

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CULTIVO AXENICO DE *Glucaria lambellia*  
EN UN MEDIO LIBRE DE SUERO

POE

Q.B.P. MAGDA ELIZABETH HERNANDEZ GARCIA

Como requisito parcial para obtener el grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD  
EN MICROBIOLOGIA

FEBRERO 2009

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CULTIVO AXENICO DE *Giardia lamblia*  
EN UN MEDIO LIBRE DE SUERO

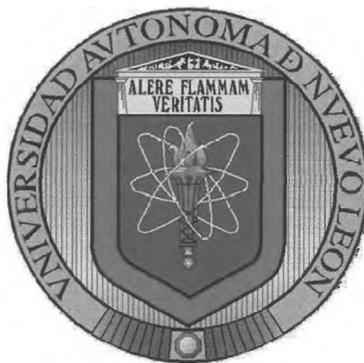
POR:  
Q.B.P. MAGDA ELIZABETH HERNANDEZ GARCIA

Como requisito parcial para obtener el grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD  
EN MICROBIOLOGIA

FEBRERO 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CULTIVO AXÉNICO DE *Giardia lamblia* EN UN MEDIO LIBRE DE SUERO

Por:

Q.B.P. Magda Elizabeth Hernández García

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
Maestría en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Febrero, 2009

CULTIVO AXÉNICO DE *Giardia lamblia* EN UN MEDIO LIBRE DE SUERO

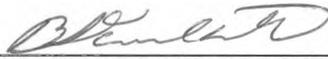
Comité de tesis



---

Dr. Mario Rodolfo Vallarta Morales

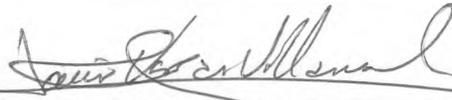
Director interno



---

Dr. Benito David Mata Cárdenas

Director externo



---

Dr. Javier Vargas Villarreal

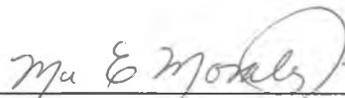
Co-director



---

Dr. Feliciano Segovia Salinas

Secretario



---

Dra. María Eufemia Morales Rubio

Vocal

*El desarrollo experimental del presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Mario Rodolfo Morales Vallarta.*

*El desarrollo experimental del presente trabajo se llevó a cabo en el  
Laboratorio de Bioquímica y Fisiología Celular del Centro de  
Investigaciones Biomédicas del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro  
Social, bajo la dirección del Dr. Benito David Mata Cárdenas.*

## DEDICATORIA

*A mi padre José Luis Hernández Martínez, por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante.*

*A mi madre Martha Eugenia García de Jesús, a quien le debo todo en la vida, gracias por haberme educado y soportar mis errores, por apoyarme en todo momento, agradezco sus consejos y la motivación constante, que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.*

*A mi hermana Mariely Eunice Hernández García, porque siempre he contado con ella para todo, le agradezco el cariño, la comprensión, la paciencia y el apoyo incondicional.*

*Gracias porque me han dado todo lo que soy como persona, valores, principios, perseverancia y empeño... todo ello con una gran dosis de amor y sin pedir nunca nada a cambio.*

*¡Gracias por creer en mí!*

## AGRADECIMIENTOS

*Quiero agradecer el apoyo que me brindaron las personas que compartieron conmigo este tiempo, en el cual me enfrenté a diversos desafíos, que sin la ayuda de ellos, este camino hubiera sido difícil.*

*Al Dr. Benito David Mata Cárdenas por sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su paciencia y motivación han sido fundamentales para mi formación. Además, mi admiración y sentirme en deuda con él por todo lo recibido durante este tiempo.*

*Al Dr. Javier Vargas Villarreal por formar parte de este nuevo reto, gracias por su apoyo incondicional y demostrarme que para lograr mis sueños, se necesita de persistencia y de no darme por vencida.*

*Al Dr. Mario Morales Vallarta por demostrarme que a pesar de todo puedo ser capaz de cumplir mis metas aunque todo este en contra, gracias por sus palabras que me hicieron crecer y me motivaron a continuar.*

*Al Dr. Feliciano Segovia Salinas, por demostrarme su apoyo incondicional, compartirme su tiempo y brindarme su amistad.*

*A la Dra. María Eufemia Morales Rubio, por su tiempo, consejos y observaciones en la revisión de este trabajo.*

## AGRADECIMIENTOS

*Quiero agradecer el apoyo que me brindaron las personas que compartieron conmigo este tiempo, en el cual me enfrente a diversos desafíos, que sin la ayuda de ellos, este camino hubiera sido difícil.*

*Al Dr. Benito David Mata Cárdenas por sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su paciencia y motivación han sido fundamentales para mi formación. Además, mi admiración y sentirme en deuda con él por todo lo recibido durante este tiempo.*

*Al Dr. Javier Vargas Villarreal por formar parte de este nuevo reto, gracias por su apoyo incondicional y demostrarme que para lograr mis sueños, se necesita de persistencia y de no darme por vencida.*

*Al Dr. Mario Morales Vallarta por demostrarme que a pesar de todo puedo ser capaz de cumplir mis metas aunque todo este en contra, gracias por sus palabras que me hicieron crecer y me motivaron a continuar.*

*Al Dr. Feliciano Segovia Salinas, por demostrarme su apoyo incondicional, compartirme su tiempo y brindarme su amistad.*

*A la Dra. María Eufemia Morales Rubio, por su tiempo, consejos y observaciones en la revisión de este trabajo.*

*A la Dra. María Porfiria Barrón González, por brindarme su apoyo y ayudarme cuando más lo necesite, gracias por los consejos y observaciones en la redacción de este trabajo.*

*A mis amigos, porque gracias a ellos sé lo que es la verdadera amistad, valor importante en mi vida, gracias por estar conmigo, por aconsejarme, regañarme, compartir risas y llantos en todo este tiempo.*

*A mis compañeros de laboratorio, porque el ambiente de trabajo creado es simplemente perfecto, y su visión, motivación y optimismo me han ayudado en momentos muy críticos.*

*A mis maestros que participaron en mi desarrollo profesional, gracias por su tiempo y enseñanzas, sin su ayuda y conocimientos no estaría en donde me encuentro ahora.*

*A las nuevas amistades que me dejó la maestría, por permitirme conocerlos y ser parte de su vida. Por ayudarme y estar conmigo a lo largo de este tiempo y aun después...*

*A ti, por tu apoyo y consejos. Por ser quien eres y cambiar mi vida.*

*Y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis, les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.*

*¡Gracias a ustedes!*

## AGRADECIMIENTOS

*Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento No. 90376, para la realización de este proyecto: "Cultivo axénico de Giardia lamblia en un medio libre de suero". Y por el apoyo otorgado como becaria No. 219737.*

*Al IMSS por la beca de investigación que me otorgo durante estos dos años, con número de beca 99206724.*

## AGRADECIMIENTOS

*Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento No. 90376, para la realización de este proyecto: "Cultivo axénico de Giardia lamblia en un medio libre de suero". Y por el apoyo otorgado como becaria No. 219737.*

*Al IMSS por la beca de investigación que me otorgo durante estos dos años, con número de beca 99206724.*

## TABLA DE CONTENIDO

| Sección                                                            | Página |
|--------------------------------------------------------------------|--------|
| DEDICATORIA                                                        | iii    |
| AGRADECIMIENTOS                                                    | iv     |
| LISTA DE TABLAS                                                    | ix     |
| LISTA DE FIGURAS                                                   | x      |
| NOMENCLATURA                                                       | xii    |
| RESUMEN                                                            | xiii   |
| ABSTRACT                                                           | xiv    |
| 1. INTRODUCCIÓN                                                    | 1      |
| 2. HIPÓTESIS                                                       | 2      |
| 3. OBJETIVOS                                                       | 3      |
| 3.1 Objetivo general                                               | 3      |
| 3.2 Objetivos particulares                                         | 4      |
| 4. ANTECEDENTES                                                    | 6      |
| 4.1 Giardiasis y <i>Giardia lamblia</i>                            | 6      |
| 4.2 Epidemiología                                                  | 8      |
| 4.3 Ciclo vital                                                    | 9      |
| 4.4 Características biológicas                                     | 12     |
| 4.4.1 Trofozoíto                                                   | 12     |
| 4.4.2 Quiste                                                       | 13     |
| 4.5 Patogenia                                                      | 13     |
| 4.6 Manifestaciones clínicas                                       | 16     |
| 4.7 Historia del cultivo <i>in vitro</i> de <i>Giardia lamblia</i> | 17     |

|                                                          |    |
|----------------------------------------------------------|----|
| 5. MÉTODOS                                               | 24 |
| 5.1 Origen de los reactivos                              | 24 |
| 5.2 Material biológico                                   | 25 |
| 5.2.1 Cepa de <i>Giardia lamblia</i> IMSS:0989           | 25 |
| 5.3 Preparación del medio basal TYI                      | 25 |
| 5.4 Preparación del suero bovino                         | 26 |
| 5.5 Preparación de la bilis bovina                       | 27 |
| 5.6 Métodos de resiembra                                 | 27 |
| 5.7 Cinética de crecimiento                              | 28 |
| 5.9 Obtención de las bilis de rastro municipal           | 28 |
| 5.10 Evaluación de las diferentes bilis                  | 29 |
| 5.11 Composición y preparación de soluciones             | 30 |
| 5.11.1 Albúmina bovina al 25%                            | 30 |
| 5.11.2 LCR (Lipid Cholesterol Rich)                      | 30 |
| 5.11.3 Mezcla de vitaminas                               | 30 |
| 5.11.3.1 Mezcla vitamínica 107                           | 31 |
| 5.11.3.2 Mezcla vitamínica Tween 80                      | 33 |
| 5.11.4 Solución de Earle                                 | 33 |
| 5.11.5 PACSR                                             | 35 |
| 5.12 Medio TYI-PACSR                                     | 36 |
| 5.13 Rendimiento del medio TYI                           | 36 |
| 5.14 Diseño experimental                                 | 36 |
| 5.14.1 Métodos estadísticos                              | 37 |
| 6. RESULTADOS                                            | 38 |
| 6.1 Parámetros de crecimiento                            | 39 |
| 6.2 Sustitución de la bilis bovina                       | 41 |
| 6.3 Sustitución del suero bovino                         | 53 |
| 6.3.1 Parámetros de crecimiento en el medio TYI-albúmina | 55 |
| 6.4 Sustitución de la albúmina                           | 56 |
| 6.4.1 Parámetros de crecimiento en el medio TYI-PACSR    | 57 |
| 7. DISCUSIÓN                                             | 59 |
| 8. CONCLUSIÓN                                            | 68 |
| LITERATURA CITADA                                        | 70 |
| RESUMEN BIBLIOGRÁFICO                                    | 80 |

## LISTA DE TABLAS

| <b>Tabla</b>            | <b>Página</b> |
|-------------------------|---------------|
| I. Composición del TYI  | 26            |
| II. Sustitutos de suero | 36            |

## LISTA DE FIGURAS

| <b>Figura</b>                                                                                             | <b>Página</b> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 1. Ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i>                                                                | 11            |
| 2. Trofozoíto de <i>Giardia lamblia</i>                                                                   | 12            |
| 3. Quiste de <i>Giardia lamblia</i>                                                                       | 13            |
| 4. Relación temporal del crecimiento de <i>G. lamblia</i>                                                 | 40            |
| 5. Efecto de la bilis bovina comercial sobre el crecimiento de <i>G. lamblia</i>                          | 42            |
| 6. Efecto de la bilis bovina de rastro sobre el crecimiento de <i>G. lamblia</i>                          | 43            |
| 7. Relación temporal del crecimiento de <i>G. lamblia</i> en presencia de bilis bovina obtenida de rastro | 44            |
| 8. Efecto de la bilis porcina comercial sobre el crecimiento de <i>G. lamblia</i>                         | 45            |
| 9. Relación temporal del crecimiento de <i>G. lamblia</i> en presencia de bilis porcina comercial         | 46            |
| 10. Efecto de la bilis porcina de rastro sobre el crecimiento de <i>G. lamblia</i>                        | 47            |
| 11. Relación temporal del crecimiento de <i>G. lamblia</i> en presencia de bilis porcina de rastro        | 48            |
| 12. Efecto de la bilis ovina de rastro sobre el crecimiento de <i>G. lamblia</i>                          | 49            |
| 13. Relación temporal del crecimiento de <i>G. lamblia</i> en presencia de bilis de ovina de rastro       | 50            |
| 14. Efecto de la bilis de cabrito de rastro sobre el crecimiento de <i>G. lamblia</i>                     | 51            |
| 15. Relación temporal de crecimiento de <i>G. lamblia</i> con bilis de cabrito de rastro                  | 52            |

|                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 16. Sustitución del suero bovino                                                                                                         | 54 |
| 17. Relación temporal de crecimiento de <i>G. lamblia</i> con albúmina bovina, LCR, bilis porcina de rastro y vitaminas Diamond-Tween 80 | 55 |
| 18. Sustitución de la albúmina bovina                                                                                                    | 56 |
| 19. Relación temporal de crecimiento de <i>G. lamblia</i> en presencia de PACSR                                                          | 58 |

## NOMENCLATURA

|                  |                                               |
|------------------|-----------------------------------------------|
| °C               | Grados centígrados                            |
| µm               | Micrómetro                                    |
| Cf-IV-1          | Suero Cohn fracción IV-1                      |
| <i>et al.</i>    | y colaboradores                               |
| g                | Gramos                                        |
| h                | Horas                                         |
| H <sub>2</sub> O | Agua                                          |
| HCl              | Ácido clorhídrico                             |
| IgA              | Inmunoglobulina A                             |
| IMSS             | Instituto Mexicano del Seguro Social          |
| L-               | Configuración (serie L), levógiro             |
| LCR              | Mezcla rica en lípidos                        |
| log              | Logaritmo                                     |
| mg               | Miligramos                                    |
| mg/mL            | miligramo por mililitro                       |
| min              | Min                                           |
| mL               | Mililitros                                    |
| mm               | Milímetros                                    |
| N                | Concentración normal                          |
| NaCl             | Cloruro de sodio                              |
| PACSR            | Protozoa Axenic Cultivation Serum Replacement |
| PBS              | Buffer salino de fosfatos                     |
| PEHPS            | Peptona Extracto de Hígado-Páncreas Suero     |
| pH               | Potencial de hidrógeno                        |
| rRNA             | Ácido ribonucleico ribosomal                  |
| TYI              | Tripticasa Extracto de Levadura Suero         |
| VSP              | Proteínas variantes de superficie             |
| YI-S             | Extracto de Levadura Suero                    |

## RESUMEN

*Giardia lamblia* produce desnutrición y muerte por diarrea. En 1983, Keister creció *in vitro* a *G. lamblia* en TYI-S-33, donde además se requiere como requisito esencial la presencia de bilis bovina y suero principalmente bovino. Actualmente a nivel mundial, no hay disponibilidad de casi ningún derivado proveniente de ganado vacuno por la enfermedad "de las vacas locas" (encefalopatía espongiiforme), lo cual ha encarecido hasta la fecha la venta de bilis y suero bovino. Por otro lado, está documentado que el suero bovino inhibe actividades biológicas importantes para la virulencia de varios protozoarios como: *Entamoeba histolytica*, *Trypanosoma cruzi*, *Trichomonas vaginalis* principalmente. Por ello, en este trabajo, nos propusimos como primera instancia reemplazar la bilis bovina comercial usada para el cultivo de *G. lamblia*, usando diferentes fuentes de bilis obtenidas del rastro municipal y extraídas en nuestro laboratorio entre ellas usamos bilis: bovina, porcina, ovina y caprina y también sustituir el suero bovino por componentes definidos que pudieran sustentar el crecimiento axénico *in vitro* de *G. lamblia*.

Decidimos explorar el rendimiento de *G. lamblia* usando bilis de varias especies obtenidas del rastro municipal y encontramos el mismo rendimiento cuando usamos la bilis porcina obtenida de rastro (0.125 mg/mL), con respecto a el control (bilis bovina comercial 0.5 mg/mL); las demás bilis bovina, ovina y caprina resultaron con densidades menores. Por lo que podemos usar la bilis porcina sin restricciones de cantidad o disponibilidad. Nuestro siguiente paso, fue crecer a *G. lamblia* en ausencia de suero y encontramos que con el PACSR (solución Earle, LCR, vitaminas Diamond-Tween 80 y bilis porcina de rastro) se puede sustituir el suero comercial para el crecimiento sustentable y vigoroso de *G. lamblia*.

Hemos desarrollado un medio de cultivo libre de suero usando componentes definidos (PACSR) donde *G. lamblia* puede crecer en densidades iguales a los obtenidos con suero. Con estos resultados somos el primer grupo en el mundo que podemos cultivar *G. lamblia* en ausencia de suero; por lo que este hallazgo abre la posibilidad de buscar nuevos factores de virulencia de este parásito que podrían ser enmascaradas por la presencia del suero.

## ABSTRACT

*Giardia lamblia* produces malnutrition and death from diarrhea. In 1983, Keister did grow *in vitro* to *G. lamblia* in TYI-S-33, which also is required as a prerequisite the presence of bovine bile and serum mainly cattle. Nowadays worldwide, there is almost no availability derived from cattle from the disease "of mad cows" (BSE), which to date has increased the sale of bovine serum and bile. Moreover, it is documented that the bovine serum inhibits biological activities important for the virulence of several protozoa such as *Entamoeba histolytica*, *Trypanosoma cruzi*, mainly *Trichomonas vaginalis*. Therefore, in this work, we proposed to replace the first instance as bovine bile used for commercial cultivation of *G. lamblia*, using different sources of bile obtained from municipal and trace out in our laboratory using bile including: cattle, swine, sheep and goats, also replaced by bovine serum components that could be defined to support the growth of *in vitro* axenic *G. lamblia*.

We decided to explore the performance of *G. lamblia* using several species of bile from the city and found traces the same performance when using the bile obtained from pig trail (0,125 mg/mL) compared to control (bovine bile trade 0.5 mg/mL); other bovine bile, sheep and goats with densities were lower. So we can use the swine bile unrestricted quantity or availability. Our next step was to grow *G. lamblia* in the absence of serum and found that the PACSR (Earle solution, LCR, vitamins Diamond Tween-80 and bile pig trail) can be substituted for commercial serum sustainable and robust growth of *G. lamblia*.

We have developed a culture medium free of serum components using defined (PACSR) where *G. lamblia* can grow in densities similar to those obtained with serum. With these results is the first group in the world that we can cultivate *G. lamblia* in the absence of serum, so this discovery opens the possibility of new virulence factors of this parasite that could be masked by the presence of serum.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Giardia lamblia* es el agente responsable de la giardiasis, es un protozooario binucleado y flagelado que puede infectar el intestino delgado de humanos y otros mamíferos (Adam, 2001; Luján, 2006). La giardiasis, es una patología que se presenta con manifestaciones clínicas que varían desde la infección asintomática, a la enfermedad aguda o crónica asociada con diarrea y mala absorción de nutrientes pudiendo causar hasta la muerte del hospedero (Thompson, 2000; López *et al.*, 1982; Ford, 2005).

