

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

Coinfección de *Giardia intestinalis* en pacientes con criptosporidiosis mediante la
amplificación del gen β -giardina

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el Título de:

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Jorge Antonio León Peraza

1942

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

APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de Jorge Antonio León Peraza, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.

Dra. Olivia Valenzuela Antelo

Presidente

M. en C. Martha Judith Valdéz Ortega

Secretario

M. en C. Alejandro Urrea Quezada

Vocal

M. en C. José Manuel Aguilar García

Suplente

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al equipo de trabajo que me abrió las puertas para que este trabajo pudiera culminarse, infinitas gracias para la Dra. Olivia Valenzuela que me dio las herramientas para poder lograrlo, al cDr. Alejandro Urrea que sin su ayuda esto no se hubiera logrado, tantos consejos y tiempo puesto en mí y mi trabajo, esas recomendaciones cada que lo veía en el laboratorio, esas idas a muestrear que siempre las hacíamos con alegría y ganas de seguir encontrando más y más parásitos.

Muchas gracias le doy a Dios por haberme dado a una madre incomparable y llena de amor, que me brindó e inculco valores tan importantes en mi persona, mi madre que siempre ha estado presente en cada momento, sin sus regaños y consejos no pudiera haber logrado todo lo que he alcanzado, cada sacrificio tiene su recompensa.

Gracias a mi padre que me dio la vida, y me ayudó a formar carácter en mi persona, siempre dándome sus consejos de cómo ser una mejor persona.

Agradezco a la hermana tan inteligente que Dios me dio, sus consejos y pláticas siempre me han servido para ser mejor cada día y tener otro punto de vista ante cada situación.

Agradezco a una de mis mejores amigas la arquitecta Angelica Valdez por haberme ayudado tanto en este proyecto y estar presente en cada uno de los momentos que necesité de su ayuda.

Agradezco a la gran amistad que forme en la carrera, mis amigas de corazón siempre presentes, a la QBC Graciela Acosta y a la QBC Karina Pellat que siempre me ayudaron en momentos de estudio y me ayudaron a superarme por más difícil que fuera el tema, sus explicaciones y apoyo brindado.

Gracias a mi familia y amigos por estar presente en cada momento que los necesité y que siempre me muestran ese apoyo incondicional, aquellos consejos que siempre uno necesita.

Agradezco al personal del Hospital Infantil del Estado de Sonora por haberme ayudado en la colección de muestras, a cDra. Mariana Gutiérrez y al cDr. Issac

González que siempre estuvieron presentes cuando necesité su ayuda, le doy gracias al maestro Tequida por facilitarme las horas que use el laboratorio y esas pláticas que me sirvieron para mejorar en mi trabajo.

DEDICATORIA

Este logro va especialmente para mis padres, que sin su apoyo incondicional este logro no lo hubiera alcanzado, desde que era muy pequeño me propuse como objetivo tener mi título universitario, y paso por paso los objetivos se van alcanzando, tengo metas más grandes que están por venir, todo es cuestión de saber a dónde quieres llegar y cumplir nuestros objetivos.

Este logro va para 2 angelotes que tengo, que desde arriba me ayudan y me cuidan en cada momento, va para ti tío Tomás que fuiste un padre en todo lo que estuviste con nosotros. Para mi abuela materna que siempre su cariño estuvo ahí, las personas que más queremos nunca se van siempre tienen un ojo puesto en nosotros.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABLAS	6
LISTA DE GRÁFICAS.....	6
OBJETIVOS.....	7
OBJETIVO GENERAL.....	7
OBJETIVOS PARTICULARES	7
RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
<i>Cryptosporidium</i> spp	10
Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium</i> spp.....	12
Criptosporidiosis	13
<i>Giardia intestinalis</i>	14
Ciclo de Vida de <i>Giardia intestinalis</i>	15
Giardiasis.....	16
Transición Parasitaria	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
Diseño del Estudio	20
Criterios de Inclusión.....	20
Consideraciones Bioéticas	20
Amplificación del Gen β -giardina de <i>Giardia intestinalis</i> Mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	20
Revelado Mediante Electroforesis de los Amplicones Productos de PCR.....	22
Análisis Estadístico.....	22
RESULTADOS	23
Edad y Género de los Participantes	24
Principal Cuadro Clínico de los Participantes	25
Descartar una Posible Coinfección con <i>Giardia intestinalis</i>	25

DISCUSIÓN.....	27
CONCLUSIÓN.....	28
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
ANEXOS.....	32
Anexo 1. Consentimiento Informado Presentado a los Tutores de los Pacientes Participantes.....	32

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Ooquistes de <i>Cryptosporidium spp</i> teñidos con Ziehl-Neelsen modificado.	11
2. Imagen representativa del ciclo de vida de <i>Cryptosporidium spp</i>	14
3. Trofozoítos y quistes de <i>Giardia intestinalis</i> . Crédito: Subdivisión de prevención de enfermedades transmitidas por el agua	18
4. Productos de PCR del gen β -giardina de <i>Giardia intestinales</i>	26

LISTA DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
1. Mezcla de reacción para la amplificación del gen β -giardina de <i>Giardia intestinalis</i>	21
2. Condiciones del termociclador para la amplificación del gen de β -giardina de <i>Giardia intestinalis</i>	21
3. Secuencia de los iniciadores utilizados en las reacciones de PCR para la amplificación del gen de β - giardina de <i>Giardia intestinalis</i>	22
4. Características clínicas de niños con criptosporidiosis	23

LISTA DE GRÁFICAS

GRÁFICA	PÁGINA
1. Intervalo de edad de los participantes	24
2. Género de los participantes	24
3. Aspectos clínicos de los participantes	25

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la coinfección con *Giardia intestinalis* en pacientes con criptosporidiosis.

OBJETIVOS PARTICULARES

Identificar la presencia de *Cryptosporidium* spp. en pacientes del Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) y Centro Médico Dr. Ignacio Chávez (CMDICH)

Identificar presencia de *G. intestinalis* en heces de pacientes del Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) y Centro Médico Dr. Ignacio Chávez (CMDICH) diagnosticados con criptosporidiosis

Evaluar la coinfección de *Giardia intestinalis* en pacientes con criptosporidiosis mediante la técnica de PCR.

RESUMEN

Giardia intestinalis y *Cryptosporidium spp.* son unas de las principales causas de diarrea en países en vías de desarrollo. Afectan principalmente a niños menores de 5 años y a personas inmunocomprometidas; provocando un impedimento en la absorción de nutrientes a edad temprana y deterioro en el crecimiento.

Ambos parásitos forman parte de las infecciones desatendidas a nivel mundial, según la OMS. Existen reportes en diferentes países sobre la coinfección de *Giardia intestinalis* en pacientes con *Cryptosporidium spp.*; en los cuales se menciona el impacto en el estado nutricional sobre todo en niños.

En la Universidad de Sonora se realiza un proyecto de investigación el cual cuenta con 38 muestras de ADN extraído de heces de pacientes con criptosporidiosis, todos ellos \leq nueve años de edad; la gastroenteritis aguda fue la manifestación clínica más frecuente en estos casos presentándose en el 82% de los sujetos de estudio, seguido de fiebre (33%), desnutrición (28%) y deshidratación (18%); estas manifestaciones clínicas son propias de la infección con *Cryptosporidium spp.*; sin embargo, aún no se ha determinado si existe coinfección con *Giardia intestinalis* en alguno de ellos.

