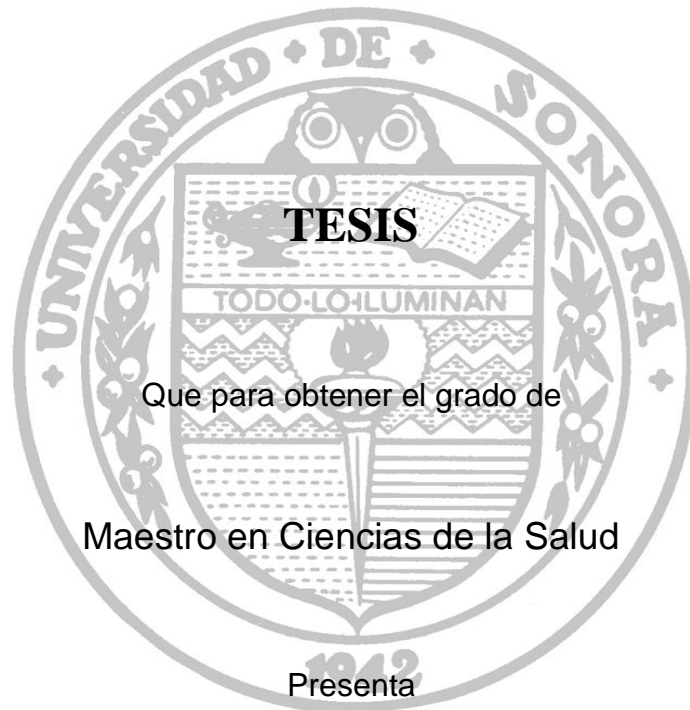


UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Zinc sérico y respuesta inmune en niños infectados con *Giardia lamblia*



TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta

Karen Domínguez Huguez

Hermosillo, Sonora

Julio de 2014

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON




“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”




Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN


Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de **Karen Domínguez Huguez**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias de la Salud.




Dr. Humberto Francisco Astiazarán García
Director



Dra. Adriana Garibay Escobar
Secretario



Dr. Luis Quihui Cota
Sinodal



M.C. María Lucila Rascón Durán
Sinodal

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada que me permitió cursar mis estudios.

A mi director de tesis, el Dr. Humberto Astizarán por permitirme participar en este proyecto, resolver todas mis dudas y por sus acertadas correcciones a este trabajo.

A la Dra. Adriana Garibay Escobar, mi sinodal y coordinadora del Programa de Maestría en Ciencias de la Salud, por apoyarme y motivarme a terminar este trabajo.

Al Dr. Luis Quihui Cota, por sus importantes aportaciones y por permitirme trabajar en el Laboratorio de Nutrición e Infección del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C

A la M.C. María Lucila Rascón Durán, por su valiosa ayuda en la realización de los inmunoensayos y por su ayuda durante la revisión de este escrito.

Al Dr. Martín Jara y al Q.B.C. Javier Yañez Baca, por la ayuda brindada en las determinaciones de zinc sérico.

A la Dra. Olivia Valenzuela Antelo, por su valiosa ayuda con el análisis estadístico.

A la M.C. Judith Valdez Ortega y a la M.C. Adriana Santeliz por compartir sus conocimientos y por su ayuda durante el procesamiento de muestras en el Laboratorio de Investigación del Cuerpo Académico de Biología y Bioquímica de la Universidad de Sonora (CABB)

Al M.C. Rogelio Ramos, por permitirme trabajar en el Laboratorio de Análisis Clínicos de la Universidad de Sonora (LACIUS).

Al Q.B.C. Nicolás Arcos Juárez y a mi prima Anel Jiménez, por haber sido mis compañeros en el trabajo de campo durante la primera etapa del proyecto.

A mis compañeros del Laboratorio de Patología Experimental del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., por resolver mis dudas mientras trabajamos juntos, en especial a la Q.B. Bertha Pacheco y a la M.C. Bianca Vargas por su ayuda durante los muestreos.

A mis compañeros del Laboratorio de Inmunología y Biología Celular de la Universidad de Sonora, en especial al Q.B.C. Samuel Alday, a la Q.B.C. Alejandra Valdez y a la M.C. Gloria Carolina López, por su ayuda con los cultivos de *G. lamblia*.

Un enorme agradecimiento a todos los padres de familia y niños que participaron en el proyecto, sin ustedes esto no hubiera sido posible.

A mi familia y amigos, gracias por su apoyo incondicional y por animarme a cerrar este ciclo.

DEDICATORIA

A DIOS, por permitirme culminar una etapa más de mi vida, la cual sin duda, ha sido una de las que más esfuerzo me ha costado. Le agradezco haber puesto en mi camino los medios y las personas necesarias para poder lograrlo.

A mis PADRES, HERMANOS, SOBRINAS y NANA, ustedes lo gozaron y sufrieron conmigo, gracias por su apoyo incondicional, en especial a mi MAMÁ, gracias por tu amor y comprensión a lo largo de mis estudios... ¡por fin terminamos la maestría!

También dedico este trabajo a mis TÍOS Javier y Gloria, por su apoyo en mi formación profesional y a mi otra familia: LOS PÉREZ, gracias por su cariño y por siempre estar dispuestos a ayudarme.

A mi mejor amigo y ahora esposo...CÉSAR, gracias por estar conmigo en las alegrías y las penas, gracias por todos estos años juntos, por tu amor y por motivarme a superarme profesionalmente.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
OBJETIVOS.....	vi
RESUMEN.....	vii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	2
Giardiasis.....	2
Epidemiología.....	3
Patogenia.....	5
Giardiasis y Deficiencia de Zinc.....	6
Deficiencia de Zinc: Problemática Epidemiológica.....	8
Implicaciones Biológicas del Zinc.....	9
Deficiencia de Zinc y Sistema Inmunológico.....	10
Giardiasis, Deficiencia de Zinc y Respuesta Inmune.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
Ética.....	13
Población y Diseño de Estudio.....	13
Criterios de Inclusión.....	13
Criterios de Exclusión.....	13

Criterios de Eliminación.....	14
Recolección y Procesamiento de Muestras Biológicas.....	14
Recolección de Muestras Fecales.....	14
Obtención de Muestras de Sangre Venosa.....	14
Análisis Coproparasitológico.....	15
Citometría Hemática.....	15
Relación CD4/CD8.....	15
Determinación de Zinc Sérico.....	16
Título de Anticuerpos IgG Anti- <i>Giardia lamblia</i>	16
Evaluación Antropométrica.....	17
Peso y Talla.....	17
Evaluación Dietaria.....	17
Análisis Estadístico.....	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
Evaluación Antropométrica.....	19
<i>Giardia lamblia</i> y Zinc Sérico.....	21
Evaluación Dietaria.....	23
Zinc Sérico y Respuesta Inmune Contra <i>Giardia lamblia</i>	27
CONCLUSIONES.....	38
BIBLIOGRAFÍA.....	39
APÉNDICES.....	47
Apéndice 1.....	47

Apéndice 2.....	49
Apéndice 3.....	50
Apéndice 4.....	52
Apéndice 5.....	54

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Características antropométricas de la población.....	20
II	Ingesta promedio de zinc en niños sin y con <i>Giardia lamblia</i>	24
III	Comparación de título de anticuerpos IgG anti- <i>Giardia</i>	29
IV	Comparación de subpoblaciones linfocitarias.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i>	4
2	Comparación de medianas para concentración de zinc sérico....	22
3	Comparación de medianas para el consumo de zinc.....	25
4	Distribución de los coeficientes de adecuación de consumo de zinc.....	26
5	Comparación de medianas para el título de anticuerpos IgG anti- <i>Giardia</i>	30
6	Comparación de medianas para el porcentaje de linfocitos CD3.....	31
7	Comparación de medianas para el porcentaje de linfocitos CD4.....	32
8	Comparación de medianas para el porcentaje de linfocitos CD8.....	33
9	Comparación de medianas para la relación linfocitaria CD4/CD8.....	34

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la concentración de zinc sérico y respuesta inmune en niños infectados con *Giardia lamblia*.

Objetivos Particulares

- 1.- Identificar los grupos de estudio de niños con base en la presencia de *Giardia lamblia*.
- 2.- Realizar el análisis antropométrico de los voluntarios.
- 3.- Determinar los niveles de zinc en muestras séricas de los niños.
- 4.- Evaluar la ingesta dietaria de zinc.
- 5.- Cuantificar la relación linfocitaria CD4/CD8 y la concentración de IgG sérica específica.
- 6.- Explorar el efecto de la disminución de zinc sérico sobre los niveles de anticuerpos IgG anti-*Giardia* y la relación linfocitaria CD4/CD8.

RESUMEN

Giardia lamblia (*G. lamblia*) es un microorganismo unicelular flagelado que infecta a miles de personas en todo el mundo, causando una enfermedad conocida como giardiasis. La giardiasis es causa común de diarrea, la cual generalmente conlleva a una malabsorción de nutrientes. Estudios previos han asociado la infección por *G. lamblia* con niveles disminuidos de zinc sérico. Por otra parte, el zinc es un nutrimento indispensable para el organismo de los humanos y tiene un papel esencial para el sistema inmunológico.

Con la finalidad de evaluar el sinergismo entre giardiasis, disminución de zinc sérico y respuesta inmune, se realizó un estudio transversal analítico en el cual se incluyeron a 83 niños, el 60.2% fueron niñas y el 39.8% fueron niños. Según el resultado de su examen coproparasitológico seriado (3 muestras diferentes de heces) se clasificaron en dos grupos: *Giardia lamblia* positivo (n=23) y *Giardia lamblia* negativo (n=60). Ambos grupos fueron evaluados antropométricamente, se midió la concentración de zinc sérico por espectrofotometría de absorción atómica y se evaluó la ingesta diaria de zinc a través de recordatorios de 24 horas. Como parámetro para evaluar la respuesta humoral en contra del parásito se utilizó el título de anticuerpos IgG anti-*Giardia*, realizado a través de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) indirecto. Por otra parte, la evaluación de la respuesta celular se realizó a través de la relación linfocitaria CD4/CD8 realizada por citometría de flujo. Los resultados fueron analizados con ayuda del paquete estadístico SPSS versión 2008. Se utilizó la prueba *t* de student para comparar variables con distribución normal y la prueba no paramétrica *U* de Mann Whitney para comparar variables sin distribución normal.

En el presente trabajo, se observó que la infección por *Giardia lamblia* se asocia con una disminución significativa en la concentración de zinc sérico en niños, sin embargo, la disminución observada no se consideró deficiencia de zinc. A través del

estudio antropométrico se observó que la presencia de *Giardia lamblia*, asociada a niveles disminuidos de zinc sérico afecta negativamente el peso y talla de los niños. A través de los recordatorios de 24 horas, se observó que el consumo promedio de zinc, se encuentra por debajo del índice diario recomendado. No se observó diferencia en la ingesta diaria promedio de zinc entre ambos grupos, lo cual sugiere que la disminución de zinc sérico es debida a la presencia de *Giardia lamblia*. Los resultados obtenidos no reflejan de manera clara el efecto de la disminución de zinc, causada por giardiasis, sobre la producción de anticuerpos anti-*Giardia* IgG. Tampoco se observó un efecto negativo en las subpoblaciones de linfocitos CD4 y CD8.

INTRODUCCIÓN

Giardia lamblia (*G. lamblia*) es un organismo unicelular que infecta el intestino delgado de los seres humanos y de algunos otros mamíferos. La giardiasis, constituye una parasitosis de gran importancia epidemiológica y clínica por su alta prevalencia y patogenicidad. A nivel mundial, se estima que 200 millones de personas están infectadas (Adam, R. 2001). En México, afecta aproximadamente a 9 millones de personas y se considera que la población infantil es la más vulnerable (Boletín Nacional de Epidemiología 2008). *G. lamblia* presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas que van desde una infección asintomática hasta diarrea aguda o crónica con síndrome de mala absorción y pérdida de peso (Eckmann, 2003).

Estudios previos han demostrado que la infección por *G. lamblia* afecta el estado de algunos micronutrientes como el zinc. Siendo el zinc un nutrimento indispensable para el organismo de los humanos, se ha demostrado que su deficiencia produce retardo en el crecimiento, cambios neuro-sensoriales, deterioro de la función cognitiva y función inmune (Schlesinger y col., 1992).

Considerando que la infección por *Giardia* es un problema de salud pública (Gülnaz y Mustafa, 2007), y que su presencia en niños produce un efecto negativo sobre las concentraciones plasmáticas de zinc (Jendryczko y col., 1993; Scrimshaw y col., 1997; Pelin, 2002; Abou-Shady y col., 2010; Quihui y col., 2010); se postula que bajo estas circunstancias la respuesta inmune, pudiera condicionarse de manera negativa. Por lo anterior, en este trabajo se explora el efecto de la disminución de zinc sérico producida por *G.lamblia* en la concentración de anticuerpos de isotipo IgG anti-*Giardia* y la relación linfocitaria CD4/CD8.

ANTECEDENTES

Giardiasis

La giardiasis, es una infección parasitaria de distribución geográfica cosmopolita causada por *G. lamblia* (también llamada *G. intestinales* y *G. duodenalis*), un organismo unicelular que infecta el intestino delgado de los seres humanos y otros hospederos mamíferos (Adam, 2001).

El espectro clínico de la infección oscila desde casos asintomáticos hasta casos con diarrea severa y persistente, asociada con frecuencia a mala absorción. La forma aguda se caracteriza por tener un inicio brusco con diarreas. Es frecuente la aparición de náuseas, vómitos y distensión abdominal, así como dolor en región epigástrica (Flanagan, 1992). La giardiasis aguda suele ser autolimitada en un periodo de 2 a 7 días. Sin embargo, puede prolongarse y desarrollar cuadros crónicos que se caracterizan por períodos diarreicos que alternan con periodos en que las deposiciones son aparentemente normales. Como se menciona líneas arriba, en algunos pacientes la infección cursa con malabsorción y las consecuencias clínicas que de ella se derivan (Goldsmith, 2000).

