M.F., J.R. Carlson, & T.H. Ermak. Clearance of *Giardia muris* infection requires helper/inducer T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1987; 165: 1743-1748.
- 125.** Carlson, J.R., M.F. Heyworth, & R.L. Owen. T-lymphocyte subsets in nude mice with *Giardia muris* infection. *Thymus.* 1987; 9: 189-196.
- 126.** Heyworth, M.F. Intestinal IgA responses to *Giardia muris* in mice depleted of helper T lymphocytes and in immunocompetent mice. *J. Parasitol.* 1989; 75: 246-251.
- 127.** Vinayak, V.K., R. Khanna, & K. Kum. Sequential changes of lamina propria immunoglobulin-containing cells in immune intact and immunosuppressed mice infected with *Giardia lamblia*. *Immunol. Cell. Biol.* 1989; 67: 177-182.
- 128.** Snider, D.P., J. Gordon, M.R. McDermott, & B.J. Underdown. Chronic *Giardia muris* infection in anti-IgM-treated mice. I. Analysis of immunoglobulin and parasite-specific antibody in normal and immunoglobulin-deficient animals. *J. Immunol.* 1985; 134: 4153-4162.
- 129.** Hill, D.R. Lymphocyte proliferation in Peyer's patches of *Giardia muris*-infected mice. *Infect. Immun.* 1990; 58: 2683-2685.
- 130.** Gottstein, B., G.R. Harriman, J.T. Conrad, & T.E. Nash. Antigenic variation in *Giardia lamblia*: cellular and humoral immune response in a mouse model. *Parasit. Immunol.* 1990; 12: 659-673.

Bibliografia

- 131.** Belosevic, M., G.M. Faubert, J.D. MacLean, C. Law, & N.A. Croll. *Giardia lamblia* infections in Mongolian Gerbils: An animal model. *J. Infect. Dis.* 1983; 147: 222-226.
- 132.** Hill, D.R., R.L. Guerrant, R.D. Pearson, & E.L. Hewlett. *Giardia lamblia* infection of suckling mice. *J. Infect. Dis.* 1983; 147: 217-221.
- 133.** Aggarwal, A., & T.E. Nash. Comparison of two antigenically distinct *Giardia lamblia* isolates in gerbils. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1987; 36: 325-332.
- 134.** Ward, H.D., B.I. Lev, A.V. Kane, G.T. Keush & M.E.A. Pereira. Identification and characterization of taglin, a mannose 6-phosphate binding, trypsin-activated lectin from *Giardia lamblia*. *Biochemistry.* 1987; 26: 8669-8675.
- 135.** Byrd, L.G., J.T. Conrad, & T.E. Nash. *Giardia lamblia* infections in adult mice. *Infection Immun* 1994; 62: 3583-3585.
- 136.** Adam, R.D. The biology of *Giardia* spp. *Microbiol. Revs.* 1991; 55: 706-732.
- 137.** Visvesvara, G.S., J.W. Dickerson, & G.R. Healy. Variable infectivity of human-derived *Giardia lamblia* cysts for Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26: 837-841.
- 138.** Daniels, C.W., & M. Belosevic. Comparison of the course of infection with *Giardia muris* in male and female mice. *Inter. J. Parasitol.* 1995; 25: 131-135.
- 139.** Belosevic, M., G.M. Faubert, E. Skamene, & J.D. MacLean. Susceptibility and resistance of inbred mice with *Giardia muris*. *Infect. Immun.* 1984; 44: 282-286.
- 140.** Brooke M.M. Intestinal and urogenital protozoa. Chapter 65 p: 594. En: E.H. Lennette, E.H. Spaulding, & J.P. Truant. (Editors) *Manual of Clinical Microbiology*. Second Edition. American Society for Microbiology. Washington D.C. 1974.
- 141.** Udezulu, I.A., G.S. Visvesvara, D.M. Moss, & G. J. Leitch. Isolation of two *Giardia lamblia* (WB Strain) clones with distinct surface protein and antigenic profiles and differing infectivity and virulence. *Infect. Immun.* 1992; 60: 2274-2280.
- 142.** Nash, T.E., A. Aggarwal, R.D. Adam, J.T. Conrad, & J.W. Merritt. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *J. Immunol.* 1988; 141: 636-641.
- 143.** Abou-Zeid, C., E. Filley, J. Steele, & G.A. W. Rook. A simple new method for using antigens separated by polyacrilamide gel electrophoresis to stimulate lymphocytes in vitro after converting bands cut from Western blots into antigen-bearing particles. *J. Immunol. Meth.* 1987; 98: 5-10.

