



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

---

Trabajo de Tesis Magister

**“Utilización de fermentos lácticos obtenidos a partir de kefir para evaluar su capacidad antagónica *in vivo* frente al protozoario intestinal *Giardia intestinalis*.”**

---

*Ing. Mariana Correa Franco*

*Director: Dr. Martín Andrés Humen*

*Codirectora: Dra. María de los Ángeles Serradell*

- 2012 -

El presente trabajo de Tesis para optar al título de Magister en Tecnología e Higiene de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata se desarrolló en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos y en la cátedra de Microbiología General (Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata).



Los resultados del presente trabajo de tesis han sido publicados parcialmente en la siguiente instancia:

Revista Medicina (suplemento especial):

LVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. LX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de inmunología.

“Efecto protector de la administración de kefir en un modelo murino de infección por *Giardia intestinalis*” (resumen).

14 al 17 de noviembre de 2012. Mar del Plata, Bs As. Argentina.

## **Agradecimientos:**

*Comenzar este camino, y viajar a Argentina fue una experiencia llena de expectativas nuevas, con el tiempo y el trabajo me fui encontrando con personas que en su momento aportaron de una manera muy especial a este proyecto.*

*Doy un agradecimiento muy especial a mi Director de tesis, Martín Humen, por su minuciosidad, orden exigencia, cosas que hacen esenciales la labor investigativa, y a mi Codirectora, María Serradell, por su dedicación, enseñanza, buen humor y paciencia, todos sus conocimientos fueron importantes en el trabajo de tesis. A los dos gracias por creer en mí para desarrollar esta tesis.*

*Al Doctor Pablo Pérez, por su dedicación y darme conocimientos sobre la Giardia, en especial por haber visto lo bueno del trabajo realizado, y a la Doctora Graciela de Antoni, por creer en mí y darme herramientas para seguir.*

*Al proyecto de extensión “kefir, un alimento probiótico” del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas por haber financiado mi trabajo, y porque en el encontré grandes personas que me acompañaron en el proceso y a las autoridades del CIDCA y de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas por permitir que este trabajo se desarrollara en sus laboratorios, allí también encontré personas excelentes que hicieron el camino más leve, me ayudaron muchísimo, con sus conocimientos y sus palabras de aliento.*

*A la Doctora Marina Golowczyc por su ayuda en el ensayo animal, fue fundamental su acompañamiento.*

*A las personas del Lisin, que me ayudaron mucho con los conocimientos en PCR, especialmente a Romi, que me auxilio, con conocimientos y herramientas. Además me gane una excelente amiga.*

*A los grandes amigos que he conocido acá, que hacen que la vida sea tan agradable y llevadera, y que me hacen sentir en familia, especialmente Bibi, que nunca me dejo caer, y no me dejo olvidar que Dios siempre me acompaña.*

*A Fer que me ayudo muchísimo, en el procesos de escritura que se hace tan pesado, me animo a seguir y aporto muchísimo con dibujos y diseño, y a Ángela, que es genial, cree en mí, me dio herramientas excelentes para seguir, y me mostro la importancia del trabajo fuera de los laboratorios.*

*Esto inevitablemente, no hubiera sido posible sin mi familia, a la distancia están presentes en mi corazón, son ellos los que me dan el motor para seguir, a mi Papa y mi Mama, les agradezco y les dedico esto a ellos, y a mi hermanos que son las dos personas más importantes para mí en el mundo, siento que hacen que todo sea posible, y los quiero con toda mi alma. Gracias a mi familia por ser quienes son.*

*Le doy gracias a Dios, que es el arquitecto que hace perfecto todo, y puso a cada una de estas personas en mi vida, para aprender, crecer y seguir adelante.*

|  |            |
|--|------------|
| <b>Índice General</b>  | <b>I</b>   |
| <b>Glosario</b>  | <b>III</b> |
| <hr/>  |            |
| <b>Introducción General</b>  | <b>1</b>   |
| Alimentos Funcionales  | 1          |
| Microbiota comensal  | 3          |
| Microorganismos Probióticos  | 4          |
| Kefir  | 5          |
| Las Parasitosis  | 11         |
| Enfermedades parasitarias transmitidas por Alimentos (EPTAS)   | 14         |
| Vigilancia epidemiológica  | 15         |
| Parasitosis intestinales: Giardiasis   | 18         |
| Descripción del parásito   | 21         |
| Patología y manifestaciones clínicas   | 23         |
| Relación con el hospedador   | 25         |
| Tratamientos   | 27         |
| <hr/>  |            |
| <b>Objetivo General</b>  | <b>30</b>  |
| <b>Objetivos Específicos</b>   | <b>30</b>  |
| <br>   |            |
| <b>Capítulo 1</b>  |            |
| <hr/>  |            |
| <b>NOMBRE: Capacidad del kefir y/o del sobrenadante de kefir de antagonizar sobre diferentes modelos de la infección con <i>Giardia intestinalis</i></b> |            |
| <b>Introducción</b>  | <b>31</b>  |
| <b>Objetivos</b>   | <b>38</b>  |
| <b>Materiales y Métodos</b>  | <b>39</b>  |
| <b>Resultados y discusión</b>  | <b>48</b>  |
| Efecto de sobrenadantes de kefir sobre la adhesión de <i>Giardia intestinalis</i> a enterocitos humanos  | 48         |
| Efecto de la administración de kefir en la tasa y/o intensidad de infección en el modelo murino  | 51         |
| <b>Conclusión</b>  | <b>56</b>  |
| <hr/>  |            |

---

**Capítulo 2**

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>NOMBRE: Capacidad inmunomodulatoria del kefir sobre la respuesta del hospedador frente a <i>Giardia intestinalis</i></b> |           |
| <b>Introducción</b>   | 56        |
| <b>Objetivos</b>  | 64        |
| <b>Materiales y Métodos</b>   | 65        |
| <b>Resultados y discusión</b>   | 71        |
| Análisis histopatológico  | 71        |
| Estudio del balance de las poblaciones celulares por citometría de flujo  | 72        |
| Poblaciones de células T en placas de Peyer (PP) y ganglios linfáticos mesentéricos (MLN).                                  | 73        |
| Expresión de MHC clase II en células de PP y MLN  | 77        |
| Cuantificación de mastocitos en bazo.   | 80        |
| Estudio de la producción de citoquinas y quimoquinas relevantes en la respuesta del hospedador frente al parásito           | 82        |
| Quimoquinas   | 83        |
| Factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )  | 85        |
| Interleuquina 12 (IL-12)  | 87        |
| Interferón- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )   | 88        |
| Determinación de células IgA+ en intestino delgado  | 90        |
| <b>Conclusión</b>   | <b>94</b> |
| <b>Conclusiones Generales</b>   | 95        |
| <b>Anexos</b>   | 97        |
| <b>Referencias Bibliográficas</b>   | 99        |

---

|                |  |
|----------------|--|
| <b>ATCC</b>    | <i>American Type Culture Collection</i>              |
| <b>DMEM</b>    | Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium |
| <b>EPTA</b>    | Enfermedades Parasitarias Transmitidas por Alimentos |
| <b>FACS</b>    | PBS, 1% de seroalbúmina bovina                       |
| <b>FAE</b>     | Folículo asociado al epitelio                        |
| <b>FITC</b>    | Isotiocianato de fluoresceína                        |
| <b>GALT</b>    | Tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal      |
| <b>IgA</b>     | Inmunoglobulina A                                    |
| <b>IgE</b>     | Inmunoglobulina E                                    |
| <b>IgG</b>     | Inmunoglobulina G                                    |
| <b>IgM</b>     | Inmunoglobulina M                                    |
| <b>IEL</b>     | Linfocitos intraepiteliales                          |
| <b>MHC</b>     | Complejo mayor de histocompatibilidad                |
| <b>MLN</b>     | Ganglios Linfáticos mesentéricos                     |
| <b>PE</b>      | Ficoeritrina   |
| <b>PP</b>      | Placa de peyer                                       |
| <b>qRT-PCR</b> | PCR cuantitativa con transcripción reversa           |
| <b>SPF</b>     | Libre de patógenos específicos                       |
| <b>Th</b>      | T colaborador  |
| <b>UFC</b>     | Unidades formadoras de colonias                      |
| <b>VSP</b>     | Proteínas variantes de superficie                    |



## **ALIMENTOS FUNCIONALES**

El concepto de alimentos funcionales surge en Japón a mediados de los años 80, como alimentos que tienen un beneficio para la salud más allá de los nutrientes que aportan y la capacidad de ser promotores de la misma. Según la American Dietetic Association (ADA) son “Alimentos que tienen potencialmente un efecto beneficioso en la salud, cuando se consumen como parte de una dieta variada, en forma regular y a niveles efectivos, incluidos los alimentos fortificados, enriquecidos, ó mejorados”. El proyecto FUFOSSE (Functional Food Science in Europe) los definió como “Un alimento que demuestre satisfactoriamente que ejerce un efecto beneficioso sobre una o más funciones selectivas del organismo, además de sus efectos nutritivos intrínsecos, de modo tal que resulte apropiado para mejorar el estado de salud y bienestar, reducir el riesgo de enfermedad, o ambas cosas” (Ashwell 2004).

Desde un punto de vista práctico los alimentos funcionales pueden ser:

- Un alimento natural, donde un componente se mejoró bajo condiciones especiales de cultivo.
- Un alimento con un componente añadido para que produzca beneficios (ej: microorganismos probióticas).

- Un alimento con un componente eliminado para que produzca menos efectos adversos sobre la salud (ej: disminución de ácidos grasos saturados).
- Un alimento en el que la naturaleza de uno o más de sus componentes se modificó químicamente para mejorar la salud (ej: hidrolizados proteicos adicionados en preparados de lactantes para reducir el riesgo de alergenicidad).
- Un alimento en el que la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes se aumentó para mejorar la asimilación de un componente beneficioso.
- Cualquier combinación de las posibilidades anteriores.

Como se mencionó anteriormente, los microorganismos probióticos pueden ser adicionados a un alimento para ejercer un efecto benéfico para el hospedador al atravesar el tracto gastrointestinal. Para comprender este efecto, primero debemos entender la distribución de microorganismos a lo largo del tracto digestivo.

## MICROBIOTA COMENSAL

El número de microorganismos presentes en la superficie de las mucosas de los seres humanos supera por lo menos en un orden el número de células totales del cuerpo (Backhed *et al.* 2004). Este “órgano” que no está codificado en el ADN, es rápidamente adquirido desde el momento del nacimiento y acompaña al individuo para toda la vida. Durante el crecimiento, la flora va cambiando en composición y en actividad metabólica, respondiendo a factores endógenos (edad, estrés) y exógenos (dieta, tratamientos médicos, entre otros). La presencia de la microbiota es de esencial importancia en el desarrollo del sistema inmune de las mucosas y el mantenimiento de su actividad (Isolauri *et al.* 2004 ). El tracto gastrointestinal tiene la población microbiana más numerosa y la más compleja del todo el cuerpo humano. Hay por lo menos 400 especies diferentes de bacterias en la comunidad microbiana en el intestino (Qin *et al.* 2010). La mayor actividad metabólica y la concentración de estos microorganismos se encuentran en el intestino grueso, alcanzando de  $10^{11}$  a  $10^{12}$  UFC/g (Lei *et al.* 2001). Esta colonización se sustenta gracias a las condiciones favorables para la proliferación, en parte favorecido por el peristaltismo lento (Bielecka *et al.* 2002, Brady *et al.* 2000). En la microbiota intestinal existen microorganismos representados por las siguientes familias: *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*,

*Escherichia*, *Veillonella*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Streptococcus* y *Lactobacillus* (Tannock *et al.* 2010).

## **MICROORGANISMOS PROBIOTICOS**

Los probióticos se definen como microorganismos vivos adicionados a alimentos, que permanecen activos en el intestino y ejercen importantes efectos fisiológicos. Ingeridos en cantidades suficientes, tienen efectos beneficiosos, como contribuir al equilibrio de la flora bacteriana intestinal del huésped y potenciar el sistema inmunitario. Pueden atravesar el tracto digestivo y recuperarse vivos en las heces (Organización para la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas, World Health Organization, 2001).

Aunque originalmente el término “probiótico” se ha asociado con lactobacilos y bifidobacterias, con el correr de los años y el estudio de las características de otros microorganismos, se incluyó también desde cepas bacterianas de *Escherichia Coli* (Kruis *et al.* 2004) hasta ciertas cepas de levaduras, como por ejemplo *Saccharomyces Boulardii* (Plein y Hotz 1993). En diferentes estudios, tanto en animales como en humanos, distintas cepas de microorganismos han demostrado su capacidad para modular respuestas inmunológicas cuando son administrados por vía oral (Maldonado Galdeano *et al.* 2007, Marjolein *et al.* 2012). Ciertos probióticos son capaces de producir una

estimulación de la inmunidad innata y de la inmunidad adaptativa, confiriendo al huésped un aumento en la resistencia a ciertos microorganismos patógenos (Borrueal 2003).

Algunos de los estudios mencionados anteriormente, han demostrado la utilidad de los probióticos en la prevención y el tratamiento de la diarrea infecciosa, en las enfermedades inflamatorias intestinales y en la profilaxis de las infecciones post-operatorias (Klarin, *et al.* 2011).

En la actualidad también se están llevando a cabo estudios con grupos de pacientes que sufren de autismo, con el fin de evaluar la influencia de la administración de probióticos sobre el sistema nervioso central (Critchfield *et al.* 2011).

## **KEFIR**

El kefir es una leche fermentada milenaria, que se obtiene a partir de la actividad metabólica de los gránulos de kefir, una masa gelatinosa e irregular de consistencia elástica (Garrote *et al.* 2001). Los gránulos están constituidos por una matriz de polisacáridos (kefiran) y proteínas en la que convive un ecosistema de microorganismos en simbiosis. De esta matriz se han aislado e identificado una amplia variedad de especies microbianas que comprenden levaduras y bacterias (Lopitz-Otsoa 2006, Garrote *et al.* 2010). No se conoce

como se formaron los primeros gránulos y no ha sido posible reproducirlos a nivel de laboratorio con la composición de cepas aisladas (Bottazzi *et al.* 1994).

Este alimento tiene una consistencia uniforme, cremosa y su sabor es ácido, algo efervescente debido a la presencia de CO<sub>2</sub>. Gracias a la acción de las levaduras, contiene un pequeño porcentaje de etanol (0.01–0.1%) además de otras sustancias entre las que se encuentran el diacetilo, la acetoína y el acetaldehído (Farnworth 2003).

