Parásitos intestinales

PROTOZOOLOGÍA

***Encephalitozoon intestinalis*, *Enterocytozoon bieneusi* y otros parásitos intestinales en pacientes positivos para VIH del Hospital Universitario de Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela**

Amparo Hernández, Ángela Bracho, Rafael Villalobos,
Solneumar Salazar, Nailleth Arraiz
Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo,
Maracaibo, Venezuela

Introducción. Los microsporidios se consideran parásitos causantes de infecciones emergentes y oportunistas en individuos inmunocomprometidos en todo el mundo.

El objeto de este estudio fue identificar las especies de microsporidios intestinales en pacientes con VIH-sida del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo (SAHUM), donde no existían estudios previos en esta materia.

Materiales y métodos. Se obtuvieron 56 muestras fecales de pacientes con diagnóstico confirmado de VIH, en un periodo de un año. Se revisaron sus historias clínicas para obtener datos sobre conteo de CD₄ y carga viral. Las muestras se analizaron mediante examen macroscópico y microscópico con SSF y Lugol, método de concentración de Ritchie, coloración de Kinyoun, coloración Gram-cromótopo rápida y la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de *Encephalitozoon intestinalis* y *Enterocytozoon bieneusi*. Para determinar el ji al cuadrado y la correlación de Spearman se utilizó el paquete estadístico SPSS®, versión 10.

Resultados. Se diagnosticaron protozoos como *Blastocystis hominis* (17,65 %), *Isospora belli* (17,65 %), *Cryptosporidium* spp. (7,84 %), complejo *Entamoeba histolytica/dispar* (5,88 %), *Entamoeba coli* (3,92 %), *Giardia lamblia* (3,92 %), *Endolimax nana* (3,92 %), *Cyclospora cayetanensis* (3,92 %) y *Chilomastix mesnili* (1,96 %). Entre los helmintos, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* y *Strongyloides stercoralis* presentaron un porcentaje de 27,27 % cada uno, e *Hymenolepis nana*, 18,18 %. Con la coloración de Gram-cromótopo, 17 muestras evidenciaron esporas del filo Microspora, lo que equivale a 33,33 % de prevalencia. Mediante

PCR las especies de microsporidios presentaron 36 % de prevalencia, y 10 pacientes presentaron *E. intestinalis*, 4 *E. bieneusi* y 4 ambas especies. Veinticuatro individuos presentaron conteos de CD₄ dentro de los valores normales, mientras que en 23 fueron menores de 200 células por mm³ y en muchos de ellos se demostró infección por microsporidios.

Conclusiones. Se determinó una relación inversamente proporcional y estadísticamente significativa entre el conteo de CD₄ y la presencia de microsporidios en la muestra fecal.

• • •

Estandarización de un método de detección en agua de quistes de *Giardia* spp., *Blastocystis* spp. y ooquistes de *Cryptosporidium* spp.

Fabiana María Lora-Suárez, Raúl Eduardo Rivera, Jhon Edward García, Jorge Enrique Gómez-Marín
Línea de Giardiasis y Parásitos Intestinales, Grupo de Estudio en Parasitología y Micología Molecular, Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia

Introducción. En Colombia, la Resolución 2115 de 2007, en el capítulo 3, establece la obligación de las empresas de agua potable a realizar la detección en agua de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp., y a efectuar mapas epidemiológicos de riesgo para estos parásitos y otros protozoos. Los métodos estándar para la detección son bastante costosos y pueden llevar a encarecer los procesos de control y tratamiento del agua, lo que puede llevar al aumento de los costos de los servicios públicos. **Objetivo.** Desarrollar métodos de control y vigilancia de estos protozoos, eficientes y menos costosos, incluyendo algunos que son de importancia en las parasitosis intestinales, como es el caso de *Blastocystis* spp.

Materiales y métodos. Se evaluaron los métodos de detección para la concentración de formas parasitarias utilizando sales y precipitación. Para ello, a 20 litros de agua pura se les añadieron formas parasitarias y se determinó la sensibilidad y la reproducibilidad del método. Esta técnica se validó luego en el campo, tomando 50 muestras de 20 L de agua por estación en estaciones

ubicadas antes de la planta de tratamiento de agua potable, durante y después de ella; se precipitaron por centrifugación y se concentraron, luego se observaron por microscopio óptico y por inmunofluorescencia.

