

GIARDIA Y GIARDIASIS

HUGO D. LUJAN

Instituto de Investigaciones Médicas Mercedes y Martín Ferreyra
(INIMEC-CONICET), Córdoba

Resumen *Giardia lamblia* es un protozooario parásito que habita el intestino delgado de los seres humanos y de muchos otros vertebrados y es una de las más comunes causas de diarrea en todo el mundo. Durante su ciclo de vida *Giardia* sufre significativos cambios bioquímicos y morfológicos que le permiten sobrevivir en ambientes y condiciones que de otro modo lo destruirían. Para sobrevivir fuera del intestino del hospedador, los trofozoítos de *Giardia* se diferencian a quistes, los que se caracterizan por poseer una rígida pared glicoproteica externa que les permiten sobrevivir inclusive frente a la acción de los desinfectantes más comunes. Otro de los mecanismos de adaptación de este parásito es la variación de los antígenos de superficie que le permite a los trofozoítos evadir la respuesta inmune del huésped y generar infecciones tanto agudas como crónicas o recurrentes en individuos infectados. Durante los últimos años se han producido importantes avances en el conocimiento de las bases moleculares de los procesos de enquistamiento y variación antigénica en *Giardia* que pronostican el pronto hallazgo de nuevos agentes quimioterapéuticos y/o inmunoprolifácticos contra este importante parásito intestinal.

Palabras clave: giardiasis, diarrea, quistes, parásito, diferenciación celular

Abstract *Giardia and giardiasis* *Giardia lamblia* is a protozoan parasite that inhabits the upper small intestine of humans and several other vertebrates and one of the most frequent cause of intestinal disease worldwide. During its life cycle, *G. lamblia* undergoes significant biochemical and morphological changes that allow the parasite to survive under hostile environmental conditions. To survive outside the host's intestine, *Giardia* differentiates into resistant cysts, which are characterized by a rigid extracellular cyst wall that protect the parasite even to the action of the most common chemical disinfectants. Another adaptive mechanism of *Giardia* is the switching of its surface antigens, a mechanism that allows the trophozoites to evade the host's immune responses and produce acute, chronic and/or recurrent infections. During the last years, important advances in the knowledge of the molecular basis underlying the mechanisms of encystation and antigenic variation in *Giardia* suggest that novel chemotherapeutic and/or immunoprophylactic reagents against this important human pathogen could soon be available.

Key words: giardiasis, diarrhea, cysts, parasite, cellular differentiation

Una particular característica de los organismos parásitos es su gran capacidad de adaptación a cambios del medio ambiente. La mayoría de los parásitos, ya sean unicelulares como los protozoarios o multicelulares como los helmintos, ocupan diferentes nichos durante su travesía por vectores y hospedadores, por lo que han desarrollado extraordinarios mecanismos de adaptación que les permiten sobrevivir en condiciones ambientales que de otro modo los destruirían¹. Durante una infección, la supervivencia de los organismos patógenos depende no sólo de su habilidad para colonizar un individuo sino también de su capacidad para contrarrestar los mecanismos

de defensa que el hospedador genera. Así, la patogenicidad o virulencia de los parásitos refleja la interacción dinámica entre ellos y el hospedador y su capacidad de respuesta a los sistemas defensivos, condición necesaria para la supervivencia parasitaria y el mantenimiento y/o transmisión de la infección².

Con la intención de conocer más acerca de los mecanismos de defensa y adaptación parasitaria que ocurren durante la infección, nuestro equipo de trabajo se encuentra estudiando desde hace varios años los procesos de adaptación celular del parásito *Giardia lamblia* (sin. *G. duodenalis*, *G. intestinalis*).

