

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE MEDICINA

POLIMORFISMO DEL GENOMA DE GIARDIA INTESTINALIS Y
SU CORRELACION CLINICA EN NIÑOS CON DIARREA
CRÓNICA. COMPARACIÓN DE LOS PATRONES DE
RESTRICCIÓN DEL GEN.GDH Y TIEMPO DE GENERACIÓN

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA

CARLOS MARIANO ARROYAVE HERNÁNDEZ

QUERÉTARO, QRO. JUNIO 2001

BIBLIOTECA CENTRAL UAQ
"ROBERTO RUIZ OBRÉGON"

No. Reg. # 65545

Class. 616.963427

A77P.

EJ. 1

**Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Maestría en Ciencias Médicas**

**POLIMORFISMO DEL GENOMA DE GIARDIA INTESTINALIS Y SU
CORRELACION CLINICA EN NIÑOS CON DIARREA CRÓNICA. COMPARACIÓN
DE LOS PATRONES DE RESTRICCIÓN DEL GEN GDH Y TIEMPO DE
GENERACIÓN**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Médicas

Presenta:

Med. Esp. Carlos Mariano Arroyave Hernández

Dirigido por :

Dra. Enedina Jiménez Cardoso

SINODALES

Presidente

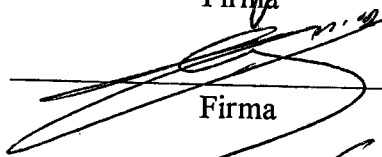
Dra. Enedina Jiménez Cardoso



Firma

Secretario

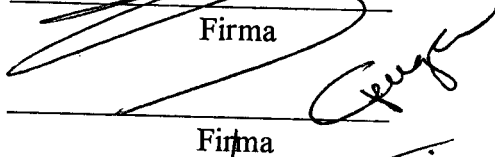
M. en C. César Gutiérrez Samperio



Firma

Vocal

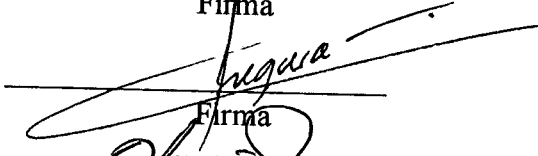
M. en C. Guadalupe Puga Sánchez



Firma

Vocal

M. en C. Jorge F. Oseguera Rodríguez




Firma

Suplente


M. en C. Ofelia Puga Sánchez



Firma



Med. Esp. Jesús Vega Malagón
Director de la Facultad de Medicina



Dr. Sergio Quesada Aldana
Director de Investigación y Postgrado
Universidad Autónoma de Querétaro

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Marzo, 2001
MEXICO

RESUMEN

Hasta la fecha, las parasitosis intestinales siguen siendo un problema en nuestro medio y en ocasiones, como es el caso de la Giardia intestinalis que se presenta en el humano con diferentes cuadros clínicos que van desde asintomáticos hasta padecimientos de diarrea crónica, pueden repercutir en el crecimiento y desarrollo de los niños. El polimorfismo del gen deshidrogenasa glutamato (GDH), ha sido utilizado para determinar diferencias genéticas entre las *Giardias* aisladas. El presente estudio se diseñó tratando de ver si hay alguna asociación entre los patrones de restricción del GDH y el tiempo de generación en cultivo axénico y el estado de gravedad de la enfermedad en niños parasitados. Se estudiaron muestras de niños con giardiasis como única parasitosis que presentaban diarrea crónica severa con repercusión en su crecimiento y desarrollo. El ácido desoxiribonucleico (ADN) genómico aislado, fue amplificado y tratado con las enzimas de restricción Kpn I, Sac I, Eco I Bam I y Pst I. Al mismo tiempo se llevaron a cabo cultivos axénicos. Los resultados de los estudios mostraron que los patrones de restricción del ADN de las *Giardias* obtenidas de heces fecales o cultivos fueron similares, sin embargo, los tiempos de generación in vitro fueron diferentes. Esto hace concluir que no hay asociación entre la actividad de la enfermedad y los patrones de generación in vitro, por lo que estos últimos no definen el grado de enfermedad del paciente.

Palabras clave: Polimorfismo, giardia, gen GDH, diarrea crónica.

SUMMARY

To date, intestinal parasitosis continues to be a health problem in our community and occasionally, as is the case of Giardia intestinalis present with different clinical manifestations (from asymptomatic to chronic diarrhea in humans), that can severely affect the growth and development of children. The glutamate dehydrogenase (GDH) gene polymorphism has been utilized to determine genetic differences among the isolated giardias. The present investigation has been developed to determine if there is any association amongst the GDH restriction enzyme patterns and generation time on axenic in vitro cultures of *Giardia intestinalis* and disease activity of children with giardiasis. Stool samples of children which have contracted *Giardia* as a sole parasite, which have presented symptoms such as chronic diarrhea, underdevelopment and limited growth, were taken and comprise the material of investigation. Genomic deoxyribonucleic acid, was amplified and treated with restriction enzymes Kpn I, Sac I, Bam I, and Pst I, and simultaneously axenic cultures were run. The results of these studies demonstrated that there are similarities between the restriction patterns of the *Giardia* DNA extracted from patients stools or from the in vitro cultures. Nonetheless, generation time patterns were different. In conclusion, there is no association between disease activity and the in vitro generation time; therefore, the latter have no effect on the severity of the illness.

Key words: Polymorphism, giardia, gene GDH, chronic diarrhea.

AGRADECIMIENTOS

Esta etapa de mi carrera académica, fue posible gracias a la confianza del **Dr. César Gutiérrez Samperio** y de la **Dra. Enedina Jiménez Cardoso**, quien con gusto aceptó dirigir este trabajo y me ayudo en todo momento.

A la Maestra en Ciencias **Leticia Eligio García** y **Carolina Deméneghi Cervantes**, incansables investigadoras en Parasitología.

A los **niños enfermos anónimos**, quienes sin ellos no sería posible nuestro trabajo diario de investigadores.

Al **Hospital Infantil de México “Federico Gómez”**, Institución que me ha facilitado el trabajo de mis tesis académicas (Medicina, Pediatría., Maestría).

A mi esposa **Mary** y mis hijos **Mónica, Carlitos, Liz y Rick**.

INDICE

	Pagina
Resumen	i
Summary	ii
Agradecimientos	iii
Índice	iv
Índice de cuadros	v
Índice de figuras	vi
I INTRODUCCIÓN	1
II REVISIÓN DE LA LITERATURA	3
III METODOLOGÍA	10
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
Conclusiones	28
V CITAS BIBLIOGRAFICAS	29
VI APÉNDICE	35
Abreviaciones	36
Glosario	37

INDICE DE CUADROS

	Pagina
Cuadro 1.- Análisis del producto 1.17 Kb obtenido de ADN de Giardia usando enzimas de restricción y técnica de la reacción en cadena de la polimerasa	23

INDICE DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1.- Patrón de restricción de <u>Giardia intestinalis</u> usando la enzima Kpn I	16
Figura 2.- Patrón de restricción de <u>Giardia intestinalis</u> usando la enzima Sac I	17
Figura 3.- Patrón de restricción de <u>Giardia intestinalis</u> usando la enzima Eco I	18
Figura 4.- Patrón de restricción de <u>Giardia intestinalis</u> usando la enzima Bam I	19
Figura 5.- Cinética de crecimiento de los cultivos axénicos de <u>Giardia intestinalis</u>	20
Figura 6.- Relación filogenética de aislados de <u>Giardia intestinalis</u> determinados por análisis máximo de Parsimonia	21

I. INTRODUCCIÓN

Las parasitosis intestinales, continúan siendo problemas de salud en nuestro país incluyendo la región donde se encuentra el Estado de Querétaro. Se ha informado que la incidencia de esta patología, puede llegar hasta un 66 % en las regiones rurales (Zaman, 1988; Zavala y Aguilera, 1991), donde el abastecimiento de agua y control de las heces fecales es muy deficiente.

La infección por Giardia intestinalis, reviste interés por varios motivos. Uno de ellos es que individuos infestados pueden o no tener sintomatología, es decir, varía desde aquellos que son asintomáticos, hasta aquellos que por el tipo y cronicidad de la infestación, pueden tener alteraciones de tipo funcional reportándose en ocasiones un déficit en el crecimiento y desarrollo, cuando la enfermedad ataca a los niños. Aunque se encuentra en todas las edades (desde la lactancia) y situaciones económicas, es más común en preescolares y escolares, sobre todo en niños que pertenecen a familias numerosas, orfanatos, asilos y escuelas elementales, lo que sugiere que en estos lugares existe una transmisión de persona a persona. Se ha informado en algunas regiones una tasa de incidencia muy alta en la población ambulatoria infantil, sobre todo en las guarderías. Es en este tipo de pacientes, el que se puede afectar el desarrollo físico e intelectual, lo que lleva a tener una baja calidad de vida. La tendencia a la alimentación artificial de los lactantes, constituye un factor que favorece la dispersión de estos parásitos (Wesley, 1989). Se ha demostrado cierta interferencia con el crecimiento y el aprendizaje en aproximadamente el 45 % de los pacientes infestados (Perea, 1992).

A través de los patrones de composición de la Giardia obtenidos por medio de tecnología de biología molecular, sobre todo de la electroforesis después de la digestión y separación de proteínas de diferente movilidad, el polimorfismo del gen glutamato deshidrogenasa (GDH) ha sido utilizado para determinar diferencias genéticas de los aislados de Giardia. La comparación de los patrones de restricción del GDH, ha ayudado a inferir el origen de la Giardia (animal o humana) (Ey y col, 1996; Monis y col ,1998). Estos hallazgos permitirán tener un mejor conocimiento del material genético de la Giardia, lo que permitirá una mejor definición epidemiológica y diagnóstica (Argüello-

García y Ortega, 1996). Al mismo tiempo, el comportamiento in vitro e in vivo en el humano, ayudará a conocer mejor el mecanismo de producción de lesión tisular.

El presente estudio se diseñó con el objetivo de investigar si había alguna asociación entre algunas de las características del genoma de la *Giardia* tales como el patrón del ácido desoxiribonucleico (ADN) después del uso de enzimas de restricción así como el comportamiento de la *Giardia* en cultivos axénicos (Keiser, 1983), utilizando como fuente de la *giardia*, la presente en heces fecales.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

Antecedentes.