Este parásito tiene dos etapas de desarrollo estructural y bioquímicamente diferentes: el trofozoíto; móvil y flagelado quien es responsable de las manifestaciones clínicas de la infección, y la forma quística; el estado infectante del microorganismo, en el cual, el trofozoíto es cubierto por una pared rígida que permite al parásito sobrevivir fuera del intestino del hospedero (Carranza y Luján, 2010). Generalmente, la infección por *G. lamblia* ocurre, por la ingestión de la forma quística del parásito a través de agua, alimentos contaminados, por contacto directo fecal-oral entre personas o a través de fomites contaminados. Una vez que el parásito llega al estómago se inicia el desenquistamiento mediante el estímulo inducido por el pH ácido y concluye principalmente en la parte alta del intestino delgado. Una vez que emerge la forma de

trofozoíto, éste es capaz de colonizar el intestino (Figura 1). Después de la exposición al líquido biliar o falta de nutrientes como el colesterol, algunos trofozoítos se enquistan en el yeyuno y pasan a las heces, lo que permite que se cierre el ciclo al infectar a un nuevo hospedero (Adam, 2001).

Epidemiología

G. lamblia es el protozooario que con mayor frecuencia se encuentra en exámenes coproparasitológicos. A nivel mundial se ha estimado una frecuencia de 200'000,000 de individuos infectados, de los cuales 500,000 sufren enfermedad (Vázquez y col., 2009).

Se calcula que en México hay 9 millones de personas parasitadas por *G. lamblia*, siendo este protozooario la causa más común de parasitosis intestinal. Un estudio que reunió 37 trabajos realizados en 14 estados de la República Mexicana, mostró una prevalencia del 18.98%, presentándose la mayor parte de ellos en preescolares y escolares, sin embargo se ha visto que la frecuencia de esta parasitosis en el país es muy variable, con cifras que fluctúan del 2% al 39% (Vázquez y col., 2009).

En el caso del estado de Sonora, la incidencia de giardiasis reportada en el Boletín de la Dirección General de Epidemiología del 2008, fue de 40.32 por cada 100,000 habitantes, ocupando el séptimo lugar a nivel nacional y siendo los niños el grupo más vulnerable (Boletín de la Dirección General de Epidemiología, 2008). En el 2012, las infecciones intestinales en niños ocuparon el segundo lugar en incidencia en el estado de Sonora (Anuarios de Morbilidad, Secretaría de Salud, 2012).

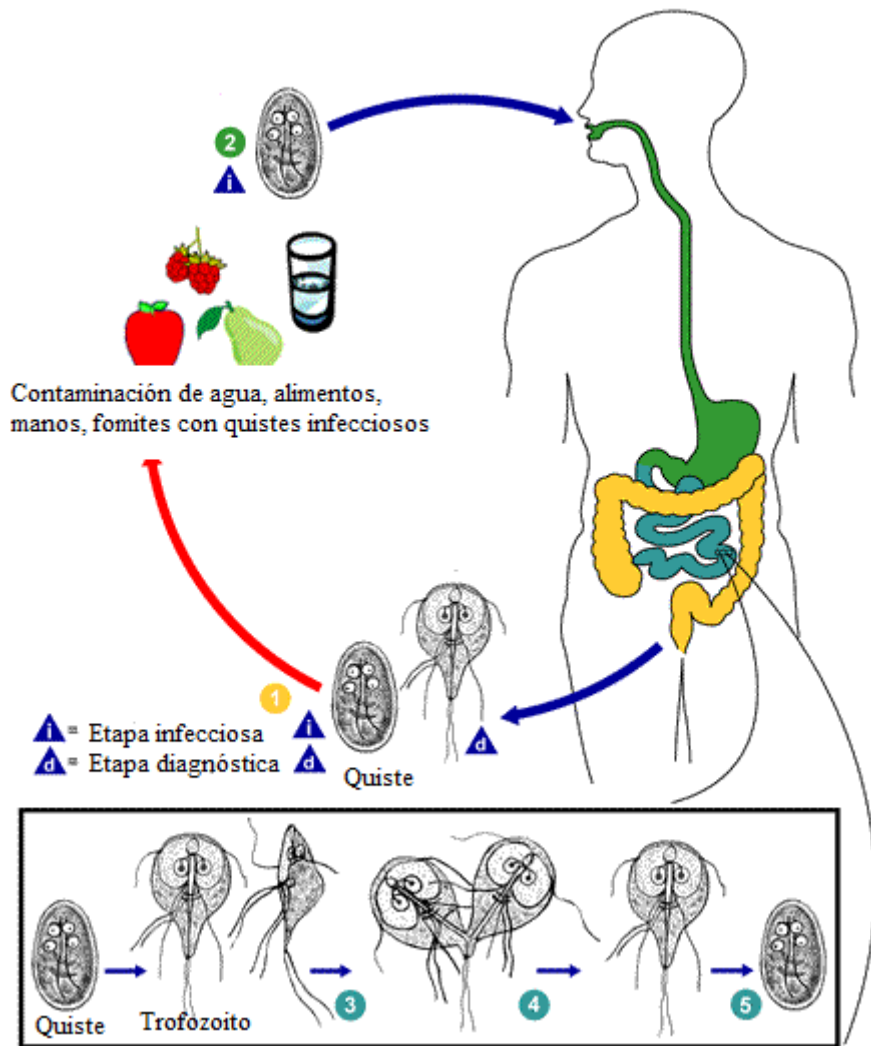


Figura 1. Ciclo de vida de *Giardia lamblia*.

<http://www.cdc.gov/parasites/giardia/biology.html>

Patogenia

Actualmente, existen diferentes teorías acerca de los posibles mecanismos en la patogenia de *G. lamblia*, una de las más antiguas, expuesta en 1939 por Vaghelyi, se refiere a una obstrucción mecánica de la mucosa causada por un número incontable de trofozoítos adheridos por mecanismos complejos de hidroadhesión al epitelio intestinal, lo que propicia un intercambio deficiente entre zonas de absorción y el material ingerido. Como consecuencia se presenta malabsorción de vitaminas liposolubles (A, D, E, K), ácidos grasos y vitamina B12, en pacientes con esta protozoosis (Phillip y Smith, 1985). Sin embargo, esta teoría no ha encontrado confirmación *in vivo*, ya que en autopsias como en infecciones experimentales se ha demostrado que *G. lamblia* no forma la “barrera mecánica” propuesta sino que crece en forma de nichos de colonización (Astiazarán-García y col., 2000).

Otra teoría postula que el protozoario compite con el hospedero por nutrientes absorbiendo del contenido intestinal el material necesario para sus actividades metabólicas, aunque no hay pruebas concluyentes de que tal actividad sea nociva para el hombre (Gryboski, 1983). Además, el número de parásitos es reducido para la enorme absorción del intestino (Roxström-Lindquist, 2006).

Otros autores han propuesto que la patogénesis puede ser resultado de la respuesta inflamatoria e inmunológica del hospedero (Scott y col., 2004). Se ha observado un incremento de los linfocitos por estimulación prolongada de antígenos de *G. lamblia*. Las células T son activadas y los linfocitos intra-epiteliales que tiene un papel de protección en la giardiasis pueden desempeñar un papel importante en protección en la patogenia (Faure-Fontenla y col., 1993). Existen citocinas secretadas por las células T que activan a los macrófagos y que contribuyen para la lesión de la mucosa intestinal (Flanagan, 1992).

Por otra parte, la combinación entre malabsorción de nutrientes e hipersecreción de electrolitos es responsable de la acumulación de fluidos en el lumen intestinal durante la infección, lo cual conlleva a la presentación de cuadros diarreicos y a su vez produce. La malabsorción se presenta como resultados del daño a las microvellosidades del borde del cepillo (Buret y col., 1992; Cevallos y col., 1995; Müller y Von Allmen, 2005).

Giardiasis y Deficiencia de Zinc

Aunque la relación entre deficiencia de zinc e infección ha sido escasamente estudiada, en 1993, se reconoció a *G. lamblia* como el primer factor de riesgo para la malabsorción, de nutrientes, en niños (Jendryczko y col., 1993). Una teoría que puede explicar este hecho sugiere que la presencia de diarrea, durante la giardiasis; afecta el estado de zinc debido a los cambios en la absorción intestinal, al incremento en las pérdidas del intestino, acompañado de una inadecuada ingesta. De esta manera, las personas infectadas, pueden presentar un ciclo de privación de zinc en el que se inicia un balance negativo del nutrimento, lo que incrementa la diarrea y la desnutrición y conlleva a una mayor vulnerabilidad de infección (Rosado, 1998). Lo anterior sugiere un sinergismo entre infección, nutrición e inmunidad, es decir, una infección tendrá efectos adversos sobre el estado nutricional. La importancia de esos efectos depende del estado nutricional previo del individuo, la naturaleza y duración de la infección y la dieta durante el período de recuperación. Por otro lado, una deficiencia de nutrientes, perjudicará la resistencia del individuo a la infección (EPA, 1999).

Varios estudios han demostrado la relación entre giardiasis y deficiencia de zinc, tal es el caso del realizado en Turquía en el 2002; en dicho estudio se midieron los niveles serológicos de zinc, cobre y hierro en niños infectados con *G. lamblia* y en niños no infectados, en el cual se encontraron disminuidos los niveles de zinc ($67.43 \pm 17.72 \mu\text{g/dL}$) y hierro ($87.98 \pm 18.31 \mu\text{g/dL}$) y se comprobó que *G. lamblia* puede ser considerado como una causa de malabsorción en niños. Por otra parte, la concentración

de cobre se observó aumentada ($198.45 \pm 39.14 \mu\text{g/dL}$) como un reflejo de la actividad de la enzima superóxido dismutasa durante infecciones crónicas. (Pelin, 2002).

Contrario a lo encontrado en dicho estudio, durante el 2007, y en el mismo país, se determinaron los niveles séricos de zinc, cobre, hierro, magnesio y selenio en niños diagnosticados con *G. lamblia*, encontrándose los niveles de zinc aumentados ($122.5 \pm 50.64 \mu\text{g/dL}$), este estudio postuló que la elevación del zinc sérico podría deberse a la inmediata movilización de las reservas corporales en la fase aguda de la infección. Por otra parte, los niveles de cobre, hierro, magnesio y selenio se encontraron disminuidos, lo cual puede conducir a un deterioro en las funciones celulares, fisiológicas y enzimáticas. (Gülnaz y Mustafa, 2007).

Posteriormente, un estudio llevado a cabo en Egipto, demostró una disminución de zinc ($62.65 \pm 6.94 \mu\text{g/dL}$) en niños infectados con el parásito, similar a la encontrada en Turquía en el 2002 (Abou-Shady y col., 2010).

Durante el año 2010, en el estado de Sonora, se realizó una investigación en niños infectados con *G. lamblia* a los cuales se les dio tratamiento antiparasitario y a través de un estudio longitudinal se observó un incremento significativo en la concentración de zinc, por lo cual se concluyó que la giardiasis pudiera ser el principal factor de riesgo para la deficiencia de zinc en escolares en el noroeste de México (Quihui y col., 2010).

Los datos existentes en la literatura son controversiales, lo cual hace necesario realizar más estudios que generen datos más contundentes sobre el impacto de la infección por *G. lamblia* sobre la malabsorción de micronutrientes, como en el caso del zinc.

Deficiencia de Zinc: Problemática Epidemiológica

La deficiencia de zinc en humanos se reportó por primera vez en Egipto durante los años sesenta. El fenómeno se presentaba en adolescentes del sexo masculino con un retraso muy importante en el crecimiento y en la maduración sexual (Prasad y col., 1963).

Estudios realizados alrededor del mundo han demostrado que la deficiencia de zinc se ha convertido en un problema nutricional que afecta principalmente a países en vías de desarrollo (Salgueiro, 2000). En el año 2004, se calculó una prevalencia global de 31%, sin embargo, dicho porcentaje oscila de 4-73%, según el país (Caulfield y Black, 2006). En la actualidad los casos de deficiencia severa de zinc son más bien raros. Sin embargo, la deficiencia moderada ha sido ampliamente notificada (Hambidge, 2000). Los grupos de población más afectados por este problema son los menores de 5 años y las mujeres durante el embarazo y la lactancia (Rosado, 1998).

Se piensa que la causa principal de la deficiencia de zinc en seres humanos es nutricional. La ingestión inadecuada de este mineral es consecuencia del consumo de una cantidad de zinc insuficiente para cubrir los requerimientos diarios o por dietas con alimentos que contiene zinc de baja biodisponibilidad o con alto contenido de inhibidores de absorción (ácido fítico o fibra dietética). Los alimentos de origen animal, particularmente las carnes, los mariscos y el pescado, son fuentes ricas en zinc, ya que durante su digestión se liberan ciertos aminoácidos y péptidos que contienen lisina y que forman complejos solubles con el zinc (Madrigal y col., 1986). Sin embargo, cualquier cambio que modifique la fisiología normal del tracto digestivo afecta profundamente la homeostasis del zinc (Rosado, 1998).

Considerando todo lo anterior, en México, la coexistencia entre giardiasis y la deficiencia de zinc, puede representar un serio problema epidemiológico debido que la

contribución de zinc de los alimentos de origen animal es muy limitada, en particular en la población rural y en la marginal urbana.