G. lamblia es un protozooario binucleado y flagelado que habita el intestino delgado de humanos y otros mamíferos y es el agente responsable de la giardiasis, 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 absor-

Recibido: 14-IX-2005

Aceptado: 1-XI-2005

Dirección postal: Dr. Hugo D. Luján, Instituto de Investigaciones Médicas Mercedes y Martín Ferreyra (INIMEC-CONICET), Friuli 2434, Parque Vélaz Sarsfield, 5016 Córdoba, Argentina
e-mail: hlujan@immf.uncor.edu

ción de nutrientes³. La infección con *G. lamblia* es una de las enfermedades parasitarias más comunes en todo el mundo y se inicia por la ingestión de los quistes del parásito, los cuales se desenquistan durante su pasaje por el contenido ácido del estómago, liberando los trofozoítos (Fig. 1). Estos colonizan el intestino delgado superior y se adhieren a la superficie del epitelio intestinal mediante una organela característica llamada disco ventral o de adhesión⁴.

Debido a las diferencias en las condiciones sanitarias, en los países subdesarrollados es mayor la prevalencia que en los países avanzados. No obstante, en estos últimos las infecciones humanas se hallan en turistas, homosexuales y personas en asilos o guarderías. En algunos países pobres, la giardiasis en niños afecta a cerca del 100% de la población. Grandes epidemias han ocurrido por contaminación fecal de alimentos y reservorios de agua, infectando en algunos casos a miles de personas. Este parásito constituye un importante problema de salud pública global⁵⁻⁷, además, en los EE.UU. 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 laboratorio⁸⁻⁹.

Aunque en la Argentina no existen estudios sobre la prevalencia de este parásito, de acuerdo a relevamientos realizados en diferentes partes del país la infección con *Giardia* sería la causa de numerosos casos de diarrea y mala absorción y/o de contaminación fecal de productos para el consumo humano. Más del 50% de los niños argentinos estarían infectados con *G. lamblia*, y sería una causa de desnutrición infantil^{10, 11}. Los animales domésticos y balnearios turísticos son fuentes de transmisión del parásito, y muchas agencias de viajes internacionales indican a *Giardia* como un potencial "peligro" para sus viajeros a la Argentina. Por otro lado, otro factor a considerar es que la infección de animales de producción (especialmente chinchillas y conejos) y domésticos (perros y gatos) produce pérdidas económicas de importancia. Estudios realizados por nuestro laboratorio a pedido de productores de la región identificaron a *Giardia* como el agente causal de numerosos casos de diarrea y pérdida de peso en chinchillas de criaderos para la producción de pieles. Además, la inmensa mayoría de los bioterios del país que mantienen animales para experimentación y que fueron analizados durante los últimos años mantenían ratas, ratones y conejos infectados con *Giardia*.

Hasta el presente, la única posibilidad de controlar la giardiasis es utilizando medicamentos cuyos principios activos no son altamente eficaces, pueden presentar un gran número de efectos secundarios y ya se han registrado cepas de *Giardia* resistentes a los mismos¹². Además, es frecuente la re-infección luego del tratamiento

debido a que estos individuos no generan mecanismos de defensas eficaces para eliminar el parásito.

Además de su importancia médica y veterinaria, *Giardia* es de gran interés en biología puesto que es una de las células eucariotas más primitivas que se conocen¹³. *Giardia* utiliza dos bien conocidos mecanismos de adaptación a los cambios ambientales que confronta durante su ciclo de vida, ya sea para sobrevivir dentro del intestino del huésped como es la variación de sus antígenos de superficie^{4, 14} o, fuera del mismo, la diferenciación de trofozoíto a quiste^{15, 16}.

