



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES
CONTRA ANTÍGENOS DE QUISTES DE
GIARDIA INTESTINALIS DEL ENSAMBLE E**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

BERENICE GONZÁLEZ RETE



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARTHA PONCE MACOTELA
2012**



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.

1. Datos del alumno

González

Rete

Berenice

82 84 30 23

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

304120176

2. Datos del tutor

Dra

Martha

Ponce

Macotella

3. Datos del sinodal 1

Dra

Paz María Silvia

Salazar

Schettino

4. Datos del sinodal 2

Dr

Rogelio

Aguilar

Aguilar

5. Datos del sinodal 3

Dra

Lilian

Yépez

Mulia

6. Datos del sinodal 4

Biól

Yolanda

Medina

Flores

7. Datos del trabajo escrito.

Obtención de anticuerpos monoclonales contra antígenos de quistes de *Giardia intestinalis* del ensamble E

93 p.

2012

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de este trabajo, se llevo a cabo en la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría bajo la supervisión de la Dra. Martha Ponce Macotella, Jefa del Laboratorio de Parasitología Experimental.

Parte de esta investigación requirió el uso de animales de laboratorio proporcionados por el Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales del Instituto de Diagnostico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), coordinado por la Biól. Yolanda Medina Flores.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por la oportunidad de desarrollarme académicamente.

A la Facultad de Ciencias, lugar que me permitió desarrollarme como profesional.

Al Laboratorio de Parasitología Experimental de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría por permitirme desarrollar mi proyecto de tesis.

Un profundo agradecimiento a la Dra. Martha Ponce Macotela por su dirección en el presente trabajo, por la acogida y formación en su laboratorio desde mi iniciación en el mundo de la Parasitología, por el afecto en momentos difíciles y su amistad, los cuales fueron muy importantes para la conclusión de la presente tesis.

Al M en C. Aarón Rodríguez Caballero, por el tiempo y la paciencia dedicado a la supervisión en el laboratorio, así como la constante revisión de este trabajo, por su amistad y su apoyo constante, muchas gracias.

A la Biól. Yolanda Medina Flores del Instituto de Diagnostico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), por la donación de animales de laboratorio para poder realizar este trabajo.

Al jurado formado por la Dra. Paz María Silvia Salazar Schettino, Dr. Rogelio Aguilar Aguilar, Dra. Martha Ponce Macotela, Dra. Lilian Yépez Mulia y Biól. Yolanda Median Flores, por la constante revisión y sus valiosas contribuciones para la realización de esta tesis.

Al personal del Laboratorio de Parasitología Experimental de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría. Mario, por sus observaciones y correcciones constantes. Lety, por sus enseñanzas, apoyo y cariño que siempre he recibido. Gus, por la accesibilidad, apoyo, cariño y su gran amistad. Gracias.

A mis compañeros que formaron parte del Taller “Estudio biológico y molecular de los parásitos de importancia medica” al cual pertencí y con los cuales conviví. Los quiero. Dalia Barrios, Gerardo Ángeles, Miroslavich Martínez, Diego Coria, Stevens Urbano, Arely Duran, Karina Cruz, Karina Clavijo, Candy Jiménez, Jimena Pérez, Christian García, Valeria Núñez, Tania Salazar. Así como a mis compañeros de veterinaria, Laura Soto, Esteban Cruz y Javier Ángeles.

DEDICATORIAS

A mis padres, Daniel González Zuñiga y Margarita Rete Ramírez, quienes me han heredado el tesoro más valioso que puede heredársele a un hijo: amor. Que sin escatimar esfuerzo alguno han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme. A quienes la ilusión de su vida a sido convertirme en persona de provecho y a quienes nunca podre pagar todos sus desvelos ni aun con las riquezas más grandes del mundo. Por eso y más los amo. Gracias.

A mi hermano Daniel González Rete, por su cariño y los momentos alegres que hemos vivido, gracias por tu apoyo siempre que lo nesecite, pero sobre todo por estar ahí cuando te necesito. Te quiero hermano.

A mi familia que has estado presente en mi formación y que han formado parte de mi inspiración a lo largo de mi vida.

A mi amigo Luis Alfredo Florián, porque a lo largo de mi vida me enseñaste muchas cosas, fuiste mi cómplice en nuestras travesuras, por esas risas inolvidables, por tu alegría, por cuidarme y defenderme siempre, por hacerme sentir fuerte cuando más lo necesite, por ser como eres. Te quiero.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias, Gaby López, Isabel Ocaña, Sebastián Cisneros, Berenice Ruano, Ana Hernández, Belén Flores, Marco Benítez, Erika Mojica, Brenda Bravo, Carlos Méndez, Dan Carrillo, Verónica Zuñiga. Los quiero.

A Eduardo Villagómez, por todos los momentos que compartimos, porque siempre me apoyaste a seguir adelante, por darme tú cariño y tú tiempo, por ser como eres. Te quiero Lalo, lo sabes.

A mis compañeros del Museo de las Ciencias UNIVERSUM, Eligio Yáñez, Julio Farías, Karen Juárez, Luis Arreguín, Sristhi Granados, Fabián López. Gracias por su cariño.

A mis profesores de la Facultad que me brindaron su apoyo y su perseverancia constante, la adquisición de conocimientos y el amor a la Biología. Gracias.

A todas aquellas personas que han formado parte de mi vida, por las experiencias, enseñanzas y conocimientos, y que hicieron posible la realización de este trabajo.

“La ciencia avanza de puntillas, no a pasos, estos hacen demasiado ruido.”

(Anónimo)

“Donde quiera que estés, es donde tienes que empezar. La diferencia del mañana estriba en el esfuerzo de hoy”

(Andrew Matthews)

“Que no interrumpa, lo cotidiano mis pensamientos, que no le cause a nadie espanto, si prefiero no estar quieto, que no me pongan en un aprieto por algo que no esta en mis manos”

(Enrique Bunbury)

ÍNDICE

ÍNDICE	1
1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1. Características generales de <i>Giardia intestinalis</i>	6
2.2. Taxonomía	6
2.3. Historia	7
2.4. Especies	7
2.5. Morfología	9
2.5.1. Trofozoíto	10
2.5.2. Quiste	13
2.6. Ciclo biológico	15
2.7. Cultivo y enquistamiento de <i>Giardia intestinalis in vitro</i>	17
2.8. Manifestaciones clínicas	17
2.9. Mecanismos patogénicos	19
2.10. Respuesta del huésped a la infección	23
2.11. Mecanismos del parásito que contrarrestan la respuesta del huésped	24
2.12. Diagnóstico	25
2.13. Tratamiento	28
2.14. Epidemiología	30
2.15. Prevención	32
2.16. Anticuerpos monoclonales	33
3. JUSTIFICACIÓN	34
4. HIPÓTESIS	35
5. OBJETIVO	35
6. MATERIAL Y MÉTODO	36
6.1. Aislado de <i>Giardia intestinalis</i>	36
6.2. Mantenimiento de los trofozoítos en cultivo <i>in vitro</i>	36
6.3. Obtención y cuantificación de trofozoítos <i>in vitro</i>	37
6.4. Enquistamiento <i>in vitro</i> del aislado INP190310-F116	39
6.5. Obtención de proteínas de trofozoítos en fase de enquistamiento <i>in vitro</i>	41
6.6. Estandarización de la ELISA	42
6.7. Inmunización de ratones para la obtención de anticuerpos monoclonales (AcMo)	43
6.8. Producción de anticuerpos monoclonales (AcMo)	44
6.8.1. Descongelación de células de mieloma (X63Ag8.653)	44

6.8.2. Mantenimiento de las células de mieloma (X63Ag8.653)	44
6.8.3. Preparación de las células de mieloma para la fusión	45
6.8.4. Preparación de las células de bazo de ratón	45
6.8.5. Fusión celular	46
6.8.6. Clonación celular por dilución limitante	47
6.8.7. Criopreservación de células	48
6.9. Electroforesis	48
6.10. Western blot	49
7. RESULTADOS	51
7.1. Cultivo <i>in vitro</i> del aislado INP190310-F116 de <i>Giardia intestinalis</i>	51
7.2. Obtención de quistes <i>in vitro</i> del aislado INP190310-F116 de <i>G. intestinalis</i>	51
7.3. Obtención de proteína soluble de pared de quiste de los aislados WB, GVH, VMRDT e INP190310-F116 de <i>G. intestinalis</i>	55
7.4. Obtención de los anticuerpos monoclonales	56
7.4.1. Monitoreo de la respuesta inmune de los ratones inmunizados	56
7.4.2. Titulación de anticuerpos por ELISA	57
7.5. Producción y obtención de anticuerpos monoclonales	58
7.6. Electroforesis	63
7.7. Western blot	64
8. DISCUSIÓN	65
9. CONCLUSIONES	70
10. PERSPECTIVAS	71
11. APÉNDICE	72
12. REFERENCIAS	82

1. Resumen

Giardia intestinalis es un protozooario cosmopolita, parásito de mamíferos, incluyendo al hombre. Esta protozoosis zoonótica produce dolor abdominal transprandial, diarrea, esteatorrea y malabsorción intestinal que induce retraso del desarrollo físico e intelectual principalmente en niños. Por medios moleculares se han descrito ocho ensambles (genotipos) A (AI, AII) y B (I-III) zoonóticos, C y D (cánidos), E (animales de granja), F (felinos), G (ratas) y H (vertebrados marinos). Es necesario generar herramientas que permitan diagnosticar la infección mediante la captura de coproantígenos y determinar el origen de los quistes. El objetivo fue obtener anticuerpos monoclonales (AcMo) contra proteínas de pared de quistes de *Giardia intestinalis* del ensamble E. Los trofozoítos del aislado INP190310-F116 (becerro) del ensamble E se mantuvieron en cultivo TYI-S-33 axénico. Se obtuvieron quistes *in vitro* y se dividieron en dos lotes: a) para la obtención de AcMo y b) para sensibilizar placas para la técnica de ELISA. Para la obtención de AcMo, a ratones BALB/c se les inocularon los quistes por vía intraperitoneal. Previa inoculación se obtuvieron muestras de sangre, se analizó la respuesta inmune de los ratones por ELISA y se sacrificaron cuando se obtuvieron títulos de 1:4000. Los linfocitos del bazo se fusionaron con células de mieloma (X63Ag8.653). Los pozos positivos al antígeno se seleccionaron y se hicieron clonaciones. Se obtuvieron proteínas de trofozoítos en fase de enquistamiento de cuatro aislados: WB (cepa de referencia, ensamble AI), INP-GVH (ensamble AII), INP-VMRDT (ensamble B) e INP190310-F116 (ensamble E) y se sometieron a electroforesis e inmunoblot. El anticuerpo monoclonal de isotipo IgG, reconoció mayoritariamente una proteína de ≈ 71 kDa en los cuatro aislados, además de

otras de pesos moleculares de ≈ 30 , 49 y 62 kDa La proteína de ≈ 71 kDa probablemente corresponda a una proteína de choque térmico (proteína de estrés). La reactividad del anticuerpo monoclonal obtenido no fue ensamble E específica.

2. Introducción

Giardia intestinalis (sinonimia: *G. lamblia*, *G. duodenalis*) es el protozooario intestinal más frecuente en la población de países en desarrollo. En el 2004 se le incluyó dentro de las enfermedades olvidadas o del rezago (Savioli *et al.* 2006). Los pacientes pueden ser asintomáticos o pueden presentar un cuadro agudo o crónico. Este parásito flagelado produce diarrea y malabsorción de nutrientes que impactan negativamente en el crecimiento y desarrollo de la población infantil (Luján, 2006). A nivel mundial se registran más de 280 millones de pacientes con giardiasis sintomática (Lane y Lloyd, 2002; Geurden *et al.* 2009) y 500,000 casos nuevos por año (WHO, 1996). En México, en el 2002 se reportaron 39 618 casos (Boletín Epidemiología, 2002).

Giardia intestinalis se encuentra en una gran variedad de mamíferos: animales domésticos (caninos y felinos), de granja (bovinos, caprinos, porcinos, etc.) y animales silvestres (castores, coyotes, primates, roedores, mapaches, etc.) (Ivanov, 2010). Mediante el uso de herramientas moleculares se han descrito 8 ensamblajes en el grupo morfológico *G. intestinalis*, los ensamblajes A (AI y AII) y B son zoonóticos, parasitan humanos y animales; los ensamblajes C y D se describieron a partir de trofozoítos obtenidos de perros; el ensamblaje E en artiodáctilos (animales de pezuña hendida) (Xiao, 1994); el ensamblaje F en felinos, el ensamblaje G en ratas (Meyer, 1985; Thompson y Monis, 2004) y el ensamblaje H en vertebrados marinos: ballenas, focas, delfines y aves marinas (Lasek-Nesselquist *et al.* 2010).

2.1. Características generales de *Giardia intestinalis*.

Las características de *Giardia intestinalis* que la ubican en el reino Protozoa están sujetas al Código Internacional de Nomenclatura Zoológica. Los micro-organismos del subreino Archeozoa carecen de aparato de Golgi, mitocondrias, hidrogenosomas y peroxisomas. Sin embargo, se ha documentado la presencia de diversas proteínas mitocondriales y mitosomas (estructuras similares a las mitocondrias) (Sogin, 1989; Tovar *et al.* 2003). La energía que producen es por glicolisis anaeróbica. Los ribosomas y el rRNA tienen mayor similitud a la de los procariontes (Cavalier-Smith, 1998).

2.2. Taxonomía (Cavalier-Smith, 1998).

Imperio: Eucariota.

Reino: Protozoa.

Subreino: Archeozoa.

Phyllum: Metamonada.

Subphyllum: Eopharyngia.

Clase: Trepomonadea.

Orden: Diplomonadida.

Suborden: Diplomonadina.

Género: *Giardia*.

Especie: *Giardia intestinalis*.

2.3. Historia

La primera descripción de *Giardia sp.* se atribuye al Holandés Antón Van Leeuwenhoek (1632-1723), quién la encontró en una muestra de sus propias heces diarreicas, pero fue hasta 1859 que el médico checo Vilem Lambl (1824-1895) realizó con gran detalle una completa caracterización del parásito y lo llamó *Cercomonas intestinalis*.

Kunstler (1882) le dio el nombre de *Giardia*. Blanchard (1888) propuso la nomenclatura *Lamblia intestinalis* y Stiles (1902) la denominó *Giardia duodenalis*. Kofoid (1915) propuso el nombre de *Giardia lamblia* (Campos *et al.* 1999; Faubert, 2000; Adam, 2001).

Grassi (1879) describió la fase quística de este protozoario. A partir de 1970 se aceptó ampliamente el nombre de *Giardia lamblia* en muestras procedentes de humanos (Faubert, 2000; Adam, 2001).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) acepta el género y especie de *Giardia intestinalis* (sin. *G. lamblia* o *G. duodenalis*) (Boreham *et al.* 1990; Van Keulen, 2002).

2.4. Especies

Se han descrito varias especies con base a la morfología del trofozoíto y del cuerpo medio. Filice (1952), describió tres especies: *G. muris* en roedores y aves, los trofozoítos son más redondos que largos y los cuerpos medios son pequeños y

redondos; *G. agilis* en anfibios, los trofozoítos son alargados y los cuerpos medios tienen forma de lágrima; y *G. intestinalis* que infecta a una amplia variedad de mamíferos, entre ellos el hombre. Los trofozoítos son piriformes y los cuerpos medios con forma de uña de martillo (Meyer, 1985) (Fig.1).

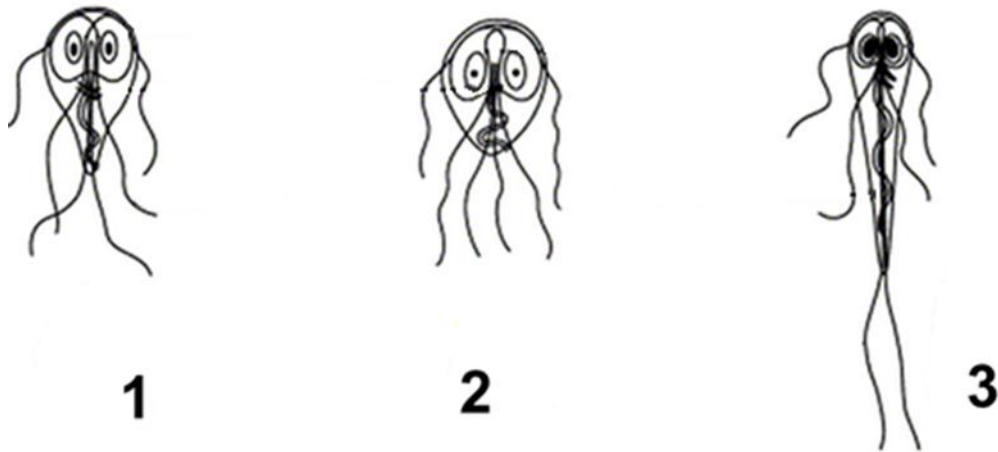


Figura. 1 Esquema que muestra la morfología de los trofozoítos de las tres especies de *Giardia*. 1) *G. duodenalis*, 2) *G. muris* y (3) *G. agilis*. Tomado de Filice (1952).

Posteriormente se describieron dos especies en aves, *G. ardeae* que se caracteriza porque tiene un flagelo caudal y *G. psittaci* que carece de flanco ventrolateral. Adicionalmente, la especie *G. microti*, que se encuentra en roedores, se caracteriza por poseer 2 trofozoítos en el quiste (Van Keulen *et al.* 1998; Adam, 2001; Thompson y Monis, 2004) (Tabla 1).

Tabla 1. Especies de *Giardia* y sus hospederos

Especies de <i>Giardia</i>	Cuerpo medio	Huéspedes
<i>G. intestinalis</i>	En forma de uña de martillo	Humanos y otros mamíferos
<i>G. muris</i>	Pequeños y redondos	Roedores
<i>G. agilis</i>	En forma de lágrima	Anfibios
<i>G. ardeae</i>	En forma de uña de martillo	Aves
<i>G. psittaci</i>	En forma de uña de martillo	Aves
<i>G. microti</i>	En forma de uña de martillo	Ratones

2.5. Morfología

Giardia intestinalis tiene dos estadios durante su ciclo de vida: el trofozoíto el cual produce las manifestaciones clínicas y el quiste que es la estructura de resistencia y forma infectante (Adam, 2001) (Fig. 2).

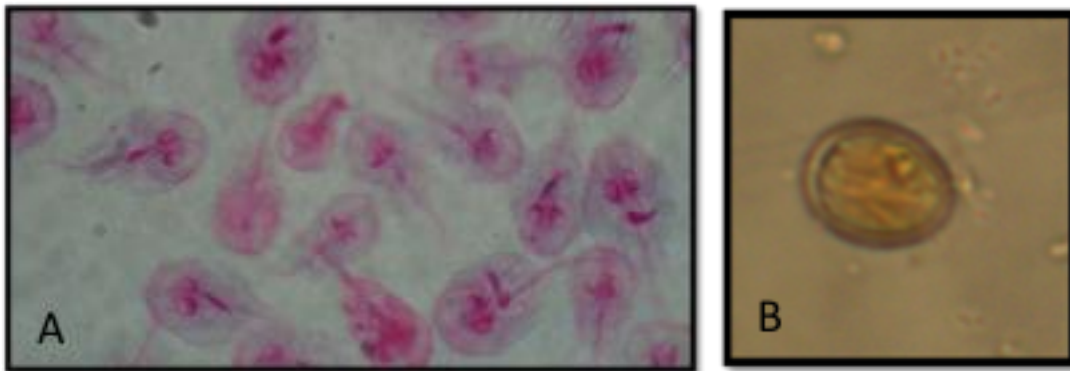


Figura 2. Microfotografías que muestran trofozoítos teñidos con Giemsa, se observan los núcleos, cuerpos medios y flagelos (A) y un quiste teñido con lugol (B). Fotos donadas por Gustavo Peralta.

2.5.1. Trofozoíto

El trofozoíto es piriforme, mide entre 12 a 15 μm de longitud, 5 a 9 μm de ancho y 1 a 2 μm de espesor, es aplanado dorso-ventralmente, tiene dos núcleos, cuerpos basales, cuatro pares de flagelos, cuerpo medio, vacuolas periféricas y un disco ventral (Adam, 2001) (Fig. 3).

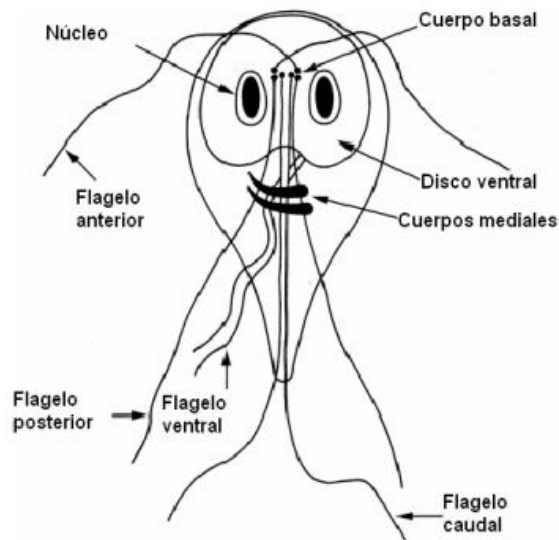


Figura 3. Esquema del trofozoíto de *G. intestinalis*. Tomado de Faubert (2000).