Implicaciones Biológicas del Zinc

El zinc posee una serie de propiedades químicas que lo hacen único y muy útil en varios sistemas biológicos y, por lo tanto, partícipe de un gran número de procesos metabólicos. Se sabe que es un constituyente de un amplio grupo de enzimas, el cual incluye: anhidrasa carbónica, carboxipeptidasa pancreática, alcohol deshidrogenasa, fosfatasa alcalina, deshidrogenasa málica, deshidrogenasa glutámica y deshidrogenasa láctica. Además, este metal, incrementa la actividad de otras enzimas, es decir, actúa como un cofactor (Prasad y col., 1967). Uno de los puntos clave en la biología del zinc es que no existe un sistema de almacenamiento especializado para este mineral en el cuerpo, por lo tanto, es importante alcanzar un estado de equilibrio en la ingesta y excreción del mineral (Rosado, 1998).

Por otra parte, es esencial para el crecimiento celular, el mantenimiento de la integridad estructural y la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas. Otra función importante es su participación en el plegamiento de los dominios de unión al ADN de los factores de transcripción eucariotas, principalmente los factores transcripcionales tipo “dedos de zinc” y una gran familia de receptores hormonales, como por ejemplo, los receptores de andrógenos. Además, está involucrado en la síntesis y liberación de neurotransmisores y en el desarrollo de las funciones del sistema nervioso central. Tiene un papel central en el sistema inmunológico, es necesario para la ontogenia inmune, y parece ser crucial para el timo y para el buen funcionamiento de la respuesta humoral y celular (Salgueiro y col., 2010).

Deficiencia de Zinc y Sistema Inmunológico

Con el fin de definir con precisión del efecto de la deficiencia de zinc en diversas facetas de la inmunidad, muchos investigadores, comenzaron sus estudios mediante la utilización de modelos murinos debido a las ventajas que tienen, como resultado de ello, la literatura actual con respecto al tema, consiste en cientos de artículos que describen esta relación. Dichos estudios han demostrado que la deficiencia de zinc conduce a una atrofia del timo, linfopenia y anormalidades de la respuesta inmune mediada por células y anticuerpos, lo cual causa un aumento en la tasa de infecciones, tanto en animales como en humanos. (Fraker y col. 1978; Fernandes y col. 1979).

Se ha observado que a medida que avanza la deficiencia, se presenta una reprogramación del sistema inmune, a partir de la activación del eje de estrés y la producción crónica de glucocorticoides que aceleran la apoptosis entre las células pre-B y pre-T. Esto reduce la linfopoyesis y provoca la atrofia del timo. En contraste, la mielopoyesis se conserva, proporcionando de este modo protección a la primera línea de defensa inmune o inmunidad innata. Los cambios en la expresión de genes para citocinas, enzimas de reparación del ADN, transportadores de zinc y moléculas de señalización sugieren que las células del sistema inmune están tratando de adaptarse a la tensión de subóptima de zinc (Franker y King, 2004).

Estudios realizados en humanos, en donde se indujo una deficiencia de zinc, mostraron que los linfocitos T cooperadores (CD4) se ven afectados por la deficiencia de zinc, lo que provoca un desequilibrio entre la respuesta Th1 y Th2. Esto se observó en la secreción alterada de las citocinas Th1 y Th2 durante el agotamiento de zinc. Las interleucinas producidas por la respuesta Th1: interferón gama (IFN γ) e interleucina 2 (IL-2) disminuyeron, mientras que las interleucinas producidas por la respuesta Th2: interleucina 4 (IL-4), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10) permanecieron sin cambio, esta condición conlleva un desequilibrio entre la respuesta Th1 y Th2 (Prasad, 2000).

Existe evidencia de que la función de la hormona timulina se afecta durante la deficiencia de zinc, lo anterior debido a que utiliza este mineral como cofactor. Este hecho, afecta de manera negativa en la diferenciación de linfocitos T inmaduros, la liberación de citocinas por células mononucleares sanguíneas, la proliferación de células CD8 y la expresión de receptores para IL-2 e los linfocitos T maduros. (Coto y col., 1992).

Como se mencionó anteriormente, los linfocitos B y sus precursores se disminuyen durante la deficiencia de zinc, mientras que los cambios en los linfocitos B maduros son mínimos. De esta manera, se disminuye el número de linfocitos B vírgenes que puedan reaccionar contra antígenos nuevos, por lo cual se afecta la respuesta inmune mediada por anticuerpos (Ibs y Rink, 2003).

De manera significativa casi todas las anomalías inmunológicas discutidas anteriormente, se corrigen después de la suplementación con zinc (Rink, 2009)

Giardiasis, Deficiencia de Zinc y Respuesta Inmune

Un estudio reciente, demostró que en ratones infectados por *G. lamblia*, alimentados con dietas con distintas concentraciones de zinc: baja, adecuada, alta y muy alta en zinc, se afecta negativamente los niveles de zinc sérico, aún en aquellos que consumen dietas altas en zinc. Sin embargo, se observó que el zinc adicional aportado por la dieta alta contribuye a que, independientemente del factor infección, los niveles séricos de zinc de dichos ratones sean mayores a los niveles que se presentan en grupos que consumen una dieta adecuada. En la misma investigación se evaluó la relación de subpoblaciones de linfocitos T CD4/CD8, en la cual no se reflejó de manera clara y consistente el efecto de zinc dietario y/o la infección. Por otra parte, se observó una mayor respuesta humoral sistémica mediada por anticuerpos de isotipo IgG en aquellos ratones sometidos a un régimen dietario alto de zinc lo que indica un papel importante de regulación positiva del micronutriente. Por lo anterior, surge el interés de evaluar la

asociación entre giardiasis y deficiencia de zinc, así como las posibles implicaciones en el sistema inmunológico en humanos (Iñigo-Figueroa. 2013).

Un estudio similar demostró que la deficiencia de zinc severa en ratones, afecta la respuesta inmune contra nemátodos, lo cual resulta en una supervivencia prolongada del parásito, mayor colonización, así como una disminución en la producción de citocinas (Scott y col., 2011).

En el año 2012, un estudio realizado en Irán, también demostró una disminución en la concentración de zinc en sujetos infectados por *Giardia lamblia*. En dicho estudio también se midieron las inmunoglobulinas A y E, los resultados no mostraron una disminución en ninguna de las clases de inmunoglobulinas en el grupo de sujetos infectados y con disminución de zinc, por el contrario, las concentraciones de ambas inmunoglobulinas se mostraron significativamente elevadas en comparación con el grupo control (Zarebavani y col., 2012).

Existen pocos estudios que asocian giardiasis, disminución de zinc y respuesta inmune, los resultados resultan contradictorios, por lo cual, es necesario realizar más investigaciones en donde se evalúe el sinergismo entre dichas variables.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ética

El protocolo de estudio fue sometido y aprobado por el comité de Ética de CIAD A.C. Se solicitó la autorización de la Secretaría de Educación y Cultura (SEC), de la Asociación Estatal de Padres de Familia y de los padres de familia sobre el consentimiento para realizar el estudio. Los padres o tutores que aceptaron la participación de sus hijos firmaron voluntariamente las formas de consentimiento.

Población y Diseño de Estudio

El presente estudio fue de tipo transversal, en el cual se invitó a participar a niños de 4 a 13 años de edad de Hermosillo, Sonora. Se informó a los padres de familia acerca de la importancia de la investigación, se solicitó la firma del consentimiento informado y se acordó que los niños participantes que resultaran parasitados recibirían tratamiento antiparasitario. A continuación se describen los criterios a utilizar para la selección de los individuos.

Criterios de Inclusión

- Niños de 4-13 años de edad, aparentemente sanos, parasitados y no parasitados por *Giardia lamblia*.
- Niños que entregaron el consentimiento previamente firmado por sus padres.
- Niños no beneficiados con el programa de desayunos escolares.

Criterios de Exclusión

- Niños que presentaron algún tipo de infección y/o fiebre durante las tres semanas previas a la toma de muestra.
- Niños que confirmaron consumo de complejos vitamínicos con zinc.

- Niños que recibieron tratamiento antiparasitario 3 semanas previas a la toma de muestra.
- Niños que presentaron leucocitosis ($> 10,000$ leucocitos por mm^3) en la citometría hemática (criterio aplicable solamente al grupo control).
- Entrega de menos de tres muestras fecales

Criterios de Eliminación

- Voluntarios que no completaron los recordatorios de 24 horas
- Problemas con el procesamiento de la muestra
- Deseo de no seguir participando en el estudio
- Cambio de residencia.

Recolección y Procesamiento de Muestras Biológicas

Recolección de Muestras Fecales

Habiendo obtenido el consentimiento firmado, se proporcionaron envases para la toma de muestras fecales de tres días diferentes, así como la información necesaria para la correcta recolección de las muestras. Una vez entregadas las muestras, se guardaron en hieleras convencionales y fueron trasladadas al laboratorio para su análisis.

Obtención de Muestras de Sangre Venosa

Para la toma de muestra venosa, se pidió a los niños que acudieran en ayuno. La recolección se realizó mediante punción venosa del antebrazo. Se tomaron 5 mL de sangre en un tubo sin anticoagulante y 3 mL en un tubo con anticoagulante (ácido etilendiaminotetraacético; EDTA). Una vez obtenidas las muestras, se guardaron en hieleras convencionales y fueron transportadas al laboratorio para su análisis. Las muestras obtenidas sin anticoagulante fueron centrifugadas a 1100 g por 10 minutos. El suero se separó, se etiquetó y se almacenó a una temperatura de -70°C para su posterior

uso en la medición de zinc y títulos de anticuerpo. Por otra parte, el tubo con anticoagulante se utilizó para realizar biometría hemática completa y relación CD4/CD8.

Análisis Coproparasitológico

Se obtuvieron tres muestras de heces fecales de cada niño, las muestras fueron analizadas por la técnica de concentración de Faust (cualitativo). Este método utiliza solución de sulfato de zinc, cuya densidad específica es de 1.180 g/ml (33%), que conforma un medio de densidad más alta que la de los parásitos y facilita que huevos y/o quistes con menor peso específico que la solución, se concentren y floten (Faust y col., 1938). Los niños que resultaron negativos en el análisis coproparasitológico de tres muestras o presentaron solamente parásitos comensales (*Endolimax nana*, *Iodamoeba bütschilii* y *Entamoeba coli*) conformaron el grupo control (*G. lamblia* positivo), por otra parte, los niños que en su examen coproparasitológico revelaron la presencia de *G. lamblia* sola o acompañada con algún parásito comensal conformaron el grupo de estudio (*G. lamblia* negativo)

Citometría Hemática

Las biometrías hemáticas se realizaron en el contador de células automatizado COULTER® Ac-T diff™ Analyzer de Beckman Coulter en el Laboratorio de Análisis Clínicos de la Universidad de Sonora. La elevación en leucocitos (>10,100 por centímetro cúbico), se utilizó como criterio de exclusión en el grupo de niños no parasitados por *G. lamblia* (Williams y col., 2014).

Relación CD4/CD8

La relación de linfocitos CD4 y CD8 se evaluó a través de citometría de flujo. Se tomaron 50 µL de sangre total y se incubaron por 20 minutos con una mezcla de los anticuerpos monoclonales anti-CD3 marcado con peridina clorofila (PerCP), anti-CD4

marcado con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) y antiCD8 marcado con R-ficoeritrina (PE). Las muestras fueron procesadas en un citómetro de flujo FACSCanto de Becton&Dickinson. La compensación del equipo se hizo mediante muestras individuales teñidas con cada uno de los anticuerpos fluorescentes y una muestra sin teñir (Apéndice 1). Paralelamente, se procesó un tubo control (muestra sin teñir) para cada sujeto. Los resultados fueron analizados en el software DIVA de Becton&Dickinson (Roitt y col., 2014).

Determinación de Zinc Sérico

La concentración de zinc en suero se determinó por medio de absorción atómica, utilizando la técnica 999.11 recomendada por la AOAC, (2000). Dicha técnica consiste en diluir 0.40mL de suero en 2mL de solución Brij 35 al 0.03% (Apéndice 2). Las mediciones se llevaron a cabo a 213.9 nm con una lámpara de cátodo hueco y como control de calidad se utilizó un estándar certificado de zinc (9.998 mg/g \pm 0.026 mg/g NIST No. 3168 a-1). Se consideró deficiencia de zinc si la concentración era menor a 70 μ g/dL (Zinc Investigators' Collaborative Group. 2000).

Título de Anticuerpos IgG Anti-*Giardia lamblia*

La evaluación de la respuesta humoral se hizo a través de la medición del título de anticuerpos de la clase IgG específicos para proteínas de *G. lamblia* en suero mediante la técnica de ELISA indirecta (Apéndice 3). La metodología consistió en fijar antígeno soluble de *G. lamblia*, obtenido por medio de lisis de trofozoitos de un cultivo axénico (Apéndice 4), e incubarlo con el suero de cada paciente, como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG, conjugado con peroxidasa de rábano. Como sistema de revelado de la reacción antígeno-anticuerpo se usó una solución ABT-S en solución reguladora de citratos con H₂O₂ (Rascón-Durán, 2008).

Evaluación Antropométrica

Peso y Talla

Los niños fueron pesados en ayunas, con el mínimo de ropa y sin zapatos en una balanza digital previamente nivelada. Cada individuo fue colocado en el centro de la balanza sin tocar ninguna otra parte de ésta.

La talla se midió con un estadiómetro portátil Holtain con aproximación de $2.05 \pm 5 \times 10^{-4}$ m de capacidad de medición (Holtain Stadiometer, Holtain Ltd, UK). Se colocó al niño de pie, sin zapatos, cuidando el plano de Frankfurt y la posición correcta, pies juntos, puntas ligeramente separadas y talones, glúteos y hombros pegados a la base del estadiómetro, brazos a los lados y se le pidió al niño que inhalara profundamente y al momento de exhalar, se tomó la medición (Cameron, 1978).