El kefir comenzó a ser consumido en Argentina por inmigrantes provenientes de países del este de Europa. Es un producto artesanal, y no se ha industrializado aún.

El kefir es un producto con sabor, viscosidad y aroma característicos que se obtiene por fermentación de la leche durante 24-48h a 20°C, alcanzando un pH final de 3,5 – 4 (Garrote *et al.* 2001).

En el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA) se cuenta con una colección de gránulos de kefir de distintas procedencias denominados AGK1, AGK2, AGK3, AGK5, AGK6, AGK7, AGK8, AGK10 y AGK11.

En las leches fermentadas con diferentes gránulos, se encontraron diferencias significativas en la concentración de bacterias y levaduras, y en la concentración de dióxido de carbono y de ácidos orgánicos (Garrote *et al.* 2001)

La composición química del kefir ha sido descrita por diversos autores. Los gránulos de kefir originarios de Europa del este tienen un contenido aproximado de 90% de agua, 3,2 % de proteínas, 0,3 % de lípidos, 5,8 % de sustancias solubles no nitrogenadas y 0,7 % de ceniza (Otogalli *et al.* 1973). Abraham y De Antoni (1999) obtuvieron resultados significativamente diferentes en la composición de los gránulos originarios de Argentina: 83 % de agua, 9-10 % de polisacáridos y 4- 5 % de proteínas.

La microbiota de kefir consiste en levaduras fermentadoras o no fermentadoras de lactosa, bacterias lácticas homofermentativas y heterofermentativas y bacterias ácido-acéticas. Tabla 1.

**Tabla 1:** Composición de la microbiota del kefir.

| <b>Microorganismo</b>  | <b>Referencia</b>   |
|--|---|
| <b><i>Lactobacillus brevis</i></b>   | Ottogalli <i>et al.</i> 1973; Rosi & Rosi 1978, Marshall <i>et al.</i> 1984, Angulo <i>et al.</i> 1993      |
| <b><i>Lactobacillus viridescens,</i><br/><i>Lactobacillus gasseri,</i><br/><i>Lactobacillus fermentum</i> y<br/><i>Lactobacillus casei</i></b> | Molska <i>et al.</i> 1983, Angulo <i>et al.</i> 1993  |
| <b><i>Lactobacillus kefir</i></b>  | Kandler & Kunath 1983, Angulo <i>et al.</i> 1993, Pintado <i>et al.</i> 1996, Takizawa <i>et al.</i> 1998   |
| <b><i>Lactobacillus acidophilus</i></b>  | Ottogalli <i>et al.</i> 1973, Angulo <i>et al.</i> 1993, Marshall 1993                                      |
| <b><i>Lactobacillus helveticus</i></b>   | Lin & Kuo 1999  |
| <b><i>Lactococcus lactis subsp lactis</i></b>  | Ottogalli <i>et al.</i> 1973, Angulo <i>et al.</i> 1993, Marshall 1993, Pintado <i>et al.</i> 1996          |
| <b><i>Leuconostoc</i></b>  | Rosi & Rosi 1978, Angulo <i>et al.</i> 1993; Marshall 1993, Lin & Kuo, 1999                                 |
| <b><i>Lactobacillus kefiranofaciens</i></b>  | Fujisawa <i>et al.</i> 1988; Toba <i>et al.</i> 1991, Mukai <i>et al.</i> 1992, Takizawa <i>et al.</i> 1998 |
| <b><i>Lactobacillus parakefir</i></b>  | Takizawa <i>et al.</i> 1994, 1998   |



|   |  |
|---|--|
| <b><i>Acetobacter aceti</i></b>                   | Rosi 1978 <sup>a</sup> , Angulo <i>et al.</i> 1993   |
| <b><i>Candida kefir, Kluyveromyces lactis</i></b> | Zourari & Anifantakis 1980, Engel <i>et al.</i> 1986, Angulo <i>et al.</i> 1993, Marshall 1993 |
| <b><i>Kluyveromyces lactis</i></b>                | Engel <i>et al.</i> 1986, Angulo <i>et al.</i> 1993  |
| <b><i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>            | Rosi 1978b, Rohm <i>et al.</i> 1992, Angulo <i>et al.</i> 1993, Marshall 1993                  |
| <b><i>Saccharomyces delbrueckii</i></b>           | Rosi 1978b, Engel <i>et al.</i> 1986, Pintado <i>et al.</i> 1996                               |
| <b><i>Torulopsis holmii</i></b>                   | Wyder. 2001  |
| <b><i>Candida holmii</i></b>                      | Engel <i>et al.</i> 1986, Angulo <i>et al.</i> 1993  |
| <b><i>Saccharomyces unisporus</i></b>             | 1993   |
| <b><i>Torulaspota delbrueckii</i></b>             | Angulo <i>et al.</i> 1993  |
| <b><i>Candida friedricchii</i></b>                |  |
| <b><i>Kluyveromyces marxianus</i></b>             | Rohm <i>et al.</i> 1992, Lin Kuo 1999  |

En los gránulos de kefir, las bacterias del ácido láctico son más numerosas ( $10^8$ - $10^9$ ufc/ml) que las levaduras ( $10^5$ - $10^6$ ufc/ml) y las bacterias ácido acéticas ( $10^5$ - $10^6$  ufc/ml), sin embargo, la proporción en la que se encuentran estos microorganismos puede ser afectada por las condiciones de fermentación (Koroleva 1991; Garrote *et al.* 2001)

Ancestralmente se han atribuido muchos efectos benéficos a la salud a partir del consumo de kefir. Esto ha sido confirmado mediante estudios *in vitro*

e *in vivo* donde se ha demostrado que el kefir y sus constituyentes pueden tener propiedades antimicrobianas, antivirales y antimutagénicas, entre otras (Garrote et al 2000, Farnworth 2005). Asimismo se ha descrito la capacidad del kefir de estimular el sistema inmune en estudios *in vivo* (Thoreux - Schmucker 2001, Vinderola *et al.* 2005). Estos efectos podrían atribuirse a la actividad de los microorganismos por sí mismos (Cross, 2002) o a los productos formados durante el proceso de fermentación, ya que se ha demostrado la actividad biológica que presentan algunos de estos productos, incluyendo la modulación de la respuesta inmune en modelos animales (Gill *et al.* 2003, Moreno de Leblanc *et al.* 2004). Medrano y colaboradores demostraron que el kefiran, que es el polisacárido que forma la matriz del gránulo de kefir, tiene capacidad inmunomodulatoria al ser administrado a ratones por vía oral (2011).

Respecto de las propiedades antimicrobianas, se ha demostrado el efecto inhibitorio a partir de sobrenadantes de productos fermentados con kefir o con microorganismos aislados a partir de ellos (Vinderola *et al.* 2007). Investigaciones realizadas *in vitro* han mostrado que lactobacilos aislados de kefir antagonizan con *E. Coli* EHEC mostrando una interferencia en la cascada de señalización activada por el patógeno (Hugo *et al.* 2006). Algunos estudios también demostraron que la microflora del kefir podía tener un efecto inhibitorio sobre la invasión de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis a células

Caco-2 (Golowczyc *et al.* 2007), y la capacidad de proteger de la infección por *Campylobacter jejuni* en estudios *in vivo* (Zacconi *et al.* 2003).

## **LAS PARASITOSIS**

Desde tiempos inmemoriales los parásitos han sido reconocidos como causantes de enfermedad en humanos.

Las enfermedades parasitarias intestinales tienen una distribución mundial, sin embargo, son más comunes en áreas tropicales y subtropicales, constituyéndose en un problema de salud pública para los habitantes de esas regiones (WHO, 1992).

En el mundo, en particular Asia, África y América Latina, el conocimiento acerca de la distribución y prevalencia de las infecciones parasitarias es insuficiente ya que los servicios de salud y asistencia médica suelen otorgar precarios recursos para su estudio y control epidemiológico.

La mayoría de las enfermedades parasitarias no son de denuncia obligatoria y en general ocurren en poblaciones marginales de las ciudades o en zonas rurales carentes de servicio de asistencia médica y de salud, lo que dificulta su diagnóstico etiológico. Por lo tanto, las estadísticas de morbilidad y de mortalidad no reflejan a menudo la realidad.

Las parasitosis intestinales son una patología muy común, debido a los malos hábitos de higiene, y a que la transmisión de las mismas se produce, entre otras, por la vía fecal - oral. Entre los parásitos intestinales más frecuentes se encuentran los protozoos, entre ellos: *Blastocystis hominis*, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba coli* y *Endolimax nana*.

Existen dos grandes grupos de parásitos intestinales: protozoos y helmintos. Algunos de los parásitos que han sido descritos como patógenos para el hombre se mencionan en la Tabla 2.

**Tabla 2:** Clasificación de los parásitos intestinales:

| <b>Protozoos</b>  |                                |
|-------------------|--------------------------------|
| <b>Amebas</b>     | <i>Entamoeba histolitica</i>   |
| <b>Flagelados</b> | <i>Giardia intestinales</i>    |
|                   | <i>Dientamoeba fragilis</i>    |
| <b>Coccidios</b>  | <i>Cryptosporidium ssp</i>     |
|                   | <i>Cyclospora cayetanensis</i> |
|                   | <i>Isospora belli</i>          |
|                   | <i>Sarcocystis coli</i>        |
| <b>Helmintos</b>  |                                |
| <b>Nematodos</b>  | <i>Enterobius vermicularis</i> |
|                   | <i>Áscaris lumbricoide</i>     |
|                   | <i>Trichuris trichura</i>      |
| <b>Trematodos</b> | <i>Fasciola hepática</i>       |
|                   | <i>Schistosoma spp</i>         |
|                   | <i>Clonorchis sinesis</i>      |
|                   | <i>Opistorchis spp</i>         |
| <b>Cestodos</b>   | <i>Taenia solium</i>           |
|                   | <i>Taenia saginata</i>         |
|                   | <i>Hymenolepis diminuta</i>    |
|                   | <i>Hymenolepis nana</i>        |

## **ENFERMEDADES PARASITARIAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (EPTA)**

Estas enfermedades son las que se originan debido a la ingestión de alimentos y/o agua que contengan agentes parasitarios en cantidades tales como para afectar la salud del consumidor, tanto a nivel individual como grupal (OPS/OMS 1996).

La contaminación de los alimentos con parásitos puede ocurrir a diferentes niveles: a nivel inicial, como en los eslabones de la cadena de industrialización y comercialización, o a nivel del consumidor final. La contaminación inicial puede implicar materias primas contaminadas, como por ejemplo, el riego de verduras con aguas servidas. Durante la cadena de industrialización la fuente de contaminación es variable pudiendo tratarse del mismo manipulador de alimentos. Los brotes de EPTA pueden clasificarse de distintas maneras, según la enfermedad que ocasionan, según el agente etiológico responsable, según los alimentos relacionados y según el lugar de consumo del alimento.

Diversos mecanismos pueden ser generadores de EPTA. A veces el agente etiológico puede hallarse como contaminante de los alimentos, tal como ocurre en los casos de:

- FECALISMO: puede ser directo (con materia fecal o de persona a persona) o indirecto (por agua o alimentos contaminados y eventualmente vectorizado por insectos: moscas o cucarachas)
- GEOFAGIA: por consumo de frutas o verduras mal lavadas que contengan tierra contaminada.

En otros casos, el parásito puede hallarse presente en el alimento como parte de su ciclo biológico, tal como ocurre con las infecciones que se adquieren por CARNIVORISMO de vacuno (*T. saginata*, pero también *Toxoplasma gondii*) o de cerdo (*T. solium*, pero también *T. gondii* y *Triquinella spiralis*).

## **VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA**

La vigilancia epidemiológica se define como la recolección sistemática, continua, oportuna y confiable de información relevante y necesaria sobre algunas condiciones de salud de la población. Hasta ahora, a nivel mundial y especialmente en países en vías de desarrollo, se ha aplicado muy poco la vigilancia planificada en materia de enfermedades parasitarias.

La eliminación de las parasitosis requiere de acciones sanitarias de alto costo y que consisten fundamentalmente en:

1. Saneamiento de los recursos hídricos.

2. Mejoramiento de las condiciones de vivienda.
3. Control de los vectores.
4. Mejoramiento de la nutrición y la higiene de los alimentos.
5. Educación sanitaria

Las parasitosis perjudican el desarrollo económico de naciones y están estrechamente vinculadas con la pobreza y con los sectores más desamparados.

Por otro lado, en los países desarrollados, ha aumentado la frecuencia de aparición de las parasitosis debido a la diseminación mundial del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (VIH-SIDA) que daña los mecanismos de defensa del hospedador.

Cada año ocurren, por citar algunos ejemplos, hasta 100000 muertes debidas a amebiasis y cientos de miles por helmintiosis, a escala mundial (Botero y Restrepo 1998). Son numerosos los reportes de infecciones por protozoos intestinales como *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium spp.* y *Cyclospora cayetanensis*, los que pueden causar diarreas autolimitadas en individuos inmunocompetentes, como niños y viajeros procedentes de zonas endémicas (Jong 2002).

En un estudio realizado en Madrid (España) durante un periodo de 4 años a una población de 1917 niños, se encontró una incidencia de parasitosis



de un 27,12%. Las especies más frecuentes fueron: *Enterobius vermicularis* (20,44%), *Giardia lamblia* (5,05%), *Entamoeba coli* (2,45%), *Endolimax nana* (1,61%), *Entamoeba histolytica* (0,31%), *Entamoeba hartmanni* (0,05%) e *Iodamoeba butschlii* (0,05%); todos ellos protozoos que suponen el 89% de las parasitosis intestinales en la población general. Un 9% de las parasitosis intestinales están producidas por nematodos, entre los que destacan el *Enterobius vermicularis* y *Trichuris trichiura* y, con mucha menos frecuencia, el *Ascaris lumbricoides* y uncinarias. (Rodrigo 2011).

En estudios y colección de datos en Uruguay, *Giardia* es el protozoo intestinal más frecuentemente informado, presentándose con una prevalencia de aproximadamente 20% (Acuña *et al.* 1999).