Los núcleos son ovoides situados simétricamente, con un cariosoma central y ambos núcleos poseen aproximadamente la misma cantidad de DNA (Adam, 2001). El disco ventral es cóncavo y ligeramente asimétrico, se localiza en la región anteroventral del trofozoíto y se encuentra implicado en la adherencia al epitelio intestinal. Las proteínas constituyentes de este disco son giardinas (un grupo de proteínas de conformación alfa hélice y pesos moleculares entre 29 a 38 kDa), proteínas contráctiles como actina, miosina y tropomiosina que constituyen

la base bioquímica para la contracción y adherencia, y tubulinas que forman los microtúbulos del disco ventral y de los flagelos.

Tienen cuatro pares de flagelos que se originan de cuerpos basales en la región ventral del trofozoíto. Recientemente se identificó la presencia de mitosomas, pequeños organelos con doble membrana y sin DNA, cuya función está relacionada con la maduración de proteínas ferro-sulfúricas y no con el metabolismo energético (Adam, 2001).

Basado en estudios morfológicos y de proteínas marcadoras se han documentado tres tipos de compartimientos membranosos: a) el correspondiente al retículo endoplásmico, el cual se extiende bilateralmente a través de toda la célula y se continúa con la membrana nuclear, b) el sistema de vesículas periféricas con actividad lisosomal y endosómica y c) las vesículas secretoras específicas de enquistamiento que contienen proteínas, proteoglicanos y lipopolisácaridos, destinados a la formación de la pared quística (Hehl y Marti, 2004; Bazán-Tejeda *et al.* 2008).

Los trofozoítos se encuentran recubiertos de proteínas variables de superficie (VSPs por sus siglas en inglés: Variant-Specific Surface Protein) (Nash, 1992; Midlej y Benchimol, 2009). *G. intestinalis* en su genoma contiene un repertorio de entre 150 a 200 genes que codifican estas proteínas, pero solamente una VSP se expresa en la superficie de los trofozoítos en un momento preciso. Estas proteínas son antigénicamente diferentes entre sí y heterogéneas en su tamaño molecular;

poseen un dominio transmembranal altamente conservado y una porción carboxilo-terminal citosólica compuesta por sólo cinco aminoácidos (CRGKA). Son ricas en cisteína (~12) y su región N-terminal es altamente variable (dándole a cada una de estas proteínas la característica de ser antigénicamente diferente) (Papanastasiou *et al.* 1997). La purificación y análisis de la VSP GS/H7, demostró que no está glicosilada y que une Zn^{2+} y Fe^{2+} . Esta es una de las razones de la deficiencia de estos minerales en pacientes con giardiosis crónica. *G. intestinalis* cambia espontáneamente la expresión de sus VSPs ya sea en cultivo o en respuesta al ataque inmunológico que estos antígenos inducen tanto en humanos como en animales de experimentación (Luján, 2006).

Se ha documentado que la variación biológica de los organismos se activa en respuesta a estímulos ambientales y probablemente permitiría que el parásito aumente su supervivencia en muchas especies. Por lo tanto, la variación de los antígenos de superficie de *G. intestinalis* podría promover la transmisión a especies diversas a partir de un solo huésped infectado (Singer *et al.* 2001).

Las VSP son antígenos de superficie inmunodominantes que cambian cada 6 a 13 generaciones y durante el enquistamiento y desenquistamiento de algunos aislados de *G. intestinalis*. La expresión de las VSPs es de tipo reversible sin un orden pre-establecido y la frecuencia del cambio de una VSP a otra depende del tipo de aislado. Este fenómeno ocurre *in vivo* e *in vitro* y se desconoce si la variación antigénica está asociada a la cronicidad. Por ende, podría estar

involucrado en infecciones repetidas en un mismo huésped o una diseminación a un mayor rango de huéspedes susceptibles (Nash, 1992).

El mecanismo molecular involucrado en la variación antigénica de *G. intestinalis* no está totalmente esclarecido, pero se ha demostrado que la variación no se encuentra directamente asociada a arreglos genómicos de las VSP (Adam, 2001).

2.5.2. Quiste

El quiste es ovoide, mide entre 8 y 12 μm de longitud, 7 a 10 μm de ancho y el espesor es de 0.3 a 0.5 μm . Dentro de los quistes se observan los axonemas, láminas de microtúbulos, ribosomas, vacuolas y fragmentos del disco ventral; los núcleos con cariosoma central o excéntrico se localizan en un extremo del quiste y cada quiste maduro es tetranucleado. La actividad metabólica de los quistes es solo del 10-20% de la desarrollada por los trofozoítos (Adam, 2001) (Fig. 4).

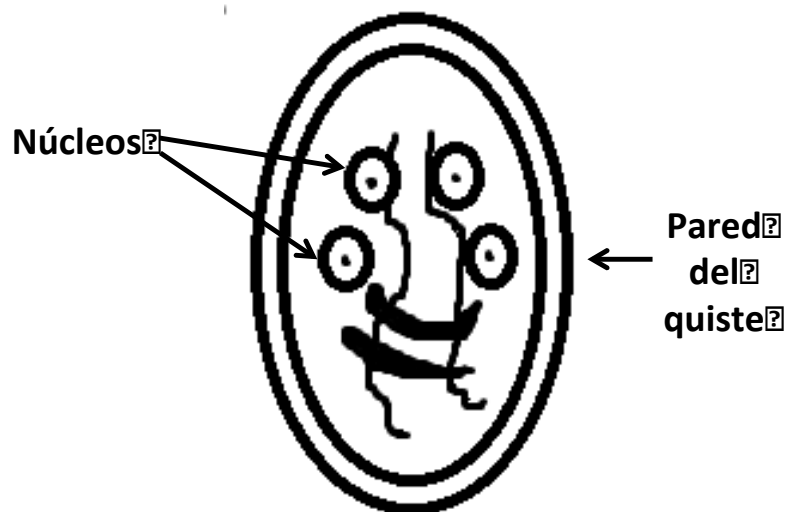


Figura. 4 Esquema del quiste de *G. intestinalis*.

El análisis bioquímico de la pared del quiste ha demostrado que los componentes principales son proteínas y carbohidratos, N-acetilgalactosamina (NAcGal) es el azúcar que se encuentra en mayor proporción (Adam, 2001).

Se han clonado y secuenciado los genes de tres proteínas; sin embargo, solo CWP1 y CWP2 (cyst wall protein) se han caracterizado funcional y bioquímicamente (Faubert, 2000). Sus pesos moleculares son de 26 y 39 kDa respectivamente. Contienen regiones ricas en cisteína, 5 copias en tándem de una secuencia repetida de 24 residuos con alto contenido de leucina (LRR o repeticiones ricas en leucina), un péptido señal en N-terminal, así como varios sitios de identidad de secuencia aunque CWP2 se distingue de CWP1 por la presencia de 121 residuos de aminoácidos básicos en la región C-terminal (Luján *et al.* 1997).

Los genes de estas dos proteínas poseen una única copia codificada en los cromosomas III y IV respectivamente; se transcriben únicamente durante el enquistamiento y con cinéticas idénticas, detectándose un aumento en los niveles transcritos de 140 veces con respecto a los trofozoítos no enquistantes (Luján *et al.* 1995).

Además se identificaron 5 nuevas proteínas que contienen secuencias LRR (residuos ricos en lisina), de las cuales solamente la CWP3 se regula positivamente durante el enquistamiento y se incorpora a la pared del quiste (Sun *et al.* 2003). Las CWPs se combinan para formar un heterocomplejo estable, se

localizan dentro de vesículas secretoras específicas (ESV), para luego incorporarse a la pared de los trofozoítos enquistantes. Dentro de las ESV, las proteínas no se pliegan completamente sino que se mantienen en forma soluble, probablemente unidas a otras proteínas y con bajas concentraciones de Ca^{2+} . Estas proteínas presentan ciertas regiones altamente conservadas que le confieren flexibilidad y estabilidad a la pared, permitiendo la deformación del quiste y el movimiento de los trofozoítos en su interior (Luján *et al.* 1995).

2.6. Ciclo biológico

Giardia intestinalis tiene un ciclo de vida directo. El mecanismo de infección es por fecalismo fundamentalmente por vía hídrica. El periodo de incubación es de 12 a 19 días (desde el momento de la infección hasta la observación del parásito en heces). Cuando los quistes son ingeridos pasan por el pH ácido del estómago y pH alcalino del duodeno; el primer signo de actividad es el movimiento flagelar, los trofozoítos se activan y salen del quiste (Bingham y Meyer, 1979; Feely *et al.* 1991; Faubert, 2000).

El proceso de desenquistamiento es rápido, entre 5 y 10 minutos, y los trofozoítos se dividen asexualmente por fisión binaria longitudinal después de salir del quiste y en ocasiones antes de terminar su salida. Las sales biliares y el colesterol favorecen su crecimiento poblacional, lo que promueve la colonización del duodeno y yeyuno. La duración del ciclo celular varía entre 6 y 20 horas (Feely *et al.* 1990).

El mecanismo por el cual los trofozoítos se diferencian en quistes se denomina enquistamiento, que consiste en una serie de eventos coordinados con cambios morfológicos y bioquímicos: división nuclear, desmantelamiento y empaquetamiento de los organelos tales como el disco ventral (Luján *et al.* 1998). El enquistamiento se inicia debido a la carencia de colesterol en la membrana citoplasmática, se activa la expresión de genes codificadores de las proteínas del enquistamiento (CWP1 y CWP2). Cuando los quistes se excretan junto con las heces ya son infectantes (Thompson *et al.* 1993; Luján *et al.* 1997; Mowatt *et al.* 1995). El enquistamiento es esencial para que el parásito pueda sobrevivir fuera del intestino del hospedador y para su fácil dispersión (Midlej y Benchimol, 2009; Luján, 2006) (Fig. 5).

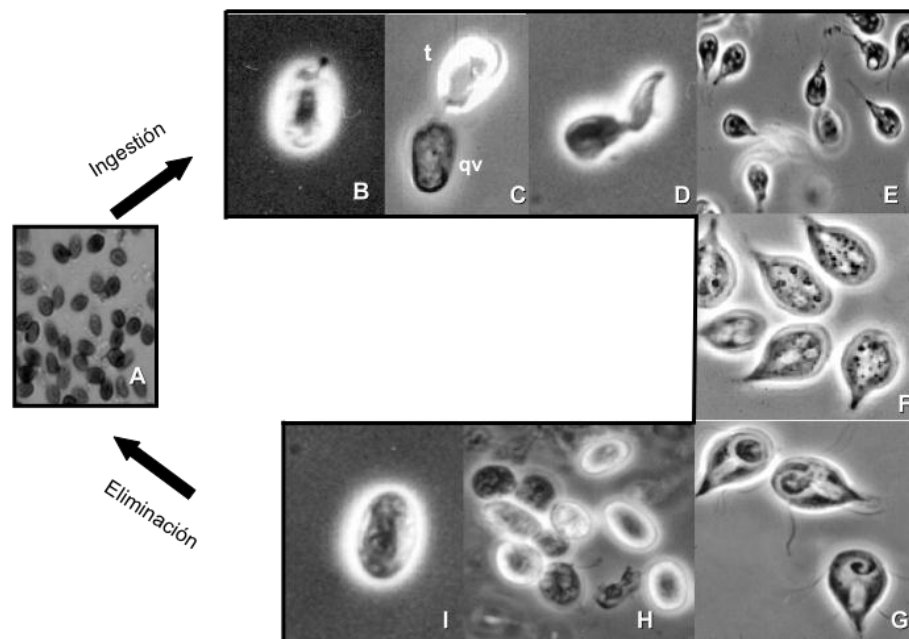


Figura 5. Ciclo biológico de *Giardia intestinalis*. A, Quistes en el ambiente. B, Quiste activado por pH ácido (estómago) y pH alcalino (duodeno). C, Última fase de salida del trofozoíto, quiste vacío (qv) y trofozoíto (t). D, Trofozoíto en división. E, Inicio de la colonización. F, Trofozoítos llenos de vesículas en proceso de enquistamiento. G, Reacomodo del disco ventral. H, Quistes en formación. I, Quiste maduro. Proporcionado por la Dra. Martha Ponce Macotela, INP.

2.7. Cultivo y enquistamiento de *Giardia intestinalis in vitro*

Karapetyan (1962), fue el primero en cultivar trofozoítos *in vitro*, para el cual usó un medio de cultivo monoxénico que contenía suero inactivado, digerido de carne, extracto de embrión y levaduras de *Sacharomyces cerevisiae*. Posteriormente se demostró que el medio de cultivo TYI-S-33 para crecer trofozoítos de *Entamoeba* (Diamond *et al.* 1978) complementado con bilis bovina favorecía el crecimiento de los trofozoítos de *Giardia* (Keister, 1983).

Una postulación para el medio de enquistamiento empleando sales biliares primarias o secundarias y pH 7.1 (Gillin *et al.* 1987), y por otro lado la disminución de colesterol como disparador de la formación de quistes (Luján *et al.* 1996). Para el enquistamiento *in vitro*, el medio TYI-S-33 se modificó, aumentando el pH y la concentración de sales biliares (Gillin *et al.* 1988). Cuando los trofozoítos se encuentran en medio de enquistamiento, sintetizan proteínas de pared de quiste (CWPs) y se transportan en vesículas específicas de enquistamiento hasta la superficie (Mowatt *et al.* 1995; Benchimol, 2004).

2.8. Manifestaciones clínicas

El periodo de incubación de la giardiasis es de 12 a 19 días y el de la infección dura desde algunas semanas a varios meses, incluso años (Chester *et al.* 1985; Hill, 1993; Thompson *et al.* 1993; Lengerich *et al.* 1994; Faubert, 2000). Esta parasitosis puede ser asintomática, pero, estos pacientes pueden presentar malabsorción intestinal y eliminación de quistes (Astiazarán-García *et al.* 2000). Cuando es sintomática puede presentar fase aguda y crónica.

En la giardiosis aguda puede haber: dolor abdominal, diarrea, hiporexia, meteorismo, náuseas, flatulencias, estreñimiento, vómito, bajo peso, palidez de tegumentos, borborismos y talla baja (Eckmann, 2003). El dolor abdominal es epigástrico y transprandial, las evacuaciones son explosivas, profusas, acuosas al principio y después esteatorreicas, fétidas, sin sangre ni moco. Debido a que algunas manifestaciones clínicas de esta fase son semejantes a las provocadas por virus (rotavirus), bacterias (*Campylobacter*, *Escherichia coli* toxigénica), y otros parásitos (*Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* sp), es necesario realizar un diagnóstico diferencial y considerar el periodo de incubación, el tiempo prolongado de los síntomas, y la ausencia de fiebre y sangre en heces (Hill, 1993).

La giardiosis crónica puede durar varios meses y es devastadora en la población infantil; el dolor abdominal se exagera durante la ingestión de los alimentos y los niños dejan de comer, tienen meteorismo, distensión abdominal, flatulencia fétida, malestar general, astenia, adinamia, pérdida de peso, talla baja y déficit cognitivo. Las evacuaciones son blandas, esteatorreicas y fétidas. Este cuadro puede alternarse con periodos de estreñimiento o evacuaciones de consistencia normal. Durante esta fase, los pacientes pueden desarrollar malabsorción de vitaminas A y B12, micronutrientes como hierro y zinc, proteínas, lípidos y carbohidratos, sobre todo lactosa, sacarosa, maltosa e isomaltosa. Los pacientes con malabsorción de lactosa pueden mostrar intolerancia a la leche, por lo que se les recomienda no ingerir productos lácteos durante los primeros 30 días después del tratamiento. El diagnóstico diferencial se establece con enfermedad celiaca, sprue, enteritis

tropical, úlcera duodenal, hernia hiatal, infecciones con *Cryptosporidium sp*, *Isospora belli* y *Strologyloides stercoralis* (Hill, 1993; Thompson *et al.* 1993).

En artiodáctilos la giardiosis les produce diarrea semilíquida y/o pastosa, fétida y en ocasiones con moco. La duración varía desde los 2 o 3 días hasta más de 5 semanas. Los animales presentan deshidratación, apatía y distensión abdominal (Geurden *et al.* 2008; Otero-Negrete *et al.* 2011).

2.9. Mecanismos patogénicos.

Traumático

Los trofozoítos se adhieren a los enterocitos por la presión negativa que produce el disco ventral, generada por la fuerza hidrodinámica secundaria a la actividad constante de los flagelos ventrales. En la adherencia mediada por factores bioquímicos participan las proteínas contráctiles del disco ventral: giardinas, actina, miosina, tropomiosina y vinculina (Feely *et al.* 1982; Narcisi *et al.* 1994). Las lectinas también están relacionadas con la adherencia mediante receptores específicos (carbohidratos localizados en las superficies celulares). La interacción de las lectinas con el epitelio intestinal produce exfoliación, lisis celular, aumento del índice mitótico y aplanamiento de las microvellosidades. Los trofozoítos de *G. intestinalis* poseen una lectina (taglina) que puede inducir alteraciones del epitelio intestinal (Farthing *et al.* 1986; Buret, 2007; Troeger *et al.* 2007).

Enzimático

Enzimas como las sulfatasas, fosfatasa ácida, hidrolasa, proteasas de cisteína y tiolproteasas (catepsina B) favorecen la adherencia del parásito al epitelio intestinal debido a que afectan las glicoproteínas de los enterocitos y alteran la integridad de las microvellosidades (Feely y Dyer, 1987; Hare *et al.* 1989; Parenti, 1989; Farthing, 1997).

Tóxico

No se ha logrado identificar toxina alguna, pero se ha observado que el medio de cultivo, en donde se han crecido trofozoítos, causa alteraciones en el epitelio intestinal. A finales del siglo pasado se describió el gen de una proteína variable de superficie (CRP136) que contiene secuencias repetitivas que codifican un péptido de 21 a 23 aminoácidos y un bajo peso molecular que tiene homología de 57% con una sarafotoxina. Esta proteína se encuentra en el veneno de la víbora *Atractaspis engadensis* y el envenenamiento por la mordedura de esta serpiente ocasiona síntomas semejantes a los observados en la giardiosis; como dolor abdominal, diarrea, entre otros (Chen *et al.* 1995; Upcroft *et al.* 1997; Upcroft y Upcroft, 1998).

Barrera mecánica

Por la extensa superficie de absorción de las microvellosidades es difícil visualizar que los trofozoítos formen una barrera mecánica que impida la absorción total de los nutrientes; sin embargo, algunas zonas podrían estar recubiertas de trofozoítos, causando daño a las microvellosidades y provocar distintos grados de

malabsorción intestinal (Chávez *et al.* 1995; Katelaris *et al.* 1995; Deselliers *et al.* 1997; Astiazarán-García *et al.* 2000; Buret, 2007).

Ruptura de uniones celulares

Existen proteínas implicadas en las uniones celulares del epitelio intestinal denominadas zonula-occludens (ZO-1), cingulina, ocludina y claudinas. La ZO-1 es una proteína de membrana periférica que interacciona en la unión de la claudina con la F-actina del citoesqueleto. La función de la ZO-1 entre las uniones celulares y el citoesqueleto es muy importante para la regulación de permeabilidad paracelular. Se ha visto que los trofozoítos de *G. intestinalis* desorganizan las uniones celulares a nivel ZO-1 e incrementan la permeabilidad transepitelial (Buret *et al.* 2002; Buret, 2007; Troeger *et al.* 2007).

Apoptosis

Se ha propuesto que la apoptosis puede ser otra causa de aumento de la permeabilidad intestinal. Además se ha establecido que la muerte celular por apoptosis no desarrolla inflamación. Recientemente se demostró que *Giardia* produce apoptosis en enterocitos dependientes de caspasa-3. Este tipo de muerte celular se ha correlacionado con la ruptura de uniones celulares a nivel de la ZO-1 e incremento de la permeabilidad epitelial; además, el efecto proapoptótico de *G. intestinalis* podría explicar la carencia de infiltrado inflamatorio en tejido intestinal colonizado por este parásito (Chin *et al.* 2002; Buret, 2007; Troeger *et al.* 2007).

Competencia por nutrientes con el huésped

Los trofozoítos compiten con el huésped por sales biliares, nucleótidos, aminoácidos y micronutrientes como hierro y zinc, porque no los pueden sintetizar de novo. La disminución de sales biliares en el intestino altera la formación de micelas y se produce una malabsorción de las grasas y esteatorrea (eliminación de grasas en materia fecal). Para la producción de energía, además de la glucosa utiliza aspartato, alanina y arginina.

La cisteína es un aminoácido fundamental de las proteínas de superficie variable, que forman enlaces disulfuro que le dan alta resistencia a los trofozoítos. Además es parte de la secuencia conocida como LIM que es responsable de los enlaces coordinados de las metaloproteínas (Nash y Mowatt, 1993; Eckmann *et al.* 2000; Eckmann y Gillin, 2001).

Todos estos mecanismos contribuyen al daño epitelial y a la malabsorción. Ésta se correlaciona con la atrofia de las vellosidades y el recambio acelerado de los enterocitos inmaduros producen enzimas defectuosas o disminuidas: glucoamilasa, isomaltasa y ATP-asa basolateral de la bomba Na⁺/K⁺. También se encuentran atenuadas las enzimas celulares: isocitrato deshidrogenasa (provoca menor producción de ATP, la falta de energía en las células da lugar a la disminución de la absorción intestinal de carbohidratos y aminoácidos) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (altera la biosíntesis de lípidos y otras macromoléculas que son necesarias para la integración de las membranas celulares) (Belosevic *et al.* 1989; Nain *et al.* 1991; Farthing, 1997).