Bibliografía

- 144.** Wenman, W.M., R.U. Meuser, Q. Nyugen, R.T. Kilani, K. El-Shewy, & R. Sherburne. Characterization of an immunodominant *Giardia lamblia* protein antigen related to alpha giardin. *Parasitol. Res.* 1993; 79: 587-592.
- 145.** Lindley, T.A., P.R. Chakraborty, & T.D. Endlind. Heat shock and stress response in *Giardia lamblia*. *Molec. Biochem. Parasitol.* 1988; 28:135-144
- 146.** Reiner, D.S., T.M. Shinnick, F. Ardeshtir, & F.D. Gillin. Encystation of *Giardia lamblia* leads to expression of antigens recognized by antibodies against conserved heat shock proteins. *Infect. Immun.* 1992; 60: 5312-5315.
- 147.** Aggarwal, A., & T.E. Nash. Antigenic variation of *Giardia lamblia* In vivo. *Infect. Immun.* 1988; 56: 1420-1423.
- 148.** Abbas, A.K., A.H. Lichtman, & J.S. Pober. Chapter 17 En: Cellular and Molecular Immunology. W.B. Saunders Co. Second Edition. Philadelphia Pa. 1994.
- 149.** Peattie, D.A. The giardins of *Giardia lamblia*: genes and proteins with promise. *Parasitol. Today.* 1990; 6: 52-56.
- 150.** Peattie, D.A., R.A. Alonso, A. Hein, & J.P. Caulfield. Ultrastructural localization of giardins to the edges of disk microribbons of *Giardia lamblia* and the nucleotide and deduced protein sequence of alpha-giardin. *J. Cell. Biol.* 1989; 109: 2323-2335.
- 151.** Aggarwal, A., & T.E. Nash. Characterization of a 33-Kilodalton structural protein of *Giardia lamblia* and localization to the ventral disk. *Infect. Immun.* 1989; 57: 1305-1310.
- 152.** Guy-Grand, D. & P. Vassalli. Gut intraepithelial T lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 1993; 5: 247-252.
- 153.** Rocha, B., P. Vassalli, & D. Guy-Grand. The extrathymic T-cell development pathway. *Immunol. Today.* 1992; 13: 449-454.
- 154.** Keister, D.B. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1983; 77:487-488.
- 155.** Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, & R.J. Randall. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.
- 156.** Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.

Bibliografia

- 157.** Towbin, H., T. Staehelin, & J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979; 76: 4350-4354.
- 158.** Weber, K., & M. Osborn. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 1969; 244: 4406-4412.
- 159.** I.M. Roit. *Essential Immunology*. Sixth Edition. Blackwell Scientific Publications. London, 1989.
- 160.** H.H. Fudenberg, D.P. Stites, J.L. Caldwell & J.V. Wells (Editors). *Basic & Clinical Immunology*. Second Edition. Lange Medical Publications. Los Altos, California, 1978.
- 161.** J. Darnell, H. Lodish, D. Baltimore (Editors). *Molecular Cell Biology*. Second Edition. Scientific American Books. W. H. Freeman. N.Y. 1990.

Anexos

Reactivos, soluciones y medios de cultivo

1) Medio axénico TYI-S-33 suplementado con suero y bilis bovina (154)

Para preparar un volumen de 100 ml de medio se utilizaron los siguientes reactivos :

- a) Biosate (Bioxon) 3 g
- b) Glucosa (Bioxon)..... 1 g
- c) Fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4 Merck de México)..... 100 mg
- d) Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4 Merck) 60 mg
- e) Cloruro de sodio (NaCl Merck)..... 200 mg
- f) Hidrocloruro de cisteína monohidratada (Bioxon) 200 mg
- g) Acido ascórbico..... 20 mg
- h) Agua bidestilada..... 75 ml