Con las mediciones de peso y talla se calcularon los indicadores antropométricos Score Z peso para la talla (Z P/T), Score Z talla para la edad (Z T/E) y Score Z peso para la edad (Z P/E). Se utilizaron el programa WHODIN v2.1 y los estándares de crecimiento de la Organización Mundial de la Salud para clasificar el estado nutricional de cada sujeto.

Evaluación Dietaria

La evaluación dietaria se realizó utilizando la técnica del recordatorio de 24 horas, la cual consiste en registrar la cantidad de todos los alimentos consumidos en las últimas 24 horas. Se realizaron 3 recordatorios no consecutivos (2 entre semana y 1 de fin de semana), con un mínimo de 3 semanas entre cada recordatorio. El niño fue entrevistado en presencia de la persona encargada de preparar los alimentos. Una vez obtenidos los gramos consumidos, se les asignó una clave y se calculó el valor nutritivo de estos a partir de una base de datos proporcionada por el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, método reportado por Ortega y col., en 1999.

Análisis Estadístico

Los resultados fueron analizados utilizando el paquete estadístico SPSS versión 2008. La distribución de todas las variables se evaluó a través de una prueba de curtosis. La comparación de medias para las variables con distribución normal se hizo mediante la prueba paramétrica *t* de Student, por otra parte, la prueba no paramétrica *U* de Mann Whitney se utilizó para comparar medianas de variables sin distribución normal. Las diferencias, fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor de *p* fue ≤ 0.05 .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación Antropométrica

Se recolectaron muestras de heces y se les tomaron muestras sanguíneas a 145 niños de Hermosillo, Sonora, los cuales entregaron el consentimiento firmado por sus padres; el 60.2% fueron niñas y el 39.8% fueron niños. Del total de niños, solamente, 83 cumplieron con los requisitos de inclusión en el estudio, 60 niños conformaron el grupo *G. lamblia* negativo y 23 al grupo de *G. lamblia* positivo.

La Tabla I muestra las características antropométricas de los grupos de estudio. En ambos grupos se observa una mayor participación del sexo femenino. Se ha demostrado que el sexo y edad tienen un efecto de confusión en la concentración de zinc (Hotz y col., 2003), sin embargo, la participación mayoritaria de mujeres fue un sesgo que no se pudo controlar en el estudio. Por otra parte, la edad se ha asociado significativamente con la concentración de zinc en suero, se ha demostrado que las concentraciones de zinc en suero son más bajas en los niños pequeños, dichos niveles se incrementan progresivamente con la edad, alcanzando su punto máximo entre los 18 y 25 años de edad y disminuyen lentamente durante la edad adulta (Hotz y col., 2003). Teniendo en cuenta que la diferencia de edad entre los grupos de estudio pudiera representar un sesgo en los resultados se compararon las medias de cada grupo, el resultado no mostró diferencia para la edad.

Aunque el significado de giardiasis como causa de retraso en el crecimiento es objeto de debate, la pérdida de peso y talla ha sido descrita en niños infectados por *G. lamblia* (U.S. EPA, 1998). En el presente estudio, se pudo observar que los niños infectados por el parásito presentaron menor peso y talla comparados con el grupo de niños no parasitados por *G. lamblia*.

Tabla I. Características antropométricas de la población (n=83)

Variables	<i>G. lamblia</i>	<i>G. lamblia</i>	Valor de <i>p</i>
	Negativo	Positivo	
	n = 60	n = 23	
	Media ± DE	Media ± DE	
Edad (años)	9.28 ± 2.31	8.71 ± 2.57	0.33*
Relación Sexo M/F	25/35	9/14	
Peso (Kg)	37.18 ± 15.67	29.44 ± 10.11	0.01
Talla (cm)	137.44 ± 15.91	130.8 ± 16.73	0.04
Z P/E	1.49 ± 1.87	0.94 ± 0.68	0.08
Z P/T	-0.04 ± 0.69	-0.13 ± 0.28	0.29
Z T/E	0.47 ± 1.30	-0.04 ± 1.44	0.06

M = Masculino, F= Femenino, DE = Desviación Estándar

***p** = Prueba U de Mann Whitney para dos muestras, significancia a *p* < 0.05**

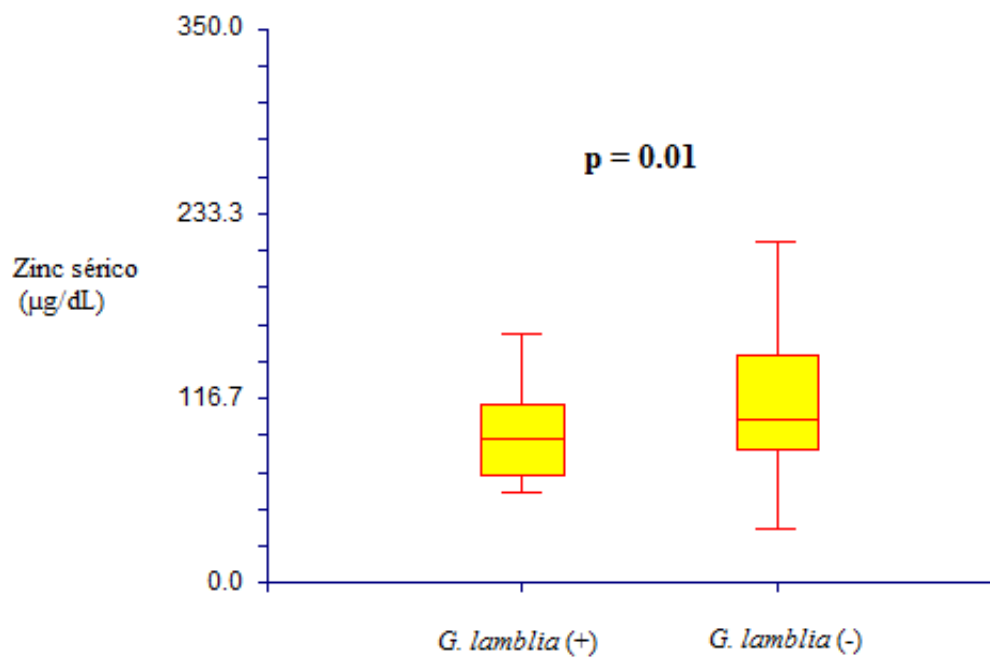
***p* = Prueba t de Student para dos muestras, significancia a *p* < 0.05**

Sin embargo, aunque los indicadores antropométricos Score Z peso para la talla (Z P/T), Score Z talla para la edad (Z T/E) y Score Z peso para la edad (Z P/E) tendieron a ser mayores en el grupo de niños infectados que en el grupo no infectado las diferencias no fueron significativas.

***Giardia lamblia* y Zinc Sérico**

En 1993, Jendryesko y colaboradores, realizaron un estudio en niños infectados por *G. lamblia* en el cual se demostró una asociación entre giardiasis y disminución en la concentración de zinc. A la fecha, varias publicaciones en diferentes partes del mundo han demostrado lo mismo (Ertan y col., 2002; Dimirci y col., 2003; Abou-Shady y col., 2010; Quihui y col., 2010). En el presente estudio, se observó que los niños infectados por el parásito también presentaron concentraciones de zinc sérico significativamente menores a los del grupo no infectado (Figura 2). De un total de 83 niños, solamente una niña, no parasitada por *G. lamblia*, presentó deficiencia de zinc. Este hallazgo contrasta con lo publicado por la Encuesta Nacional de Salud en 1999, en donde se estimó una prevalencia de deficiencia de zinc sérico del 34% en niños a nivel nacional.

A pesar de que en la actualidad se desconoce el mecanismo exacto por el cual *G. lamblia* compromete el metabolismo del zinc, existen ciertas hipótesis que explican la disminución de zinc sérico: una teoría señala el daño en la mucosa intestinal y microvellosidades resultado de la infección, que podría conducir a la malabsorción del zinc y la segunda teoría señala una posible redistribución del zinc en circulación hacia aquellos sitios donde se requiere para los procesos inmunológicos en contra del parásito. (O'Loughlin y col., 1991; Scott y col., 2000).



**Figura 2. -Comparación de medianas para concentración de Zinc sérico.
Prueba U de Mann Whitney, significancia a $p \leq 0.05$
Mediana *G. lamblia* (+) 103.0 µg/dL
Mediana *G. lamblia* (-) 115.0 µg/dL**

Evaluación Dietaria

Además de la infección por *G. lamblia*, la deficiencia de zinc, puede atribuirse o acompañarse de una ingesta inadecuada del mineral en la dieta. Para evaluar la ingesta de zinc en los niños se realizaron recordatorios de 24 horas. En la Tabla II, se observa el consumo promedio de zinc en niños sin y con *G. lamblia*. El consumo promedio de zinc en ambos grupos fue similar y no fue estadísticamente diferente ($p > 0.05$) (Figura 3). Sin embargo, las medias estuvieron por debajo de la ingesta diaria recomendada (IDR) de zinc (7mg/día). En la figura 4 se observa una distribución muy similar de los coeficientes de adecuación de consumo de zinc en los niños no infectados e infectados por el parásito. Cabe mencionar, que se observó un 42 y 43% en niños sin y con *Giardia* que consumen menos del 75% de IDR, estos porcentajes son mayores a los publicados por la Encuesta Nacional de Salud en el 2001, en los cuales se observó que del 19% al 24% de los escolares mexicanos presentan consumo de zinc dietario por debajo del límite recomendado.

El consumo promedio de zinc en nuestra población de estudio fue de 6.9 ± 1.85 y 7.3 ± 3.28 mg/día en niños sin y con *Giardia lamblia*, similar al observado por Quihui y col., en el 2010. Se buscó una relación en cada grupo entre la concentración de zinc sérico e ingesta de zinc, no se encontró correlación significativa a diferencia de lo reportado en la bibliografía (Amani y col., 2010; Lowe y col., 2012); de igual forma se buscó correlación entre zinc sérico y posibles inhibidores de la absorción provenientes de la dieta, como son: calcio y fibra, tampoco se obtuvo correlación significativa (Apéndice 5). Lo anterior puede ser resultado de la variabilidad diaria de la ingesta alimentaria de los individuos que no se refleja en los recordatorios de 24 horas. Además, se ha visto que no es un método apropiado para detectar estados deficitarios en un individuo, pues la ingesta de muchas vitaminas y minerales puede variar grandemente de un día a otro y aun ser en su conjunto adecuada (Sabaté, 1993).

Tabla II. Ingesta promedio de zinc en niños sin y con *Giardia lamblia*

	<i>Giardia</i> Negativo (n = 60)	<i>Giardia</i> Positivo (n = 23)
	Media ± DE	Media ± DE
Ingesta de Zinc (mg/día)	6.22 ± 2.41	6.53 ± 2.69

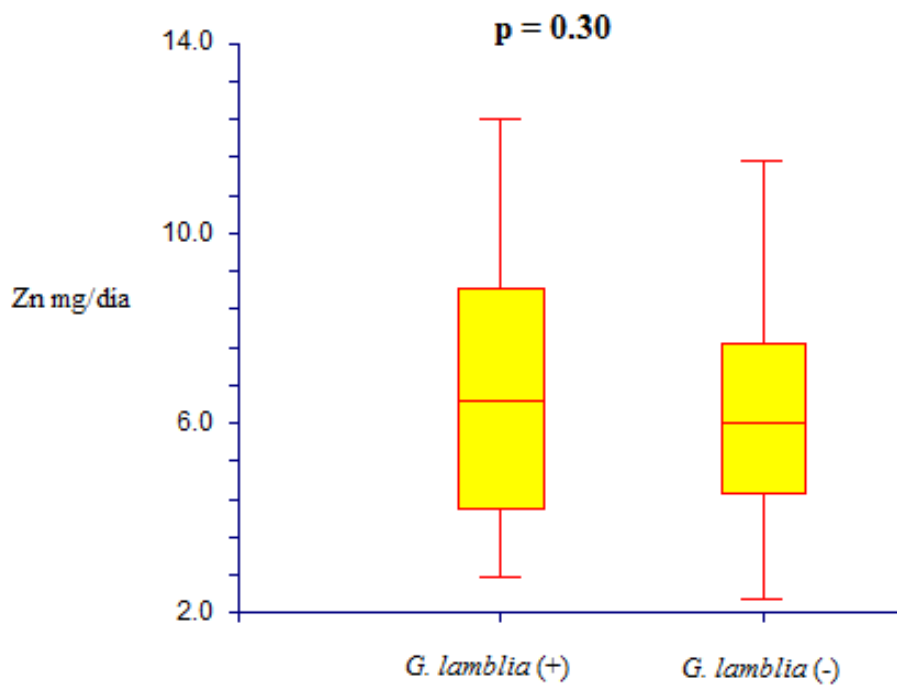
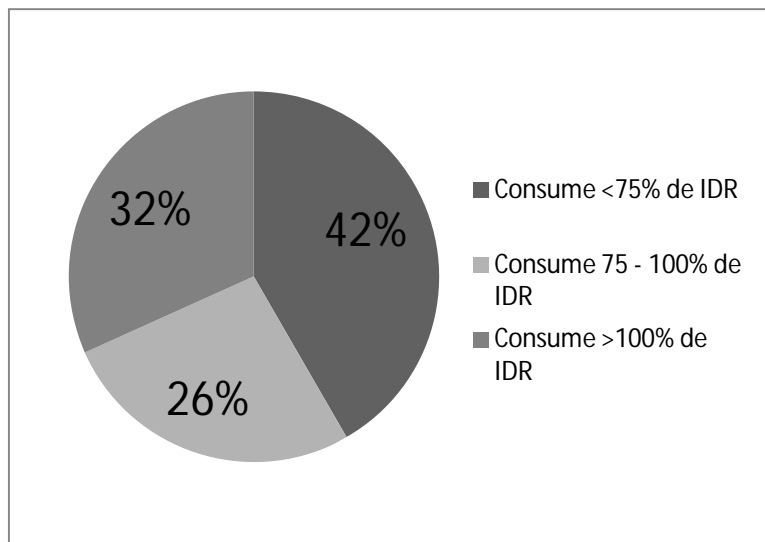