El medio utilizado en el crecimiento en cultivo *in vitro* de *G. lamblia* se elabora a base de tripticasa, extracto de levadura y fierro (TYI), a este medio es indispensable enriquecerlo con suero bovino y bilis bovina para el crecimiento sustentable de *G. lamblia* (Diamond *et al.*, 1978; Keister, 1983). Desafortunadamente, como se sabe bien, el suero bovino no presenta una uniformidad en su contenido proteico, estas proteínas enmascaran o modifican factores de virulencia en *Giardia lamblia* como sucede en otros protozoarios

Una solución a este problema sería utilizar un medio libre de suero para el cultivo axénico de *G. lamblia*.

## 2. HIPOTESIS

*Giardia lamblia* puede crecer en el medio TYI en presencia de bilis obtenidas de diferentes fuentes y en ausencia de suero, sustituyéndolo por mezclas definidas, que proveen los factores de crecimiento óptimos y sea este un medio accesible económicamente y de fácil elaboración.

### 3. OBJETIVO GENERAL

Lograr el crecimiento axénico de *Giardia lamblia* en un medio de cultivo axénico con un sustituto de suero.

### 3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- I. Elaborar curvas de crecimiento de la cepa IMSS:0989 de *G. lamblia* en fase logarítmica y evaluar sus parámetros de crecimiento (tiempo de duplicación, tiempo de generación, intercepto en la curva, pendiente y coeficiente de determinación) en el medio de cultivo TYI-S-33 adicionado con 9% de suero y 0.5% de bilis bovina comercial.
  
- II. Los datos obtenidos en el objetivo particular I, los compararemos con medios de cultivo (TYI-S-33 con 9% de suero) y bilis obtenidos de diferentes animales obtenidos del rastro municipal y liofilizado en nuestro laboratorio: a) Bilis bovina, b) Bilis porcina y c) Bilis ovina. Determinaremos la concentración óptima de cada una de las bilis antes mencionadas. Esto es para garantizar la continuidad de este proyecto ya que la bilis bovina de casas comerciales en Estados Unidos ya no la venden.

III. Determinar los rendimientos de *Giardia lamblia* en el medio TYI, adicionado con diferentes suplementos.

IV. Determinaremos mediante curvas de crecimiento, los parámetros (tiempo de duplicación, tiempo de generación, intercepto en la curva, pendiente y coeficiente de determinación) del tratamiento que de el mejor rendimiento e incremento obtenido en el objetivo específico III.

V. Si en las condiciones experimentales del objetivo específico III, nos dieran un incremento sustentable y vigoroso de crecimiento en las fracciones donde se use la albúmina bovina, remplazaremos esta condición con una mezcla más definida como es la mezcla de aminoácidos de Earle para sustituir a la albúmina.

VI. Determinar la concentración óptima necesaria para sustituir la albúmina por la mezcla de aminoácidos de Earle y comparar los parámetros de crecimiento con los controles.

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1. Giardiasis y *Giardia lamblia*

Los estudios más recientes han demostrado que este parasitismo afecta al hombre desde tiempos prehistóricos (Ortega y Bonavia, 2003). Aunque durante mucho tiempo se pensó que era un comensal humano, no es hasta los años 60 que se comienza a conocer claramente que puede producir diarreas y malabsorción en el hombre (Cox, 2002a). *Giardia lamblia*, también conocido como *G. duodenalis* o *G. intestinalis*, fue el primer protozoo humano, visto en 1681 por el científico Antonie Van Leeuwenhoek, quien lo observó precisamente en sus propias heces diarreicas. Sin embargo, las ilustraciones de Leeuwenhoek no fueron tan claras como las de Vilém Lambl.

Este flagelado fue denominado inicialmente como *Cercomonas intestinalis* por Lambl en 1859; sin embargo, el parásito recibió poca atención hasta 1902, cuando el parasitólogo norteamericano Charles Wardell Stiles comenzó a sospechar una relación causal entre la infección por este flagelado y las diarreas (Cox, 2002a).

La observación de una posible relación causal del flagelado con enfermedad clínica, no se volvió a tener en cuenta, hasta el período de la Primera Guerra Mundial entre 1914

y 1918, cuando se verificó que los quistes obtenidos de las heces de soldados con diarrea provocaban similares síntomas cuando se les suministraban a animales de laboratorio. En 1921, Clifford Dobell sugirió que *Giardia* podría ser un patógeno y en 1926, Reginald Miller, un médico que trabajaba en Londres, demostró que algunos niños infectados con el parásito sufrían de malabsorción, mientras que otros eran portadores no afectados. Sin embargo, no fue hasta 1954 que los estudios detallados del médico Robert Rendtorff demostraron evidencias firmes sobre la relación entre este parasitismo y enfermedad clínica (Cox, 2002a).

En los 300 años transcurridos desde que fue descubierto por primera vez, este protozoo ha comenzado a reconocerse con fuerza, como un parásito común y un patógeno potencial a escala mundial; sin embargo, aún existen muchos aspectos desconocidos como el número de especies que infectan a los humanos, y cuál es el papel, si existiese, que juegan los huéspedes reservorios en la epidemiología de la infección (Cox, 2002a).

*Giardia lamblia* agente causal de la giardiasis, es el protozoario patógeno intestinal más común, que afecta a humanos y otros mamíferos (Ali y Hill, 2003; Kirkpatrick, 1987; Thompson *et al.*, 1993; Xiao, 1994; Zajac, 1992). *G. lamblia* es un protozoo flagelado que ha sido ubicado taxonómicamente según la clasificación en el **Subphylum:** Mastigophora (Flagellata), **Clase:** Zoomastigophorea, **Orden:**

Diplomonadida, **Suborden:** Diplomonadina, **Familia:** Hexamitidae, **Género:** *Giardia* y **Especie:** *lamblia* (Faust *et al.*, 1961; Levine *et al.* 1980).

#### 4.2 Epidemiología

*Giardia lamblia* tiene una distribución mundial. Su frecuencia es mayor en zonas tropicales y subtropicales donde la temperatura, la humedad y las malas condiciones higiénicas favorecen su transmisión (Chute *et al.*, 1987; Roon *et al.*, 2004; Thompson, 2000; Thompson y Monis, 2004).

*G. lamblia* ha producido grandes epidemias por contaminación fecal de alimentos y reservorios de agua, infectando en algunos casos a miles de personas (Hlavsa *et al.*, 2005; Roon *et al.*, 2004; Shandera, 1990). Este parásito constituye un importante problema de salud pública mundial por la desnutrición y muerte que produce (Addis *et al.*, 1992; Thompson y Monis, 2004; Fayer *et al.*, 2004), además se considera a *Giardia* un posible agente de bioterrorismo por su capacidad de ser transmitido por el agua, por su potencial de ser genéticamente manipulado y por la posibilidad de reproducir totalmente su ciclo vital en el laboratorio (Braden y Duchin, 2002; Carus, 2001; Hunter, 1997).

La infección se adquiere por la ingestión de quistes procedentes de material fecal (Knight, 1980) y la transmisión pueden ser de dos formas: a) fecal-oral directa, cuando sucede por contacto con personas o animales infectados por *Giardia* (Flanagan, 1992;

Hill, 1993); y b) fecal-oral indirecta, por el consumo de aguas o alimentos contaminados con quistes (Craun, 1986; Marshall *et al.*, 1997; Robertson y Gjerde, 2001). Se ha señalado la importancia de algunos fómites entre los que se incluyen hasta los juguetes (Smalheiser, 2004) y algunos vectores mecánicos como las moscas, los que pueden tener particular importancia en los mecanismos de diseminación de los quistes (Graczyk *et al.*, 2003).

La giardiasis es considerada como la enfermedad intestinal producida por protozoos más frecuente en países desarrollados y afecta un estimado de alrededor de 280 millones de personas a nivel mundial (Lane y Lloyd, 2002). En países de vías de desarrollo, *G. lamblia* afecta entre un 20 a un 30 % de la población, siendo los niños menores de 5 años y los ancianos de más de 65 años los más afectados debido a sus malos hábitos de higiene y bajo sistema inmunológico (Burke, 1975; Craft, 1982; Pickering y Engelkirk, 1988). Sin embargo, se reporta también en viajeros a áreas endémicas, homosexuales y personas en asilos y nosocomios (Schmerin *et al.*, 1978). La frecuencia de la giardiasis en la República Mexicana en el 2007 fue de 2,350 casos reportados (Epidemiología SS, 2008).

#### **4.3 Ciclo vital**

El ciclo biológico de *G. lamblia* incluye dos fases o estadios: el trofozoíto (forma vegetativa) cuyo hábitat es el intestino delgado, siendo responsable de las manifestaciones clínicas; y el quiste (forma de resistencia e infecciosa) responsable de la

transmisión del parásito. Una vez ingeridos los quistes, el proceso de exquistación se inicia cuando los quistes pasan por el estómago y los jugos gástricos (ácidos) de estos fracturan la pared celular de los quistes, este hecho es el detonante para que haya activación de los trofozoítos dentro del quiste; cuando estos quistes pasan a la primera porción del intestino delgado, los jugos pancreáticos (alcalinos), terminan de destruir la pared celular de los quistes, como resultado aparecen dos trofozoítos que se multiplican asexualmente en la superficie mucosa del intestino delgado.

Los trofozoítos se encuentran en el duodeno y primeras porciones del yeyuno, donde se empiezan a desarrollar los trofozoítos de *G. lamblia* alimentándose de nutrientes disueltos en el intestino, así como con bacteria y protozoarios que se encuentren colonizando esta parte de intestino delgado. En esta parte de la infección es cuando empiezan a producir los síntomas y manifestaciones clínicas.

Una vez que los trofozoítos colonizan el intestino delgado estos son arrastrados por el bolo alimenticio hacia el intestino grueso donde el cambio enzimático y la falta de agua son detonantes para que los trofozoítos comiencen a enquistarse, una vez producido los quistes estos son eliminados al exterior y pueden infectar un nuevo hospedero y así completar el ciclo biológico de este parásito. (Wolfe, 1992).

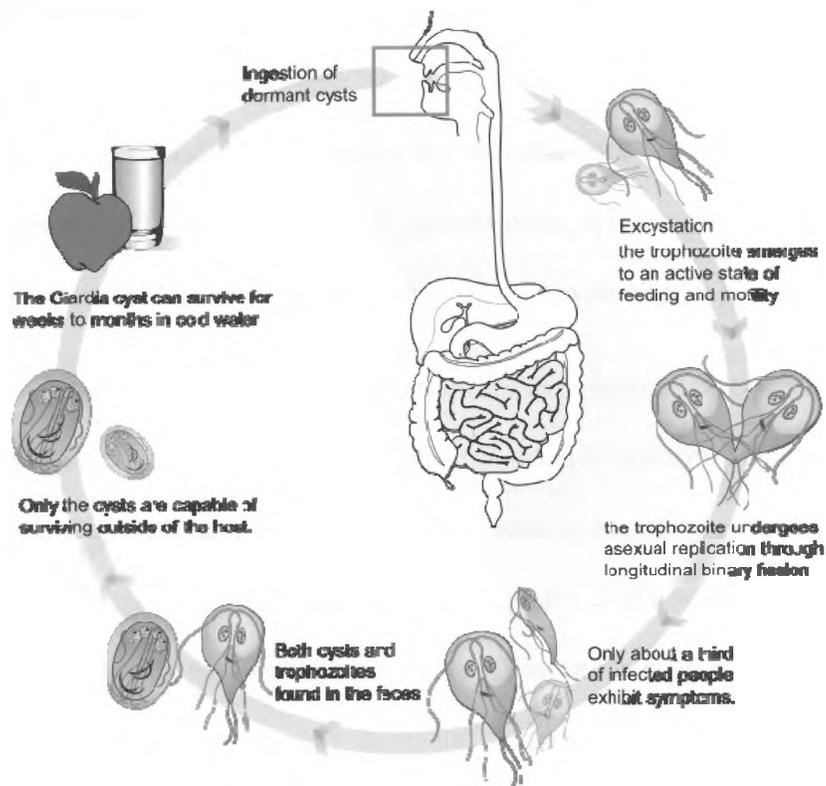


Figura 1. Ciclo de vida de *Giardia lamblia*.

Las infecciones experimentales han demostrado que la infección puede establecerse con inóculos tan pequeños como un trofozoíto ó 10 quistes. Los quistes han aparecido en las heces entre 5 y 41 días posteriores a la infección experimental, y entre 2 y 3 semanas en viajeros que retornan de áreas endémicas (Adam, 2001).

#### 4.4 Características biológicas

##### 4.4.1 Trofozoíto

El trofozoíto posee un tamaño de 12-15 de largo x 5-9  $\mu\text{m}$  de ancho. Es de aspecto piriforme con una región dorsal convexa y dos axóstilos centrales. Su región ventral es cóncava y posee un disco de succión de gran tamaño, que parece ser el órgano más importante para el enlace con la mucosa intestinal del hospedador.

Tiene cuatro pares de flagelos (antero-lateral, postero-lateral, ventral y central) y un par de cuerpos parabasales centralizados. Estos impulsan al trofozoíto en forma desigual, similar a la caída de una hoja. Estructuralmente muestra dos núcleos de igual tamaño y contenido, ambos con actividad transcripcional y dos cuerpos medios que exhiben diferencias en su morfología lo que permite identificar varias especies de *Giardia*. Otros organelos celulares son, el aparato de Golgi, lisosomas y ribosomas. No se han identificado mitocondrias ni retículo endoplásmico liso (Adam, 2001; Conboy, 1997; Gillin *et al.*, 1996).



Figura. 2 Trofozoíto de *Giardia lamblia*

#### 4.4.2 Quiste

El quiste tiene una forma oval o redondeada, mide de 10-15 de ancho x 5-8  $\mu\text{m}$  de largo y posee de dos a cuatro núcleos. El núcleo contiene axonemas flagelares, vacuolas, ribosomas y fragmentos del disco ventral. Las estructuras internas que se observan en el trofozoíto, están contenidas de manera desordenada dentro del quiste (Adam, 1991; Beaver, 1984).



Figura. 3 Quiste de *Giardia lamblia*

#### 4.5 Patogenia

Los quistes de *G. lamblia*, una vez ingeridos, pasan por el estómago y se convierten en trofozoítos en el duodeno. Se diseminan por este órgano y por el yeyuno, adhiriéndose por medio de su ventosa ventral a la superficie de las células del epitelio intestinal. Este parásito puede desarrollar un espectro de anomalías en la arquitectura de las microvellosidades intestinales que va desde una apariencia normal, hasta una atrofia parcial o total de las microvellosidades (Farthing, 1993; Stevens, 1982).

En los casos sintomáticos, se ha observado aplanamiento de las microvellosidades de las células ciliadas del epitelio, infiltración linfocítica y mal absorción de nutrientes, principalmente de proteínas y vitaminas. En ocasiones, existe acortamiento de las microvellosidades y a veces se ve un gran número de trofozoítos en las criptas duodenales sin evidencias de trastornos patológicos (Farthing, 1996; Ortega y Adam, 1997).

El papel protector de la microflora puede estar relacionado con la competencia por sustratos nutricionales, la competencia específica por sitios receptores en la mucosa intestinal, la producción de compuestos antimicrobianos y metabólicos que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos, y la amplificación de la respuesta inmune (Pérez *et al.*, 2001).

Las diferencias en la flora normal del huésped pudieran explicar parcialmente la capacidad del parásito para provocar cuadros clínicos variables en los hospederos (Singer y Nash, 2000b; Torres *et al.*, 2000).

El desarrollo de una enfermedad puede o no estar determinada por la acción de un solo factor de virulencia, generalmente es un proceso multifactorial. En la mayoría de los microorganismos la virulencia es un fenómeno muy complejo que depende de dos propiedades generales: a) invasividad o capacidad de los agentes patogénicos para multiplicarse y causar destrucción localizada de los tejidos invadidos y b) toxigenicidad

ó capacidad de los agentes patogénicos para producir y liberar sustancias que pueden causar lesiones a distancia (Rosenberg, 1976).

Los mecanismos patogénicos específicos por el que el protozooario *G. lamblia* causa enfermedad, no ha sido identificado. Se ha propuesto la adhesión mecánica y molecular (Muller y von Allmen, 2005) donde los trofozoítos constituye una barrera física para la absorción de nutrientes (vitamina B<sub>12</sub>, D-xilosa y solutos en general) con daño consecuente a las microvellosidades de las células epiteliales. (Brieva *et al.*, 1998; Canone *et al.*, 2000; Lewis y Freedman, 1992).

Además, se ha descrito que *G. lamblia* posee actividades enzimáticas del tipo cisteín-proteasa que hidrolizan la inmunoglobulina humana IgA1, dándole capacidad para evadir la respuesta inmune del hospedero (Parenti, 1989).

Análisis enzimáticos de extractos crudos de *G. lamblia* han demostrado una mayor actividad de proteasas en cepas aisladas de pacientes sintomáticos que en las cepas obtenidas de pacientes asintomáticos (Guimaraes *et al.*, 2003).

Hasta la fecha, se han detectado actividades de fosfolipasas A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> y lisofosfolipasas L<sub>1</sub> (Vargas-Villarreal *et al.* 2007). Actualmente, hay un incremento en el interés por el estudio en moléculas de *G. lamblia* que pueden estar involucradas en el metabolismo de los protozoarios o como posibles factores de virulencia.

Además, una gran heterogeneidad entre los aislamientos de *G. lamblia* ha sido demostrada por técnicas bioquímicas. Esta variabilidad fenotípica confirmada, pudiera estar asociada a la existencia de una gran heterogeneidad genética entre los aislamientos. Aunque no se ha encontrado una clara correlación entre las variaciones fenotípicas y las formas clínicas de presentación, los estudios de caracterización molecular pueden ser muy útiles para un mejor conocimiento de la patogenicidad y la epidemiología de la giardiasis (Meloni *et al.*, 1995; Guimaraes *et al.*, 1999; Adam, 2001).

#### **4.6 Manifestaciones clínicas**

El espectro clínico de la infección por *G. lamblia* varía de acuerdo a la intensidad de la infección, la cepa del parásito y el estado inmunológico del paciente. Oscila desde los casos asintomáticos hasta casos con diarrea severa y persistente asociada con mal absorción. El período de incubación después de la ingestión de quistes es variable y puede ser tan corto como una o dos semanas o meses de infección con periodos de recurrencia (Hill, 1993; Farthing, 1996; Ortega y Adam, 1997; Procop, 2001).

Los signos y síntomas de la enfermedad son difíciles de distinguir de los de otras enfermedades gastrointestinales como *Entamoeba histolytica*, *Escherichia coli*. La giardiasis no siempre produce diarrea y es más frecuente los dolores abdominales y los cólicos (Adam, 1991; Beaver *et al.*, 1984).