2.10. Respuesta del huésped a la infección

En la interacción huésped-parásito, el huésped cuenta con mecanismos inespecíficos y específicos para eliminar al parásito. En el duodeno las sales biliares actúan como un detergente que inhibe el crecimiento de los microorganismos. Los ácidos grasos (productos de lipólisis) y las proteinasas (carbopetidases) dañan las membranas citoplasmáticas de microorganismos invasores (Gillin *et al.* 1988; Seow *et al.* 1993). Existen además células caliciformes productoras de moco que protegen la mucosa intestinal de alimentos, virus, bacterias y parásitos (Miller, 1987; Ishikawa, 1993). Además, los enterocitos producen óxido nítrico (NO) a partir de arginina mediante la óxido nítrico sintetasa (ONS) y lo liberan hacia la luz del intestino, el NO y sus derivados, nitratos y nitritos, son potentes antiparasitarios, regulan la integridad de la mucosa y el tono vascular del intestino (Eckmann *et al.* 2000).

Giardia intestinalis estimula la vía del complemento, las IgG3 e IgM lisan a los trofozoítos en la presencia de complemento. La eliminación del parásito se ha relacionado con la IgA secretora, además, los macrófagos de las placas de Peyer, en la presencia de anticuerpos anti *Giardia*, fagocitan grandes cantidades de trofozoítos que mueren por mecanismos oxidativos. Los macrófagos activados por INF- γ fagocitan a los trofozoítos, aunque en este proceso también se dañan los enterocitos (Farthing, 1997; Faubert, 2000; Eckmann y Gillin, 2001).

2.11. Mecanismos del parásito que contrarrestan la respuesta del huésped

Giardia intestinalis es uno de los pocos microorganismos que coloniza un ambiente tan hostil como es el duodeno (Eckmann y Gillin, 2001). Estudios *in vitro* muestran que la sales biliares favorecen su crecimiento. El parásito necesita colesterol para la biogénesis de sus membranas y se sugiere que emplea sales biliares como acarreadoras de colesterol y fosfolípidos (Jarroll *et al.* 1981; Luján *et al.* 1996), aunque recientemente se ha documentado que posee material genético para la síntesis de colesterol. En el ambiente intestinal puede haber pocos ácidos grasos libres (lipólisis) porque los trofozoítos producen un inhibidor de la lipasa pancreática (Katelaris *et al.* 1991; Farthing, 1997); además, el parásito se protege de los ácidos grasos libres porque induce el incremento de células caliciformes (Miller, 1987), aunque algunos componentes del moco también pueden dañarlo, como se ha visto en otros parásitos.

Los trofozoítos de *G. intestinalis* evitan el ataque proteolítico mediante diferentes mecanismos: inhiben a la tripsina (Seow *et al.* 1993), se protegen con sus proteínas variables de superficie (VSP) que son ricas en cisteína y le proporcionan gran estabilidad estructural porque forma puentes disulfuro; el recambio constante de sus VSP's les ayuda a evadir la respuesta inmune del huésped. Además, las VSP se unen al zinc, cuya carencia en el ambiente intestinal inhibe la función de las carboxipeptidasas dependientes de este metal (Luján *et al.* 1995; Upcroft y Upcroft, 1998; Singer *et al.* 2001). Los trofozoítos evitan la agresión del NO debido a que consumen la arginina, que es necesaria para la formación de NO (Eckmann *et al.* 2000; Kasper Buzoni-Gatel, 2001).

La tiolproteinasa (catepsina B) de *G. intestinalis* hidroliza a las proteínas y rompe las inmunoglobulinas a nivel de la bisagra, lo que facilita la evasión de la reacción inmune del huésped (Parenti, 1989; Eckmann y Gillin, 2001).

2.12. Diagnóstico

Después del examen clínico y epidemiológico, en el que se considera la diarrea de larga evolución, pérdida de peso, malabsorción, hábitos higiénicos deficientes y fuentes de agua no potable para beber, el desafío en el laboratorio es encontrar quistes y/o trofozoítos de *G. intestinalis* en las heces; trofozoítos en sondeo duodenal o de biopsia del intestino delgado, e indirectamente por captura de anticuerpos en suero, coproantígenos y secuencias de DNA específicas de *G. intestinalis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Kamath y Murugasu, 1974; Pickering, 1985; Hill, 1993; Faubert, 1996; Thompson, 2004).

Coproparasitoscópicos (CPS)

Esta técnica se encuentra catalogada como el estándar de oro. En pacientes con evacuaciones blandas o diarreicas se indica examen directo en fresco y hay mayor probabilidad de encontrar trofozoítos. Los CPS cualitativos de concentración, como flotación (sulfato de zinc) o sedimentación (formol-éter) se llevan a cabo en pacientes con evacuación de consistencia formada o semiformada y es muy posible encontrar quistes (Baker *et al.* 1987). La sensibilidad puede ser baja debido a la excreción intermitente de los quistes, por lo cual cuando se realizan los CPS la sensibilidad se incrementa al analizar varias muestras de diferentes días, con una muestra la sensibilidad es de 76 a 86%, con dos de 90% y con tres hasta

de 97.6%. Según estos datos, el número mínimo de estudios CPS para descartar la giardiosis es de tres. Si los resultados son negativos y el cuadro clínico es consistente con esta parasitosis, se deberá solicitar una serie de cinco (Hill, 1993) (Tabla 2).

Tabla 2. Prevalencia de *Giardia intestinalis* por CPS

Técnica	Población	Positivos	Prevalencia (%)	Autor
Solución salina	Niños (2-5 años)	34/105	32.3	Farooque <i>et al.</i> 2010
Formalina- acetato	Adultos	4/109	3.6	El-Badry <i>et al.</i> 2010
Formol-éter	Niños (413 niños y 400 niñas de 7- 12 años)	45/413 niños 69/400 niñas	10.9 en niños 17.2 en niñas	Ettehad <i>et al.</i> 2010
Ritchie	Niños (5-11 años)	80/200	40	Dueñas, 2001
Directo en fresco	Adultos	31/39	79	Janoff, 1989
Faust	Niños (5-14 años)	53/493	10.5	Devera <i>et al.</i> 1988
Formol-éter acetato	Niños (3-10 años)	37/518	7.1	Harter, 1982

Inmunológicos

Se utilizan para detección de anticuerpos en suero y antígenos en heces. La sensibilidad depende del antígeno, el tipo de anticuerpo (IgG, IgM, o IgA) y la técnica que se utilice: IFI, ELISA y Western blot (Faubert, 2000). Se ha detectado IgG en suero de pacientes giardiósicos después de dos semanas de la infección y hasta 15 meses después del tratamiento (Smith *et al.* 1981). Para la detección de coproantígenos se han utilizado varios kits que detectan al antígeno GSA-65 de trofozoíto y quiste de *G. intestinalis* con anticuerpos poli o monoclonales. La especificidad va del 80.8 al 100% y la sensibilidad del 88.75 al 100% (Tabla 3).

Tabla 3. Inmunodetección de coproantígenos de *Giardia intestinalis*

Técnica	Especificidad (%)	Sensibilidad (%)	Autor
Coproantígenos(AcMo)	100	98.9	Chakarova, 2010
Antígeno GSA-65 o CWP1	99	95	Fuentes <i>et al.</i> 2010
Coproantígenos (AcMo)	97	98	Schuurman <i>et al.</i> 2007
AcMo vs quiste	80.8	96.4	Doğrumax, <i>et al.</i> 2006
AcPo de conejo	95	100	Duque-Beltrán <i>et al.</i> 2002
Coproantígenos (AcMo)	88.75	100	Dueñas, 2001
Kit <i>Giardia</i> Microplate Assay (GSA-65) (AcMo)	95	100	Rocha <i>et al.</i> 1999
Kit Alexon ProSpecT <i>Giardia</i> EZ (AcMo)	95.7	100	Aldeen <i>et al.</i> 1998
Kit Alexon ProSpecT <i>Giardia</i> Rapid (AcMo)	90	100	Aldeen <i>et al.</i> 1998
Kit Alexon ProSpecT <i>Giardia</i> “Microplate” (AcMo)	100	100	Aldeen <i>et al.</i> 1998
Kit Alexon ProSpecT <i>Giardia</i> Microplate (AcPo)	100	100	Aldeen <i>et al.</i> 1998
Kit Cambridge Microwell ELISA (AcPo)	88.6	100	Aldeen <i>et al.</i> 1998
Kit Meridian Premier (AcPo)	92.9	100	Aldeen <i>et al.</i> 1998
Kit Trend <i>G. lamblia</i> Direct Detection System (AcPo)	98.6	99.3	Aldeen <i>et al.</i> 1998
Kit Trend <i>Giardia</i> Detection RS System (AcPo)	97.1	100	Aldeen <i>et al.</i> 1998
Coproantígenos (AcMo)	100	88.75	Romia, 1990
Kit AcMo vs quiste (CELISA)	100	95	Stibbs, 1989
Coproantígenos(AcPo)	98	100	Green, 1986
Coproantígenos(AcPo)	98	100	Green <i>et al.</i> 1985

Moleculares

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP) y la secuenciación de los genes que codifican para: glutamato deshidrogenasa (GDH), triosa fosfato isomerasa (TPI), giardinas y el gen de la pequeña subunidad de RNA ribosomal, factor de elongación y proteínas variables de superficie se han descrito ocho ensambles. Estas técnicas se utilizan con mayor frecuencia en estudios epidemiológicos y permiten conocer el ensamble infectante (Thompson, 2004).

2.13. Tratamiento

Existe controversia en proporcionar el tratamiento a pacientes asintomáticos de países en desarrollo (Gillin *et al.* 1988; Thompson *et al.* 1993); sin embargo, debe darse el tratamiento ya que independientemente del curso de la infección, los pacientes pueden tener daño en las microvellosidades y porque serán reservorios y diseminadores de quistes.

Hasta el momento no hay un anti giardiásico específico y los antiparasitarios utilizados han sido los derivados de la naranja de acridina, nitroimidazoles, nitrofuranos, bencimidazoles y nitrotiazol (Gardner y Hill, 2001; Harris *et al.* 2001; Mineno y Avery, 2003), los cuales producen efectos adversos y por su uso indiscriminado están apareciendo cepas resistentes. La nitazoxanida es un antiparasitario de amplio espectro, el primer informe de su uso en México es de 1997. La dosis en niños es de 200 mg dos veces al día por tres días, la eficacia es de 65 a 72% y con escasos efectos adversos. Se sugiere que el mecanismo de

acción es similar al observado con los nitroimidazoles como el metronidazol (Romero-Cabello *et al.* 1997; Rossignol *et al.* 2001; Ponce-Macotela *et al.* 2001; Cedillo-Rivera *et al.* 2002; Díaz *et al.* 2003; Müller *et al.* 2007).

Tratamientos alternativos

Debido a que se están seleccionando cepas resistentes y a que la mayoría de los fármacos producen efectos secundarios, se están investigando otras alternativas, las plantas son una fuente importante para la búsqueda de componentes activos, ya que 25% de los medicamentos utilizados a nivel mundial proviene de éstas. En México, en 1994, se publicó el primer estudio de plantas con actividad anti-giardiasis *in vitro* donde se probó el efecto de 14 plantas (*Justicia spicigera* (muicle), *Lipia berlandieri* (orégano), *Psidium guajava* (guayaba), *Punica granatum* (granado), *Mangifera indica* (mango), *Plantago major* (llantén mayor), *Cupressus sempervirens* (ciprés), *Castella tormentosa* (chaparro amargoso), *Hematoxylon campechianum* (palo de Campeche), *Prosopis juliflora* (mesquite), *Rizophora mangle* (mangle), *Oryza sativa* (arroz), *Capsicum annum* (pimiento), *Persea americana* (aguacate) (Ponce-Macotela *et al.* 1994). Se ha documentado que orégano, guayaba, muicle, ajo y geranio, entre otras, pueden ser buenos candidatos para la obtención de nuevos fármacos anti-giardiasis (Calzada *et al.* 1998; Harris *et al.* 2000; Ponce-Macotela *et al.* 2001; Ankli *et al.* 2002; Calzada *et al.* 2005; Ponce-Macotela *et al.* 2006).

2.14. Epidemiología

La giardiosis es una parasitosis re-emergente (Thompson, 2000). La OMS ha informado que en América, Asia y África hay 280 millones de personas con giardiosis sintomática y que se infectan 500,000 personas anualmente (WHO, 1996; Lane y Lloyd, 2002). En los países desarrollados la prevalencia es de 2 a 5% (Issac-Renton *et al.* 1993; Ortega y Adam, 1997) y en los países en desarrollo está entre 20 y 69% (Gilman *et al.* 1988). En México se documentó una frecuencia de 7.4 a 68% y en el 2002 se registraron 39 618 casos (Boletín Epidemiología, 2002). Debido a las diferencias en las condiciones sanitarias, en los países subdesarrollados es mayor la prevalencia que en los países desarrollados. En algunos países pobres, la giardiosis en niños afecta a cerca del 100% de la población (Luján, 2006).

El mecanismo de infección es el fecalismo y la transmisión fundamentalmente es por vía hídrica, toda vez que los cuerpos de agua se contaminan con heces humanas o de animales (Marshall *et al.* 1997). En estancias infantiles la infección sigue la ruta oral-fecal directa (Polis *et al.* 1986), además los niños que no controlan esfínteres o que se introducen en las piscinas pueden ser diseminadores de quistes (Hoque *et al.* 2001; Linane *et al.* 2001). Otras vías importantes son los manipuladores de alimentos, los transmisores mecánicos (*Musca domestica* y *Periplaneta americana*) y la transmisión sexual en homosexuales (Hill, 1993; Luján, 2006).

Esta parasitosis afecta de modo preferencial a la población infantil, es común en pacientes hipogammaglobulinémicos y turistas cuando viajan a países endémicos (Lo Galbo *et al.* 1982; Taylor *et al.* 1988; Hill, 1993; Marshall *et al.* 1997).

Además de infectar humanos, *G. intestinalis*, también infecta a animales domésticos y silvestres (Meloni *et al.* 1993; Xiao y Herd, 1994; Van Keulen *et al.* 2002; Appelbee *et al.* 2003; Thompson, 2004). Debido a que los trofozoítos y quistes obtenidos de diferentes hospederos mamíferos son morfológicamente indistinguibles, se han utilizado herramientas bioquímicas y de biología molecular para poderlos discriminar: análisis de antígenos de secreción y excreción de *G. intestinalis* (Nash *et al.* 1985a), isoenzimas (Meloni *et al.* 1988; Cedillo *et al.* 1989; Andrews *et al.* 1989; Homan *et al.* 1992; Moss *et al.* 1992; Mayrhofer *et al.* 1995), enzimas de restricción, hibridación (Nash *et al.* 1985b; Homan *et al.* 1992), cariotipos (Korman *et al.* 1992), huella génica (Carnaby *et al.* 1994; Hopkins *et al.* 1999), PCR-RFLP'S (Ey *et al.* 1992; Ey *et al.* 1993a; Ey *et al.* 1993b, Ponce-Macotela *et al.* 2002; Cedillo-Rivera, 2003; Read *et al.* 2004) y secuenciación (Monis *et al.* 1999).

Los aislados de *Giardia* de diferentes partes del mundo se han agrupado en diferentes Ensamblés (genotipos): Ensamblés A (AI y AII) y B con potencial zoonótico; Ensamblés C y D obtenidos de perros; Ensamble E de bovinos, caprinos, porcinos y equinos; Ensamble F en felinos y Ensamble G de ratas (Monis *et al.* 1996; Ey *et al.* 1996, Ey *et al.* 1997; Adam, 2001; Van Keulen *et al.* 2002; Monis *et al.* 1998; Monis *et al.* 1999). Últimamente se describió el Ensamble

H en vertebrados marinos: ballenas, focas, delfines y aves marinas (Lasek-Nesselquist *et al.* 2010).

La prevalencia de *G. intestinalis* en terneros menores de siete semanas de edad puede superar el 90%. También los bovinos adultos tienen alta prevalencia (50%); las hembras gestantes eliminan abundantes quistes al final de la gestación y durante los primeros días de lactancia. En los bovinos prevalece el ensamble E, pero, también se pueden infectar con los ensambles A y B. Se han documentado casos de infección con varios ensambles (E+A, E+B), de tal manera que, los animales son portadores y diseminadores de ensambles especie-específicos y zoonóticos. La infección por *G. intestinalis* en estos animales tiene un impacto negativo, porque les produce mala conversión de los alimentos; con las consecuentes pérdidas económicas a los productores (Geurden *et al.* 2008; Fonte y Ali, 2010; Otero-Negrete *et al.* 2011).

2.15. Prevención

La giardiosis en países desarrollados es epidémica y en países en desarrollo es endémica. Para prevenir es necesario dotar a todas las comunidades de servicios públicos adecuados como: drenaje, agua potable, y pavimento, además de instituir programas educativos nacionales para promover los hábitos de higiene personal.

Es necesario desinfectar todas las frutas y verduras que se consumen sin cocción. El método más seguro y económico de obtener agua para beber es la ebullición, la filtración es un método excelente ya que retiene los quistes de *Giardia* e incluso a bacterias enteropatógenas (Hill, 1993).

2.16 Anticuerpos Monoclonales

Los pioneros en la producción de anticuerpos monoclonales (AcMo) fueron Köhler y Milstein (1975); quienes obtuvieron hibridomas murinos productores de AcMo contra eritrocitos de carnero. Para la obtención de anticuerpos monoclonales se inmunizan ratones (BALB/c generalmente) contra el antígeno para el que se desea producir anticuerpos. Se monitorea la respuesta inmune mediante ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Se sacrifica al animal, se obtienen los linfocitos B del bazo y se fusionan con células de mieloma. Los hibridomas se clonan, seleccionan y aíslan (Potter, 1972). Los anticuerpos monoclonales (AcMo) son importantes porque presentan una infinidad de aplicaciones. Por inmunofluorescencia o inmunoelectrotransferencia se pueden detectar epítopes de antígenos para diagnóstico (Rodríguez-Ulloa y Rivera-Jacinto, 2011). También se pueden utilizar para inmunomarcaje, inmunohistoquímica, para colocalización de algunas proteínas etc.

3. Justificación

Giardia intestinalis (Syn: *G lamblia*, *G duodenalis*) es un parásito zoonótico que infecta a una gran cantidad de mamíferos incluido el hombre. Afecta fundamentalmente a la población infantil provocándole dolor abdominal, hiporexia, malabsorción intestinal y déficit cognitivo. Debido a que los trofozoítos y quistes del grupo morfológico *G. intestinalis* son morfológicamente semejantes se han utilizado técnicas moleculares para poder diferenciarlos, y mediante PCR-FRFLPs y secuenciación se han descrito ocho ensambles: A y B zoonóticos, C y D en caninos, E en ganado (bovinos, ovinos, caprinos, porcinos y equinos), F en felinos, G en ratas y H en mamíferos marinos. La obtención de herramientas inmunológicas, como el uso de anticuerpos monoclonales, podría ayudar en la caracterización y discriminación de los diferentes ensambles. En el Laboratorio de Parasitología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría se cuenta con un aislado de *G. intestinalis* que se obtuvo de un becerro perteneciente al ensamble E, por lo que resulta de interés contar con anticuerpos monoclonales contra la pared del quiste de este ensamble y evaluar su reactividad con otros ensambles. Hasta el momento no hay reportes de infección en humanos por el ensamble E.

4. Hipótesis

Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la pared de quistes de *Giardia intestinalis* ensamble E serán ensamble específicos.

5. Objetivo

Obtener anticuerpos monoclonales contra antígenos de quistes de *Giardia intestinalis* del ensamble E.

Objetivos Específicos

- Obtención de anticuerpos monoclonales contra quistes de *G. intestinales* ensamble E.
- Evaluación de la reactividad de los anticuerpos monoclonales contra quistes de *G. intestinales* de otros ensambles.

6. Material y Método

6.1 Aislado de *Giardia intestinalis*

Se trabajó con el aislado INP190310-F116 de *Giardia* que se obtuvo de un becerro de cinco días de edad, de la cuenca lechera de Tizayuca en el Estado de Hidalgo. Mediante técnicas moleculares se encontró que este aislado corresponde al ensamble “E” (Tesis del P MVZ Esteban Cruz Gómez. En redacción).

6.2 Mantenimiento de los trofozoítos en cultivo *in vitro*

Los trofozoítos se cultivaron en tubos de borosilicato de 13 x 100 cm³, con tapón de rosca, que contenía el medio de cultivo TYI-S-33, complementado con 10% de suero fetal de ternera (SFB) y 1.0 mg/mL de bilis bovina. Los tubos colocados en una gradilla con una inclinación de 10° se incubaron a 37°C.

El cultivo de trofozoítos funciona a base de un sistema cerrado, en donde no existe un aporte permanente de nutrientes; ni salida de células y excreciones. Por tal motivo, se agota el nutriente y se acumulan desechos, y la fase exponencial de crecimiento balanceado dura solo unas generaciones.

El crecimiento poblacional se divide en tres fases: A) fase “lag” o de ajuste metabólico, es el tiempo en el que el inóculo se adapta a las condiciones del medio. B) fase “log” se caracteriza por un crecimiento exponencial, los trofozoítos forman una monocapa sobre la pared del tubo. C) fase estacionaria es cuando la capacidad de carga de trofozoítos en el cultivo ha llegado a tope (el medio de

cultivo ya es inadecuado para el crecimiento celular), los trofozoítos se deforman, se hacen más grandes o se lisan.

Para el mantenimiento del cultivo de los trofozoítos *in vitro*, cada 36 h (fase log), una alícuota de 200 μ L se sembró en tubos con medio TYI-S-33 nuevo.

6.3 Obtención y cuantificación de trofozoítos *in vitro*

Para asegurarnos de la integridad de los trofozoítos, en todos los ensayos, solamente se utilizaron los que estaban formando monocapa y se eliminaron los que estaban en el sobrenadante (en división o deformes).

Para el conteo celular:

1. Al tubo con trofozoítos que tenía 70% de monocapa se le decantó el medio de cultivo y se le agregó solución salina de fosfatos (PBS) pH 7.5 estéril (apéndice).