Figura 3.- Comparación de medianas para el consumo de zinc.
Prueba U de Mann Whitney, significancia a $p \leq 0.05$
Mediana *G. lamblia* (+) 6.49 mg/día
Mediana *G. lamblia* (-) 6.04 mg/día

Distribución de los coeficientes de adecuación de consumo de zinc en niños no infectados por *G. lamblia* (n=60)



Distribución de los coeficientes de adecuación de consumo de zinc en niños infectados por *G. lamblia* (n=23)

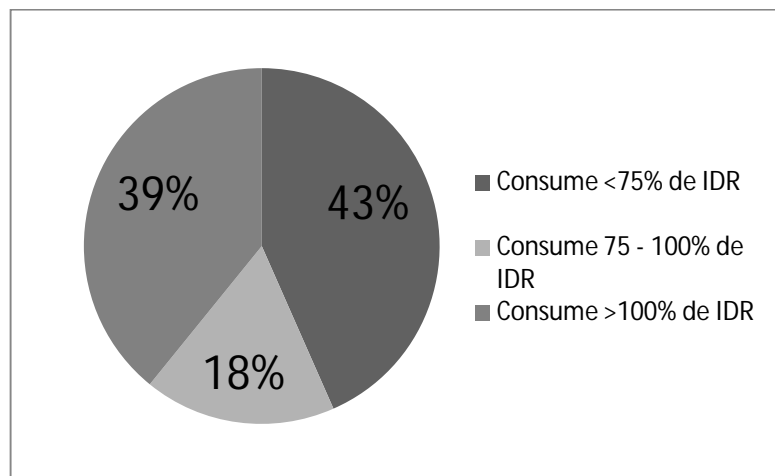


Figura 4. Distribución de los coeficientes de adecuación de consumo de zinc

La combinación del uso de recordatorios de 24 horas, con otros métodos como el cuestionario de frecuencia de consumo y el diario dietético puede dar una estimación mejor y más precisa de la dieta habitual del individuo entrevistado, pues los inconvenientes de un método son contrarrestados por las ventajas del otro.

Zinc Sérico y Respuesta Inmune Contra *Giardia lamblia*

Al igual que en otros estudios, se observó que *G. lamblia* se asocia con una disminución de zinc aunque los mecanismos por los cuales sucede aún no son explicados en su totalidad. Con la finalidad de evaluar si esta disminución tiene alguna repercusión en la respuesta inmune contra el parásito, *in vivo* en niños, se evaluaron los títulos de anticuerpos IgG anti-*Giardia* y la relación linfocitaria CD4/CD8.

La densidad óptica promedio, obtenida a 405nm, mediante el inmunoensayo ELISA indirecto, realizada en el grupo de niños infectados por *G. lamblia* (0.389 ± 0.13) coincidió con el punto de corte propuesto por Duque y colaboradores en el año 2001 (Tabla III), investigación en la cual se estableció un valor ≥ 0.300 , a la misma longitud de onda, para considerar positiva una elevación de anticuerpos IgG anti-*Giardia*.

Contrario a lo reportado en un modelo murino por Iñigo-Figueroa en el año 2013, no se encontró disminución en el título de anticuerpos del grupo de niños con *G. lamblia*, respecto al grupo control (Figura 5). Se observó que su concentración fue prácticamente igual, sin embargo, retomando los resultados de Duque y colaboradores, la media obtenida en nuestro estudio fue mucho menor a la observada por ellos, lo cual puede ser un indicio del efecto de la disminución del zinc en la respuesta humoral en nuestra población.

Es probable que la medición de anticuerpos IgG anti-*Giardia* no sea la mejor opción para estudiar el sinergismo entre las variables propuestas debido a que Sonora es un estado endémico de giardiasis, este tipo de inmunoglobulina no permite diferenciar

entre una infección pasada o reciente y simplemente refleja una exposición constante frente al parásito. Otra explicación para los resultados obtenidos podría ser el hecho de que el diagnóstico de la infección por *G. lamblia* se basó en la identificación de quistes o trofozoitos en materia fecal a través del método de Faust, el cual tiene una sensibilidad del 95% en muestras seriadas, debido a la excreción intermitente del parásito, esta baja sensibilidad de la técnica, pudo haber provocado que se incluyeran resultados de coproparasitoscópicos falsos negativos en el grupo control. En la actualidad existen diversos enzimoimmunoensayos comerciales con una sensibilidad superior al 95% (Abbas, N.F. y col. 2011).

Por otra parte, en 1993, Char y colaboradores, evaluaron el título de anticuerpos de clase IgM, IgA e IgG anti-*Giardia* en niños gambianos con giardiasis persistente y evidente desnutrición, al comparar los resultados con un grupo de niños aparentemente sanos solamente se observó una elevación significativa en los anticuerpos de la clase IgM anti-*Giardia* pero no de IgA e IgG. Debido a estos resultados además de la incapacidad de resolver la infección, los investigadores llegaron a la conclusión de que es posible que en niños con desnutrición proteico energética la respuesta humoral sea deficiente y por lo tanto exista un problema en el cambio de isotipo de IgM hacia IgA e IgG. Otros investigadores han coincidido al respecto (Christian-López y col., 1999). Por lo anterior, quizá sería factible medir simultáneamente los diferentes isotipos de anticuerpos, estudiar la medición de citocinas involucradas en el cambio de isotipo y proliferación de células B, ya que está ampliamente reconocido que la deficiencia de zinc tiene un impacto negativo en la concentración de citocinas. Otra alternativa, pudiera ser medir los anticuerpos del tipo IgA en las muestras fecales ya que es la principal inmunoglobulina presente en secreciones digestivas mientras que en sangre solo representa del 5 al 10% del total de inmunoglobulinas corporales, además de ser el principal isotipo secretado hacia el lumen intestinal, sitio de colonización de *G. lamblia*.

Tabla III. Comparación de título de anticuerpos IgG anti-*Giardia*

	<i>G. lamblia</i>	<i>G. lamblia</i>
	Negativo	Positivo
	(n = 60)	(n = 23)
	Media ± DE	Media ± DE
IgG anti- <i>Giardia</i>		
(Densidad óptica a 405nm)	0.385 ± 0.24	0.389 ± 0.13

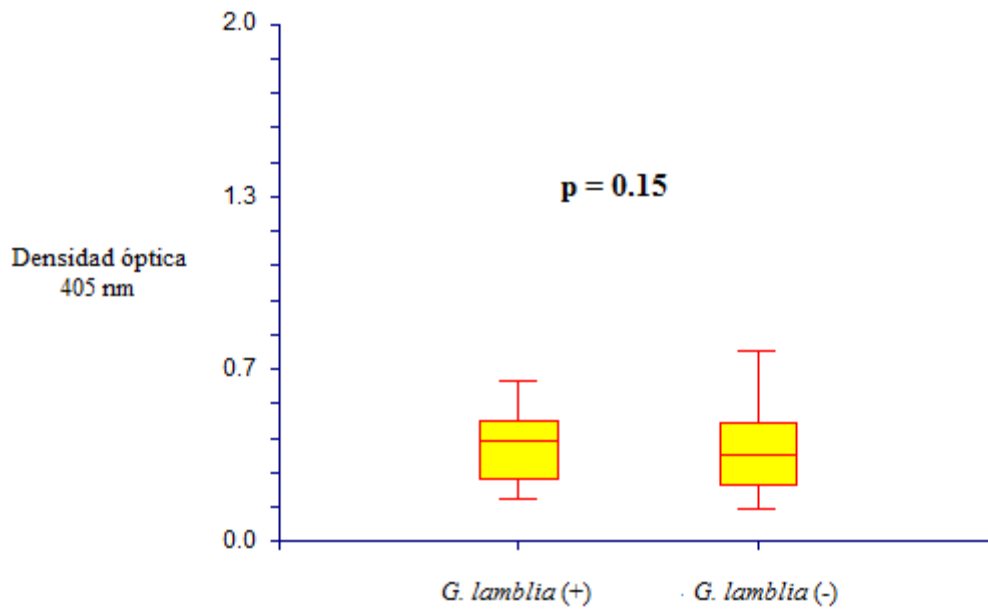


Figura 5.- Comparación de medianas para la densidad óptica.
Prueba U de Mann Whitney: significancia a $p \leq 0.05$
Mediana *G. lamblia* (+) 0.39
Mediana *G. lamblia* (-) 0.33

Con la finalidad de estudiar el efecto de la disminución de zinc en la respuesta celular, se evaluaron subpoblaciones de linfocitos T (Tabla IV). Nuestros resultados mostraron un porcentaje promedio de linfocitos CD3 y CD4 muy similares a los valores normales reportados para niños en edad de 2 a 16 años, tanto en niños infectados como no infectados (Comans-Bitter y col., 1997). El porcentaje de linfocitos CD4 observado en nuestro estudio mostró una media muy similar a la publicada en 1993, por Schlesinger y colaboradores de $41.55 \pm 7.92\%$, en niños con diarrea asociada a *Giardia lamblia*. Por otra parte, en nuestro estudio, ambos grupos mostraron un porcentaje de linfocitos CD8 mayor al valor normal reportado por Comans-Bitter y colaboradores en 1997. Cabe mencionar que la elevación de linfocitos CD8 durante la giardiasis debe ser tomada en cuenta ya que se ha visto que los linfocitos CD8 juegan un rol importante en el daño en las vellosidades del intestino en ratones (Scott y col., 2003).

El aumento en el porcentaje de linfocitos CD8 provocó una disminución en la relación CD4/CD8 en ambos grupos. Dicho aumento pudo deberse a que la ingesta inadecuada de zinc, encontrada en ambos grupos, pudiera estar acompañada por la deficiencia de algún otro micronutriente, como la vitamina A, en donde se ha visto, que una deficiencia marginal de esta vitamina, conduce a un incremento en la diferenciación celular de linfocitos T extratímica, estos linfocitos, tienden a expresar principalmente el marcador CD8, a diferencia de aquellos derivados del timo (Dawson y Ross, 1999).

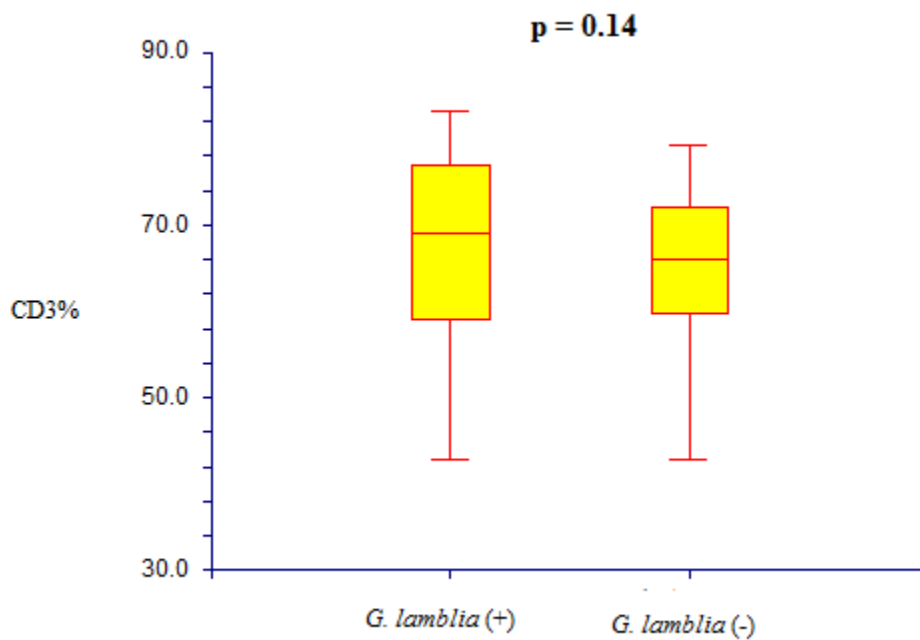
Al comparar los grupos no se observó diferencia estadísticamente significativa en las subpoblaciones estudiadas (Figuras 6, 7, 8 y 9). Nuestros resultados coinciden con lo observado por Iñigo-Figueroa y colaboradores, en donde la disminución de zinc sérico no refleja de manera contundente un efecto negativo sobre la respuesta inmune celular. Los hallazgos reportados en nuestro trabajo también coinciden con los reportados en ratas, en 2009, por Someya y colaboradores, en donde se observó que neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos aumentan en circulación, sin observar aumento de linfocitos T o B y NK. Es posible que la disminución en la concentración de

zinc en la población estudiada no haya logrado tener un efecto tan marcado en las subpoblaciones linfocitarias estudiadas, lo anterior debido a que el nivel promedio de zinc sérico en el grupo de niños infectados por *Giardia lamblia* no se considera deficiencia de zinc.

Son necesarios más estudios en los que se tomen en cuenta otras variables que afectan la proliferación de las subpoblaciones estudiadas, pues es sabido que la edad, sexo, dieta, duración de la infección e incluso la exposición al sol, afectan la relación CD4/CD8 (Zhang y col., 1994; Lee y Woodward, 1996; Falkenbach, y col. 1997).