Se ha descrito que la afección de las funciones pancreáticas pudiera ser una causa de severa mal absorción en la giardiasis (Carroccio *et al.*, 1997). Diferentes estudios han encontrado los niveles de algunos oligoelementos como el hierro sérico, el zinc (Ertan *et al.*, 2002; Demirci *et al.*, 2003) y el magnesio (Olivares *et al.*, 2003; Kilic *et al.*, 2004) son significativamente más bajos en pacientes infectados con *Giardia lamblia* que en personas normales, lo que pudiera deberse a la mal absorción producido por este parásito. Entre los síntomas digestivos más comunes están la diarrea, los cólicos o dolores abdominales, náuseas y disminución del apetito. (Demirci *et al.*, 2003; Olivares *et al.*, 2003).

#### **4.7 Historia del cultivo *in vitro* de *Giardia lamblia***

*Giardia lamblia* fue el primer protozooario visto en 1681 por Antonie Van Leeuwenhoek, quien lo observó en sus propias heces diarreicas (Cox, 2002a), sin embargo, la primera descripción se realizó en 1859 por Vilém Lambl (Adam, 1991).

Los primeros cultivos de *Giardia* se reportaron desde el siglo pasado. Chatterjee en 1927, inoculó una porción de materia fecal con quistes de *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*, en PBS, logrando que las *Giardias* y *trichomonas* se pudieran mover durante 5 semanas.

En 1929, Penso describió un cultivo de *Giardia* en suero fisiológico con bilis y en base N`N`N` (Novy, McNeal, Nicolle) con bilis. En ambos casos, se observaron formas raras móviles después de 48 horas.

Poindexter reportó en 1931, que fue capaz de inducir la exquistación de *Giardia lamblia*, manteniendo los trofozoítos durante 19 días en el medio Boeck-Drbohlav y durante 11 días en agar infusión hígado. El número de trofozoítos observados en subcultivos, llevó a Poindexter a determinar que se estaba llevando a cabo la multiplicación de los trofozoítos y no solo la exquistación y sobrevivencia de los trofozoítos. Hegner y Eskidge en 1937, propusieron que la bilis favorece el crecimiento de *Giardia sp. in vivo*.

En 1960, Karapetyan reportó el crecimiento de *G. duodenalis* de conejo en cultivo monoxénico en la presencia de *Saccharomyces cerevisiae* y *G. lamblia* en cultivo dixénico con dos especies de hongos (Karapetyan, 1962).

El cultivo axénico fue hecho por Meyer en 1970, quien reportó el crecimiento de *Giardia*, presumiblemente *G. duodenalis* a partir de conejo, chinchilla, y gato (Meyer, 1970).

El próximo avance en el cultivo de *Giardia* fue hecho por Bingham y Meyer en 1979, quienes aislaron quistes maduros de *Giardia lamblia*, tratándolos con ácido clorhídrico

(pH 2.0) para desenquistarlos. Los trofozoítos obtenidos de esta manera pudieron ser cultivados axénicamente sin cultivarlos en forma monoxénica previamente (Bingham y Meyer, 1979).

El medio HSP-1 y HSP-2 son modificaciones del medio M-3 en los cuales solo se añadió un suplemento de peptona de caseína. El suero humano utilizado en los medios HSP-1 y HSP-2 varía de lote a lote en soportar el crecimiento de *Giardia* en cultivo dando rendimientos muy variados. Este estudio reportó por primera vez cultivo de *G. lamblia* del hombre (Meyer, 1976).

Los medios desarrollados hasta entonces fueron variados desde el medio M-3 descrito por Meyer (Bingham and Meyer, 1979) el cual, uno de sus principales componentes era el suero humano y que podría ser utilizado tanto para el cultivo monoxénico, como para el axénico (Diamond, 1983).

Visvesvara en 1980, en un intento por sortear este problema adaptó la cepa Pórtland de *G. lamblia* al medio esterilizado por filtración TP-S-1 (Diamond, 1968) conteniendo como suplemento, suero bovino. El crecimiento obtenido en el medio TP-S-1 fue más uniforme y numeroso comparado al de HSP-1 (Visvesvara, 1980).

Gillin y Diamond describieron el crecimiento clonal de *G. lamblia* en un medio semisólido de agarosa preparado con el medio TP-S-1 (Gillin y Diamond, 1980). Bhatia

y Warhurst describieron una técnica para la iniciación rutinaria de cultivos axénicos a partir de quistes de *Giardia* utilizando el medio de Visvesvara en donde en lugar de utilizar suero de bovino utilizaron suero de caballo (Bhatia y Warhurst, 1981).

Jarroll *et al.* demostraron que entre los componentes nutricionales, los lípidos son esenciales para el crecimiento sostenido de *G. lamblia*. Ya que este parásito es incapaz de sintetizar fosfolípidos o esteroides *de novo*, entonces utiliza los lípidos que ya están presentes en el medio de cultivo (Jarroll *et al.*, 1981). Gillin y Reiner reportaron que el suero bovino (Cohn fracción III) contiene un factor que es requerido por los trofozoítos para sobrevivir en el medio y que permite la unión al sustrato y la sobrevivencia a corto plazo, pero este medio falla a soportar el crecimiento a largo plazo (Gillin y Reiner, 1982).

En estudios complementarios encontraron que el hierro y moco duodenal, aumenta el crecimiento en el medio suplementado con sales biliares (Kobiler *et al.*, 1981). En otro reporte. Se logró crecer trofozoítos de *G. lamblia* usando una fracción sérica de lipoproteína-colesterol y albúmina (Weider *et al.*, 1983).

*G. lamblia* fue adaptada a crecer en el medio modificado de Diamond (TYI-S-33), en donde el crecimiento fue mejorado al suplementar a este medio con bilis bovina, encontrando un baja en los tiempos de duplicación de un 50 % (Farthing *et al.*, 1983).

Keister en 1983, utilizando el medio descrito por Diamond en 1978 (Diamond *et al.*, 1978) logró cultivar a *G. lamblia* en el medio TYI-S-33 en forma prolongada y con altos rendimientos. Este medio lo hizo apropiado para el cultivo de *Giardia*, modificando la cantidad de cisteína (cambiando de 1 a 2 gramos por litro) y añadiendo bilis bovina a la concentración de 500 mg por litro de medio (Keister, 1983).

Uno de los principales componentes del TYI-S-33 es un digerido pancreático de caseína (denominado tripticasa). Este componente presenta serias desventajas para el cultivo de *Giardia*, una de ellas es que los lotes son variables en cuanto el rendimiento del parásito, para solventar este problema, se desarrolla un medio libre de caseína, YI-S, consistiendo de un caldo nutritivo y una mezcla vitamínica (Diamond *et al.*, 1995).

En los medios de uso común (TYI-S-33 y YI-S) uno de los componentes indefinidos imprescindibles es el suero bovino o equino. Este componente aporta distintos nutrientes, como factores de crecimiento, vitaminas, cofactores de enzimas, proteínas, lípidos, hormonas y sales minerales.

Kaneda y Goutsu en 1988, encontraron que *Giardia* tiene como principales fosfolípidos a la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y esfingomielina, como lípidos neutro a los esteroides, y como ácidos grasos, a los ácidos palmítico y oleico. Encontrando también que las fuentes principales de donde proceden estos lípidos son el suero y la bilis bovina (Kaneda y Goutsu, 1988).

Diamond desarrolló un medio definido de mantenimiento, donde la cisteína fue absolutamente requerida para la unión y sobrevivencia de *G. lamblia*. La fracción III de Cohn del suero bovino, también estimuló la unión al sustrato y la sobrevivencia (Gillin y Reiner, 1982).

Gillin *et al* en 1986, encontraron que una mezcla de lípidos biliares pueden soportar el crecimiento de *G. lamblia* en un medio libre de suero, pero en una forma limitada lo que indica que las sales biliares no llenan completamente las funciones del suero (Gillin *et al.*, 1986).

Bifulco y Schaefer en 1992, reemplazaron el suero del medio TYI-S-33 con un sustituto de suero Ultrosor G, pero la composición exacta de Ultrosor G es desconocida y contiene constituyentes del suero (Bifulco y Schaefer, 1992).

Luján *et al.* en 1994, reportaron que el suero Cohn fracción IV-1 (Cf-IV-1) soporta el crecimiento *in vitro* de *G. lamblia*. Sin embargo, el Cf-IV-1 de algunos mamíferos muestran variables efectos en el crecimiento de *G. lamblia* (Luján *et al.*, 1994).

Mata *et al.* en 1996, encontraron que adicionando el medio basal TYI-33 con PACSR, favorece el crecimiento de *Entamoeba histolytica*. PACSR es una mezcla de aminoácidos, vitaminas y LCR, el cual es un suplemento soluble en agua aislado de

suero bovino que contiene colesterol, fosfolípidos, ácidos grasos y proteínas (Mata *et al.*, 1996).

Hasta la fecha, no se ha podido cultivar a *Giardia lamblia* en ausencia de suero, la eliminación de este componente esencial para el crecimiento de *G. lamblia*, sería de gran utilidad ya que cualquier suero presenta componentes que pueden inhibir la actividad de factores de virulencia de este y algunos protozoarios (Alagón *et al.*, 1996; Bos, 1979; Freshney, 1987; Lushbaugh *et al.*, 1981; Muñoz *et al.*, 1982).

Por otro lado, debido a que Estados Unidos de América tiene un problema con respecto a la enfermedad bovina denominada “de las vacas locas” (encefalopatía espongiiforme), actualmente no se está surtiendo ningún producto derivado de ganado vacuno, ya sea suero o derivados.

Por tal motivo, en este proyecto también planteamos la sustitución de la bilis bovina que se obtiene de una compañía americana (Sigma) por bilis obtenidas de nuestro entorno (rastro municipal) de diversos animales tales como vaca, puerco, borrego y cabrito.

## 5. MÉTODOS

### 5.1 Origen de los reactivos

Enseguida se enlistan las compañías de origen de cada uno de los reactivos que se utilizaron en la elaboración de esta tesis.

El extracto de levadura y peptona de caseína fueron obtenidos de Bioxon de México. Glucosa, L-cisteína, L-alanina, L-ácido aspártico, L-asparagina·H<sub>2</sub>O, L-ácido glutámico, L-prolina, L-serina, L-glutamina, glicina, L-tirosina, L-cistina, L-arginina, L-valina, L-histidina·HCl, L-lisina, L-leucina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-treonina, L-triptófano, seroalbúmina bovina, mezcla de lípidos (LCR) fueron obtenidas de Sigma Chemical Co. (St Luois MO, USA).

Cloruro de sodio, ácido clorhídrico, fosfato de potasio monobásico, fosfato de potasio dibásico, citrato férrico amónico, ácido ascórbico, de Reactivos Monterrey.

La solución de vitaminas de Diamond 107 fue obtenida de JRH Biosciences (Lenexa, KS).

## **5.2 Material biológico**

### **5.2.1 Cepa de *Giardia lamblia* IMSS:0989**

Para la realización de esta tesis, se utilizó la cepa de *Giardia lamblia* IMSS:0989 (Mata-Cárdenas *et al.*, 1998; Vargas-Villarreal *et al.*, 2007), la cual fue donada por el Dr. Cedillo Rivera en 1991 al laboratorio de Fisiología Celular y Bioquímica de la División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste (I.M.S.S.).

Esta cepa se ha mantenido criopreservada en nitrógeno líquido, así como en resiembras continuas dos veces por semana durante 15 años. Para esta tesis, se descongeló un tubo de la cepa original (para mantener las características originales y fisiológicas de virulencia de *G. lamblia*) y se cultivó en TYI-S-33 suplementado con 9 % de suero bovino y 2 % de bilis bovina (Keister, 1983).

### **5.3 Preparación del medio basal TYI**

La composición del medio TYI (Diamond, 1978) se encuentra en la Tabla I. Se mezclaron los componentes, se disolvieron en 850 mL de agua desionizada. El pH se ajustó a 7.0 con NaOH 10 N y se aforó a 1000 mL con agua desionizada. El medio se esterilizó usando vasos de filtración de 1000 mL. Se colocaron 5 mL del medio en tubos de 13 x 100 mm con tapón de rosca (borosilicato, Corning Co., Alemania). Almacenamos a -20 °C hasta su uso.

Tabla I. Composición del TYI.

| Componentes                     | TYI     |
|---------------------------------|---------|
| Extracto de levadura            | 10 g    |
| Peptona de caseína              | 20 g    |
| Ácido ascórbico                 | 1 g     |
| Cisteína                        | 1 g     |
| Cloruro de sodio                | 3.3 g   |
| Glucosa                         | 10 g    |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1 g     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0.6 g   |
| Citrato férrico amónico         | 0.028 g |

#### 5.4 Preparación del suero bovino (Saíd-Fernández *et al.*, 1988).

Se obtuvo el suero de sangre colectada en el rastro de la ciudad de Monterrey. La sangre se dejó coagular a 37 °C por 12 horas, posteriormente se separó el suero del coagulo por sedimentación a 2,000 x g por 15 minutos. Después el suero se prefiltra con papel Whatman No. 1 y se prefiltró usando una serie de filtros (HAWP Millipore Before, MA, USA) de 10 a 0.22 µm.

Finalmente se esterilizó por filtración utilizando sistemas de filtración al vacío de un litro con filtros de 0.22 µm (Corning, Inc. Corning NY, USA). El suero estéril se descomplementó por calentamiento a 56 °C por 30 minutos, se dejó enfriar a

temperatura ambiente y se le añadió 25 mL de mezcla de vitaminas (vitaminas de Diamond 107, JRH Biosciences, Lenexa, KS) por cada litro de suero. El suero se distribuyó en alícuotas de 100 mL, en botellas ámbar, estériles, de vidrio con tapón de rosca y se almacenó a -20 °C, hasta su uso.

### **5.5 Preparación de la bilis bovina**

Se disolvieron 0.3 g de bilis bovina en 10 mL de PBS. Se esterilizó usando acrodiscos de 0.22 µm (Millipore, Molsheim France) y la solución se almacenó en tubos estériles de 13 x 150 mm con tapón de rosca a 4 °C hasta su uso (Keister, 1983).

### **5.6 Métodos de resiembra**

La cepa 0989:IMSS de *G. lamblia* se mantuvo en cultivo en 5 mL de medio basal TYI-S-33 en tubos de tapón de rosca de 13 x 100 mm, incubándolas a 36.5 °C (incubadora Thelco Laboratory Incubation). Antes de cada resiembra, los cultivos fueron observados en un microscopio invertido (Biovert, Reichert, Austria) para comprobar su buen estado.

El cultivo que mostró la mejor densidad de trofozoítos y el mejor aspecto, fue colocado en agua-hielo durante 10 minutos y el número de trofozoítos se determinó utilizando un hemocitómetro e inoculando 10,000 trofozoítos/mL a cada uno de los tubos con medio fresco. Los cultivos se resembraron cada 72 horas, en fase log de crecimiento (Mata-Cárdenas *et al.*, 1998).

### 5.7 Cinética de crecimiento

La curva de crecimiento de *G. lamblia* cepa 0989:IMSS se llevó a cabo por 120 horas, inoculando 10,000 trofozoítos en 5 mL de medio basal adicionado con 9 % de suero bovino y 0.5 mg/mL de bilis bovina, en tubos de tapón de rosca de 13 x 100 mm.

Se incubaron a 36.5 °C durante 120 horas y cada 24 horas se determinó el número de trofozoítos y evaluamos sus parámetros de crecimiento en el medio. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado.

Se determinó el tiempo de generación mediante la siguiente ecuación:

$$G = \frac{t}{3.3} \log \frac{b}{B}$$

G es el tiempo de generación.

Donde t significa el intervalo de tiempo de la fase exponencial,

B es el número de organismos al comienzo del intervalo de tiempo,

b es el número de organismos al final del intervalo de tiempo.

Para determinar el tiempo de duplicación se utilizó la siguiente ecuación:

$$Td = 0.693 G$$

### 5.9 Obtención de las bilis de rastro municipal

Se obtuvieron las bilis (bovina, porcina, ovina y de cabrito) del rastro municipal de Monterrey, de la siguiente manera: colectamos las vesículas biliares de las diferentes

especies (vaca, cerdo, borrego y cabrito), usando una laparotomía exploratoria, al detectar las vesículas biliares, las cortamos con un cuchillo tipo carnicería de 30 cm de largo, procurando que las vesículas no se rompieran (las que vertían su contenido, fueron eliminadas). Las bilis fueron depositadas inmediatamente en hielo frapé, para mantenerlas a 4 °C para su transportación a nuestro laboratorio.

Obtuvimos el contenido de cada bilis, punzando con un cuchillo cada vesícula y las juntamos hasta obtener 500 mL de bilis de cada animal. Después filtramos las bilis utilizando filtros de papel Whatman No.1, cada bilis (bovina, porcina, ovina y de cabrito) la depositamos en frascos (previamente etiquetados) para liofizarlas. Congelamos cada frasco a -70 °C, por 24 horas. Después de este tiempo, liofilizamos (LABCONCO, FREEZER DRY-SYSTEM, KA, USA) cada bilis hasta sequedad y guardamos su contenido a 4 °C y en atmósfera de nitrógeno, hasta su uso.

#### **5.10 Evaluación de las diferentes bilis**

Se pesaron diferentes concentraciones (0.0625-4 mg/mL) de cada una de las bilis bovina (comercial y de rastro), porcina (comercial y de rastro), ovina de rastro y cabrito de rastro.

Cada una de las bilis, la disolvimos en 750 mL del medio TYI-33 y se esterilizó por filtración usando vasos de filtración de 0.22 µm de 1000 mL. Se colocaron 5 mL del

medio en tubos de 13 x 100 mm con tapón de rosca (borosilicato, Corning Co., Alemania) y adicionamos el 9 % de suero bovino.

Se realizaron 6 experimentos independientes por triplicado.

## **5.11 Composición y preparación de soluciones**

### **5.11.1 Albúmina bovina al 25%**

Se pesaron 10 g de albúmina bovina y se disolvieron en 40 mL de PBS. Se esterilizó por filtración usando acrodiscos de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millex GP, Millipore, Corriglwohill, Co. Cork, Irlanda). Se distribuyó en tubos de 16 x 100 mm, en alícuotas de 10 mL y se almacenó a -20 °C, hasta su uso.

### **5.11.2 LCR (Lipid Cholesterol Rich)**

Solución comercial la cual contiene: 114 mg de colesterol, 73.33 mg de fosfatidilcolina, 10.90 mg de lisofosfatidilcolina, 28.70 mg de esfingomiolina, 63.75 mg de ácido linoleico, 19.2 mg de ácido araquidónico, 18.50 mg de ácido linolénico, 18.50 mg de ácido oleico y 18.50 mg de ácido docohexaenoico (Sigma Chemical Co., St Louis, Missouri, USA).