Después de disolver los componentes, se ajustó el pH de la mezcla entre 7.0 y 7.2 adicionando una solución acuosa de hidróxido de sodio (Na OH Merck) 1N y después se añadió :

- i) Citrato férrico/amonio (Merck) 2.28 mg

Posteriormente se filtró la mezcla usando papel Whatman del No. 1 y el filtrado resultante se ajustó a un volumen de 85 ml con agua bidestilada y se esterilizó en el autoclave a 15 lb de presión y 121°C durante 15 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se suplementó con los siguientes componentes:

- j) Bilis bovina deshidratada (Bioxon de México)..... 10 mg/ml
- k) Suero bovino (Hyclone Laboratories Inc. Logan Utha USA) calentado a 56°C durante 30 minutos para descomplementarlo..... 10 ml

Preparada la mezcla se envasó en tubos o matraces en condiciones de esterilidad y se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

2) Amortiguador salino de fosfatos (PBS) pH 7.4

Se preparó con 0.15 M de cloruro de sodio (NaCl Merck de México), 8.40 mM de fosfato dibásico de sodio anhidro (Na_2HPO_4 Merck) y 1.86 mM de fosfato monobásico de sodio monohidratado ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ Merck). Los ingredientes se disolvieron en agua bidestilada y el pH=7.4 de la solución se ajustó a 7.4 y se aforó al volumen final deseado.

3) Solución concentrada de lugol parasitológico

Para preparar un volumen de 100 ml de solución se pesaron los siguientes reactivos:

- a) 10 g de yoduro de potasio (KI Merck)
- b) 5 g de yodo cristalino (I_2 Merck)

El KI se disolvió en el agua destilada y los cristales de yodo se añadieron poco a poco agitando vigorosamente para disolver perfectamente estos componentes y después de aforar a 100 ml con agua destilada, se filtró y se almacenó en un frasco ámbar con tapón de esmeril esta solución concentrada la cual se diluyó 1:5 con agua destilada para teñir las preparaciones de quistes.

4) Solución salina isotónica (SSI) 0.15 M de NaCl

Se pesaron 0.85 g de cloruro de sodio (NaCl Merck) y se disolvieron en agua bidestilada y con esta última se ajustó a 100 ml el volumen final de la solución.

5) Solución de sulfato de zinc 1.185 g/ml

Se disolvieron 330 g de sulfato de zinc en polvo ($Zn SO_4$ Merck grado analítico) en un litro de agua destilada y la solución se ajustó a una gravedad específica de 1.185 g/ml con la ayuda de un hidrómetro, añadiendo agua o sulfato de zinc. Antes de usar esta solución se corroboró su gravedad específica.

6) Formol al 5% v/v disuelto en solución salina isotónica

Se preparó mezclando 5 ml de formol (Merck sol. acuosa al 36%) con 95 ml de solución salina isotónica (NaCl 0.15M).

7) Amortiguador tris 10 mM pH 8.0 con inhibidores de proteasas

Por cada ml de amortiguador tris (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo.) 10 mM pH=8.0 se adicionaron los siguientes inhibidores de proteasas cuya concentración final se ajustó 5 mM: fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF Sigma); metil maleimida (MM Sigma) y etilén diamino tetra-acético (EDTA Merck).

8) Gel de acrilamida al 10% para electroforesis

Se preparó con los siguientes componentes usando las proporciones señaladas a continuación:

- a) 33.51% v/v de una mezcla preparada con una solución acuosa de acrilamida (Sigma) al 30% p/v y con una solución acuosa de N-N'-bis-metilén-acrilamida (Bio-Rad Laboratories Richmond Ca.) al 0.8% p/v.
- b) 25.39% v/v de una solución acuosa de tris/HCl (Sigma) 1.5M pH 8.8
- c) 2.03% v/v de una solución acuosa de dodecilsulfato de sodio (SDS Sigma) al 10% p/v.
- d) 0.18% v/v de temed (Sigma).
- e) 1.32% v/v de una solución acuosa preparada con 20 mg/ml de persulfato de amonio (Bio-Rad).
- f) Se aforó a 100 ml el volumen final de la solución adicionando agua bidestilada.