Tabla IV. Comparación de subpoblaciones linfocitarias

	<i>Giardia</i> Negativo (n = 60) Media ± DE	<i>Giardia</i> Positivo (n = 23) Media ± DE
CD3 (%)	64.97 ± 10.46	67.46 ± 12.08
CD4 (%)	42.07 ± 10.95	44.04 ± 13.96
CD8 (%)	47.44 ± 8.48	49.50 ± 10.41
Relación linfocitaria CD4/CD8	0.95 ± 0.39	0.95 ± 0.38



**Figura 6.- Comparación de medianas para el porcentaje de CD3.
Prueba U de Mann Whitney, significancia a $p \leq 0.05$
Mediana *G. lamblia* (+) 69.3%
Mediana *G. lamblia* (-) 66.1%**

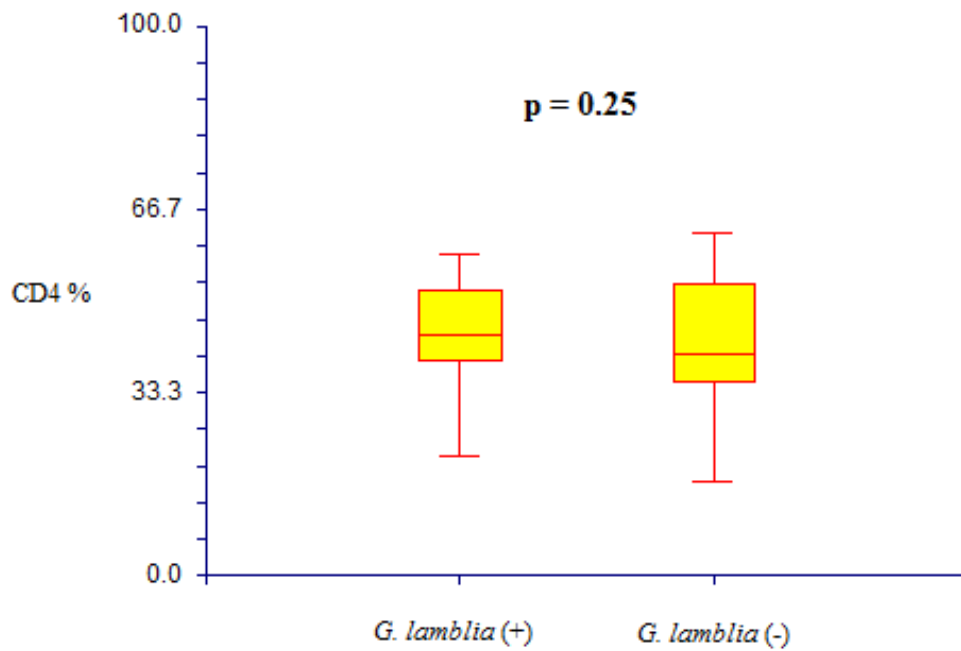
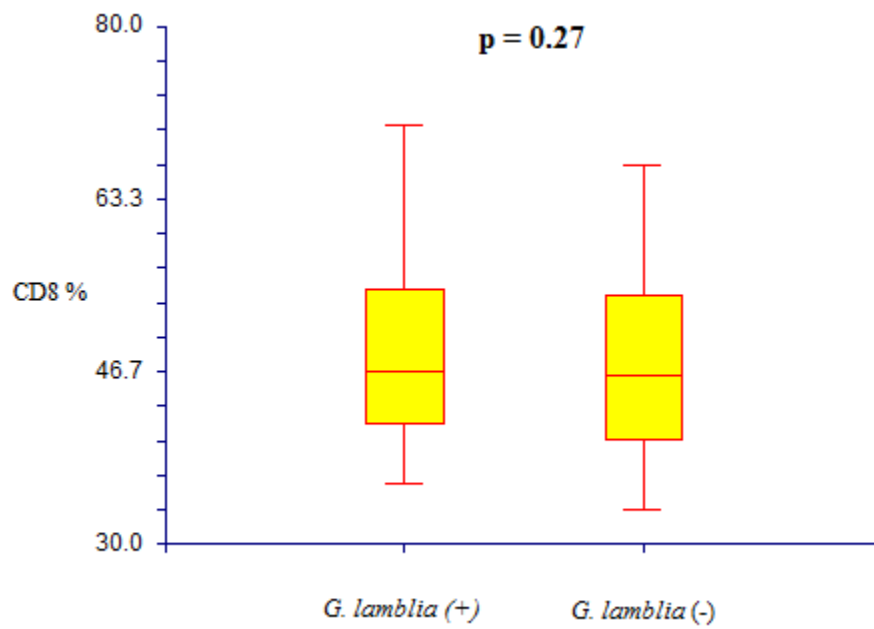
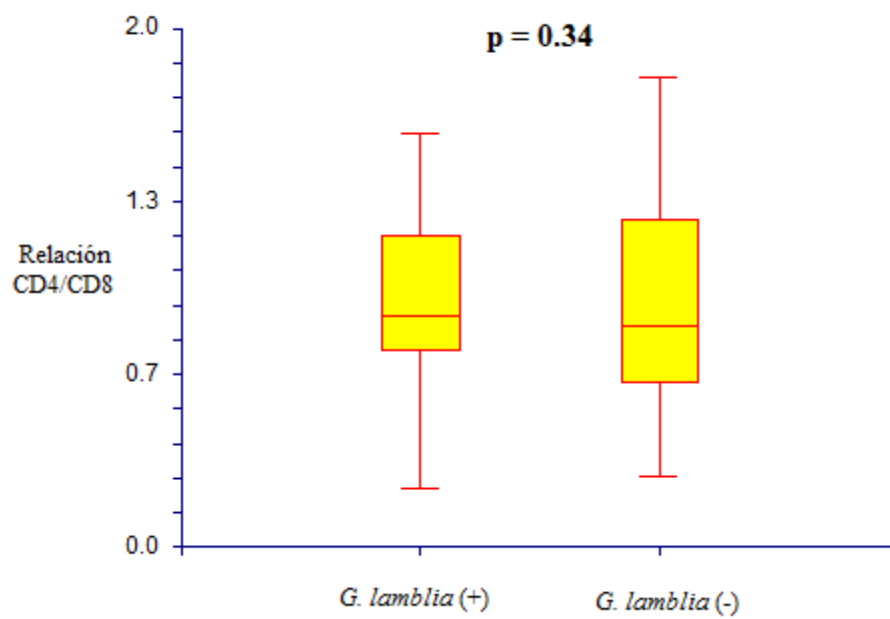


Figura 7.- Comparación de medianas para el porcentaje de CD4.
Prueba U de Mann Whitney, significancia a $p \leq 0.05$
Mediana *G. lamblia* (+) 43.9%
Mediana *G. lamblia* (-) 40.8%



**Figura 8.- Comparación de medianas para el porcentaje de CD8.
Prueba U de Mann Whitney, significancia a $p \leq 0.05$
Mediana *G. lamblia* (+) 46.9%
Mediana *G. lamblia* (-) 46.4%**



**Figura 9.- Comparación de medianas para la relación linfocitaria CD4/CD8.
Prueba U de Mann Whitney, significancia a $p \leq 0.05$
Mediana *G. lamblia* (+) 0.89
Mediana *G. lamblia* (-) 0.86**

CONCLUSIONES

- En el presente trabajo, se observó que la infección por *Giardia lamblia* se asocia con una disminución significativa en la concentración de zinc sérico en niños. La disminución observada no se consideró deficiencia de zinc.
- La presencia de *Giardia lamblia*, asociada a niveles disminuidos de zinc sérico, mostró un efecto negativo para las variables: talla y peso.
- El consumo promedio de zinc en nuestra población de estudio, evaluado por los recordatorios de 24 horas, estuvo por debajo de la ingesta diaria recomendada.
- No se observó diferencia en la ingesta diaria promedio de zinc, lo cual sugiere que la disminución de zinc sérico es debida a la presencia de *Giardia lamblia*.
- Los resultados no reflejan de manera clara el efecto de la disminución de zinc, causada por giardiasis, sobre la producción de anticuerpos anti-*Giardia* IgG. Tampoco se observó un efecto negativo en las subpoblaciones de linfocitos CD4 y CD8.
- Los hallazgos observados en nuestro estudio sugieren buscar parámetros inmunológicos más susceptibles a los cambios de concentraciones de zinc sérico.

BIBLIOGRAFÍA

Abbas, N.F. y col. 2011. Prevalence of *Giardia lamblia* in diarrheic children in Almadinah Almunawarh, KSA. *Journal of Taibah University for Science*. 5:25-30.

Abou-Shady, O. y col. 2010. Impact of *Giardia lamblia* on Growth, Serum Levels of Zinc, Copper, and Iron in Egyptian Children. *Biological Trace Element Research* 140: 1-6

Adam, R.D. 2000. The *Giardia lamblia* genome. *International Journal for Parasitology*. 30: 475-484

Adam, R.D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*. 14(3): 447-475.

Amani, R. y col. 2010. Correlation between dietary zinc intakes and its serum levels with depression scales in young female students. *Biological Trace Element Research*. 137(2):150-158.

Ash, L.R. y col. 2007. Atlas of human parasitology. American Society for clinical pathology. 5^a ed. 420-421.

Astiazarán-García, H. y col. 2000. *Giardia lamblia*: Effect of Infection with Symptomatic and Asymptomatic Isolates on the Growth of Gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Experimental Parasitology* 95: 128-135.

Buret, A. y col., 1993. Pathophysiology of small intestinal malabsorption in gerbils infected with *Giardia lamblia*. *Gastroenterol* 103: 506-513.

Cameron. 1978. The methods of auxological anthropometry. In: Falkner, F. and Tanner,

J. Human Growth. Post natal growth. Plenum Press, London.

Caulfield, L.E., Black, R.E. 2006. Zinc deficiency. Global and regional burden of disease

attributable to selected major risk factors comparative quantification of health risks World Health Organization Geneva Ezzati M, Lopez AD, Rodgers A, CJL. 257-279.

Carranza, P.G. y Luján, H.D. 2010. New insights regarding the biology of *Giardia lamblia*. Microbes and Infection. 12(1): 71-80.

Char, S. 1993. Impaired IgA response to Giardia heat shock antigen in children with persistent diarrhoea and giardiasis. Journal of Gastroenterology and Hepatology. 34(1): 38-40.

Christian-López y col. 1999. Alteraciones inmunológicas en niños con enfermedad diarrea prolongada y parasitismo. Revista Cubana de Pediatría. 71(3):140-145.

Cevallos, A. y col., 1995. Small intestinal injury in a neonatal rat model of giardiasis is strain dependent. Gastroenterol 109: 766-773.

Coto, J. y col., 1992. Interleukin 1 regulates secretion of zinc-thymulin by human thymic epithelial cells and its action on T-lymphocyte proliferation and nuclear protein kinase C. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 89: 7752-7756.

Comans. Bitter, W.M. y col. 1997. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. *Journals of Pediatrics*. 130(3):388-93.

Díaz-Cinco, M.E. 2002. Impacto de la dieta sobre la inducción de infección con quistes de *Giardia lamblia* en ratas Sprague-Dawley. *Salud Publica Mex*. 44: 315-322

Dawson, H.D. y Ross, A.C. Chronic marginal vitamin A status affects the distribution and function of T cells and natural T killer cells in aging Lewis rats. *J Nutr* 1999 129:1782-1790.

Eckmann, L. 2003. Mucosal Defences against *Giardia*. *Parasite Immunology* 25(5): 259-270.

Dawson, H.D. y Ross, A.C. 1999. Chronic marginal vitamin A status affects the distribution and function of T cells and natural T killer cells in aging Lewis rats. *Journal of Nutrition*. 129:1782-90.

Duque, S. y col. 2001. Serodiagnóstico de giardiasis: identificación de inmunoglobulina G anti-*Giardia duodenalis* en suero mediante ELISA. *Revista Biomédica*. 21(3): 228-233.

Environmental Protection Agency. 1999. *Giardia* Risk for Infants and Children.

Faure-Fontela, M.A. y col., 1993. Deficiencia selectiva de IgA y malabsorción. Revisión de la literatura a propósito de un caso. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México* 50: 185-189.

Faus, E.C. y col. 1938. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 18:169-183

Fernandes, G. y col. 1979. Impairment of cell-mediated immunity functions by dietary zinc deficiency in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 457–461

Falkenbach, A. 1997. Travel to sunny countries is associated with changes in immunological parameters. *Journal Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 13: 139-142.

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

Fraker, P.J. y col. 1978. Regeneration of T-cell helper function in zinc-deficient adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 5660–5664.

Franker, P.J. 2004. Reprogramming of the immune system during zinc deficiency. *Annual Review of Nutrition*. 24: 277-298.

Goldsmith R.S. 2000. Enfermedades infecciosas: protozoos y helmintos. Diagnóstico clínico y tratamiento. 35ª ed. Mexico: El Manual Moderno. 1367-1432.

Gryboski, J.D. 1983. *Gastrointestinal Problems in the Infant (Major Problems in Clinical Pediatrics)*. 1ª ed. Estados Unidos: Saunders Company.

Gülnaz, Ç., Mustafa, K. 2007. Serum Levels of Zinc, Copper, Iron, Cobalt, Magnesium, and Selenium Elements in Children Diagnosed with *Giardia Intestinalis*

and Enterobiosis Vermicularis in Hatay, Turkey. Biological Trace Element Research. 118:21–26.

Hajo, H., Lothar, R. 2009. Functional significance of zinc-related signaling pathway in immune cells. Annual Review of Nutrition. 29: 2.1-2.20.

Hambidge, M. 2000. Zinc and Health: Current Status and Future Directions. The Journal of Nutrition. (Supplement 1): S1344-S1349

Hotz, C. y col. 2003. Suggested lower cutoffs of serum zinc concentrations for assessing zinc status: reanalysis of the second National Health and Nutrition Examination Survey data (1976-1980). American Journal of Clinical Nutrition. 78(4):756-64.

Ibs, K. y Rink, L. 2003. Zinc-altered immune function. The Journal of Nutrition. 133-145

Iñigo-Figueroa, G. y col., 2013. Effects of dietary zinc manipulation on growth performance, zinc status and immune response during *Giardia lamblia* infection: a study in CD-1 mice. Nutrients. 5(9): 3447-34460.