### **5.11.3 Mezcla de vitaminas**

Esta solución está compuesta por dos mezclas de vitaminas; la mezcla vitamínica 107 (Diamond 1968) y la mezcla vitamínica Tween 80 (Diamond *et al.*, 1978).

### 5.11.3.1 Mezcla vitamínica 107

#### **Solución de vitaminas B hidrosolubles**

**Solución a.** Se disolvieron en agua bidestilada hirviendo, 62.5 mg de niacina y 125 mg de ácido p-aminobenzoico. Se aforó a 150 mL, con agua bidestilada hirviendo, dejamos enfriar y se colocó en frasco de 250 mL y lo almacenamos a -20 °C hasta su uso.

**Solución b.** Se disolvieron en agua bidestilada, 62.5 mg de niacinamida; 62.5 mg de hidrocloreuro de piridoxina; 62.5 mg de hidrocloreuro de piridoxal; 25 mg de hidrocloreuro de tiamina, 25 mg de pantotenato de calcio; 125 mg de I-inositol y 1,250 mg de cloruro de colina y se aforó a 150 mL, con agua bidestilada, se colocó en frasco de 250 mL y lo almacenamos a -20 °C hasta su uso.

**Solución c.** Se disolvieron 25 mg de riboflavina en 75 mL de agua bidestilada, se le añadió NaOH 0.1 N gota a gota y se aforó a 100 mL, con agua bidestilada, se colocó en frasco de 250 mL y lo almacenamos a -20 °C hasta su uso.

**Solución de vitaminas B.** Se mezclaron las soluciones a, b y c. Se aforó a 500 mL con agua bidestilada, se colocó en frasco de 600 mL y lo almacenamos a -20 °C hasta su uso.

#### **Solución de biotina**

Se disolvió 30 mg de D-biotina en 200 mL de agua bidestilada, se añadió NaOH 0.1 N y se aforó a 300 mL con agua bidestilada, colocamos en frasco de 500 mL y lo almacenamos -20 °C hasta su uso.

#### **Solución de ácido fólico**

Se disolvió 30 mg de ácido fólico en 200 mL de agua bidestilada, se añadió NaOH 0.1 N y se aforó a 300 mL con agua bidestilada, colocamos en frasco de 500 mL y almacenamos -20 °C hasta su uso.

#### **Solución de vitaminas liposolubles (A, D y K)**

**Solución a.** Se disolvieron 300 mg de vitamina D<sub>2</sub> (calciferol) en 3 mL de alcohol etílico al 95 % (v/v). Se agregó 300 mg de vitamina A.

**Solución b.** Se disolvieron 60 mg de vitamina K (menadiona bisulfito de sodio) en 300 mL de una solución acuosa de Tween 80 al 5 % (v/v).

Se mezclaron la solución a y la solución b y se aforó a 3000 mL con agua bidestilada, guardamos en frascos de 4000 mL y almacenamos a -20 °C hasta su uso.

#### **Solución de vitamina E**

Se disolvió 25 mg de vitamina E (acetato de  $\alpha$ -tocoferol) en 250 mL de agua bidestilada, guardamos en frasco de 500 mL y almacenamos a -20 °C hasta su uso.

#### **Solución de trabajo de la mezcla vitamínica 107**

Se mezclaron las soluciones estándar en las siguientes proporciones: 500 mL de la solución de vitaminas B hidrosolubles; 250 mL de la solución de biotina; 250 mL de la solución de ácido fólico; 2500 mL de la solución de las vitaminas liposolubles y 250 mL de la solución de vitamina E. La mezcla completa se esterilizó por sistema de filtración

de 1 litro y se almacenó en botellas ámbar de 125 mL en la obscuridad a -20 °C hasta su uso.

#### **5.11.3.2 Mezcla vitamínica Tween 80**

**Solución a.** Mezcla vitamínica 107.

**Solución b.** Se disolvieron 40 mg de vitamina B<sub>12</sub> en 40 mL de agua bidestilada y se aforó a 100 mL con agua bidestilada.

**Solución c.** Se disolvió 100 mg de DL-6,8 ácido tióctico en 100 mL de alcohol etílico absoluto.

**Solución d.** Se disolvió 50 g de Tween 80 en 100 mL de alcohol etílico absoluto.

**Solución de trabajo de la mezcla de vitaminas Tween 80.** Se mezclaron 1000 mL de la solución a; 12 mL de la solución b; 4 mL de la solución c; 4 mL de la solución d y 180 mL de agua bidestilada. La mezcla completa se esterilizó por sistema de filtración de 1 litro y se almacenó en botellas ámbar de 125 mL en la obscuridad a -20 °C hasta su uso.

#### **5.11.4 Solución de Earle (Eagle, 1959)**

##### **Solución 1 de sales**

**Solución 1a.** Se pesaron 9.05 g de NaCl; 0.40 g de KCl; 0.14 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; se disolvieron en 800 mL de agua. Se ajustó el pH a 7.2. La solución se colocó en botellas, en porciones de 64 mL. Se esterilizó por autoclave y se almacenó a temperatura ambiente.

**Solución 1b.** Se pesaron 2.0 g de  $\text{CaCl}_2$  y se disolvieron en 1 L de agua. Esta solución se distribuyó en alícuotas de 100 mL. Se esterilizó por autoclave y se almacenó a temperatura ambiente.

**Solución 1c.** Se pesaron 2.0 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y se disolvieron en 1 L de agua. La solución se distribuye en alícuotas de 100 mL. Se esterilizó por autoclave y se almacenó a temperatura ambiente.

**Solución de trabajo de sales.** Se mezclaron antes de añadir el resto de los componentes: 64 mL de la solución 1a; 8 mL de la solución 1b y 8 mL de la solución 1c.

### **Solución de aminoácidos**

#### **Aminoácidos esenciales**

**Solución 2.** Se pesaron 1.27 g de L-arginina; 0.38 g de L-histidina·HCl; 0.58 g de L-lisina; 0.52 g de L-leucina; 0.52 g de L-iso-leucina; 0.15 g L-metionina; 0.32 g de L-fenilalanina; 0.48 g de L-treonina; 0.10 de L-triptófano; 0.46 g de L-valina. Se disolvieron en 100 mL de solución 1, calentando a 80 °C. Se esterizaron por filtración, se distribuyeron en alícuotas de 10 mL. y se almacenaron en tubos de 116 x 100 mm envueltos en papel aluminio a 4 °C.

**Solución 3.** Se pesaron 0.36 g de L-tirosina; 0.24 g de L-cistina. Se disolvieron en 100 mL de HCl 0.1 N. Se calentó ligeramente. Se esterilizó por filtración, se distribuyó en alícuotas de 10 mL y se almacenó en tubos de 16 x 100 mm envueltos en papel aluminio a 4 °C.

**Solución 4.** Se pesaron 2.29 g de L-glutamina. Se disolvió en 100 mL de solución 1. Se esterilizó por filtración, se distribuyó en alícuotas de 10 mL y se almacenó en tubos de 16 x 100 mm envueltos en papel aluminio a 4 °C.

#### **Aminoácidos no esenciales**

**Solución 5.** Se pesaron 0.089 g de L-alanina; 0.150 g de L-asparagina·H<sub>2</sub>O; 0.133 g de L-ácido aspártico; 0.147 g de L-ácido glutámico; 0.115 g de L-prolina; 0.105 g de L-serina; 0.075 g de glicina. Se disolvieron en 100 mL de agua bidestilada. Se esterilizó por filtración, se distribuyó la solución en alícuotas de 10 mL y se almacenó en tubos de 16 x 100 mm envueltos en papel aluminio a 4 °C.

**Solución de trabajo de Earle** (Earle, 1959).

Se añadió a cada botella de la solución 1; 2.5 mL de cada una de las soluciones 2, 3, 4 y 5 de aminoácidos y 2.5 mL de la mezcla de vitaminas de Diamond-Tween 80.

**5.11.5 PACSR: Protozoa Axenic Cultivation Serum Replacement** (Mata-Cárdenas *et al.*, 1996; 1998).

El PACSR se preparó de la siguiente forma; a la solución de trabajo de Earle se le añadió 1 mL de LCR y 1.8 mL de la mezcla vitamínica Diamond-Tween 80 y esterilizamos utilizando sistemas de filtración de 250 mL.

### 5.12 Medio TYI-PACSR

Descongelamos los tubos con medio TYI-33 con bilis porcina de rastro (250 mg/L), se añadieron el 0.1 mL de la mezcla de lípidos (LCR), 0.1 mL de la mezcla vitamínica Diamond-Tween 80 y 0.5 mL de solución Earle.

### 5.13 Rendimiento del medio TYI

Para sustituir el suero bovino, determinamos los rendimientos de crecimiento de *G. lamblia* en el medio TYI en las siguientes condiciones mencionadas en la Tabla II.

Tabla II. Sustitutos de suero.

|         | Suero (9 %) | Bilis bovina (0.5 mg/mL) | Bilis porcina de rastro (0.125 mg/mL) | Vitaminas Diamond-Tween 80 (0.2 %) | LCR (0.9 %) | Albúmina (9 %) | Solución de Earle (9%) |
|---------|-------------|--------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|-------------|----------------|------------------------|
| Control | ✓           | ✓                        |                                       |                                    |             |                |                        |
| 1       | ✓           |                          | ✓                                     |                                    |             |                |                        |
| 2       |             |                          |                                       | ✓                                  |             |                |                        |
| 3       |             |                          |                                       |                                    | ✓           |                |                        |
| 4       |             |                          | ✓                                     |                                    | ✓           |                |                        |
| 5       |             |                          |                                       | ✓                                  |             | ✓              |                        |
| 6       |             |                          |                                       |                                    | ✓           | ✓              |                        |
| 7       |             |                          | ✓                                     |                                    |             | ✓              |                        |
| 8       |             |                          | ✓                                     | ✓                                  | ✓           | ✓              |                        |
| 9       |             |                          | ✓                                     | ✓                                  | ✓           |                | ✓                      |

### 5.14 Diseño experimental

El diseño experimental usado fue un análisis de varianza completamente al azar de un factor para probar las diferencias en los rendimientos del medio de cultivo, en los

diferentes experimentos. Posteriormente realizamos la prueba de Tukey para determinar en qué experimento hubo diferencias.

#### **5.14.1 Métodos estadísticos**

Para determinar el rendimiento obtenido para cada prueba, en el crecimiento de *G. lamblia*, se hicieron 6 experimentos independientes, cada uno por triplicado. Se promediaron los rendimientos obtenidos durante los diferentes experimentos, obtuvimos la media  $\pm$  desviación estándar y los datos se compararon mediante análisis de varianza, usando el paquete estadístico SPSS para Windows versión estándar 10 (SPSS Inc., Chicago Illinois, USA).

## 6. RESULTADOS

El cultivo *in vitro* de cualquier microorganismo celular, requiere medios de cultivos artificiales, los cuales, deben de estar preparados mediante la mezcla de componentes purificados o de soluciones orgánicas complejas bien definidas. Estos cultivos deben de mantener las condiciones fisico-químicas adecuadas para que dichos microorganismos puedan crecer fuera de su entorno natural, donde se debe de respetar las características innatas como el pH, osmolaridad y temperatura óptima.

El suero bovino es un producto único de gran importancia en la ciencia, principalmente en el área de la medicina y biotecnología. El suero bovino, sirve como suplemento en los medios de cultivo donde suele aportar factores de crecimiento y hormonas, necesarias para el crecimiento *in vitro* de los microorganismos. El gran problema de usar suero bovino es: a) a pesar de que la composición del suero es conocida, existen gran cantidad de componentes presentes en cantidades variables en éste que pueden influir notablemente en el crecimiento de los microorganismos (hormonas, factores de crecimiento); b) el suero varía de lote a lote, y se deteriora cada año, a pesar del almacenamiento a -20 °C; c) cada cambio de lote de suero requiere realizar una serie de controles costosos y tediosos; d) si se han de purificar productos del

medio de cultivo la presencia de los componentes del suero dificulta notablemente estos procesos; e) desgraciadamente, el suero está contaminado con mucha frecuencia por virus y micoplasmas, lo que representa un grave peligro para el cultivo.

Por ello, la realización de esfuerzos para obtener medios definidos para el crecimiento de microorganismos es muy importante. Esto, además de la reproducibilidad buscada, permite establecer medios selectivos en los que crezca el tipo celular deseado. En la literatura no hay reportes donde se demuestre que *Giardia lamblia* puede crecer en forma vigorosa y sostenida en medios *in viro* definidos y en ausencia de suero bovino. Debido a lo anterior, en esta tesis nos propusimos hacer crecer a *G. lamblia* en ausencia de suero y así tener la posibilidad más adelante de poder determinar algunos factores de virulencia de este protozooario que pueden estar enmascarados por la presencia del suero bovino.

### 6.1 Parámetros de crecimiento

Realizamos la cinética de crecimiento de *Giardia lamblia* cepa IMSS:0989, cultivamos en el medio basal TYI, al cual le adicionamos el 9 % de suero bovino y 0.5 mg/mL de bilis bovina, inoculamos 10,000 trofozoítos/mL e incubamos a 36.5 °C por diferentes tiempos. La Figura 4 corresponde a una curva típica de crecimiento de *G. lamblia*, la función matemática que obtuvimos en la fase exponencial del crecimiento de los trofozoítos de *G. lamblia* correspondió a la siguiente ecuación.

$$\text{No. giardias/mL} = e$$

A partir de la ecuación lineal, determinamos un tiempo de generación de 9.75 h y tiempo de duplicación de 6.73 h. Con estos valores definimos tanto el inóculo de 10,000 trofozoítos/mL como 72 horas las horas de incubación que fueron necesarios para obtener cultivos en la fase exponencial y por lo tanto, en las mejores condiciones fisiológicas de este protozoario.

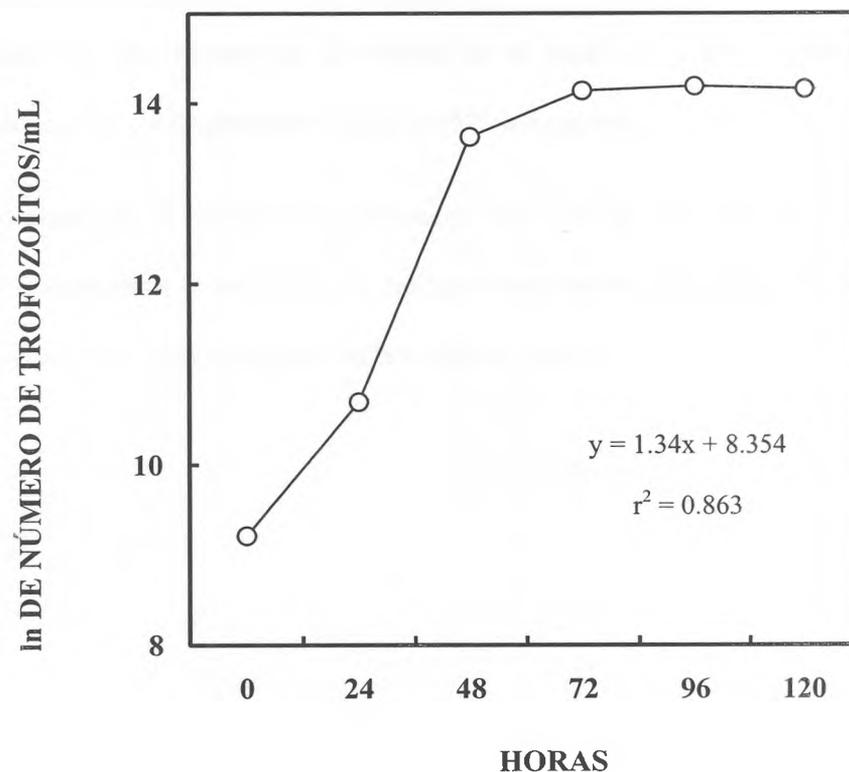


Figura 4. Relación temporal del crecimiento de *G. lamblia*. Inoculamos por triplicado 10,000 giardias/mL en tubos con 5 mL de medio TYI (suplementado con 9% de suero bovino y 0.5 mg/mL de bilis bovina). Cada 24 h se enfriaron los tubos en agua-hielo por 10 min y se hizo una dilución de 1:10 con formalina para contar los trofozoítos en cada tubo. Después se determinó la densidad de los cultivos con un hemacitómetro. Cada punto corresponde a seis experimentos independientes por triplicado.

## 6.2 Sustitución de la bilis bovina

Como un objetivo adicional en esta tesis y forzados por un desabasto de bilis bovina en el mundo, decidimos sustituir este componente al igual que el suero, se requiere para el crecimiento *in vitro* de *G. lamblia*.

Para ello, decidimos obtener del rastro municipal diferentes tipos de bilis (bovina, porcina, ovina y de cabrito), las cuales obtuvimos y liofilizamos por separado. Determinamos el crecimiento de *G. lamblia* en el medio TYI adicionado con suero bovino y diferentes concentraciones desde 0.0625 a 4 mg/mL.

Cuando añadimos al medio TYI adicionado con 9 % de suero bovino, bilis bovina comercial encontramos lo esperado, la densidad máxima la obtuvimos con 0.5 mg/mL de bilis bovina, como está reportado en la literatura. Figura 5.

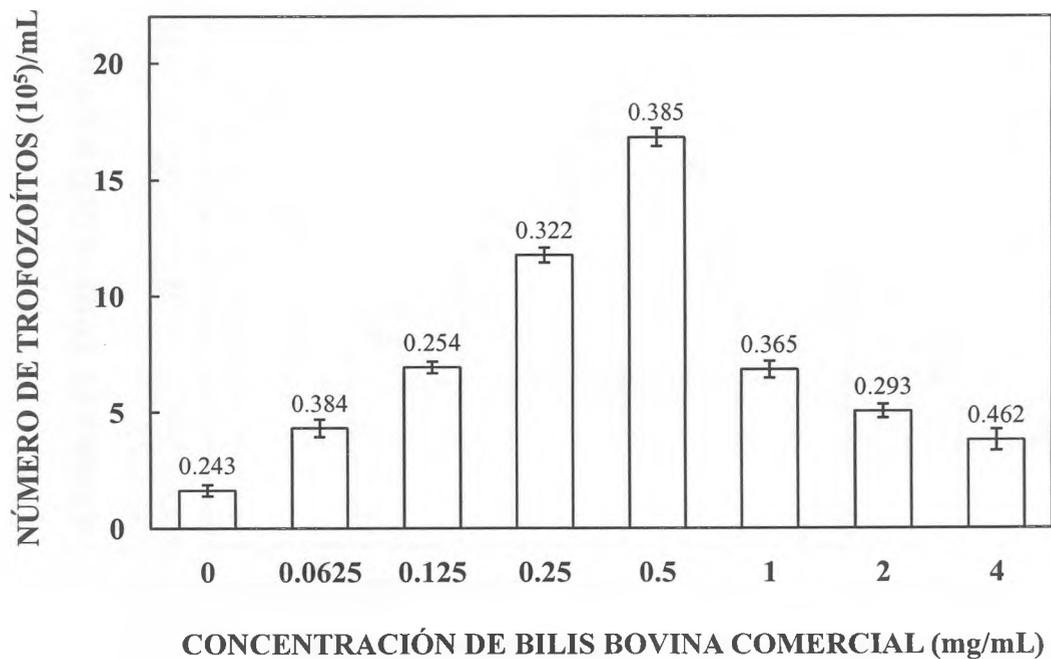


Figura 5. Efecto de la bilis bovina comercial sobre el crecimiento de *G. lamblia*. Inoculamos 10,000 trofozoitos/mL a tubos con 5 mL de medio basal TYI adicionado con 0.5 mL de suero bovino y cantidades variables (0.625 a 4 mg/mL) de bilis bovina por 72 horas a 36.5 °C. La barras corresponden a la media y desviación estándar de 6 experimentos independientes por triplicado.