El mecanismo de adaptación de *Giardia* conocido como enquistamiento es esencial para que el parásito pueda sobrevivir fuera del intestino del hospedador, ya que los trofozoítos son sumamente sensibles a los cambios de temperatura, humedad y a la presencia de agentes químicos⁴. En este proceso, los trofozoítos descienden por el intestino del hospedador, y al encontrar un ambiente pobre en colesterol, se induce su diferenciación a quiste¹⁷, los cuales son eliminados con las heces (Fig. 1). La principal característica de la forma quística es la presencia de una rígida pared glicoproteica externa que protege al parásito en condiciones ambientales muy hostiles, inclusive a la acción de desinfectantes⁴. En los últimos años, utilizando métodos bioquímicos, inmunológicos y de biología molecular, nuestro equipo de trabajo ha identificado el estímulo que inicia el enquistamiento de *Giardia*¹⁷ y caracterizado moléculas cuya expresión es inducida específicamente en este proceso¹⁸⁻²⁰. Además, dilucidamos varios eventos moleculares comprometidos en el transporte, secreción y ensamblado de la pared quística extracelular²¹⁻²⁵. Es importante destacar que a partir de estos estudios sobre la biología, bioquímica y genética del parásito, hemos desarrollado herramientas diagnósticas (anticuerpos monoclonales específicos contra el quiste de *Giardia* y proteínas recombinantes de la pared del quiste) que son utilizados por varias empresas internacionales para la elaboración de equipos diagnósticos de inmunofluorescencia y ELISA.

Por otro lado, para sobrevivir dentro del hospedador y evadir la respuesta inmune, *Giardia* manifiesta lo que se conoce como variación antigénica (Fig. 2). Los trofozoítos se encuentran recubiertos de una determinada proteína de superficie que forma una verdadera interfaz entre el parásito y el medio, y que pertenece a una familia de proteínas denominadas proteínas variables de superficie (*Variant-Specific Surface Protein*, VSPs). *Giardia* contiene en su genoma un repertorio de entre 150 a 200 genes que codifican estas proteínas^{4, 26, 27}, pero solamente una VSP se expresa en la superficie de los trofozoítos en un momento dado¹⁴ (Fig. 2). Estas proteínas, a pesar de ser antigénicamente diferentes entre sí y ser hetero-géneas en lo que respecta a su tamaño molecular, poseen un dominio transmembrana altamente conservado y una porción carboxilo-terminal

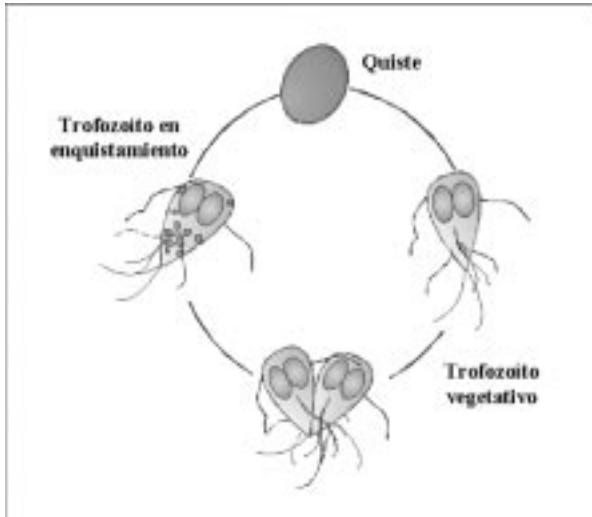


Fig. 1.- Ciclo de vida de *Giardia lamblia*. Esquema representativo del ciclo vital de *Giardia*: La infección se inicia con la ingesta de los quistes, los que desenquistan en el intestino superior liberando los trofozoitos, la forma del parásito que prolifera en el intestino y es responsable de los síntomas de la enfermedad. Al descender por la luz intestinal, algunos trofozoitos comienzan a enquistarse, lo cual se manifiesta por la aparición de gránulos de secreción específicos que transportan los materiales que luego formarán la pared del quiste maduro y que protegen al parásito fuera del intestino del hospedador.

citósica compuesta por sólo cinco aminoácidos (CRGKA)¹⁴. Su región N-terminal es altamente variable (dándole a cada una de estas proteínas la característica de ser antigénicamente diferente), pero todas son ricas en cisteína (~12%), incluyendo una alta incidencia del motivo CXXC (donde X representa cualquier aminoácido). La purificación y análisis de una de estas proteínas, la VSP GS/H7, demostró que la misma no está glicosilada y que une Zn^{2+} y Fe^{2+} por coordinación a los dominios CXXC²⁸. Esa sería la razón de la deficiencia de esos minerales observada en pacientes con giardiasis crónica.

