

Artículos Originales //

Factores inmunológicos que pueden influir en la presencia de síntomas clínicos en niños con giardiasis

Immunological factors influencing the presence of clinical symptoms in children with giardiasis

Isabel Hagel^{*1}, Isais Cáceres¹, Guillermo Terán², Maira Cabrera², María Cristina Di Prisco³, María Teresa Zabala⁴, Raimundo Cordero⁵ & Benito Infante⁴

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el perfil de la respuesta inmune según sintomatología intestinal en niños con giardiasis. Se realizó un estudio transversal clínico, inmunológico y parasitológico en 182 escolares (6-7 años) de la región de Barlovento, Estado Miranda. La evaluación clínica fue realizada haciendo énfasis en los síntomas intestinales y evaluación antropométrica. Se realizaron exámenes de heces seriadas. Los niveles de IgA secretora (total y específicos a *G. duodenalis*) así como los niveles de citocinas fueron determinados mediante ELISA. Los niveles de óxido nítrico usando el método colorimétrico de Griess. Análisis estadístico mediante Med Calc Software, Versión 12.4.0. Encontramos que Los niveles plasmáticos de TNF- α y de óxido nítrico (en saliva) fueron más elevados en los niños con síntomas intestinales y giardiasis ($P<0.001$) mientras que los niveles de TGF- β , IL-10 y los niveles de IgA secretora total y específica a *G. duodenalis* fueron más elevados ($P<0.0001$) en el grupo de asintomáticos. Los niveles de IL-6 fueron más elevados en los niños con giardiasis independientemente de la sintomatología. La co-infección con *A. lumbricoides* se asoció negativamente a la presencia de síntomas intestinales. Los indicadores antropométricos (Talla/edad, peso/Edad y Peso/Talla) se asociaron positivamente a la presencia de citocinas reguladoras ($P<0.005$) y niveles de IgA secretora ($P<0.0001$). Así, Diferencias en el perfil de la respuesta inmune podrían asociarse a síntomas intestinales inducidos por giardiasis. Deficiencias en el estado nutricional se asocian a procesos inflamatorios y a la generación de síntomas mientras que la co-infección con helmintos intestinales favorece la reducción de la sintomatología.

Palabras clave: *G. duodenalis*, TGF- β , IL-10, TNF- α , sIgA, óxido nítrico, síntomas clínicos.

SUMMARY

We evaluated the immune profile associated to intestinal symptoms in children with giardiasis. A cross-sectional study including clinical, immunological and parasitological aspects in 182 children (6-7 years) from the area of Barlovento, Miranda state, Venezuela was carried out. Clinical evaluation was performed with emphasis on intestinal symptoms and anthropometric parameters were also determined. Serial stool examinations were carried out. Secretory IgA levels (total and specific against *G. duodenalis*) and cytokine levels were determined by ELISA. Nitric oxide levels were determined using the Griess colorimetric method. Statistical analysis was performed by Med Calc Software, Version 12.4.0. We found that plasma levels of TNF- α and nitric oxide (salivary) were higher in children with intestinal symptoms and giardiasis ($P<0.001$) while the levels of TGF- β , IL-10 and IgA levels (total and anti-*G. duodenalis*) were higher ($P<0.0001$) in the asymptomatic group. The levels of IL-6 were higher in children with giardiasis regardless of symptoms. Co-infection with *A. lumbricoides* was associated negatively with the presence of intestinal symptoms. Anthropometric indicators (height / age, weight / age and weight / height) were positively associated with the presence of regulatory cytokines ($P<0.005$) and secretory IgA levels ($P<0.0001$). Therefore, differences in the immune profile may be associated with intestinal symptoms induced by giardiasis. Co-infection with intestinal helminths helps to reduce symptoms while nutritional deficiencies are associated with inflammatory processes and the generation of symptoms.

Key words: *G. duodenalis*, TGF- β , IL-10, TNF- α , sIgA, nitric oxide, clinical symptoms

¹ Secciones de Inmunología, ² Inmunoparasitología, ³ Inmunopatología, Instituto de Biomedicina, ⁴ Escuela de Nutrición, ⁵ Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