Jendryczko, y col., 1993. Zinc deficiency in children infected with *Giardia lamblia*. Wiad Lek. 46(1-2):32-35.

Lee, W. y col. 1996. The CD4/CD8 ratio in the blood does not reflect the response of this index in secondary lymphoid organs of weanling mice in models of protein-energy malnutrition known to depress thymus-dependent immunity. Journal of

Lowe, N.M. 2012. The relationship between zinc intake and serum/plasma zinc concentration in adults: a systematic review and dose-response meta-analysis by the EURRECA Network. *Biological Trace Element Research*. 108(11):1962-1971.

Madrigal, H. y col. 1986. Consumo de alimentos y estado nutricional de la población del medio rural mexicano. *Revista de Investigación Clínica*.38: 9-19.

Marshall, A.L. 2014. *Manual de Hematología*. 8ª ed. México. Editorial McGraw Hill.

Müller, N. y Von Allmen, N. 2005. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *International Journal for Parasitology*. 35: 1339-1347.

Ochoa-Camacho, K.A. 2006. Determinación de linfocitos B, linfocitos T y subpoblaciones de linfocitos T en pacientes con tuberculosis pulmonar crónica. Universidad de Sonora. División de Ciencias biológicas y de la Salud.

Pelin, E., 2002. Serological levels of zinc, cooper and iron elements among *Giardia lamblia* infected children in Turkey. *Pediatrics International*. 44: 286-388.

Phillip, D., Smith, M.D. 1985. Pathophysiology and immunology of giardiasis. *Annual Review of Medicine*. 36: 295-307.

Prasad, A.S. y col. 1963. Zinc metabolism in patients with syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism, and hypogonadism. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 61:537-549.

Prasad, A.S. y col. 1967. Studies on zinc deficiency: changes in trace elements and enzyme activities in tissues of zinc deficient rats. *Journal of clinical Investigation*. 46(4).

Prasad, A.S. 2000. Effects of zinc deficiency on Th1 and Th2 cytokine shifts. *Journal of Infectious Diseases*. 182 (Suppl. 1): S62-S68.

Quihui y col., 2010. Could giardiasis be a risk factor for low zinc status in schoolchildren from northwestern Mexico? A cross-sectional study with longitudinal follow-up. *BMC Public Health*. 10:85.

Roitt, I. y col. 2014. *Fundamentos de Inmunología*. 12^a ed. México. Editorial Panamericana.

Rascón-Durán, M.L. 2008. Caracterización bioquímica parcial de antígenos inmunodominantes de *Giardia lamblia* capaces de inducir una respuesta inmune humoral en un modelo murino. Universidad de Sonora. División de Ciencias biológicas y de la Salud.

Rosado, J.L 1998. Deficiencia de zinc y sus implicaciones funcionales. *Salud Pública Mex*. 40:181-188.

Roxtröm-Lindquist, K., y col. 2006. *Giardia* immunity – and update. *Trends in Parasitology*. 22(1): 26-31.

Sabaté, J. 1993. Estimación de la ingesta dietética: métodos y desafíos. *Medicina Clínica (Barcelona)*. 100: 591-596

Salgueiro, M.J. 2000. Zinc status and immune system relationship. *Biological Trace Element Research*. 76: 193-205

Scott, K., y col. 2004. Role of CD8+ and CD4+ T Lymphocytes in Jejunal Mucosal Injury during Murine Giardiasis. *Infection and Immunity*. 72(2): 3536-3542

Someya, S. y col. 2009. Zinc deficiency induced changes in the distribution of rat white blood cells. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 55: 162-169.

Véghelye, P.V. 1939. Absorption studies in children with *Giardia lamblia* infection. A Preliminary Report. *Archives of Disease in Childhood*. 78: 155-158

Zarebavani, M. y col. 2012. Serum levels of zinc, copper, vitamin B12, folate and immunoglobulins in individuals with giardiasis. *Iranian Journal of Public Health*. 41(12):47-53.

Zhang, Z. y col. 1994. Lymphocyte subsets in thymus and peripheral lymphoid tissues of angling and diabetic NOD. *Autoimmunity*. 17: 41-48.

Zinc Investigators' Collaborative Group. 2000. Therapeutic effects of oral zinc in acute and persistent diarrhea in children in developing countries: pooled analysis of randomized controlled trials. *American Journal of Clinical Nutrition*. 72:1516-1522.

APÉNDICES

Apéndice 1.- Tinción para relación linfocitaria CD4/CD8

Materiales

- Tubos de FACS
- Tubos con EDTA
- Micropipetas
- Centrifuga
- Vortex
- Tela de nylon

Reactivos

- Anticuerpo anti-CD3 marcado con Proteína Peridina Clorofila (PerCP)
- Anticuerpo anti-CD4 marcado con Isocianato de fluoresceína (FITC)
- Anticuerpo anti-CD8 marcado con R-ficoeritrina (PE)
- Buffer PBS 10x: para 1L disolver 1.9 gr de NaH_2PO_4 , 12 gr de NaHPO_4 y 85 gr de NaCl. Aforar con agua ultrapura, ajustar el pH a 7.2 y filtrar. Utilizar agua ultrapura para diluirlo a 1X.
- Buffer de lisis: para 250 mL disolver 2.10 gr de NH_4Cl , 0.25 gr de KHCO_3 y 9.3 mg de $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Ajustar el pH a 7.2. Aforar con agua ultrapura y filtrar.
- Buffer PBA: mezclar 50 mL de PBS 10X con 450 mL de agua ultrapura. Agregar 0.1 gr de Azida.
- Paraformaldehído 2%: disolver 2 gr de paraformaldehído en 10 mL de PBS 1X. Calentar sin hervir hasta que la solución sea transparente.

Metodología

- Mezclar 50 μL de la muestra de sangre con EDTA y 5 μL de anti-CD3 marcado con PerCP, 5 μL de anti-CD4 marcado con FITC y 5 μL de anti-CD8 marcado

con PE. Agitar en vortex y dejar incubar en oscuridad por 30 minutos en oscuridad.

- Agregar 4 mL de buffer de lisis, agitar en vortex y reposar por 5 minutos en oscuridad.
- Centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos a 25 °C. Decantar el sobrenadante.
- Lavar el precipitado con 4mL de PBS 1X. Decantar el sobrenadante. El precipitado se resuspende en 150 μ L de PBA y 150 μ L de paraformaldehído al 2%. Se filtra con tela de nylon.

Apéndice 2.- Determinación de zinc sérico (Método oficial AOAC 991.11)

Materiales

- Espectrofotómetro de Absorción Atómica
- Tubos de vidrio
- Matraces volumétricos (25 µL)
- Micropipetas
- Vortex

Reactivos

- Brij 35 0.03%
- Estándar certificado de zinc (9.998 mg/g ± 0.026 mg/g NIST No. 3168 a-1)
- Soluciones de zinc de 0.0, 0.10, 0.50y 1.0 µg de Zn/mL

Metodología

- Diluir 0.40 mL de suero en 2 mL de solución Brij al 0.03%
- Las mediciones se llevan a cabo a 213.9 nm con una lámpara de cátodo hueco

Apéndice 3.- Técnica de ELISA indirecta

Materiales

- Lector de microplacas
- Microplacas
- Agitador horizontal con capacidad mínima de 50 rpm
- Pipetas automáticas multicanal con capacidad de 0.5 – 1000 μ L
- Vortex
- Pizeta
- Vasos de precipitado con capacidad de 50 y 100 mL

Reactivos

- **Antígeno:** Extracto Proteico de trofozoitos de *G. lamblia*
- **Muestra biológica:** Suero de niños infectados por *G. lamblia*
- **Solución reguladora para sustrato (solución reguladora de citratos pH 4.2.):** Mezclar 3.2 gr de ácido cítrico, 3.2 gr de KH_2PO_4 monobásico anhidro, 200 mL de agua deionizada, ajustar el pH a 4.2 con NaOH 1M y aforar a 250 mL con agua deionizada.
- **Solución reguladora de carbonatos pH 9.6:** mezclar 0.795 gr de Na_2CO_3 , 1.465 gr de NaHCO_3 , en un volumen de 400 mL. Ajustar pH a 9.6 con NaOH 1M o HCl 1M. Aforar a 500 mL con agua deionizada.
- **PBS 10X:** para 1L disolver 1.9 gr de NaH_2PO_4 , 12 gr de NaHPO_4 y 85 gr de NaCl. Aforar con agua ultrapura, ajustar el pH a 7.2 y filtrar. Utilizar agua ultrapura para diluirlo a 1X.
- **Solución de lavado PBS 1X/Tween-20 0.05%:** a 1 L de PBS 1X adicionar 0.5 mL de Tween-20
- **Solución bloqueadora PBS 1X/BSA 1%:** disolver 1 gr de BSA en 100 mL de PBS 1X.
- **Solución reveladora:** a 10 mL de ABTS adicionar 10 μ L de H_2O_2 al 30%.

- **Solución ABTS (2,2'-azino-di-3-octilbenzotiazolina sulfonato):** mezclar 137 mg de ABTS en 250 mL de solución reguladora de citratos.

Metodología

- Cubrir 3 pozos de la microplaca con 2.5 µg/50 µL de antígeno soluble de *G. lamblia* diluido en solución reguladora de carbonatos pH 9.6 en cada pozo.
- Incubar 2 horas a 37 °C o toda la noche a 4 °C.
- Lavar a chorro la placa con PBS-Tween-BSA al 0.5% por 5 veces. Llenar cada pozo con 50 µL de PBS-Tween-BSA 1% (Solución reguladora utilizada como bloqueador), incubar 1 hora a temperatura ambiente.
- Lavar 5 veces con PBS-Tween-20.
- Adicionar 50 µL de suero de niño infectado diluido 1:10 con PBS 1X.
- Lavar la placa con PBS-Tween-20 5 veces.
- Adicionar a cada pozo 50 µL de anticuerpo anti-IgG de humano acoplado a peroxidasa, diluido 1:16 000 en PBS, incubar 1 hora a temperatura ambiente.
- Lavar la placa con PBS-Tween-20 5 veces.
- Adicionar 50 µL de sustrato (ABTS + H₂O₂) a cada pozo. Por 1 mL de ABTS adicionar 1 µL de H₂O₂ al 30%.
- Cubrir la placa y agitar, incubar la placa por 15 minutos a temperatura ambiente. Leer a 405nm en el lector de microplacas.

Apéndice 4.- Preparación de Medio TYI-S-33 y cultivo de *Giardia lamblia*

Materiales

- Tubos de ensaye 13 x 100 estériles con tapón
- Pipetas serológicas estériles (5 y 10 mL)
- Pipetor
- Sistema de filtración (Steril aseptic system, Millipore corporation, Bradford, MA 01730) Filtro de 0.45 µm
- Campana de flujo laminar (Purifier Class II Biosafety Cabinet, Delta Series, LABCONCO)
- Incubadora (Thermolyte, type 41900)

Reactivos

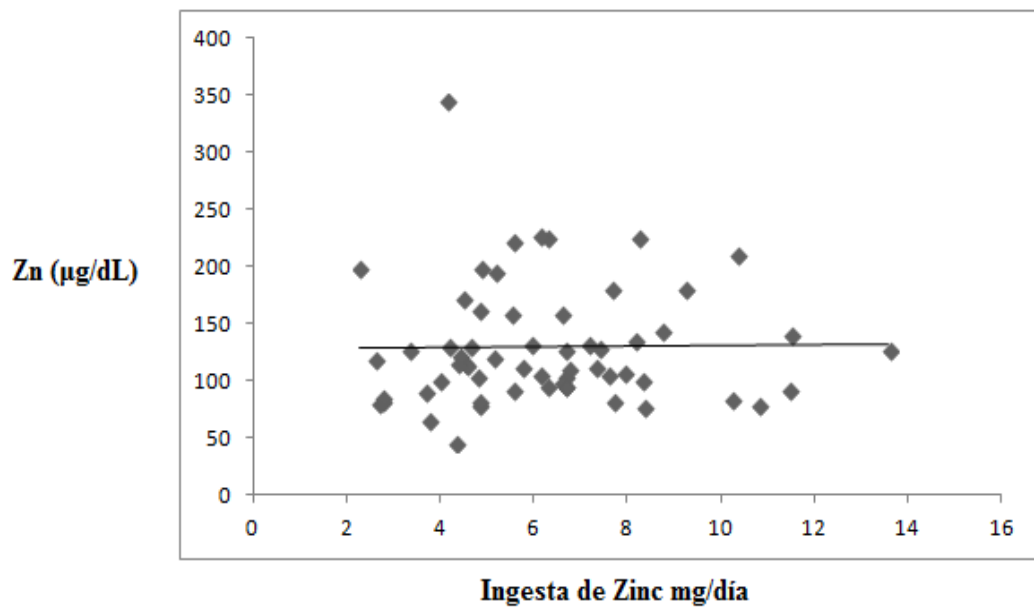
- Componentes para 200 mL de medio
- | | |
|--|-----------|
| Peptona Biotrptasa (BD BIOXON 2305) | 4.0 gr |
| Extracto de Levadura (BD 11929) | 2.0 gr |
| Dextrosa (J.T. Baker 1916-01) | 2.0 gr |
| Cloruro de sodio (SIGMA S-7653) | 0.4 gr |
| L-Cisteina (SIGMA C-8277) | 0.4 gr |
| Fosfato de Sodio Dibásico (J.T. Baker 3252-01) | 0.2 gr |
| Fosfato de Posasio Monobásico (J.T. Baker) | 0.1 gr |
| Bilis (SIGMA B-8331) | 0.1 gr |
| L- Ascórbico (Spectrum A1317) | 0.02 gr |
| Citrato Férrico Amoniacal (J.T. Baker 324601) | 0.0046 gr |

- **Preparación:** Aforar a 200 mL con agua bidestilada y ajustar el pH a 6.9 con NaOH 10N. Agregar 0.4 mL de antibiótico Rosephin y complementar suero bovino (Bovine Adult FERUM, SIGMA B2771) al 10%.