Giardia cambia espontáneamente la expresión de sus VSPs ya sea en cultivo o en respuesta al ataque inmunológico que estos antígenos inducen tanto en humanos como en animales de experimentación¹⁴. La variación antigénica se acompaña de la pérdida del ARNm del gen que codifica para una determinada VSP con la concomitante aparición de los transcritos derivados de la expresión de una nueva VSP^{4, 14}. El mecanismo por el cual los trofozoitos cambian su cubierta de superficie no se conoce, pero se cree que la variación antigénica le permite a *Giardia* evadir la respuesta inmune del hospedador y por ello producir infecciones crónicas y recurrentes.

Desde su descubrimiento hace más de 20 años²⁹, varios investigadores han intentado dilucidar los eventos moleculares involucrados en el mecanismo de variación antigénica de *Giardia*, pero sus esfuerzos han sido

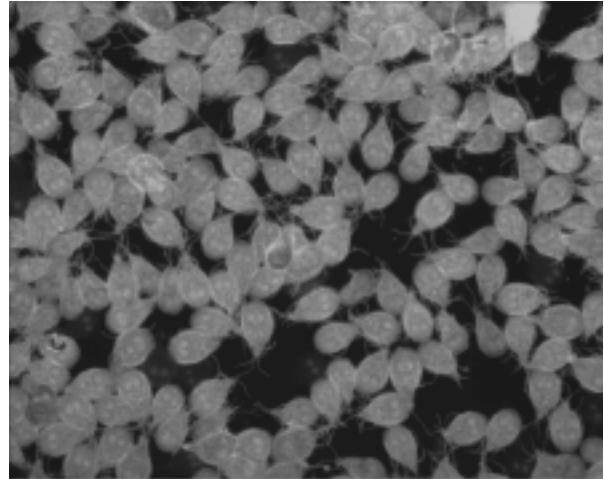


Fig. 2.- Variación antigénica de *Giardia lamblia*. Imagen representativa del proceso de variación antigénica en *Giardia*. Trofozoitos en cultivo fueron marcados para la detección de la proteína variable de superficie 9B10 usando un anticuerpo monoclonal específico y con DAPI para resaltar los núcleos del parásito. En esta población algunos trofozoitos han dejado de expresar la VSP9B10, expresando en su superficie otra VSP no detectada por el anticuerpo anti-VSP9B10.

infructuosos por la carencia de las herramientas necesarias para realizar estos estudios, además de un modelo animal eficiente^{4, 14}. Hasta el presente, la mayoría de los estudios para comprender la variación antigénica en *Giardia* se basaron en la premisa de que el cambio de expresión de los genes que codifican VSP se realizaba en la transcripción⁴; es decir, que regiones o dominios reguladores en estos genes debían contener la información necesaria para su expresión diferencial; sin embargo los genes que codifican VSP tienen gran variabilidad en esas regiones y en muchos casos ellas ni siquiera existen⁴.

Es posible especular que el mecanismo de regulación de la expresión de las VSPs podría ser controlado de manera post-transcripcional. En este sentido, en los últimos años se ha avanzado considerablemente en la comprensión de mecanismos de este tipo de regulación en otras células eucariotas. Se conoce, por estudios realizados en organismos más evolucionados, que copias repetidas u homólogas de genes, ya sea en tándem o dispersos en el genoma, son habitualmente reconocidas por la célula y silenciadas³⁰. Cuando la regulación de la expresión génica es post-transcripcional, se ha observado que la generación de un ARN anti-sentido homólogo a la secuencia a silenciar conduce a la formación de ARN de doble hebra (dsRNA) que es rápidamente degradado por una ARNasa específica llamada Dicer, impidiendo su normal procesamiento y con ello la inhibición de la expresión del gen en cues tión³⁰⁻³³.