*Autor de correspondencia: isabelhagel@yahoo.com

INTRODUCCIÓN

Giardia duodenalis es el protozoo flagelado intestinal diagnosticado con mayor frecuencia en el intestino humano y uno de los agentes etiológicos más importantes de la Enfermedad Diarreica Aguda (EDA) en niños mayores de cuatro años, adolescentes y adultos (Thompson, 2000). La infección se puede desarrollar tanto de forma endémica particularmente en comunidades rurales y de forma epidémica presentando brotes que afectan a comunidades cerradas (orfanatos y sitios de reclusión) o en viajeros que visitan zonas endémicas, siendo responsable de un 2-3% de todas las diarreas del viajero (Harms *et al.*, 2002). La incidencia guarda estrecha relación con las condiciones sanitarias, vivienda, higiene y nivel educativo (Thompson, 2000). En Venezuela aproximadamente 25 % de la población infantil tanto en el medio urbano como en el rural sufre de infección por este parásito (Cheng-Ng *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2004) llegando a ser la prevalencia hasta de 52% en comunidades indígenas sin ningún acceso al agua potable (Rodríguez *et al.*, 2011). Los síntomas de la giardiasis pueden ser variables. En una gran proporción de individuos la infección es asintomática mientras que algunos grupos de individuos pueden presentar dolor abdominal, náuseas, vómitos y diarrea acuosa (Farthing, 1997). En muchos casos la resolución de la infección es espontánea y ocurre a los pocos días de la infección. En cambio, la infección crónica se manifiesta con episodios recurrentes o persistentes de diarrea. La infección en humanos, ocurre al ingerir los quistes. La dosis infectante oscila de 1 a 10 quistes. En el intestino delgado ocurre un proceso de desenquistamiento, el cual se inicia en el estómago (pH2) y termina en el duodeno bajo la influencia de las secreciones pancreáticas. De cada quiste se producen dos trofozoítos hijos, los cuales viven en las microvellosidades intestinales, colonizando el duodeno y yeyuno. Los trofozoítos se reproducen de inmediato por fisión binaria hasta alcanzar un elevado número. Se fijan a la mucosa, y si las condiciones son adversas se enquistan nuevamente y se excretan con las heces (Farthing, 1997; Müller y Allmen, 2005). El trofozoíto se adhiere a las células cilíndricas de las vellosidades intestinales mediante una depresión circular que tiene su superficie ventral y que actúa como una ventosa. El enquistamiento ocurre en la luz del intestino delgado, produciéndose un quiste binucleado, pero son los quistes tetranucleados los que representan la forma infectante (Farthing, 1997; Müller y von Allmen,

2005). Los quistes tetranucleados salen al medio ambiente con las defecaciones y pueden sobrevivir durante largos periodos de tiempo. El quiste es poco resistente a la desecación o al calor, pero se mantiene bien en el agua fría de almacenes de agua potable. Son resistentes a la cloración del agua, pero se eliminan por ebullición y filtración (Lujan, 2006). La giardiasis está frecuentemente acompañada por cambios estructurales y funcionales en el epitelio intestinal. Por un lado la adhesión del trofozoíto a las células epiteliales en el duodeno produce daño intestinal (Müller & von Allmen, 2005). Además, se producen alteraciones histoquímicas de la mucosa intestinal debido a la estimulación local de una respuesta inmune pro- inflamatoria (activación de mastocitos, células T CD8+, secreción de citocinas pro-inflamatorias y óxido nítrico del epitelio entre otros), inducida por proteínas de superficie del trofozoíto (Roxtröm-Lindquist *et al.*, 2006). La falta de control del proceso inflamatorio puede conducir a la atrofia de las microvellosidades intestinales y al síndrome de malabsorción característico de esta infección (Solaymani-Mohammadi & Singer, 2010). Por otra parte, la producción de IgA secretora que ejerce funciones de exclusión (Boullier *et al.*, 2009) sin estimular inflamación contribuye al control de la infección y limita el daño en la mucosa. Así, tanto la inmunodeficiencia humoral, como la hipogammaglobulinemia (congénita, común variable o ligada al cromosoma X), o el déficit selectivo de IgA (afecta al 10% de la población) están asociados a la cronicidad de la infección y a una mayor sintomatología (Stark *et al.*, 2009). También la malnutrición calórico-proteica podría aumentar la gravedad de la giardiasis por disminución de la producción de enterocitos en las microvellosidades intestinales (Lunn, 2000) lo cual podría favorecer la inflamación causada por el parásito. Por último, es necesario citar la importancia de la composición de la microflora intestinal, las cuales estimulan la producción de citocinas reguladoras de la inflamación como IL-10 y TGF- β (O'Hara & Shanahan, 2006) que a su vez podría favorecer la producción de IgA frente al parásito limitando su patogenicidad. En este trabajo comparamos el perfil de citocinas (pro-inflamatorias/reguladoras), los niveles de óxido nítrico así como los niveles totales y específicos de IgA secretora en niños parasitados con *G. duodenalis* según la presencia de síntomas intestinales. Evaluamos también las asociaciones entre indicadores del estado nutricional de los niños con los niveles de citocinas (inflamatorias o reguladoras), óxido nítrico y los niveles de IgA secretora específica y total.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población

Se realizó un estudio transversal en una población de 182 niños y niñas que asisten al primer grado de edades comprendidas entre 6 y 7 años provenientes de dos escuelas primarias ubicadas en la región de Barlovento, Estado Miranda en donde en estudios previos (Cordero *et al.*, 2009; Hagel *et al.*, 2011) hemos reportado una elevada prevalencia de giardiasis.

Evaluación clínica

Los niños fueron evaluados clínicamente de forma integral pero haciendo énfasis en la presencia de síntomas intestinales y diarreas asociadas a la presencia de *G. duodenalis*. Se evaluaron los parámetros antropométricos peso/edad, talla/edad, y peso/talla de acuerdo las normas establecidas por la OMS siguiendo el protocolo descrito en trabajos anteriores (Cordero *et al.*, 2009).

Determinación de la prevalencia e infección parasitaria

Se realizaron exámenes seriados (3 muestras en tres días sucesivos) de heces en muestras frescas para determinar la prevalencia de protozoarios y helmintos en los grupos seleccionados (particularmente la presencia de *G. duodenalis*).