Giardia lamblia, sinónimo de intestinalis o duodenalis, fue el primer parásito microscópico observado en la especie humana, y a la fecha se han descrito en mas de 40 diferentes animales (Woo,1984), y curiosamente como en el humano, los animales de poca edad son los que se ven mas afectados (Xiao,1994). Fue descubierta por Leewenhoek en 1681 (ref Tay, 1993) al parecer cuando estaba observando una muestra de materia fecal al microscopio. Lambl realizó la primera descripción identificable, y le dio el nombre de intestinalis. Kunster creó el nombre de Giardia para designar protozoos flagelados observados en el intestino de batracios y posteriormente se concluyó que éste y el observado en el intestino del humano eran del mismo género. Blanchard sugirió que el parásito fuera denominado lamblia para honrar al profesor Lambl y finalmente Stiles creo una denominación binomial nueva, Giardia lamblia, en honor al profesor Girard de París, Francia y del profesor Lambl de Praga, Checoslovaquia (Faust,1981).

Hace mucho tiempo se pensó que este protozoo tenía especificidad de huésped, pero en la actualidad se han descrito un gran número de especies morfológicamente indiferenciables unas de otras. Las evidencias indican que las especies de Giardia varían mucho en su especificidad de huésped, por lo cual la presencia de enfermedad y la reinfección por este agente, es poco entendida. Se presenta sobre todo en población de bajos recursos. La Giardia intestinalis, comparte características importantes con las demás especies de Giardia, como ha sido demostrado en varios estudios (Ey, 1962; Andrews y col, 1989; Hopkins y col 1997).

Taxonomía

La Giardia intestinalis es un protozoario que carece de mitocondrias y parasita a un número importante de mamíferos.

El género Giardia, especie lamblia

Familia de las Hexamitidae

Clase : Zoomastigophora

Phillum: Sarcomastigophora (organismo de una célula)

Subphillum: Mastigophora

Morfología

Este parásito presenta una fase infectante (quiste) y una parasitaria (trofozoito) (Leventhal, 1989). De perfil es más delgada que de frente y el tamaño variable de los trofozoitos va de diez a doce micras de longitud por seis a doce de ancho. Como trofozoito, presenta una forma piriforme, es flagelado sin membrana ondulante. Tiene una cara dorsal convexa y una ventral plana. En esta última tiene dos depresiones adyacentes que constituyen el disco suctor que actúa como ventosa para adherirse a la mucosa intestinal; tiene dos núcleos dispuestos a los lados de la línea media que son ovoides y contienen un cariosoma central formado por una masa densa de cromatina la cual está dispersa en el nucleoplasma. Detrás de los núcleos se encuentran los cuerpos parabasales que son dos masas cromáticas alargadas (Jawetz, 1981). Este organismo tiene cuatro pares de blefaroplastos que dan origen a los cuatro pares de flagelos. Durante el movimiento el parásito tiende a enroscarse sobre sí mismo, imitando lo que se conoce como “hoja que cae”. Gracias a los rápidos movimientos de sus flagelos, el trofozoito de *Giardia* se desplaza activamente de un lugar a otro, aplicando su disco suctor a la superficie epitelial. La concavidad que forma su cara ventral en sus dos tercios anteriores, constituye una ventosa o disco suctor compuesto por dos lóbulos unidos a la altura de los núcleos. Este disco tiene cierta capacidad contráctil y su cito esqueleto está compuesto de microtúbulos en los que se destacan dos proteínas, tubulina y giardina. Se han localizado proteínas contráctiles actina, alfa-actina, miosina y tropomiosina en el borde. La adhesión depende del metabolismo activo y es inhibido por el oxígeno, temperatura baja, concentración baja de cisteína y agentes farmacológicos con actividad en contra de *Giardia*, entre los que se encuentran el metronidazol, furazolidona y banzimidazoles.

Se reproduce asexualmente mediante un complicado proceso de fisión binaria durante el cual se lleva a cabo la división del núcleo, después del aparato neuromotor y el disco suctorio (Beck, 1981). Los dos trofozoitos hijos permanecen en el intestino adheridos a la mucosa o son evacuados en las heces líquidas cuando la materia fecal comienza a deshidratarse gradualmente en su tránsito hacia el colon, hasta enquistarse (Matthew, 1970). Los quistes son elipsoides, resistentes y constituyen la forma infectante del parásito; miden de nueve a doce micras de largo y de ocho a diez micras de ancho. Su

pared es gruesa, lisa, bien definida y contiene dos núcleos cuando esta recién formado y cuatro cuando es maduro. Tienen además, un doble contorno (Bernard, 1988).

El quiste es viable por un periodo de dos meses en agua fría y es más resistente en agua potable. En general, el citoplasma está encogido separado de la pared del quiste, dejando un espacio entre los dos y así permanece hasta que es ingerido y enquistado en el intestino.

Epidemiología

La Giardia lamblia es un parásito cosmopolita; la presencia de patología en el humano está ubicada entre las 20 principales enfermedades infecciosas en países en vía de desarrollo (Warren, 1989), pero con cifras de frecuencia muy variables dependientes de las condiciones sanitarias de cada región y del nivel educativo de las personas (Craig, 1960).

Es más frecuente en climas templados y cálidos que en los fríos. En el pasado los trabajos hechos en México, refieren que la infección se presentaba entre un 0.4 y 66 % de la población, dependiendo de la región de estudio (Zaman, 1988; Zavala y Aguilera, 1991), pero informes recientes, sitúan este porcentaje en un 18.9 %. En Chile, se observó una infestación intestinal del 24 % de los lactantes y en el 55 % de preescolares que acudieron a un hospital por problemas digestivos. Así, se han reportado las siguientes frecuencias en otros países: Estados Unidos de América 1-6 %, Panamá 10 %, Venezuela 9%, Brasil 4-11 %, Egipto 4-15 %, China 10%, Alemania 3-27 %, Italia 9 % y España 24 % (Do Sa Cardoso y col, 1995; Navarrete y Torres, 1994; Téllez y col, 1997). Esta enfermedad presenta un comportamiento característico de alta frecuencia desde la niñez hasta la pubertad, seguido en los años posteriores por una rápida disminución hasta mantenerse estable en le edad adulta.

Mecanismo de transmisión

La giardiasis es fácilmente transmisible, a través de la ingestión de quistes viables eliminados en las heces fecales de personas infestadas. Según los estudios de brotes epidémicos, se ha demostrado que el agua juega un papel importante en este mecanismo (Lannette, 1991). El quiste maduro entra por vía oral, resiste la acidez del jugo gástrico, llega al duodeno y se multiplica por mitosis dentro del quiste, al romperse da origen a dos

trofozoitos. La multiplicación es muy rápida sobre todo en un medio alcalino en condiciones de aclorhidria o alimentación rica en carbohidratos. Cualquier alimento, fómite o mosca doméstica, puede servir de vehículo.

Otro mecanismo frecuente de transmisión, es por las heces de personas infestadas con sanas (Joklik, 1986); se ha demostrado que este mecanismo es de gran importancia considerando que hay un número importante de portadores sanos (Thompson y col, 1993; Hill, 1993).

El enquistamiento sucede cuando la materia fecal se comienza a deshidratar en su tránsito hacia el colon. Los trofozoitos retraen sus flagelos en los axonemas, los cuales toman un aspecto de cuatro pares de cerdas curvas. El citoplasma se condensa y secreta una membrana fina hialina, la pared quística.

Patogenicidad

La giardiasis, varía desde los cuadros asintomáticos, hasta los de diarrea crónica con síndrome de mala absorción muy severo y extensa sintomatología, pasando por diarrea con pocas evacuaciones (Markell, 1980). Los síntomas se inician en las primeras tres semanas de haber sido infectado, se observa clásicamente diarrea que puede ser aguda, casi siempre con dolor abdominal. Las heces fecales son malolientes, de aspecto grasoso que flotan en el agua. Cuando llega a producir mal absorción intestinal, se reporta la presencia de distensión abdominal, flatulencia, náusea, anorexia, evacuaciones abundantes y pérdida de peso. Los pacientes con este problema, presentan una colonización del yeyuno con bacterias entéricas o levaduras, lo que sugiere que estos microorganismos pueden actuar de un modo sinérgico con la Giardia (Martínez, 1963).

La invasión del parásito al nivel intestinal, produce un proceso inflamatorio que genera atrofia de las vellosidades, hay proliferación de bacterias y desconjugación de las sales biliares (Farthing, 1993; Oberhuber y Stole, 1990). Los trofozoitos adosados a la mucosa intestinal, actúan como barrera para la absorción de glucosa, ácido fólico, vitaminas y lactosa, debido a que como se ha observado histológicamente en biopsias de pacientes sintomáticos, provoca un acortamiento y engrosamiento de las vellosidades intestinales, hiper celularidad de la lámina propia e inflamación aguda de las mucosas (Ramzi, 1990).

Otros factores de patogenicidad son la competencia que establece con el huésped por los nutrientes (Pumarola, 1987). Este factor es de interés clínico ya que este puede explicar en parte las alteraciones de crecimiento y desarrollo observado en algunos pacientes.

Inmunología

En relación con la inmunología, se ha encontrado una inmunoglobulina A secretoria específica anti giardia en leche materna de ratas, teniendo un efecto protector a la infección de crías. En cuanto a la inmunidad celular, se conoce poco, sin embargo, en ratas hipotímicas (*nude+ /nude+*), la infección por giardia produce un cuadro muy grave con gran tendencia a la reinfección. Las ratas deficientes en células cebadas (*wf/wf*), desarrollan giardiasis crónica (Atias-Neghma, 1996).

El antígeno soluble crudo de los trofozoitos de *Giardia* y otras fracciones purificadas, se han utilizado para la producción de anticuerpos y así identificar la localización de estas en el parásito. Hay algunos datos epidemiológicos que sugieren la existencia de inmunidad parcial después de la infección. Llama la atención que siendo una infección con una alta morbilidad, se conozca poco de su participación en el huésped y la respuesta inmune. Hay datos que sugieren desarrollo de inmunidad después de la infección.