Debido a su relativamente largo periodo de incubación y su inicio a menudo insidioso, *Giardia* es difícil detectar como fuente común de epidemias. Sin embargo se han descripto epidemias debidas a contaminaciones a través del agua: en excursionistas en contacto con castores, a través del hielo en restaurantes (Quick *et al.* 1992), y también a través de vegetales crudos consumidos tanto en oficinas como durante actividades al aire libre (Mintz *et al.* 1993).

Según los datos epidemiológicos descriptos, los protozoos son uno de los parásitos más frecuentes y entre ellos, la *Giardia intestinalis*, es una de las más prevalentes y causante principal de parasitosis intestinales en el mundo.

Por todo lo mencionado, las enfermedades parasitarias son consideradas un problema de salud pública y el control de éstas es una prioridad para la OMS.

### **PARASITOSIS INTESTINALES: GIARDIASIS**

El agente etiológico responsable de esta enfermedad es un protozoario conocido como *Giardia spp*, que presenta dos estados en su ciclo de vida. La forma infectiva son los quistes, los cuales al ingresar por vía oral sufren la acción de las enzimas digestivas, y de esa manera se liberan los trofozoítos, siendo este el segundo estado del parásito (Adam 1991).

Si bien la giardiasis es una parasitosis que afecta a personas de todas las edades, el número de casos notificados es mayor entre los niños de 1 a 9 años y adultos mayores de 50 años (Rutledge y Boyd. 2010). Las estaciones del año donde predomina el calor marca una diferencia en la aparición de personas infectadas con *Giardia*. Se ha visto que la incidencia de la enfermedad aumenta dos veces en primavera y verano, lo cual coincide con el aumento de las actividades al aire libre, refleja un mayor uso de agua no tratada para el

consumo (los lagos y ríos), así como un mayor uso de piscina comunitaria. La transmisión de *Giardia* se ve facilitada por el importante número de quistes que pueden ser diseminados por una sola persona (Danciger y López, 1975), los largos períodos de tiempo que los quistes puede ser esparcidos (Pickering *et al.* 1984), la baja dosis infecciosa (Katz *et al.* 2006), y la tolerancia del parásito a la acción de los desinfectantes comúnmente utilizados (Jarroll *et al.* 2005).

A nivel mundial, es uno de los parásitos identificados con mayor frecuencia asociado a brotes de enfermedades transmitidas por el agua (Karaniš *et al.* 2007). Durante el periodo 1998 - 2007, de 7.650 brotes de origen alimentario se más del 7% se atribuyeron a *Giardia* en EEUU. Las prácticas inadecuadas de higiene contribuyen a que los brotes de giardiasis sean asociados al consumo de alimentos (Quick *et al.* 1992), y por contacto de persona a persona en los centros de cuidado infantil (Furnes *et al.* 2000). Los brotes que se atribuyen a contaminación con agua, son generalmente asociados a la contaminación de las heces de los animales en las fuentes de agua (Daly *et al.* 2010).

La transmisión de la *Giardia* por alimentos se produce generalmente por la contaminación directa a través de un manipulador infectado (Quick *et al.* 1992), el uso de agua contaminada en la preparación de los alimentos (Dawson 2005), o la contaminación de los alimentos de origen animal (Smith *et al.* 2007). Por otro lado, el uso de aguas residuales tratadas para el riego está

asociado con el hallazgo de quistes de *Giardia* en los productos frescos, tales como lechuga, repollo y algunos tubérculos (Amahmid 1999).

Este organismo es causante de diarrea a través del mundo, tiene una alta prevalencia e incidencia de infección, provocando retardo en el crecimiento cuando se presenta una giardiasis crónica (Fraser *et al.* 2000). La giardiasis es una infección cosmopolita de tipo zoonótico cuya prevalencia varía entre 2 y 5% en países industrializados, y puede superar el 30% en países en desarrollo (Minvielle *et al.* 2004). Según la OMS, la giardiasis tiene una distribución global estimada en  $2,8 \times 10^8$  casos anuales en seres humanos. En Asia, África y Latinoamérica, alrededor de  $2 \times 10^8$  personas presentan giardiasis sintomática y se diagnostican  $5 \times 10^5$  nuevos casos por año (Thompson 2004).

En un estudio realizado en Colombia en niños de 1 a 7 años atendidos en los hogares de madres comunitarias del Instituto Colombiano de Bienestar Familiar (ICBF), se informó una prevalencia de la parasitosis del 12,8% en niños (Chaves *et al.* 2007).

Otro estudio realizado en Brasil mostró una tendencia a presentar un menor peso (para una misma edad y talla) en niños que presentaron síntomas de giardiasis (Robert *et al.* 2001), observaciones que también fueron reportadas por otros autores (Muniz-Junqueira y Queiroz 2002). Asimismo, un estudio realizado con un grupo de niños ecuatorianos informó que los

pacientes infectados con *Giardia* tuvieron un riesgo de retraso en el crecimiento que duplica la de los niños sanos (Sackey *et al.* 2003).

En Argentina, se llevó a cabo un estudio en el año 2004 donde se detectó una prevalencia del 6% en algunas zonas rurales de la provincia de Buenos Aires (Minvielle *et al.* 2004) mientras que otros estudios epidemiológicos realizados en hogares transitorios y asentamientos de Argentina han reportado prevalencias de 23 y 29% respectivamente (Minvielle *et al.* 2008). En Chaco, se ha reportado una prevalencia de 24% (Mangiatterra *et al.* 2006). Mediante estudios realizados en La Plata, se ha reportado una prevalencia del 34% en habitantes de ese distrito (Gamboa *et al.* 2003). Además, este parásito ha sido detectado en muestras ambientales, en aguas de consumo y de recreación en diferentes zonas del país (Soriano *et al.* 2003).

La tasas de reinfección por *Giardia* son altas, por lo que la infección por este protozoo, a diferencia de otras parasitosis intestinales, resulta muy difícil de controlar (Gilman *et al.* 1988). La variación antigénica ha sido señalada como un mecanismo del parásito para incrementar tanto la oportunidad de infección inicial exitosa como las frecuentes reinfecciones (Nash 1997).

### **Descripción del parásito**

*Giardia intestinalis* (Sin. *Giardia lamblia*, *Giardia duodenalis*) es un microorganismo eucariótico unicelular flagelado (Adam 1991). El parásito fue

descrito por primera vez por el inventor del microscopio Antonie Van Leeuwenhoek, en 1681, quien observó el microorganismo en sus propias deposiciones (Botero y Restrepo 1999).

Como se mencionó anteriormente, *Giardia* presenta dos estados en su ciclo de vida: el quiste (su forma infectiva) y el trofozoíto. Los quistes son eliminados con la materia fecal, subsisten a condiciones hostiles y son capaces de sobrevivir de 1 a 3 meses en suelos húmedos y aguas. Algunos de los quistes que ingresan por vía oral sufren la acción de las enzimas digestivas y de esa manera se liberan los trofozoítos. El trofozoíto de *Giardia intestinalis* tiene forma piriforme, posee dos núcleos y mide aproximadamente 15 micrones de largo por 7 de ancho (Adam 2001). En el citoplasma de los trofozoítos se encuentra una gran cantidad de gránulos. Algunos de ellos son grandes, de 300 A°, de aspecto denso, formados principalmente de glucógeno; otros son pequeños, de 150 a 200 A°, de aspecto claro, que corresponden a ribosomas. El trofozoíto presenta retículo endoplásmico rugoso, aunque no tiene aparato de Golgi, retículo endoplásmico liso, cuerpos de pigmento, ni mitocondrias. Además contiene una gran cantidad de vacuolas ovoides y circulares limitadas por una membrana, las cuales se disponen en hilera en la periferia dorsal y ventral, y están interconectadas formando una red de canales intracitoplasmáticos que conforman el sistema digestivo de *Giardia* (Ackers 1980, Lujan *et al.* 1995)

Es característica una cavidad o ventosa que ocupa la mitad anterior del cuerpo del parásito, la cual utiliza para fijarse a la mucosa intestinal. El disco mide de 8 a 10  $\mu\text{m}$ , y se encuentra integrado por microtúbulos espirales (Adam 2001). La membrana citoplasmática que cubre al disco posee lectinas que también juegan una importante función en los mecanismos de adhesión del parásito (Farthing 1980).

### **Patología y manifestaciones clínicas**

Los trofozoítos se localizan en el intestino delgado fijándose a la mucosa, principalmente en el duodeno. Allí se multiplican por división binaria. A medida que descienden en el tracto gastrointestinal encuentran condiciones que promueven el enquistamiento, como el pH levemente alcalino y las sales biliares conjugadas con ácidos grasos (Adam 2001).

La infección por *Giardia* tiene varias presentaciones posibles. Puede tratarse de una infección autolimitada con episodios de diarrea aguda, aunque la mayoría de los infectados son asintomáticos. Este último grupo está conformado por individuos bien nutridos que presentan respuesta inmune adecuada y que albergan pocos parásitos en el intestino (Atias 1998). Por otro lado, se pueden encontrar pacientes infectados que presentan una giardiasis crónica, que manifiestan diarreas esporádicas y mala absorción de nutrientes como: grasas, D-xilosa, vitamina A y vitamina B12 (Mekhlafi *et al.* 2004). Estos

casos se caracterizan además por infecciones con elevado número de parásitos, siendo frecuente encontrar entre ellos niños menores de 6 años, con algún grado de desnutrición o con deficiente respuesta inmune, que puede deberse a diversos grados de desnutrición (Atias 1998).

Las formas leves se caracterizan por dolor epigástrico de poca intensidad y alteración del tránsito intestinal (Jimenez-Cardoso 2009). En casos agudos severos se observan náuseas, vómitos y diarrea, dolor epigástrico y anorexia; síntomas que pueden persistir por 3 o 4 días. La falta de tratamiento de las infecciones puede llevar a la cronicidad (Adam 1991). En la fase crónica aparece un cuadro diarreico con 4 ó 5 evacuaciones diarias, disentería, anorexia, dolores abdominales y se agrega una importante baja de peso. Los síntomas remiten y reaparecen en tiempos variables de un individuo a otro. El cuadro puede permanecer así por un lapso indefinido si no se realiza un tratamiento específico.

El principal mecanismo por el cual el parásito ejerce su acción patógena se debe a la acción mecánica sobre la mucosa, ya que los trofozoítos se adhieren fuertemente a la superficie epitelial del intestino a través de su disco ventral. Algunas moléculas de la superficie del parásito se ocupan de esta interacción, entre las que están las giardinas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\delta$  giardinas) que son una compleja red de proteínas contráctiles que cumplen la función de adhesión (Jenkins *et al.* 2009). Los trofozoítos utilizan varios nutrientes del lumen intestinal,



fundamentalmente glucosa, sales biliares y ciertos aminoácidos, por lo que el secuestro de sales biliares podría explicar el fenómeno de malabsorción de grasas (Hawrelak 2003, Müller y von Allmen 2005).

El daño del ribete en cepillo del epitelio intestinal y la disminución de la actividad de las disacaridasas provocan un aumento de disacáridos en el lumen intestinal (Farthing 1997), hipersecreción de electrolitos y malabsorción que da como resultado una acumulación de fluidos en el lumen, lo cual desencadena finalmente la diarrea (Buret 2008).

### **Relación con el hospedador**

El hospedador utiliza varios mecanismos para hacer frente a la infección parasitaria. En ese sentido, tanto la inmunidad innata como la adaptativa (humoral y celular) tienen una importante función en el control de la infección. Los anticuerpos IgA e IgG cumplen un papel importante, al mismo tiempo que la actividad de las células T, los macrófagos y los neutrófilos (Singer y Nash 2000).

En el proceso de respuesta inmune, las células epiteliales y macrófagos producen óxido nítrico, el cual se ha demostrado que tiene un efecto inhibitorio sobre la proliferación de trofozoítos (Eckmann 2003). Por otro lado, se produce la liberación de defensinas y lactoferrina (Aley *et al.* 1994), y de especies reactivas del oxígeno que, junto al óxido nítrico, poseen un efecto citotóxico e

inmunomodulador (Roxström-Lindquist *et al.* 2006), mejorando la capacidad de los macrófagos de eliminar al parásito (Hill *et al.* 1987). Además, los mastocitos juegan un rol crítico en la respuesta inmune innata y adaptativa (Rao *et al.* 2008), y se demostró que participan en la defensa del hospedador frente a la giardiasis (Li *et al.* 2004).

A pesar de los esfuerzos del hospedador por controlar la infección, *Giardia* posee mecanismos de evasión capaces de impedir la resolución de la infección y los trofozoitos pueden persistir en el intestino delgado durante semanas o incluso años (Farthing *et al.* 1986). Entre estos mecanismos de evasión se puede mencionar las proteínas variantes de superficie (VSP), que son codificadas por los genes *vsp* de *Giardia*. Las VSP varían en su resistencia a proteasas intestinales por lo que ciertos autores sugieren que esta propiedad actuaría como un mecanismo de selección positiva, ya que los trofozoitos con estas VSP son capaces de sobrevivir en el medio intestinal. Este fenómeno ocurre en una gran variedad de microorganismos y su principal función es la evasión de la respuesta inmunológica (Svård *et al.* 1998; Nash, 2002).

En el intestino delgado proximal, el ambiente en el cual el parásito coloniza, existe una concentración muy baja de bacterias. La microbiota predominante está compuesta por microorganismos de los géneros *Streptococcus spp.*, *Haemophilus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Actinomyces spp.*, y *Peptostreptococcus spp.* Algunos autores han sugerido que la composición de la

microbiota intestinal también puede influenciar en alguna medida el grado de infección por *Giardia* (Torres *et al.* 2000).

## **Tratamientos**

El metronidazol es la droga de elección recomendada por la Food and Drug Administration (F.D.A.) y ha probado ser efectivo a dosis diarias múltiples (tres) por un período de cinco días. Sin embargo, produce efectos adversos como náuseas, vómitos, cefalea, sequedad de la mucosa oral, sabor metálico, intolerancia oral, urticaria y vértigo, lo cual puede ocasionar que el tratamiento sea abandonado antes de completarse (Abramou 1993). El metronidazol es mutagénico en bacterias y carcinogénico en ratones y ratas, administrado en altas dosis por periodos prolongados (Burtin *et al.* 1995).

También se usan otros derivados de los nitroimidazoles, además de furazolidona, quinacrina, albendazol y paramomicina. Todos estos agentes también producen efectos secundarios, como náuseas, sabor metálico, coloración amarillenta de la piel (quinacrina), incremento de las enzimas hepáticas (albendazol) y náuseas tras la toma junto con alcohol. Algunos tratamientos se administran en dosis única (tinidazol), a diferencia de las dosis sugeridas para el metronidazol (Liu y Weller 1996).