Después de los resultados obtenidos con bilis bovina comercial, nuestro siguiente paso fue determinar y cuantificar a diferentes concentraciones la bilis bovina de rastro, procesada en nuestro laboratorio, donde encontramos que la máxima densidad de *G. lamblia* fue con 0.25 mg/mL. En donde demostramos que la bilis bovina obtenida del rastro municipal y elaborada en nuestro laboratorio, fue 50 % más eficiente que la comprada comercialmente, ver Figura 6.

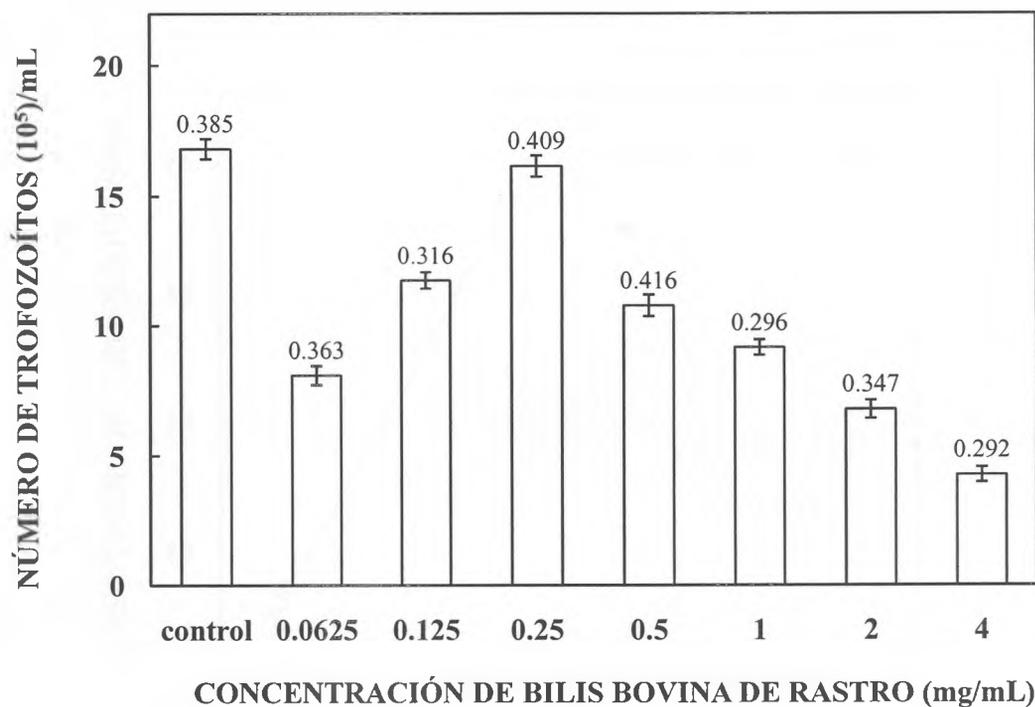


Figura 6. Efecto de la bilis bovina de rastro, procesada en nuestro laboratorio sobre el crecimiento de *G. lamblia*. Incubamos 10,000 trofozoítos/mL en tubos de 5 mL de medio basal TYI adicionado con 0.5 mL de suero bovino. Control corresponde a la bilis bovina comercial con 0.5 mg/mL. La barras corresponden a la media y desviación estándar de 6 experimentos independientes por triplicado.

Con este hallazgo, determinamos los parámetros de crecimiento de *G. lamblia*, en medio basal TYI adicionado con suero bovino y 0.25 mg/mL de bilis bovina de rastro, mediante una cinética de crecimiento. Obtuvimos como parámetros de crecimiento el tiempo de generación de 7.07 h y tiempo de duplicación de 4.88 h. Figura 7.

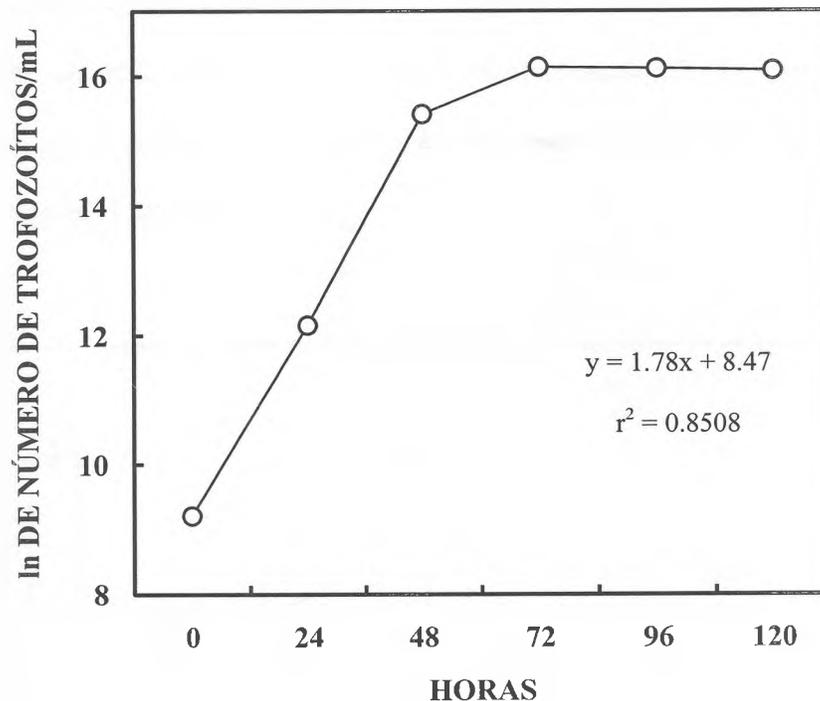


Figura 7. Relación temporal del crecimiento de *G. lamblia* en presencia de bilis bovina obtenida de rastro. Incubamos 10,000 trofozoitos/mL en tubos de 5 mL de medio basal TYI adicionado con 0.5 mL de suero bovino y 0.25 mg/mL de bilis bovina de rastro. Cada 24 h se enfriaron los tubos en agua-hielo por 10 min y se hizo una dilución de 1:10 con formalina para contar los trofozoitos en cada tubo. Después se determinó la densidad de los cultivos con un hemacitómetro. Cada punto corresponde a seis experimentos independientes por triplicado.

En ambos casos los tiempos de generación (9.75 h con bilis bovina comercial y 7.07 h con bilis bovina de rastro) y los tiempos de duplicación (6.73 h bilis bovina comercial y 4.88 h con bilis bovina de rastro) fueron mejorados 1.38 veces cuando usamos bilis bovina de rastro.

Una vez que conocimos la concentración óptima de bilis bovina obtenida comercialmente y de rastro, nos propusimos determinar la concentración óptima de la bilis porcina obtenida comercialmente sobre el crecimiento de *G. lamblia*. Donde encontramos que la máxima concentración de crecimiento fue con 0.25 mg/mL de bilis porcina comercial. Figura 8.

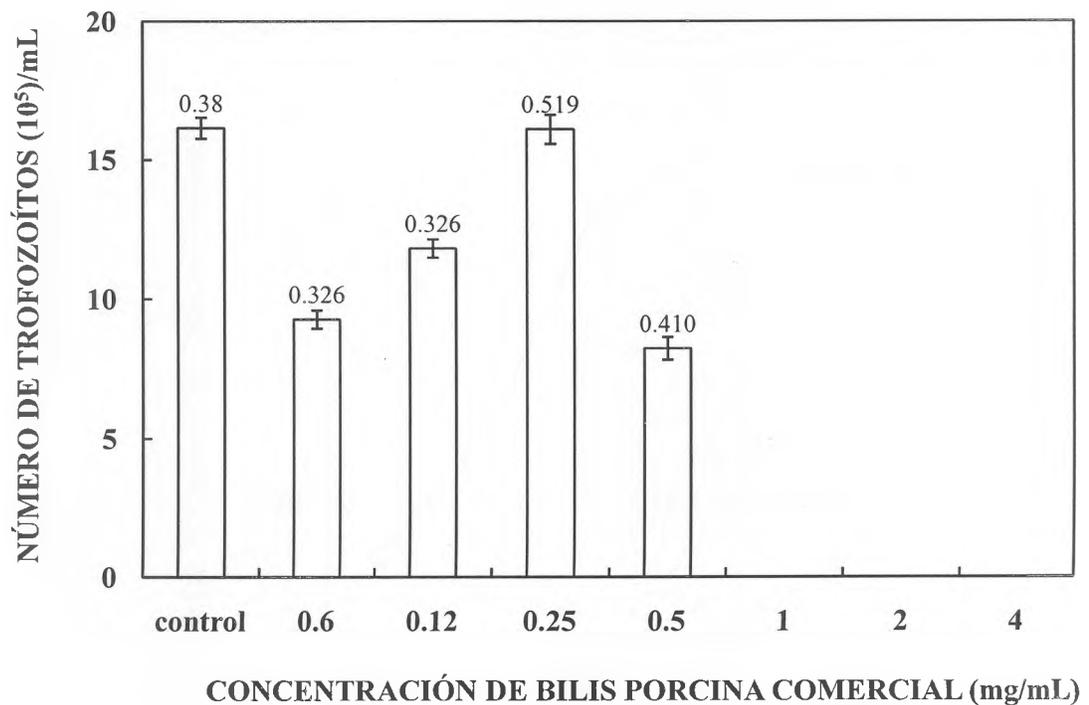


Figura 8. Efecto de la bilis porcina comercial sobre el crecimiento de *G. lamblia*. Incubamos 10,000 trofozoítos/mL en tubos de 5 mL de medio basal TYI adicionado con 0.5 mL de suero bovino. Control corresponde a bilis bovina comercial con 0.5 mg/mL. La barras corresponden a la media y desviación estándar de 6 experimentos independientes por triplicado.

Con el resultado anterior determinamos los parámetros de crecimiento de *G. lamblia*, en medio basal TYI adicionado con suero bovino y 0.25 mg/mL de bilis porcina comercial, mediante una cinética de crecimiento. Obtuvimos como parámetros de crecimiento el tiempo de generación de 7.03 h y tiempo de duplicación de 4.85 h, Figura 9. En ambos casos tanto el tiempo de generación como el tiempo de duplicación disminuyeron 1.38 veces con respecto a nuestro control que es el medio suplementado con bilis bovina comercial.

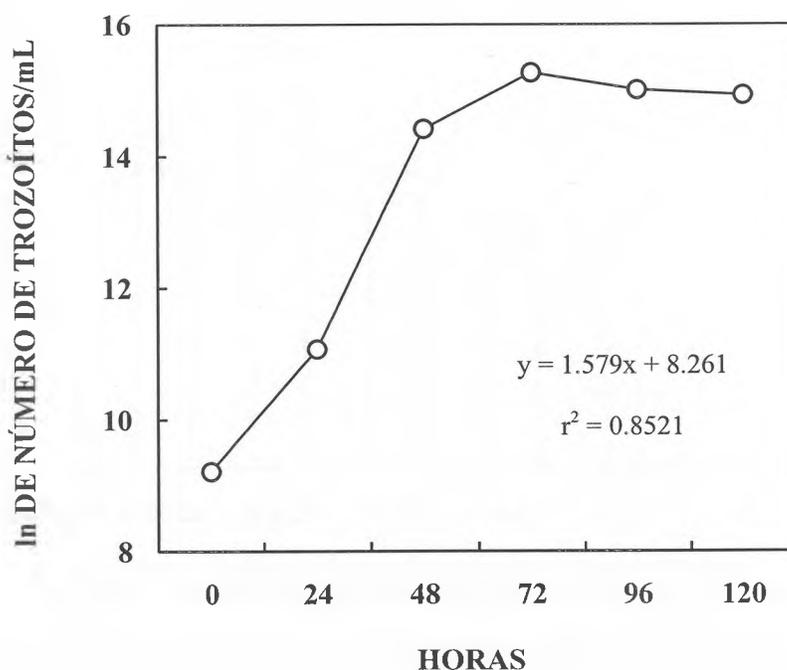


Figura 9. Relación temporal del crecimiento de *G. lamblia* en presencia de bilis porcina comercial. Incubamos 10,000 trofozoítos/mL en tubos de 5.6 mL de medio basal TYI adicionado con 0.5 mL de suero bovino y 0.25 mg/mL de bilis porcina comercial. Cada 24 h se enfriaron los tubos en agua-hielo por 10 min y se hizo una dilución de 1:10 con formalina para contar los trofozoítos en cada tubo. Después se determinó la densidad de los cultivos con un hemacitómetro. Cada punto corresponde a seis experimentos independientes por triplicado.

Después determinamos la concentración óptima de la bilis porcina de rastro sobre el crecimiento de *G. lamblia*. Donde encontramos que la máxima concentración de crecimiento fue con 0.125 mg/mL de bilis porcina de rastro.

Figura 10.

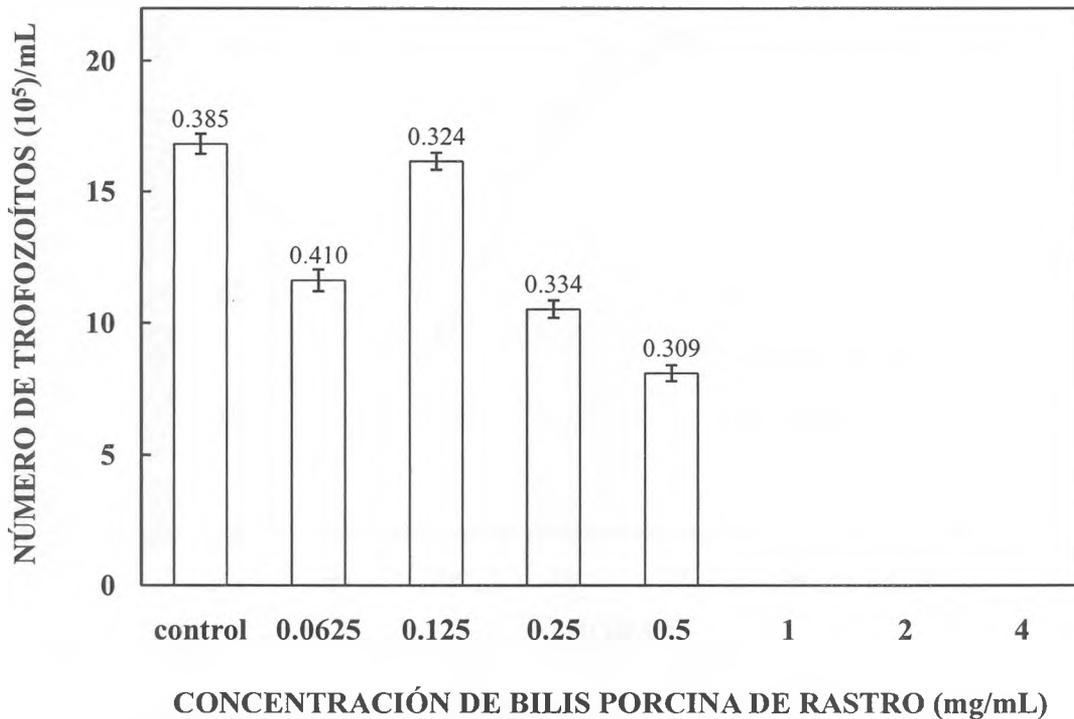


Figura 10. Efecto de la bilis porcina de rastro sobre el crecimiento de *G. lamblia*. Incubamos 10,000 trofozoitos/mL en tubos de 5 mL de medio TYI adicionado con 0.5 mL de suero bovino. Control corresponde a bilis bovina comercial con 0.5 mg/mL. La barras corresponden a la media y desviación estándar de 6 experimentos independientes por triplicado.

Determinamos los parámetros de crecimiento de *G. lamblia*, en medio basal TYI adicionado con 9 % de suero bovino y 0.125 mg/mL de bilis porcina de rastro, mediante

una cinética de crecimiento. Obtuvimos como parámetros de crecimiento el tiempo de generación de 6.98 h y tiempo de duplicación de 4.82 h. Figura 11. Ambos tiempos fueron 1.39 veces menores que encontramos con nuestro control con bilis bovina comercial.

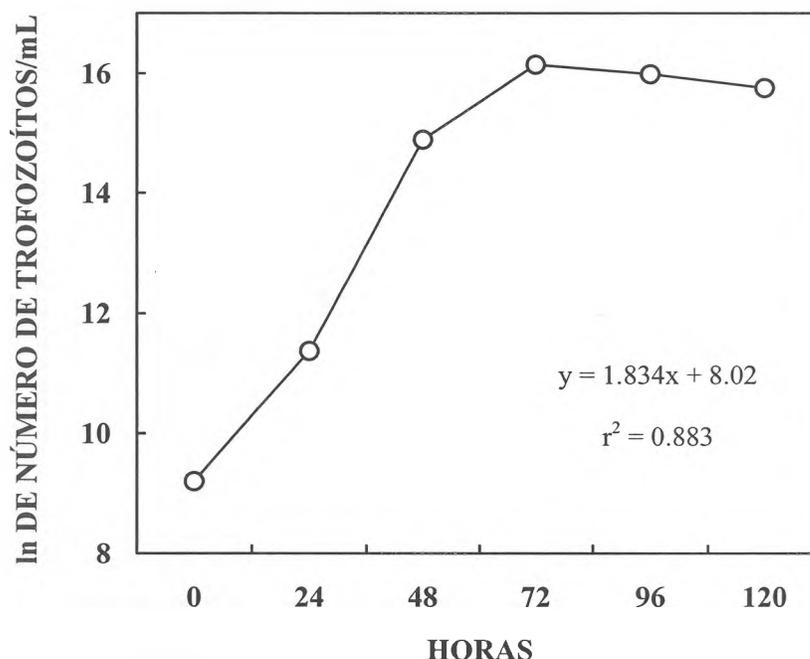


Figura 11. Relación temporal del crecimiento de *G. lamblia* en presencia de 0.125 mg/mL de bilis porcina de rastro. Incubamos 10,000 trofozoítos/mL en tubos de 5 mL de medio TYI adicionado con 0.5 mL de suero bovino y 0.125 mg/mL de bilis porcina de rastro. Cada 24 h se enfriaron los tubos en agua-hielo por 10 min y se hizo una dilución de 1:10 con formalina para contar los trofozoítos en cada tubo. Después se determinó la densidad de los cultivos con un hemacitómetro. Cada punto corresponde a seis experimentos independientes por triplicado.