Para despegar a los trofozoítos de la pared del tubo, éste se incubó en hielo frape durante 15 min y se centrifugó a 2500 rpm/10 min. El sobrenadante se decantó y el paquete celular se colocó en un tubo Eppendorf con 1 mL de PBS estéril 1X.

2. El tubo Eppendorf que contenía los trofozoítos se colocó en hielo frape durante 10 min. Se homogeneizó y una alícuota de 100 μ L se colocó en otro tubo Eppendorf que contenía 900 μ L de PBS y que se mantuvo en hielo frape durante 5 min. Posteriormente el tubo se homogeneizó y una alícuota de 10 μ L se depositó

en cada lado de la cámara de Neubauer. Por capilaridad la muestra cubre el área de conteo.

3. La cuantificación de trofozoítos (refringentes) se hizo con iluminación en contraste de fases con el objetivo de 10X. Por regla general se leyeron los cuatro cuadrantes externos y el central de la cámara (10 cuadrantes en total) y solamente se cuantificaron las células que se encontraban dentro de los cuadrantes y que no tocaran la segunda línea (Fig. 6).

4. Se obtuvo el promedio de células de los dos lados de la cámara, se multiplicó por el factor de dilución (10^4), y el valor se multiplicó por la cantidad de mililitros del medio de cada tubo.

5. Se cuantificaron 2 tubos de cada lote (cada lote constó de 10 tubos) y se determinó el promedio de cada tubo.

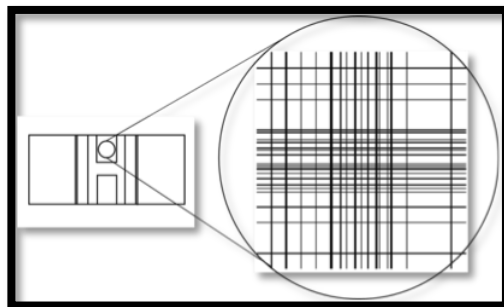


Figura 6. Esquema de la cámara de Neubauer.

6.4 Enquistamiento *in vitro* del aislado INP190310-F116

Para el enquistamiento se siguió el método propuesto por Gillin *et al.* (1988). Aproximadamente 100, 000 trofozoítos se sembraron en medio de cultivo TYI-S-33 pH 7.0, 10% de SFB y antibióticos; se incubaron a 37°C hasta la obtención de la fase log (36h). A los tubos que tenían 70% de monocapa se les decantó el medio, se reemplazó con medio de enquistamiento TYI-S-33 modificado; pH 7.8 y 7.0 mg/mL bilis bovina, adicionado con 10% de SFB y antibióticos. El experimental se repitió cinco veces (10 tubos/lote). Los tubos se incubaron a 37°C/48 h.

Para aumentar el número de quistes se modificó el medio. Se realizaron los experimentos con 10 tubos/lote y el procedimiento se repitió 10 veces. Aproximadamente 100, 000 trofozoítos se sembraron en medio de cultivo TYI-S-33 pH 7.0, 10% de SFB y antibióticos, se incubaron a 37°C hasta la obtención de la fase log (36h). A los tubos que tenían 70% de monocapa se les decantó el medio, se reemplazó con medio de enquistamiento TYI-S-33 modificado, pH 7.8, 7.0 mg/mL de bilis bovina y sin citrato férrico de amonio (apéndice), los tubos se incubaron a 37°C/48 h.

Los tubos se centrifugaron a 2500 rpm/10 min, el medio se decantó y se les adicionó el PBS pH 7.0 estéril, los tubos se homogeneizaron y se volvieron a centrifugar. Este procedimiento se repitió tres veces.

Posteriormente a los tubos se les agregó agua destilada estéril, pH básico (pH 11) (apéndice) para lisis a los trofozoítos que no se enquistaron y se centrifugaron a 2500 rpm/10 min.

El sobrenadante se decantó y el precipitado se colocó en un tubo Eppendorf con un volumen final de 1000 μ L de agua destilada estéril. Los quistes se cuantificaron en una cámara de Neubauer. Del tubo Eppendorf que contenía los quistes se tomó una alícuota de 100 μ L y se depositó en otro tubo que contenía 900 μ L de agua destilada estéril. De éste se tomaron 10 μ L, se pusieron en la cámara y la lectura se hizo como se describió en la sección 6.3. Los quistes se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Bajo iluminación de contraste de fases los quistes viables se ven ovoides y refringentes (el contorno del quiste brilla, el interior se ve de color azul, el centro de color café).

Los quistes obtenidos *in vitro* se dividieron en dos lotes:

1. Inoculación de quistes a ratones BALB/c para la obtención de los AcMo.
2. Para sensibilizar las placas de ELISA empleadas en la determinación de los títulos de los sueros obtenidos de los ratones inoculados con quistes del ensamble E.

6.5. Obtención de antígenos proteicos de trofozoítos en fase de enquistamiento *in vitro*

Trofozoítos de los aislados WB (cepa de referencia), INP-GVH (obtenido de un paciente pediátrico, Ensamble AII), INP-VMRDT (obtenido de un paciente pediátrico, Ensamble B) e INP190310-F116 de *G. intestinalis* se procesaron para la obtención de antígenos proteicos de la fase de enquistamiento.

A un tubo de cada uno de los aislados en fase log se le decantó el medio de cultivo, se reemplazó por medio de enquistamiento y se incubaron a 37°C/18 h (las vacuolas con proteínas de quiste son visibles a este tiempo).

Para desprender a los trofozoítos que se encontraban en fase de activación, los tubos se colocaron en hielo frape por 15 min, se centrifugaron a 2 500 rpm/10 min, el medio se decantó y el paquete celular se resuspendió en PBS. Los trofozoítos se lavaron tres veces mediante centrifugación a 2 500 rpm/ 10 min, y las células se llevaron a un volumen final de 100 µL.

Los trofozoítos se lisaron mediante cinco ciclos de congelación/descongelación; posteriormente se centrifugaron a 11000 rpm/10 min/4°C, el sobrenadante con inhibidores de proteasas se puso en un tubo Eppendorf y se almacenó a -70°C hasta su uso.

Se obtuvo una alícuota del sobrenadante de cada aislado y se cuantificó por el método de Bradford (1976).

6.6. Estandarización de la ELISA

1. En placa de ELISA de 96 pozos de poliestireno se colocaron 100 quistes viables del aislado INP190310-F116 por pozo (100 quiste/10 μ L de agua destilada estéril). Los quistes se fijaron a la placa con 50 μ L de metanol y se dejó evaporar el metanol a temperatura ambiente/1h.
2. Las placas se lavaron tres veces con 200 μ L/pozo de solución de lavado PBS-Tween 20 al 0.05% durante 5 min. En cada lavado se retiró el exceso de líquido y se secó con una gasa.
3. Se colocaron 200 μ L/pozo de solución bloqueadora (PBS-Tween 20 al 0.05% y leche descremada al 5%), se incubaron a 37°C/30 min. Posteriormente se eliminó el contenido y con una gasa se secó el exceso.
4. Las placas se lavaron tres veces, en cada lavado se retiró el exceso de líquido con una gasa.
5. A) Para la respuesta inmune del ratón inoculado con quistes de *Giardia* se colocó el suero con una dilución 1:500; B) Para la titulación fueron diluciones dobles seriadas del suero y se inició con 1:500 hasta 1:16000; y, C) Para los AcMo se agregó el sobrenadante (después de tres días de crecimiento) del pozo que contenía el hibridoma. En los tres casos las placas se incubaron a 4°C toda la noche. Las placas se lavaron tres veces, como se describió anteriormente.
6. A cada pozo se le pusieron 100 μ L del conjugado (anti IgG de ratón acoplado a peroxidasa) en una dilución 1:5000 en PBS Tween 20 al 0.05%. Se incubó a 37°C/2 h. Se lavaron tres veces.

7. En cada pozo se colocaron 100 μL de la solución cromógeno/sustrato (solución reveladora BioRad, apéndice) en una dilución 1:9. Se incubaron a temperatura ambiente (en oscuridad)/15 min.
8. La reacción enzimática se paró con 100 μL /pozo de H_2SO_4 2N (apéndice).
9. Finalmente las absorbancias de las placas se leyeron en un lector de ELISA a 450 nm.

6.7. Inmunización de ratones para la obtención de anticuerpos monoclonales (AcMo)

Dos ratones hembras de la cepa BALB/c, de cuatro semanas de destete, donados por el Laboratorio de Producción de Anticuerpos Monoclonales del InDRE, se inmunizaron con 1×10^6 quistes del ensamble E con adyuvante completo de Freud (1:1) por vía intraperitoneal. Después de 15 días de la primera inmunización se dieron otras cuatro inmunizaciones con 1×10^6 quistes con adyuvante completo de Freud (2:1), con espacio de, 15, 8 y 7 días entre la segunda, tercera y cuarta inmunización respectivamente. Para monitorear la respuesta inmune de los ratones, antes de cada inoculación se obtuvieron 200 μL de sangre de la vena caudal. La sangre se centrifugó a 11 000 rpm/10 min y se obtuvieron 30 μL de suero de cada muestra. Éstos se alicuotaron en tubos Eppendorf de 250 μL y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

6.8. Producción de anticuerpos monoclonales (AcMo)

6.8.1 Descongelación de células de mieloma (X63Ag8.653)

Un vial de la línea celular de mieloma X63Ag8.653 (donada por el Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales del InDRE) se descongeló en baño de agua a 37 °C con agitación suave, manteniendo la junta teórica y tapa fuera del agua (para evitar contaminación). La descongelación fue de aproximadamente 2 min. El vial se retiró del baño de agua y en una campana de flujo laminar se desinfectó con etanol al 70%. El contenido del vial se transfirió a un tubo que contenía 9 mL de medio DMEM sin suero fetal bovino (SFB). Se centrifugó a 1250 rpm/10 min. El precipitado celular se resuspendió en medio DMEM con SFB (10%), se distribuyó en botellas de cultivo de 75 cm³ y se incubó a 37°C en una atmosfera de 5% de CO₂ y 95% de aire.

6.8.2. Mantenimiento de las células de mieloma (X63Ag8.653)

El manejo de los cultivos de la línea celular fue en ambiente estéril (campana de flujo laminar).

1.- Las células de mieloma en medio DMEM enriquecido con 10% de SFB (apéndice) se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con una mezcla de 95% aire y 5% de CO₂.

2.- Los cultivos se revisaron diariamente en un microscopio invertido para ver la morfología celular y posible contaminación bacteriana o fúngica.

3- El medio de cultivo se cambió cuando las células llegaron a su proliferación máxima o cuando el medio viró de color rojo a naranja o amarillo, lo cual se interpretó como cambio en el pH por acidificación).

6.8.3. Preparación de las células de mieloma para la fusión.

1.- Las células de mieloma se mantuvieron en crecimiento exponencial en medio DMEM con antibióticos y con SFB 10%.

2.- Aproximadamente 5×10^6 células se pusieron en botellas de cultivo de 75 cm^3 con 20 mL de medio DMEM con antibióticos y SFB 10% y se incubaron a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO_2 durante 24 h.

3.- Al momento de hacer la fusión las células se resuspendieron con agitación suave; posteriormente, con una pipeta de 5 mL, la suspensión se colocó en un tubo de 50 mL y se centrifugó a 1 200 rpm/10 min/ 37°C . El sobrenadante se eliminó y el precipitado celular se resuspendió en medio DMEM con antibióticos y sin SFB (listas para la fusión).

6.8.4. Preparación de células de bazo de ratón

1.- El ratón con el título de anticuerpos más alto se sacrificó por dislocación cervical. Dentro de la campana de flujo laminar se hizo la asepsia del ratón introduciéndolo en etanol al 70%, se hizo una incisión longitudinal de la piel del abdomen y del peritoneo. Se extrajo el bazo (el material quirúrgico que se utilizó para abrir la piel, no se usó para la obtención del bazo) y se colocó en un cuadro

de tela de organza estéril contenida en una caja Petri estéril con aproximadamente 5 mL de medio DMEM con antibióticos y sin SFB.

2.- El bazo envuelto totalmente en la tela de organza se presionó suavemente con ayuda del embolo de una jeringa estéril para disgregar el tejido.

3.- Las células se resuspendieron con una pipeta Pasteur estéril. La suspensión celular se colocó en medio DMEM con antibióticos y sin suero en un tubo de 50 mL. Se centrifugó a 1 100 rpm/10 min/37°C. El sobrenadante se desechó y el precipitado celular se resuspendió en 25 mL de medio DMEM con antibiótico y sin SFB, y se mantuvieron en la campana de flujo laminar hasta su uso.

6.8.5. Fusión celular

1.- Las células de bazo y las de mieloma se mezclaron en una relación 5:1 (5 células de bazo por 1 célula de mieloma) en un tubo de 50 mL con medio DMEM con antibióticos y sin SFB. Se centrifugó a 1200 rpm/5 min. El sobrenadante se eliminó y las células se disgregaron suavemente.

2.- Por cada 60 millones de células se agregaron 0.5 mL de polietilenglicol (PEG al 42%) agitando suavemente, a 37°C y en un tiempo de 60 segundos.

3.- Se agregaron gota a gota 5.0 mL de medio DMEM con antibióticos y sin SFB, agitando suavemente en un lapso de tres minutos. Adicionalmente se pusieron otros 15 mL del mismo medio, en un lapso de 1 min. Se centrifugó a 1 200 rpm/10 min/ 37°C. El sobrenadante se eliminó y el paquete celular se resuspendió en medio DMEM con antibióticos, con 10% de SFB y adicionado con HAT.

- 4.- En placas de cultivo de 96 pozos se colocaron 200 μ L (de la suspensión celular)/pozo y se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 95% de aire y 5% de CO₂.
- 5.- Las cajas se revisaron diariamente para identificar los pozos con híbridos viables, contaminación o para el cambio de medio.
- 6.- Diez días después de la fusión se realizaron cambios a medio HT por 5 días. Posteriormente las células se mantuvieron en medio DMEM con antibióticos y SFB al 10%.
- 7.- La presencia de híbridos productores de anticuerpos se determinó mediante el análisis de los sobrenadantes por ELISA.

6.8.6. Clonación celular por dilución limitante

- 1.- En la fila A de la placa de cultivo de 96 pozos se colocaron 100 μ L de medio de cultivo DMEM-SFB (10%). En la posición A1 se depositaron 100 μ L del pozo con los hibridomas productores de anticuerpos. A partir de ésta se hicieron diluciones doble seriadas hasta el final de la fila. Se incubaron durante 10 min, con empleo de un microscopio invertido se contaron las células de cada pozo. El pozo con 30-40 células se diluyó en 18 mL de medio DMEM-SFB (15%).
- 2.- De la suspensión celular se sembraron 200 μ L/pozo en las siete filas restantes de la placa y se incubaron a 37°C (95% de aire y 5% de CO₂)/una semana. Posteriormente, se revisaron los pozos y se seleccionaron los que presentaron cúmulos de células.

3.- Los sobrenadantes de los pozos con cúmulos de células se probaron con el ELISA para la detección del AcMo.

4.- Las clonas positivas se sub-clonaron, se expandieron y se crio-preservaron.

6.8.7. Criopreservación de hibridomas

Para contar con una reserva de células, varias alícuotas se criopreservaron en nitrógeno líquido.

Se preparó una suspensión de 5×10^6 células y se centrifugó a 1200 rpm/10 min. El sobrenadante se desechó y el paquete celular se resuspendió en un vial con 2 mL de la solución para criopreservación. El vial se envolvió en una capa de algodón de un centímetro de espesor, se colocó en una caja de poliuretano a -70°C por 24h y posteriormente se transfirió a un tanque con nitrógeno líquido.

6.9. Electroforesis

Se prepararon geles de acrilamida para la electroforesis (apéndice) y Western blot. En cada pozo se pusieron 10 μg de los extractos totales solubles obtenidos de trofozoítos activados para enquistamiento de los aislados WB (cepa de referencia), INP-GVH, INP-VMRDT, INP190310-F116 y marcadores de peso molecular preteñidos (SIGMA). El corrimiento electroforético fue a: 50 volts, 50 watts y 20 miliAmp/5 h. El gel se tiñó con 100 mL de azul de Coomasie R-250 (apéndice) a 4°C toda la noche. Posteriormente el colorante se eliminó y el gel se puso en

solución decolorante (apéndice). Se colocó en celofán y se secó en un secador de geles (BioRad Model 543 Gel Dryer) por 1h.

6.10. Western blot

Dos geles con las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 100 volts, 40 watts y 400 miliAmp por 1h. Se cortó la membrana de NC en tiras que correspondían a los carriles del gel. Las tiras de los marcadores de peso molecular se cortaron y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Las tiras restantes se bloquearon (50 mL de PBS Tween 20 al 0.05% y 5% de leche descremada) (apéndice) durante 2 h/37°C. Se lavaron tres veces con PBS-Tween 20 al 0.05%.

Se probaron cuatro tiras con el suero hiperinmune en una dilución 1:4000 en PBS-Tween 20 al 0.05%. Otras cuatro se colocaron en 30 mL de sobrenadante de hibridoma 4D6C10B2C10C9 y las últimas cuatro con suero preinmune en una dilución 1:4000 en PBS Tween 20 al 0.05% a 4°C toda la noche. Se realizaron tres lavados por separado con PBS-Tween 20 al 0.05% a temperatura ambiente con agitación suave.

Posteriormente, por separado, las tiras se colocaron con el conjugado (anti-IgG de ratón-peroxidasa) en una dilución de 1:5000 en PBS-Tween 20 al 0.05% durante 2 h/37°C. Se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 al 0.05% con agitación ligera.

Finalmente las 12 tiras se revelaron con solución cromógeno-sustrato DAB (3.3' Diaminobenzidina) (apéndice) durante 2 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con agua destilada.

7. Resultados

7.1. Cultivo *in vitro* del aislado INP190310-F116 de *Giardia intestinalis*

Los trofozoítos de *G. intestinalis* en medio de cultivo TYI-S-33, en fase “log” se distribuyeron y adhirieron a la pared del tubo formando monocapa en algunos sitios (Fig. 7). El aislado presentó un crecimiento muy lento y sólo se obtuvo aproximadamente el 70% de monocapa en el tubo.

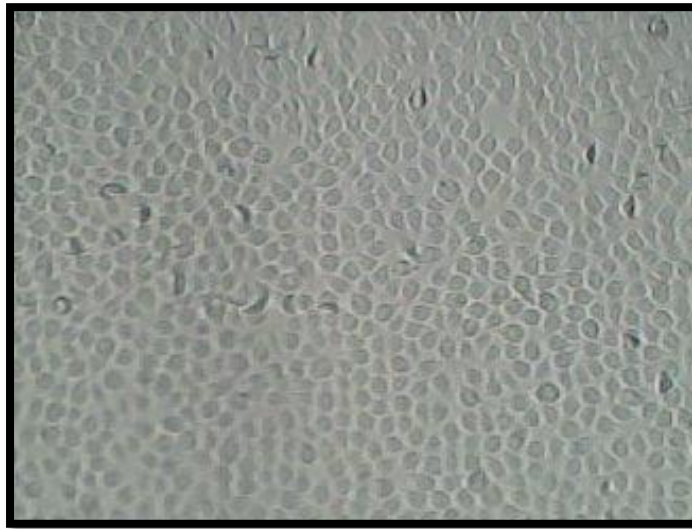


Figura 7. Microfotografía de trofozoítos del aislado INP190310-F116 de *G. intestinalis* formando monocapa en una región del tubo de cultivo.

7.2. Obtención de quistes *in vitro* del aislado INP190310-F116 de *G. intestinalis*.

Los trofozoítos se cuantificaron en una cámara de Neubauer (Fig. 8), un promedio de 4, 627, 000 células se sometieron al enquistamiento en medio TYI-S-33 pH 7.8, bilis bovina (7 mg/mL) y citrato férrico de amonio (0.03 mg/mL), la producción de

quistes fue del 2.146 % con un mínimo de 1.32 % y un máximo de 3.11 % (Tabla 4).

Por otro lado, cuando los trofozoítos (en promedio 4,855,200 células) se sometieron al enquistamiento en el medio TYI-S-33 modificado (pH 7.8, bilis bovina 7 mg/mL y sin CFA) (Fig. 9) se obtuvo el 10.073% de quistes, con un mínimo de 6.94 % y un máximo del 13.46% (Fig.10) (Tabla 5). Se notó una clara diferencia en el porcentaje de enquistamiento cuando no se le adicionó citrato férrico de amonio.

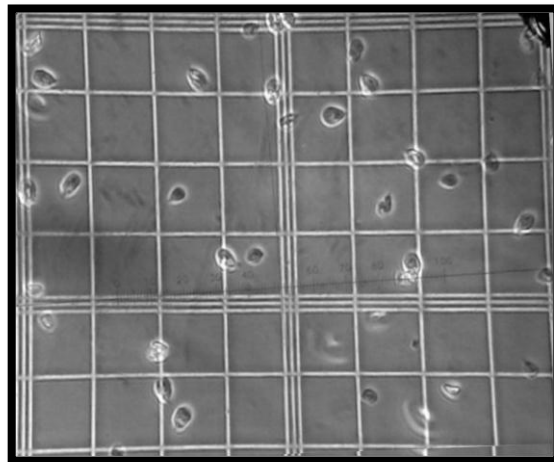


Figura 8. Microfotografía de trofozoítos en una cámara de Neubauer. 40X



Figura 9. Microfotografía que muestra una panorámica de trofozoítos y quistes en el tubo de cultivo TYI-S-33 para enquistamiento.