Los problemas asociados a los tratamientos tradicionales han motivado la búsqueda de estrategias terapéuticas alternativas. Entre ellas se pueden

mencionar el uso de extractos de plantas (Calzada *et al.* 1999), productos derivados de abejas (Miyares *et al.* 1988) y lectinas presentes en la dieta (Ortega-Barria *et al.* 1994). También fue publicada la acción de la leche materna sobre el parásito a través de la generación de productos lipolíticos tóxicos y la capacidad de los anticuerpos presentes en la leche humana para conferir protección frente a la giardiasis (Reiner *et al.* 1986).

En estos casos siempre se recomienda realizar una dieta especializada para reducir los síntomas de la enfermedad y promover las defensas del huésped, y de esta manera inhibir el crecimiento y replicación del parásito. Esto se podría lograr con una dieta rica en trigo (Grant *et al.* 2001) y alimentos ricos en fibra y bajos en carbohidratos simples (Hawrelak 2003). Por otro lado, la ingestión adicional de microorganismos benéficos puede ayudar en la eliminación de la infección por *Giardia*, al interferir a través de diferentes mecanismos que incluyen la competencia por los sitios limitados de adherencia (Fuller y Gibson, 1997) y por nutrientes como la glucosa (Vanderhoof y Young, 1998), además de la estimulación de la respuesta inmune (Schultz *et al.* 2008).

Por el papel que ejercen los probióticos en la protección al hospedador, se planteó como una alternativa para el control de la infección por *Giardia* el uso de bacterias ácido lácticas para antagonizar la adhesión y proliferación de trofozoítos (Perez *et al.* 2001). Estos estudios mostraron una importante

inhibición de la proliferación del parásito *in vitro* por factores extracelulares de un lactobacilo con características probióticas (*Lactobacillus johnsonii* La1).

En modelos animales, se demostró un efecto protector frente a la infección y la capacidad de modular la respuesta inmune *in vivo*, utilizando esta misma cepa de *Lactobacillus johnsonii* o una cepa de *Enterococcus faecium* (Humen *et al.* 2005, Benyacoub *et al.* 2005). Estas evidencias alientan la posibilidad de continuar el estudio de esta interacción en modelos *in vivo*, y evaluar la alternativa de utilización de productos probióticos en la prevención y/o tratamiento de la giardiasis.

## OBJETIVO GENERAL

Estudiar la influencia de leches fermentadas con gránulos de kefir en el curso de una infección experimental con *Giardia intestinalis* en un modelo murino, para su posible utilización en la prevención y/o tratamiento de la giardiasis.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Estudiar la capacidad de sobrenadantes de kefir de inhibir la adhesión de *Giardia intestinalis* a células de epitelio intestinal en cultivo.
- ✓ Estudiar la capacidad de leches fermentadas con gránulos de kefir de alterar la tasa y/o intensidad de infección por *Giardia intestinalis*
- ✓ Evaluar la capacidad inmunomodulatoria del kefir a través de la determinación de la distribución de diferentes poblaciones celulares de importancia en la respuesta contra el parásito, y a través del estudio de la producción de citoquinas y quimoquinas relevantes en la respuesta del hospedador.

## INTRODUCCIÓN:

La adhesión de enteropatógenos microbianos al epitelio intestinal se considera un paso crítico en la patogénesis de muchas infecciones intestinales. Los trofozoítos de *Giardia* se replican en las criptas del duodeno y en la porción superior del yeyuno, y se reproducen asexualmente por fisión binaria o bipartición. Algunos de los trofozoítos pueden enquistarse en el íleon, posiblemente como resultado de la exposición a sales biliares o a la ausencia de elementos nutritivos como el colesterol (Adam, 1991).

En general se considera que el parásito se adhiere a las células epiteliales intestinales por una fuerza de succión generada por debajo del disco ventral, mediante procesos mecánicos relacionados con la actividad de las proteínas contráctiles del disco ventral. Los cambios conformacionales del disco ventral podrían ser suficientes para dar lugar a la adhesión a diferentes superficies como vidrio, plástico o al epitelio intestinal *in vivo*. Por otra parte, la estructura rígida del disco ventral, indirectamente puede contribuir al proceso de adhesión activo mediante el mantenimiento de un diferencial de presión negativo por un mecanismo aún desconocido (House *et al.* 2011). Aunque existen varias teorías en las que se dice que los flagelos están involucrados en la adhesión, recientemente se ha demostrado que la motilidad flagelar no está directamente relacionada al mantenimiento de la unión (House *et al.* 2011), lo

que invalida el "modelo hidrodinámico" antiguamente postulado (Holberton 1974).

La membrana del parásito puede estar implicada en el proceso de unión. Se ha demostrado previamente utilizando eritrocitos de mamíferos como modelo de adhesión, que *Giardia intestinalis*, como algunas bacterias y otros protozoos, tiene actividad lectina asociada con la superficie de la membrana con especificidades para residuos de D-glucosa y D-manosa (Inge *et al.* 1988, Buret 2008).

Además de resistir esfuerzos de corte resultantes del flujo peristáltico, *Giardia* debe soportar las variaciones en la osmolalidad y el pH del contenido del intestino delgado (Hansen *et al.* 2008).

La infección con *Giardia* produce la disrupción del ribete en cepillo en la cara apical de los enterocitos y desencadena diversos procesos inmunopatológicos, contribuyendo de esa forma al desarrollo de una respuesta inmune por parte del hospedador. Además, se plantea la interferencia mecánica por efecto de tapizado que pueden producir los trofozoítos adheridos al duodeno, evitando que el epitelio sea colonizado por otros microorganismos (Farthing 1996, Ortega y Adam 1997, Procop 2001).

La giardiasis provoca una malabsorción de electrolitos y fluidos asociada a la alteración del borde en cepillo y una disminución del área de absorción (Buret *et al.* 1992). El daño del borde en cepillo de las microvellosidades y la



disminución de la actividad de las disacaridasas pueden llevar a incrementar las cantidades de disacáridos en la luz intestinal y causar diarrea osmótica (Nain *et al.* 1991, Humen *et al.* 2011).

Por otro lado, las alteraciones en el epitelio observadas en la giardiasis, no se deben al solo efecto de la adhesión mecánica del parásito, se deben también a mecanismos más específicos de activación celular que derivan en estas modificaciones del epitelio. Existen algunas evidencias acerca de la posible acción de quinasas de miosina de cadena liviana (myosin-light-chain kinases) y la acción pro-apoptótica de caspasa-3 (Scott *et al.* 2002).

En estudios previos sobre la adhesión de trofozoitos de *Giardia* se han utilizado superficies tales como vidrio o plástico como sustrato (Zenian *et al.* 1985), enterocitos aislados de roedores (Inge *et al.* 1988), líneas celulares como Madin-Darby canine kidney cell (MDCK) (Chavez *et al.* 1986) y enterocitos humanos (Caco-2) (Katelaris *et al.* 1995). Si bien las superficies de vidrio y plástico son convenientes y fáciles de trabajar, distan mucho de la superficie con que se encuentra el trofozoíto al momento de la adhesión *in vivo*. El uso de enterocitos aislados en fresco o vellosidades intestinales es tedioso y el manejo experimental de estas células puede ser dificultoso (Ceú Sousa *et al.* 2001). El uso de líneas celulares en cultivo como sistema modelo *in vitro* permite una mejor comprensión y acercamiento a mecanismos celulares de interacción patógeno-huésped y tiene como ventaja el trabajar con una alta homogeneidad

de la población celular. Si bien las líneas celulares están desprovistas de los mecanismos de control normal de crecimiento y de la interacción con células del sistema inmune propias del tejido epitelial intacto, resulta un modelo válido de estudio inicial de la interacción del parásito con el hospedador (Weymer *et al.* 1985). Por tanto, los modelos de co-incubación *Giardia*-enterocito *in vitro* son un vehículo simple y útil tanto para los ensayos de adhesión como para los estudios de patogenicidad y factores de virulencia de *Giardia* (Katelaris *et al.* 1995).

Por otro lado, para estudiar ciertos mecanismos de patogenicidad de este parásito, la utilización de un modelo mucho más complejo, como es el *in vivo*, puede proveer información más cercana a la interacción con el huésped, ya que no solo muestra la interacción con éste, sino también con la microbiota intestinal, la cual necesariamente está involucrada en los procesos patológicos de la infecciones intestinales.

La presencia de flora bacteriana normal en el tracto intestinal también protege contra la colonización por patógenos. Sólo unos pocos ejemplos concretos de esta protección han sido reportados para infecciones por protozoos (Singer *et al.* 2000, Torres *et al.* 2000, Eckmann 2003). La mayoría de los estudios sobre la protección que ofrece la microbiota del intestino o los microorganismos probióticos se han realizado principalmente con bacterias

enteropatógenas (Messens y De Vuyst 2002, Jamuna y Jeevaratnam 2004, Sleator 2010).

Los estudios realizados sobre *Giardia* y su interacción con el huésped han mostrado que la flora normal podría inhibir las infecciones a través de varios mecanismos, incluyendo la competencia por nutrientes, la toxicidad directa, la inducción de la interacción entre los microorganismos probióticos y/o comensales y el patógeno en el epitelio, o diferentes tipos de respuesta innata del sistema inmune de mucosa. Además, algunos estudios *in vitro* indican que lactobacilos probióticos (por ejemplo, *Lactobacillus johnsonii* La1) son capaces de interferir con el ciclo celular de *Giardia intestinalis* (Pérez *et al.* 2001). Por otro lado, un estudio realizado en meriones infectados con *Giardia*, mostró que la administración de *Lactobacillus Johnsonii* La1 redujo la tasa de infección y contribuyó a la resolución de la infección en 21 días, protegiendo la integridad de la membrana de las microvellosidades y disminuyendo el daño generado en la mucosa (Humen *et al.* 2005). Por otro lado, se han reportado estudios realizados con *Enterococcus faecium* SF68, en los cuales se demostró la eficacia en la eliminación de la infección por *Giardia* en ratones (Benyacoub *et al.* 2005).

El efecto antagonista de *L. johnsonii* La1 y *E. faecium* SF68 sobre *Giardia* sugiere que la modulación de la ecología microbiana en el intestino, a través de la administración de microorganismos probióticos, puede constituir un

enfoque interesante para la prevención de la giardiasis. Aunque los mecanismos subyacentes de este proceso son desconocidos, disminuir la proliferación de trofozoitos sería un paso relevante para eliminar los parásitos del huésped o para reducir los efectos patógenos. Este efecto inhibitorio podría atribuirse tanto a un producto común del metabolismo bacteriano o a una combinación de productos en lugar de un compuesto antimicrobiano específico (Pérez *et al.* 2001).

Como se mencionó anteriormente, diversos autores han descrito que el kefir es capaz de inhibir microorganismos patógenos. Parte de la actividad antimicrobiana del kefir se atribuye al ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetilo, acetaldehído, y/o bacteriocinas producidas por las especies de *Lactobacillus* presentes en el producto (Havenaar *et al.* 1992, Helander *et al.* 1997, Garrote *et al.* 2001).

En nuestro grupo de trabajo se han llevado a cabo diferentes estudios sobre la acción inhibitoria del kefir y sus microorganismos a lo largo de la última década. En particular, se demostró que los sobrenadantes de lactobacilos heterofermentativos aislados de kefir ejercerían una acción bactericida sobre *Salmonella*, lo cual estaría asociado al bajo pH de los mismos (Golowczyc *et al.* 2007). Por otro lado, se observó que el kefir inhibe la germinación de endosporas de *Bacillus cereus* y, si los gránulos de kefir se hallaran contaminados con endosporas de este patógeno, paulatinamente irían

perdiendo dicha contaminación hasta desaparecer a través de los sucesivos repiques en leche no contaminada (Kakisu *et al.* 2007). Además se demostró la actividad inhibitoria del sobrenadante de leche fermentada con gránulos de kefir contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Garrote *et al.* 2000), entre ellas *E. coli*, atribuyéndole dicho efecto a los ácidos orgánicos producidos durante la fermentación del kefir.

Recientemente, en un estudio realizado sobre ratones C57BL/6, se observó que la administración de una mezcla de cepas aisladas de kefir (*S. cerevisiae* CIDCA 8112, *L. plantarum* CIDCA 83114 y *L. kefir* CIDCA 8348) logró reducir la tasa de infección por *Giardia* de manera significativa (Humen 2009). Sin embargo, aún no se han llevado a cabo estudios sobre la acción del producto fermentado entero (kefir) en un modelo de infección de similares características.

El presente capítulo abarcará los estudios *in vitro* sobre la capacidad de los sobrenadantes de kefir de inhibir y/o interferir en la adhesión del trofozoíto sobre células de epitelio intestinal humano en cultivo, así como el efecto de la administración de kefir sobre la tasa y/o intensidad de infección en un modelo *in vivo*.

## Objetivos Capítulo 1

- ✓ Estudiar la capacidad de sobrenadantes de kefir de inhibir la adhesión de *Giardia intestinalis* a células de epitelio intestinal en cultivo.
- ✓ Evaluar la capacidad de leches fermentadas con gránulos de kefir de alterar la tasa y/o intensidad de infección de *Giardia intestinalis* en un modelo murino.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### CULTIVO DE *Giardia intestinalis*

La cepa utilizada en este trabajo fue la cepa H7, provista por American Type Culture Collection (ATCC 50581). Los trofozoítos se cultivaron en tubos de vidrio con 12 ml de medio TYI-S-33 (ver Anexo) durante 72hs a 37°C en oscuridad. Para los repiques sucesivos, se descartó el sobrenadante que contiene los trofozoítos no adheridos al vidrio, y se adicionaron 2 ml de medio TYI-S-33 fresco. Luego se incubaron durante 10 minutos sobre hielo y con agitación para despegar los trofozoítos adheridos al vidrio. Posteriormente, 200 µl de la suspensión anterior se inocularon en tubos con 12 ml de medio TYI-S-33 fresco y se incubaron a 37 °C en oscuridad hasta confluencia. En ningún caso se realizó más de tres repiques sucesivos a partir del mismo cultivo, de manera de preservar las características originales de la cepa de trabajo.

Para la cosecha de los trofozoítos, se repitió el proceso de desprendimiento, resuspendiendo los mismos en buffer fosfato salino a pH 7,2 (PBS) estéril.