ESTA TERCERA PARTE
SALVA LA VIDA

9) Amortiguador de muestra para electroforesis

Se preparó con los siguientes componentes usando las proporciones señaladas a continuación:

- a) 12.5% v/v de una solución acuosa de tris/HCl (Sigma) 0.05M pH 6.8
- b) 10% v/v de glicerol (Merck)
- c) 2% p/v de SDS (Sigma)
- d) 1% v/v de β -mercaptoetanol (Sigma)
- e) 0.0025% p/v de azul de bromofenol (Bio-Rad)
- f) Se aforó a 100 ml el volumen final de la solución adicionando agua bidestilada.

10) Gel de acrilamida al 5% para electroforesis

Se preparó con los siguientes componentes usando las proporciones señaladas a continuación:

- a) 16.59% v/v de una mezcla preparada con la solución acuosa de acrilamida (Sigma) al 30% p/v y con la solución acuosa de N-N'-bis-metilén-acrilamida (Sigma) al 0.8% p/v.
- b) 24.89% v/v de la solución acuosa de tris/HCl (Sigma) 0.5M pH 6.8
- c) 1% v/v de una solución acuosa de SDS (Sigma) al 10% p/v.
- d) 1% v/v de una solución acuosa de 20 mg/ml de persulfato de amonio (Bio-Rad)
- e) 0.1% v/v de temed (Bio-Rad).
- f) Se aforó a 100 ml el volumen final de la solución adicionando agua bidestilada.

11) Marcadores de peso molecular (Bio-Rad)

Fosforilasa b 97 kDa, albúmina sérica bovina (BSA) 66 kDa, ovoalbúmina 43 kDa, anhidrasa carbónica 31 kDa, inhibidor de tripsina de soya 22 kDa y lisozima 14 kDa.

12) Amortiguador para corrimiento electroforético pH=8.3

Se preparó con los siguientes componentes:

- a) 0.0198 M de una solución acuosa de tris (Sigma)
- b) 0.153 M de glicina (Merck)
- c) 0.1% p/v de SDS (Sigma)
- d) Se ajustó el pH de la solución a 8.3 antes de aforar a 1 lt con agua bidestilada.

13) Solución colorante de azul de Coomasie (Bio-Rad)

Se preparó con los siguientes componentes usando las proporciones que a continuación se indican:

- a) 0.3% p/v de azul de Coomasie (Bio-Rad)
- b) 10% v/v de etanol (Merck)
- c) 30% v/v de metanol (Merck)
- d) 10% v/v de ácido acético (Merck)
- e) Se aforó a 100 ml el volumen final de la solución

14) Solución amortiguadora para electrotransferencia pH= 8.3

Se preparó con los siguientes componentes en las proporciones que continuación se señalan:

- a) 0.0198 M de una solución acuosa de tris (Sigma)
- b) 0.153 M de glicina (Merck)
- c) 20% v/v de metanol (Merck)
- d) Se ajustó el pH de la solución a 8.3 antes de aforar a 1 lt con agua bidestilada.

15) Amortiguador salino-tris/HCl (TBS) pH=7.4

Se preparó mezclando los siguientes componentes en las proporciones que continuación se señalan:

- a) 10 mM de una solución acuosa de tris/HCl (Sigma)
- b) 0.15 M de una solución acuosa de cloruro de sodio (NaCl Merck)
- c) Se ajustó el pH de la solución a 7.4 antes de aforar a 1 lt con agua bidestilada.

16) Solución colorante de amido negro para tinción permanente

Se preparó mezclando los siguientes componentes en las proporciones que continuación se señalan:

- a) 0.1% p/v de amido negro (Bio-Rad)
- b) 45% v/v de metanol (Merck)
- c) 10% v/v de ácido acético (Merck)
- d) Se aforó el volumen final de la solución a 100 ml con agua bidestilada

17) Solución decolorante para tinción permanente

Se preparó mezclando los siguientes componentes en las proporciones que continuación se señalan:

- a) 90% v/v de metanol (Merck)
- b) 2% v/v de ácido acético (Merck)
- c) Se aforó el volumen final de la solución a 100 ml con agua bidestilada

18) Solución colorante de amido black 0.01% para tinción de papel de NC

Se pesaron 0.01 g de amido negro (Gibco) y se disolvieron en 100 ml de una solución acuosa de ácido acético (Merck) al 0.5% v/v.