Pruebas inmunológicas

Niveles de IgA secretora

Los niveles de IgA secretora total se midieron de acuerdo al protocolo en uso frecuente en el laboratorio de Inmunoquímica utilizando la técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) (Ortiz *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2004). Similarmente se utilizó la técnica de ELISA para medir los valores de IgA secretora frente *G. duodenalis*. El antígeno de *G. duodenalis* fue preparado según protocolo reportado en trabajos previos de nuestro grupo de investigación (Rodríguez *et al.*, 2004; Hagel *et al.*, 2011). Los valores de IgA específica frente a *G. duodenalis* fueron expresados en UI/mL para lo cual se estandarizó una curva de calibración utilizando un kit comercial (Epitope-Diagnostics/San Diego, California, USA). Se utilizó como punto de corte de la prueba

(de acuerdo al Kit comercial) el valor de 12.5 UI/mL, siendo el valor de la media más dos desviaciones estándar de un grupo de 50 niños venezolanos sanos no expuestos al parásitos de 12,8 UI/mL.

Niveles de citocinas plasmáticas

Los niveles de citocinas plasmáticas se determinaron utilizando un ensayo comercial (Quantikine cytokine assay (R&D Systems, Minneapolis, USA). Los niveles de detección para cada ensayo fueron de 1.6 pg/mL para TNF- α , 0, 7 pg/mL para IL-6, 3, 9 pg/mL para IL-10 y 31,2 pg/mL para TGF- β .

Cuantificación de metabolitos estables de óxido nítrico (NO) en saliva

La cuantificación de metabolitos estables de NO se determinó utilizando el método de detección colorimétrica con el reactivo de Griess. Se realizó una curva de calibración con diferentes diluciones de una solución de H_3PO_4 con una concentración de 14,5mM hasta una solución de concentración 1,563 μ M. El reactivo de Griess fue preparado con los siguientes compuestos: ácido sulfanílico (1% p/p) y 1-Naftil-Etilendiamina (0,1% p/p) diluidos en ácido fosfórico 5%. La cuantificación de metabolitos estables de NO fue realizada en una placa de microtitulación, agregando 100 μ L de saliva y 100 μ L del reactivo de Griess. Se dejó incubando 10 minutos en completa oscuridad y se realizó la lectura en un espectrofotómetro para placas de microtitulación BIO-RAD model 550 microplate reader a una longitud de onda de 570 nm.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Med calc (Med calc Software, Versión 12.4.0, Ostend, Bélgica, 2012). Para medir la influencia de la prevalencia de distintos parásitos intestinales sobre la presencia o ausencia de síntomas intestinales se aplicó el análisis de regresión logística de entrada simple. La presencia o ausencia de diarrea acompañada de dolor abdominal se tomó como variable dependiente. Se calcularon el coeficiente de regresión con sus respectivos valores de p así como los valores de Odds Ratio con un intervalo de confianza de 95% para cada caso. Para comparar los valores de los niveles de IgA secretora total y específica frente

a *G. duodenalis* así como los valores de las distintas citocinas plasmáticas y óxido nítrico se utilizó ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis), aplicándose el Test de Comparación Múltiple de Dunn para estudiar las diferencias entre los valores de los distintos grupos de acuerdo a la presencia de síntomas intestinales. Se realizó un estudio de correlación no-paramétrica (Prueba de Spearman) para estudiar las asociaciones entre los indicadores antropométricos evaluados con los distintos parámetros inmunológicos.

Consideraciones éticas

El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Biomedicina y por las autoridades regionales de Salud. Participaron en el estudio todos los niños cuyos padres firmaron el consentimiento informado.

RESULTADOS

Se evaluaron 182 (97 niños/85 niñas) escolares que asisten al primer grado en dos escuelas primarias de la región de Barlovento con características socioeconómicas y ambientales similares. El estudio se llevó estrictamente bajo consentimiento informado de los padres y representantes y con la colaboración del personal de la comunidad educativa respectiva y el Centro de Salud Integral local.

Prevalencia de parásitos intestinales

Se encontró que 75% de los niños presentaron exámenes de heces positivos para al menos un helminto intestinal siendo *Ascaris lumbricoides* el más prevalente (62,6%) seguido por *Trichuris trichiura* (46%). Encontrándose además una prevalencia de anquilostomídeos de 12%. Es importante señalar que en este grupo de niños el 52% presentaron infección por *G. duodenalis*. Se observó también una prevalencia de 22% de *Blastocystis hominis*.

Aspectos clínicos

De los niños que resultaron infectados con *G. duodenalis* se encontró que el 32% presentó diarrea acompañada de dolor abdominal difuso o epigástrico persistente (17%) con (12%) o sin (5%) náuseas. El 68% de los niños resultó asintomático. No se encontraron síntomas intestinales en los niños parasitados solo con helmintos o con *Blastocystis hominis* en ausencia de

G. duodenalis. Es importante señalar que en el grupo de niños asintomáticos parasitados con *G. duodenalis*, el 70% se encontraba parasitado con *A. lumbricoides* y el 40% con *T. trichiura* mientras que en el grupo con síntomas intestinales solo el 6% presentó infección por algún helminto. Además el análisis de regresión logística simple (Tabla I) mostró que la infección por *G. duodenalis* influyó fuertemente a la presencia de síntomas intestinales (odds ratio=3,04; 95%IC: 0,998-9,283; $P<0,005$) mientras que la infección por *A. lumbricoides* se asoció inversamente (odds ratio=0,0148; 95%IC: 0.002-0.114; $P<0,0001$) a la presencia de los síntomas intestinales evaluados. No hubo influencia de los otros parásitos evaluados en la manifestación de síntomas intestinales (Tabla I). Se realizó un estudio antropométrico en todos los niños evaluados observándose que el 16% de los niños se encontraron bajo el percentil 10 para el indicador talla/edad; 8% bajo el percentil 10 para el indicador peso/edad y 11% bajo el percentil 10 para el indicador peso/talla. Evidenciándose así una proporción importante de niños en situación de riesgo nutricional.