Resultados. La prueba tuvo una recuperación entre el 80 y el 90 %. En las muestras de campo, en la planta y en la red de distribución se encontró *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. y *Blastocystis* spp. La forma parasitaria más frecuente fue *Blastocystis* spp., seguido de *Giardia* spp., y el menos frecuente fue *Cryptosporidium* spp.

Conclusión. Se ha desarrollado un método eficiente, de bajo costo, para la detección de protozoos. Este método pudo ser aplicado con éxito en muestras de una planta de tratamiento y de su red de distribución.

• • •

Prevalencia de parasitosis intestinales y factores de riesgo asociados en escolares y adolescentes del Colegio Chicamocha, sección Kennedy I, del municipio de Tuta, Boyacá

Iván Pérez, Andrea Castañeda, Alexander Moreno, Fred Manrique, Sandra Suescún-Carrero
Programa de Medicina, Facultad de Ciencias de la salud, Universidad de Boyacá, Tunja, Colombia

Introducción. La prevalencia de la parasitosis intestinales en Colombia, principalmente en las áreas rural y urbana marginal, ha sido tradicionalmente alta debido a que las condiciones socioeconómicas y sanitarias son deficientes.

El objetivo del estudio fue determinar la prevalencia de parasitosis intestinales en escolares y adolescentes del Colegio Chicamocha, sección Kennedy I, del municipio de Tuta, Boyacá, e identificar los factores de riesgo asociados

Materiales y métodos. Se realizó un estudio de corte transversal en 50 escolares y adolescentes de 7 a 12 años de edad, pertenecientes al 30 % de la población. Se evaluó la presencia de parásitos intestinales de un examen coprológico directo y de la técnica de concentración de Ritchie o centrifugación con formol-éter, y de los factores de riesgo asociados mediante una encuesta estructurada, en la que se incluían aspectos generales, de la vivienda, socioeconómicos, biológicos, de comportamiento y ambientales. El procesamiento y análisis estadístico se realizó con el programa SPSS®, versión 11.5 (SPSS Inc. Chicago, USA). Se calcularon tablas de frecuencias para las variables nominales.

Resultados. La prevalencia de parasitosis fue de 96 %. Los parásitos más frecuentes fueron *Blastocystis hominis* (88 %), *Giardia intestinalis* (34 %), *Entamoeba coli* (56 %) y el complejo *Entamoeba histolica/dispar* (24 %). La poliparasitosis fue muy importante (84 %), y se encontraron hasta cuatro especies por huésped. El 54 % eran niñas, de predominio rural (n=27). El 72 % de la población tenía mascotas en la casa. En general, las condiciones de vivienda e higiénicas eran buenas.

Conclusiones. Este estudio demuestra una alta prevalencia de *B. hominis* en la población con buen acceso a servicios públicos. Es necesario hacer énfasis en los programas de control de zoonosis y en la desparasitación de las mascotas.

• • •

Control de transcripción del gen de la glucosamina-6-fosfato isomerasa durante el enquistamiento de *Entamoeba histolytica*

José Hugo Aguilar, Juan Pedro Laclette, Julio César Carrero

Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

Introducción. *Entamoeba histolytica* posee dos estadios: el trofozoíto y el quiste. El quiste, la forma infectiva, es tetranucleado y es responsable de la transmisión de la infección. Actualmente no existen reportes de la obtención de quistes maduros de *E. histolytica*, ni los estímulos y mecanismos implicados en el proceso de enquistamiento. Recientemente, nuestro grupo describió un protocolo para inducir enquistamiento *in vitro* de *E. histolytica*, mediante el uso de estrés por oxidación (H_2O_2) y de algunos dicaciones metálicos utilizados como cofactores. Estos ensayos resultan en la formación de estructuras tipo quiste que presentan características similares a las de un quiste maduro. Asimismo, observamos un aumento de la expresión de la glucosamina-6-fosfato isomerasa (Gln6Pi), enzima clave en la ruta metabólica del quiste en otros protozoarios intestinales.

Con base en esto, el presente trabajo pretendió abordar el papel de la Gln6Pi durante el proceso de la formación de estructuras tipo quiste de *E. histolytica*.