## **OBTENCIÓN DE LA LECHE FERMENTADA CON KEFIR**

Para todos los ensayos se usó leche UAT comercial y gránulos AGK1 de la colección del CIDCA. Los gránulos fueron previamente lavados con agua potable, y se incubaron en la leche en una proporción del 10% durante 24 horas a 20°C. El producto obtenido se filtró con colador plástico para separar la leche fermentada de los gránulos, los cuales fueron lavados nuevamente con agua potable y sembrados en leche fresca.

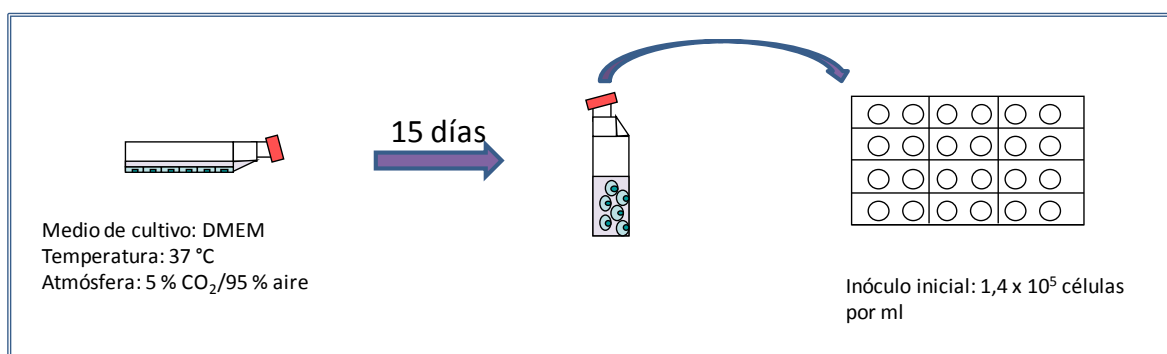
## **EXTRACCIÓN DE LOS SOBRENADANTES DE KEFIR**

El kefir obtenido se centrifugó a 8000 rpm durante 20 minutos a 20°C y el sobrenadante se llevó a pH 6 con NaOH 10N. Se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones para la precipitación de proteínas en el suero, y el sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ . Como control, se utilizó leche parcialmente descremada sometida al mismo proceso, la cual fue acidificada con HCl 10N hasta el pH alcanzado por el kefir luego de 24 horas de fermentación. Una vez obtenidos los concentrados de los sobrenadantes se reconstituyeron en PBS estéril a una concentración aproximada de 500  $\mu\text{g}$  /ml. Los productos así obtenidos se congelaron a -80°C y se liofilizaron.



## CULTIVO DE ENTEROCITOS HUMANOS

Enterocitos humanos de la línea Caco-2, fueron cultivados en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium, Invitrogen, USA) suplementado con suero fetal bovino (PAA, USA) al 15%, aminoácidos no esenciales (Invitrogen, USA) y antibióticos (penicilina/estreptomicina). Las monocapas celulares se prepararon en placas de cultivo celular (Greiner Bio One, Alemania – Corning Glass Work, Corning, N.Y.) de 24 pocillos, con un inóculo inicial de  $1,4 \times 10^5$  células por ml. Los ensayos y el mantenimiento de los cultivos celulares fueron llevados a cabo a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera de 5 % de  $\text{CO}_2$  - 95 % de aire. Las células fueron utilizadas en confluencia y completamente diferenciadas (15 días de cultivo) (Figura 1).



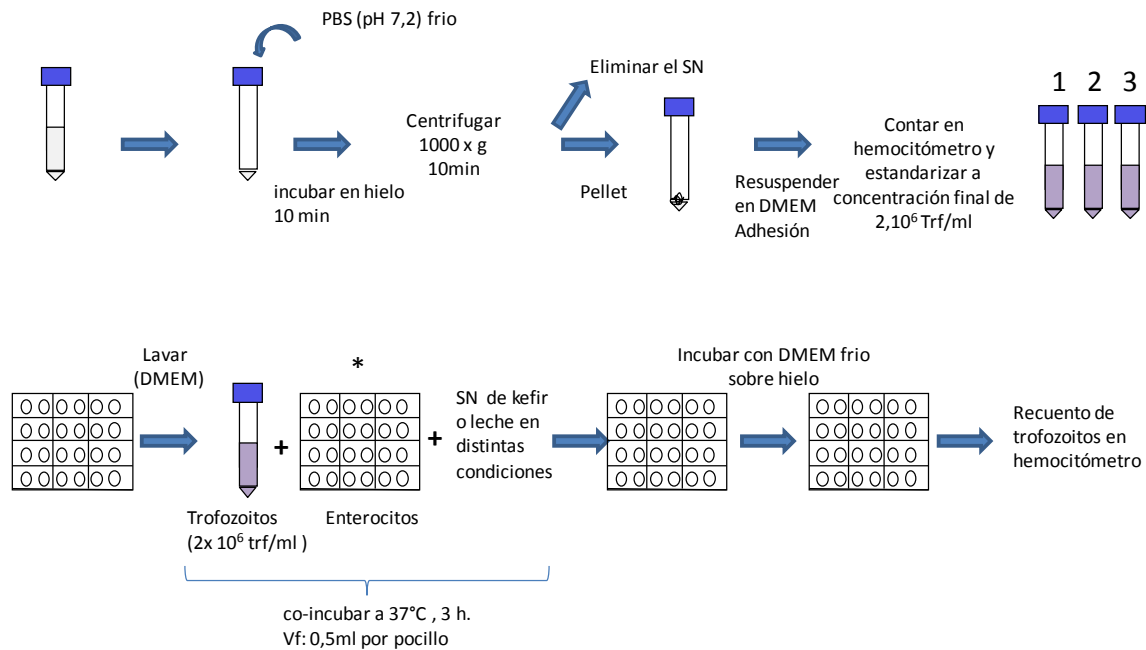
**Figura 1:** Esquema del mantenimiento de células y preparación de placas de células de cultivo (Caco-2)

## ENSAYO DE ADHESIÓN

Los ensayos de adhesión fueron llevados a cabo como fuera descrito previamente por Ceu Sousa *et al.* (2001). Los cultivos de *Giardia* fueron cosechados eliminando el medio de cultivo conteniendo los trofozoítos que no se adhirieron a la superficie del tubo. A los tubos se le agregó PBS (pH 7,2) frío, se los incubó en hielo durante 10min para despegar los trofozoítos adheridos y posteriormente fueron centrifugados a 1000 x g por 10min. El sobrenadante fue eliminado y el pellet de trofozoítos se resuspendió en medio DMEM Adhesión (sin suero fetal bovino ni antibióticos). Se contó una alícuota de esta suspensión en hemocitómetro para determinar la concentración inicial y posterior a esto se ajustó la concentración a  $2 \times 10^6$  Trofozoítos/ml. Dos tubos fueron separados para realizar una pre-incubación *Giardia* – sobrenadante de kefir o *Giardia* – sobrenadante de leche por una hora a 37°C.

Por otro lado, se retiró el medio de cultivo de las placas de 24 pocillos y las monocapas celulares fueron suavemente lavadas con DMEM Adhesión para retirar células no adheridas y partículas en suspensión. Los trofozoítos, a una concentración de  $2 \times 10^6$  trf/ml, fueron co-incubados con las células Caco-2 a 37°C en un volumen final de 0,5 ml por pocillo más la adición del sobrenadante en las diferentes condiciones, en una concentración de 100µg /ml. Luego de 3 horas de incubación, los trofozoítos no adheridos fueron suavemente lavados con DMEM Adhesión termostatzado a 37 °C. Los trofozoítos adheridos fueron

recuperados por incubación con 2ml de DMEM Adhesión frío sobre hielo y posteriormente contados en un hemocitómetro (Figuras 2 y 3). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, con pasajes celulares sucesivos.



**Figura 2:** Esquema del ensayo de adhesión de trofozoítos. 1: Tubo con suspensión de trofozoítos. 2: tubo con suspensión de trofozoítos + sobrenadantes de Kefir (100µg/ml) preincubado 1 hora. 3: tubo con suspensión de trofozoítos + sobrenadantes de leche (100µg/ml) preincubado 1 hora. \* Esquema de ensayo detallado en Figura 3.

|                                    |                                    |                                    |  |  |  |
|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|--|--|--|
| PBS+ trofozoítos                   | PBS+ trofozoítos                   | PBS+ trofozoítos                   | ---  | ---  | ---  |
| Trofozoítos + SN de kefir 100µg/ml | Trofozoítos + SN de kefir 100µg/ml | Trofozoito + SN de kefir 100µg/ml  | Trofozoítos + SN de kefir Preincubado 100µg/ml | Trofozoítos + SN de kefir Preincubado 100µg/ml | Trofozoítos + SN de kefir Preincubado 100µg/m  |
| Trofozoítos + SN de Leche 100µg/ml | Trofozoítos + SN de Leche 100µg/ml | Trofozoítos + SN de Leche 100µg/ml | Trofozoítos + SN de leche Preincubado 100µg/ml | Trofozoítos + SN de leche Preincubado 100µg/ml | Trofozoítos + SN de leche Preincubado 100µg/ml |
| ---                                | ---                                | ---                                | ---  | ---  | ---  |

**Figura 3:** Esquema de placa de células Caco 2, condiciones ensayadas.

## **ENSAYOS *IN VIVO***

### ***Animales empleados***

Para el ensayo *in vivo* se usaron ratones C57BL/6 (hembras) categoría SPF (Libre de patógenos específicos) de 4 a 6 semanas de edad, provistos por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Los animales fueron llevados a las instalaciones del bioterio de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP con 10 días de anticipación al tratamiento, para su adaptación al nuevo ambiente y para disminuir los efectos del estrés causados por el traslado y los cambios en las condiciones. Los mismos fueron mantenidos en un sistema controlado de barreras durante todo el tiempo del ensayo para evitar la contaminación cruzada y externa. Todos los procedimientos fueron realizados bajo las normas internacionales de trabajo con animales de experimentación.

### ***Esquema general de los ensayos in vivo***

La inoculación de los animales se realizó por medio de una sonda orogástrica con 200  $\mu$ l de una suspensión de  $2 \times 10^8$  Trofozoítos/ml en PBS estéril. Los controles se inocularon con el mismo volumen de PBS estéril. La distribución de los animales en los distintos grupos de estudio, se muestra en la siguiente tabla 3.

**Tabla 3:** Selección de grupos de ensayo *in vivo*

| Grupo                       | Tratamiento   | Número de animales |
|-----------------------------|---|--------------------|
| <b>Control (C)</b>          | Leche (1:100) <i>ad libitum</i> + comida <i>ad libitum</i>                  | 15                 |
| <b>Giardia (G)</b>          | Infectado con <i>Giardia Intestinalis</i>                                   | 15                 |
| <b>Kefir (K)</b>            | Kefir (1:100) <i>ad libitum</i>   | 15                 |
| <b>Giardia + Kefir (GK)</b> | Infectado con <i>Giardia Intestinalis</i> + Kefir (1:100) <i>ad libitum</i> | 15                 |

Todos los animales recibieron comida (alimento balanceado rata-ratón irradiado) *ad libitum* durante todo el ensayo. Los animales tratados con kefir recibieron el mismo *ad libitum* en el agua de bebida en una dilución 1:100. El mismo fue preparado en fresco cada 24 horas.

A diferentes tiempos después de la infección (2 horas, 2 días y 7 días), los animales fueron sacrificados por inhalación de CO<sub>2</sub> y se tomaron diferentes muestras, como se especifica en la Tabla 4.

**Tabla 4:** Muestras colectadas a diferentes tiempos del ensayo *in vivo*

| TIEMPO POST- INFECCION | MUESTRAS  | ANALISIS REALIZADO                             |
|------------------------|---|--|
| 2 Horas                | 1 cm de intestino sin placa de Peyer                                      | Citoquinas por qRT-PCR*                        |
| 2 Días                 | -Bazo<br>-Placas de Peyer (PP)<br>-Ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) | Poblaciones celulares por citometría de flujo* |
|                        | - 1cm de intestino sin placa de Peyer                                     | Citoquinas por qRT-PCR*                        |
|                        | -5cm de intestino.  | Recuento de Trofozoitos                        |
| 7 Días                 | -Bazo<br>-PP<br>-MLN  | Poblaciones celulares por citometría de flujo* |
|                        | -5cm de intestino.  | Recuento de Trofozoitos                        |

\* Metodologías y protocolos descritos en el Capítulo 2

### ***Recuento de trofozoítos en intestino***

Para evaluar la intensidad de infección en el duodeno a distintos tiempos post-infección, se tomaron porciones de 5cm de intestino delgado desde la unión gastroduodenal y se mantuvieron en 2 ml de medio TYI-S-33 frío. Se lavaron dos veces con el mismo medio para arrastrar los trofozoítos presentes en el lumen intestinal, se realizó un corte longitudinal de la porción de intestino y se homogeneizó en vortex durante 1min. Los trofozoítos recuperados se contaron en hemocitómetro.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para el recuento de trofozoítos, se compararon las medianas utilizando prueba de Mann Whitney. Para la comparación de los resultados de la prueba de adhesión se realizó un test de ANOVA.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

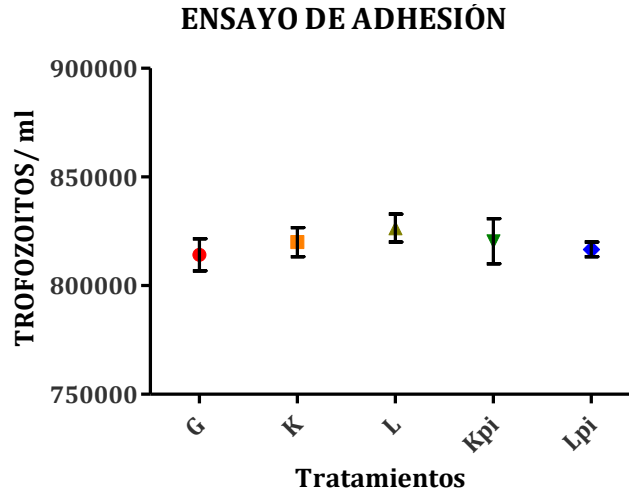
### EFFECTO DE SOBRENADANTES DE KEFIR SOBRE LA ADHESIÓN DE *Giardia intestinalis* A ENTEROCITOS HUMANOS.