INTRODUCCIÓN

Cryptosporidium spp. y *Giardia intestinalis* son los principales parásitos protozoarios patógenos intestinales que provocan diarrea, con una gran variedad de hospederos alrededor del mundo, incluidos humanos, animales domésticos y animales salvajes (1). Estos parásitos afectan principalmente a personas inmunocomprometidas (VIH/SIDA, cáncer), así como también a individuos con desnutrición, sobre todo a niños \leq cinco años (2). Provocando un impedimento en la absorción de nutrientes a edad temprana y deterioro en el crecimiento. Por lo cual en el 2004, la criptosporidiosis y la giardiasis fueron añadidas en unas de las principales enfermedades desatendidas a nivel mundial según la OMS, ya que estas enfermedades tienen un vínculo directo con las pobres medidas de sanidad de cada país (4) y una misma ruta de infección, por la vía fecal-oral (3).

Estos parásitos son un serio problema de salud en determinadas regiones del mundo debido a que se encuentran en agua y alimentos (5). El principal cuadro clínico de la giardiasis y la criptosporidiosis es la diarrea, después deshidratación, fiebre, náuseas y pérdida de peso (3). En particular *Giardia intestinalis* no es invasiva y coloniza la parte superior del intestino (duodeno), es frecuente encontrar portadores asintomáticos; sin embargo, en algunos casos los pacientes presentan diarrea aguda o crónica. Y *Cryptosporidium* spp. es un parásito emergente intracelular (enterocitos), que en el caso de personas inmunocomprometidas se ha logrado aislar extraintestinalmente (pulmón y conductos biliares) (8). Es un parásito emergente considerado a nivel mundial como la segunda causa de muerte asociada a diarrea en niños \leq de cinco años, solamente después de rotavirus (13).

Se estima que, a nivel mundial ocurren alrededor de 280 millones de casos de giardiasis anualmente (6, 7). Y *Cryptosporidium* presentaba una prevalencia de 1-4% en Europa y América del Norte y del 3-20% en África, Asia, Australia, Sur y Centroamérica (9). Recientemente se ha informado que el 60% de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos y agua en todo el mundo durante 2004-2010 fue ocasionada por *Cryptosporidium* spp. (10). El diagnóstico convencional de estos protozoarios se basa principalmente en el examen microscópico de muestras de heces (11) utilizando la tinción de lugol y la tinción de kinyoun; sin embargo, la microscopía está limitada por una baja sensibilidad.

Actualmente existe un vacío en información epidemiológica a nivel regional referente a la morbi-mortalidad ocasionada por parásitos emergentes. Considerando el aumento en la

incidencia de estas infecciones a nivel mundial es necesario implementar las técnicas apropiadas para la identificación de los mismos y evaluar el impacto de las coinfecciones.

***Cryptosporidium* spp.**

Cryptosporidium spp. es una coccidia, con *Cyclospora* y *Cystoisospora* al pertenecer al grupo de los Gregarinos, en el Phylum Apicomplexa. Los gregarinos son un grupo de parásitos que infectan principalmente el intestino. Estas tres coccidias (nomenclatura tradicional) se caracterizan por la eliminación de ooquistes con la materia fecal de los hospederos (12).

Cryptosporidium spp. es un parásito emergente considerado a nivel mundial como la segunda causa de muerte asociada a diarrea en niños \leq de cinco años, solamente después de rotavirus (13).

El género *Cryptosporidium* spp. constituido por diversas especies, puede causar infección gastrointestinal en una amplia variedad de mamíferos, incluido el hombre. Está asociado a morbilidad y mortalidad significativas tanto en países desarrollados como subdesarrollados (14).

La forma infectiva de *Cryptosporidium* spp. es el ooquiste, estadio de resistencia del parásito que permite la diseminación de la infección, el cual mide entre 4.5 y 5.9 μm de diámetro (Figura 1) y contiene en su interior 4 esporozoítos. Los esporozoítos son el estadio que participa en la adhesión e invasión de las células blanco (enterocitos), proceso mediado por proteínas del complejo apical el cual se encuentra en uno de los extremos de cada esporozoíto (15). El diámetro reportado para los esporozoítos de *Cryptosporidium* spp. oscilan entre 3.8 - 5.2 μm (16). La resistencia a condiciones adversas y a los tratamientos de potabilización del agua permiten su diseminación y persistencia en el ambiente (17).

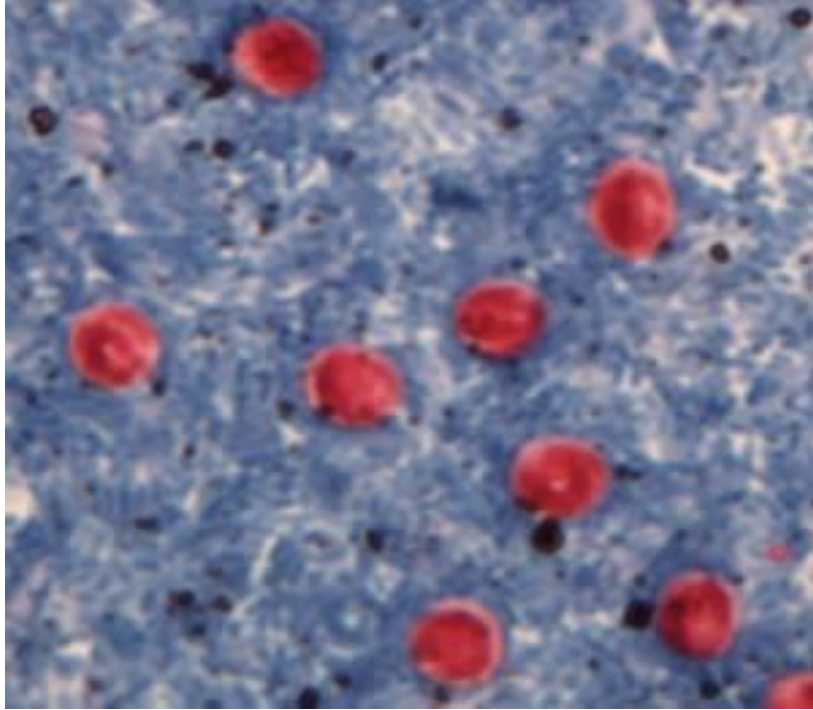


Figura 1. Ooquistes de *Cryptosporidium* spp. teñidos con Ziehl-Neelsen modificado (CDC, 2016)

Ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp

Una vez ingeridos los ooquistes, *Cryptosporidium* spp. no penetra profundamente en el citosol de la célula huésped, sino que descansa sobre un pedestal de filamentos de actina que se forman en las superficies apicales de las células epiteliales del intestino (18). Después se produce un proceso denominado desenquistamiento, es decir, la apertura de la pared del ooquiste a lo largo de una línea se rompe; esto permite que los cuatro esporozoítos sean liberados para producir la invasión (19). El desenquistamiento es un proceso que se cumple exclusivamente en parásitos metabólicamente activos y que involucra la acción de enzimas parasitarias como la cisteín proteinasa, cuya función es degradar moco, y en segundo lugar, la acción de enzimas intestinales (20, 21). Los requerimientos necesarios para iniciar el desenquistamiento incluyen cambios en la temperatura y el pH, sales biliares y acción de proteasas. El contacto directo entre los ooquistes y el ácido siálico presente en la superficie de las células intestinales también constituye un estímulo para el desenquistamiento (22).