19) Amortiguador de carbonato/bicarbonato ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$) 0.05 M pH= 9.6

Se preparó con los siguientes reactivos :

- a) 0.05 M de una solución acuosa de carbonato de sodio (Na_2CO_3 Merck)
- b) 0.05 M de una solución acuosa de bicarbonato de sodio (NaHCO_3 Merck)
- c) Se ajustó el pH final de la solución a 9.6 mezclando ambas soluciones en las proporciones adecuadas.
- d) Se esterilizó en el autoclave a 15 lb de presión y 121°C y se guardó a temperatura ambiente.

20) Solución salina balanceada de Hank (HBSS) pH= 7.4

Se utilizaron los siguientes componentes para preparar 1 lt de solución:

- a) 5.55 mM de dextrosa (Bioxon)
- b) 0.485 mM de fosfato monobásico de potasio anhidro (KH_2PO_4 Merck)
- c) 1.30 mM de fosfato dibásico de sodio anhidro (Na_2HPO_4 Merck)
- e) 2 ml de una solución indicadora de rojo de fenol al 0.05% p/v disuelto en agua.
- d) 5.36 mM de cloruro de potasio (KCl Merck)
- e) 136.89 mM de cloruro de sodio (NaCl Merck)
- f) 25 mM de hepes (Sigma)

Todos estos componentes se disolvieron en 900 ml de agua bidestilada y se ajustó el pH de la solución a 7.4 con una solución acuosa de hidróxido de sodio (NaOH Merck) 1N y después se aforó a un volumen final de 1 lt con agua bidestilada. Posteriormente se esterilizó por filtración usando un filtro (Millipore) de 0.22 μm , y se envasó en frascos de vidrio con tapón de rosca y se mantuvo en refrigeración. En el momento de su uso se añadió lo siguiente:

- g) 1% v/v de mezcla de antibióticos y antimicóticos (Sol. 100X Gibco)
- h) 50 μg de gentamicina (Schering, México) por cada ml de solución

21) RPMI-1640 incompleto

Se disolvió un sobre de RPMI-1640 (Gibco) elaborado para preparar 1 lt de solución en 900 ml de agua bidestilada y se adicionaron los siguientes reactivos:

- a) 2% p/v de bicarbonato de sodio (NaHCO_3 Gibco)
- b) 25 mM de hepes (Sigma)
- c) Se ajustó el pH final de la solución a 7.3
- d) Se aforó el volumen total de la solución a 1 lt con agua bidestilada
- e) Se esterilizó bajo la campana de flujo laminar usando un filtro (Millipore) de 0.22 μm y se usaron frascos de vidrio con tapón de rosca para envasar este medio, el cual se mantuvo a 4° C en hasta su uso.

22) RPMI-1640 Suplementado

Para 100 ml de solución se utilizaron los siguientes reactivos esterilizados por filtración y disueltos en RPMI-1640 incompleto en las proporciones señaladas a continuación:

- a) 1mM de piruvato sódico (Gibco)
- b) 1% v/v de una mezcla de aminoácidos no esenciales (Sol. 100x Gibco)
- c) 0.5% v/v de una mezcla de aminoácidos esenciales (Sol. 100x Gibco)
- d) 2 mM de L-glutamina (Gibco)
- e) 1% v/v de una mezcla de antibióticos/antimicóticos (Sol. 100X Gibco)
- f) 50 μg de gentamicina (Schering) por cada ml de medio

Anexos

- g) 10% v/v de suero fetal de ternera (Hyclone) descomplementado por calentamiento a 56°C 30 minutos.
- h) Se aforó el volumen final de la solución a 100 ml con RPMI-1640 incompleto estéril ajustado a pH 7.3 con 25 mM de hepes (Sigma) y 2% p/v bicarbonato de sodio (NaHCO_3 Gibco).
- l) La solución obtenida se envasó en condiciones de esterilidad en frascos de vidrio con tapón de rosca y se mantuvo en refrigeración a 4° C hasta su uso.