Parámetros inmunológicos

La Fig. 1 muestra que los valores de IgA secretora total variaron (Kruskal-Wallis: 88.10) significativamente entre los distintos grupos de niños evaluados de acuerdo a la presencia de síntomas intestinales. Se observó que los mismos eran significativamente más elevados en aquellos niños asintomáticos infectados con *G. duodenalis* comparados con los que presentaron al menos 2 síntomas (diarrea y dolor abdominal) con o sin vómitos ($P<0,001$) y con el grupo no parasitado con *G. duodenalis* ($P<0,001$). Más aún los niños con síntomas intestinales presentaron niveles de IgA secretora total significativamente más bajos

Fig. 1. Niveles de IgA secretora total en niños pre-escolares parasitados con *G. duodenalis* según la presencia de síntomas clínicos.

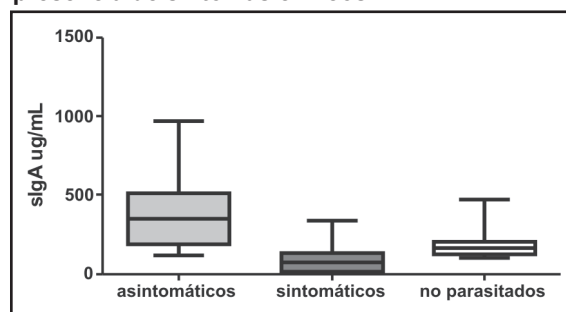


Tabla I. Influencia de la presencia de parásitos intestinales en la sintomatología intestinal.

	Odds ratio	95% IC	Coefficiente de regresión	error Standard	Significancia estadística
<i>A. duodenalis</i>	0,403	0,033 -4,897	-0,907	1,273	0,476
<i>A. lumbricoides</i>	0,0148	0,002-0,114	-4,214	1,004	0,0001
<i>T. trichiura</i>	1,46	0,496-4,333	0,579	0,966	0,5487
<i>B. hominis</i>	0,503	0,044-4,876	0,383	0,552	0,4876
<i>G. duodenalis</i>	3,04	0,998-9,283	1,113	0,568	0,005

($P<0,05$) que los niños que no sufrían de giardiasis en el momento de la evaluación. Similarmente en la Fig. 2 se observa que los niveles de IgA secretora específica fueron significativamente más elevados en los niños asintomáticos comparados con aquellos que presentaron síntomas ($P<0,001$) y con aquellos no parasitados con *G. duodenalis* ($P<0,001$). En la Tabla II se observó además una correlación positiva entre los niveles de IgA secretora total y específica frente a *G. duodenalis* con los indicadores antropométricos talla/edad ($P<0,0001$ respectivamente), peso/edad ($P<0,0001$ respectivamente) y peso/talla ($P<0,0001$ en el caso de la IgA secretora total y $P=0,0023$ en el caso de la IgA secretora específica a *G. duodenalis*).

En la Fig. 3 se muestran los valores de las medianas de los niveles plasmáticos de distintas citocinas de acuerdo a la presencia de síntomas asociados a la giardiasis. Se encontró que los niveles de citocinas reguladoras (IL-10 y TGF- β) variaron significativamente entre los grupos de niños evaluados (Kruskal-Wallis: 92.49 y 127.2 respectivamente), siendo los mismos significativamente más elevados en los niños asintomáticos comparados con los niños sintomáticos ($P<0,0001$ para la diferencia entre los valores de ambas citocinas) o no parasitados con *G.*

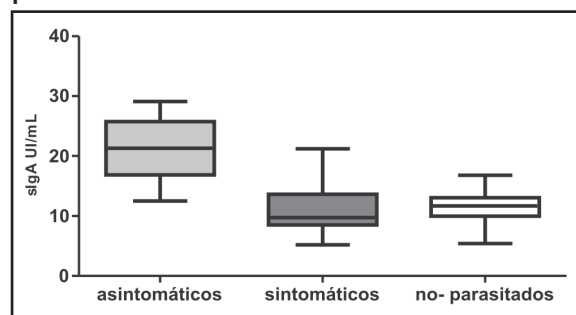
duodenalis ($P<0,0001$ para la diferencia entre los valores de ambas citocinas). No hubo diferencias en los niveles de IL-6 según la presencia de síntomas, sin embargo los niveles de esta citocina fueron más elevados en todos los niños infectados con *G. duodenalis* comparados con aquellos que no presentaron esta infección (Kruskal Wallis: 67.61; $P<0,0001$). También se encontraron variaciones significativas en los valores de mediadores pro-inflamatorios como TNF- α (Kruskal-Wallis: 149,7) y óxido nítrico (Kruskal-Wallis: 55.56 entre los distintos grupos) (Fig. 3 y 4). Al contrario de lo observado para las citocinas anti-inflamatorias, los niveles plasmáticos de TNF- α así como los valores de óxido nítrico medidos en saliva fueron significativamente más elevados en los niños con síntomas intestinales comparados con aquellos asintomáticos ($P<0,0001$ para ambos mediadores) o no infectados con este parásito ($P<0,0001$ para ambos mediadores). En la Tabla III se observa además una asociación positiva entre los valores de TGF- β y los indicadores talla/edad ($P<0,0001$), peso/edad ($P<0,0001$) y peso talla ($P<0,0001$). Similarmente se encontró una asociación positiva entre los niveles plasmáticos de IL-10 con los indicadores talla/edad ($P<0,0001$), peso/edad ($P<0,0001$) y peso talla ($P=0,0002$). No se encontró