Los esporozoítos liberados son móviles e invaden activamente a los enterocitos (12), para iniciar el ciclo asexual de reproducción (Figura 2). Los esporozoítos y todas las etapas asexuales y sexuales endógenas subsecuentes se desarrollan dentro de una vacuola parasitófora intracelular. Los esporozoítos se diferencian en trofozoítos esféricos y la división nuclear da como resultado la producción del estadio multinucleado de meronte. Los esquizontes tipo I contienen de seis a ocho núcleos que maduran en merozoítos. Los merozoítos de los esquizontes tipo I pueden infectar células vecinas y someterse a un ciclo de multiplicación asexual similar al descrito para la etapa de trofozoíto, y producir progenie de merozoítos de tipo I, o desarrollarse en un esquizonte de tipo II. Cada esquizontes de tipo II maduro se desarrolla a cuatro merozoítos de tipo II los cuales inician el ciclo sexual (16).

En la multiplicación sexual, los merozoítos individuales producen microgametos (masculino) o macrogametos (femenino). La división nuclear en el microgameto conduce a la producción de numerosos microgametos que se liberan de la vacuola parasitófora y cada macrogameto es fertilizado por un microgameto.

El producto de la fertilización, el cigoto, se convierte en un ooquiste. El cigoto se diferencia a ooquistes de pared delgada los cuales participan en el proceso de autoinfección, sobre todo en personas con estreñimiento; estos ooquistes de pared delgada maduran a ooquistes de pared gruesa que son los que se excretan en las heces fecales como ooquistes

completamente esporulados (cada uno de ellos con cuatro esporozoítos), los cuales serán infecciosos para otros huéspedes susceptibles. En este ciclo de vida, tanto los merozoítos que participan en la generación de merontes tipo I (esquizontes tipo I) como la reinfección endógena de los ooquistes de pared delgada aseguran un gran número de ooquistes infecciosos (de paredes gruesas) se excreten en las heces (16).

Criptosporidiosis

Las especies del género *Cryptosporidium* spp. son de distribución cosmopolita. El principal mecanismo de infección es la ingestión de ooquistes esporulados por contacto directo, ya sea por la ingesta de agua o alimentos contaminados, también por la vía indirecta (fómites) con el hospedador. Este género presenta características epidemiológicas particulares: la dosis infectiva es baja (1 a 10 ooquistes), los ooquistes no requieren maduración exógena una vez eliminados, presentan notable resistencia frente a condiciones adversas y se dispersan en el ambiente con la consecuente contaminación del agua destinada al consumo humano (23).

Afecta principalmente a niños y personas inmunocomprometidas, los cuales, generalmente presentan los signos y síntomas de la gastroenteritis aguda: diarrea, dolor abdominal y en algunos casos vómito y fiebre (15).

Las principales manifestaciones clínicas de la criptosporidiosis en personas inmunocomprometidas son las diarreas, en particular las diarreas son más intensas y de más larga duración. En personas desnutridas, sobre todo en niños, las diarreas son particularmente intensas y prolongadas. En individuos con inmunocompromiso reversible, la intensidad y duración de las diarreas dependen del grado de incompetencia del sistema inmunológico (24).

El diagnóstico de criptosporidiosis intestinal se efectúa mediante la búsqueda e identificación de ooquistes en la materia fecal (15). Para la identificación de los ooquistes al microscopio óptico, suelen utilizarse las técnicas de coloración de Ziehl-Neelsen modificado (tinción de kinyoun). También pueden emplearse tinciones para microscopía de fluorescencia. En la actualidad se recurre a técnicas moleculares para identificar especies/genotipos de *Cryptosporidium* spp. ya que las diferencias en los ooquistes son morfológicamente indistinguibles (19).

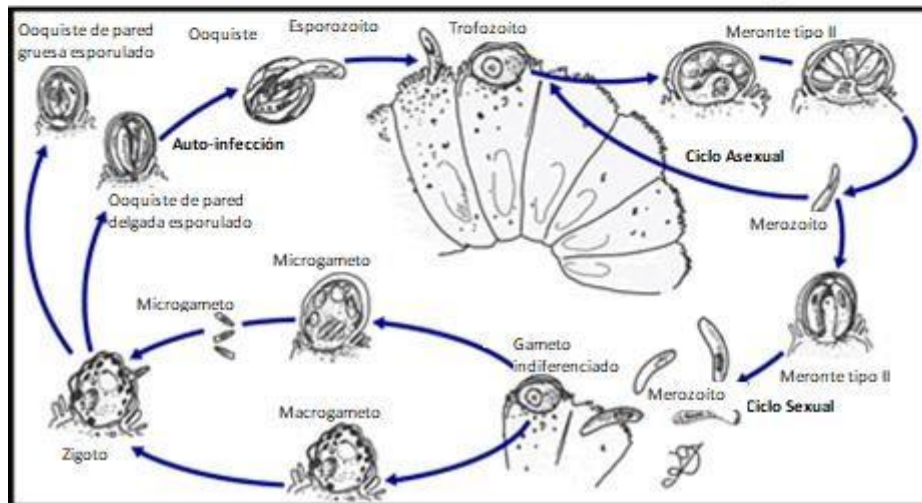
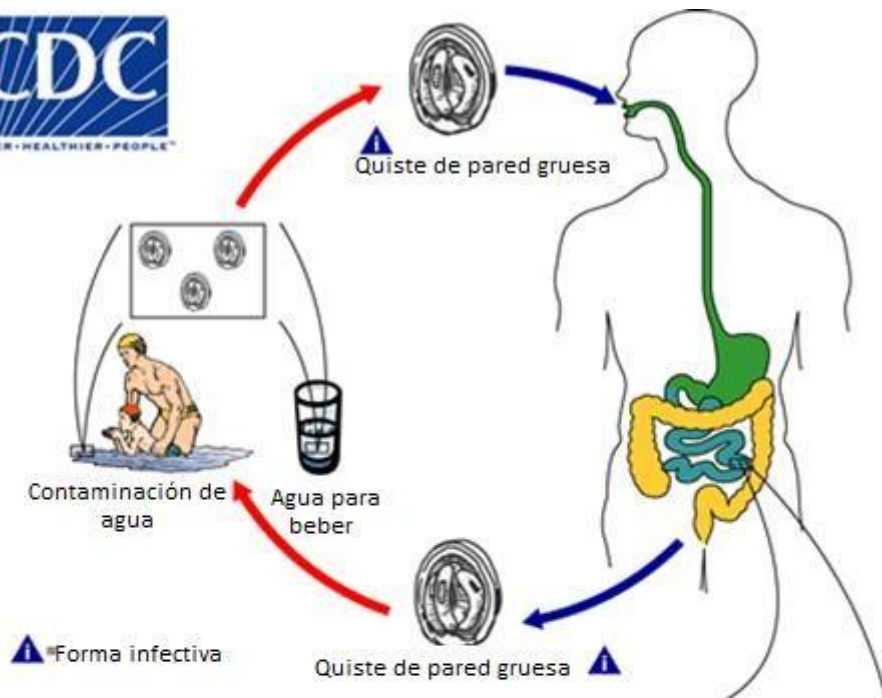


Figura 2. Imagen representativa del ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp (CDC, 2016).