Fig.10. Microfotografía que muestra un quiste producido *in vitro* (40X) en medio de enquistamiento modificado (TYI-S-33, pH 7.8 y 7.0 mg/mL).

Tabla 4. Porcentaje de quistes del aislado INP190310-F116 obtenidos *in vitro* en medio de enquistamiento

No. de lote	Trofozoítos promedio/tubo	Quistes promedio/tubo	Enquistamiento (%)
1	5,072,000	128,000	2.52
2	5,024,000	96,000	1.91
3	4,272,000	80,000	1.87
4	3,632,000	48,000	1.32
5	5,136,000	160,000	3.11

Tabla 5. Porcentaje de quistes del aislado INP190310-F116 obtenidos *in vitro* en medio de enquistamiento modificado

No. de lote	Trofozoítos promedio/tubo	Quistes promedio/tubo	Enquistamiento (%)
1	5,216,000	464,000	8.89
2	5,392,000	592,000	9.86
3	4,896,000	496,000	10.13
4	4,800,000	448,000	9.33
5	5,824,000	784,000	13.46
6	5,680,000	672,000	11.83
7	5,456,000	560,000	10.26
8	5,072,000	496,000	9.77
9	5,760,000	400,000	6.94
10	4,560,000	464,000	10.26

7.3. Obtención de proteína soluble de pared de quiste de los aislados WB, GVH, VMRDT e INP190310-F116 de *G. intestinalis*

Los trofozoítos de los aislados WB (cepa de referencia. Ensamble AI), GVH (obtenido de un paciente pediátrico. Ensamble AII), VMRDT (obtenido de un paciente pediátrico. Ensamble B) y F116 (obtenido de un becerro, Ensamble E) se sometieron al enquistamiento durante 18 h para la obtención de una mayor cantidad de proteína formadora de quistes (Fig. 11).

La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford y la concentración fue de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el aislado WB (cepa de referencia), 70.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el INP-GVH, 143.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para INP-VMRDT y 160.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para INP190310-F116.

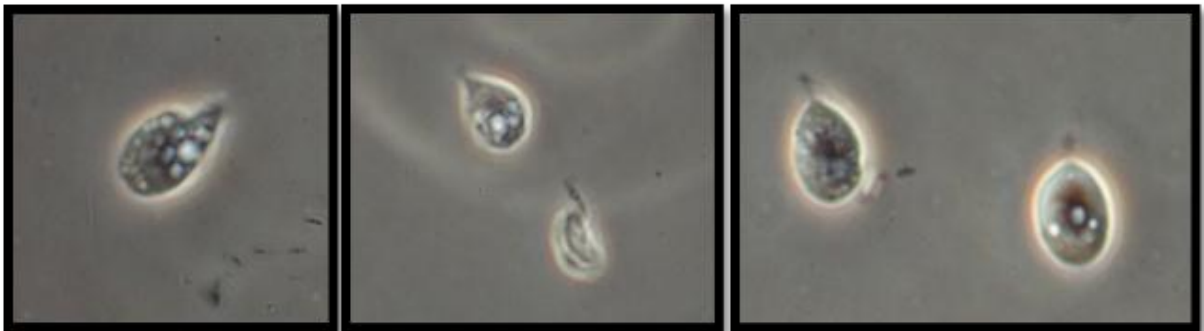


Figura 11. Microfotografía de trofozoítos del aislado INP190310-F116 de *G. intestinalis* en proceso de enquistamiento. Se observan trofozoítos llenos de vesículas o vacuolas. Iluminación en contraste de fases. 40X

7.4. Obtención de los anticuerpos monoclonales

7.4.1. Monitoreo de la respuesta inmune de los ratones inmunizados.

Para monitorear la dinámica de la respuesta inmune de los dos ratones inoculados con quistes del aislado INP190210-F116, los sueros de los 0, 7, 15, 23, 31, 39 y 47 días post-inoculación se analizaron mediante el test de ELISA. El suero del ratón 1 presentó una absorbancia por arriba del valor de corte ($DO = 0.448$) a los 23 días (con dos inoculaciones) y subió hasta una absorbancia de 1.2 a los 47 días. La respuesta inmune del ratón 2 siempre fue baja (Fig. 12).

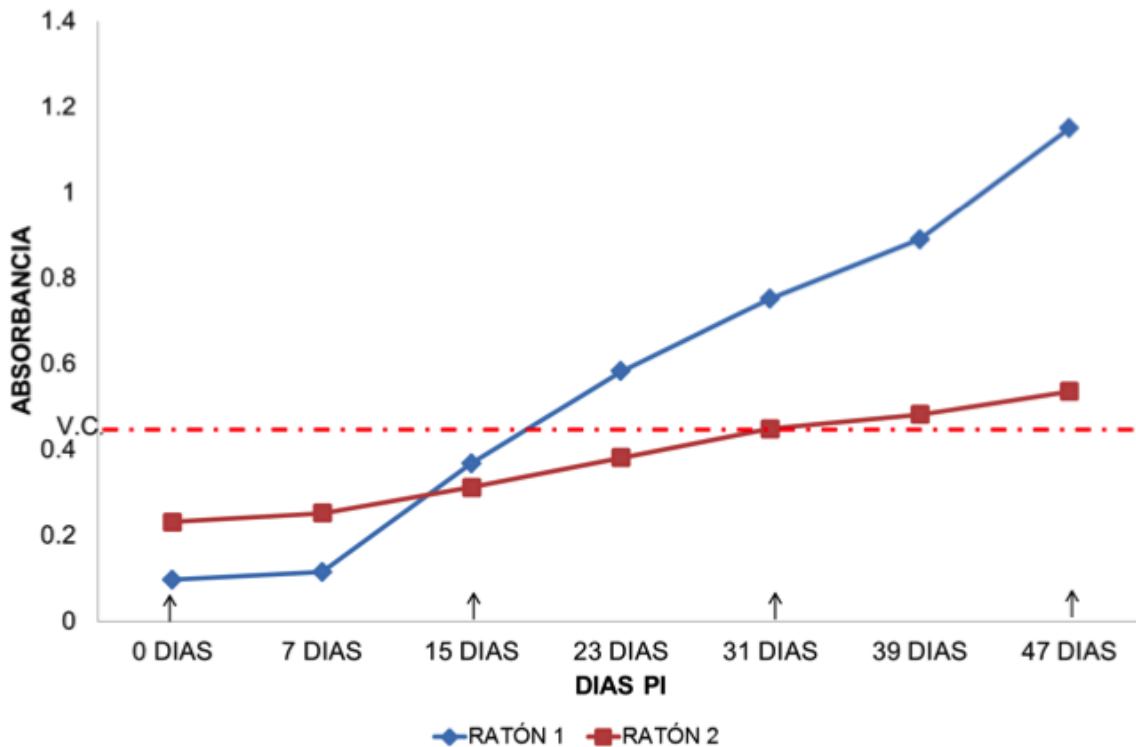


Figura 12. Detección de IgG en los sueros de los ratones inoculados con quistes del aislado INP190319-F116 de *G. intestinalis*. VC: valor de corte que se obtuvo con el promedio de las absorbancias de los sueros de los dos ratones en el tiempo 0 más 3 veces su desviación estándar. Flechas: días de inoculación.

7.4.2. Titulación de anticuerpos por ELISA.

Con el suero que se obtuvo del día 47, se hizo la titulación de anticuerpos, con diluciones que fueron desde 1:500 hasta 1:16000. El suero del ratón 1 siguió positivo con la dilución 1:4000. El suero del ratón 2 ya no fue positivo con la dilución 1:2000 (Fig. 13).

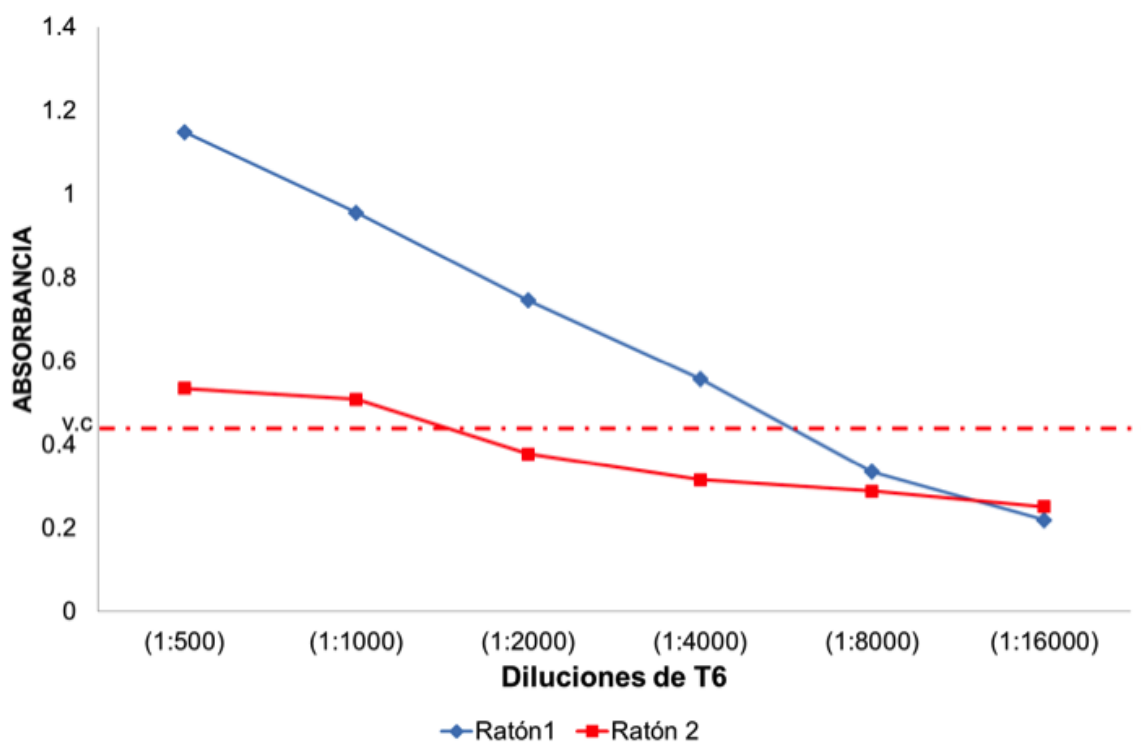


Figura 13. Titulación de los sueros de los ratones (día 47). VC: valor de corte. Se observa una marcada diferencia en las absorbancias.

7.5. Producción y obtención de anticuerpos monoclonales

Para la fusión celular se seleccionó al ratón 1 porque tuvo el título más alto de anticuerpos dirigidos contra los quistes del aislado INP190310-F116. Las células se cultivaron en pozos de cuatro cajas de 96 pozos. Solamente en la caja número cuatro se encontraron hibridomas viables (Fig. 14).

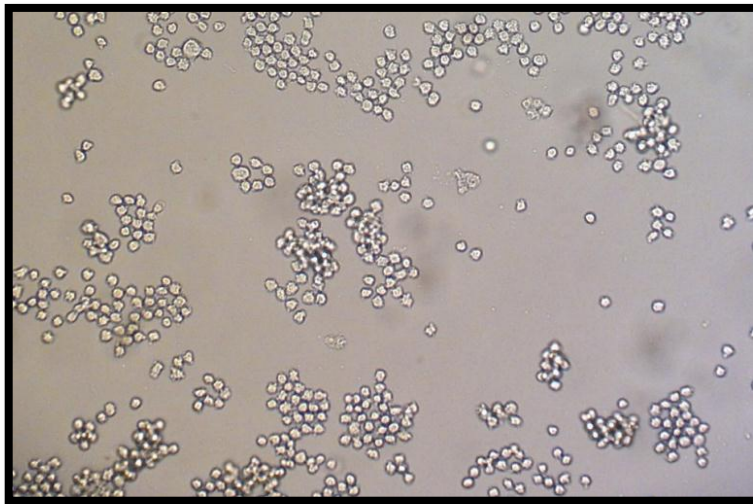


Figura 14 .Microfotografía de los hibridomas después de ocho días de la fusión celular (mieloma/célula de bazo). 20X

De la caja número cuatro se analizaron, por ELISA, los sobrenadantes de cada uno de los pozos que tuvieron hibridomas. En dos pozos se encontraron hibridomas productores de anticuerpos anti *G. intestinalis* INP190310-F116 (Fig. 15).

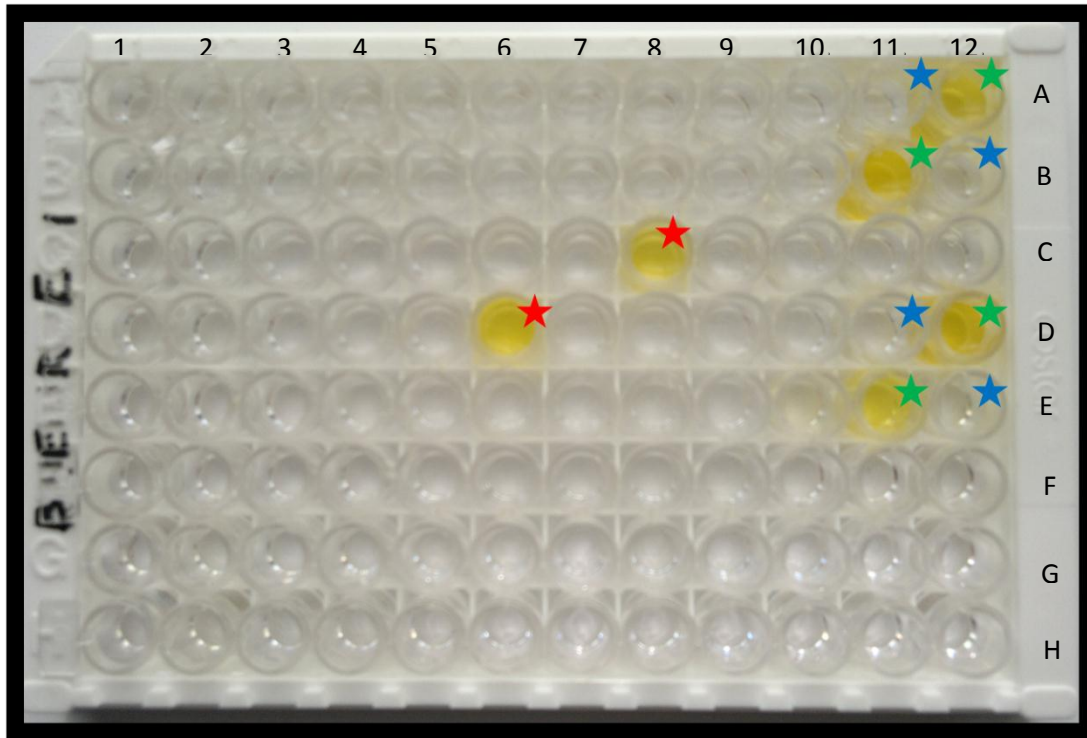


Figura 15. ELISA de los pozos que presentaron crecimiento de hibridomas contra proteínas de pared de quiste del aislado INP190310-F116 de *G. intestinalis*. Los pozos 4C8 y 4D6 con absorbancias por arriba del valor de corte (★). Control positivo (★) (suero hiperimmune). Control negativo (★) (suero preimmune).

Los sobrenadantes de los pozos 4C8 y 4D6 dieron una absorbancia de 0.465 y 0.542 respectivamente y estuvieron por arriba del valor de corte (0.448) (Fig. 16).

Para la primera clonación se utilizaron los hibridomas del pozo 4D6. Se encontraron tres pozos (4D6C10, 4D6D3 y 4D6E10) con hibridomas productores de anticuerpos con absorbancias de 0.496, 0.589 y 0.478 respectivamente y que estuvieron por arriba del valor de corte (0.448) (Fig. 17).

Se realizaron cuatro clonaciones y algunos hibridomas se perdieron durante el proceso. En el tamiz de la última clonación, solamente la clona 4D6C10B2C10C9 fue la productora del anticuerpo (Fig. 18). Esta clona se cultivó en cajas de cultivo de 75 cm³ para obtener mayor cantidad del anticuerpo monoclonal (Fig. 19).

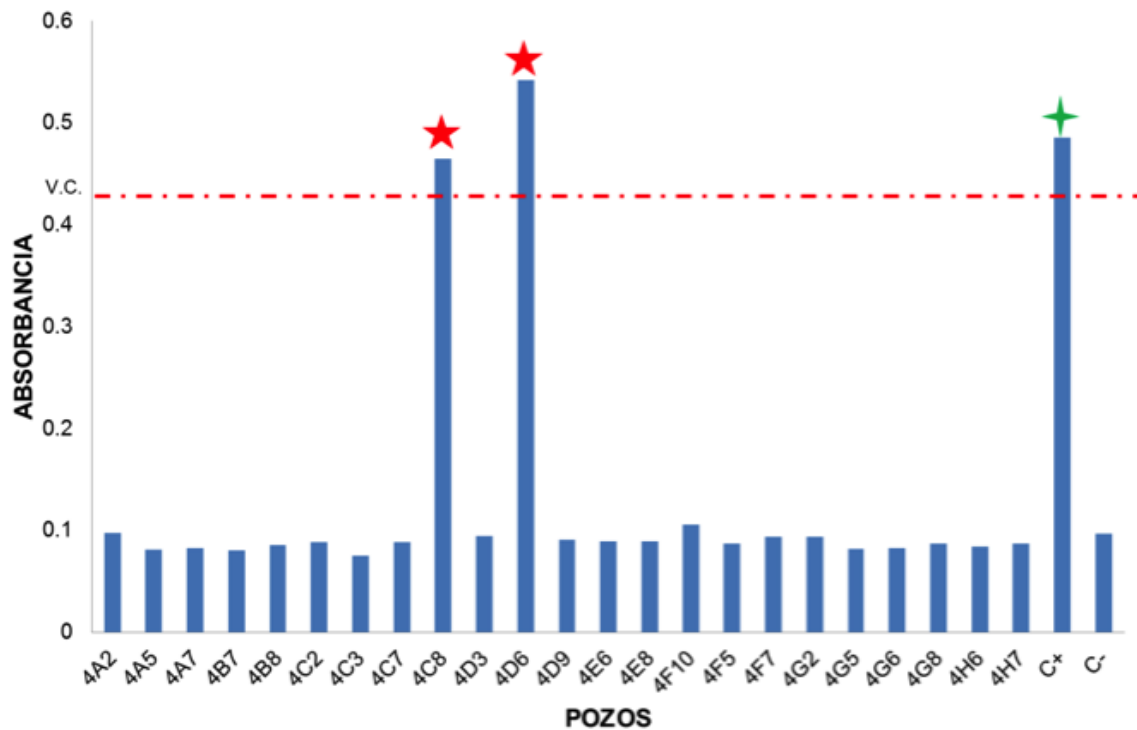


Figura 16 Tamiz de los pozos con hibridomas productores de anticuerpos anti proteínas de pared de quiste del aislado INP190310-F116 de *G. intestinalis*. Los pozos 4C8 y 4D6 (★) con absorbancias por arriba del valor de corte. C+: control positivo (suero hiperimmune 1:5000), C-: control negativo (suero preimmune). VC: valor de corte 0.448.

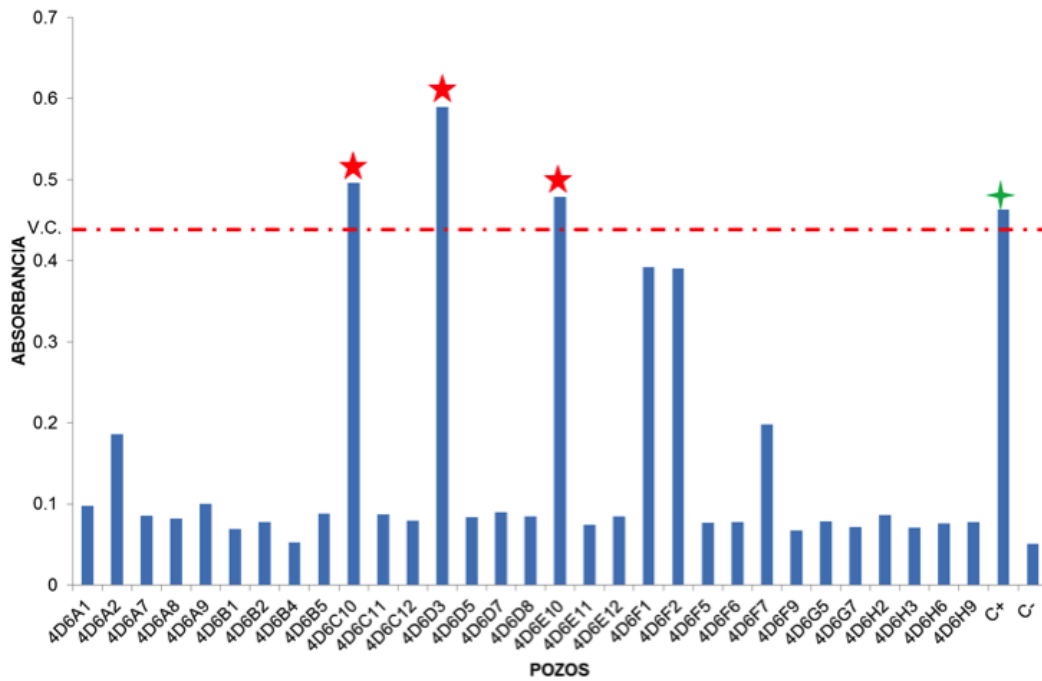


Figura 17. Clonación del pozo 4D6 que contenía los hibridomas productores de anticuerpos. Como se puede observar en este tamiz 4D6C10, 4D6D3 y 4D6E10 (★) presentaron absorbancias por arriba del valor de corte. C+: control positivo (suero hiperinmune 1:5000). C-: control negativo (suero preinmune). V.C: valor de corte.