Tabla II. Correlación entre los niveles de sIgA e indicadores antropométricos.

	Talla/Edad	Peso/Edad	Peso/Talla
Número de niños	182	182	182
sIgA total			
Spearman r	0,729	0,657	0,444
95% intervalo de confianza	0,651 - 0,792	0,563 - 0,735	0,316 - 0,557
Significancia	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
sIgA-anti <i>G. duodenalis</i>			
Spearman r	0,4819	0,4017	0,2242
95% intervalo de confianza	0,3580 to 0,5891	0,2681 to 0,5201	0,07704 to 0,3618
significancia	< 0,0001	< 0,0001	0,0023

Tabla III. Asociación entre indicadores antropométricos y niveles de citocinas.

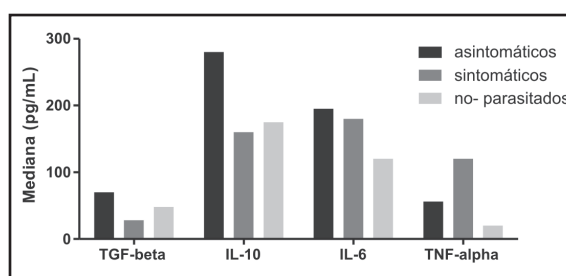
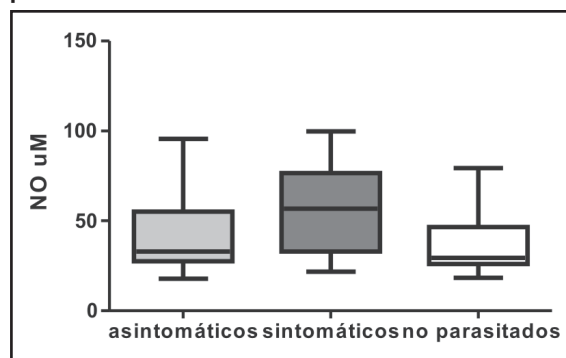
	NO	TGF- β	IL-10	IL-6	TNF- α
Número de casos	182	182	182	182	182
Talla /edad					
Spearman r	-0,1624	0,7742	0,4553	-0,1024	-0,5149
95% intervalo de confianza	-0,3047 to -0,01302	0,7064 to 0,8280	0,3280 to 0,5664	-0,2483 to 0,04811	-0,6170 to -0,3957
Significancia	0,0285	< 0,0001	< 0,0001	0,1691	< 0,0001
Peso/edad					
Spearman r	-0,2712	0,724	0,4054	-0,1319	-0,5035
95% intervalo de confianza	-0,4045 to -0,1266	0,6441 to 0,7883	0,2722 to 0,5234	-0,2762 to 0,01816	-0,6074 to -0,3826
Significancia	0,0002	< 0,0001	< 0,0001	0,0758	< 0,0001
Peso/Talla					
Spearman r	-0,1709	0,4982	0,272	-0,07268	-0,2604
95% intervalo de confianza	-0,3126 to -0,02175	0,3766 to 0,6030	0,1275 to 0,4052	-0,2200 to 0,07789	-0,3948 to -0,1152
Significancia	0,0211	< 0,0001	0,0002	0,3295	0,0004

Fig. 2. Niveles de IgA secretora anti-*G. duodenalis* en niños pre-escolares parasitados según la presencia de síntomas clínicos.

ninguna asociación con los valores plasmáticos de IL-6. En cambio se encontró una asociación negativa entre los valores de TNF- α con los indicadores talla/edad ($P<0,0001$), peso/edad ($P<0,0001$) y peso talla ($P=0,0004$). Los valores de óxido nítrico también se asociaron negativamente a los indicadores talla/edad ($P=0,028$), peso/talla ($P=0,0002$) y peso/edad ($P=0,0211$).

DISCUSIÓN

La giardiasis es una infección intestinal prevalente entre los niños venezolanos (Cheng-Ng *et al.*, 2002; Hagel *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2004; 2011). En este trabajo

Fig. 3. Niveles de citocinas plasmáticas en niños parasitados con *G. duodenalis* según la presencia de síntomas clínicos.**Fig. 4. Niveles de óxido nítrico en saliva en niños parasitados con *G. duodenalis* de acuerdo a la presencia de síntomas clínicos.**

encontramos que la mitad de los niños evaluados presentaron la infección. Estos resultados coinciden con resultados anteriores obtenidos de evaluaciones realizadas en estas comunidades en donde el acceso al agua potable es limitado (Hagel *et al.*, 2011). Además otros factores tales como la falta de conocimientos en el manejo de agua potable y preparación de los alimentos influyen también en la alta prevalencia de esta parasitosis tanto en el medio urbano como rural (Hurtado *et al.*, 2004).