Probamos diferentes concentraciones de bilis ovina de rastro y determinamos la concentración óptima sobre el crecimiento de *G. lamblia*. Donde encontramos que la máxima concentración de crecimiento fue con 0.125 mg/mL de bilis ovina de rastro.

Figura 12.

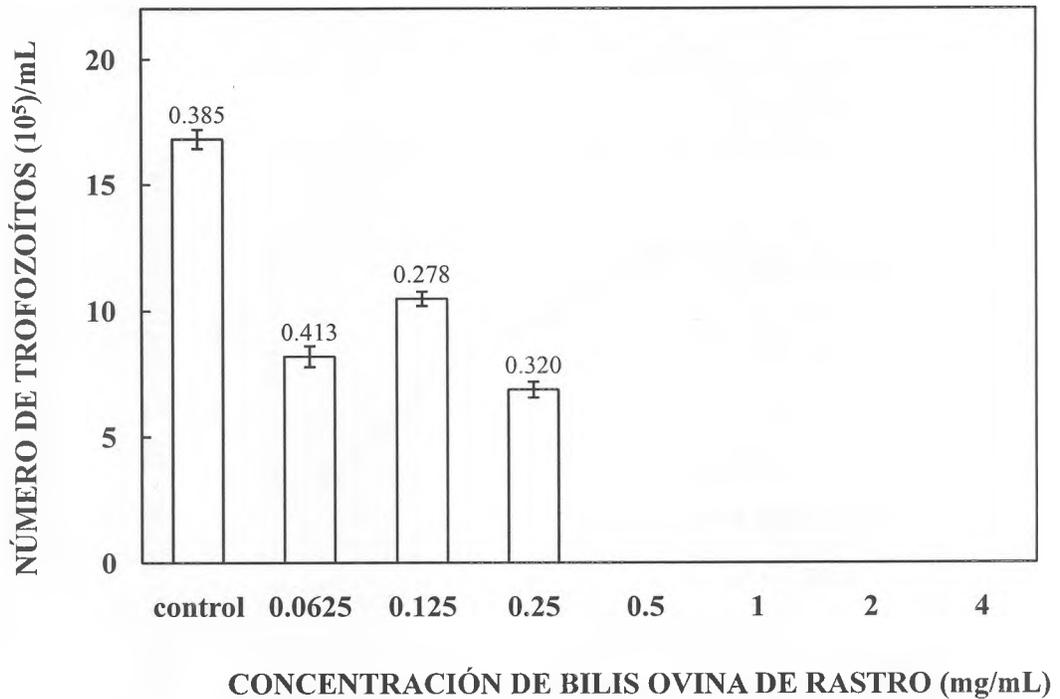


Figura 12. Efecto de la bilis ovina de rastro sobre el crecimiento de *G. lamblia*. Incubamos 10,000 trofozoitos/mL en tubos de 5 mL de medio basal TYI adicionado con 0.5 mL de suero bovino. *Test* (testigo) corresponde a bilis bovina comercial con 0.5 mg/mL. La barras corresponden a la media y desviación estándar de 6 experimentos independientes por triplicado.

Determinamos los parámetros de crecimiento de *G. lamblia*, en medio basal TYI adicionado con 0.5 mL de suero bovino y 0.125 mg/mL de bilis de ovina de rastro, mediante una cinética de crecimiento. Obtuvimos como parámetros de crecimiento el tiempo de generación de 7.17 h y tiempo de duplicación de 4.94 h. Figura 13. Ambos tiempos fueron 1.38 veces menores que encontramos con nuestro control con bilis bovina comercial.

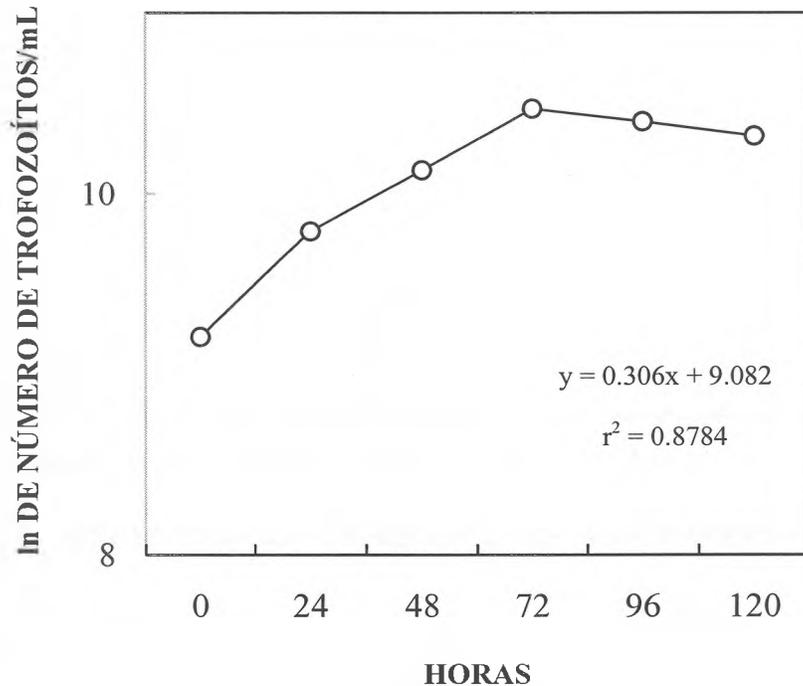


Figura 13. Relación temporal del crecimiento de *G. lamblia* usando 0.125 mg/mL de bilis de ovina de rastro. Incubamos 10,000 trofozoítos/mL en tubos de 5.0 mL de medio basal TYI adicionado con 0.5 mL de suero bovino y 0.125 mg/mL de bilis ovina de rastro. Cada 24 h se enfriaron los tubos en agua-hielo por 10 min y se hizo una dilución de 1:10 con formalina para contar los trofozoítos en cada tubo. Después se determinó la densidad de los cultivos con un hemacitómetro. Cada punto corresponde a seis experimentos independientes por triplicado.

Probamos diferentes concentraciones de bilis ovina de rastro y determinamos la concentración óptima sobre el crecimiento de *G. lamblia*. Donde encontramos que la máxima concentración de crecimiento fue con 0.0625 mg/mL de bilis caprina de rastro.

Figura 14.

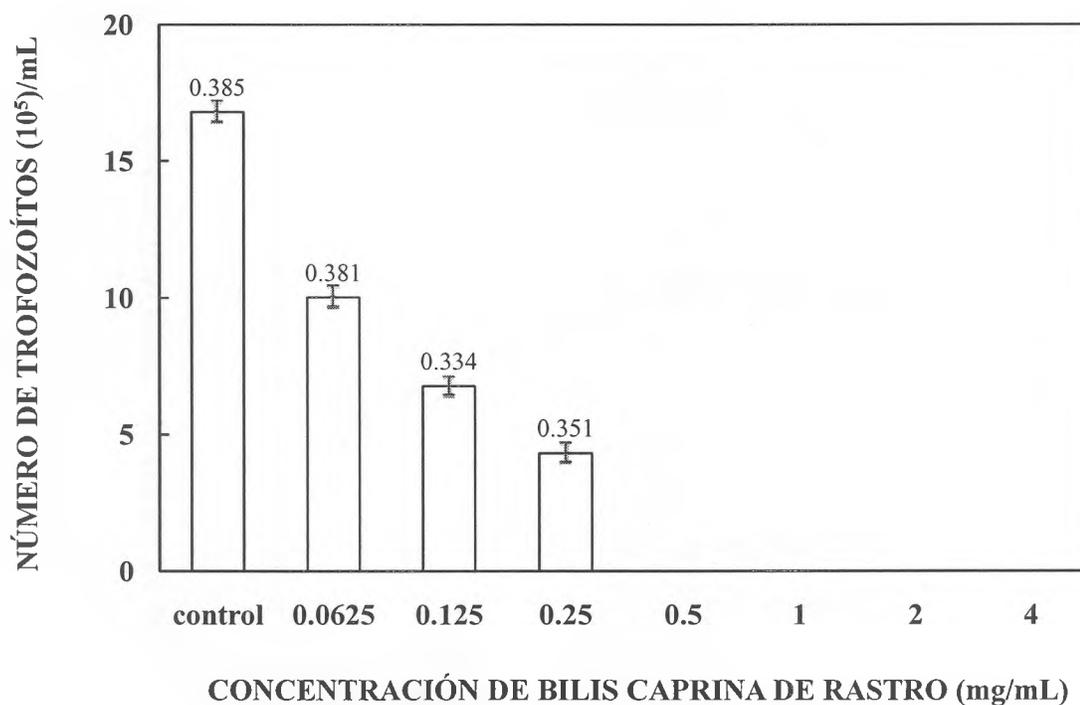


Figura 14. Efecto de la bilis de cabrito de rastro sobre el crecimiento de *G. lamblia*. Incubamos 10,000 trofozoitos/mL en tubos de 5.0 mL de medio basal TYI adicionado con 0.5 mL de suero bovino. Control corresponde a bilis bovina comercial con 0.5 mg/mL. La barras corresponden a la media y desviación estándar de 6 experimentos independientes por triplicado.

Determinamos los parámetros de crecimiento de *G. lamblia*, en medio TYI adicionado con suero bovino y 0.0625 mg/mL de bilis caprina de rastro, mediante una cinética de crecimiento. Obtuvimos como parámetros de crecimiento el tiempo de generación de 7.20 h y tiempo de duplicación de 4.97 h. Figura 15. Ambos tiempos fueron 1.35 veces menores que encontramos con nuestro control con bilis bovina comercial.

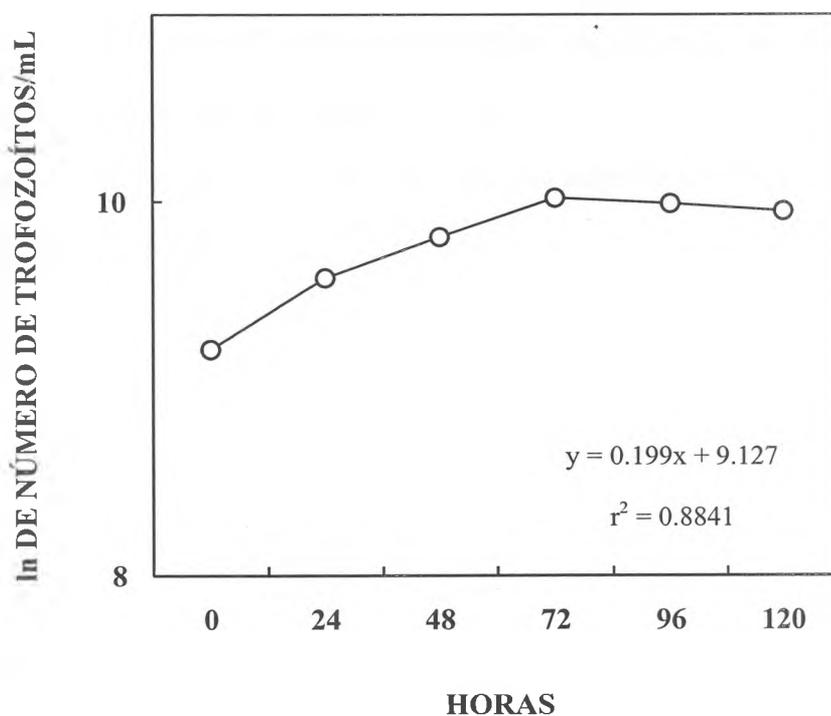


Figura 15. Relación temporal de crecimiento de *G. lamblia* con 0.0625 mg/mL de bilis de cabrito de rastro. Incubamos 10,000 trofozoítos/mL en tubos de 5.0 mL de medio basal TYI, 0.5 mL de suero bovino y 0.0625 mg/mL de bilis de cabrito de rastro. Cada 24 h se enfriaron los tubos en agua-hielo por 10 min y se hizo una dilución de 1:10 con formalina para contar los trofozoítos en cada tubo. Después se determinó la densidad de los cultivos con un hemacitómetro. Cada punto corresponde a seis experimentos independientes por triplicado.

### 6.3 Sustitución del suero bovino

Con estos resultados, determinamos que nuestros siguientes experimentos usaríamos bilis porcina de rastro para el crecimiento de *G. lamblia*.

Nuestro siguiente paso, fue hacer crecer a *G. lamblia* en ausencia de suero. Para ello, nos propusimos sustituir el suero bovino en el medio de cultivo TYI, en este caso usamos las combinaciones de vitaminas Diamond-Tween 80, LCR y albúmina (ver tabla METODOS). Una vez que pusimos en práctica esta estrategia encontramos que la combinación de la mezcla que contiene las vitaminas Diamond-Tween 80 (0.1 mg/mL), LCR (0.1 mg/mL) y albúmina (9 %) fue la que dio mejor resultado para el crecimiento de *G. lamblia*. Figura 16.

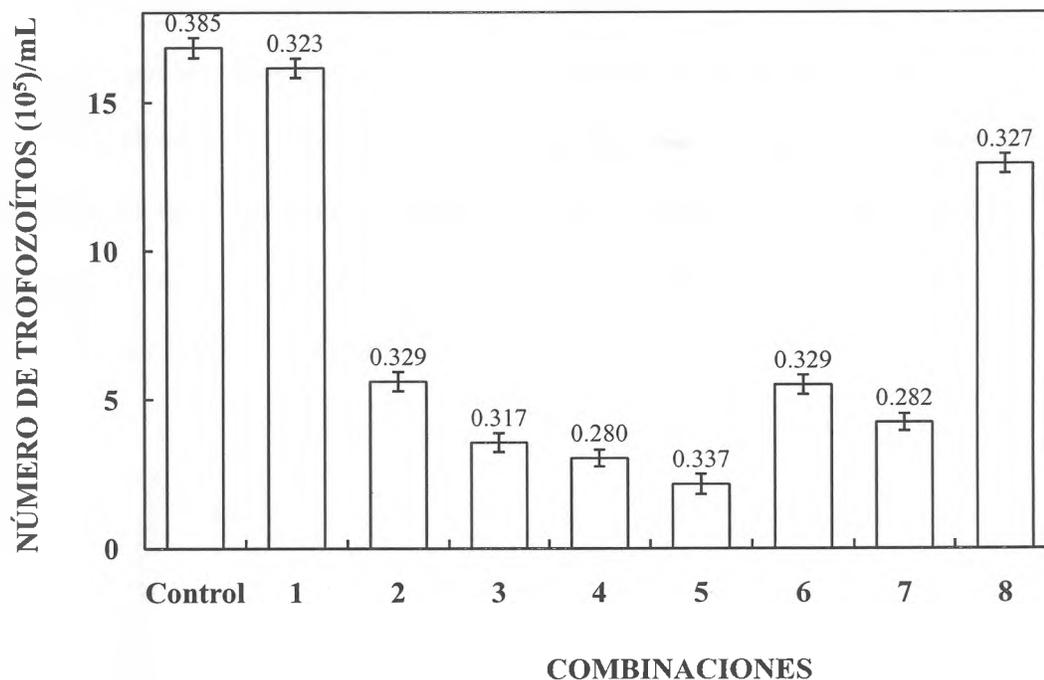


Figura 16. Sustitución del suero bovino. Incubamos 10,000 trofozoítos/mL en tubos de 5.0 mL de medio basal TYI. Control corresponde al medio TYI con 0.5 mL de suero bovino y bilis bovina comercial con 0.5 mg/mL. (1) suero más bilis porcina de rastro, (2) suero más vitaminas; (3) LCR; (4) bilis porcina de rastro más LCR; (5) vitaminas más albúmina; (6) albúmina bovina más LCR; (7) bilis porcina de rastro más albúmina; (8) albúmina, LCR, bilis porcina de rastro más vitaminas. La barras corresponden a la media y desviación estándar de 6 experimentos independientes por triplicado.

Con este resultado hemos podido crecer a *G. lamblia* en ausencia de suero, usando albúmina, LCR, vitaminas Diamond-Tween 80 y bilis porcina de rastro, con una eficiencia del 76.91 % con respecto al control.

### 6.3.1 Parámetros de crecimiento en el medio TYI-albúmina

Una vez que encontramos que *G. lamblia* podía crecer en ausencia de suero y este ser sustituido por la combinación de vitaminas Diamond-Tween 80 (0.1 mg/mL), LCR (0.1 mg/mL), albúmina (9 %) y bilis porcina de rastro (0.125 mg/mL), corroboramos el crecimiento de *G. lamblia* en ausencia de suero usando una curva de crecimiento. Obtuvimos como parámetros de crecimiento el tiempo de generación de 8.58 h y tiempo de duplicación de 5.92 h. Figura 17.

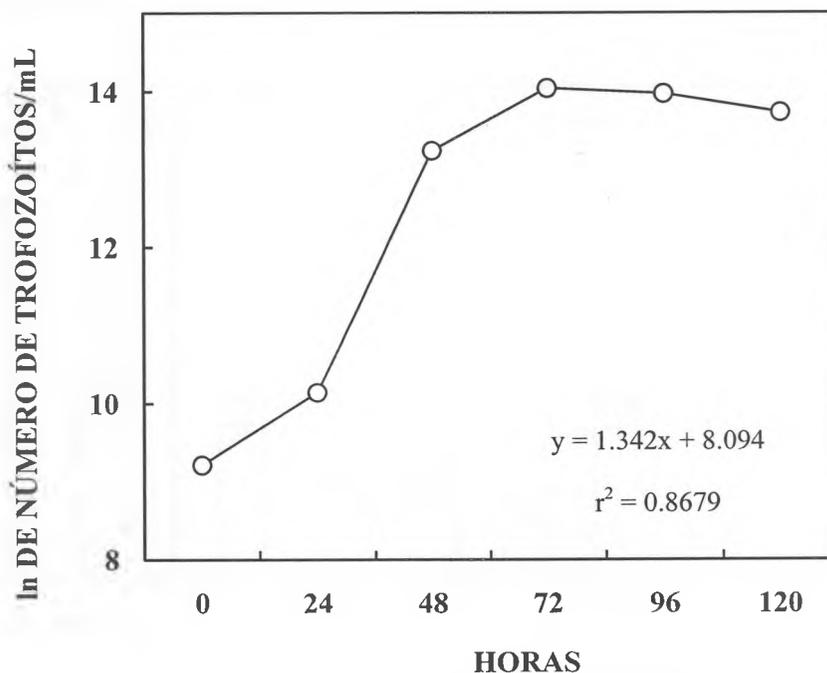


Figura 17. Relación temporal de crecimiento de *G. lamblia* albúmina bovina, LCR, bilis porcina de rastro y con las vitaminas Diamond-Tween 80. Incubamos 10,000 trofozoítos/mL en tubos de 5.0 mL de medio basal TYI, 0.5 mL de albúmina, 0.1 mL de LCR, 0.1 mL de vitaminas y 0.125 mg/mL de bilis porcina de rastro. Cada 24 h se enfriaron los tubos en agua-hielo por 10 min y se hizo una dilución de 1:10 con formalina para contar los trofozoítos en cada tubo. Después se determinó la densidad de los cultivos con un hemacitómetro. Cada punto corresponde a seis experimentos independientes por triplicado.