Giardia intestinalis

Giardia intestinalis es un protozoo que ha sido estudiado desde hace 300 años, fue identificado por primera vez por Antony Van Leeuwenhoek. Es un protozoo flagelado del phylum *Sarcomastigophora*, subphylum *Mastigophora*, agente causal de la giardiasis (25). Este parásito se divide en ocho grupos genéticos, denominados ensamblajes que van de A-H. Los ensamblajes A y B son los principales ensamblajes que pueden llegar a infectar a humanos (25), aunque un informe reciente ha descrito infecciones humanas con ensamblaje E.

Las giardinas son proteínas producidas por *Giardia intestinalis*; hasta la fecha, nada en la literatura indica la presencia de proteínas similares en citoesqueletos de otros tipos de células. Estas proteínas se encuentran principalmente localizada en el disco ventral y en el axostilo (26).

Ciclo de vida de *Giardia intestinalis*

Este protozoo posee varias características particulares; el quiste tiene cuatro núcleos, lo que después del proceso de desenquistamiento da lugar a cuatro trofozoítos (27). Los trofozoítos de *Giardia intestinalis* se dividen por fisión binaria y no invaden células epiteliales. Se mueven con la ayuda de los flagelos (n=8) y se unen al epitelio mediante un disco ventral (28). El disco ventral es esencial para la adhesión del parásito y es un importante factor de virulencia (7). Varias proteínas asociadas al disco ventral han sido identificadas usando herramientas que evalúan la función de las proteínas (7).

Los quistes se excretan en las heces y estos son el estadio infeccioso (29); los quistes al salir pasan por las heces y pueden ser transmitidos de dos maneras, ya sea directa o indirectamente. Estos quistes infecciosos pueden sobrevivir durante semanas o meses en el suelo y el agua (4, 6).

Giardiasis

La giardiasis se incluyó en el grupo de las enfermedades desatendidas a nivel mundial según la OMS en 2004 (4). Se encuentra en todo el mundo, con una prevalencia que oscila entre el 20 y el 30% en el mundo en desarrollo y el 3-7% en las naciones industrializadas (30).

La mayoría de las infecciones por *Giardia intestinalis* en humanos resulta ser asintomática, mientras que otras se vuelven una enfermedad aguda o crónica asociada a una diarrea severa, además generando una mala absorción en nutrientes y problemas en el peso. Los principales factores de riesgo para que se manifieste la enfermedad es la capacidad del estado inmune del huésped, edad, estado nutricional y que genotipo de la cepa sea (26).

Para el diagnóstico de la giardiasis es difícil ya que el cuadro clínico resulta ser inespecífico y se asemeja a otras enfermedades gastrointestinales. Las características clínicas más generales de esta enfermedad son náuseas, vómito, dolor de cabeza, flatulencias, y pueden variar desde diarrea hasta estreñimiento (31). Estos síntomas aparecen 6-15 días después de la infección (6).

La giardiasis es rutinariamente diagnosticada por el examen microscópico de heces, endoscopia y los antecedentes epidemiológicos (32).

Observación microscópica de trofozoítos (en materia fecal acuosa mediante el examen directo en fresco, con solución salina y lugol) y quistes (en materia fecal sólida o semisólida, se utilizan exámenes coproparasitológicos de concentración por flotación), estudios de baja sensibilidad y alta especificidad. Si resultan negativos, se opta por ELISA para captura de coproantígenos. Varios estudios han reportado especificidades de 87–100% y sensibilidades de 63–100% y algunos falsos negativos, corroborados mediante técnicas basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para confirmar la presencia del parásito (33). Uno de los genes más utilizados para la caracterización genética de *Giardia intestinalis* es el gen de la β -giardina que codifica para la proteína β -giardina presente únicamente en el citoesqueleto de *Giardia intestinalis*, en ningún otro parásito se presenta. La utilización del gen β -giardina sirve para la caracterización genética de *Giardia intestinalis* y para evaluar la posible transmisión zoonótica del parásito.

Se ha reportado que en caso de una coinfección de *Giardia intestinalis* con otras infecciones bacterianas o virales, la infección por *Giardia intestinalis* puede manifestarse como úlceras en la mucosa intestinal y es visto mediante endoscopia aunque suele ser una técnica invasiva (32).

Hay varios medicamentos anti-giardiales, como el Albendazol (compuestos de bencimidazol) que actualmente se emplean para tratar la giardiasis (34). El cuadro básico de medicamentos Instituto Mexicano del Seguro Social indica que para combatir a la giardiasis se suministran diferentes dosis de anti-giardiales como Metronidazol, Nitazoxanida y Tinidazol.

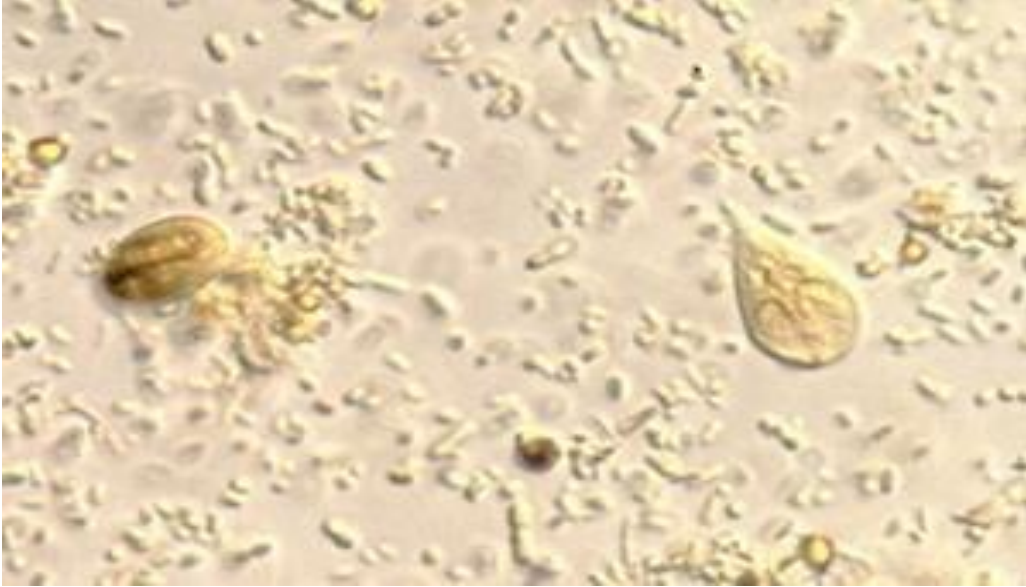


Figura 3. Trofozoítos y quistes de *Giardia intestinalis*. (CDC,2016)

Transición parasitaria

La transición parasitaria se relaciona en forma directa con las características geográficas y ecológicas específicas del lugar, tanto como las condiciones de saneamiento básico disponibles y los factores socioeconómicos y culturales del país. Así mismo, la presencia del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) en algunas personas, las hace más vulnerables a coinfección y presentar complicaciones clínicas causadas por parásitos intestinales como *Cryptosporidium* spp. (24).