Materiales y métodos. Se hizo análisis *in silico* de la secuencia del gen de la Gln6Pi para el diseño y la síntesis de siRNA. Hubo incorporación de los siRNA en trofozoítos por medio de *soaking*, y siembra en medio de cultivo TYIS33. La inducción del enquistamiento se logró por medio

de estrés de oxidación. Se hizo extracción de ARN y de las proteínas totales para la evaluación del silenciamiento (RT-PCR y Western blot, respectivamente). La evaluación fenotípica se hizo por medio de microscopía y tinción con calcoflúor blanco.

Resultados. El silenciamiento del gen de la Gln6Pi con el uso de siRNA, mostró una disminución de la expresión del ARNm y de la proteína, que resultó en el bloqueó de la formación de la pared y por tanto en la obtención de estructuras tipo quiste durante el enquistamiento.

Conclusiones. Los ensayos de silenciamiento de gen de la Gln6Pi demostraron la participación de la enzima durante la formación de la pared del quiste, sugiriendo ser la limitante durante el proceso de enquistamiento.

• • •

Confirmación de la expresión de Ubp6, candidata a enzima “desubicuitinadora” en trofozoítos de *Giardia intestinalis*

Luisa Prada, Moisés Wasserman
Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica,
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C.,
Colombia

Introducción. La marcación de proteínas con ubiquitina puede generar su degradación por parte del proteosoma o su participación en una gran variedad de eventos celulares. Un grupo de enzimas clave en la homeostasis de la ubiquitina son las enzimas “desubicuitinadoras”; sobre estas enzimas existen aún muchos interrogantes de su función y blancos de acción. En estudios previos de nuestro grupo se ha reportado que el sistema de “ubiquitinación” es de gran importancia a lo largo del ciclo de vida de *Giardia intestinalis*; utilizando herramientas bioinformáticas hemos identificado candidatos de enzimas “desubicuitinadoras”, entre las cuales se encuentra una secuencia ortóloga a Ubp6 en levadura, la cual se asocia al proteosoma.

El objetivo del este estudio fue comprobar la expresión de Ubp6 y determinar su localización en trofozoítos de *G. intestinalis*.

Materiales y métodos. Mediante RT-PCR se verificó la expresión del gen *Ubp6*, en trofozoítos del parásito. El ORF de la enzima fue clonado en un vector de expresión específico para *G. intestinales*: pTubHApac. El plásmido recombinante se utilizó para transfectar parásitos, los cuales fueron seleccionados por su resistencia a la puomicina. El

aumento de la expresión de la enzima fue verificada mediante Western blot e inmunofluorescencia.

Resultados. Los experimentos de RT-PCR mostraron que la candidata a enzima “desubicuitinadora”, Ubp6, en *G. intestinalis* sí se está expresando en el estadio de trofozoítos del parásito. La transfección de los parásitos con el vector de expresión permitió su aumento de expresión, la cual pudo ser confirmada mediante Western blot.

Conclusiones. Este trabajo valida los resultados de bioinformática obtenidos por nuestro grupo de investigación ya que se pudo verificar la expresión de la proteína ortóloga a Ubp6 en trofozoítos de *G. intestinales*.

• • •

Enzimas de la ruta de síntesis de isoprenoides en *Giardia intestinalis*

María Angélica Calderón, Paula C. Hernández,
Jacqueline Chaparro-Olaya
Laboratorio de Parasitología Molecular, Universidad El
Bosque, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. *Giardia intestinalis* es un parásito entérico que causa la enfermedad diarreaica llamada giardiasis. Este parásito sufre cambios morfológicos y bioquímicos que le permiten sobrevivir en condiciones extremas, uno de ellos es el enquistamiento. Se sabe que uno de los factores necesarios para que este proceso ocurra es la falta de colesterol en el medio en el que el parásito se encuentra. Aunque se cree que *Giardia* spp. no puede sintetizar colesterol *de novo*, se ha demostrado la existencia de varios genes que codifican para algunas enzimas que hacen parte de la ruta de síntesis por medio de la cual el parásito podría sintetizar colesterol.