Es importante mencionar que la mayoría de individuos infestados, son portadores asintomáticos, La ausencia de síntomas es probable que sea debido a la ausencia de daño al nivel de la mucosa intestinal. Se ha sugerido que la inmunidad en esta patología, es de tipo celular y humoral, debido en parte a un incremento en los linfocitos T que liberan sustancias como las linfocinas.

Genética

Poco se sabe acerca de la información genética de los dos núcleos morfológicamente equivalentes de la *Giardia lamblia* (Wiesehahn, 1984). La haploidía de este organismo, aún no ha sido determinada, pero algunos patrones electroforéticos, coinciden con diploidía (Andrews y col, 1989; Kanick, 1990). Al clonar algunas líneas celulares de diversos aislados de *Giardia lamblia*, se ha observado con gran frecuencia que continuamente aparecen variantes antigénicas (Gillin, 1990). Algunos genes han sido

clonados y codifican para polipéptidos ricos en cisteína, que son expresados como antígenos de superficie en trofozoitos (Mowatt, 1991).

La característica de dos poblaciones de ADN, como ha sido descrito, es de gran importancia bioquímica y genética (Ortega-Pierres y col, 1990). Se ha observado que existen regiones de ADN muy conservadas, las que se presentan en muchas especies de protozoarios. Esto puede ocasionar que al llevarse a cabo amplificaciones, se produzcan reacciones en tecnología molecular cuando se usan iniciadores, por lo que hay que tener mucho cuidado para escoger el mas adecuado.

La *Giardia* presenta en su estructura dos núcleos morfológicamente equivalentes, que contienen cantidades similares de ADN. Ambos se dividen con sincronía y contienen ácido ribonucleico (ARN) ribosomal transcripcional activo (Cheng, 1978; Ey y Mayrhofer, 1993). Una gran variedad de antígenos polipeptídicos de superficie, ha sido detectada en diversos aislados axénicos de *Giardia lamblia*, en los que continuamente aparecen variantes antigénicas y según se ha observado, presentan una cantidad relativamente alta de cisteína. Los polipéptidos predichos para estos genes, exhiben poca homología excepto para una región altamente conservada de un segmento terminal que se caracteriza por la presencia de múltiples copias de cuatro aminoácidos (cys-xa-xa-cys) (Ey, 1962; Ey y col, 1993). Estas secuencias conservadas, presentan sitios específicos reconocidos por diversas enzimas de restricción (Nash, 1992; Morgan, 1993).

En los últimos años, se ha verificado una serie de estudios a diferenciar tipos de *Giardia*, en diferentes especies, y se ha podido demostrar que se pueden conformar cuatro grupos de ensamblaje que han sido denominados I, II, III y IV (Andrews y col, 1989). La importancia de este conocimiento, reside en la posibilidad de poder determinar el origen de la *Giardia* ya sea de humanos o de otros animales y así de esta manera poder diseñar métodos de prevención de la enfermedad (Ey y col, 1992; Monis y col 1996). Otra forma de ver este ensamblaje, se puede ver en el trabajo de Monis y col (1997), en el que se describe la presencia de cuatro grupos, A, B, C y D. En la clasificación A y B, se tienen a los grupos del I al IV mencionados anteriormente, que corresponden a la especie *G. intestinalis* cuyo origen es de perros y humanos y C y D corresponden únicamente a perros.

Existe el problema de que los diferentes niveles de patogenicidad y sintomatología que produce la Giardia lamblia, sugieren que hay una diversidad genética de cepa a cepa, debido a que hay un gran polimorfismo, y que tienen un genoma con unidades de repetición susceptibles de cambiar. Es por esta razón que es importante determinar las características de cada cepa y diferenciarlas de acuerdo a su variabilidad genética. Esto hace pensar que esta variabilidad se encuentra asociada al cuadro clínico de la infestación y/o características propias del hospedero.

Se ha demostrado que la selección natural del protozooario en cultivos axénicos, permite modificaciones que no se observan cuando infesta al huésped, mostrando con esto la plasticidad de su genoma, por lo que cualquier marca putativa de virulencia para clasificarlo o conocerlo biológicamente en cultivo se dificulta mucho. En ocasiones se observa una mezcla de reacciones genotípicas (Andrew y col, 1989; Carnaly y col, 1991)

La investigación de la presencia de giardia en este estudio, se hará en heces así como en material axénico. El primer procedimiento tiene la ventaja de evitar cambios genéticos importantes y de haberlos, serán mínimos si se comparan con los observados cuando se emplean parásitos de cultivos axénicos, situación en la cual a veces se observan cambios importantes.

El uso de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), permite hacer estudios con pocos quistes, ya que la prueba es positiva teniendo dos a tres de ellos (Jiménez-Cardoso y col, 1995). Utilizando esta técnica y cultivos axénicos, se analizará algunas características de la Giardia asociadas con enzimas de restricción específicas. De esta manera la hipótesis de trabajo es que el grado de enfermedad del paciente, esta dado por las características del genoma de la Giardia así como de su comportamiento en cultivos axénicos.

III. METODOLOGIA

Material y métodos

Muestras obtenidas de heces fecales de niños con una historia clínica de parasitosis intestinal producida únicamente por giardia y con evolución crónica que los había llevado a tener problemas de desarrollo y crecimiento, que habían sido internados en el Instituto Mexicano del Seguro Social así como del Hospital Infantil de México, se les estudió para identificar la presencia de parásitos usando la técnica de Faust (Faust, 1981). Por medio de este análisis se definió que se incluirían en la presente investigación, únicamente las muestras fecales que presentarán Giardia intestinalis sin ningún otro parásito. Cualquier muestra que tuviera mas de un parásito o no fuera Giardia, fue excluida. De las muestras que se obtuvieron en forma al azar, unas fueron utilizadas para aislar el ADN de la giardia y analizar los patrones de electroforesis del gen GDH después de someter las muestras a la acción de diferentes enzimas de restricción utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (Jiménez-Cardoso y col 1995), y otras muestras fueron utilizadas para cultivos axénicos y así de esta manera poder analizar la cinética de crecimiento de la Giardia (Ey 1962; Keiser 1983; Meloni y col 1993). Como control del estudio se utilizó la Giardia Pórtland, el GDH así como marcadores de peso molecular durante la electroforesis. Todos los pacientes presentaban sintomatología severa consistente en diarrea crónica y repercusión en su crecimiento y desarrollo. Los métodos utilizados y el tipo de muestra utilizada para cada una de las dos diferentes muestras (se encuentran en el diagrama de flujo para su mejor comprensión), fueron los siguientes.

Cultivos

Los trofozoitos crecieron en medio de TYI-S-33 suplementado con bilis durante 14 horas, a 37 grados C de acuerdo a la técnica previamente descrita por Keister (1983). La cuantificación del crecimiento se hizo tomando muestras a las 15, 27, 39, 51, 63, 75, 87, 99, 111 y 166 horas, y el número de células se cuantificó en una cámara de Neubauer.

Extracción de ADN.

- De las muestras de materia fecal positivas a Giardia, se tomaron 5 mg, se suspendieron en 5 ml de agua destilada y se homogeneizaron perfectamente.

Se centrifugó a 6 000 g por 5 minutos y se tomaron 3 ml de sobrenadante. Se agregaron 8.5 ml de amortiguador de lisis compuesto de cloruro de sodio (NaCl) con ácido etilene diamino tetraacético (EDTA) 0.1M. Se añadió proteinasa K hasta una concentración de 0.5 % y se incubó durante 2 horas a 50 ° C.

- Cuando la muestra fue un concentrado de trofozoitos, después de centrifugar el tubo de la reacción correspondiente, y remover el sobrenadante, el material depositado en el fondo del tubo, se suspendió en 8.5 ml de una solución fría que contenía NaCl 0.15 M y EDTA 0.1 M . Se añadió proteinasa K hasta una concentración final de 0.1 mg/ml y sodio dodecil sulfato (SDS) a una concentración final de 0.5 %, así como un volumen de fenol precalentado a 60° C y se mezcló vigorosamente en agitador manual (vortex). Se centrifugó durante 10 minutos a 8 000 g a 4 ° C.
- Se recogió en fase acuosa y se extrajo con un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), mezclando vigorosamente y centrifugando a 8 000 g durante 10 minutos.
- Se extrajo la fase acuosa con un volumen de cloroformo-alcohol-isoamílico (24:25:1), se mezcló vigorosamente y centrifugó en las condiciones ya señaladas.
- Se separó la fase acuosa y añadió 0.1 volúmenes de acetato de sodio (NaAc) 3M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío.
- Se mezcló suavemente hasta que la madeja formada por el ADN se hizo evidente; se dejó precipitar a -20° C (2 a 12 horas) y después se centrifugó a 10 000 g durante 20 minutos.
- Se dejó secar la pastilla y resuspendió en 1 ml de Tris EDTA (TE).
- Se añadió ARNasa hasta una concentración final de 20 ug/ml. Se incubó a 37° C durante 20 minutos.
- Se extrajo con un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1).
- Se centrifugó durante 5 minutos a 8 000 g a 4 ° C.
- En un tubo limpio se colocó el sobrenadante cuantificado.
- Se agregó 0.1 volúmenes de NaAc 3M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío. Se dejó 10 minutos en hielo.

- Se centrifugó durante 20 minutos a 10 000 g a 4 ° C.
- Se lavó con etanol al 80 %.
- Se resuspendió en 0.5 ml de TE y se determinó la concentración para almacenar a 20° C en alícuotas de concentración conocida.
- En ocasiones el ADN obtenido por esta técnica resulta resistente a la digestión con enzimas de restricción. Si esto ocurre, se recomienda utilizar el siguiente método de purificación de ADN en alta concentración de sal.
- Se añade 0.5 volúmenes de NH₄Ac 7.5 M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío.
- Se mezcla y deja en hielo hasta que la madeja de ADN se haga aparente.
- Centrifugar a 10 000 g durante 2 minutos y lavar la pastilla con etanol al 80 %.
- Resuspender en 50 ul de TE.

Reacción en cadena de la polimerasa (RCP)

En un tubo eppendorf, colocar la siguiente mezcla de reacción:

10 ng-1 ug de ADN.

0.3 uM de cada iniciador.

200 uM de dNTPs.

1.5 mM de MgCl₂.

Amortiguador específico 1X.

2.5 U de Taq* ADN polimerasa.

cbp 100 ul de agua destilada.