Cada hospedero es diferente, y gracias a distintos mecanismos de defensa de cada individuo, es limitado el daño que ocasionan estos parásitos, a esto se le conoce como tolerancia (genes de reparación de tejidos y eliminación de toxinas). La gran diferencia es que la resistencia reduce el riesgo de infección y/o la tasa de replicación del parásito en el hospedero, mientras que la tolerancia no (35). A pesar de esto, existen factores de riesgo que aumentan la posibilidad del desarrollo de la enfermedad.

Actualmente se desarrolla un proyecto sobre la caracterización de la respuesta inmune de pacientes con criptosporidiosis en la Universidad de Sonora; para lo cual es de suma importancia determinar que en los casos no exista coinfección con otros agentes infecciosos; siendo *Giardia intestinalis* un parásito intestinal que produce en algunos pacientes síntomas similares a los casos con *Cryptosporidium* spp. Es necesario determinar la presencia o no del mismo en los casos de estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del Estudio

Este es un estudio transversal descriptivo.

Criterios de Inclusión

Se analizaron las muestras de ADN total de heces de 38 pacientes con diagnóstico etiológico y clínico de criptosporidiosis; edad y género indistinto. Es importante mencionar que la extracción de ADN (Anexo 1), así como el estudio coproparasitoscópico (tinción de Kinyoun y lugol) se realizaron previo a este trabajo (8).

Consideraciones Bioéticas

El protocolo de investigación está aprobado por los comités de ética de las instituciones participantes: Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) y Centro Médico Dr. Ignacio Chávez (CMDICH). El consentimiento informado fue obtenido del tutor de cada participante infectado con *Cryptosporidium* spp después de una clara explicación de los objetivos de la investigación (Anexo 2).

Amplificación del Gen β -giardina de *Giardia intestinalis* mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se etiquetó un tubo como mezcla de reacción para cada marcador molecular y se vació en él los reactivos por orden (Tabla 1). Se multiplicaron todos los reactivos por el total de muestras a amplificar con objeto de que al realizar esta mezcla se vaciara la cantidad exacta de los reactivos que conforman la mezcla de reacción y sea la cantidad adecuada para que se pueda llevar a cabo la amplificación. Se prepararon los tubos controles, los tubos muestra y se colocaron en el termociclador MyCycler™ (BIO RAD) se encendió y programó con las condiciones específicas según los iniciadores utilizados (36, 37) (Tabla 2) (8).

Tabla 1. Mezcla de reacción para la amplificación del gen β -giardina de *Giardia intestinalis*

Mezcla / Reactivo	Volumen
Agua	37.25 μ L
Amortiguador (10X)	5.0 μ L
MgCl ₂ (25 mm)	3.0 μ L
Iniciadores	
SSU rDNA 5' (10 μ M)	1.3 μ L
SSU rDNA 3' (10 μ M)	1.3 μ L
dNTP's (10mmol)	1 μ L
Taq polimerasa (5 U/ μ L)	0.15 μ L
Muestra (ADN)	1.0 μ L
TOTAL	50.0 μ L

Tabla 2. Condiciones del termociclador para la amplificación del gen de β -giardina de *Giardia intestinalis*

	Temperatura	Tiempo (segundos)
Inicial	95°C	300
35 ciclos	94°C	30
	67°C	30
	72°C	60
Final	72°C	300

Para amplificar una región polimórfica de ~809 pb del gen de la β -giardina se emplearon los siguientes iniciadores: G7 y G759 (36). Para amplificar una región intergénica del ADN de los cuales amplifican un segmento de 780 pb respectivamente.

G7 (FW)	AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC	753 pb
G759 (RV)	GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC	

Tabla 3. Secuencia de los iniciadores utilizados en las reacciones de PCR para la amplificación del gen de β -giardina de *Giardia intestinalis*.

Revelado Mediante Electroforesis de los Amplicones Productos de PCR

Se preparó el gel de agarosa al 1.2%. Para lo cual pesaron 0.36 g de agarosa y se disolvieron en 30 mL de amortiguador TAE 1X con Sybersafe. Se calentaron los reactivos (Gel de agarosa y Buffer TAE 1X con Sybersafe) dentro del microondas en un frasco de vidrio por 25 segundos, se esperó a que enfriara y se dejó gelificar en el soporte para el gel. El gel se montó en la cámara de electroforesis y se agregó aproximadamente 300 mL de solución TAE 1X. En el primer pocillo del gel se agregaron 2 μ L del marcador de pares de bases TrackIt™ 100 bp DNA Ladder (invitrogen; EUA) mezclado con 2 μ L de amortiguador de carga. Para los siguientes siete pocillos se mezclaron 7 μ L de amplicón y 2 μ L de amortiguador de carga. Se realizó la corrida electroforética con 100 volts por treinta minutos. Acabado el tiempo se escurrió el gel y se colocó en un fotodocumentador GelDoc™ XR+ (BIO RAD) para tomar la foto.

Análisis Estadístico

Para el análisis de resultados se determinó el porcentaje de coinfección en pacientes con criptosporidiosis en tablas del programa Excel (Tabla 4).