La hipótesis de que un mecanismo post-transcripcional regula el proceso de variación antigénica en *Giardia* ha sido confirmada en nuestro laboratorio (Slavin I y col.,

material aún no publicado). En este caso, todas las VSPs son transcritas al mismo tiempo y luego silenciadas. En este escenario debe dilucidarse aún cómo es posible el silenciamiento de todos, excepto uno, de los genes que codifican VSPs de manera que sólo un transcrito maduro del repertorio que se transcribe en el núcleo sea traducido para generar la única VSP que será posteriormente expresada en la superficie del trofozoíto. De nuestros resultados queda claro que el mecanismo por el cual *Giardia* regula la expresión de sus proteínas variables de superficie es similar al ARN de interferencia, y que involucra enzimas tales como ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP), ARN helicasas y Dicer. Al conocer las bases moleculares del proceso de variación antigénica en *Giardia*, es posible extrapolar los resultados al diseño de herramientas que evitan la infección desarrollando una vacuna. Por ejemplo, si logramos inhibir la acción de la RdRP, no habría silenciamiento génico, todos los genes que codifican VSP se traducirían en proteínas y éstas a su vez se expresarían en la superficie del parásito. La utilización de estas VSPs como antígenos en la formulación de una vacuna permitirá al hospedador generar anticuerpos y células reactivas contra todo el repertorio de VSPs, que contrarresten la infección y/o las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Los estudios preliminares realizados por nuestro laboratorio en ese sentido y los promisorios resultados alcanzados en la generación de un modelo experimental murino³⁴ sugieren que generar una vacuna contra *Giardia* es una meta alcanzable en el mediano plazo. Como se describió anteriormente, la giardiasis es una de las infecciones parasitarias más comunes en todo el mundo y si bien la enfermedad asociada a la infección con *Giardia* es muy frecuente, su importancia va más allá de lo estrictamente médico para convertirse en una infección que involucra a sectores productivos tales como la generación de agua potable, el turismo y la cría de animales para consumo o experimentación y la producción agropecuaria. Esperamos que las herramientas y conocimientos derivados de estudios básicos sobre los mecanismos de adaptación de este parásito permitan en el futuro el control, tanto de la diseminación de la enfermedad como de las manifestaciones clínicas que ella genera.

Nota: Hugo D. Luján es Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET e *International Research Scholar* of *Howard Hughes Medical Institute*.

Bibliografía

- Losick R, Shapiro L. Microbial Development. Cold Spring Harbor Laboratory. New York Cold Spring Harbor 1984
- Deitsch KW, Moxon ER, Wellems TE. Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal, and fungal infections. *Microb Mol Biol Rev* 1997; 61: 281-93.
- Thompson RCA. Giardiasis as a re-emerging disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol* 2000; 30: 1259-67.
- Adam R. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 447-75.
- Thompson RCA, Monis PT. Variation in *Giardia*: Implications for taxonomy and epidemiology. *Adv Parasitol* 2004; 58: 69-137.
- Addis D, David P, Roberts JM, Mast E. Epidemiology of Giardiasis in Wisconsin: increasing incidence of reported cases and unexplained season trends. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 47: 13-9.
- Fayer R, Dubey J, Lindsay D. Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends Parasitol* 2004; 20: 531-6.
- Carus S. Bioterrorism and Biocrimes. Working paper. Center for Counter Proliferation Research. Washington DC: National Defense University, 2001.
- Braden JB, Duchin JS. Preparing for and responding to Bioterrorism. Information for the Public Health Workforce. Northwest Center for Public Health Practice. University of Washington, 2002.
- Hunter PR. Waterborne disease. Epidemiology and ecology. Chichester: John Wiley and Sons, 1997.
- Satterthwaite D, Hart R, Levy C, et al. eds. The Environment for children. New York: UNICEF, 1996, p 284.
- Petri W. Therapy of intestinal protozoa. *Trends Parasitol* 2003; 19: 523-6.
- Sogin, ML, Gunderson JH, Elwood HJ, Alonso RA, Peattie DA. Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science* 1989; 243: 75-7.
- Nash TE. Antigenic variation in *Giardia lamblia* and the host's immune response. *Phil Trans R Soc Lond B* 1997; 352: 1369-75.
- Luján HD, Mowatt MR, Nash TE. The mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997; 61: 294-304.
- Luján, H.D, Mowatt MR, Nash TE. The molecular mechanisms of *Giardia* encystation. *Parasitol Today* 1997; 14: 446-50.
- Luján HD, Mowatt MR, Byrd LG, Nash TE. Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 7628-33.
- Mowatt MR, Luján HD, Cotten DB, et al. Developmentally regulated expression of a *Giardia lamblia* cyst wall protein gene. *Mol Microbiol* 1995; 15: 955-63.
- Luján HD, Mowatt MR, Conrad JT, Bowers B, Nash TE. Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich repeats. *J Biol Chem* 1995; 270: 29307-13.
- Touz MC, Gottig N, Nash TE, Lujan, HD. Identification and characterization of a novel secretory granule calcium-binding protein from the early branching eukaryote *Giardia lamblia*. *J Biol Chem* 2002; 277: 50557-63.
- Carranza PG., Feltes G, Ropolo A, Quintana SMC, Touz MC, Lujan HD. Simultaneous expression of different variant-specific surface proteins in single *Giardia lamblia* trophozoites during encystation. *Infect Immunol* 2002; 70: 5265-8.
- Touz MC, Nores MJ, Slavin I, et al. The Activity of an encystation-specific cysteine proteinase is required for cyst wall formation in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *J Biol Chem* 2002; 277: 8474-81.
- Touz MC, Nores MJ, Slavin I, et al. Membrane-associated dipeptidyl-peptidase IV is involved in encystation-specific gene expression during *Giardia* differentiation. *Biochem J* 2002; 364: 703-10.