La adhesión al epitelio es un paso fundamental para la infección y multiplicación de la *Giardia* (Farthing 1985). Con el fin de determinar si el sobrenadante de kefir es capaz de afectar este proceso, se llevó a cabo un estudio *in vitro* sobre la adhesión de los trofozoítos de la cepa H7 a células de epitelio intestinal humano en cultivo (línea Caco-2), de acuerdo al protocolo descrito en Materiales y Métodos.

El recuento en hemocitómetro del número de trofozoítos adheridos a la monocapa de enterocitos no evidenció diferencias significativas al comparar las diferentes condiciones ensayadas: incubación de células con trofozoítos (G), co-incubación de enterocitos con *Giardia* en presencia de sobrenadante de kefir (K), co-incubación de enterocitos con *Giardia* en presencia de sobrenadante de leche (L), pre-incubación con sobrenadantes de kefir y posterior incubación con trofozoítos (Kpi), y pre-incubación con sobrenadantes de leche y posterior incubación con trofozoítos (Lpi). Estos resultados se muestran en la Figura 1. Cabe destacar que el sobrenadante de kefir no tuvo una influencia negativa sobre el epitelio, ya que las células conservaron su integridad, evidenciada al



microscopio óptico. Asimismo no se observaron células epiteliales en suspensión, ni desprendimiento de la monocapa.



**Figura 4:** Ensayo de adhesión sobre células Caco-2. Recuento de trofozoítos de *Giardia* H7 adheridos al epitelio después de tres horas de incubación (a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub>) en diferentes condiciones (C: control, K: sobrenadantes de kefir, L: sobrenadantes de Leche, Kpi: pre-incubado con sobrenadantes de kefir, Lpi: pre-incubado con sobrenadantes de Leche). Los trofozoítos no adheridos se retiraron con DMEM Adhesión a 37°C. Los trofozoítos adheridos se extrajeron incubando la placa a 4 °C por 10min con DMEM Adhesión frío, y luego fueron contados con hemocitómetro. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Se puede ver que el sobrenadante de kefir concentrado no presenta un efecto antiadherente sobre *Giardia*, ya que no modifica la concentración de trofozoítos adheridos en las condiciones de cultivo. Si bien los modelos que emplean células en cultivo dan un amplio marco de investigación, existen limitaciones particulares para el estudio de nuestro sistema (sobrenadante de kefir), tal como fue descrito empleando otros sistemas modelo (Garrote *et al.*

2001). Al emplear el sobrenadante de kefir previamente neutralizado, los ácidos disociados podrían ejercer un efecto sobre la adhesión del parásito, pero en nuestro estudio no se observaron diferencias que pudieran atribuirse a la presencia de estos compuestos.

El kefir presenta además algunos componentes bioactivos producto de las fermentaciones de los diferentes microorganismos (Farnworth 2005), tales como exopolisacáridos y péptidos. Estos metabolitos podrían ser responsables de los efectos antagónicos contra patógenos intestinales específicos, como es el caso del efecto inhibitorio del exopolisacárido (kefiran) sobre los factores extracelulares citotóxicos y la infección por *Bacillus cereus* (Medrano *et al.* 2008, 2011). De manera similar, también se ha descrito que las proteínas de superficie (capa-S) secretadas por *L. kefir* al medio son capaces de inhibir la invasión de *Salmonella* a células Caco-2 en cultivo (Golowczyc *et al.* 2007). Si bien nuestra hipótesis planteaba la posibilidad de que los componentes bioactivos presentes en el sobrenadante del kefir también pudieran interferir en la adhesión de *Giardia*, los ensayos realizados no mostraron un efecto directo sobre la adhesión.

## **EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE KEFIR EN LA TASA Y/O INTENSIDAD DE INFECCION EN UN MODELO MURINO**

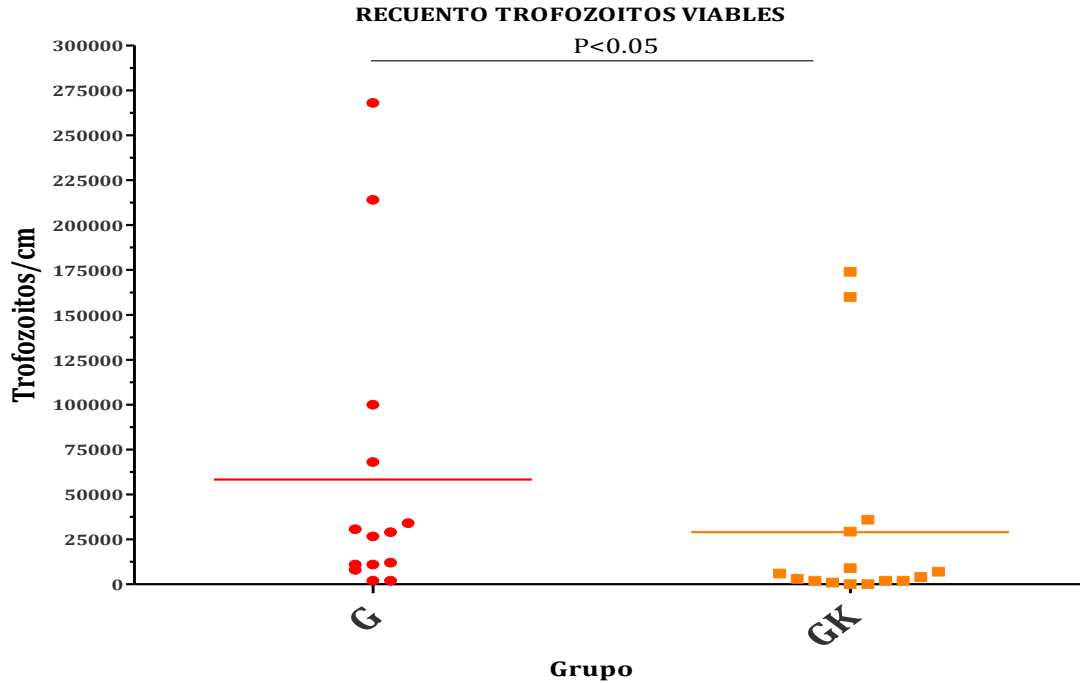
El modelo *in vivo* de infección con *Giardia* en ratones C57BL/6 fue validado en estudios previos de nuestro grupo de trabajo (Humen 2009), constituyendo una herramienta adecuada para el estudio de la influencia del consumo de kefir en el curso de una infección con el parásito.

Los tratamientos realizados a cada grupo de animales fueron descripta en Materiales y Métodos del presente capítulo.

Los resultados obtenidos indican que la administración de kefir en las condiciones ensayadas logró disminuir significativamente la intensidad de infección con *Giardia* a los 7 días post-infección ( $P < 0.05$ ), respecto del grupo de animales que no recibió el probiótico. El tiempo al cual se logró esta disminución coincide con el momento en el cual se produce el pico de infección según lo descripto para este modelo en estudio (Figura 5).

Por otro lado, si bien algunos de los ratones que consumieron kefir no mostraron indicios de infección, la diferencia en la tasa de infección (número de animales infectados/total de animales del lote) no resultó estadísticamente significativa respecto del grupo infectado control.

A tiempos cortos post-infección, cuando el parásito aún no comenzó el proceso de expansión, no se observaron diferencias en la tasa o intensidad entre los grupos ensayados (datos no mostrados).



**Figura 5:** Recuento de trofozoítos viables en intestino. G: Grupo infectado con *Giardia intestinalis*. GK: Grupo tratado con kefir e infectado *Giardia intestinalis*.  $P < 0,05$ . Ensayo realizado por duplicado.

Cabe señalar que durante la necropsia no se observaron diferencias macroscópicas en el aspecto de los órganos de la cavidad abdominal entre los animales de los grupos infectados (G y GK) y de los grupos control (C y K), en coincidencia con lo descrito previamente por Humen (2009).

Estudios *in vivo* realizados por otros investigadores con *Enterococcus faecium* SF68, demuestran que la administración de un probiótico es capaz

disminuir la infección por *Giardia* en ratones C57BL/6 (Benyacoub *et al.* 2005). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en nuestro estudio, donde el kefir suministrado tuvo un efecto protector frente a la infección, disminuyendo el número de trofozoítos activos en el intestino, marcador inequívoco de la infección en curso. En el mismo sentido, estudios previos con *Lactobacillus johnsonii* La1 en ratones, muestran que la administración del probiótico logra reducir significativamente el número de trofozoítos viables en intestino (Humen *et al.* 2005). Además, en un estudio realizado por Shulka y colaboradores (2008) con cepas aisladas de leche de búfala, se muestra cómo en ensayos *in vivo* se reduce el número de quistes de *Giardia* eliminados en materia fecal, atribuyéndole el efecto a los factores extracelulares y a las interacciones con el epitelio. También se describió que la administración de *Lactobacillus casei* logró disminuir la intensidad de infección por *Giardia* y resolver la misma en 14 días, correlacionando en este sentido con nuestros resultados (Shulka *et al.* 2008).

Asimismo, los resultados obtenidos en nuestro sistema de trabajo son concordantes con investigaciones realizadas anteriormente que mostraron cómo microorganismos aislados de kefir. En el caso particular de *Giardia intestinalis*, se realizaron ensayos con cepas aisladas del kefir (*S. lipolytica* CIDCA 8112, *L. plantarum* CIDCA 83114 y *L. kefir* CIDCA 8348) mostrando la capacidad de disminuir la tasa de infección por el parásito en un modelo *in vivo*

(Humen 2009). El presente trabajo también muestra este efecto protector, pero en nuestro caso utilizando el fermento completo de kefir, demostrando su potencial utilización como alimento funcional, sustentado en su capacidad disminuir la intensidad de infección en un modelo *in vivo*.

A diferencia de lo observado en nuestro trabajo y por los autores antes mencionados, investigadores de nuestro laboratorio han estudiado el efecto antagónico de otras cepas probióticas, como es el caso distintas cepas de *L. acidophilus* frente al patógeno *Giardia intestinalis* no encontrando en este caso efecto protector alguno (Humen 2009). Esto sugiere que el efecto antagónico no puede ser atribuido a todos los microorganismos probióticos como una propiedad general, sino que es un efecto dependiente de la cepa o el producto administrado.

Todos estos datos en conjunto ponen de manifiesto la influencia que tienen algunos microorganismos probióticos sobre la infección por *Giardia*. Si bien los mecanismos exactos que llevan a este efecto no son conocidos, se podrían atribuir a una mejora en el equilibrio de la microbiota beneficiosa generada por el consumo de probióticos, o bien a que la colonización eficaz por parte de los lactobacilos en el intestino mejore la interacción con los enterocitos y tenga una influencia directamente sobre el establecimiento de la infección por *Giardia* (Koji 2005).

Por otro lado, el desarrollo de mecanismos de tipo inmunológico o de interacción microorganismo–epitelio, podrían contribuir a la disminución en la intensidad de infección observada en los ratones que recibieron kefir. Estos resultados, sumados a estudios previos realizados por otros investigadores (Vinderola *et al.* 2005, 2006), nos sugieren que es posible que la actividad inmunomodulatoria del kefir, tanto a nivel de la mucosa intestinal como a nivel sistémico, esté involucrada en el efecto protector frente a *Giardia intestinalis*, y abre la puerta para la realización de estudios en profundidad en este sentido para tratar de dilucidar algunos de estos posibles mecanismos.

## **Conclusiones:**

El kefir es un alimento probiótico que contiene una gran variedad de microorganismos y metabolitos microbianos, muchos de los cuales han sido estudiados parcialmente para evaluar cómo interactúan con el epitelio y frente a patógenos específicos.

De acuerdo a nuestros resultados, la administración de kefir de manera regular previo a una infección con el parásito *Giardia intestinalis*, fue capaz de modificar el curso de la misma, promoviendo un efecto protector a través de la disminución de trofozoítos activos en el intestino del hospedador. De los ensayos *in vitro* sobre la adhesión a células epiteliales intestinales en cultivo, podemos inferir que el efecto antagónico observado *in vivo* podría no estar mediado por la modificación en la capacidad de adhesión del parásito al epitelio por parte de la fracción no microbiana del kefir (sobrenadante), y que habría otros mecanismos involucrados.

Estos resultados plantean la necesidad de profundizar el estudio de los mecanismos a través de los cuales el kefir ejerce su acción preventiva frente a este parásito.



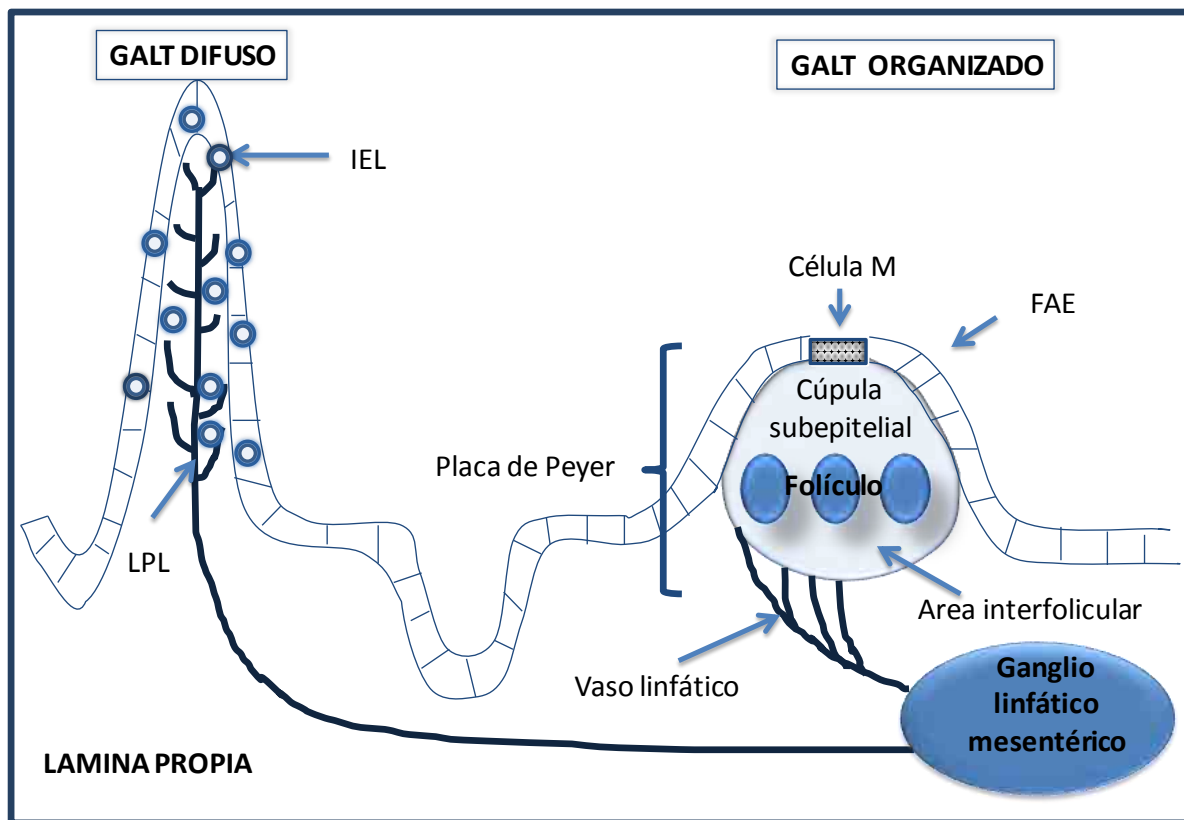
## INTRODUCCIÓN:

El empleo de microorganismos para mejorar la microbiota intestinal comensal se ha llevado a cabo desde tiempos ancestrales. Pero fue hasta principios del siglo XX que se empezó a sugerir que el consumo de productos fermentados por microorganismos, ejercía efectos beneficiosos a la salud de las personas, indicando la existencia de una posible interrelación entre la microbiota y el huésped.