Aún cuando se reportan altas prevalencias es importante destacar que la mayoría de estos niños no presento ningún tipo de síntomas asociados a la infección. Sin embargo aunque minoritario, un número significativo de niños presentó síntomas intestinales recurrentes asociados a la presencia de *G. duodenalis* que pueden afectar su calidad de vida. Los factores que determinan por qué un niño presenta o no síntomas son complejos y pueden variar desde factores genéticos (Pierce & Kirkpatrick, 2009) a factores extrínsecos como el estado nutricional y la co- infección con otros parásitos que pueden modular el micro-ambiente de la mucosa intestinal favoreciendo o restringiendo los procesos inflamatorios desencadenados por el parásito. En este trabajo encontramos diferencias marcadas en el perfil inmunológico entre los niños asintomáticos y los que presentaron síntomas. En los niños asintomáticos predominó un perfil anti-inflamatorio caracterizado por elevados niveles de IgA secretora total y específica frente al parásito acompañado de elevados niveles de citocinas plasmáticas reguladoras como IL-10 y TGF- β mientras que los niveles de mediadores pro-inflamatorios tales como TNF- α y óxido nítrico fueron significativamente bajos en este grupo. En cambio en el grupo que presento síntomas intestinales este perfil inmunológico se encontró invertido observándose una predominancia de los mediadores pro-inflamatorios (TNF- α y óxido nítrico) mientras que los niveles de IgA secretora fueron incluso menores que los observados en el grupo de niños no parasitado con *G. duodenalis*. Es conocido el papel protector que ejerce la IgA secretora frente a la inflamación inducida por antígenos provenientes de agentes patógenos. La función de la IgA consiste en prevenir la interacción de los microorganismos con el epitelio intestinal, limitando la penetración de agentes patógenos a las mucosas (Bullier *et al.*, 2009), además participa en el proceso de neutralización de las toxinas y enzimas provenientes de distintos agentes patógenos limitando la disponibilidad de antígenos en la mucosa (O'hara

& Shanagan, 2006) que potencialmente pudieran estimular procesos inflamatorios. La presencia de IgA secretora frente a *G. duodenalis* se ha asociado a la protección en distintos grupos de niños (Rodríguez *et al.*, 2004; 2011; Stark *et al.*, 2009). Además se ha demostrado que la presencia de este anticuerpo en la leche materna confiere protección al lactante (Téllez *et al.*, 2005). Por otra parte la presencia de citocinas reguladoras como TGF- β e IL-10 las cuales son estimuladas constantemente por la flora intestinal constituyen un factor importante en el control de la inflamación inducida por distintos agentes patógenos (Looijer-van Langen & Dieleman, 2009). Más aun se ha demostrado que la flora intestinal per se es capaz de limitar la infección por *Giardia* en animales inhibiendo la proliferación de los trofozoitos (Pérez *et al.*, 2007). Los resultados de este trabajo sugieren que la presencia de estas citocinas es importante para el control de los procesos inflamatorios asociados a la manifestación de síntomas intestinales. Además, la co-infección con helmintos intestinales como *A. lumbricoides* se asoció negativamente a la presencia de síntomas intestinales. Se ha reportado extensivamente que la interacción crónica de este parásito con su hospedador induce la producción no específica de citocinas reguladoras (Akdis, 2009; Bradley *et al.*, 2004; Hagel & Giusti, 2010) para crear un ambiente tolerogénico que le permite sobrevivir el intestino (Bradley *et al.*, 2004). Más aun, en trabajo previos realizados en grupos de niños de estas mismas comunidades hemos reportado que la co-infección con *A. lumbricoides* disminuye la producción de citocinas pro-inflamatorias como IFN- γ e IL-13 estimuladas con antígenos de *G. duodenalis* así como los niveles séricos específicos de IgG e IgE (Hagel *et al.*, 2011). Otros investigadores han propuesto que la presencia crónica de helmintos inhibe los procesos inflamatorios asociados con enfermedades autoinmunes que afectan el tracto intestinal (Zacccone & Cooke, 2013).

Por otra parte, variaciones en la calidad de la flora intestinal inducida por factores ambientales o nutricionales pueden alterar la homeostasis inmunológica de la mucosa intestinal (Lotz *et al.*, 2007). También, diarreas continuas ocasionadas por otros agentes patógenos (virales y bacterianos) durante los primeros 5 años de vida pueden ocasionar cambios estructurales en el epitelio intestinal que pueden persistir a lo largo de la infancia (Lunn, 2000). Esta situación podría favorecer la adhesión de los trofozoitos de *G. duodenalis* y la potenciación de las reacciones