Tabla 4. Características clínicas de niños con criptosporidiosis

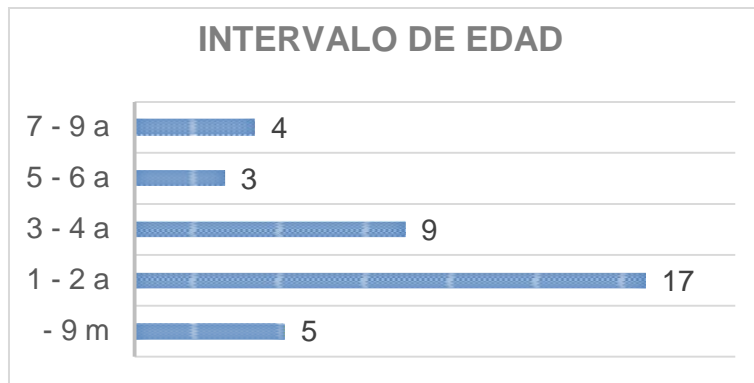
CLAVE	EDAD	SEXO	ASPECTOS CLÍNICOS
S1	9 años	M	VIH Desnutrición severa Gastroenteritis Candidiasis oral Sepsis
S2	1 año	M	Desnutrición moderada Gastroenteritis aguda Neumonía Enfermedad granulomatosa pulmonar
S3	8 meses	M	Deshidratación Gastroenteritis aguda
S4	7 meses	F	Desnutrición leve Gastroenteritis aguda Deshidratación Neumonía
S8	4 años	F	Gastroenteritis aguda Diarrea Vómito
S9	3 años	F	Gastroenteritis Dolor Abdominal
S10	1 año	F	Desnutrición crónica Gastroenteritis aguda Diarrea Vómito Fiebre
S11	4 años	M	Diarrea
S12	6 años	M	VIH Desnutrición grado III Gastroenteritis Neumonía Diarrea Candidiasis oral Tuberculosis pulmonar Herpes
S13	3 años	M	Gastroenteritis aguda Deshidratación Vómito Diarrea Dolor abdominal
S14	5 meses	F	Desnutrición crónica Deshidratación Diarrea
S15	3 años	F	Desnutrición Severa Gastroenteritis aguda Diarrea Vómito Hepatitis B Hipotiroidismo
S16	2 años	M	Otitis aguda Diarrea Fiebre Vómito
S17	1 año	M	Desequilibrio hídrico electrolítico remitido Deshidratación severa Gastroenteritis aguda Diarrea
S18	3 años	M	Doudenitis crónica severa Positivo Colitis Diarrea
S19	4 años	F	Otitis aguda Dolor abdominal Nauseas Dolor de cabeza
S21	7 años	F	-
S20	2 años	F	-
S22	2 años	M	Diarrea crónica
S23	3 años	F	Estreñimiento Diarrea Dolor abdominal Vómito Flatulencias Dolor de cabeza y piernas
S25	2 años	M	-
S24	2 años	M	Sinusitis
S26	5 años	F	Gastroenteritis
S27	5 años	M	Dispepsia Dolor abdominal Diarrea
S29	9 meses	F	Gastroenteritis aguda Diarrea Dolor abdominal Vómito Fiebre
S30	1 año	M	Gastroenteritis aguda Desnutrición severa Deshidratación moderada Fiebre Malestar general
S31	1 año	F	Gastroenteritis aguda Deshidratación Desnutrición leve Diarrea Vómito Flatulencias
S32	1 año	M	Tuberculosis pulmonar Dolor abdominal Flatulencias
S33	7 años	M	Dolor abdominal Nauseas Vómito Diarrea Flatulencias
S37	5 meses	F	Desnutrición severa Conguntivitis Neumonía Fiebre Flatulencias Hincharción
S38	3 años	M	Dolor abdominal Nauseas Vómito Diarrea Flatulencias
S40	2 años	F	Gastroenteritis aguda Diarrea Dolor abdominal Fiebre Vómito Flatulencias
S41	1 año	F	Gastroenteritis aguda Diarrea Dolor abdominal Fiebre Dolor de cabeza
S42	1 año	F	Gastroenteritis aguda Fiebre Vómito Flatulencias
S43	8 años	M	Infección en vías urinarias Dolor abdominal Fiebre Dolor de cabeza Vómito Nauseas Flatulencias
S44	2 años	M	Dolor abdominal Flatulencias
S46	1 año	F	Gastroenteritis aguda Desnutrición Severa Epilepsia Retinopatía Dolor abdominal Fiebre Diarrea Vómito Flatulencias
S47	2 años	M	-

RESULTADOS

Edad y Género de los Participantes

En este estudio se incluyeron 38 pacientes con criptosporidiosis que provenían de distintos hospitales, el 76% de las muestras fueron del Hospital infantil del estado (HIES) ,17% del Hospital Dr. Ignacio Chávez y 7% por médicos particulares; todos ellos ≤ 9 años de edad.

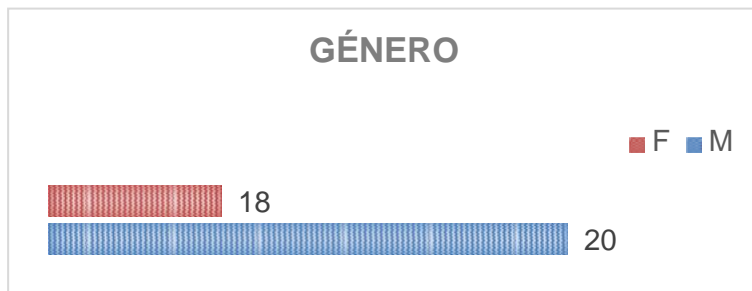
El 82% (31/38) de los niños fueron \leq cuatro años.



Gráfica 1. Intervalo de edad de los participantes.

A= años M= meses

El 53% de los casos reclutados en el estudio son del sexo masculino (20/38)

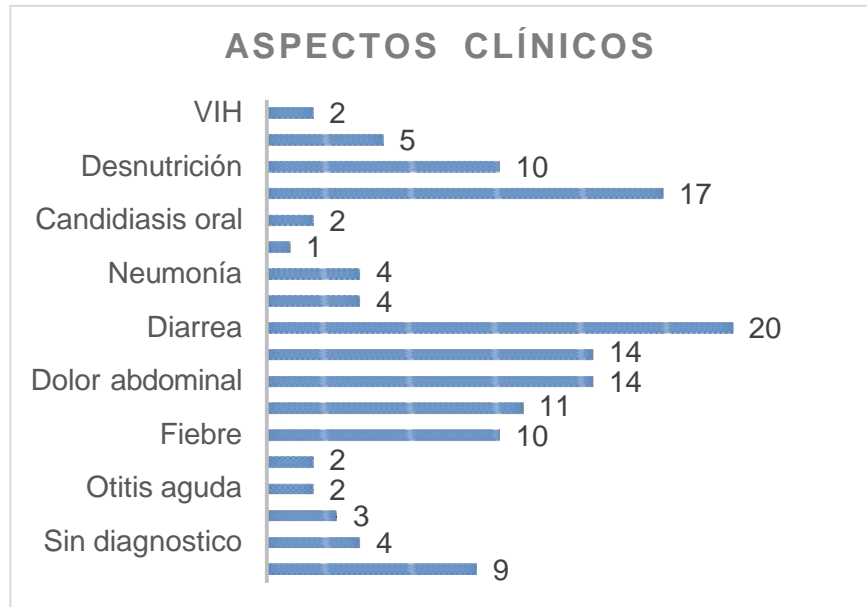


Gráfica 2. Género de los participantes.

F=femenino M=masculino

Principal cuadro clínico de los participantes

En este estudio se encontró a la gastroenteritis aguda como la principal manifestación clínica en el 82% (31/38) de los casos.



Gráfica 3. Aspectos Clínicos de los participantes.

Confección con *Giardia intestinalis*

Para descartar la presencia de otro enteroparásito como agente causal de diarrea se buscó la presencia de *Giardia intestinalis* mediante PCR.

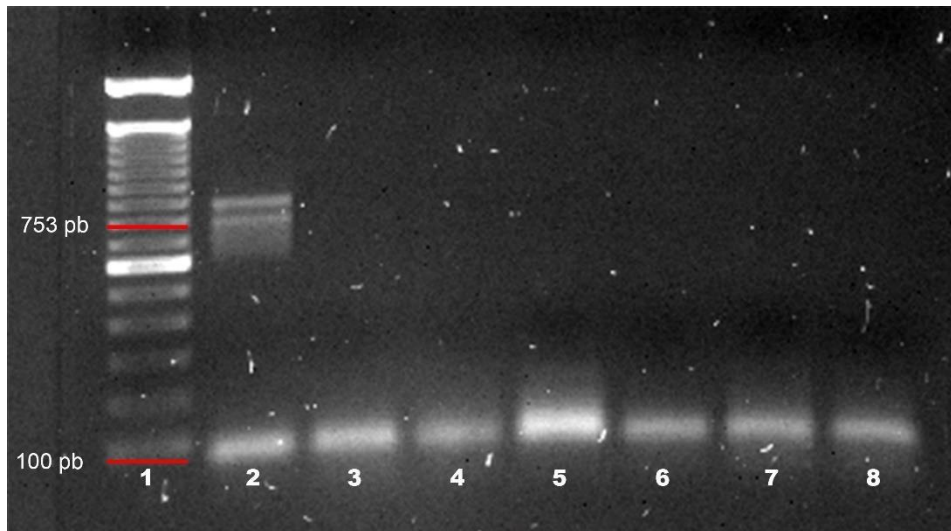


Figura 4. Productos de PCR del gen β -giardina de *Giardia* intestinales. Carril 1, marcador molecular (pb); carril 2, control positivo de *Giardia intestinalis*; carril 3, muestra perro; carril 4, paciente S14; carril 5, paciente S15; carril 6, paciente S16; carril 7, paciente S17; carril 8, control negativo.