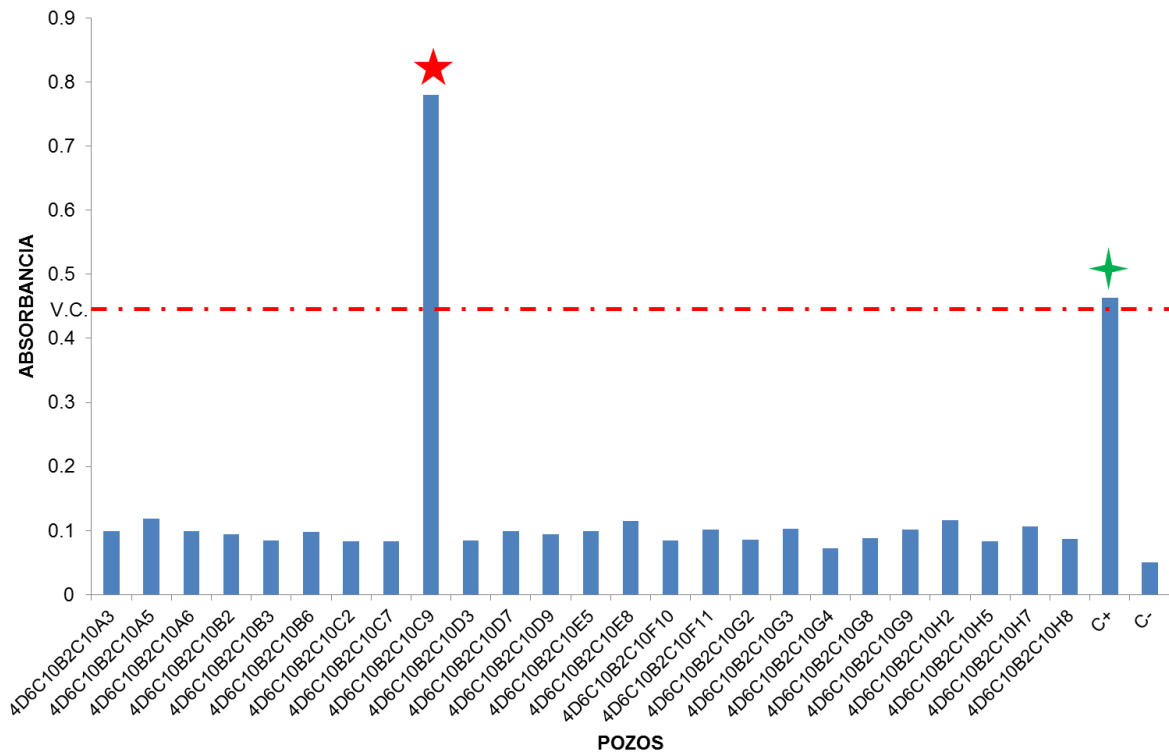


Figura 18. Tamiz de los pozos productores de anticuerpo. La clona 4D6C10B2C10C9 (★) con una absorbancia de 0.779. C+: control positivo suero hiperinmune 1:5000. C-: control negativo suero preinmune. V.C: valor de corte 0.448.

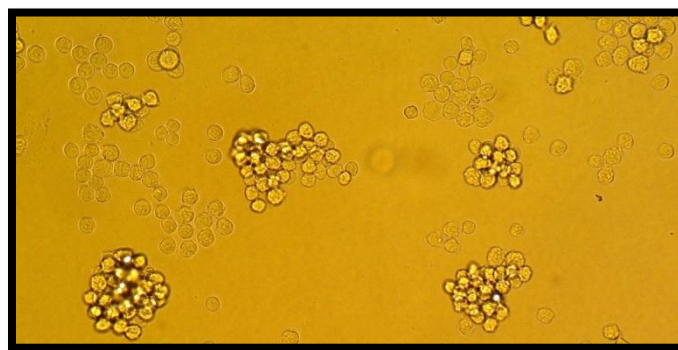


Figura 19. Microfotografía de los hibridomas de la clona 4D6C10B2C10C9 en fase de crecimiento (40X).

7.6. Electroforesis

En la electroforesis de las proteínas de trofozoítos activados para enquistamiento de los aislados: WB (cepa de referencia. Ensamble AI), INP-GVH (obtenido de un paciente pediátrico. Ensamble AII), INP-VMRDT (obtenido de un paciente pediátrico. Ensamble B) e INP-F116 (obtenido de un becerro, Ensamble E) se observaron bandas desde 20-150 kDa (Fig. 20).

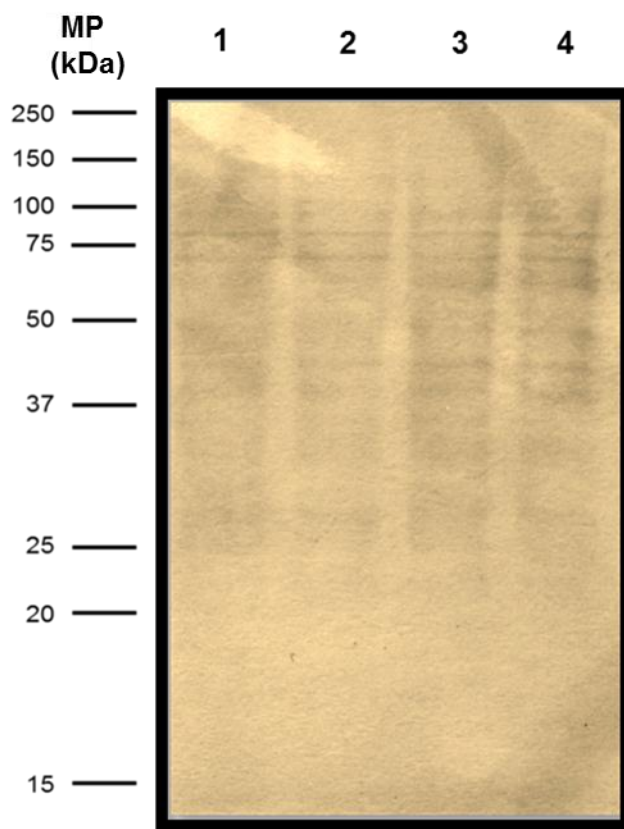


Figura 20. Electroforesis de proteínas de trofozoítos activados para enquistamiento (10 μ g por carril). MP) marcador de peso (kDa). 1) Cepa de referencia (WB), 2) INP-GVH (paciente pediátrico), 3) INP190310-F116 (aislado de becerro) y 4) INP-VMRDT (paciente pediátrico).

7.7. Western blot

En el western blot con las proteínas de trofozoítos activados para enquistamiento de los cuatro aislados (WB, GVH, F116 y VMRDT) y el sobrenadante de la clona 4D6C10B2C10C9 (formadora de anticuerpos anti *Giardia*) se encontró una banda muy marcada de ≈ 71 kDa. Se observó un grupo de bandas de menor peso correspondiente a ≈ 62 , ≈ 44 , ≈ 49 , ≈ 51 y ≈ 30 kDa. También se observaron bandas tenues de mayor peso, desde ≈ 85 a ≈ 181 kDa. En el suero hiperinmune (1:5000) que se evaluó también con proteínas de los trofozoítos activados prevalecieron las bandas de bajo peso ($\approx 44 - 51$ kDa) y una de ≈ 93 kDa (Fig. 21).

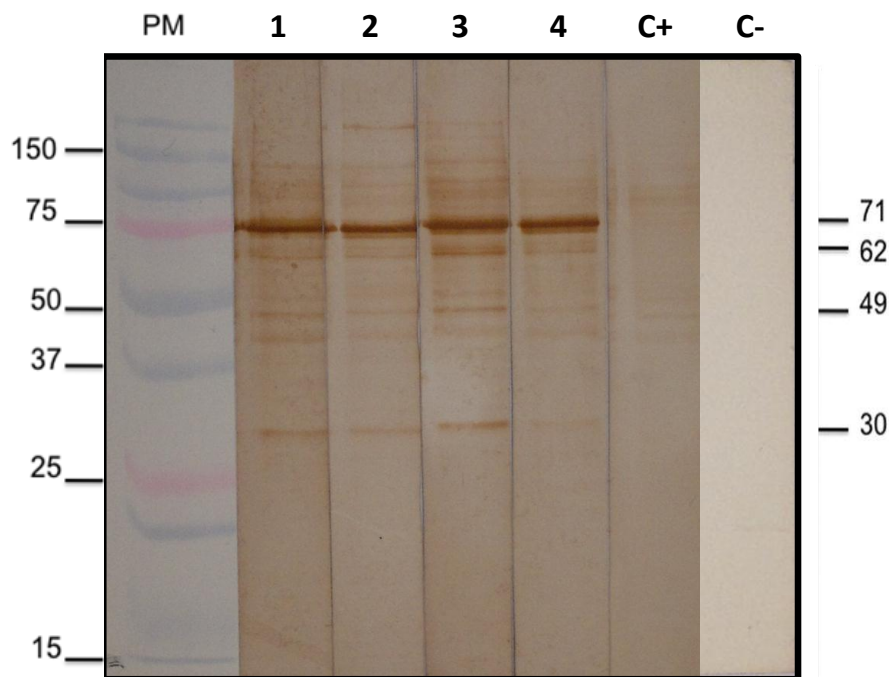


Figura 21. Componentes proteicos reconocidos por el sobrenadante de la clona 4D6C10B2C10C9 del aislado INP190310-F116 de *G. intestinalis*. PM) marcador de peso (kDa). Los aislados: 1) WB, 2) INP-GVH, 3) INP190310-F116, 4) INP-VMRDT. C+) Control positivo (suero hiperinmune 1:5000) y C-) Control negativo (suero preinmune). El control positivo y negativo se evaluó con el ensamble E (aislado INP190310-F116).

8. Discusión

En el Laboratorio de Parasitología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría se tienen varios aislados de *G. intestinalis* que se han obtenido de diferentes hospederos y que se han genotipificado. En esta tesis se propuso la obtención de AcMo contra antígenos de la pared de quistes del ensamble E, debido a que es parte de un megaproyecto en el que se ha planteado producir AcMo contra proteínas de la pared de quiste de *G. intestinalis* de diferentes ensamblajes.

Para la producción del AcMo contra antígenos de la pared del quiste del aislado INP190310-F116, éste se mantuvo en el medio de cultivo TYI-S-33 modificado. Este aislado tuvo un tiempo de generación muy lento, de tal manera que solamente se lograba $\approx 70\%$ de monocapa. A partir de trofozoítos de este aislado se obtuvieron quistes. Se han propuesto varias modificaciones al medio de cultivo para la formación de quistes *in vitro*, como son: medio sin bilis, con sales biliares primarias o secundarias, con ácido láctico, con calcio, pH (6.6 - 7.8) (Gillin *et al.* 1987; Luján *et al.* 1996); con sueros de humano, bovino, porcino y con diferentes concentraciones; sin embargo, los resultados varían (Boucher y Gillin, 1990; Luján *et al.* 1997). Se ha documentado que el pH 7.8 y altas concentraciones de bilis incrementan la formación de quistes *in vitro* (Gillin *et al.* 1988; Gillin *et al.* 1989), y que la disminución de colesterol en el ambiente es el disparador para la formación de los quistes (Luján *et al.* 1996).

En el reporte de Gillin *et al.* (1987) se documentó que el medio sin bilis generó solamente el $0.15 \pm 0.17\%$ de enquistamiento; pero, cuando al medio de

enquistamiento sin bilis se le puso glycodeoxycholato (GdC) produjo un $8.2 \pm 3.0\%$ de enquistamiento y cuando al medio con GdC se adicionó ácido oleico el enquistamiento fue del $9.1 \pm 2.0\%$. Gillin *et al.* 1988, propusieron otro método para la obtención de quistes, en el que se utiliza bilis bovina a 7 mg/mL. Este método fue el que inicialmente se siguió, obteniéndose únicamente el 2.1% de quistes normales (que analizados con la iluminación de contraste de fases fueran ovals, con pared lisa y refringentes).

La modificación del medio (sin CFA) que se implementó en el laboratorio favoreció el enquistamiento de este aislado (10%). Se ha descrito que el CFA favorece la adhesión de los trofozoítos y que éstos adheridos son más propensos a enquistarse, con los resultados obtenidos decidimos eliminar el CFA porque se emplea en una cantidad mínima postulando que no afectaría el enquistamiento de los trofozoítos; sin embargo, se están planteando varias hipótesis para determinar el por qué la carencia del CFA favoreció el enquistamiento.

Con los quistes obtenidos por el segundo método (sin CFA), se inocularon 2 ratones BALB/c por vía intraperitoneal. El monitoreo para la detección de anticuerpos en sus sueros mostró variabilidad en la respuesta inmune. Uno de ellos tuvo una absorbancia mayor que el valor de corte a los 23 dpi y a los 47 dpi se encontró una absorbancia de 1.2, mientras que en el otro ratón la respuesta inmune siempre fue mínima. Este tipo de respuesta es rara en animales que son "inbred", sin embargo, factores ambientales o metodológicos pueden afectar los resultados.

El primer ratón se utilizó para la fusión y a los ocho días se observaron hibridomas; por ELISA empleando quistes del aislado INP190310-F116, se obtuvieron 2 hibridomas productores de anticuerpos anti *G. intestinalis* (pozos 4C8 y 4D6). Se hizo una primera clonación de los hibridomas del pozo 4D6 y se encontraron tres pozos con producción de anticuerpos anti-*G. intestinalis* INP190310-F116 (4D6C10, 4D6D3 y 4D6E10). Después de cuatro clonaciones de los hibridomas del pozo (4D6C10), en el pozo 4D6C10B2C10C9 se encontró un hibridoma que generó anticuerpos anti-*G. intestinalis* INP190310-F116, en este caso la absorbancia fue de 0.8, el doble que el valor de corte 0.448. El sobrenadante de esta clona se utilizó para el western blot con los antígenos de *G. intestinalis* de diferentes ensamblajes, que tenían 18 h de enquistamiento y que correspondían a los aislados INP190310-F116, INP-GVH, INP-VMRDT y WB.

En todas las muestras se observó el reconocimiento de una banda muy intensa de ≈ 71 kDa. También se encontraron bandas de menor peso ($\approx 30, 49, 62$ y 63 kDa), y otras bandas de $\approx 128, 110$ y 93 kDa. En la década de los 80` se documentó que la síntesis de proteínas formadoras de pared de quiste es asincrónica; en las primeras horas de enquistamiento (≈ 4 horas) la producción de proteínas es de bajo peso molecular $\approx 21-39$ kDa y que después de 24 horas aparecen proteínas de alto peso $\approx 66-103$ kDa (Reiner *et al.* 1989). Gillin *et al.* (1987) mediante western blot detectaron antígenos de $\approx 21, 28$ y 49 kDa en trofozoítos que recuperaron de heces de humanos. También detectaron solo antígenos de $\approx 21, 28$ y 36 kDa en quistes que fueron desenquistados y cultivados *in vitro* por 1-7

días en medio con glyocolato. Pero, sus anticuerpos no reaccionaron con antígenos de trofozoítos en cultivo de crecimiento.

Por otro lado, Rosoff y Stibbs (1986) reportaron un antígeno ≈ 65 kDa que detectaron en trofozoítos y quistes mediante inmunotransferencia (GSA65). Posteriormente Luján *et al.* (1995) describieron dos proteínas formadoras de pared de quiste CWP1 y CWP2 (proteína de pared de quiste) con el mismo peso molecular descrito por Rosoff y Stibbs (1986). Sun *et al.* (2003) describieron una tercera proteína de pared de quiste (CWP3) de ≈ 43 kDa. Está documentado por varios autores que las proteínas de pared de quiste son de ≈ 65 kDa (Rosoff y Stibbs, 1986; Reiner *et al.*, 1989; Rossoff *et al.* 1989; Moss *et al.* 1991; Faubert, 1996; Luján *et al.* 1997).

Al evaluar la reactividad del AcMo con trofozoítos en fase de enquistamiento (18h) se encontraron dos bandas de ≈ 62 y 63 kDa que posiblemente podrían corresponder a las de pared de quiste; ensayos de inmunofluorescencia empleando el AcMo permitiría determinar si éste reconoce mayoritariamente una proteína de ≈ 71 kDa que probablemente pueda corresponder a una proteína de choque térmico (proteínas de estrés); las proteínas de choque térmico se producen ante un aumento de la temperatura, o algún estímulo estresante de la célula. Lindley *et al.* (1988) reportaron cuatro proteínas de 100, 83, 70 y 30 kDa que se sintetizaron ante un aumento de la temperatura (43°C durante 40 minutos), o con etanol al 6% durante 20 minutos. Nosotros, además de la proteína de ≈ 71 kDa también se encontró una banda de 30 kDa. El resultado es

interesante ya que podrían ser proteínas “chaperonas” que se unen a las proteínas de pared de quiste y que se encargarían de su plegamiento, ensamblaje y transporte a la periferia para la formación de la pared quística. Reiner *et al.* (1992) utilizando un antisuero contra una proteína recombinante (75 kDa, proteína relacionada a la HSP70) de *Plasmodium falciparum*, detectaron proteínas de \approx 68, 82 y 92 kDa en trofozoítos en fase de enquistamiento.

El AcMo obtenido no mostró un reconocimiento específico hacia componentes del quiste del ensamble E, lo que indica que los epítomos reconocidos presentes en las proteínas de los trofozoítos inducidos al enquistamiento están presentes en todos los otros ensambles. La gran cantidad de proteínas reconocidas en todos los ensambles evaluados puede deberse a que en el extracto obtenido de los trofozoítos inducidos al enquistamiento están presentes moléculas del trofozoíto, por lo que es conveniente que los quistes se obtengan a tiempos más prolongados y que el reconocimiento del AcMo se realice con extractos de estos quistes puros. Una alternativa sería evaluar el reconocimiento de los quistes obtenidos de los diferentes aislados por el AcMo mediante inmunofluorescencia.

9. Conclusiones

- 1.- Se optimizó el método de enquistamiento del aislado INP190310-F116, quitándole el CFA al medio de cultivo.
- 2.- Se obtuvo un anticuerpo monoclonal contra *Giardia intestinalis*, de isotipo IgG.
- 3.- El anticuerpo monoclonal reconoció por Western blot varias proteínas del parásito con pesos moleculares de ≈ 30 , 49 y 62 kDa. Mayoritariamente reconoció una proteína de 71 kDa, presente en el extracto total (trofozoítos en fase de enquistamiento) de los cuatro aislados analizados de *G. intestinalis*: INP190310-F116 (Ensamble E); INP-GVH (Ensamble AII), INP-VMRDT (Ensamble B) y WB (Ensamble AI).
- 4.- El anticuerpo monoclonal 4D6C10B2C10C9 no es ensamble E específico.

10. Perspectivas

1. Caracterizar el anticuerpo monoclonal.
2. Establecer qué antígeno de *Giardia intestinalis* reconoce el anticuerpo monoclonal
3. Determinar que no cruce con antígenos de otros parásitos: protozoarios, cestodos, trematodos y nematodos.
4. Probarlo con quistes (procedentes de heces de humanos, bovinos, ovinos, caninos y felinos) genotipificados y corroborar que ensambla reconoce.

11. Apéndice

Medio de cultivo TYI-S-33 pH 7.0 (1L)

Reactivos	Cantidad (g)
Ac. Ascórbico	0.200
Citrato de Hierro y Amonio	0.030
NaCl	2.0
K ₂ HPO ₄	1.0
KH ₂ PO ₄	0.600
Bilis bovina	1 .0
Cloruro de cisteína	1 .0
Extracto de levadura	10
Tryptona	20
Glucosa	10
H ₂ O desionizada	1.0 L

Los reactivos se mezclaron en 800 mL de H₂O, se ajustó el pH 7.0, se adicionaron los antibióticos y el antimicótico (20 mg de gentamicina, 20 mg de estreptomycin, 10 mg de ampicilina, 10 mg de ceftazidina y 1 mg de anfotericina B) y se aforó a 1.0 L. El medio se esterilizó por filtración con una membrana de 0.22 µm, se complementó con 10% de suero fetal bovino y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Medio de enquistamiento TYI-S-33 pH 7.8 (1L)

Reactivos	Cantidad (g)
Ac. Ascórbico	0.200
NaCl	2
K ₂ HPO ₄	1
KH ₂ PO ₄	0.600
Bilis bovina	7
Cloruro de cisteína	1
Extracto de levadura	10
Tryptona	20
Glucosa	10
H ₂ O desionizada	1.0 L

Los reactivos se mezclaron en 800 mL de H₂O, se ajustó el pH 7.8, se adicionaron los antibióticos y antimicóticos (20 mg de gentamicina, 20 mg de estreptomycin, 10 mg de ampicilina, 10 mg de ceftazidina y 1 mg de anfotericina B) y se aforó a 1.0 L. El medio se esterilizó por filtración con una membrana de 0.22 µm, se complementó con 10% de suero fetal bovino y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Descomplementación de Suero Fetal Bovino

La botella de suero de ternera fetal grado cultivo celular (Hyclone No. Cat. SH30070-03) se incubó durante 30 min/56°C en baño María. El suero se fraccionó en tubos estériles de 50 mL y se almacenó a -20°C.

Agua destilada estéril pH 11 (100 mL)

El agua destilada (80 mL) se ajustó a pH 11 con NaOH 1N, se aforó a 100 mL y se esterilizó en autoclave.

Amortiguador de carbonatos (0.1 M, pH 9.6)

Reactivos	Cantidad (g)
Na ₂ CO ₃	3.18
NaHCO ₃	5.86

Los reactivos se mezclaron en 800 mL de H₂O, se ajustó a pH 9.6, se aforó a 1.0 L y se mantuvo a 4°C hasta su uso.