La relación entre las bacterias intestinales y el hospedador es considerada como un “cross-talk”, lo cual implica una coexistencia en la cual se obtienen beneficios mutuos. El desarrollo normal del tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (GALT) es funcionalmente dependiente de la microbiota que se desarrolla en el lumen. Sin embargo, aún no se conoce con certeza cuales son los antígenos bacterianos que median el estado de “inflamación fisiológica” que caracteriza la asociación entre el hospedador y la microbiota residente.

El GALT representa la mayor masa de tejido linfoide del organismo y por tanto constituye un elemento de gran importancia. Está compuesto por tejidos linfoides organizados como los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN), placas de Peyer (PP) y folículos linfoides aislados, así como linfocitos intraepiteliales (IEL *intraepithelial lymphocytes*) y células dendríticas en la lámina propia (Bourrel 2003).

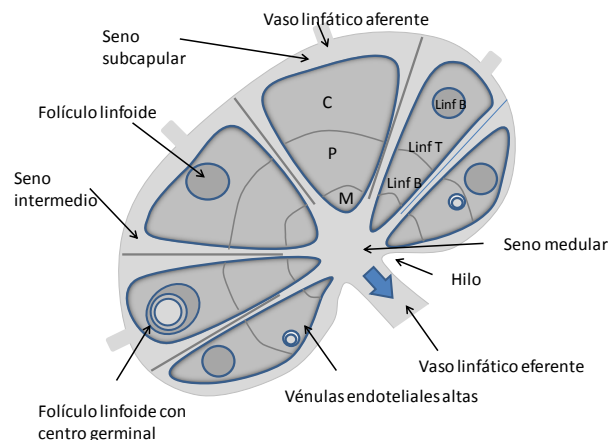
Las placas de Peyer están formadas por agregados linfoides macroscópicos situados por debajo del epitelio intestinal. Este tejido linfoide está separado del lumen intestinal por una monocapa de células (*follicle-associated epithelium*, FAE) formada por células epiteliales columnares, células M, IEL y algunas células secretoras de mucus (*goblet cells*). Las células M son enterocitos especializados en la captación de antígenos luminales, carecen de recubrimiento de glicocálix y en su superficie luminal presentan pliegues en lugar de las microvellosidades características del resto de los enterocitos. Por debajo del FAE hay una región difusa denominada cúpula subepitelial (*subepithelial dome*), compuesta por células dendríticas y algunos macrófagos. Las áreas interfoliculares están formadas por linfocitos T, mayoritariamente de tipo colaborador o *helper* (Th), células dendríticas maduras y macrófagos. Inmersos en la placa de Peyer (Figura 6) se encuentran multitud de folículos integrados por linfocitos B IgM<sup>+</sup>, precursores de células plasmáticas productoras de IgA y en los centros germinales de estos folículos se generan linfocitos B IgA<sup>+</sup> de memoria. A diferencia del resto de los órganos linfoides, las placas de Peyer sólo presentan vasos linfáticos eferentes (Newberry y Lonrenz 2005).



**Figura 6:** Representación de los elementos que conforman el tejido linfático asociado a la mucosa (GALT) inductor de la respuesta inmunitaria (PP y MLN), y GALT difuso o efector (linfocitos intraepiteliales o IEL y linfocitos de lámina propia o LPL). Adaptado de Mowat (2003).

Los ganglios linfáticos mesentéricos se localizan en el mesenterio del intestino y se dividen, estructuralmente, en tres regiones con distinta composición celular: corteza, paracorteza y médula (Figura 7). La corteza contiene folículos primarios y secundarios ricos en linfocitos B y células dendríticas. La paracorteza se caracteriza por una elevada proporción de linfocitos T y células dendríticas. La médula, región más interna del ganglio, está integrada por linfocitos T y B y células plasmáticas (Crivellato *et al.* 2004). Mientras que los linfocitos efectores abandonan los ganglios linfáticos y migran

hacia los tejidos no linfoides, algunos linfocitos Th permanecen en el ganglio linfático como células memoria o migran hacia los centros germinales de los folículos para promover el proceso final de diferenciación de los linfocitos B.



**Figura 7:** Esquema de la estructura general de un ganglio linfático. C: corteza; P: paracorteza; y M: médula. Adaptado de Crivellato (2004).

El sistema gastrointestinal ha desarrollado diferentes mecanismos de regulación para optimizar la protección contra agentes patógenos, mientras que al mismo tiempo evita la actividad inmunitaria contra antígenos inocuos (Kanamori *et al.* 1998), a través de la secreción de diferentes quimoquinas y citoquinas. Estas sustancias son producidas tanto por las células inmunes (LT, LB, DC, Macrófagos) como también por las células epiteliales (Crivellato *et al.* 2005).

Resultados reportados por diferentes investigadores demuestran que los microorganismos ingeridos no se establecen como miembros de la microbiota intestinal normal, sino que persisten en el tracto gastrointestinal durante el período de ingesta o por tiempos relativamente cortos una vez finalizado el

tratamiento (Pavan *et al.* 2003). De esta manera, la interacción “transiente” de microorganismos probióticos con las células del epitelio podría ser suficiente para disparar cascadas de señales que resulten en la activación de células inmunes, o bien podrían inducir la secreción de factores solubles capaces de ejercer estos efectos (Menard *et al.* 2004). Por ejemplo, se probó que distintos probióticos pueden desencadenar la liberación de citoquinas pro- o anti-inflamatorias en células epiteliales o macrófagos (Delcenserie 2008).

En los últimos años, los trabajos de Vinderola y colaboradores han sido relevantes en el avance del conocimiento sobre modulación de la respuesta inmune por administración de kefir. En este sentido, se ha reportado que tanto la administración de kefir entero (aún pasteurizado) como la de los productos de la fermentación de leche con microflora de kefir a ratones BALB/c produce un aumento de células IgA<sup>+</sup>, IL-4<sup>+</sup>, IL-6<sup>+</sup> e IL-10<sup>+</sup> en mucosa intestinal y un aumento de la capacidad fagocítica de macrófagos peritoneales (Vinderola *et al.* 2005a, 2006a). Algunos de estos efectos fueron también observados en sitios más distantes, como la mucosa bronquial, y los valores retornaron a su nivel de control hasta 7 días luego de finalizada la administración (Vinderola *et al.* 2005c). Estos autores también han observado efectos de los microorganismos del kefir sobre la producción de citoquinas por parte de macrófagos peritoneales y células adherentes de las PP (Vinderola *et al.* 2006b).

En la giardiasis, como se presentó en el capítulo anterior, la unión al epitelio es un paso importante en el proceso de infección. Sin embargo, está demostrado que *Giardia* no invade el tejido. En muchos casos la infección es autolimitante, ya que los individuos inmunocompetentes afectados pueden controlar y erradicar la infección mediante la activación de las células T CD4<sup>+</sup>, los macrófagos, neutrófilos y producción de la inmunoglobulina A secretora (IgA) (Faubert 2000, Singer y Nash 2000). Nuestros resultados muestran que si bien los sobrenadantes de kefir no alteraron la capacidad de adhesión del parásito, la administración de kefir a animales infectados disminuyó significativamente la intensidad de infección (Capítulo 1). Este efecto podría entonces estar asociado a la modulación de respuesta inmune del hospedador frente al parásito. En este sentido, Benyacoub y colaboradores han reportado que la administración oral de *Enterococcus faecium* SF68 a ratones mejoró la respuesta inmune frente *Giardia*, mostrando una mayor producción de IgA secretoria específica, y un aumento en la cantidad de células T CD4<sup>+</sup> en PP y en bazo (2005). Por otro lado, estudios realizados en meriones mostraron un aumento en las células T y B, y una disminución en la liberación de antígenos específicos del parásito en heces fecales, incluso después de 14 días de tratamiento con *L. johnsonii* (Humen *et al.* 2005). Asimismo, la administración de una mezcla de cepas aisladas de kefir, contribuyó a la resolución de la infección, mostrando un aumento en la producción de anticuerpos específicos

anti-*Giardia* (IgA intestinal e IgG sérica) y un aumento en la población de mastocitos en bazo (Humen 2009).

En el presente capítulo se estudiarán los efectos de la administración de kefir sobre diferentes aspectos de la respuesta inmune innata y adaptativa en el modelo murino de infección por *Giardia intestinalis*.

## **Objetivos Capítulo 2**

- ✓ Evaluar la capacidad inmunomoduladora del kefir a través de la determinación de la distribución de diferentes poblaciones celulares de importancia en la respuesta contra el parásito, y a través del estudio de la producción de citoquinas y quimoquinas relevantes en la respuesta del hospedador.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **EXTRACCIÓN DE CÉLULAS DE BAZO, PLACAS DE PEYER Y GANGLIOS LINFÁTICOS MESENTÉRICOS.**

Después de la necropsia, los órganos (bazo, MLN y PP) se retiraron en forma aséptica y se conservaron en PBS estéril sobre hielo hasta el momento de procesarlos. Cada órgano se disgregó con el émbolo de una jeringa sobre una malla metálica estéril y se lavó con 5 ml de PBS estéril. Las suspensiones obtenidas se centrifugaron durante 5 minutos a 400 x g. En el caso del bazo, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1ml de agua destilada estéril para lisar los glóbulos rojos, e inmediatamente se agregaron 9 ml de medio RPMI. Se centrifugó durante 5 min a 400 x g. El número de células viables en cada muestra fue determinado en hemocitómetro utilizando el colorante vital Azul Tripán.

### **MARCACIÓN CON ANTICUERPOS ESPECÍFICOS**

Las células fueron marcadas con los siguientes anticuerpos: anti-CD4 de ratón conjugado con FITC (isotiocianato de fluoresceína), anti-CD8 de ratón conjugado con FITC, anti-MHC-II (I-A) de ratón conjugado a PE (ficoeritrina), anti-B220 de ratón conjugado a FITC y anti-Rc IgE de ratón conjugado con biotina (e-Bioscience Inc.). Las células fueron lavadas con buffer FACS (PBS, 1%

de seroalbúmina bovina) e incubadas durante 30 minutos con el anticuerpo correspondiente a 4°C y en oscuridad. Se procesaron los correspondientes controles de isotipo y un control de células sin marcar para cada tipo de muestra. Posteriormente se realizaron dos lavados con buffer FACS y finalmente se realizó una fijación con paraformaldehído al 1% en PBS. Las células de bazo marcadas con anti-Rc-IgE fueron tratadas con streptavidina conjugada con FITC (e-Bioscience Inc.) por 30 minutos, lavadas dos veces con buffer FACS y fijadas en paraformaldehído 1% en PBS.

### **ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO**

Las células fueron analizadas por citometría de flujo utilizando un equipo FACScalibur Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ). El recuento diferencial de células se realizó sobre la población de linfocitos, seleccionada en base a las características de tamaño (forward) y complejidad interna (side scatter). Las células sin marcar se usaron para establecer la potencia del láser y la compensación se realizó sobre células con simple marcado. Se adquirieron 10000 eventos y los datos se expresaron como porcentaje de células positivas para la marcación correspondiente.

## ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Para el análisis histológico, se removió 1cm de intestino delgado, localizado a 11cm del píloro, se cortó longitudinalmente y se fijó en 2 ml de etanol al 96°. En el momento de procesar la muestra se realizó una deshidratación e inclusión en parafina del tejido con los siguientes pasos:

**Tabla 5**

| <b>Coloración Hematoxilina - Eosina</b>  |                        |                |
|--|------------------------|----------------|
| <b>Deshidratación</b>  |                        |                |
| <b>Solvente</b>  | <b>Numero de baños</b> | <b>Tiempo</b>  |
| Etanol 70°   | 3                      | 10 min         |
| Etanol 96°   | 3                      | 10 min         |
| Etanol 100°  | 4                      | 10 min         |
| Xileno   | 3                      | 10 min         |
| <b>Inclusión</b>   |                        |                |
| Parafina   | 1                      | 1 hora a 57°C  |
| Parafina   | 1                      | 1 hora a 57°C  |
| Parafina   | 1                      | 2 horas a 57°C |
| Se realizó un último baño de parafina en el molde definitivo y se llevó a refrigeración para fijar la muestra. Se realizaron los cortes con micrótomo (Leica® SM 2000 R), con un espesor de 5µm. |                        |                |
| <b>Desparafinado</b>   |                        |                |
| Xileno   | 3                      | 5min           |
| Etanol absoluto  | 2                      | 2min           |
| Etanol 96  | 2                      | 2min           |

|  |   |             |
|--|---|-------------|
| Etanol 80  | 1 | 2min        |
| Agua destilada   | 1 | 1min        |
| <b>Coloración</b>  |   |             |
| Hematoxilina   | 1 | 5min        |
| <b>Se lavó con agua corriente y luego con agua destilada</b> |   |             |
| Eosina   | 1 | 1min        |
| Etanol 70  | 1 | Rápidamente |
| Etano 96   | 2 | 2min        |
| Etanol absoluto  | 2 | 2min        |
| xilol  | 2 | 2min        |
| <b>Montaje en bálsamo de Canadá.</b>                         |   |             |

## MARCACIÓN DE CÉLULAS IgA<sup>+</sup>

**Tabla 6**

| Desparafinación   |                    |                    |
|---|--------------------|--------------------|
| Solvente  | Numero de<br>baños | Tiempo             |
| Xilol   | 3                  | 15 min             |
| Etanol absoluto   | 2                  | 10min              |
| Etanol 96   | 2                  | 5min En heladera   |
| PBS   | 3                  | 5min En heladera   |
| <b>Marcación con anticuerpo</b>                               |                    |                    |
| Anticuerpo Anti IgA-Biotinilado<br>1:500 (eBiosciences®, USA) | 1                  | 30min a 37° C      |
| PBS   | 3                  | 5min               |
| STV- FICT (Sigma®, USA) 1:250                                 | 1                  | 20min en oscuridad |

|   |   |                   |
|---|---|-------------------|
| PBS   | 3 | 5min en oscuridad |
| Las muestras se montaron en PBS/Glicerol al 50%, y se conservaron en oscuridad a 4°C. Se observaron en microscopio de fluorescencia acoplado a una cámara DC100 (Leica Microscopy Systems Ltd., Heerbrugg, Switzerland) en el objetivo de 40X. Se realizó el recuento de células IgA <sup>+</sup> en 10 campos por muestra. |   |                   |

### PCR CUANTITATIVA CON TRANSCRIPCIÓN REVERSA (qRT-PCR)

Las muestras de intestino delgado fueron disgregadas y sometidas al protocolo de extracción de RNA del kit de LG® (Illustra RNAspin mini RNA isolation Kit), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midió la concentración de RNA a 260nm.