- Al agregar cada reactivo, se debe microcentrifugar 10 segundos para asegurar que todos los reactivos se depositen en el fondo del tubo.
- Agregar 2 ul de aceite mineral para evitar evaporaciones durante los diferentes ciclos de temperatura.
- Colocar los tubos conteniendo la mezcla de reacción en el termociclador y someterlo a condiciones de amplificación previamente programadas para cada ADN en especial.

Corte con enzimas de restricción

- Se someten a digestión siguiendo las instrucciones del fabricante, 5 ul de PCR (gdh) de cada uno de los aislados con 2 unidades de las siguientes enzimas:

Kpn I
Sac I
Pst I
Eco RI.
BAM I

- Se incuban a 37 ° C durante toda la noche.
- Se agregan 5 ul de EDTA 0.5 M pH 8.0
- Las muestras se corren en poliacrilamida al 10 % y agarosa al 1 %. En las muestras corridas, se tiñen con nitrato de plata y bromuro de etidio, respectivamente.
En cada corrida se tuvieron controles negativos y positivos según fuera necesario.

Electroforesis

Gel de agarosa al 1 %

- Preparar una solución de agarosa al 1 % en TBE 10 X ; calentar a ebullición hasta disolverla.
- .Agregar 3 ul de bromuro de etidio 0.05 ug/ml y enfriar a 50 ° C.
- Verter la agarosa en un molde de acrílico de 8 x 10 x 05.cm, con un peine con capacidad de 20 ul por orificio. Dejar gelificar a temperatura ambiente (45 minutos).
- Colocar el gel en una cámara de electroforesis que contenga 500 ml de amortiguador TBE 1X. El gel deberá de estar cubierto completamente con el amortiguador.
- Por otro lado en un tubo eppendorf, mezclar 10 ul de la muestra de ADN obtenida más 2.5 ul de jugo azul, homogeneizar bien y depositar la mezcla en un pozo en el gel.
- Correr a 100 volts durante 45 minutos.
- Observar con una lampara de luz ultravioleta.

Gel de poliacrilamida al 10 %.

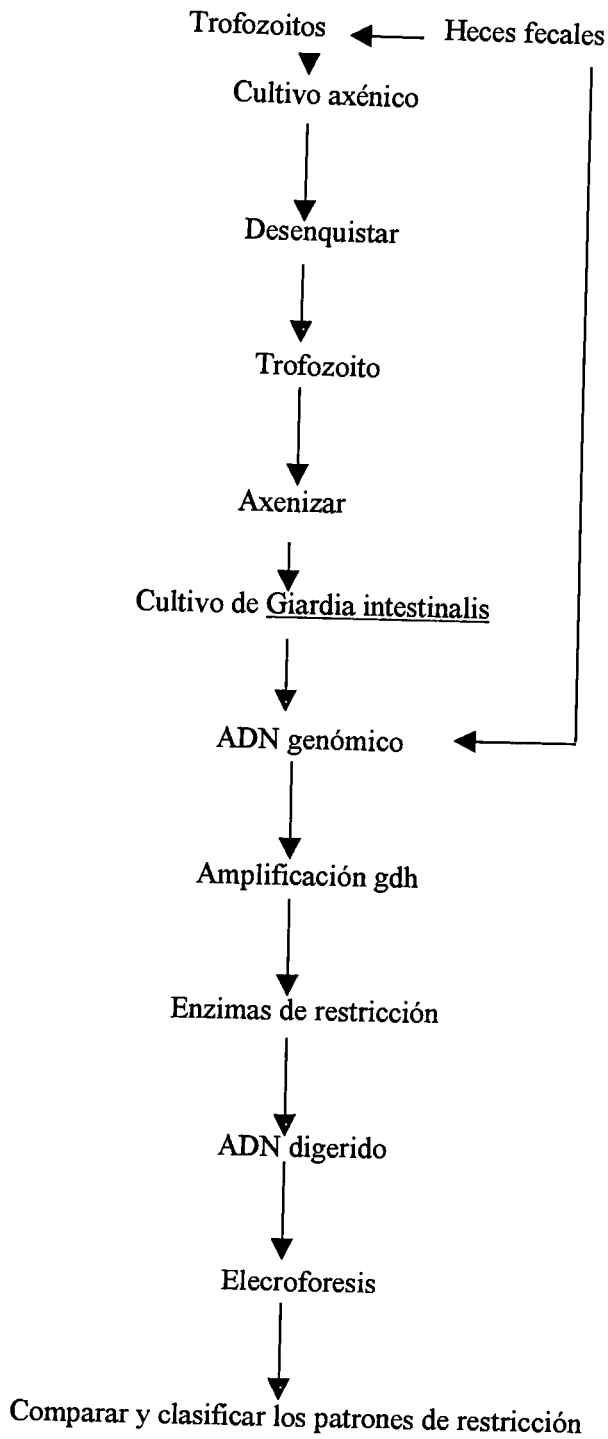
- Se prepara la siguiente mezcla de reacción:

Agua destilada	6.8 ml
TBE 10 X	2.0 ml
Acrilamida 30 %	2.0 ml
TEMED	10 ul

Persulfato de amonio 10 % 100 ulç

El diagrama de flujo de la presente investigación, se encuentra a continuación.

DIAGRAMA DE FLUJO



IV RESULTADOS Y DISCUSION

Resultados

Con el objeto de facilitar el entendimiento de los resultados, estos se presentarán en dos grupos. El primero tratará de los cultivos axénicos y los segundos del estudio del ADN proveniente Giardias de muestras fecales.

De acuerdo a los criterios de inclusión establecidos, de las 56 muestras analizadas, únicamente ocho cumplieron los criterios de inclusión, por lo que cuatro fueron utilizadas para hacer el análisis del ADN de material fecal de cuatro de ellas se hizo el estudio de cinética de crecimiento .

Las muestras fueron denominadas IMSS 1, IMSS 2, IMSS 3, IMSS 4, A, B, C y D. Cuando los ADN de las muestras de giardias del IMSS fueron cultivadas y tratados con la enzima de restricción Kpn I, no se observó corte. Todas las muestras corridas, mostraron fragmento de 1.2 kb y algunas bandas en 0.3, 0.2 kb. como se ve en la figura 1.

Cuando la enzima usada fue Sac I y las muestras fueron las Giardias axenizadas, se observaron tres fragmentos, uno a 1.0 kb y dos mas a 0.3 y 0.2 kb como se ve en la figura 2. Estos resultados sugieren la presencia de un sitio de reconocimiento.

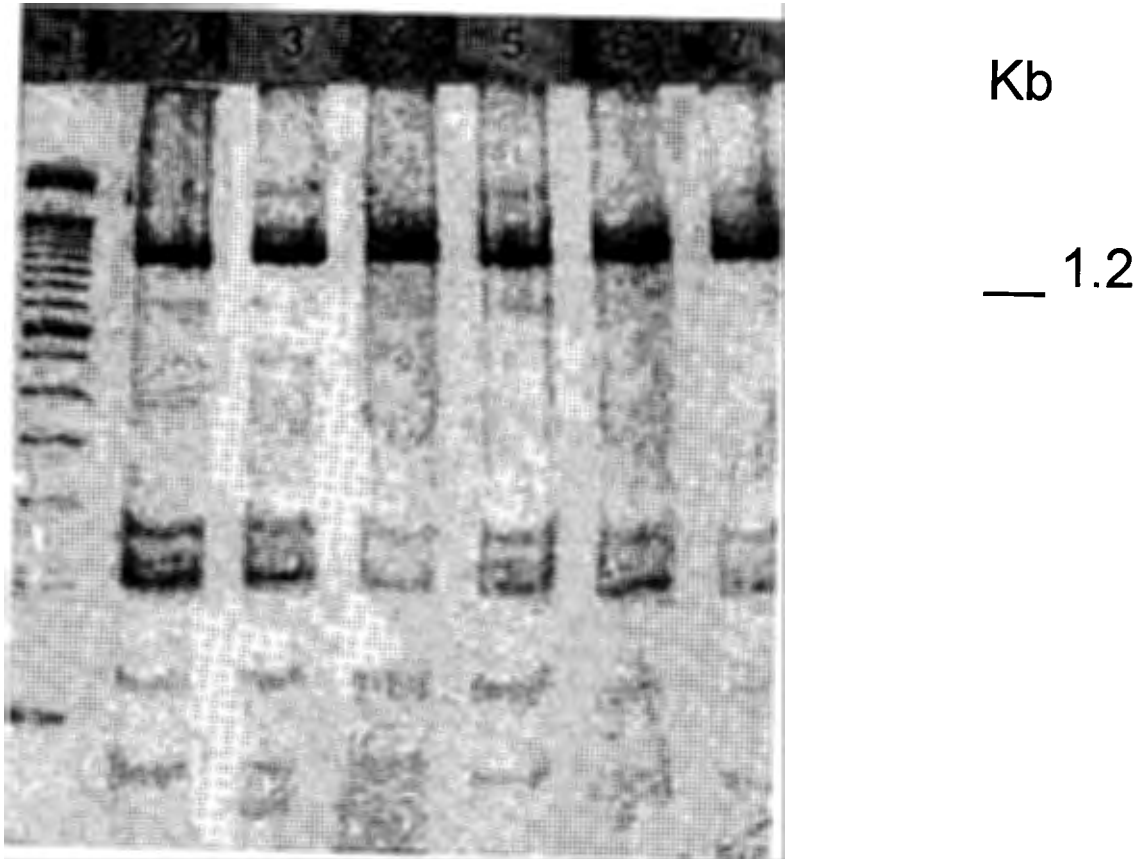


Figura 1. Patrón de restricción de Giardia intestinalis y controles usando la enzima Kpn
Las corridas corresponden a: 1 pesos moleculares; 2 control GDH; 3 IMSS 1; 4 IMSS 2;
5 IMSS 3; 6 IMSS 4 y 7 Portland I.