inflamatorias inducidas en el epitelio intestinal como mecanismo de defensa para la eliminación del parásito (Zhou *et al.*, 2007). La presencia de estos mecanismos en conjunto, podrían explicar el perfil pro-inflamatorio de la respuesta inmune que se observa en los niños con síntomas intestinales. Además deficiencias en el estado nutricional podrían favorecer la producción local de citocinas pro-inflamatorias en el intestino (Abo-Shousha *et al.*, 2005). En este trabajo encontramos una fuerte asociación positiva entre indicadores antropométricos y la capacidad de establecer un perfil anti-inflamatorio frente a la infección mientras que elevados niveles de TNF- α y óxido nítrico se asociaron a valores más bajos de los indicadores antropométricos confirmando que niños en situación de riesgo nutricional son más propensos al desarrollo de procesos inflamatorios. Más aún, en trabajos anteriores se ha reportado previamente deficiencias en los niveles de IgA secretora en niños en situación de riesgo nutricional (Ortiz *et al.*, 2000) lo cual también favorecería la estimulación de mecanismos pro-inflamatorios conducentes a la presencia de síntomas intestinales.

Por otra parte, diferencias en la virulencia y patogenicidad de las cepas de *Giardia* han sido reconocidos como importantes determinantes para la gravedad de la infección (Singh *et al.*, 2009). Numerosos estudios han intentado correlacionar el desarrollo de los síntomas, particularmente la presencia de diarrea, con diferencias en cuanto al genotipo y virulencia de los parásitos (Haque *et al.*, 2005; Kohli *et al.*, 2008). Sin embargo los resultados no han sido claros debido a que una cepa en particular puede inducir distintos tipos de respuestas (Solaymani-Mohammadi & Singer, 2010).

En este trabajo no se encontraron diferencias en los niveles de IL-6 en cuanto a la sintomatología intestinal, sin embargo los mismos se asociaron fuertemente a la presencia de *G. duodenalis*. Trabajos en modelos experimentales han demostrado el papel de la IL-6 y los mastocitos en la eliminación temprana del parásito (Solaymani-Mohammadi & Singer, 2010). Además elevados niveles de esta citocina se han reportado en distintos grupos de pacientes infectados con el parásito ((Matowicka-Karna, *et al.*, 2009).

En conclusión los resultados de este trabajo sugieren que diferencias en el perfil (inflamatorio/anti-inflamatorio) de la respuesta inmune determinan

la presencia o ausencia de síntomas intestinales asociados predominantemente a la presencia de *G. duodenalis*. Factores extrínsecos como la infección crónica con helmintos intestinales, favorece el perfil anti-inflamatorio y la reducción de la sintomatología. Por otra parte, deficiencias en el estado nutricional se asocian al establecimiento de procesos inflamatorios y la generación de síntomas como diarrea y dolor abdominal. El balance entre el desarrollo de cierto grado de inflamación, que podría contribuir a la eliminación temprana del parásito y la presencia de factores anti-inflamatorios que limitan el daño epitelial y la sintomatología, podría ser un factor importante a considerar en los estudios del comportamiento de la infección en relación al tratamiento anti-parasitario en distintos grupos de niños.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos que no se presentó ningún conflicto de intereses.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro especial agradecimiento a los médicos rurales de la Comunidad de Río Chico, Estado Miranda por la colaboración prestada en la evaluación clínica de los niños. Este trabajo fue financiado por el proyecto CDCH/ PG -09-7946.

REFERENCIAS

- Abo-Shousha S., Hussei M., Rashwan A., Salama M. (2005). Production of proinflammatory cytokines: Granulocyte-macrophage colony stimulating factor, interleukin-8 and interleukin-6 by peripheral blood mononuclear cells of protein energy malnourished children. *Egypt J. Immunol.* **12**: 125-131.
- Akdis M. (2009). Immune tolerance in allergy. *Curr. Opin. Immunol.* **21**: 700-707.
- Boullier S., Tanguy M., Kadaoui K., Caubet C., Sansonetti P., *et al.* (2009). Secretory IgA-mediated neutralization of *Shigella flexneri* prevents intestinal tissue destruction by down-regulating inflammatory circuits. *J. Immunol.* **183**: 5879-5885.