En este trabajo verificamos la existencia y expresión de seis de ellos en el estadio de trofozoíto y en parásitos sometidos al proceso de enquistamiento *in vitro*.

Materiales y métodos. Se realizó un trabajo de bioinformática en el que se analizaron las secuencias de las proteínas codificadas por los genes de las enzimas fosfomevalonato cinasa, prenilttransferasa, isopentenil difosfato isomerasa, farnesil difosfato sintasa y difosfomevalonato decarboxilasa. Se diseñaron iniciadores para amplificar estos genes por PCR sobre ADN de trofozoítos de *Giardia* spp. Los trofozoítos se sometieron al proceso de enquistamiento *in vitro* y se analizaron los mismos genes por medio de un RT-PCR sobre ARN de parásitos que formaron quistes en diferentes períodos.

Resultados. Por medio de las técnicas de PCR y RT-PCR se encontró que los genes de las enzimas fosfomevalonato cinasa, preniltransferasa, isopentenil difosfato isomerasa, farnesil difosfato sintasa y difosfomevalonato decarboxilasa se encuentran presentes en el genoma del parásito y que sus mensajeros se expresan en los trofozoítos de *Giardia* spp. y durante el proceso de enquistamiento.

Conclusiones. Estos resultados sugieren que el parásito tiene las herramientas moleculares para llevar a cabo la síntesis de farnesil difosfato, molécula precursora de esteroides, dolicoles, proteínas “preniladas” y ubiquinona.

• • •

Expresión de la calmodulina durante la diferenciación de *Giardia intestinalis* e identificación de proteínas de unión a calmodulina

Magda E. Alvarado, Moisés Wasserman
Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica,
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C.,
Colombia

Introducción. Los mecanismos que controlan los procesos de diferenciación (el paso de la forma infectiva a la de replicación, y viceversa) de *Giardia intestinalis* se desconocen en gran medida. En las células eucariontes, la proteína calmodulina regula importantes hechos entre los que se pueden mencionar la diferenciación, movilidad y metabolismo de segundos mensajeros, entre otros.

El objetivo de este trabajo fue determinar si había cambios en la expresión y localización de la calmodulina durante la diferenciación de *G. intestinalis* e identificar algunos de sus blancos que se desconocen por completo en este parásito.

Materiales y métodos. Para obtener células del ciclo de vida completo se realizaron experimentos de desenquistamiento y enquistamiento. Se expresó el gen de la calmodulina como una proteína recombinante que se utilizó para desarrollar un anticuerpo específico. Se evaluó la expresión de la calmodulina endógena por Western blot y la localización celular por inmunofluorescencia. La proteína recombinante permitió aislar proteínas de unión a la calmodulina en experimentos de *pull down*. Estas proteínas fueron identificadas por espectrometría de masas.

Resultados. Los experimentos de Western blot indican que la calmodulina se expresa de forma constitutiva durante la diferenciación del parásito y la inmunofluorescencia muestra que, posiblemente, está involucrada en la movilidad del parásito. En

ensayos de *pull down* aislamos proteínas que se unen específicamente a la calmodulina de una forma dependiente de calcio. Tres de ellas fueron identificadas son GASP180, alfa-tubulina y la piruvato fosfato dicinasa; las dos primeras son proteínas del citoesqueleto y la última es una enzima de la glucólisis.

Conclusiones. Este es el primer reporte sobre proteínas de unión a la calmodulina en *G. intestinalis* que es considerado un modelo de diferenciación muy interesante, y que indica que la calmodulina está implicada en dos procesos vitales, la movilidad y el metabolismo energético.

• • •

La inmunización con baculovirus recombinantes administrados por mucosa confiere protección contra la amibiasis hepática en el hámster.

D. M. Meneses-Ruiz¹, H. Aguilar-Díaz¹, A. Luz-Madrigal², J. Hernández-Ruiz³, M. Nequiz³, L. Vaca², J. P. Laclette¹, J. C. Carrero¹

¹ Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

² Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

³ Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

Introducción. *Entamoeba histolytica* es el parásito causante de disentería y absceso hepático amebiano en humanos y ocasiona a nivel mundial de 40 a 100 mil muertes anualmente. Los reportes previos demuestran que una respuesta inmune contra LC3 (un fragmento de la lectina de *E. histolytica* de adherencia a las mucosas) es capaz de conferir protección ante el reto de amebiasis experimental. Por otra parte, se ha propuesto recientemente al baculovirus AcNPV como un novedoso vector para vacunas.