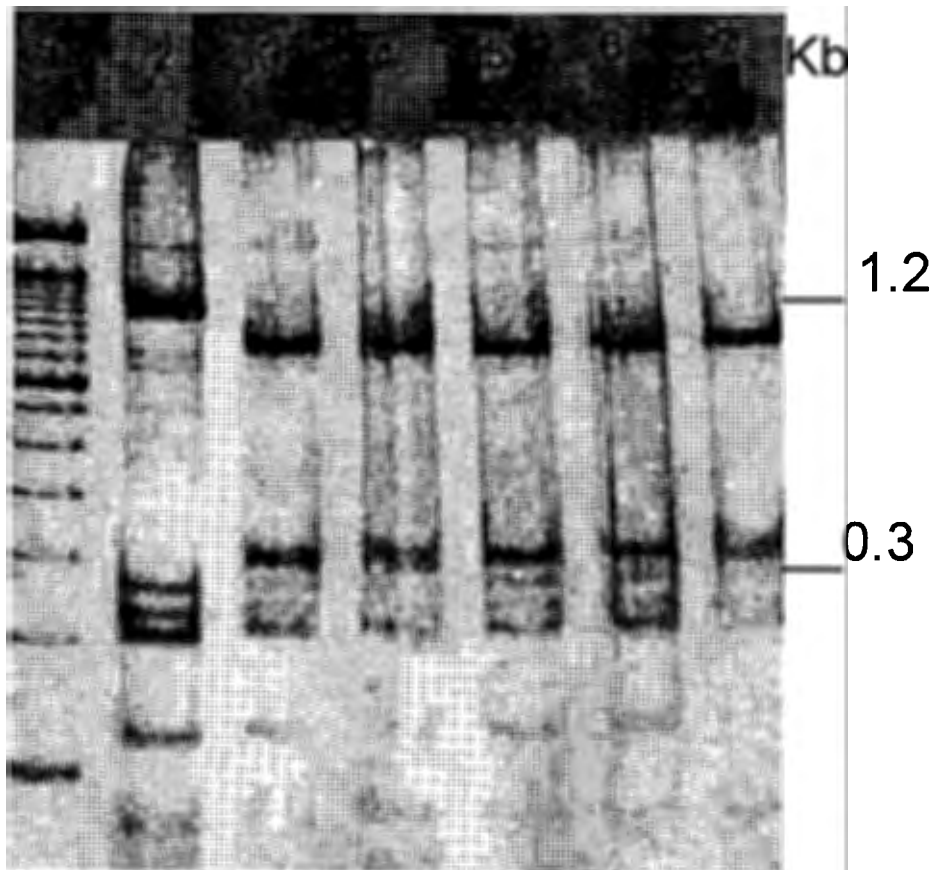


Figura 2.- Patrón de restricción de Giardia intestinalis y controles usando enzima Sac I. Las muestras en cada una de las líneas es semejante a lo descrito en figura 1.

El análisis del tratamiento con la enzima de restricción Eco I, se muestra en la figura 3. Se observan tres bandas a 1.0, 0.9 y 0.2 Kb para las muestras IMSS 1, IMSS 3, y Portland I. La muestra IMSS 2 e IMSS 4 presentaron dos bandas a 1.0 y 0.2 kb.

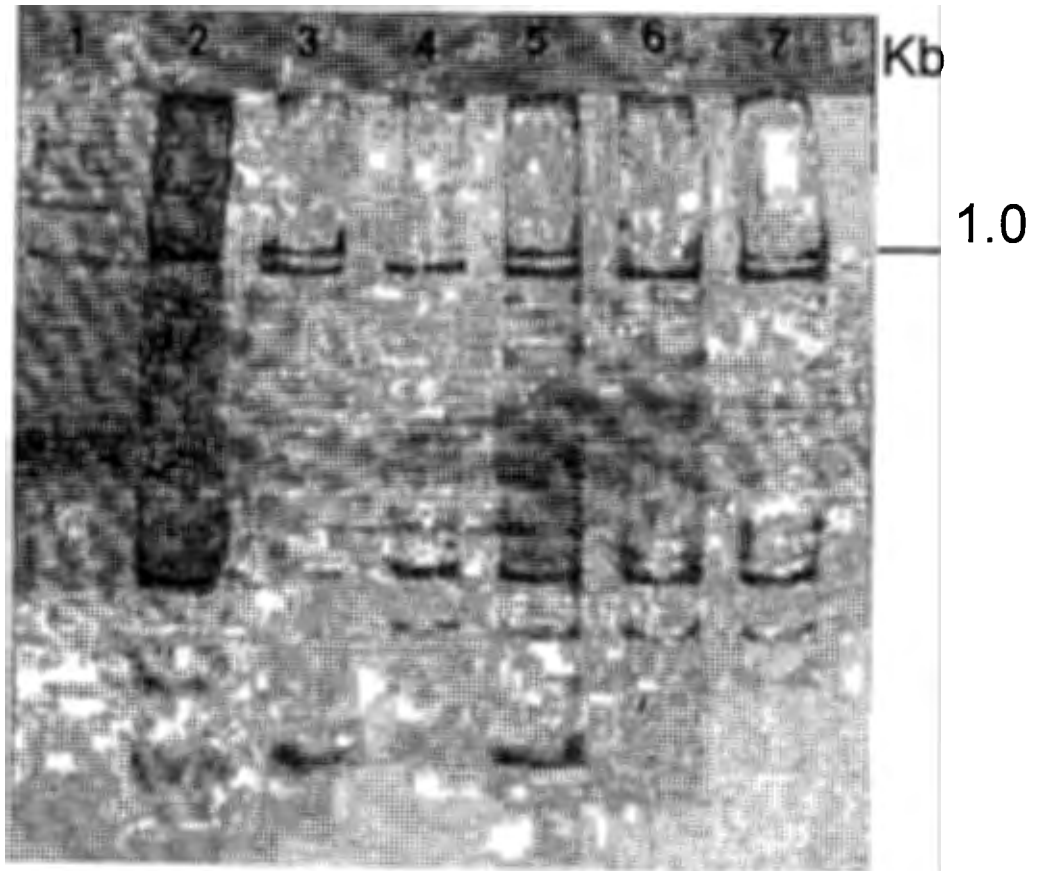


Figura 3.- Patrón de restricción de *Giardia intestinalis* y controles usando la enzima Eco I. Las muestras corresponden a lo descrito en la figura 1.

El patrón de restricción de Giardia intestinalis y controles cuando se uso la enzima Bam I se observa en la figura 4. No se ve que haya cambios que muestren sitio de acción. Resultados semejantes se obtuvieron con la enzima Pst I (no se muestra figura). Cuando el ADN tratado con todas las enzimas de restricción ya mencionadas fue el obtenido de las heces fecales sin cultivo, los resultados fueron idénticos, por lo que no se presentan mas ilustraciones al término de la electroforesis. Análisis idéntico al aquí presentado, se observo con las muestras A, B, C y D.

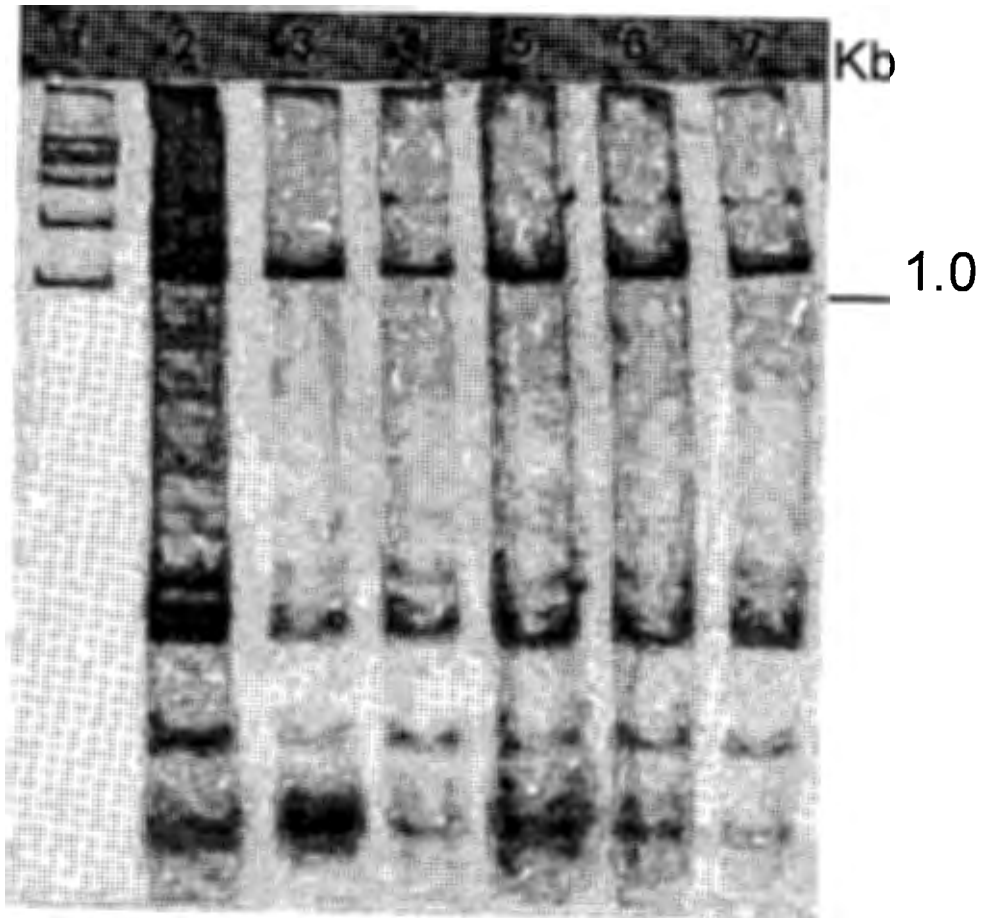


Figura 4.- Patrón de restricción de Giardia intestinalis y controles usando la enzima BAM I. Las muestras en cada línea corresponden a las descritas en la figura 1.

Estos resultados indican que en las condiciones de estudio, las giardias tienen probablemente el mismo origen regional correspondiendo al ensamble B grupo III/IV, habiendo la posibilidad de que pudieran corresponder a una zoonosis de origen animal.

La segunda serie de resultados nos muestran la

La cinética de crecimiento de los aislados de la Giardia intestinalis. IMMS 1, IMSS 2, IMSS 3, IMSS 4 y Portland en cultivo TYI-S-33 en sus diferentes fases, por un período de 87 y 166 horas, se observan en la figura 5. Cuando menos se pueden identificar 3 patrones de crecimiento diferentes siendo muy similares IMSS 3 e IMSS 4 con crecimiento rápido; IMSS 1 e IMSS 2 de crecimiento lento y Portland I de crecimiento intermedio que es diferente a los dos anteriores.