24. Luján HD, Mowatt MR, Conrad JT, Nash TE. Increased expression of the molecular chaperone BiP/GRP78 during the differentiation of a primitive eukaryote. *Biol Cell* 1996; 86: 11-8.
25. Luján HD, Touz MC. Protein trafficking in *Giardia lamblia*. *Cell Microbiol* 2002; 5: 427-34.
26. Pimenta PFP, Pinto da Silva P, Nash TE. Variant surface antigens of *Giardia lamblia* are associated with the presence of a thick coat. *Infect Immun* 1991; 59: 3989-96.
27. Adam RD. The *Giardia lamblia* genome. *Int J Parasitol* 2000; 30: 475-84.
28. Luján HD, Mowatt MR, Wu J, et al. Purification of a variant-specific surface protein of *Giardia lamblia* and characterization of its metal-binding properties. *J Biol Chem* 1995; 270: 13807-13.
29. Nash T, Gillin FD, Smith PD. Excretory-secretory products of *Giardia lamblia*. *J Immunol* 1983; 4: 2004-10.
30. Cogoni C, Macino G. Homology-dependent gene silencing in plants and fungi: a number of variations of the same theme. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2: 657-62.
31. Faergeron G. Diversity of homology-dependent gene silencing strategies in fungi. *Curr Opin Microbiol* 2000; 3: 141-8.
32. Chicas A, Macino G. Characteristics of post-transcriptional gene silencing. *EMBO Rep* 2001; 2: 992-6.
33. Tang G. siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends Biochem. Sci.* 2005; 30: 106-14.
34. Ropolo A, Saura A, Carranza P, Luján HD. Identification of variant-specific surface proteins in *Giardia muris* trophozoites. *Infect Immunol* 2005; 73: 5208-11.

Versos para una muchacha sin dote

[. . .]

Combinabas tu nombre con otros apellidos
ayer; y en ese juego gozabas y sufrías
quisiste amar la vida con los cinco sentidos
y pasaron tus príncipes en lentos tranvías

César Tiempo (Israel Zeitlin) (1906-1980)

Sabatión argentino - Antiguos y nuevos dones para la pausa del sábado (1933). En: *25 poetas argentinos. 1920-1945*. Presentación y selección por Julio Caillet-Bois e Iride Rossi de Fiori. Buenos Aires: Eudeba, 1964, p 30