El objetivo de este trabajo fue determinar el grado de protección conferida por la inmunización en mucosa con baculovirus recombinantes en el modelo experimental de absceso hepático amebiano.

Materiales y métodos. Se obtuvieron baculovirus recombinantes AcNPV-LC3 clonando el gen de LC3 bajo el control del promotor CMV en el vector BacBlueCMV y por recombinación homóloga con ADN de AcNPV en células de insecto. Se caracterizaron por PCR, secuenciación y Western

blot. Se inmunizaron hámsteres por vía oral y nasal con 1×10^8 partículas virales de AcNPV-LC3 y AcNPV-WT; se retaron con 1×10^6 trofozoítos de *E. histolytica* en la vena porta y se evaluó la protección a los 7 días. Se determinó la respuesta inmunitaria específica de antígenos mediante ELISA y proliferación celular. La estadística para evaluar protección y la respuesta inmune se realizó utilizando pruebas de Fisher y ANOVA, respectivamente. Los parámetros bioquímicos se evaluaron en suero para determinar el grado de afección hepática.

Resultados. Los datos de tres experimentos indicaron que la inmunización oral con AcNPV-LC3 confirió protección estéril con respecto a su control ($p < 0,05$) y que la respuesta inmune asociada a ésta, está dada por una respuesta humoral y celular específica de antígenos. Las pruebas de función hepática mostraron correlación con el daño observado en animales sin protección.

Conclusiones. La inmunización de hámsteres con AcNPV-LC3 es capaz de despertar una respuesta humoral y celular específica de antígeno, que confiere protección ante el reto en absceso hepático amebiano.

• • •

Estandarización de la técnica de PCR-RFLP para la identificación de subtipos de *Blastocystis* spp. a partir de aislamientos humanos

Gloria D. Muñoz, Diana C. Bucurú, Raúl E. Rivera, Fabiana M. Lora, Jorge E. Gómez-Marín
Grupo de Estudio en Parasitología Molecular, Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia

Introducción. *Blastocystis* spp. es un parásito intestinal que posee una alta prevalencia y es causante de una parasitosis intestinal inespecífica pero poco se conoce sobre su papel como patógeno primario y se ha sugerido una relación entre los subtipos con los síntomas presentados por pacientes.

El objetivo de este trabajo fue estandarizar la técnica de PCR-RFLP para la identificación de subtipos de *Blastocystis* spp. de aislamientos humanos.

Metodología. Una muestra fecal de un paciente con diarrea que fue positivo para *Blastocystis* spp. en el examen coprológico, se cultivó en 10 % de suero equino, 0,05 % L-asparagina y solución de lactato de Ringer, a 37 °C con 5 % de CO₂; posteriormente, se utilizaron tres protocolos de extracción de ADN, uno enzimático, DNAzol y el Wizard Genomic. Se

realizó una PCR utilizando los cebadores RD3(5'-GGGATCCTGATCCTTCCGCAGGTTACCTAC-3') y RD5(5'-GGAAGCTTATCTGGTTGATCCTGCCAGTA-3') para la amplificación del gen 18s de la subunidad de ARN ribosómica de *Blastocystis* spp. La identificación de los subtipos se hizo mediante RFLP utilizando dos enzimas de restricción, RsaI y Sau3A, según los subtipos establecidos por Clark en 1997.

Resultados. Se logró el cultivo de *Blastocystis* spp. en el cual se observaron formas vacuolares, del cual se realizó la extracción del ADN. Posteriormente, por PCR se obtuvo un amplificado de 1.800 pb y, según los patrones generados por el corte con las enzimas RsaI y Sau3AI, concuerdan con el subtipo 1 según lo propuesto por Clark en 1997.

Conclusiones. Se logró establecer para la línea de investigación en parásitos intestinales un cultivo de *Blastocystis* spp., subtipo I, y las condiciones para la identificación de los demás subtipos del parásito que permitirán el desarrollo de investigaciones futuras.

• • •

Utilidad de la PCR frente a los métodos parasitológicos convencionales en el diagnóstico de la infección por *Blastocystis* spp.