DISCUSIÓN

Los principales factores de riesgo de las infecciones parasitarias que están expuestos los pacientes son la edad, los malos hábitos de higiene, la contaminación de los alimentos y agua potable, los cuales son puntos clave para la prevención y control de estas infecciones.

En la mayoría de los reportes se menciona que la criptosporidiosis tiene un bajo porcentaje de fiebre en los pacientes; en contraste a este estudio muestra que es alta la tasa de pacientes que presentaron diarrea (77%), no es posible atribuirle a *Cryptosporidium* spp. el causante de la misma, es importante mencionar que dentro de las limitantes del estudio es que no se determinó la presencia de virus (rotavirus), los cuales son mayormente asociados a fiebre.

Según las referencias bibliográficas que ayudaron para este estudio, se encontraron escasos reportes del impacto de coinfección por protozoarios intestinales; la mayoría de los autores discuten el impacto de la coinfección de los protozoarios y virus. En este estudio es posible ver que no existió coinfección de *Cryptosporidium* con *Giardia intestinalis*, pero no cabe duda que es de suma importancia su análisis para determinar si el cuadro clínico es propiamente causado por *Cryptosporidium* spp.

Una de las posibles causas de que no existiera coinfección de *Giardia intestinalis* en pacientes con criptosporidiosis se podría explicar debido a que algunos de estos pacientes refirieron tratamiento antiparasitario que pudo eliminar a *Giardia* que es susceptible a estos tratamientos convencionales (Metronidazol y Tinidazol); en contraste se ha descrito que *Cryptosporidium* no puede ser eliminado con estos antiparasitarios.

CONCLUSIÓN

Es necesario continuar con estudios epidemiológicos que permitan determinar la principal fuente de infección y/o ruta de transmisión, así como el riesgo de salud pública para los pacientes con desnutrición, además de conocer el o los agentes etiológicos en casos de gastroenteritis aguda, para poder brindar un tratamiento adecuado a los pacientes. Son de suma importancia los estudios moleculares para un mayor entendimiento de las infecciones parasitarias, descartar posibles coinfecciones, conocer las rutas de transmisión de estos y así establecer mejores medidas de prevención.

Se descartó la coinfección de *Giardia intestinalis* y *Cryptosporidium* spp., a pesar de que estos parásitos comparten un similar cuadro clínico en los pacientes con giardiasis y criptosporidiosis, afectando así la salud de los pacientes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Xiao L, Fayer R. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int J Parasitol*. 2008;38(11):1239-55.
2. Hunter PR, Nichols G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(1):145-54.
3. Huang J, Yue D, Qi M, Wang R, Zhao J, Li J, et al. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Ningxia, northwestern China. *BMC Vet Res*. 2014;10:292.
4. Savioli L, Smith H, Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends Parasitol*. 2006;22(5):203-8.
5. Devera R, Blanco Y, Cabello E. [High prevalence of *Cyclospora cayentanensis* among indigenous people in Bolivar State, Venezuela]. *Cad Saude Publica*. 2005;21(6):1778-84.
6. Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(6):413-22.
7. Einarsson E, Ma'ayeh S, Svärd SG. An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Curr Opin Microbiol*. 2016;34:47-52.
8. Valenzuela O, González-Díaz M, Garibay-Escobar A, Burgara-Estrella A, Cano M, Durazo M, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in children from Mexico. *PLoS One*. 2014;9(4):e96128.
9. Current WL, Garcia LS. Cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev*. 1991;4(3):325-58.
10. Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water Res*. 2011;45(20):6603-14.
11. Boughattas S, Behnke JM, Al-Ansari K, Sharma A, Abu-Alainin W, Al-Thani A, et al. Molecular Analysis of the Enteric Protozoa Associated with Acute Diarrhea in Hospitalized Children. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:343.
12. Wetzel DM, Schmidt J, Kuhlenschmidt MS, Dubey JP, Sibley LD. Gliding motility leads to active cellular invasion by *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *Infect Immun*. 2005;73(9):5379-87.
13. Collaborators GMAcOD. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016;388(10053):1459-544.
14. Cacciò SM, Thompson RC, McLaughlin J, Smith HV. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol*. 2005;21(9):430-7.
15. Del Coco VF, Córdoba MA, Basualdo JA. [Cryptosporidiosis: an emerging zoonosis]. *Rev Argent Microbiol*. 2009;41(3):185-96.
16. Smith HV, Nichols RA, Grimason AM. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends Parasitol*. 2005;21(3):133-42.
17. Sibley LD. Intracellular parasite invasion strategies. *Science*. 2004;304(5668):248-53.
18. Dobrowolski JM, Niesman IR, Sibley LD. Actin in the parasite *Toxoplasma gondii* is encoded by a single copy gene, ACT1 and exists primarily in a globular form. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1997;37(3):253-62.
19. Fayer R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol*. 2004;126(1-2):37-56.
20. Boulter-Bitzer JI, Lee H, Trevors JT. Molecular targets for detection and immunotherapy in *Cryptosporidium parvum*. *Biotechnol Adv*. 2007;25(1):13-44.
21. Pezzani BC, Bautista E, Córdoba A, De Luca MM, Basualdo JA. [Factors affecting the in vitro excystation of *Cryptosporidium* sp]. *Rev Argent Microbiol*. 1998;30(3):138-42.
22. Choudhry N, Bajaj-Elliott M, McDonald V. The terminal sialic acid of glycoconjugates on the surface of intestinal epithelial cells activates excystation of *Cryptosporidium parvum*. *Infect Immun*. 2008;76(8):3735-41.