#### 6.4 Sustitución de la albúmina

Como objetivo final quisimos remplazar la albúmina bovina que usamos en las combinaciones anteriores (ver Figura 16), ya que esta generalmente bien contaminada con ácidos grasos libres de cadena alifática corta (8 a 16 carbonos), y esto podría afectar los resultados obtenidos, ya que no sabríamos si la albúmina o los ácidos grasos son los que nos están ayudando al crecimiento de *G. lamblia* en ausencia de suero bovino. Para descartar esta posibilidad usamos una mezcla definida de aminoácidos libres que pueden sustituir a la albúmina bovina, esta mezcla es llamada solución de Earle. Figura 18.

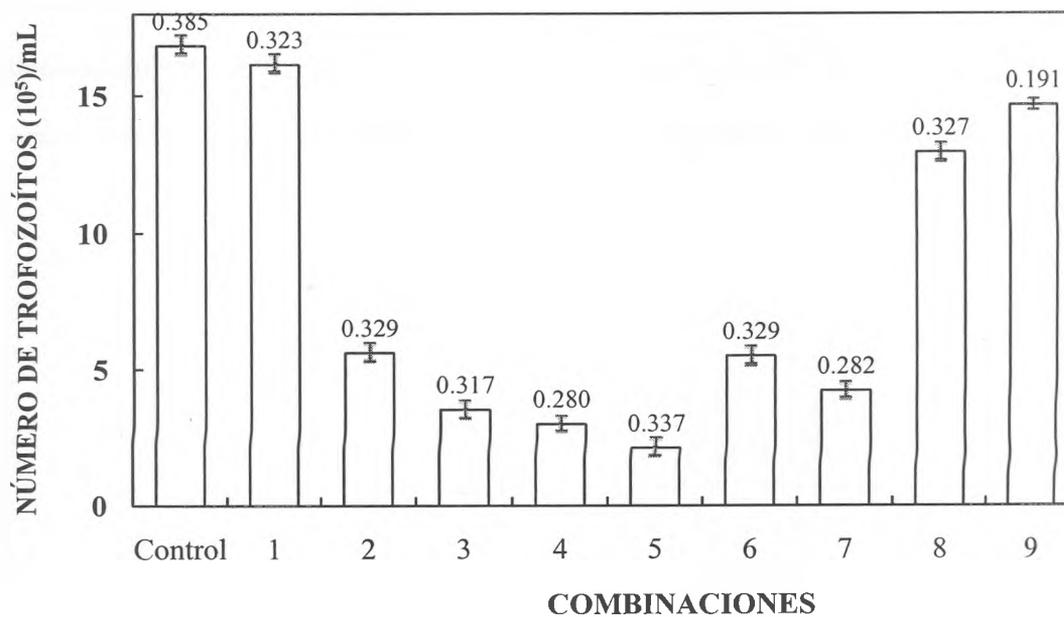


Figura 18. Sustitución de la albúmina bovina por el PACSR. Incubamos 10,000 trofozoitos/mL en tubos de 5.0 mL de medio basal TYI. Control corresponde al medio TYI adicionado con 0.5 mL de suero bovino y bilis bovina comercial con 0.5 mg/mL. (1) suero más bilis porcina de rastro, (2) suero más vitaminas; (3) LCR; (4) bilis porcina de rastro más LCR; (5) vitaminas más albúmina; (6) albúmina más LCR; (7) bilis porcina de rastro más albúmina; (8) albúmina, LCR, bilis porcina de rastro más vitaminas; (9) solución de Earle, LCR, vitaminas y bilis porcina de rastro. La barras corresponden a la media y desviación estándar de 6 experimentos independientes por triplicado.

#### 6.4.1 Parámetros de crecimiento en el medio TYI-PACSR

Cuando usamos el PACSR (solución de Earle, LCR, vitaminas Diamond-Tween 80) y en la combinación con la bilis porcina de rastro, encontramos que el crecimiento de *G. lamblia* fue 87.20 % mejor que cuando usamos la albúmina bovina en la combinación y 1.14 % menor que nuestro testigo que fue con suero bovino.

Para corroborar este resultado hicimos curvas de crecimiento usando como sustituto de albúmina bovina el PACSR. Por regresión lineal encontramos que los parámetros de crecimiento de *G. lamblia*, el tiempo de generación fueron de 8.49 h y tiempo de duplicación de 5.86 h. Figura 19. Ambos parámetros fueron 0.9 veces menores que los obtenidos con respecto a albumina y 1.26 veces con respecto al control.

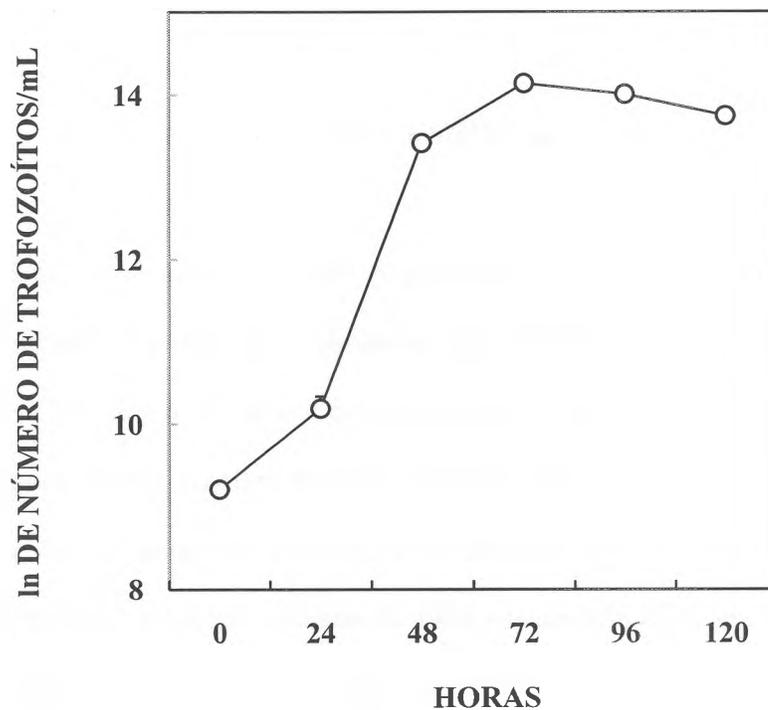


Figura 19. Relación temporal de crecimiento de *G. lamblia* en presencia de PACSR (solución de Earle, LCR, vitaminas Diamond-Tween 80) y bilis porcina. Incubamos 10,000 trofozoitos/mL en tubos de 5.0 mL de medio basal TYI, 0.5 mL de solución de Earle, 0.1 mL de LCR, 0.1 mL de vitaminas y 0.125 mg/mL de bilis porcina de rastro. Cada 24 h se enfriaron los tubos en agua-hielo por 10 min y se hizo una dilución de 1:10 con formalina para contar los trofozoitos en cada tubo. Después se determinó la densidad de los cultivos con un hemacitómetro. Cada punto corresponde a seis experimentos independientes por triplicado.

## 7. DISCUSIÓN

*Giardia lamblia* (sinónimo: *Giardia intestinalis*, *Giardia duodenalis*) es el agente causante de la enfermedad llamada giardiasis, este protozooario es considerado de gran importancia epidemiológica y clínica por su alta prevalencia y patogenicidad en muchos mamíferos gatos, perros, caballos, humanos (Conboy, 1997). El interés por este protista flagelado se ha incrementado a partir de la segunda mitad del siglo XX con el reconocimiento de su potencial patógeno en 1962 y la demostración, en 1987, de que la infección experimental humana por *Giardia* cumple los postulados de Koch. Asimismo, los estudios de secuenciación del gen que codifica la subunidad pequeña o 18S rRNA (Sogin *et al*, 1989), utilizados en los actuales sistemas de clasificación molecular de los microorganismos de eucariotas, señalan a *Giardia lamblia* como el organismo eucariota más primitivo conocido (Gillin *et al*, 1996).

En el mundo, *G. lamblia* produce una de las enfermedades diarreicas agudas más importantes, especialmente atacando a niños, ancianos y turistas (Gascón, 1998; Faruque *et al*, 2004). Este protozooario es transmitido en el agua y alimentos contaminados con quistes (Wolfe, 1992) y la giardiasis es considerada actualmente la infección más común del intestino delgado del hombre del trópico latinoamericano. La

tasas de reinfección por *G. lamblia* son altas en zonas endémicas, por lo que la infección por este protozoo, a diferencia de otras parasitosis intestinales, resulta muy difícil de controlar (Gilman *et al.*, 1988; Dorea *et al.*, 1996). La variación antigénica ha sido señalada como un mecanismo del parásito para incrementar tanto la oportunidad de infección inicial exitosa como las frecuentes reinfecciones (Nash, 1997). Los estudios clínicos y experimentales señalan que en el hospedero hay anomalías en los linfocitos B, permitiendo la susceptibilidad de adquirir la infección por este protozoario (Katelaris *et al.*, 1995).

Por otro lado, el mecanismo patogénico específico por el que el protozoario *G. lamblia* causa enfermedad no ha sido identificado con claridad. Se habla de una patogenia de origen multifactorial y se han implicado a factores dependientes tanto del parásito como del hospedador, siendo: a) Factores dependientes de *G. lamblia*: se han observado alteraciones histoquímicas de la mucosa intestinal, debidas a la activación de los linfocitos T por la presencia de VSP (proteínas variantes de superficie), que se traducen en una atrofia de las microvellosidades intestinales y b) Factores dependientes del hospedador: i) la inmunodeficiencia humoral, como la hipogammaglobulinemia, o el déficit selectivo de IgA y la susceptibilidad en los antígenos de histocompatibilidad, ii) la malnutrición calórico-proteica aumenta la gravedad de la giardiasis, iii) la microflora intestinal, imprescindible para la expresión de la patogenicidad de *G. lamblia* (Canut *et al.*, 1996; Katelaris *et al.*, 1995; Oberhuber y Stolte, 1995).

A pesar de que durante los últimos tiempos se ha venido ganando en conciencia sobre la importancia para la Salud Pública de la infección por *Giardia* y de que ha aumentado el interés por las investigaciones sobre este protozoo, existen aún muchas cuestiones que no han sido elucidadas totalmente, como son: i) el riesgo potencial de la transmisión zoonótica, ii) ciertos mecanismos de patogenicidad, iii) algunos procesos de reacción del huésped frente a la infección, y iv) la respuesta inmune. Por otra parte, se continúa la búsqueda de nuevos recursos terapéuticos para combatir y prevenir la infección tanto en el hombre como en los animales (Minenoa y Avery, 2003).

Por otro lado, se sabe que para cultivar *in vitro* cualquier microorganismo, se requieren medios de cultivos artificiales, los cuales, deben ser preparados mediante la mezcla de componentes purificados o de soluciones orgánicas complejas. Estos cultivos deben de mantener las condiciones físico-químicas adecuadas para que dichos microorganismos puedan crecer fuera de su entorno natural, donde se debe de respetar las características innatas como el pH, potencial de oxido-reducción, osmolaridad y temperatura óptima de cada microorganismo y disposición de nutrientes tales como grasas, lípidos, proteínas, entre otros.

En esta tesis trabajamos con cultivos del protozoario parásito *G. lamblia*; ya que para el cultivo *in vitro* de este microorganismo es indispensable suplementar el medio de cultivo con suero y bilis de mamífero (Keister, 1983), ya que *in vivo* su hábitat es la

región del duodeno y el yeyuno proximal (Kamat y Murugasu, 1974; Olveda *et al.*, 1982), sitios en donde están disponibles estos nutrientes. Sin embargo, recientemente han surgido una serie de dificultades para obtener ambos productos (suero y bilis bovina) de forma comercial ya que ha resurgido la enfermedad de las vacas locas (encepatía esponjiforme). Por estos antecedentes anteriores y sin la disposición de poder comprar productos derivados de vaca (suero bovino y bilis bovina), nos planteamos la posibilidad, de que *G. lamblia* pudiera crecer en un medio con un sustituto de suero y una fuente alterna de bilis.

De acuerdo con lo anterior, exploramos con mayor detalle la presencia del suero bovino en el medio de cultivo *in vitro* ya que este producto es de gran importancia en el diseño y elaboración de medios de cultivo, porque sirve como suplemento debido a que aportar lípidos, factores de crecimiento y hormonas, necesarias para el crecimiento *in vitro* de los microorganismos. El gran problema de usar suero bovino es: a) existen componentes en cantidades variables, que pueden influir notablemente en el crecimiento de los microorganismos (hormonas, factores de crecimiento, toxinas, etc.); b) el suero varía de lote a lote, y se deteriora con el tiempo, a pesar del almacenamiento a -20 °C; c) cada cambio de lote de suero requiere realizar una serie de controles tediosos y costosos; d) si se han de purificar productos del medio de cultivo la presencia de los componentes del suero dificulta notablemente estos procesos; e) el suero está frecuentemente contaminado con virus y micoplasmas, lo que representa un grave peligro para el

cultivo. Esto, además de la reproducibilidad buscada, permite establecer medios selectivos en los que crezcan tipos celulares deseados.

Por otro lado, actualmente, las técnicas de cultivo que son utilizadas para el estudio *in vitro* de los parásitos son abordadas utilizando diferentes puntos de vista ya que el cultivo es un prerequisite para estudios que requieren un gran número de células, por ejemplo en pruebas de antiparasitarios, estudios antigénicos, bioquímicos y de biología celular y molecular (Adam, 2001; Cox, 2002a).

En este trabajo, para establecer los estándares de comportamiento del cultivo de *G. lamblia* bajo condiciones axénicas *in vitro* empleando el medio TYI suplementado con suero bovino y bilis bovina comercial, realizamos curvas de crecimiento para determinar la cantidad de inóculo y los días de incubación necesarios para tener a *G. lamblia* (cepa IMSS:0989) en buenas condiciones fisiológicas. Con las curvas de crecimiento desarrolladas encontramos un tiempo generación de 9.75 h y tiempo de duplicación de 6.73 h con un inóculo de 10,000 trofozoítos/mL (Figura 2). Lo anterior concuerda con otros reportes en donde se ha descrito un tiempo de generación de 7.5 hasta 12 h en condiciones semejantes de cultivo (Farthing, 1983; Guimaraes *et al.*, 2002). Con estos datos definimos 72 horas de incubación como el tiempo necesario para que *G. lamblia* alcance su fase logarítmica, lo que nos aseguraba una máxima cantidad en masa de este protozoario en las mejores condiciones fisiológicas (Figura 4).

Por otra parte, para sustituir la bilis bovina comercial (control) en el medio de cultivo axénico TYI el cual es adicionado con suero bovino para *G. lamblia* se realizaron ensayos empleando bilis bovina de rastro (Figura 6), porcina comercial (Figura 8) porcina de rastro (Figura 10), ovina (Figura 12) y de cabrito (Figura 14). Los resultados encontrados indican que la bilis bovina comercial (empleando 0.5 mg/mL; ver Figura 5), puede ser sustituida satisfactoriamente empleando bilis porcina comercial (empleando solamente 0.25 mg/mL, ver Figura 8), la cual a su vez puede ser sustituida por la bilis porcina de rastro (empleando 0.125 mg/mL, ver Figura 10), estos rendimientos no presentaron diferencia significativa con respecto al control (ver Figura 5); sin embargo, es de resaltar que al emplear la bilis porcina de rastro se obtuvo un rendimiento de 96.07%, este rendimiento es superior al 95.71% obtenido al emplear la bilis porcina comercial, consideramos importante hacer notar que con la bilis porcina de rastro empleamos la concentración más baja de 0.125 mg/mL, este resultado nos condujo a hacernos la siguiente pregunta: ¿Es indispensable la bilis para el cultivo *in vitro* de *G. lamblia*?, por lo cual realizamos un ensayo por triplicado en ausencia de bilis, obteniendo un rendimiento de 17% en la primera resiembra y para la segunda resiembra, este cultivo no creció, con estos resultados corroboramos la necesidad que tiene *G. lamblia* en cultivos *in vitro*, esta necesidad de bilis en el medio de cultivo se debe a que *G. lamblia* es incapaz de sintetizar *de novo* los fosfolípidos de sus membranas (Farthing *et al*, 1985).

Cuando empleamos otras bilis como la bilis ovina (Figura 12) y la bilis de cabrito (Figura 14) ambas obtenidas del rastro municipal, estas bilis produjeron rendimientos muy bajos de 40 % menos que el control o la misma bilis porcina también de rastro, este efecto negativo en el crecimiento de este protozooario posiblemente se deba a que la consistencia de estas bilis era muy grasosa y por consiguiente la disposición de nutrientes no fue la adecuada para soportar el cultivo celular de *G. lamblia*, o también puede ser que las bilis ovina y de cabrito no tengan los requerimientos necesarios para sustentar el crecimiento de este protozooario, lamentablemente esta información no puede ser cotejada con ningún otro trabajo, ya que es el primer estudio de su tipo que se realiza con algún protozooario parásito humano como lo es *G. lamblia*.

La bilis bovina y porcina obtenida del rastro y procesada en condiciones de laboratorio fueron 2 veces más potentes que las obtenidas comercialmente (ver Figura 6 y Figura 10). Estos resultados encontrados abren la posibilidad de sustituir la bilis obtenida de otros países –la cual siempre es más cara y difícil de conseguir-, así como el usar la bilis de laboratorio sin restricciones de cantidad o disponibilidad.

En el estudio de la substitución del suero en el crecimiento de *G. lamblia*, en el medio basal TYI usamos las siguientes combinaciones: 1) suero más bilis porcina de rastro, (2) suero más vitaminas; (3) LCR (mezcla de lípidos y colesterol); (4) bilis porcina de rastro más LCR; (5) vitaminas más albúmina; (6) albúmina bovina más LCR; (7) bilis porcina de rastro más albúmina; (8) albúmina, LCR, bilis porcina de rastro y vitaminas.

Estos componentes se saben que por separado sirven para sustentar el crecimiento de microorganismos y son usados frecuentemente como suplementos en los medios de cultivos. Nuestro grupo estaba interesado en usarlos en combinaciones para obtener mejores resultados, en comparación si se utilizaban en forma individual. Encontramos que la combinación de albúmina, LCR, bilis porcina de rastro más vitaminas, los trofozoítos de *G. lamblia* podrían crecer en ausencia de suero con una eficiencia del 76.91 % con respecto al control que usamos (suero más bilis porcina de rastro; ver Figura 16).