M. V. Domínguez¹, M. T. Gómez-Muñoz², R. Borrás³

¹ Servicio de Microbiología, Hospital General, Castellón, España

² Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Madrid, España

³ Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina y Hospital Clínico Universitario, Valencia, España

Introducción. *Blastocystis* spp. son organismos, incluidos en el reino Chromista, parásitos intestinales del hombre y de varios animales, tanto homeotermos como poiquilotermos. *Blastocystis* spp. incluye 13 subtipos genéticos, nueve de ellos encontrados en humanos y animales. Es el organismo más frecuentemente observado en las heces humanas y su relevancia clínica, motivo de controversia. Aunque, los estudios recientes señalan el probable poder patógeno para el hombre de los subtipos 1, 4 y 7, el diagnóstico de la blastocistosis se basa en la observación microscópica de preparaciones fecales en fresco o de frotis teñidos. Sin embargo, existen publicaciones que describen una mayor sensibilidad y especificidad de otros procedimientos, como las técnicas de amplificación genómica (PCR).

El objetivo de este estudio fue valorar la eficacia diagnóstica de la PCR frente a la observación microscópica.

Material y métodos. Con las heces de 395 cerdos, diluidas con PBS (1:4 p/v) y filtradas a través de dos gasas, se prepararon alícuotas que se conservaron con SAF o se congelaron para estudio microscópico tras concentración con éter etílico y PCR, respectivamente. El ADN genómico extraído (QiAmp1®, *DNA Stool Mini Kit*; QIAGEN, Valencia, CA) fue amplificado con los iniciadores R1 y F1.

Resultados. La microscopía fue positiva en 41 % de los casos frente a la PCR que lo fue en 44,6 % (amplicón de 1.050 pb). La prevalencia global fue de 184 casos (46,6 %), de los cuales 22 (12 %) y 8 (4,3 %) fueron exclusivamente diagnosticados por PCR y microscopía, respectivamente. El análisis estadístico demuestra una buena concordancia (92,4 %) y una fuerte correlación ($\kappa=0,845$) entre ambos métodos. Aunque, la PCR según los coeficientes de probabilidad, es más eficaz para confirmar la ausencia de infección.

Conclusiones. La concordancia entre ambos procedimientos y la ausencia de métodos moleculares normalizados, aconsejan el mantenimiento de la microscopía como método diagnóstico de elección.

• • •

Inducción y transducción en el enquistamiento de *Giardia duodenalis*: del estímulo a la expresión génica temprana

Raúl Argüello-García, Aurora Cleotilde Cervantes-Tovar, María Luisa Bazán-Tejeda, Guadalupe Ortega-Pierres
Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F., México

Introducción. La transformación trofozoíto-quiste (enquistamiento) es una respuesta del protozoario *Giardia duodenalis* modulada por colesterol y sales biliares miceliarias extracelulares. Su fase inductiva comprende desde la transducción del estímulo, mediada por cascadas de señalización implicando probablemente las cinasas ERK, hasta la expresión de genes como las proteínas de pared quística (CWP1-3).

En este trabajo se propuso determinar la duración de esta fase inductiva y si la ruta de señalización intracelular involucraba la cinasa C de proteínas (gPKC β) y enzimas tipo MAP cinasas, como Raf y MEK, posiblemente acopladas a ERK.

Materiales y métodos. El enquistamiento de *G. duodenalis* se indujo por varios períodos en medio TYI-S-33 que contenía bilis bovina (5

mg/ml) a pH 7,8 en ausencia o en presencia de inhibidores específicos para gPKC β (hispidina), MEK (PD920548) y Raf (GW50), entre otros. La expresión de ARNm de los genes *cwp1* (prueba) y ubicuitina (control constitutivo) se analizó por RT-PCR. La citolocalización de la gPKC β , la fosforilación de ERK1-2 y la probable interacción entre estas dos cinasas se evaluó mediante inmunofluorescencia, Western blot y coimmunoprecipitación, respectivamente.