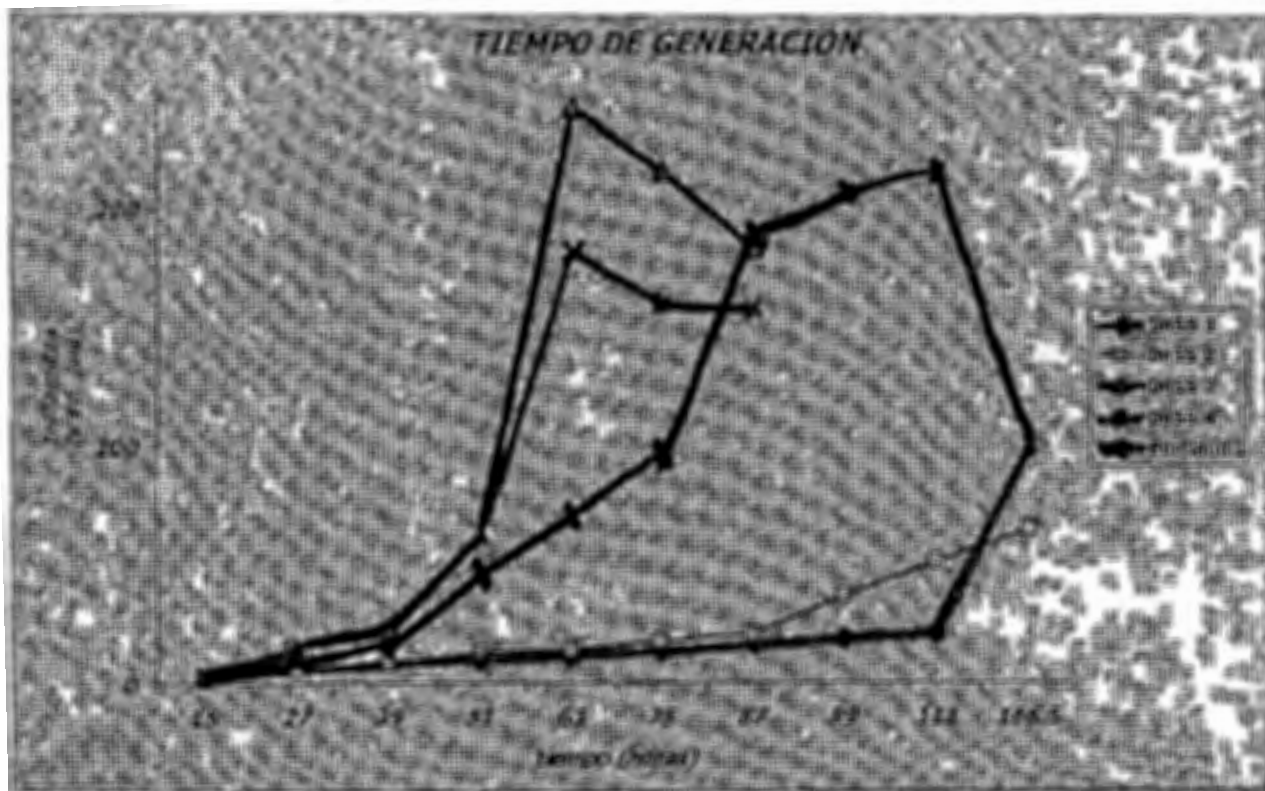


Figura 5.- Cinética de crecimiento de los aislados axénicos de Giardia intestinalis.

Discusión

En la presente investigación, el análisis de los productos obtenidos después de la incubación de cuatro muestras de heces fecales con diferentes enzimas de restricción, sugiere que las giardias estudiadas pueden corresponder al ensamble B tipo III o IV, basado al comparar los resultados de esta investigación y los establecidos en la literatura, como se ejemplifica en la figura 6.

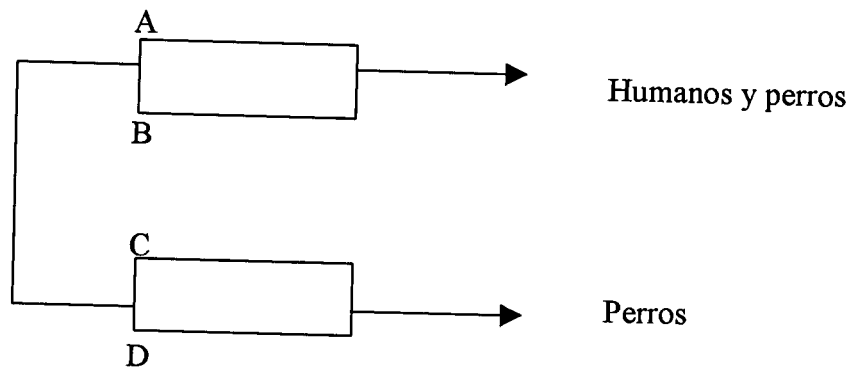


Figura 6.- Relación filogenética de aislados de Giardia intestinalis determinados por análisis máximo de parsimonia. En A se encuentra el tipo Pórtland (Monis y col 1998). Las letras A, B, C y D corresponden al tipo de ensamble.

El nombre de Giardia intestinales que actualmente se usa, corresponde anteriormente al de *G duodenalis* o *G lamblia* debido a su similitud en las características morfológicas (Filice 1952; ref por Panagiotis, 1998), pero tienen diferencias genéticas importantes. Considerando los ancestros de éstas y la forma de ensamblaje, han sido clasificadas en grupo A y B en donde se encuentran todos los tipos aislados en humanos Mayrhofer y col (1995) que corresponden respectivamente a los grupos I, II y III, IV de Andrews y col (1989) así como a los genotipos Polish y Belgian de Homan y col (1992) basados en la presencia del nucleótido CGC o ATC en la posición 22-24 respectivamente (Hopkins y col 1997).

Como se menciona anteriormente, los estudios de los genotipos más importantes han mostrado la presencia de cuatro grupos diferentes. Los dos primeros I y II son identificados primordialmente en el humano y los grupos III y IV de diferentes animales (Ey , Andrews , Mayhofer, 1992; Monis y col 1996). Considerando el análisis de las giardias estudiadas y comparando los resultados con los previamente publicados, cuando se usan diferentes enzimas de restricción (cuadro 1) se deduce que las giardias probablemente no provienen de humanos.

En este tipo de situaciones, se puede hablar de una zoonosis en donde un animal transmisor puede ser el causante de la enfermedad, como posiblemente sucede con casos en esta investigación. En relación con el tiempo de generación de los cuatro aislados, estos tuvieron tiempos de generación diferentes, los que no se correlacionaron con el polimorfismo del gen GDH que interviene en el metabolismo del parásito. Varios intentos se llevaron a cabo, siendo siempre los mismos resultados.

CUADRO 1

Análisis del producto 1.17 Kb obtenido de *Giardia* usando la reacción en cadena de la polimerasa *

Huésped	Ensamble	Grupo	E n z i m a			
			Kpn I	Bsp I	Sac I	Eco I
Hum **	A	I	+	+	+	-
Hum	A	II	+	+	+	-
Gato	Gato		-	+	+	-
Hum	B	III	-	-	+	-
Hum	B	IV	-	-	+	-
Perro	Perro		-	+	+	+
Presente estudio			-	-	+	-

* Referencia (Monis, 1993).

** Humano = Hum

Considerando que dentro de los diferentes grupos, sobre todo el I hay *Giardias* que se han aislado de otras especies de animales (Ey y col , 1997), se puede sugerir que hay un ancestro común y la posibilidad de problemas de zoonosis, sobre todo en áreas donde el agua de tomar está contaminada, lo que es común tratándose de agua de uso tanto en animales como humanos.

Con el objeto de clasificar diferencias genéticas de la *Giardia lamblia*, se han utilizado varios métodos como son análisis zimodemo (Proctor y col , 1989),

polimorfismo de fragmentos de restricción (Nash y col, 1985), cariotipo usando gel de electroforesis (Issac-Renton y col, 1993), y PCR (van Belkum y col, 1993) con y sin axenización. Esta última técnica, es difícil y requiere de tiempo pero además, puede introducir sesgos a favor de la *Giardia* la cual crece mejor in vitro que in vivo.

La investigación de las características genéticas de la *Giardia* es de interés, pues de esta manera es posible identificar el origen de cualquier situación en la cual se presente algún brote epidémico, ya que la giardiasis sigue siendo un problema de salud pública por su alta morbilidad y efectos secundarios sobre todo en la población infantil (Thompson , 1993; Rojas y Salazar, 1995).

El uso de metodología como RCP ha venido a revolucionar los conocimientos moleculares de la *Giardia* en situaciones en que se pueden usar muestras pequeñas (Jiménez-Cardoso y col, 1995; Mayer y Palmer, 1996)

Hay estudios en Suiza y Australia, donde se han comparado los grupos genéticos determinados por medios moleculares e inmunológicos con los que fueron aislados tanto de humanos como animales. Sus resultados lo hacen concluir que no hay evidencia para la ocurrencia de genotipos específicos del huésped (Ey y col, 1996).

El primer estudio en que se llevó a cabo un cultivo axénico de *Giardia intestinalis* se realizó en Bonn, Alemania, los investigadores encontraron que había tres diferentes fenotipos de acuerdo a su crecimiento in vitro: rápidos, medianos y lentos. El tipo de crecimiento en este estudio se asoció con el grupo A para los dos primeros y B para el lento. Esto indica que probablemente las diferencias metabólicas, son definidas genéticamente. Los estudios se hicieron usando PCR para identificar ampliaciones de gene que codifica para la enzima deshidrogenasa glutamato (Panagiotis y Ey, 1998; Karanis y Ey, 1998), condiciones semejantes a las usadas en esta investigación, cuando se analizó el tipo de crecimiento de las giardias cultivadas axenicamente, inicialmente el tiempo de crecimiento fue de 9 a 14 horas para su duplicación, fue reportado para el tipo I y es el descrito para la Portland (Farthing y col, 1983).

El crecimiento lento de algunas cepas de *Giardia* ha sido observado en situación que hay dos giardias, observándose casi siempre que una crece mas que la otra observándose un fenómeno inhibitorio de una sobre la otra (Binz y col, 1992) o como

también se propone, esta diferencia de crecimiento pudiera ser debida a contaminación experimental (Thompson y col, 1996).