- Bradley J. E. & Jackson J. A. (2004). Immunity, immunoregulation and the ecology of trichuriasis and ascariasis. *Parasite Immunol.* **26**: 429-441.
- Cheng-Ng R., Castellano-Cañizales J. A., Díaz-Suárez O. & Villalobos-Perozo R. E. (2002). Prevalencia de Giardiasis en Hogares de Cuidado Diario en el Municipio San Francisco, Estado Zulia, Venezuela. *Invest. Clin.* **43**: 231-237.
- Cordero R. E., Infante B., Zabala M. T. & Hagel I. (2009). Efecto de las parasitosis intestinales sobre los parámetros antropométricos en niños de un area rural de Rio Chico Estado Miranda Venezuela. *Rev. Fac. Med.* **32**: 132-138.
- Farthing M. J. (1997). The molecular pathogenesis of giardiasis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **24**: 79-88.
- Hagel I. & Giusti T. (2010). *Ascaris lumbricoides*: An overview of therapeutics targets. *Infect. Disord. Drug Targets.* **10**: 349-367.
- Hagel I., Cabrera M., Puccio F., Santaella C., Buvat et al. (2011). Co-infection with *Ascaris lumbricoides* modulates protective immune responses against *Giardia duodenalis* in school Venezuelan rural children. *Acta Tropica.* **117**: 189-195.
- Haque R., Roy S., Kabir M., Stroup S. E., Mondal D. et al. (2005). *Giardia* assemblage. infection and diarrhea in Bangladesh. *J. Infect. Dis.* **192**: 2171-2173.
- Harms G., Dorner F., Bienzle U. & Stark K. (2002). Infections and diseases after travelling. *Dtsch Med. Wochenschr.* **127**: 1748-1753.
- Hurtado M., Hagel I., Araujo M., Rodríguez O. L. & Palenque M. (2004). Creencias y prácticas alimentarias e higiénicas en madres, según el estado nutricional de su hijo. *Anales Venezolanos de Nutricion.* **17**: 13-18.
- Kohli A., Bushen O. Y., Pinkerton R. C., Houpt E., Newman R. D. et al. (2008). *Giardia duodenalis* assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **102**: 718-725.
- Looijer-van Langen M. A. C. & Dieleman L. A. (2009). Prebiotics in chronic intestinal inflammation. *Inflamm. Bowel Dis.* **15**: 454-462.
- Lotz M., Menard S. & Hornef M. (2007). Innate immune recognition on the intestinal mucosa. *Int. J. Med. Microbiol.* **297**: 379-392.
- Lujan H. (2006) *Giardia* y Giardiasis. *Medicina (Buenos Aires).* **66**: 70-74.
- Lunn P. G. (2000). The impact of infection and nutrition on gut function and growth in childhood. *Proc. Nutr. Soc.* **59**: 147-154.
- Matowicka-Karna J., Dymicka-Piekarska V. & Kemon H. (2009). IFN-gamma, IL-5, IL-6 and IgE in patients infected with *Giardia intestinalis*. *Folia Histochemica et Cytobiologica.* **47**: 93-97.
- Miller S. A., Rosario C. L., Rojas E. & Scorza J. V. (2003). Intestinal parasitic infection and associated symptoms in children attending day care centers in Trujillo. *Trop. Med. Int. Health.* **8**: 42-47.
- Müller N. & von Allmer N. (2005). Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *Int. J. Parasitol.* **35**: 1339-1347.
- O'Hara A. M. & Shanahan F. (2006). The gut Flora as a forgotten organ EMBO reports. **7**: 688-693.
- Ortiz D., Afonso C., Hagel I., Rodríguez O., Ortiz C., et al. (2000). Influence of helminthic infection and nutritional status on immune response in Venezuelan children. *Rev. Panam. Salud Pub.* **8**: 156-163.
- Pérez P. F., Minnaard J., Rouvet M., Knabenhans C., Brassart D. et al. (2001). Inhibition of *Giardia intestinalis* by extracellular factors from Lactobacilli: an in vitro study. *Applied and Environmental Microbiology.* **67**: 5037-5042.
- Pierce K. K. & Kirkpatrick B. D. (2009). Update on human infections caused by intestinal protozoa. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **25**: 12-17.
- Rodríguez O., Hagel I., González Y., Roque M.E., Vazquez N., et al. (2004). Secretory antibody responses in Venezuelan children infected with *Giardia duodenalis*. *J. Trop. Ped.* **26**: 75-83.

- Rodríguez O. L., Ortiz-Princz D., Cavazza M. C., López E. & Hagel I. (2011). Evaluación de la posible asociación entre la presencia de parásitos intestinales y *Helicobacter pylori* en población infantil de la etnia Warao, Venezuela. *Bol. Malariol. Salud Ambiental*. **51**: 41-50.
- Roxstrom-Lindquist K., Palm D., Reiner D., Ringqvist E. & Svard S. G. (2006). Giardia immunity-an update. *Trends Parasitol.* **22**: 26-30.
- Singh A., Janaki L., Petri W. A. Jr. & Houpt E. R. (2009). *Giardia intestinalis* assemblages A and B infections in Nepal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **81**: 538-539.
- Solaymani-Mohammadi S. & Singer S. M. (2010). *Giardia duodenalis*: The Double-edged Sword of Immune Exp. *Parasitol.* **126**: 292-297
- Stark D., Barratt J. L., van Hal S., Marriott D., Harkness J. & Ellis J. T. (2009). Clinical significance of enteric protozoa in the immunosuppressed human population. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**: 634-650.
- Tellez A., Palm D., Weiland M., Aleman J., Winiecka-Krusnel J. et al. (2005). Secretory antibodies against *Giardia duodenalis* in lactating Nicaraguan women. *Parasite Immunol.* **27**: 163-169.
- Thompson R.C. (2000). Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int. J. Parasitol.* **30**: 1259-1267.
- Zaccone P. & Cooke A. (2013) Vaccine against autoimmune disease: Can helminths or their products provide a therapy? *Curr Opin Immunol.* **25**: 418-423.
- Zhou P., Li E., Zhu N., Robertson J., Nash T. & Singer S. M. (2003). Role of interleukin-6 in the control of acute and chronic *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect. Immun.* **71**: 1566-1568.
- Zhou P., Li E., Shea-Donohue T. & Singer S. M. (2007). Tumour necrosis factor alpha contributes to protection against *Giardia lamblia* infection in mice. *Parasite Immunol.* **29**: 367-374.

Recibido el 03/06/2013

Aceptado el 04/10/2013