Resultados. El aumento de la expresión de ARNm del gene *cwp1* fue significativa a partir de los 20 minutos posteriores a la inducción del enquistamiento, período en el que también la gPKC β presentó translocación del citosol a la membrana plasmática y ésta se revirtió hacia las 2 horas, tiempo que concordó con la desfosforilación progresiva de ERK1 y no de ERK2. Los inhibidores de gPKC β , Raf y MEK inhibieron de forma significativa y dependiente de la dosis el enquistamiento del parásito. En estos períodos también se observó la coprecipitación con gPKC β de una molécula con PM similar a ERK1.

Conclusiones. La transducción del estímulo inductor del enquistamiento de *G. duodenalis* se efectúa en un tiempo relativamente corto, involucrando, posiblemente, un eje de señalización gPKC β -Raf1-MEK1-ERK1 que permite el aumento de la expresión de las proteínas de pared quística.

• • •

Mecanismos adaptativos y efectores en la resistencia a albendazol *in vitro* en *Giardia duodenalis*

Raúl Argüello-García¹, Luz María Teresita Paz-Maldonado¹, Claudia Cervantes¹, Maricela Cruz-Soto¹, Guillermo Mendoza², Guadalupe Ortega-Pierres¹

¹ Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F., México

² Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

Introducción. El albendazol es frecuentemente prescrito contra la giardiasis aunque en campañas de desparasitación su administración es subóptima. Así, la resistencia al albendazol es un problema creciente cuyas bases moleculares son desconocidas. Este fármaco se une a la β -tubulina y puede afectar el manejo de la glucosa por el parásito.

En este trabajo se analizaron clones de *G. duodenalis* resistentes a 1,35, 8 y 250 μ M de

albendazol para determinar si la resistencia implicaba una adaptación en la utilización de la glucosa, producción de ATP y capacidad de adhesión, así como participación de mutaciones en la β -tubulina o metabolización diferencial del albendazol al sulfóxido (ABzSO) y sulfona (AbzSOO) y los mecanismos efectores asociados.

Materiales y métodos. Se secuenció el gen β -tubulina de cultivos sensibles y resistentes al albendazol. La metabolización del fármaco se determinó por cromatografía de líquidos (HPLC). Mediante análisis proteómicos se identificaron moléculas diferencialmente expresadas entre los cultivos, con análisis de expresión de los ARNm correspondientes por RT-PCR. Se comparó la capacidad de crecimiento y de adhesión a células epiteliales *in vitro* con glucosa o sin ella, así como la producción de ATP por luminometría.

Resultados. El gen β -tubulina presentó secuencias similares en cultivos sensibles y resistentes al albendazol; pero la acumulación de AbzSO y AbzSOO fue menor en las clonas resistentes. Se identificaron enzimas antioxidantes (NADH oxidasa, tiorredoxina peroxidasa y flavodiferroproteína) que fueron expresadas en exceso en las clonas resistentes, las mismas que mostraron mayores niveles de tioles intracelulares. La producción de ATP y la capacidad de adhesión fue menor en las clonas resistentes, aunque la necesidad de glucosa en el crecimiento fue similar.

Conclusiones. La resistencia al albendazol en *G. duodenalis* presenta como mecanismos adaptativos una menor eficiencia energética asociada a una menor capacidad de adhesión, y como mecanismo efector, una respuesta antioxidante generalizada ante el estrés por oxidación generado por el albendazol.

• • •

Caracterización molecular y genotipificación de cepas de *Trypanosoma rangeli* aisladas de los vectores *Rhodnius pallescens*, *Rhodnius colombiensis* y *Rhodnius ecuadoriensis* y los reservorios *Tylomys mirae* y *Bradypus variegatus*

Simón L. Gamboa¹, Daniel A. Urrea¹, Gustavo A. Vallejo¹, Marta M. Teixeira², Julio C. Carranza¹

¹ Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia

² Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Introducción. Los marcadores moleculares mitocondriales (kDNA) y nucleares (SSUrDNA) han indicado una amplia variabilidad genética

en los aislamientos de *Trypanosoma rangeli*, sugiriendo su segregación en dos subpoblaciones [KP1(+)] y [KP1(-)] o en cinco linajes (TrA-TrE), respectivamente.