Solución salina fosfatos (PBS) 10X

Reactivos	Cantidad (g)
NaCl	8.006
KCl	0.2
Na ₂ HPO ₄	0.612
KH ₂ PO ₄	0.19

Los reactivos se mezclaron en 800 mL de H₂O, se ajustó a pH 7.2, se aforó a 1.0 L y se mantuvo a 4°C hasta su uso.

Solución de lavado (PBS Tween 20 al 0.05%)

Reactivo	Cantidad (mL)
Tween 20	0.5
PBS pH 7.2	1000

Los reactivos se mezclaron en 800 mL de H₂O, se aforó a 1.0 L y se mantuvo a 4°C hasta su uso.

Solución de bloqueo (leche descremada al 5%)

Reactivos	Cantidad (g)
Leche descremada	1

Se adicionó la leche descremada en PBS-Tween 20 al 0.05%, se mezcló y aforó a 20mL. La solución se preparó al momento (para una placa de ELISA).

Solución para parar la reacción (H₂SO₄ 2N)

Reactivo	Cantidad (mL)
H ₂ SO ₄	55.17

El H₂SO₄ 2N se puso en 800 mL de agua destilada y se aforó a 1.0 L. La solución se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Solución de hidróxido de sodio (NaOH 1N)

Reactivo	Cantidad (g)
NaOH	40

El NaOH se puso en 800 mL de agua destilada y se aforó a 1.0 L. La solución se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

Solución de polietilenglicol (PEG 1300-1600 Sigma No. Cat. P7777)

El reactivo se puso en baño María a 50-60°C. Se diluyó al 42-43% con medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) sin suero a 45°C. Se ajustó el pH a 7.5-8, hasta que el reactivo (aproximadamente 10 minutos) adquirió una coloración rojizo-violeta. Se fraccionó en volúmenes de 0.5 mL y se almacenó a 4°C (hasta 6 meses).

Medio selectivo con hipoxantina, aminopterina y timina (HAT)

Se agregaron 2.0 mL de HAT 50X (Sigma N-0262) a 100 mL de DMEM complementado y se conservó a 4°C hasta su uso.

Medio selectivo con hipoxantina y timina (HT)

Se agregaron 2.0 mL de HT 50X (Sigma No. Cat. H-0137) a 100 mL de DMEM complementado con SFB y se conservó a 4°C hasta su uso.

Solución Cromógeno para Inmunoelectrotransferencia

Reactivo	Cantidad (g)
3,3'-Diaminobenzidina	0.030 g

Se colocó la 3,3'-Diaminobenzidina en 60 mL de PBS y después se le adicionó 6 µL de H₂O₂ al 30%. Esta solución se preparó inmediatamente antes de usar.

Solución Cromógeno BIORAD

Reactivo	Cantidad (mL)
Solución A	9.0
Solución B	1.0

Se colocó la solución A y B en una caja Petri, y preparó inmediatamente antes de usar.

Solución para criopreservar células

Reactivo	Cantidad (mL)
Suero fetal de bovino (SFB)	9.0
Dimetilsulfóxido (DMSO)	1.0

El DMSO se esterilizó en autoclave. Se mezcló el SFB y el DMSO en la campana de flujo laminar. Se guardó a -20°C hasta su uso.

Acrilamida 30%-bis-acrilamida 0.8%

Reactivo	Cantidad (g)
Acrilamida (99% pureza)	29.2 g
bis-acrilamida	0.8 g

Se colocó la acrilamida y bis-acrilamida en 100 mL de agua destilada. Se filtró la solución con papel Whatman 1 y se almacenó en un frasco ámbar a 4°C.

Nota: Estos reactivos se manejaron con guantes y cubre boca porque son neurotóxicos.

Mezcla de soluciones para preparar el gel de la electroforesis

Reactivos	Separador 12% (mL)	Concentrador 5% (mL)
Agua destilada	3.3	2.7
Acrilamida/Bis-acrilamida	4.0	0.67
Tris pH 8.8	2.5	-
Tris pH 6.8	-	0.50
SDS 10%	0.1	0.04
* Persulfato de amonio 10%	0.1	0.04
* TEMED	0.004	0.004

*Estos reactivos se agregaron hasta el final

Se preparó el gel separador al 12% de acrilamida y el gel concentrador al 5%. Se colocó la mezcla del gel separador entre las 2 placas de vidrio dejando un marco de 3 cm del borde superior y se esperó a que se polimerizara. Se colocó el peine apropiado, de acuerdo al número de muestras. Se preparó la mezcla para gel concentrador, se agregó la mezcla sobre el gel separador evitando que se formaran burbujas y se dejó polimerizar. Se retiró el peine con cuidado y se lavaron los carriles con agua destilada. Se pusieron las placas en el electrodo y se introdujo en la cámara de electroforesis, se llenó la cámara con amortiguador de electroforesis (Tris-glicina-SDS). Se verificó que no hubiese burbujas en el espacio que se genera entre los vidrios en la parte inferior, entre el gel y la solución de electroforesis. Para la preparación de las muestras se requirió de condiciones reductoras y se añadió 2-β-mercaptoetanol y se hirvió 5 min en baño María.

Amortiguador del gel separador (Tris-Base 1.5M, pH 8.8)

Reactivo	Cantidad (g)
Tris-base	18.17

Se disolvió el Tris-base en 85 mL de agua destilada, se ajustó el pH con HCl concentrado hasta un pH de 8.8, se aforó a 100 mL con agua destilada, se guardó a 4°C hasta su uso.

Amortiguador del gel concentrador (Tris-HCl 0.5M, pH 6.8)

Reactivo	Cantidad (g)
Tris	16.05

Se disolvió el Tris en 85 mL de agua destilada, se ajustó el pH con HCl 1N hasta un pH de 6.8, se aforó a 100 mL con agua destilada, guardar a 4°C.

Persulfato de amonio 10%

Reactivo	Cantidad (g)
Persulfato de amonio (PSA)	0.100

Se disolvió el persulfato de amonio en 1 mL de agua destilada. Esta solución se preparó al momento.

Lauril sulfato de sodio (duodecil sulfato de sodio) SDS 10%

Reactivo	Cantidad (g)
SDS	10

El SDS se disolvió en 80 mL de agua destilada, se aforó a 100mL con agua destilada, la solución se fraccionó y se mantuvo a 4°C hasta su uso.

Amortiguador de electroforesis Tris-glicina-SDS

Reactivo	Cantidad (g)
Tris base	15.0
Glicina	72.0
SDS	5.0

Se pesaron los reactivos y se disolvieron en 800 mL de agua, se aforó a 1.0 L. Se tomaron 200 mL del amortiguador Tris-Glicina-SDS 5X, y se aforó a 1.0 L con agua destilada y almacenó a 4°C hasta su uso.

Azul de Coomassie R-250 al 0.06% (1.0 L) para tinción de geles.

Reactivo	Cantidad (g)
Azul Brillante Coomassie R-250	2.5

Se disolvió el Azul Brillante de Coomassie R-250 en 450 mL de metanol y 100 mL de ácido acético glacial, finalmente se aforó a 1.0 L con agua destilada. Se guardó en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

Nota: Esta solución se puede recuperar y reusar nuevamente si se filtra y se mezcla con la solución de Coomassie restante.

Solución decolorante para geles de acrilamida (1.0 L)

Reactivo	Cantidad (mL)
Metanol	200
Ácido acético	150
H ₂ O	650

Para decolorar el gel se realizaron lavados hasta obtener la mayor nitidez.

Nota: Esta solución se puede recuperar y reusar si se filtra con un poco de carbón activado.

Medio DMEM

Reactivo	Cantidad (g)
DMEM (GIBCO, 12100-017)	1 sobre
Bicarbonato de sodio	2.0
HEPES (Sigma, H3375)	2.0

Los reactivos se disolvieron en 800 mL en agua tridestilada y desionizada. El pH se ajustó a 6.8 (con NaOH 1N o con HCl 1N), se aforó a 1.0 L con agua tridestilada y desionizada. Se esterilizó por filtración con una membrana de 0.22 µm y se almacenó en frascos estériles de 250 mL a 4°C hasta su uso.

**Amortiguador de transferencia
(Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, metanol 20% v/v, pH 8.3)**

Reactivo	Cantidad
Tris base 1.5 M	12.5 mL
Glicina	14.49 g
Metanol	200 mL

Se disolvió la glicina en el Tris base 1.5 M y se le añadió el metanol. Se aforó a 1.0L con agua destilada y se almacenó a 4°C. No se ajustó el pH, el amortiguador oscila entre pH 8.1 y 8.4, dependiendo de la calidad del Tris, la glicina y el metanol.

Nota: El metanol debe ser de grado analítico, de lo contrario contiene contaminantes metálicos que interfieren con las láminas de los electrodos. Este amortiguador se puede usar hasta 3 veces, después de cada uso se filtra con papel Whatman 1.

Obtención de sangre por vía retro orbital

Se sujetó al animal en decúbito dorsal, se introdujo la punta de una pipeta Pasteur larga en el ángulo externo del ojo, hasta que se encontró el seno venoso. La sangre fluyó inmediatamente hacia el interior de la pipeta. El ojo se limpió con un algodón humedecido con agua estéril y se le aplicaron unas gotas de solución de antibiótico-antimicótico. La sangre se colectó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se dejó a temperatura ambiente por 30 min. Se centrifugó a 2500 rpm/15 min. El suero se separó y almacenó a -20°C.

Descongelación de células de mieloma (X63Ag8.653)

El vial con las células se descongeló en un baño de agua a 37 °C con agitación suave, manteniendo la junta teórica y tapa fuera del agua (para evitar contaminación). La descongelación fue de aproximadamente 2 min. El vial se retiró del baño de agua, y bajo una campana de flujo laminar, se desinfectó con etanol al 70%. El contenido del vial se transfirió a un tubo de centrifuga que contenía 9.0 mL de medio DMEM sin Suero Fetal Bovino (SFB). Se centrifugó a 125xg/5-7 min. El precipitado con las células se resuspendió en medio DMEM con SFB (10%), se distribuyó en frascos de cultivo de 25 cm² y se incubó a 37°C, con 5% de CO₂.

Mantenimiento de las células del mieloma (X63Ag8.653)

Los cultivos con las células de mieloma se manejaron bajo un ambiente de campana de flujo laminar y se mantuvieron en medio DMEM y SFB (10% v/v) a 37°C en una atmósfera húmeda con una mezcla de 95% aire y 5% de CO₂.

Los cultivos se revisaron diariamente en el microscopio invertido, vigilando la morfología celular, así como las posibles fuentes de contaminación bacteriana y fúngica. Los cambios de medio de cultivo se realizaron cuando el color rojo viró a naranja (indicación de cambio el pH por acidificación).

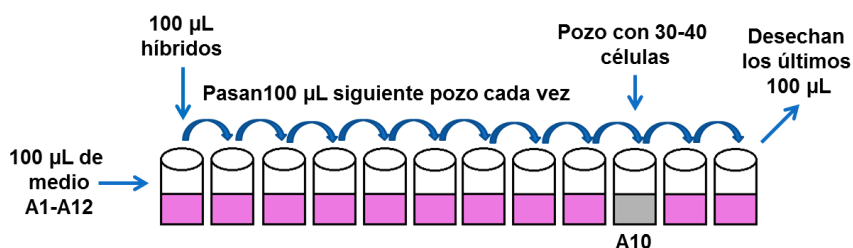
Cuando los cultivos se encontraron confluentes (máxima proliferación celular) las células se resembraron en cajas nuevas o se congelaron a -196°C en nitrógeno líquido.

Criopreservación de células

Para contar con una reserva de células, varias alícuotas se criopreservaron a -196°C. Se preparó una suspensión de 5×10^6 células y se centrifugó a 1200 rpm/10 min/4°C. El sobrenadante se desechó y el paquete celular se resuspendió en un vial con 2.0 mL de la solución para criopreservación. El vial se envolvió en una capa de algodón de un centímetro de espesor, se colocó en una caja de poliuretano a -70°C/24h y posteriormente se transfirió a un tanque con nitrógeno líquido.

Clonación celular por dilución limitante

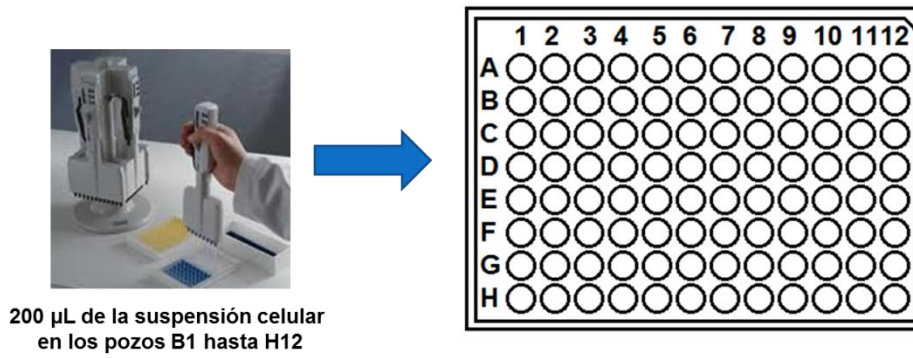
1ª Dilución doble seriada del híbrido.



2ª Resuspensión del pozo que tenga 30-40 células.



3ª Distribución de la suspensión en los 80 pozos restantes (200 μ L/pozo)



12. Referencias

- Adam RD. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev* 14: 447-75
- Aldeen WE, Carroll K, Robison A, Morrison M, Hale D. 1998. Comparison of nine commercially available enzyme-linked immunosorbent assays for detection of *Giardia lamblia* in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 5: 1338-40
- Andrews RH, Adams M, Boreham PFL, Mayrhofer G, Meloni BP. 1989. *Giardia intestinalis*: electrophoretic evidence for a species complex. *Int J Parasitol* 19:183-90
- Ankli A, Heinrich M, Bork P, Wolfram L, Bauerfeind P, Brun R, Schmid C, Weiss C, Bruggisser R, Gertsch J, Wasescha M, Sticher O. 2002. Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. *J Ethnopharmacol* 79: 43-52
- Appelbee AJ, Frederick LM, Heitman TL, Olson ME. 2003. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. *Vet Parasitol* 112: 289-94
- Astiazaran-García H, Espinoza-Castellano M, Castañón G, Chávez-Munguia B, Martínez-Palomo A. 2000. *Giardia lamblia*: effect of infection with symptomatic and asymptomatic isolates on the growth of gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Exp Parasitol* 95: 128-35
- Baker DG, Strombeck DR, Gerschwin LJ. 1987. Laboratory diagnosis of *Giardia duodenalis* infection in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 190: 53-56
- Belosevic M, Faubert GM, Maclean JD. 1989. Disaccharidase activity in the small intestine of gerbils (*Meriones unguiculatus*) during primary and challenge infections with *Giardia lamblia*. *Gut* 30: 1213-9
- Bazán-Tejeda ML, Arguello-García R, Ortega-Pierres G. 2008. La biogénesis del quiste de *Giardia duodenalis* como modelo de diferenciación unicelular. *Mensaje Bioquímico* 32: 25-38
- Benchimol M. 2004. The release of secretory vesicle in encysting *Giardia lamblia*. *FEMS Micr Lett* 235: 81-7
- Bingham AK, Meyer EA. 1979. *Giardia* encystation can be induced *in vitro* in acidic solutions. *Nature* 277: 301-2
- Boletín Epidemiología 2002. Casos acumulados por entidad federativa de enfermedades infecciosas y parasitarias del aparato digestivo, semana epidemiológica No. 39: 19:7-10
- Boreham PFL, Upcroft JA, Upcroft P. 1990. Changing approaches to the study of *Giardia* epidemiology: 1681-2000. *Int J Parasitol* 20: 479-90

- Boucher SE, Gillin FD. 1990. Excystation of in vitro-derived *Giardia lamblia* cysts. *Infect Immun* 11 3516-22
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54
- Buret AG. 2007. Mechanisms of epithelial dysfunction in giardiasis. *Gut* 56: 316–7
- Buret AG, Mitchell K, Muench DG, Scott KGE. 2002. *Giardia lamblia* disrupts tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal monolayers: effects of epidermal growth factor. *Parasitol* 125: 11-19
- Calzada F, Meckers M, Cedillo-Rivera R, Tapia-Contreras A, Mata R. 1998. Screening of Mexican medicinal plants for antiprotozoal activity. *Pharmaceutical Biol* 36: 305-9
- Calzada F, Cervantes-Martínez JA, Yépez-Mulia L. 2005. *In vitro* antiprotozoal activity from the roots of *Geranium mexicanum* and its constituents on *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. *J Ethnopharmacol* 98: 191-3
- Campos T, Vázquez O. 1999. Reseña histórica del descubrimiento de los intrusos del arca y de sus cazadores (1ª parte). *Acta Pediátrica* 20: 55-60
- Carnaby S, Katelaris PH, Naeem A, Farthing MJG. 1994. Genotypic heterogeneity within *Giardia lamblia* isolates demonstrated by M13 fingerprinting. *Infect Immun* 62: 1875-80
- Cavalier-Smith T. 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev* 73: 203-66
- Cedillo-Rivera R, Enciso-Moreno JA, Martínez-Palomo A, Ortega-Pierres G. 1989. *Giardia lamblia*: isoenzyme analysis of 19 axenic strains isolated from symptomatic and asymptomatic patients in Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 83: 644-6
- Cedillo-Rivera R, Chávez B, González-Robles A, Tapia A, Yépez-Mulia L. 2002. *In vitro* effect of nitatoxanide against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *J Eukaryot Microbiol* 49: 201-8
- Cedillo-Rivera R, Darvy JM, Enciso-Moreno JA, Ortega-Pierres, Ey PL. 2003. Genetic homogeneity of axenic isolates of *Giardia intestinalis* derived from acute and chronically infected individuals in Mexico. *Parasitol Res* 99: 119-23
- Chakarova B. 2010. Comparative evaluation of the diagnostic methods for detection of *Giardia intestinalis* in human fecal samples. *Trakia J Sciences* 8: 174-179
- Chávez V, González-Mariscal L, Cedillo-Rivera R, Martínez-Palomo A. 1995. *Giardia lamblia*: *In vitro* cytopathic effect of human isolates. *Exp Parasitol* 80: 133-8

- Chen N, Upcroft JA, Upcroft P. 1995. *Giardia duodenalis* gene encoding multiple repeats of a toxin homologue. *Parasitol* 111: 423-31
- Chester AC, Macmurray FG, Restifo MD, Mann O. 1985. Giardiasis as a chronic disease. *Dig Dis Sci* 30: 215-8
- Chin AC, Teoh DA, Scott KGE, Meddings JB, Macnaughton WK, Buret AG. 2002. Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *Infect Immun* 70: 3673-80
- Devera R, Niebla-Punos G, Nastasi-Vatanese JA, Velásquez-Alvarez VJ, González-Meneses R. 1988. Giardiasis en escolares de Ciudad Bolívar, Estado Bolívar, Venezuela. *Rev Biomed* 9:145-150
- Deselliers LP, Tan DTM, Scott RB, Olson ME. 1997. Effects of *Giardia lamblia* infection on gastrointestinal transit and contractility in Mongolian gerbils. *Dig Dis Sci* 42: 2411-9
- Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC. 1978. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 72: 431-2
- Díaz E, Mondragón J, Ramírez E, Bernal RM. 2003. Epidemiology and control of intestinal parasites with nitatoxanide in children in México. *Am J Trop Med Hyg* 68: 384-5
- Doğrumax AF, Kuştimur S, Özekinci T, Balaban N, İlhan MN. 2006. The use of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and direct fluorescent antibody (DFA) methods for diagnosis of *Giardia intestinalis*. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 4: 275-8
- Dueñas RL, Arenaba DAA, Tomey MO. 2001. Detección de coproantígenos de *Giardia intestinalis* mediante un sándwich ELISA estandarizado en Cuba. *Rev MCiego* 9: 53-6
- Duque-Beltrán S, Nicholls-Orejuela RS, Arévalo-Jamaica A, Guerrero-Lozano R, Montenegro S, James MA. 2002. Detection of *Giardia duodenalis* Antigen in Human Fecal Eluates by Enzyme-linked Immunosorbent Assay Using Polyclonal Antibodies. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 8: 1165-1168
- Eckmann L, Laurent F, Langford TD, Hetsko ML, Smith JR, Kagnoff MF, Gillin FD. 2000. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. *J Immunol* 164: 1478-87
- Eckmann L, Gillin FD. 2001. Microbes and microbial toxins: Paradigms for microbial mucosal interactions. I. Pathophysiological aspects of enteric infections with the lumen-dwelling protozoan pathogen *Giardia lamblia*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280: G1-G6