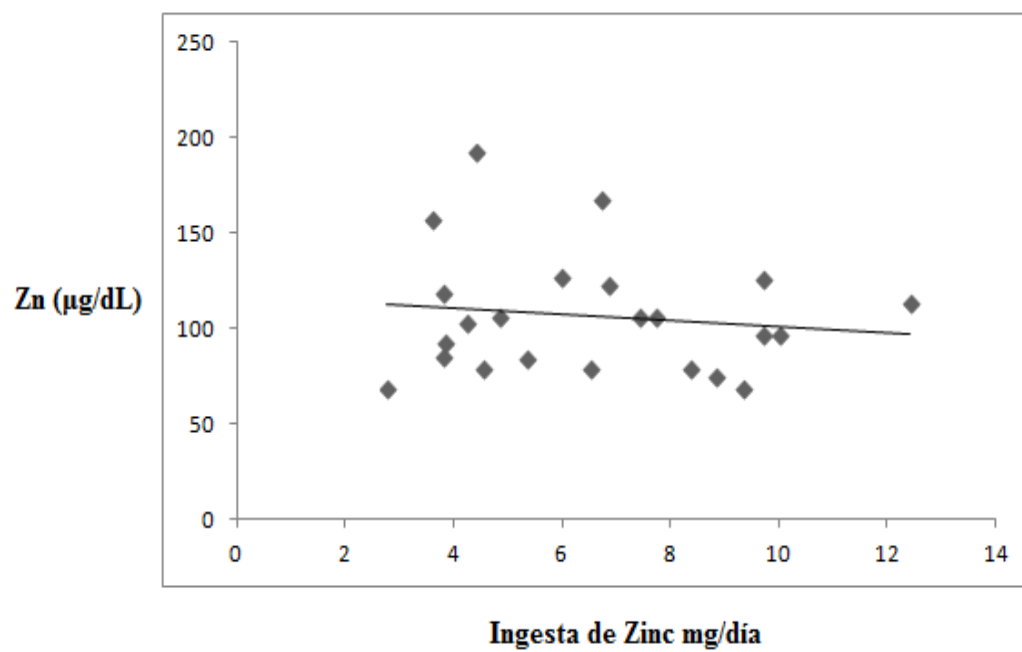
Metodología

- Colocar 7.5 mL de medio TYI-S-33 suplementado al 10% con suero bovino, en tubo de ensayo 13 x 100.
- Agregar 0.5 mL de cultivo confluyente de *G. lamblia* GS/M-83-H7 (1×10^6 trofozoitos/mL).
- Realizar la transferencia del parásito en condiciones estériles con la ayuda de una campana de flujo laminar.
- Cuando el cultivo vuelva a estar confluyente poner los tubos que contienen a *G. lamblia* en agua con hielo por 15 minutos.
- Juntar todo el cultivo en un tubo falcon de 50 mL y centrifugar a 1800 rpm por 7 minutos a 4 °C. Descartar el sobrenadante y al precipitado hacer 3 lavados con PBS 1X bajo las mismas condiciones de centrifugación.
- Recoger los trofozoitos que quedan como precipitado en un tubo eppendorf y resuspenderlos en un volumen final de 750 μ L de PBS. Sonicar hasta que quede una solución transparente. Medir la concentración final de la proteína y congelar a una temperatura de -80°C.

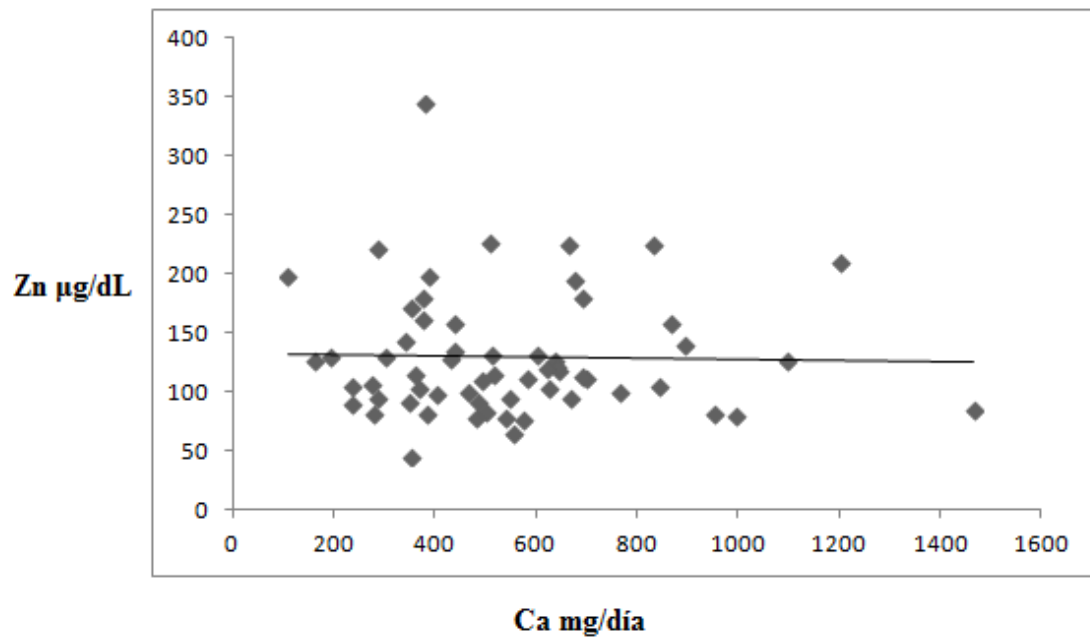
Apéndice 5.- Correlaciones entre zinc sérico e ingesta de zinc, zinc sérica e ingesta de calcio, zinc sérica y fibra.



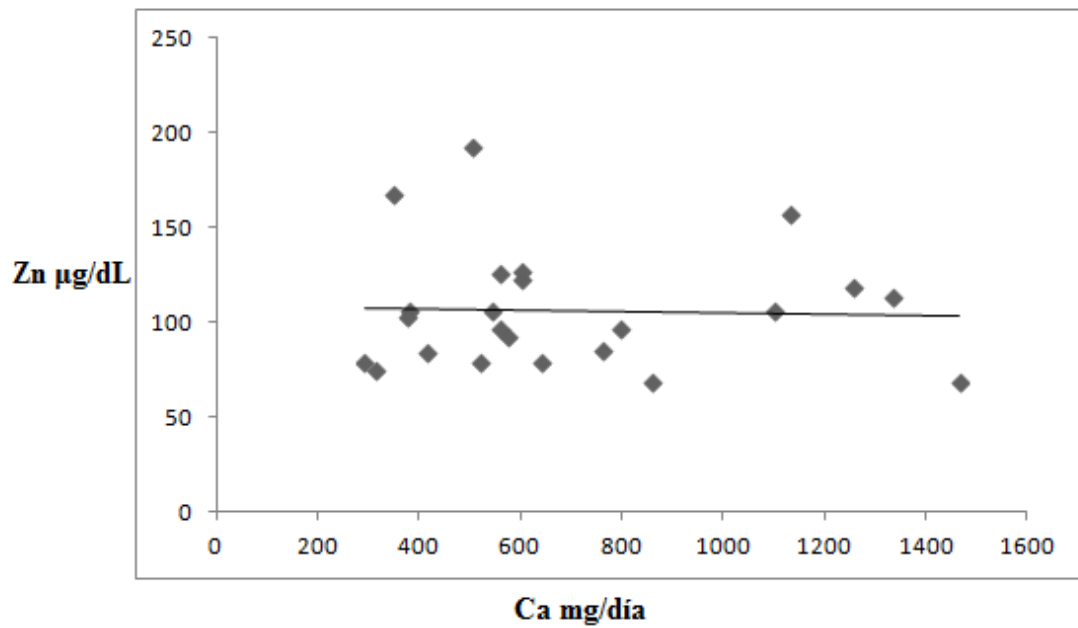
Análisis gráfico de la correlación entre Concentración de Zinc Sérico e Ingesta de Zn en niños no infectados por *Giardia lamblia*. Correlación de Spearman: $r = 0.08$ ($p = 0.50$).



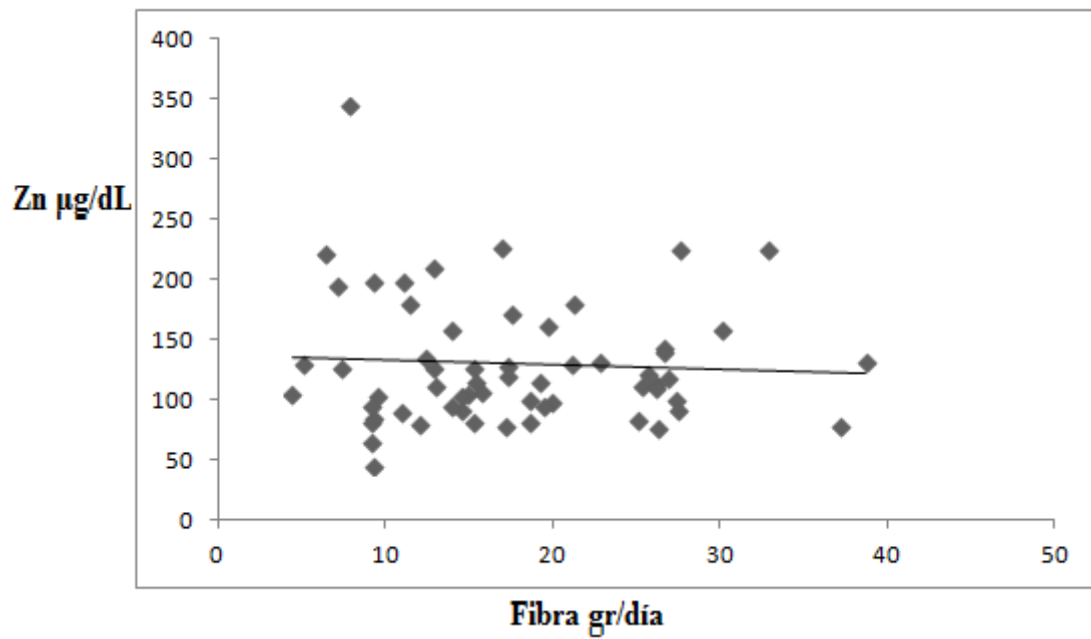
Análisis gráfico de la correlación entre Concentración de Zinc Sérico e Ingesta de Zn en niños infectados por *Giardia lamblia*. Correlación de Spearman: $r = -0.030$ ($p = 0.88$)



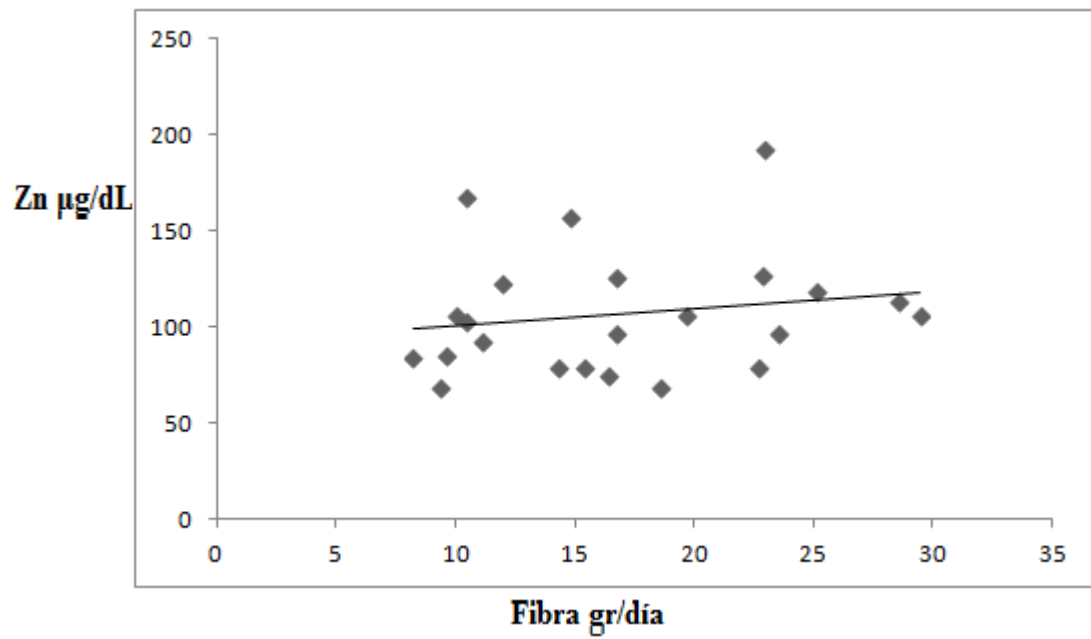
Análisis gráfico de la correlación entre Concentración de Zinc Sérico e Ingesta de Calcio en niños no infectados por *Giardia lamblia*. Correlación de Spearman: $r = -0.003$ ($p = 0.97$)



Análisis gráfico de la correlación entre Concentración de Zinc Sérico e Ingesta de Calcio en niños infectados por *Giardia lamblia*. Correlación de Spearman: $r = 0.006$ ($p = 0.97$)



Análisis gráfico de la correlación entre Concentración de Zinc Sérico e Ingesta de Fibra en niños no infectados por *Giardia lamblia*. Correlación de Spearman: $r = 0.029$ ($p = 0.82$)



Análisis gráfico de la correlación entre Concentración de Zinc Sérico e Ingesta de Fibra en niños infectados por *Giardia lamblia*. Correlación de Spearman: $r = 0.30$ ($p = 0.16$)