Es importante establecer la paridad entre ambos marcadores para definir la estructura de la población del parásito y su relación con los insectos vectores; no obstante, los perfiles moleculares de SSUrDNA de aislamientos de *T. rangeli* provenientes de *Rhodnius colombiensis* y *R. ecuadoriensis* son desconocidos. Además, se encontraron nuevos aislamientos del parásito en los huéspedes silvestres *Tylomys mirae* y *Bradypus variegatus* originarios del Pacífico colombiano, siendo epidemiológicamente importante caracterizar estas cepas de acuerdo con ambos marcadores moleculares.

Materiales y métodos. Se obtuvieron aislamientos de *T. rangeli* de *R. colombiensis*, *R. ecuadoriensis*, *B. variegatus* y *T. mirae* naturalmente infectados. Las cepas se mantuvieron en medio bifásico NNN/LIT-SFB y se caracterizaron posteriormente con los iniciadores S35/S36/KP1L. La definición de los linajes se hizo mediante PCR-RFLP de la región V7-V8 del SSUrDNA y análisis filogenéticos utilizando el espaciador intergénico del gen miniexón.

Resultados. Se analizaron 25 aislamientos de vectores y reservorios silvestres en este estudio. La caracterización molecular reveló que todos ellos correspondían a la subpoblación KP1(-) y al linaje TrC de *T. rangeli*. Los análisis filogenéticos usando el gen miniexón también sustentaron estos resultados.

Conclusiones. *Trypanosoma rangeli* del linaje TrC había sido reportado únicamente en *R. pallescens* y en humanos. Los resultados de este trabajo confirman su presencia en otros vectores y reservorios silvestres. También corroboran la homogeneidad genética entre los aislamientos de *R. pallescens*, *R. colombiensis* y *R. ecuadoriensis*, los cuales parecen pertenecer a una misma línea evolutiva de vectores (linaje transandino). Además, es posible sugerir la presencia de *R. pallescens* o *R. colombiensis* como vectores naturales de la región donde fueron encontrados los huéspedes silvestres analizados en este estudio.

• • •

Genotipificación de *Giardia duodenalis* mediante PCR-RFLP a partir de quistes obtenidos de humanos y perros de Ibagué, Tolima

Victoria Rodríguez^{1,2}, Oneida Espinosa¹, Julio Cesar Carranza¹, Sofía Duque³, Adriana Arévalo³, Gustavo Adolfo Vallejo¹

¹ Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia

² Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia

³ Laboratorio de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. *Giardia duodenalis* es el agente etiológico de la giardiasis, enfermedad diarreica que afecta humanos y un amplio rango de mamíferos; esta especie presenta una alta diversidad genética por lo que ha sido dividida en siete genotipos (A-G), de los cuales, A y B han sido detectados en humanos y otros animales, mientras que los genotipos C a G presentan mayor especificidad de huésped.

En este estudio genotificamos quistes de *G. duodenalis* obtenidos de muestras fecales de humanos y perros de Ibagué mediante PCR-RFLP de los genes de β -giardina y glutamato deshidrogenasa (GDH) con el fin de dilucidar el papel zoonótico de algunos genotipos en los ciclos de transmisión de este protozoario.

Materiales y métodos. Las muestras fueron sometidas a análisis coproparasitológico; las

positivas para *G. duodenalis* fueron sometidas a concentración de quistes por el método de flotación de Faust, extracción de ácidos nucleicos y PCR-RFLP utilizando iniciadores específicos para la amplificación de los genes de β -giardina y GDH. El control positivo fue la cepa MHOM/CO/04/G40 cedida por el Instituto Nacional de Salud.

Resultados. Se determinó la prevalencia de *G. duodenalis* en los humanos (11,78 %), así como en los perros (14,28 %). Se genotipificaron 23 muestras de origen humano, de las cuales, 11 (47,82 %) correspondieron con el genotipo A, subgrupo A2/A3, y 12 (52,17 %) con el genotipo B, subgrupos BIII, BIV y mezclas BIII-BIV. Se genotipificaron cuatro muestras de perros y se encontraron los genotipos C (50 %) y D (50 %).

Conclusiones. Según los genotipos de *G. duodenalis* encontrados en las muestras analizadas, no se evidenció interacción entre los ciclos de transmisión del humano y del perro, lo que permite establecer que los huéspedes estudiados no presentaron infecciones zoonóticas durante el tiempo de estudio.

• • •