- Eckmann L. 2003. Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite Immunol* 25: 259-270
- El-Badry AA, Al-Ali K, Mahrous ARS. 2010. Molecular identification and prevalence of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium* in duodenal aspirate in Al-Madinah. *J Med Biomed Scien* 47-52
- Ettehad, GH, Daryani A, Nemati A. 2010. Effect of *Giardia* infection on nutritional status in primary school children, in Northwest Iran. *Pak J Biol Sci* 13: 229-34
- Ey PL, Khanna K, Andrews RH, Manning PA, Mayrhofer G. 1992. Distinct genetic groups of *Giardia intestinalis* distinguished by restriction fragment length polymorphisms. *J Gen Microbiol* 138: 2629-37
- Ey PL, Andrews RH, Mayrhofer G. 1993a. Differentiation of major genotypes of *Giardia intestinalis* by polymerase chain reaction analysis of a gene encoding a trophozoite surface antigen. *Parasitol* 106: 347-56
- Ey PL, Darby JM, Andrews RH, Mayrhofer G. 1993b. *Giardia intestinalis*: detection of major genotypes by restriction analysis of gene amplification products. *Int J Parasitol* 23: 591-600
- Ey PL, Bruderer T, Wehrli C, Köler P. 1996. Comparison of genetic groups determined by molecular and immunological analyses of *Giardia* isolated from animals and humans in Switzerland and Australia. *Parasitol Res* 82: 52-60
- Ey PL, Masouri M, Kulda J, Nohýnková E, Monis PT, Andrews RH, Myrhofer G. 1997. Genetic analysis of *Giardia* from hoofed farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. *J Eukar Microbiol* 44: 626-35
- Farthing MJG, Pereira MEA, Keusch GT. 1986. Description and characterization of a surface lectin from *Giardia lamblia*. *Infect Immunol* 51: 661-7
- Farthing MJG. 1997. The Molecular pathogenesis of Giardiasis. *J Pediatric Gastroenterol Nutr* 24: 79-88
- Farooque MB, Ahmed JB, Qadeer SA, Ahmed SK. 2010. A comparison study of different methods used in the detection of *Giardia lamblia* on fecal specimen of children. *Medical Chanel* 3: 489-92
- Faubert GM. 1996. The immune response to *Giardia*. *Parasitol Today* 12: 140-5
- Faubert GM. 2000. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev* 13: 35-54
- Feely DE, Schollmeyer JV, Erlandesen SL. 1982. *Giardia spp.* Distribution of contractile proteins in the attachment organelle. *Exp Parasitol* 563: 145-54
- Feely DE, Dyer JK. 1987. Localization of acid phosphatase activity in *Giardia lamblia* and *Giardia muris* trophozoites. *J Protozool* 34: 80-3

- Feely DE, Erlandsen SL, Chase DG, Holberton DV. 1990. The biology of *Giardia*. In: Meyer, E.A. (Ed.), *Giardiasis*. Elsevier, Amsterdam, pp. 11–49
- Feely DE, Gardner MD, Hardin EL. 1991. Excystation of *Giardia muris* induced by a phosphate bicarbonate medium: localization of acid phosphatase. *J Parasitol* 77: 441-8
- Filice FP. 1952. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from a laboratory rat. *U California Publications in Zoology* 57: 53-146
- Fonte L, Ali S. 2010. Giardiasis ¿Una zoonosis?. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología* 48(2)108-113
- Fuentes CI, Gutiérrez CMJ, Garate OT. 2010. Diagnóstico de las parasitosis intestinales mediante detección de coproantígenos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 28: 33-39
- Gardner TB, Hill DR. 2001. Treatment of Giardiasis. *Clin Microbiol Rev* 14: 114-28
- Geurden T, Geldhof P, Levecke B, Martens C, Berkvens D, Casaert, Vercruyssen S, Claerebout E. 2008. Mixed *Giardia duodenalis* assemblage A and E infections in calves. *Inter J for Parasitol* 38: 259–264
- Geurden T, Vercruyssen V, Claerebout E. 2009. Is *Giardia* a significant pathogen in production animals?. *Exp Parasitol* 124: 98-106
- Gillin FD, Reiner DS, Gault MJ, Douglas H, Das S, Wunderlich A. 1987. Encystation and expression of cyst antigens by *Giardia lamblia* *in vitro*. *Science* 25: 1040-3
- Gillin FD, Reiner DS, Boucher SE. 1988. Small-intestinal factors promote encystation of *Giardia lamblia* *in vitro*. *Infect Immunity* 56: 705-7
- Gillin FD, Boucher SE, Rossi SS, Reiner DS. 1989. *Giardia lamblia*: the roles of bile, lactic acid and pH in completion of the life cycle *in vitro*. *Exp Parasitol* 69: 164–74
- Gilman RH, Marquis GS, Miranda E, Vertegui M, Martínez H. 1988. Rapid reinfection by *Giardia lamblia* after treatment in a hyperendemic third world community. *Lancet* 13: 343-5
- Green EL, Miles MA, Warhust DG. 1985. Immunodiagnostic detection of *Giardia* antigen in faeces by rapid usual enzyme-linked immunosorbent assay. *Lancet* 691-693
- Green EL. 1986. Immunological Detection of Parasite Antigen in Faeces. *Parasitol Today* 7: 198-200
- Hare DF, Jarroll EL. 1989. Lind mark of proteinase activity in trophozoites. *Exp Parasitol* 68: 168-75

- Harris JC, Plummer S, Turner MP, Lloyd D. 2000. The microaerophilic flagellate *Giardia intestinalis*: *Allium sativum* (garlic) is an effective anti-giardial. *Microbiology* 146: 3119-27
- Harris JC, Plummer S, Lloyd D. 2001. Anti-giardial drugs. *Appl Microbial Biotechnol* 57: 614-9
- Harter L, Frost F, PhD, Jakubowski W. 1982. *Giardia* prevalence among 1-to-3-year-old children in two Washington State counties. *AJPH* 4: 386-388
- Hehl AB, Marti M. 2004. Secretory protein trafficking in *Giardia intestinalis*. *Mol Microbiol* 1: 19-28
- Hill DR. 1993. Giardiasis. Issues in diagnostic and management. *Infect Dis Clin North Am* 7: 503-25
- Homan WL, van Enckevort FHJ, Limper L, van Eys GJJM, Schoone GL, Kasprzak W, Majewska AC, van Knapen F. 1992. Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and DNA probes. *Parasitol Res* 78: 316-23
- Hopkins RM, Constantine CC, Groth DA, Wetherall JD, Reynoldson JA, Thompson RCA. 1999. PCR-based DNA fingerprinting of *Giardia duodenalis* isolates using the intergenic rDNA spacer. *Parasitol* 118: 531-39
- Hoque ME, Hope VT, Scragg R, Kjellström T, Lay-Yee R. 2001. Nappy handling and risk of Giardiasis. *Lancet* 357: 1017-8
- Ishikawa N, Horri Y, Nawa Y. 1993. Immune-mediated alteration of the terminal sugars of globet cell mucins in the small intestine of *Nippostrongylus brasiliensis*-infected rats. *Immunol* 78: 303-7
- Issac-Renton JL, Cordeiro C, Sarafis K, Shahriari H. 1993. Characterization of *Giardia duodenalis* isolates from a waterborne outbreak. *J Infect Dis* 167: 431-40
- Ivanov IA. 2010. *Giardia* and Giardiasis. *Bul J Vet Med* 2: 65-80
- Janoff EN, Craft C, Pickering LK, Novotny T, Blaser MJ, Knisley CV, Reller L. 1989. Diagnosis of *Giardia lamblia* infections by detection of parasite-specific antigens. *J Clin Microbiol* 3: 431-35
- Jarroll EL, Muller PJ, Meyer EA, Morse SA. 1981. Lipid and carbohydrate metabolism of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol* 2: 187-96
- Kamath KR, Murugasu R. 1974. A comparative study of four methods for detecting *Giardia lamblia* in children with diarrheal disease and malabsorption. *Gastroenterol* 66: 16-21

- Karapetyan A. 1962. *In vitro* cultivation of *Giardia duodenalis*. *J Parasitol* 48: 337-40
- Kasper LIH, Buzoni-Gatel D. 2001. Ups and Downs of mucosal cellular immunity against protozoan parasites. *Infect Immun* 69: 1-8
- Katellaris PH, Seow F, Ngu MC. 1991. The effect of *Giardia lamblia* trophozoites on lipolysis *in vitro*. *Parasitol* 103: 35-9
- Katellaris PH, Naeem A, Farthing MJG. 1995. Attachment of *Giardia lamblia* trophozoites to a cultured human intestinal cell line. *Gut* 37: 512-8
- Keister, DB. 1983. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TWI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77: 487-488
- Köhler G, Milstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-7
- Korman SH, Le Blancq SM, Deckelbaum RJ, Van der Ploeg LH. 1992. Investigation of human Giardiasis by karyotype analysis. *J Clin Invest* 89: 1725-33
- Lane S, Lloyd D. 2002. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit Rev Microbiol* 28: 123-47
- Lasek-Nesselquist E, Mark WD, Sogin ML. 2010. The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *Int J Parasitol* 40: 1063-1074
- Lengerich EJ, Adiss DG, Juranek DD. 1994. Severe Giardiasis in the United States. *Clin Infect Dis* 18: 760-3
- Lindley TA, Prasanta R, Chakraborty, Edlindl TD. 1988. Heat shock and stress response in *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol* 28: 135-44
- Linnane E, Roberts R, Loocher N. 2001. Nappies and transmission of *Giardia lamblia* between children. *Lancet* 358: 507
- Lo Galbo PR, Sampson HA, Buckley RH, Durham NC. 1982. Symptomatic Giardiasis in three patients with X-linked agammaglobulinemia. *J Pediatric* 101: 78-80
- Luján HD, Mowatt MR, Wu JJ, Lu Y, Lees A, Chance MR, Nash TE. 1995. Purification of a variant-specific surface protein of *Giardia lamblia* and characterization of its methal-binding properties. *J Biol Chem* 270: 13807-13
- Luján HD, Mowatt MR, Nash TE. 1996. Lipid requirements and lipid uptake by *Giardia lamblia* trophozoites in culture. *J Euk Microbiol* 43: 237-42
- Luján HD, Mowatt MR, Nash TE. 1997. Mechanism of *Giardia lamblia* differentiation into cyst. *Microbiol Mol Biol Rev* 3: 294-304

- Luján HD, Mowatt MR, Nash TE. 1998. The Molecular Mechanisms of *Giardia* Encystation. *Parasitology Today* 11: 446-450
- Luján HD. 2006. *Giardia* y Giardiosis. *Medicina* 66: 70-74
- Marshall MM, Naumovits D, Ortega Y, Sterling Ch R. 1997. Waterborne protozoan pathogens. *Clin Microbiol Rev* 10: 67-85
- Mayrhofer G, Andrews RH, Ey PL, Chilton NB. 1995. Division of *Giardia* isolates from human into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. *Parasitol* 111: 11-17
- Meloni BP, Lymbery AJ, Thompson RC. 1988. Isoenzyme electrophoresis of 30 isolates of *Giardia* from human and felines. *Am J Trop Med Hyg* 38: 657-3
- Meloni BP, Thompson RCA, Hopkins RM, Reynoldson JA, Graceey M. 1993. The prevalence of *Giardia* and other intestinal parasites in children, dogs and cat from aboriginal communities in the Kimberly. *Med J Austr* 158: 157-9
- Meyer EA. 1985. The Epidemiology of Giardiasis. *Parasitology Today* 4: 101-104
- Midlej V, Benchimol M. 2009. *Giardia lamblia* behavior during encystment: How morphological changes in shape occur. *Parasitology International* 58: 72-80
- Miller HRP. 1987. Gastrointestinal mucus, a medium for survival and for elimination of parasitic nematodes and protozoa. *Parasitology* 94: S77-S100
- Mineno T, Avery MA, 2003. Giardiasis: recent progress in chemotherapy and drug development. *Current Pharmaceutical Design* 9: 841-55
- Monis PT, Mayrhofer G, Andrews HM, Homan WL, Limper L, Ey PL. 1996. Molecular genetics analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. *Parasitol* 112: 1-12
- Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Mackrill J, Kulda J, Issac-Renton JL, Ey PL. 1998. Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. *Parasitol* 116: 7-19
- Monis PT, Andrews RH, Mayrhofer G, Ey PL. 1999. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Mol Biol Evol* 16: 1135-1144
- Moss DM, Mathews HM, Visvesvara GS, Dickerson JW, Walker EM. 1991. Purification and Characterization of *Giardia lamblia* Antigens in the Feces of Mongolian Gerbils. *J Clin Microbiol* 1: 21-6
- Moss DM, Visvesvara GS, Mathews HM. 1992. Isoenzyme comparison of axenic *Giardia lamblia* strains. *Protozool* 39: 559-64

- Mowatt MR, Luján HD, Cotton DB, Bowers B, Yee J, Nash TE, Stibbs H. 1995. Developmentally regulated expression of a *Giardia lamblia* cyst wall protein gene. *Mol Microbiol* 15: 965-63
- Müller J, Wastling J, Sanderson S, Müller N, Hemphill A. 2007. A Novel *Giardia lamblia* Nitroreductase, GINR1, Interacts with Nitazoxanide and Other Thiazolidines. *Antimicrob Agents Chemother* 5: 1979-1986
- Nain CK, Dutt P, Vinayak VK. 1991. Interactions in enzymatic activities of the intestinal mucosa during the course of *Giardia lamblia* infection in mice. *Ann Trop Med Parasitol* 85: 515-22
- Narcisi EM, Paulin JJ, Fechheimer M. 1994. Presence and localization of vinculin in *Giardia*. *J Parasitol* 80: 468-73
- Nash TE, Keiser DB. 1985a. Differences in excretory-secretory products and surface antigens among 19 isolates of *Giardia*. *J Infect Dis* 152: 1166-71
- Nash TE, McCutchan T, Keister D, Dame JB, Conrad JD, Gillin FD. 1985b. Restriction-endonuclease analysis of DNA from *Giardia* isolates obtained from humans and animals. *J Infect Dis* 152: 64-73
- Nash TE. 1992. Surface antigen variability and variation in *Giardia lamblia*. *Parasitol Today* 8: 229-234
- Nash TE, Mowatt MR. 1993. Variant-specific surface proteins of *Giardia lamblia* are zinc-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci* 90: 5489-93
- Ortega YR, Adam RD. 1997. *Giardia*: Overview and update. *Clin Infect Dis* 25: 545-50
- Otero-Negrete JJ, Ibarra-Velarde F, Martínez-Gordillo MN, Ponce-Macotela M. 2011. Prevalence of *Giardia intestinalis* and zoonotic genotype predominance in small scale sheep and cattle farms in five states of the Mexican Republic. *Vet Méx* 3: 219-26
- Papanastasiou PH, Mc Conville M, Ralton J, Kohler P. 1997. The variant-specific surface protein of *Giardia*, VSP4A1, is a glycosylated and palmitoylated protein. *Biochem J* 322:49-56
- Parenti DM. 1989. Characterization of a thiol proteinase in *Giardia lamblia*. *J Infect Dis*. 160: 1076-80
- Pickering LK. 1985. Problems in diagnosing and managing Giardiasis. *Pediatric Infect Dis* S6-S10
- Polis MA, Tuazon CU, Alling DW, Talmanis E. 1986. Transmission of *Giardia lamblia* from a day care center to the Community. *Am J Public Health* 76: 1142-4

- Ponce-Macotela M, Navarro-Alegría I, Martínez-Gordillo MN, Alvarez-Chacon R. 1994. Efecto anti-giardiasico *in vitro* de 14 extractos de plantas. *Rev Inv Clin* 46: 343-7
- Ponce-Macotela M, Gómez-Garduño J, González-Maciel A, Reynoso-Robles R, Anislado-Tolentino V, Martínez-Gordillo MN. 2001. Determinación *in vitro* de la susceptibilidad a la nitazoxanida de cuatro aislados de *Giardia duodenalis* obtenidos de diferentes huéspedes. *Rev Inv Clin* 53: 41-5
- Ponce-Macotela M, Martínez-Gordillo MN, Bermúdez-Cruz RM, Salazar-Schettino PM, Ortega-Pierres G, Ey PL. 2002. Unusual prevalence of the *Giardia intestinalis* A-II amongst isolates from humans and domestic animals in Mexico. *Int J Parasitol* 32: 1201-2
- Ponce-Macotela M, Rufino-González Y, González-Maciel A, Reynoso-Robles R, Martínez-Gordillo MN. 2006. Oregano (*Lippia spp*) kills *Giardia intestinalis* trophozoites *in vitro*: anti-giardiasic activity and ultrastructural damage. *Parasitol Res* 98: 557-60
- Potter M. 1972. Immunoglobulin-producing tumors and myeloma proteins of mice. *Physiol Rev* 52: 631-719
- Read MR, Monis PT, Thompson RCA. 2004. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect Genetic Evol* 4: 125-30
- Reiner DS, Douglas H, Gillin FD. 1989. Identification and localization of cyst-specific antigens of *Giardia lamblia*. *Infect Immunol* 57: 963-68
- Reiner DS, Shinnick TM, Ardeshir F, Gillin FD. 1992. Encystation of *Giardia lamblia* leads to expression of antigens recognized by antibodies against conserved heat shock proteins. *Infect Immun* 60: 5312-5
- Rocha MO, Mello RT, Guimarães TMD, Toledo VPCP, Moreira MCCG, Costa CA. 1999. Detection of *Giardia* a *Giardia lamblia* coproantigen by using a commercially available immunoenzymatic assay in Belo Horizonte, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 3: 151-54
- Rodríguez-Ulloa C, Rivera-Jacinto M. 2011. ELISA y técnica de sedimentación para el diagnóstico de infección por *Giardia lamblia* en muestras fecales de niños de Perú. *Salud Public Mex* 53: 516-519
- Romero-Caballero R, Robert-Guerrero L, Muñoz-García MR, Geyne-Cruz A. 1997. Nitazoxanida for the treatment of intestinal protozoan and helminth infections in Mexico. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 91: 701-3
- Romia SA, Zakham AA, Kholy ES. 1990. Immunodiffusion, immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay in the serodiagnosis of Giardiasis. *J Egypt Soc Parasitol* 20: 209-14

- Rossignol JF, Ayoub A, Ayers MS. 2001. Treatment of diarrhea caused by *Giardia intestinalis* and *Entamoeba histolytica* or *E dispar*. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of nitazoxanide. *J Infect Dis* 184: 381-4
- Rossoff JD, Stibbs HH. 1986. Isolation and purification of a *Giardia lamblia*-specific stool antigen (GSA-65) useful in coprodiagnosis of Giardiasis. *J Clin Microbiol* 23: 905-10
- Rosoff JD, Sanders SS, Seema PR, DeLay WK, Hadley FF, Vincezi DM, Yajko, O'Hanley PD. 1989. Stool diagnosis of giardiasis using a commercially available enzyme immunoassay to detect *Giardia*-specific antigen 65 (GSA 65). *J Clin Microbiol* 27: 1997-2002
- Savioli L, Smith H, Thompson A. 2006. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the "Neglected Diseases Initiative". *Trends in Parasitology* 22: 203-208
- Seow F, Katelaris P, Ngu M. 1993. The effect of *Giardia lamblia* trophozoites on trypsin, chemotrypsin and amylase *in vitro*. *Parasitol* 106:233-8
- Schuurman T, Lankamp P, Van Belkum A, Kooistra-Smid M, Van Zwet A. 2007. Comparison of microscopy, real-time PCR and rapid immunoassay for the detection of *Giardia lamblia* in human stool specimens. *Clin Microbiol Infect* 13: 1186-1191
- Singer SM, Elmendorf HG, Conrad JT, Nash TE. 2001. Biological selection of variant-specific surface proteins in *Giardia lamblia*. *J Infect Dis* 183: 119-24
- Smith PD, Gillin FD, Brown WR, Nash TE. 1981. IgG antibody to *Giardia lamblia* detected by enzyme-linked immunosorbent assay. *Gastroenterol* 80: 1474-80
- Sogin ML. 1989 Evolution of eukaryotic microorganism and their small subunit ribosomal RNAs. *Am Zool* 29: 487-99
- Stibbs HH. 1989. Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for *Giardia lamblia* antigen in human stool. *J Clin Microbiol* 11: 2582-88
- Sun CH, McCaffery JM, Reiner DS, Gillin FD. 2003. Mining the *Giardia lamblia* genome for new cyst wall proteins. *J Biol Chem* 278: 21701-8
- Taylor DN, Houston R, Shlim DR, Bhaibulaya M, Ungar BLP, Echeverría P. 1988. Etiology of diarrhea among travelers and foreign residents in Nepal. *JAMA* 260: 1254-8
- Thompson RCA, Reynoldson JA, Mendis AHW. 1993. *Giardia* and giardiasis. *Adv Parasitol* 32: 71-160
- Thompson RCA. 2000. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol* 30: 1259-67

- Thompson RCA. 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and Giardiasis. *Vet Parasitol* 126: 15-35
- Thompson RCA, Monis PT. 2004. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Advances in Parasitology* 58: 69-137
- Tovar J, Léon-Avila G, Sutak R, Tachezy J, Van der Giezen M, Hernández M, Müller M, Lucocq JM. 2003. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur Protein maturation. *Nature* 426: 172-6
- Troeger H, Epple HJ, Schneider T, Wahnschaffe U, Ullrich R, Burchard GD, Jelinek T, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. 2007. Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut* 56:328–335
- Upcroft P, Chen N, Upcroft JA. 1997. Telomeric organization of a variable and inducible toxin gene family in the ancient eukaryote *Giardia duodenalis*. *Genome Res* 7: 37-46
- Upcroft J, Upcroft P. 1998. My favorite cell: *Giardia*. *BioEssays* 20.3: 256-63
- Van Keulen H. 2002. An overview of *Giardia* taxonomy: A historical perspective. En Olson BE, Olson ME, Wallis PM. *Giardia*. The cosmopolitan parasite. *CAB International*, Wallingford, UK.
- Van Keulen H, Feely D, Macechko P, Jarroll E, Erlandsen S. 1998. The sequence of *Giardia* small subunit species *Giardia microti*. *J Parasitol* 84: 294-300
- WHO. 1996. The World Health Report 1996. Fighting Disease Fostering Development. World Health Organization. Geneva.
- Xiao L. 1994. *Giardia* Infection in Farm Animals. *Parasitology Today* 10: 436-438
- Xiao L, Herd RP. 1994. Epidemiology of equine *Cryptosporidium* and *Giardia* infections. *Equine Vet J* 26: 14-7