23. Basualdo J, Pezzani B, De Luca M, Córdoba A, Apezteguía M. Screening of the municipal water system of La Plata, Argentina, for human intestinal parasites. *Int J Hyg Environ Health*. 2000;203(2):177-82.
24. Fregonesi BM, Suzuki MN, Machado CS, Tonani KA, Fernandes AP, Monroe AA, et al. Emergent and re-emergent parasites in HIV-infected children: immunological and socio-environmental conditions that are involved in the transmission of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(6):753-8.
25. Monis PT, Caccio SM, Thompson RC. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol*. 2009;25(2):93-100.
26. Faubert G. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(1):35-54, table of contents.
27. Bernander R, Palm JE, Svärd SG. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. *Cell Microbiol*. 2001;3(1):55-62.
28. Elmendorf HG, Dawson SC, McCaffery JM. The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *Int J Parasitol*. 2003;33(1):3-28.
29. Luján HD, Mowatt MR, Nash TE. Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1997;61(3):294-304.
30. Roxström-Lindquist K, Palm D, Reiner D, Ringqvist E, Svärd SG. *Giardia* immunity--an update. *Trends Parasitol*. 2006;22(1):26-31.
31. Adam RD. The biology of *Giardia* spp. *Microbiol Rev*. 1991;55(4):706-32.
32. Zhen Y, Liao L, Zhang H. Intestinal Giardiasis Disguised as Ulcerative Colitis. *Case Rep Gastrointest Med*. 2018;2018:8968976.
33. Koehler AV, Jex AR, Haydon SR, Stevens MA, Gasser RB. *Giardia*/giardiasis - a perspective on diagnostic and analytical tools. *Biotechnol Adv*. 2014;32(2):280-9.
34. Karabay O, Tamer A, Gunduz H, Kayas D, Arinc H, Celebi H. Albendazole versus metronidazole treatment of adult giardiasis: An open randomized clinical study. *World J Gastroenterol*. 2004;10(8):1215-7.
35. Råberg L. How to live with the enemy: understanding tolerance to parasites. *PLoS Biol*. 2014;12(11):e1001989.
36. Santín M, Gómez-Muñoz MT, Solano-Aguilar G, Fayer R. Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. *Parasitol Res*. 2011;109(1):205-12.
37. Valenzuela O, Morán P, Ramos F, Cardoza JI, García G, Valadez A, et al. Two different chitinase genotypes in a patient with an amebic liver abscess: a case report. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;80(1):51-4.



UNIVERSIDAD DE SONORA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

“Caracterización molecular e inmunológica de genotipos de *Cryptosporidium* spp. en pacientes sintomáticos y asintomáticos”

I. DATOS GENERALES.

1. NÚMERO DE FOLIO: _____

II. IDENTIFICACION.

2. NOMBRE DEL PACIENTE: _____

(Apellido paterno, materno y nombre)

3. EDAD: _____

4. SEXO: _____

5. LUGAR DE RESIDENCIA (COLONIA):

III. INDICE DE NIVEL SOCIOECONOMICO.

6. NÚMERO DE PERSONAS QUE HABITAN SU CASA: _____

7. NÚMERO DE CUARTOS EN LA VIVIENDA: _____

8. MATERIAL DE PISO DE LA VIVIENDA:

CON RECUBRIMIENTO (LOZETA, MOSAICO, MADERA) ___ CEMENTO ___ TIERRA ___

9. AGUA POTABLE: ENTUBADA DENTRO ___ ENTUBADA FUERA ___ PIPA ___ POZO ___

OTROS: _____

10. ELIMINACION DE EXCRETAS: EXCUSADO CON DRENAJE ___ FOSA SEPTICA ___

LETRINA ___

OTROS: _____

11. ESCOLARIDAD: _____

12. CONTACTO CON ANIMALES:

DOMESTICOS: PERROS___ GATOS___ AVES___ ANIMALES DE TRASPATIO___

GRANJAS: GALLINAS___ CERDOS___

13. SI LA RESPUESTA A LA PREGUNTA ANTERIOR ES AFIRMATIVA, ESPECIFIQUE FRECUENCIA DE LIMPIEZA DE EXCRETAS: _____

14. PLAGAS EN LA VIVIENDA O COLONIA: RATAS___ CUCARACHAS___ MOSCAS___
GARRAPATAS___ GUINAS___ CHINCHES___ MOSQUITOS___ GRILLOS___
CORUCOS/GORGOJOS (HARINAS) _____ OTROS (ESPECIFICAR)

15. LA VIVIENDA CUENTA CON MOSQUITERO: SI___NO___

IV. HABITOS DE HIGIENE (MADRE O TUTOR).

16. SE LAVA LAS MANOS

a) ANTES DE COMER: SI___NO___

b) ANTES DE PREPARAR LOS ALIMENTOS: SI___NO___

c) DESPUES DE IR AL BAÑO: SI___NO___

d) DESPUES DE ESTAR EN CONTACTO CON ANIMALES: SI___NO___

17. PREPARA ALIMENTOS PARA CONSUMO FAMILIAR: SI___NO___

18. CONSUME ALIMENTOS EN LA VIA PÚBLICA: SI___ NO___ EN OCASIONES___

19. TOMA AGUA HERVIDA: SI___NO___

V. ANTECEDENTES PERSONALES PATOLOGICOS

20. ENFERMEDAD DIARREICA: SI___NO___

21. SI LA RESPUESTA A LA PREGUNTA ANTERIOR ES AFIRMATIVA ESPECIFIQUE:

a) NUMERO DE EVENTOS POR AÑO: _____

b) FECHA DEL ULTIMO EPISODIO: _____

c) TIEMPO DE DURACIÓN: _____

d) PRESENCIA DE MOCO Y SANGRE: _____

e) COMPLICACIONES (HOSPITALIZACIÓN): _____

f) TRATAMIENTO: _____

VI.

SITUACIÓN ACTUAL

22. PESO: _____

23. TALLA: _____

24. FECHA DE LA ÚLTIMA DESPARASITACIÓN:

25. TRATAMIENTO:_____ CULMINO: SI____
NO_

26. CUADRO CLINICO ACTUAL DE PROBLEMAS GASTROINTESTINALES:

(Tiempo de duración, presencia de moco y sangre, complicaciones, hospitalización, tratamiento, dolor abdominal, fiebre, dolor de cabeza, náuseas, vómito, flatulencias).

Consentimiento informado para participar en un proyecto
**“Caracterización molecular e inmunológica de genotipos de *Cryptosporidium* spp.
en pacientes sintomáticos y asintomáticos”**

Responsable del Proyecto: Dra. Olivia Valenzuela Antelo

Sede donde se realizará el estudio: Universidad de Sonora, Departamento de Ciencias Químico
Biológicas

Nombre del padre o tutor (fecha):

Se le invita a participar en este estudio de investigación. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

En caso de aceptar participar en el estudio se le realizarán algunas preguntas sobre usted y su hijo/a, hábitos y antecedentes médicos, y sus respuestas serán incluidas en una base de datos para su análisis. Una vez que acepte participar se le pedirá que nos done 3 muestras de heces y una muestra de suero de su hijo/a. Todos los procedimientos diagnósticos serán por parte de la Universidad de Sonora y Usted será informado de los resultados obtenidos.

RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

Este estudio está considerado como de bajo riesgo de acuerdo a la Ley General de Salud ya que sólo implica la recolección de muestras de heces y suero, **TOTALMENTE VOLUNTARIO**.

ACLARACIONES

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
 - No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
 - Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el Investigador responsable no se lo solicite, informando las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
 - No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
 - No recibirá pago por su participación.
 - En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo al Investigador responsable.
 - La información obtenida en este estudio, puede ser publicada en revistas científicas de impacto nacional o internacional; sin embargo, la identidad de los participantes en el estudio, será mantenida con estricta confidencialidad.
- ES IMPORTANTE INFORMARLE QUE LA **SECRETARÍA DE SALUD DEL ESTADO** ESTÁ INFORMADA DEL DESARROLLO DE ESTE PROYECTO.

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar esta Carta de Consentimiento Informado.

Dudas y/o aclaraciones:

Dra. Olivia Valenzuela Antelo. Email: valenzuela.o@gmail.com.

Teléfono: 2592163-2592164.