Mas tarde. estudios de Ey, mostraron que hay un alto grado de asociación con el genotipo I y II (ensamble A) y el tipo de crecimiento de la Giardia in vitro, que es entre rápido y medio. Los datos genéticos indican que las diferencias metabólicas pueden ser determinadas rápidamente en cultivos axénicos (Karanis y Ey, 1998).

Uno de los problemas que hay que considerar en este tipo de estudios in vitro, es que el crecimiento rápido con división asexual de la Giardia puede ser responsable de mutaciones o arreglos cromosómicos (Le Blancq, 1994).

Investigaciones de esta índole se han verificado desde 1989 utilizando Giardias y 48 clonas de 50 enzimas diferentes (Andrew y col, 1989).

Es de gran interés el saber que casi el 50 % de los pacientes en edad pediátrica son asintomáticos por lo tanto son portadores sanos. Así misma, la sintomatología es muy variada y aparentemente esta depende de una gran cantidad de variables, como son la respuesta inmune del huésped, estado nutricional, infecciones recurrentes, virulencia y patogenicidad de las cepas de Giardia lamblia (Thompson y col, 1993; Hill, 1993)

En trabajos de investigación como el aquí reportado, es importante que el material de estudio provenga de pacientes que presenten un solo grupo de Giardia, ya que se han informado casos en los cuales en un solo paciente se han encontrado dos grupos de Giardia, siendo estos tan diferentes que hay una homología en un 50 % (Upcroft y Upcroft, 1994) considerándolos de esta manera diferente. Esto fue inclusive confirmatorio, cuando al hacer cultivos de este material, se obtuvo una gran variabilidad en el patrón electroforético de l cariotipo y ADN (Upcroft y Upcroft, 1994). Estos resultados probablemente son debidos a una selección clonal del genotipo dominante durante el proceso de cultivo.

Un estudio de 200 niños de los cuales 100 tenían diarrea aguda, 50 crónica y 50 asintomáticos, mostró que aparentemente un defecto de la inmunidad humoral en el huésped, puede ser el mayor determinante de la presencia de sintomatología en este tipo de pacientes (Rajeshwari y col, 1996).

En cuanto a la antigenicidad de las giardias en enfermedades experimentales se ha

demostrado que parte de la antigenicidad radica en el antígeno mayor superficial (Stager, 1997)

La aplicación de tecnología molecular es importante en el diagnóstico, lo que permite un tratamiento temprano así como estudio de tipo epidemiológico.

Contrastando con la similitud morfológica que existe entre giardia de humanos y otros mamíferos, se han analizado cerca de 200 productos aislados de humanos y 40-50 de animales, mostrando una amplia diversidad genética.

Los aislados de animales, pueden tener algunas similitudes aunque hay otros que son muy diferentes (Ey y col, 1997).

El conocimiento del tipo de Giardia que causa la infestación en una población dada, reviste gran importancia, pues de esta manera y considerando los conocimientos y avances recientes en esta parasitosis, se podrán saber si se puede presentar una zoonosis, además de sugerir la probable susceptibilidad o resistencia a medicamentos, lo cual se ha observado se asocia con cambios en el citoesqueleto y no con mutación en el aminoácido 200 en la beta tubulina (Upcroft y col, 1996). De esta manera tendremos una mejor idea epidemiológica que permita limitar la presencia de un brote, sobre todo en la población desprotegida. Este tipo de estudios se han hecho en varios países con distribución geográfica diversa, permitiendo poder caracterizar las diferentes especies y su comportamiento con el huésped.

Estudios epidemiológicos usando tecnología molecular considerando la secuencia de bases que ayudan al estudio del tipo de transmisión, tratamiento y control, ha sido también sugerida como una forma de identificar el tipo de Giardiasis (Baruch e Issac-Renton, 1996; Meloni y col, 1995). Estos estudios son de gran significación ya que los mecanismos responsables de la sintomatología en esta enfermedad son tan variables y la respuesta terapéutica e infectividad, son poco conocidos.

La importancia de la presente investigación radica en que por primera vez en nuestro medio, se hace un estudio comparativo entre dos parámetros, tiempo de generación en el cultivo axénico y plimorfismo del gen GDH de Giardia obtenida de materia fecal proveniente de pacientes sintomáticos. De los resultados podemos inferir que la colonización de giardia fue independiente del tiempo de generación in vitro y de la

constitución genética del gen GDH; sin embargo permitió conocer el origen de la Giardia estableciendo así la presencia o no de una zoonosis..

Conclusiones

1. Los patrones de restricción del gen glutamato dehidrogenasa de giardia obtenida de pacientes con diarrea crónica y alteraciones en el desarrollo y crecimiento, son muy similares. Esto se observó tanto en ADN aislado de heces fecales como el aislado de trofozoitos cultivados en forma axénica
2. La cinética de crecimiento de aislados axénicos de Giardia intestinalis de los cuatro pacientes mencionados en 1, fueron diferentes, habiendo dos de crecimiento rápido, uno de intermedio y dos de lento.
3. Los datos sugieren que no hay asociación entre el la severidad de la enfermedad producida por la Giardia y el crecimiento in vitro de giardias cultivadas en forma axénica, ya que algunas crecieron lentamente y produciendo aparentemente el mismo grado de enfermedad que aquellas que crecieron rápidamente.
4. Por medio del uso de enzimas de restricción, se puede conocer el origen de la Giardia, animal y humano, lo que permite establecer programas epidemiológicos.

V. CITAS BIBLIOGRAFICAS

- Arguello-García, R., and M.G. Ortega-Pierres. 1996. Avances en el estudio del material genético de giardia duodenalis y su aplicación potencial en epidemiología y diagnóstico molecular de la giardiasis. *Gac. Med. Mex.* 132:303-313.
- Andrews, R.H., M. Adams, P.F.L. Boreham, G. Mayrhofer, and B.P. Meloni. 1989. *Giardia intestinalis*: electrophoretic evidence for a species complex. *Int. J. Parasitol.* 19:183-190.
- Atias-Neghme. 1996. En: *Parasitología médica* p 123. Ed. Mediterraneo, Santiago de Chile.
- Baruch, A.C., and J. Isaac-Renton. 1996. The molecular epidemiology of *Giardia lamblia*: A sequence-based approach. *J. Infec. Dis.* 174:233-236
- Beck, J. W. 1981. In: *Medical Parasitology.* p 41-46. Ed. Mosby Co, USA
- Bernard, H.J. 1988. En: *Diagnóstico y tratamiento clínicos en el laboratorio.* p 1520-1521. Ed. Salvat, México.
- Binz, N., R.C.A. Thompson, A.J. Lymbery, and R.P. Hobbs. 1992. Comparative studies on the growth dynamics of two genetically distinct isolates of *Giardia duodenalis* in vitro. *Int. J. Parasitol* 22:195-202
- Carnaly, S., D.T. McHugh, P.H. Katelosis, and M.J.G. Farthing. 1991. Genomic evidence for multiple strain involuemention *Giardia lamblia* infection *M.G.T.* 32:563-566.
- Cheng, T.C. 1978. En: *Parasitología general.* p 137-146. Ed. AC, España.
- Craig, C.F. 1960. En: *Parasitología clínica.* p 121-125. Hispano Americana (Ed), México.
- Do Sa Cardoso, G., A.D. de Santana, and C.P. de Aguir. 1995. Prevalencia y aspectos epidemiológicos de Giardiasis en creches no Municipio de Acaraju, SE Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 28:25-51.
- Ey, P.L. 1962. Distinct genetic groups of *Giardia intestinalis*. distinguished by restriction fragment length polymorphism. *J. Microbiol.* 138: 2629-2637.
- Ey, P.L., and G. Mayrhofer. 1993. Two genes encoding homologous 70 Kda surface trophozoites of the binucleate protozoan parasite *Giardia intestinalis*. *Gene* 129:257-262

- Ey, P.L., R.H. Andrews, and G. Mayhofer. 1993. Differentiation of major genotypes of *giardia intestinalis* by polymerize chain reaction analysis of a gene encoding a trophozoite surface antigen. *Parasitology* 106:347-356
- Ey, P.L., T. Bruderer, C. Wehrli, and Kohler P. 1996. Comparison of genetic groups determined by molecular and immunochemical analyses of *Giardia* isolated from animals and humans in Switzerland and Australia. *Parasitol. Res.* 82:52-60
- Ey, P.L., M. Mansouri, J. Kulda, E. Nohýnková, P.T. Monis, R.H. Andrews, and G. Mayrhofer. 1997. Genetic analysis of *Giardia* from hooved farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. *J. Euk. Microbiol.* 44:626-635
- Farthing, M.J.G. 1993. Diarrhea disease: current concepts and future challenges. Pathogenesis of giardiasis. *Trans. R.Soc. Trop. Med. Hyg.* 82: 17-21
- Farthing, M.J.G., S.R. Varon, and G.T. Keusch. 1983. Mammalian bile promotes growth of *Giardia lamblia* in axenic culture. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77:467-469
- Faust, E.C. 1981. En: *Parasitología clínica*. p 59-60. Ed. Salvat, México.
- Gillin, F.P. 1990. Isolation and expression of the gene for a major surface protein of *Giardia lamblia*. *Proc. Nat. Aca. Sci. USA* 87:4463-4467.
- Hill, D.R. 1993. Giardiasis. Issues in diagnosis and management. *Infec. Dis. Clin. North. Am.* 7:503-521.
- Homan, W.L., van F.H.J. Enkevort, L. Limper, G.J.J.M. Eys, G.J. Schoone, W. Kasprzak, A.C. Majewska, and van F. Knapen. 1992. Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzymes analysis and DNA probes. *Parasitol. Res.* 78:316-323
- Hopkins, R.M., B.P. Meloni, D.M. Groth, J.D. Wetherall, J.A. Reynoldson, and R.C.A. Thompson. 1997. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *giardia* isolates recovered from humans and dogs in the same locality. *J. Parasitol.* 83:44-51.
- Issac-Renton, J.L., C. Cordeiro, K. Sarafis, and H. Shahriari. 1993. Characterization of *Giardia duodenalis* isolates from a waterborne outbreak. *J. Infect. Dis.* 167:431-440.
- Jawetz, E. 1981. En: *Microbiología médica*. p 526-527. Ed. Manual Moderno, México.
- Jiménez-Cardoso, E., T. Alamillo, y col. 1995. La reacción en cadena de la polimerasa. Una alternativa en niños con problemas diagnóstico de giardiasis. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 32:560-564.