Estos componentes son bien definidos a excepción de la albúmina ya que esta generalmente está contaminada con ácidos grasos libres de cadena alifática corta (8 a 16 carbonos), y esta contaminación podría afectar los resultados obtenidos, ya que no sabríamos si la albúmina o los ácidos grasos son los que nos están ayudando al crecimiento de *G. lamblia* en ausencia de suero bovino. Por ello, sustituimos la albúmina bovina por una mezcla definida de aminoácidos llamada solución de Earle (Eagle, 1959). Cuando usamos la solución de Earle en combinación con LCR, vitaminas Diamond-Tween 80 y bilis porcina de rastro encontramos que el crecimiento de *G. lamblia* fue 87.20 % mejor que cuando usamos la albúmina bovina en combinación con LCR, vitaminas Diamond-Tween 80 y bilis porcina de rastro 76.91 % menor que nuestro testigo que fue con suero bovino y bilis porcina (Figura 18).

Los resultados obtenidos muestran que para el cultivo *in vitro* de *G. lamblia* el suero bovino puede ser sustituido por el PACSR (Protozoa Axenic Cultivation Serum Replacement) (ver Figura 18), resultados semejantes fueron obtenidos al sustituir el suero por el PACSR en cultivos de los protozoarios parásitos de humanos, *Trichomonas vaginalis* y *Entamoeba histolytica* (Mata *et al*, 1996 y 1998).

Hasta ahora no se había propuesto un sustituto de suero para el crecimiento de *G. lamblia in vitro*, en esta tesis pudimos obtener una serie de combinaciones de compuestos totalmente definidos que sustentan el crecimiento de este protozoario *in vitro* en forma igual a la obtenida con suero bovino.

## 8. CONCLUSIONES

Para establecer condiciones de cultivo axénicas *in vitro* para *G. lamblia* en este trabajo encontramos que:

- La bilis bovina comercial puede ser reemplazada satisfactoriamente con la bilis porcina de rastro, la cual resultó potente ya que se empleó una menor concentración (0.125 mg/mL) que la bilis bovina comercial (0.5 mg/mL) y obtuvimos resultados muy similares.
- Comparamos la bilis porcina de rastro (0.125 mg/mL) y la bilis porcina comercial (0.25 mg/mL) y encontramos rendimientos similares. Por lo que es posible reemplazar la bilis porcina de rastro por la bilis porcina comercial, lo cual facilita la adquisición y manejo.
- El LCR contiene lípidos que son esenciales para *G. lamblia*. La albúmina puede ser sustituida por la mezcla de aminoácidos de Earle.

- Encontramos que la mayor densidad de trofozoítos la obtuvimos al adicionar: PACSR (9%) y bilis porcina de rastro (0.125 mg/mL), este dato se comparó con el control (suero y bilis bovina) y observamos resultados muy similares.
- Es posible sustituir satisfactoriamente el suero (9%) con el PACSR (mezcla de lípidos, vitaminas Diamond-Tween 80 y solución de Earle) para el cultivo axénico en TYI de *Giardia lamblia*.

De acuerdo con los resultados obtenidos, hemos desarrollado un medio de cultivo para *Giardia lamblia* libre de suero, usando componentes definidos.

## LITERATURA CITADA

Adam RD. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. Clinical Microbiology Reviews **14**: 447-475.

Addis D, David P, Roberts JM, Mast E., 1992. Epidemiology of giardiasis in Wisconsin: increasing incidence of reported cases and unexplained season trends. American Journal Tropical Medicine and Hygiene **47**: 13-19.

Ali SA, Hill DR. 2003. *Giardia intestinalis*. Current Opinion in Infectious Disease **16**: 453-460.

Ansari MA. 1951. Contribution to the study of the genus *Giardia* Kunstler, 1882 (Mastigophora, Octomitidae.) I. Synoptic table of known species and four new species. **26**(5-6):477-490.

Beaver PC, Jung RC, Cupp EW. 1984. Clinical Parasitology. Philadelphia: Lea and Febiger, pp. 52-56.

Bhatia VN, Warhurst DC. 1981. Hatching and subsequent cultivation of cysts of *Giardia intestinalis* in Diamond's medium. Journal of Tropical Medicine & Hygiene **84**: 45.

Bifulco JM, Schaefer FW. 1992. Serial subcultivation of *Giardia lamblia* in Keister's modified TYI-S-33 medium containing Ultrosor G. Journal of Protozoology **39**: 211-213.

Bingham AK, Meyer EA. 1979. *Giardia* excystation can be induced in vitro in acidic solutions. Nature **277**: 301-302.

Braden JD, Duchin JS. 2002. Preparing for and responding to bioterrorism. Information for the Public Health Workforce. Northwest Center for Public Health Practice. University of Washington.

Brieva L, Ara JR, Bertol V, Canellas A. 1998. Polyneuropathy caused by vitamin B12 deficiency secondary to chronic atrophic gastritis and giardiasis. *Revista de Neurologia* **26**: 1019-1020.

Burke JA. 1975. Giardiasis in childhood. *American Journal of Diseases of Child* **129**: 1304-1310.

Canonne D, Dubost-Brama A, Segard M, Piette F, Delaporte E. 2000. Wells syndrome associated with recurrent giardiasis. *British Journal of Dermatology* **143**:425-427.

Canut A, Rodriguez J, Martin A. 1996. Prevalencia de *Cryptosporidium* y *Giardia* en diferentes grupos de población. *Medicina Clinica (Barcelona)* **107**: 42-43.

Carroccio A, Montalto G, Iacono G, Ippolito S, Soresi M, Notarbartolo., 1997. A Secondary impairment of pancreatic function as a cause of severe malabsorption in intestinal giardiasis: a case report. *American Journal of Tropical Medicina and Hygiene* **56**:599-602.

Carus S. 2001. Bioterrorism and biocrimes. Working paper. Center for counter proliferation research. Washington DC: National Defense University.

Chute CG, Smith RP, Baron JA., 1987. Risk factors for endemic giardiasis. *American Journal of Public Health* **77**: 585-587.

Conboy G. 1997. *Giardia*. *Diagnostic Parasitology*. *Canadian Veterinary Journal*. **38**:245-247.

Cox FEG. 2002a. History of Human Parasitology. *Clinical Microbiology Review* **15**:595-612.

Craft JC. 1982. *Giardia* and giardiasis in childhood. *Pediatric Infectious Disease* **1**: 196-211.

Craun G. 1986. Waterborne giardiasis in the United States 1965-1984. *Lancet* **2**: 513-514.

Demirci M, Delibas N, Altuntas I, Oktem F, Yonden Z. 2003. Serum iron, zinc and copper levels and lipid peroxidation in children with chronic giardiasis. *Journal of Health Population Nutrition* **21**:72-75.

Diamond LS. 1983. Lumen Dwelling protozoa: *Entamoeba*, trichomonads, and *Giardia*. In J. B. Jensen (ed.) *In vitro* cultivation of protozoan parasites. P. 67-109.

Diamond LS, Clark CG, Cunnick CC. 1978. A new medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and other *Entamoeba*. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **72**: 431 - 432.

Diamond LS, Clark CG, Cunnick CC. 1995. YI-S, a casein free medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*, related *Entamoeba*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Eukaryote Microbiology* **42**: 277 - 278.

Diamond LS. 1968. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn 1903 and *E. histolytica*-like amoeba. *Journal of Parasitology* **54**: 1047-1056.

Dogliani C, De Boni M, Cielo R, Laurino L., Pelosio P. y Viale G., 1992. Gastric giardiasis. *Journal of Clinical Pathology* **45**:964-967.

Eagle H. 1959. Aminoacid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* **130**: 57-85.

Eckman L. 2003. Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite Immunology* **25**: 259-270.

Ertan P, Yereli K, Kurt O, Balcioglu IC, Onag A. 2002. Serological levels of zinc, copper and iron elements among *Giardia lamblia* infected children in Turkey. *Pediatrics International* **44**:286-288.

Farthing MG. 1993. Pathogenesis of giardiasis. *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene* **87**: 17-21.

Farthing MG. 1996. Giardiasis. *Clinics Medical of North America* **25**: 493-515.

Farthing MJ, VArón Sr, Keusch GT. 1983. Mammalian bile promotes growth of *Giardia lamblia* in axenic culture. *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene* **77**: 467 – 469.

Faruque A.S., Malek M.A., Khan A.I. 2004. Diarrhoea in elderly people: Aetiology, and clinical characteristics. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **36**:204-208.

Faust EC, Russell PF, Lincicome DR. *Parasitología Clínica de Craig y Faust*. UTHEA, México, 1961. p 93-95.

Fayer R, Dubey J, Lindsay D. 2004. Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends in Parasitology* **20**: 531-536.

Flanagan PA. 1992. *Giardia*- diagnosis, clinical course and epidemiology. A review. *Epidemiology and Infection* **109**: 1-22.

Ford BJ. 2005. The discovery of *Giardia*. *Microscope* **53**:4.

Gardner TB, Hill DR., 2001. Treatment of giardiasis. *Clinical Microbiology Review* **14**: 114-128.

Gascón BJ, 1998. Giardiasis. *Medicine* 7: 3751-3752.

Gault MJ, Gillin FD, Zenian AJ. 1987. *Giardia lamblia*: stimulation of growth by human intestinal mucus and epithelial cells in serum-free medium. *Experimental Parasitology* 64: 29-37.

Gillin FD, Diamond LS. 1980. Clonal growth of *Giardia lamblia* Trophozoites in a semi-solid agarosa medium. *Journal of Parasitology* 66: 350-352.

Gillin FD, Gault MJ, Hofmann AF, Gurantz D, Sauch JF. 1986. Biliary lipids support serum-free growth of *Giardia lamblia*. *Infection and Immunity* 53: 641-645.

Gillin FD, Reiner DS, McCaffery. 1996. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *Annual Review Microbiology* 50: 679-705.

Gillin FD, Reiner DS. 1982. Attachment of the flagellate *Giardia lamblia*. Role of reducing agents, serum, temperature, and ionic composition. *Molecular and Cellular Biology* 2: 369-377.

Graczyk TK, Grimes BH, Knight R, Da Silva AJ, Pieniazek NJ, Veal DA. 2003. Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* carried by synanthropic flies by combined fluorescent *in situ* hybridization and a monoclonal antibody. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 68:228-232.

Guimaraes S, Sogayar MIL, Franco MF. 1999. *Giardia duodenalis*: Inter-strain variability of proteins, antigens, proteases, isoenzymes and nucleic acids. *Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo* 41:45-58.

Hill DR. 1993. Giardiasis. Issues in diagnosis and management. *Infectious Disease Clinics of North America* 7: 503-525.

Hlavsa MC, Watson JC, Beach MJ. 2005. Giardiasis Surveillance -United States, 1998-2002. *MMWR Surveillance Summaries* 54: 9-16.

Hunter PR. 1997. Waterborne disease. Epidemiology and ecology. Chichester: John Wiley and sons.

Jarroll EL, Muller PJ, Meyer EA, Morse SA. 1981. Lipid and carbohydrate metabolism of *Giardia lamblia*. Molecular and Biochemical Parasitology 2: 187-196.

Kamath KR, Murugasu R. 1974. A comparative study of four methods for detecting *Giardia lamblia* in children with diarrheal illness and malabsorption. Gastroenterology 66:16-21.

Kaneda Y, Goutsu T. 1988. Lipid analysis of *Giardia lamblia* and its culture medium. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 82: 83-90.

Karapetyan AE. 1962. *In vitro* cultivation of *Giardia duodenalis*. Journal of Parasitology 48: 337-339.

Katellaris PH, Naeem A, Farthing MJ. 1995. Attachment of *Giardia lamblia* trophozoites to a cultures human instestinal cell line. Gut 37: 512-518.

Keister DB. 1983. Axenic cultivation of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene 77: 487-488.

Kilic E, Yazar S, Saraymen R. 2004. Responsiveness of total content changes of magnesium and zinc status in patients infected with *Giardia intestinalis*. Biological Trace Element Research 96:153-158.

Kirkpatrick CE. 1987. Giardiasis. Veterinary Clinics North American Small Animal Practice 17: 1377-1404.

Knight R. 1980. Epidemiology and transmission of giardiasis. Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene 74: 433-436.

Kobiler D, Mirelman D, Matterna CFT. 1981. Lectin and toxin-like activities of *Entamoeba histolytica*. Comparison of properties. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 30: 955-959.

Lane S, Lloyd D. 2002. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. Critical Review in Microbiology 28:123-47.

López M, Barreno M, Gutiérrez G, Gómez A. 1982. *Giardia lamblia* como microorganismo productor de cuadros diarreicos. Rev San Hig Pub 56:277-284.

López-Revilla R, Rodríguez-Báez J. 1981. Manual para el cultivo axénico de *Entamoeba histolytica*. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México pp 36 y 56.

Luján HD, Byrd LG, Mowatt MR, Nash TE. 1994. Serum Cohn fraction IV-1 supports the growth of *Giardia lamblia* in vitro. Infection and Immunity 62: 4664-4666.

Luján HD. 2006. *Giardia* y Giardiasis. Medicina (Buenos Aires) 66: 70-74.

Marshall MM, Naumovitz D, Ortega Y, Sterling CR. 1997. Waterborne protozoan pathogens. Clinical Microbiology Reviews 10: 67-85.

Mata-Cárdenas BD, Morales-Vallarta MR, Vargas-Villarreal J, Saíd-Fernández S. 1996. PACSR: a serum replacement for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene 90: 586.

Mata-Cardénas BD, Vargas-Villarreal J, Navarro-Marmolejo L, Saíd-Fernández S. 1998. Axenic cultivation of *Trichomonas vaginalis* in a serum-free medium. Journal of Parasitology 84: 638-639.

Mata-Cárdenas BD, Morales-Vallarta M, Vargas-Villarreal J, Saíd-Fernández S. 1996. PACSR: a serum replacement for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene 90: 586.

Meloni BP, Lymbery AJ, Thompson RCA. 1995. Genetic characterization of isolates of *Giardia duodenalis* by enzyme electrophoresis: implications for reproductive biology, population structure, taxonomy and epidemiology. *Journal of Parasitology* **81**:368-383.

Meyer EA. 1970. Isolation and axenic cultivation of *Giardia* Trophozoites from the rabbit, chinchilla and cat. *Experimental Parasitology* **27**: 179 – 183.

Meyer EA. 1976. *Giardia lamblia*: isolation and axenic cultivation. *Experimental Parasitology* **39**: 101-105.

Oberhuber G, Stolte M. 1995. Histologic detection of trophozoites of *Giardia lamblia* in the terminal ileum. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **30**: 905-908.

Olivares JL, Fernández R, Fleta J, Rodríguez G, Clavel A. 2003 Serum mineral levels in children with intestinal parasitic infection. *Digestive Disease* **21**:258-261.

Olveda RK, Andrews JS, Hewett EL. 1982. Murine Giardiasis: localization of trophozoites and small bowel histopathology during the course of infection. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene* **31**:60-66.

Ortega YR, Adam RD. 1997. *Giardia*: Overview and Update. *Clinical Infectious Disease* **25**:545-550.

Perez PF, Minnaard J, Rouvet M, Knabenhans C, Brassart D, De Antoni GL. 2001. Inhibition of *Giardia intestinalis* by extracellular factors from *Lactobacilli*: an in vitro study. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:5037-5042.

Pickering LK, Engelkirk PG. 1988. *Giardia lamblia*. *Pediatric Clinics North America* **35**: 565-577.

Procop GW. 2001. Gastrointestinal Infections. *Infectious Disease Clinic of North America* **15**:1073-1108.

Quincey C, James PD, Steele RJC. Chronic giardiasis of the stomach. *Journal of Clinical Pathology* **45**:1039-1041, 1992.

Robertson LJ, Gjerde B. 2001. Occurrence of parasites on fruits and vegetables in Norway. *Journal of Food Protection* **64**:1793-1798.

Roon RM, Bartram JK, Cramer EH, Mantha S, Nichols G, Suraj R, Todd ECD (2004). A review of outbreaks of waterborne disease associated with ships: evidence for risk management. *Public Health Reports* **119**: 435-442.

Saíd-Fernández S, Vargas-Villarreal J, Castro-Garza J, Mata-Cárdenas BD, Navarro-Marmolejo L, Lozano-Garza G, Martínez-Rodríguez H. 1988. PEHPS Medium: an alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene* **82**: 249-253.

Schmerin MJ, Jones TC, Klein H. 1978. Giardiasis: association with homosexuality. *Annals of Internal Medicine* **88**: 801-803.

Shandera WX. 1990. From Leningrad to the day-care center. The ubiquitous *Giardia lamblia*. *Western Journal of Medicine* **153**: 154-159.

Singer SM, Nash TE. 2000 b. The role of normal flora in *Giardia lamblia* infections in mice. *Journal of Infectious Diseases* **181**:1510-1512.

Smalheiser NR. 2004. Bath toys—a source of gastrointestinal infection. *New England Journal of Medicine* **350**:521.

Sogin ML, Gunderson JH, Elwood HJ, Alonso RA, Peattie DA. 1989. Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an usual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science* **243**: 75-77.

Stevens DP. 1982. Giardiasis: host-pathogen biology. *Reviews of Infectious Diseases* **4**:851-858.

Thompson RCA, Monis PT. 2004. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Advances in Parasitology* **58**: 69-137.

Thompson RCA, Reynoldson JA, Mendis HW. 1993. *Giardia* and giardiasis. *Advances in Parasitology* **32**: 71-160.

Thompson RCA. 2000. Giardiasis as a re-emerging disease and its zoonotic potential. *International Journal of Parasitology* **30**: 1259-1267.

Torres MA, Uetanabaro APT, Costa AF, Alves CA, Farias LM, Bambilra EA. 2000. Influence of bacteria from the duodenal microbiota of patients with symptomatic giardiasis on the pathogenicity of *Giardia duodenalis* in gnotoxenic mice. *Journal of Medical Microbiology* **49**:209-215.

Visvesvara GS. 1980. Axenic growth of *Giardia lamblia* in Diamond's TPS-1, *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene* **74**: 213-215.

Wieder SC, Keister DB, Reiner DS. 1983. Mass cultivation of *Giardia lamblia* in a serum-free medium. *Journal of Parasitology* **69**. 1181-1182.

Wolfe MS. 1992. Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews* **5**: 93-100.

Xiao L. 1994. *Giardia* infections in farm animals. *Parasitology Today* **10**: 436-438.

Zajac AM. 1992. Giardiasis. *Compend Contin Educ Pract Vet* **14**: 604-611.

## RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Magda Elizabeth Hernández García

Candidata para el Grado de

Maestra en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: CULTIVO AXÉNICO DE *Giardia lamblia* EN UN MEDIO LIBRE DE SUERO.

Campo de estudio: Biología Celular.

Datos personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León, el 1 de Diciembre de 1982, hija de José Luis Hernández Martínez y la Lic. Martha Eugenia García de Jesús.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2006.