- Joklik, W.K. 1986. In: Zinsser microbiology. p 956-857. Ed. Appleton, USA.
- Kabnick, K. S. 1990. In situ analysis reveal that the two nuclei of *Giardia lamblia* are equivalent. *J. Cell. Sci.* 95: 353-360.
- Karanis, P. and P.L. Ey. 1998. Characterization of axenic isolates of *Giardia intestinalis* established from humans and animals in Germany. *Parasitol. Res.* 84:442-449
- Keister, D.B. 1983. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77:487-488
- Le Blancq, S.M. 1994. Chromosome rearrangement in *Giardia lamblia*. *Parasitology Today* 10:177-179.
- Lennette, E.H. 1991. En : Manual de microbiología médica. p 797. Ed. Panamericana, Argentina.
- Leventhal, R. 1989. In: Medical parasitology. P 495. Ed. Davis FA , Col USA.
- Markell, E.K. 1980. In: Medical parasitology. p 51-58. Ed. Saunders W.B., USA.
- Martínez, B.M. 1963. En: Manual de parasitología médica. p.85 Ed. Prensa Médica - Mexicana, México.
- Matthew, J.L. 1970. En : Métodos de laboratorio. p 1037-1038. Ed. Interamericana, México
- Mayer, CL., and C.J. Palmer. 1996. Evaluation of PCR, nested PCR, and fluorescent antibodies for detection of *Giardia* and *Cryptosporium* species in wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2081-2085
- Mayrhofer, G., R.H. Andrews, P.L. Ey, and N.B. Chilton. 1995. Division of *Giardia* isolates from humans into two major assemblages by electrophoresis analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. *Parasitol.* 111:11-17
- Mayrhofer, G., R.H. Andrews, P.L. Ey, M.J. Albert, T.R. Grimmond, and D.J. Merry. 1992. The use of suckling mice to isolate and grow *Giardia* from mammalian faecal specimens for genetic analysis. *Parasitol.* 105:255-263.
- Meloni, B.P., A.J. Lymbery, and R.C.A. Thompson. 1995. Genetic characterization of isolates of *Giardia duodenalis* by enzyme electrophoresis: implications for reproductive biology, population structure, taxonomy, and epidemiology. *J. Parasitol.* 81:368-380
- Monis, P.T. 1993 *Parasitology* 116:7-19.

- Monis, P.T., G. Mayrhofer, R.H. Andrews, W.L. Homan, L. Limper, and Ey P.L. 1996. Molecular genetic analysis of giardia intestinalis isolates at the glutamate dehydrogenase locus. *Parasitology* 112:1-12
- Morgan, U.M. 1993. Rapid analysis of Giardia DNA and correlation with isoenzyme data. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 867:702-705.
- Mowatt, T.C. 1991. Terminal sequence conservation among variant species surface proteins of Giardia lamblia. *Mol. Biochem. Parasitol.* 99:215-228.
- Nash, T.E., T. McCutchan, D. Keister, J.B. Dama, J.D. Conrad, and F.D. Gillin. 1985. Restriction –endonuclease analysis of DNA from 15 giardia isolates obtained from human and animals. *J. Infect. Dis.* 152:64-73
- Nash, T.E. 1992. Surface antigen variability and variation in Giardia lamblia. *Parasitol. Today.* 8: 229-234.
- Navarrete, N., P. Torres. 1994. Prevalencia de infección por protozoas y helmintos intestinalis en escolares de un sector costero de la Provincia de Valdivia, Chile. *Bol. Chil. Parasitol.* 49:79-81.
- Oberhuber, G., and M. Stole. 1990. Giardiasis: analysis of histological changes in biopsy specimens of patients. *J. Clin. Pathol.* 43:641-643.
- Ortega-Pierres, M.G., R.A. Alonso, L. Cervantes, y C. Montañez. 1990. Characterization of two DNA populations of Giardia lamblia. *Mol. Microbiol.* 4:1985-1991.
- Panagiotis, K., and P.L. Ey. 1998. Characterization of axenic isolates of Giardia intestinalis established from humans and animals from Germany. *Parasitol. Res.* 84:442-449
- Perea, E.J. 1992. En : *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica.* p 960-961. Ed. Doyma, España.
- Proctor, E.M., J.L. Renton, J. Boyd, Q. Wong, and W.R. Bowie. 1989. Isoenzyme analysis of human and animal isolates of Giardia duodenalis from British Columbia, Canada. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41:411-415
- Pumarola, A. 1987. En: *Microbiología y parasitología médica.* p 828-830. Ed. Méndez, México.
- Rajeshwari, K., N. Jaggi, V. Aggarwal, S.K. Mittal, and U. Baveja. 1996. Determinants of symptomatic giardiasis in childhood. *Trop. Gastroenterol.* 17:70-76.
- Ramzi, S.C. 1990. En: *Patología estructural y funcional.* p 87 Ed. Interamericana, España.

Rojas, Y., and W. Salazar. 1995. Estudio coproparasitológico de la localidad de los Cachicatos Estado de Sucre. Acta. Cient. Venezol. 46 (suppl 1) :160-172

Stager, S., B. Gottstein, and N. Muller. 1997. Systemic and local antibody response in mice induced by a recombinant peptide fragment from *Giardia lamblia* variant surface protein (VSP) H7 produced by salmonella typhimurium strain. Int. J. Parasitol. 27:965-971

Tay, Z.J. 1993. En : Microbiología y parasitología médica. p 340-344. Ed. Méndez, México.

Tellez A, W. Morales, y col. 1997. Prevalence of intestinal parasitosis in the human population on Leon, Nicaragua. Act. Trop. 66:119-125.

Thompson, R.C.A., J.A. Reynoldson, and A.H. Mendis. 1993. *Giardia* and giardiasis. Adv. Parasitol. 71:160-168

Thompson, R.C.A., A.J. Lymbery, D.A. Pearce, K.C. Finn, J.A. Reynoldson, and B.P. Meloni. 1996. *Giardia duodenalis*-exposure to metronidazole inhibits competitive interactions between isolates of the parasite in vitro. J. Parasitol. 82:679-683.

Upcroft, J.A., and P. Upcroft. 1994. Two distinct varieties of *Giardia* in a mixed infection from a single human patient. J. Euk. Microbiol. 41:189-194.

Upcroft, J., R. Mitchell, N. Chen, and P. Upcroft. 1996. Albendazole resistance in *Giardia* is correlated with cytoskeletal changes but not with a mutation at amino acid 220 in beta-tubulin. Micro. Drug. Resist. 2:303-308.

Van Belkum, A., W. Homan, L. Limper, and W.G.W. Quint. 1993. Genotyping isolates and clones of *Giardia duodenalis* by polymerize chain reaction: implications for the detection of genetic variation among protozoan parasite species. Molecular Biochemical. Parasitol. 61:69-78.

Warren, K.S. 1989. Selective primary health care and parasitic diseases. In KPWJ Mc Adam p 217-231 Ed. New strategies in parasitology. New York, Churchill Livingston.

Wesley, A.V. 1989. En: Microbiología médica. p 764-765. Ed. Interamericana, México.

Wiesehahn, G.P. 1984 *Giardia lamblia*: autoradiographic analysis of nuclear replication. Exp. Parasitol. 58:94-100.

Woo, P.K. 1984. Evidence for animal reservoirs and transmission of *Giardia* infection between animal species. In S.L. Erlandsen and E.A. Meyer. P431-464. Eds: *Giardia* and Giardiasis. New York: Plenum Press.

Xiao, L . 1994. Giardia infection in farm animals. Parasitol Today 10:436-438.

Zaman, U. 1988. En: Atlas de parasitología clínica médica. p 36-38. Ed. Panamericana, México.

Zavala, J.T y R.C. Aguilera. 1991. En: Parasitología médica. p 78-81. Ed. Francisco Martínez Cervantes, México.

VI. APENDICE

Abreviaciones

ADN.- Acido deoxiribonucleico

ARN.- Acido ribonucleico

EDTA.- Acido etilene diamino tetracetico

g.- gravedad

GDH.- Gen glutamato dehidrogenasa

IMSS.- Instituto Mexicano del Seguro Social

Kb.- Kilo bases

MgCl₂.- Cloruro de magnesio

NaAc.- Acetato de sodio

NaCl.- Cloruro de sodio

NH₄Ac.- Acetato de amonio

dNTPs.- deoxinucleotidos trifosfatados

RCP.- Reaccion en cadena de la polimerasa

SDS.- Dodecil sulfato de sodio

TBE.- Tris acido borico EDTA

TE.- Tris EDTA

TEMED.- Tetraetilenmetildiamino

Glosario

Axénico.- Se dice del desarrollo de una sola especie o género de ser vivo, libre de todo organismo. Cultivo puro, no contaminado.

Diploidia.- Esta caracterizado por la posesión de dos grupos completos de cromosomas homólogos.

Genoma.- Conjunto de todos los cromosomas diferentes que se encuentran en cada núcleo de una especie determinada.

Genotípico.- Relativo al genotipo.

Genotipo.- Conjunto de factores hereditarios constitucionales de un individuo o de una especie.

Haplo.- Prefijo utilizado en botánica para referirse a algo que pudiendo ser doble o complejo es simple.

Haploide.- Que tiene en los gametos el número de cromosomas reducido en distinción del número diploide o completo de cromosomas en las células somáticas normales.

Homología.- Calidad de lo que es homólogo

Homólogo.- Dícese de cuerpos orgánicos que desempeñan iguales funciones y sufren idénticas metamorfosis

Infestación.- Estado morboso especialmente el producido por parásitos macroscópicos.

Morbilidad.- Proporción de enfermos en un lugar y tiempo determinado

Polimorfismo.- Presencia de organismos, microorganismos, gérmenes, etc.

morfológicamente distintos en el seno de una misma especie. En genética, existencia en una población de dos o más genotipos alternativos, determinados por factores genéticos que presentan frecuencia demasiado elevadas para que puedan ser mantenidos solo por la mutación.