A partir de 100ng de RNA se realizó la transcripción reversa utilizando MMLV-RT (Promega), y el cDNA resultante se amplificó utilizando Super Mix IQ Sybr Green PCR (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.) y los primers que se detallan en la Tabla 7. La reacción de amplificación se llevó cabo en un equipo iCycler (Bio-Rad), de acuerdo al siguiente protocolo: 2 minutos a 50°C y durante 10 min a 95°C, seguido por 40 amplificaciones con ciclos con 1 minuto de reasociación/extensión a 60° °C y 15 segundos de desnaturalización a 95 ° C. La expresión de  $\beta$ -actina se utilizó como normalizador. La especificidad de la PCR fue verificada por las curvas de fusión.

Los primers utilizados se muestran en la siguiente tabla:

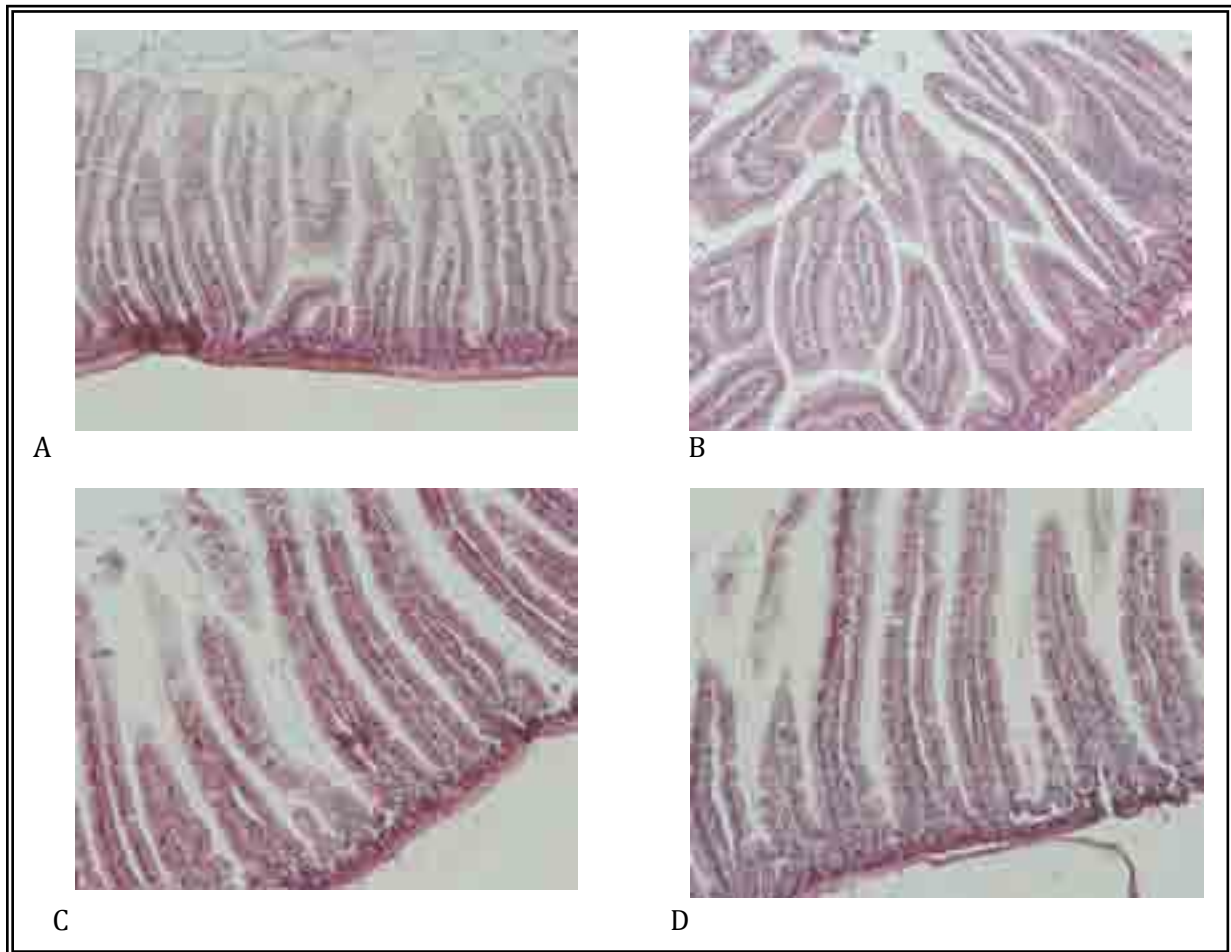
**Tabla 7.**

| <b>Nombre</b>    | <b>Forward primer</b>    | <b>Reverse primer</b>      |
|------------------|--------------------------|----------------------------|
| <b>CCL20</b>     | TTTTGGGATGGAATTGGACAC    | TGCAGGTGAAGCCTTCAACC       |
| <b>CXCL10</b>    | GGAGTGAAGCCACGCACAC      | TGATGGAGAGAGGCTCTCTGC      |
| <b>IFN gamma</b> | TGGCATAGATGTGGAAGAAAAGAG | TGCAGGATTTTCATGTCACCAT     |
| <b>IL- 12p40</b> | ATCACACGGGACCAAACCA      | CAGGCAACTCTCGTTCTTGTG TAGT |
| <b>TNF alfa</b>  | CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA | CCTCCACTTGGTGGTTTGCT       |

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

En vista de que muchos procesos infecciosos producen un deterioro del tejido modificando la arquitectura celular y promoviendo procesos inflamatorios con infiltración de células inmunes, se realizó una coloración con HE para evaluar cómo la infección con el parásito y la administración del kefir podrían afectar el tejido intestinal. En la Figura 8 se muestran cortes histológicos representativos de los distintos grupos de animales. No se observaron cambios histopatológicos (infiltrado inflamatorio, daño en el epitelio) en el tejido intestinal de los animales infectados con *Giardia* (grupos G y GK) ni de aquellos que recibieron solo kefir (grupo K). En el caso de los animales que solo recibieron kefir, los resultados pueden compararse con estudios desarrollados previamente por nuestro grupo, donde la administración de kefir durante tiempos prolongados (7 y 20 días) no produjo daños a nivel histológico (Bolla *et al.* 2011). En cuanto a los animales infectados, observaciones similares fueron reportadas por investigadores de nuestro laboratorio (Humen 2009).



**Figura 8:** Coloración de intestino con hematoxilina/eosina (40X), a los diferentes grupos tratados: A: control; B: *Giardia*; C: Kefir; D: *Giardia* + Kefir. En la figura se observan que no hay cambios en la estructura epitelial y que no hay signos de inflamación.

## ESTUDIO DEL BALANCE DE LAS POBLACIONES CELULARES POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para realizar un estudio mas amplio del efecto del kefir sobre la infección por *Giardia* y su acción sobre la respuesta del hospedador, se llevó a cabo un



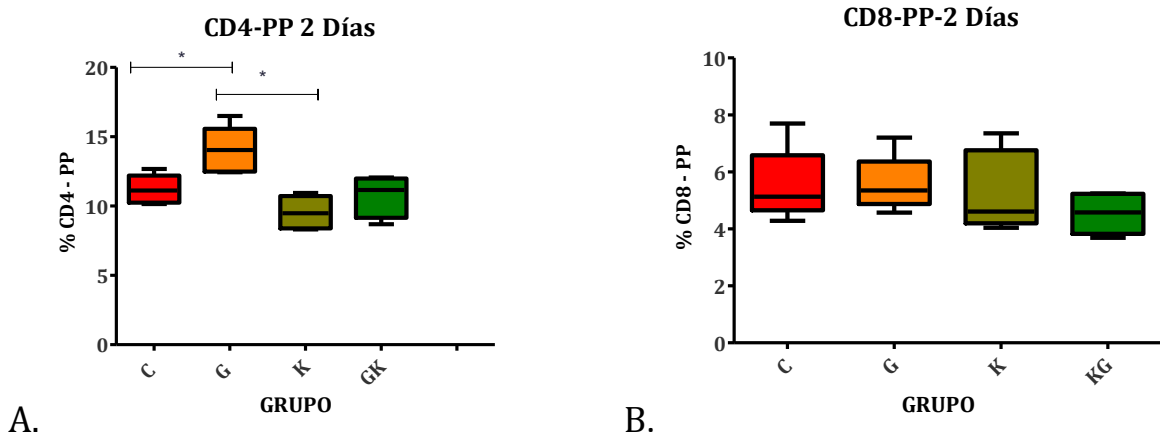
análisis por citometría de flujo de diferentes poblaciones celulares relevantes en la respuesta frente al parásito. Dado que diferentes poblaciones celulares pueden intervenir en los procesos de resolución de las patologías intestinales, se seleccionaron los marcadores más relevantes en la respuesta inmune.

### **POBLACIONES DE CÉLULAS T EN PLACAS DE PEYER Y GANGLIOS LINFÁTICOS MESENTÉRICOS.**

Las células T son importantes marcadores de la respuesta ante la infección y de la modulación de la inmunidad adaptativa. Tal como lo demostraron en sus investigaciones Singer y Nash, la presencia de esta población celular resulta importante en la resolución de la infección por *Giardia* (1999).

En nuestro modelo, la infección por *Giardia* produjo un aumento significativo en el número de células T CD4<sup>+</sup> en PP a los 2 días post-infección respecto de lo observado en los animales control no infectados (grupo C) y en aquellos que solo recibieron kefir (grupo K) ( $P < 0,05$ ). La administración de kefir en ratones infectados (grupo GK) normalizó el recuento de células T CD4<sup>+</sup> en PP, tal como se muestra en la Figura 9A. En el caso de las células T CD8<sup>+</sup>, no se encontraron cambios significativos en PP entre los diferentes grupos de animales a los 2 días post-infección (Figura 9B).

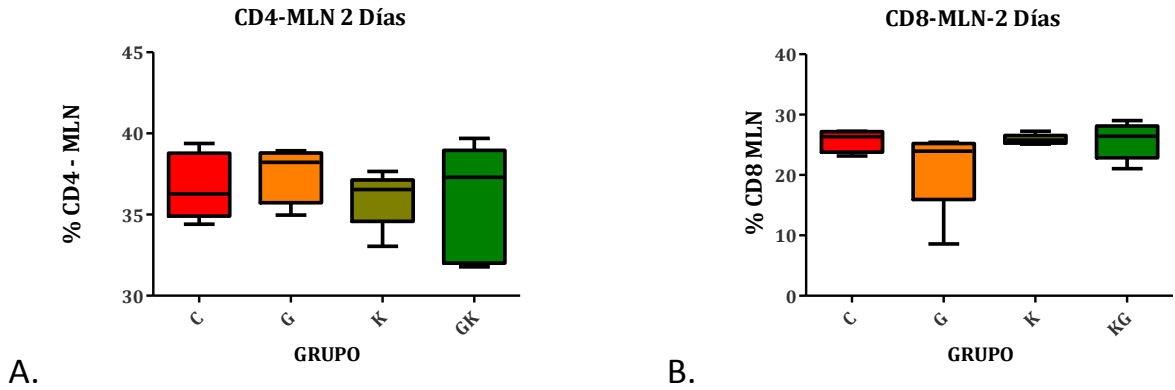
Al calcular la relación  $CD4^+/CD8^+$ , no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos en estudio (datos no mostrados).



**Figura 9:** Células  $CD4^+$  (A) y  $CD8^+$  (B) en placas de Peyer a 2 días post-infección con *Giardia* y luego de 9 días de administración de kefir. Los animales fueron sacrificados y las células de Placa de Peyer fueron procesadas y marcadas para su análisis por citometría de flujo como se indicó en Materiales y Métodos. \* $P < 0,05$ . Datos representativos de uno de al menos dos ensayos independientes.

Dado que las células presentadoras de antígenos que son activadas en PP migran hacia los MLN a través de los vasos linfáticos (Puig *et al.* 2008) y pueden activar allí a los linfocitos T, y que también los linfocitos T que se activen en PP migran hacia los MLN para completar su activación, se evaluaron las poblaciones T en MLN. En nuestro caso, al analizar los porcentajes de células T  $CD4^+$  y T  $CD8^+$  en MLN, no se observaron diferencias entre los diferentes

grupos en estudio a los 2 días post-infección (Figura 10 A y B), ni a los 7 días post-infección (no mostrado).



**Figura 10:** Células CD4<sup>+</sup> (A) y CD8<sup>+</sup> (B) en MLN a 2 días post-infección con *Giardia* y luego de 9 días de administración de kefir. Los animales fueron sacrificados y las células de los MLN fueron procesadas y marcadas para su análisis por citometría de flujo como se indicó en Materiales y Métodos. Datos representativos de uno de al menos dos ensayos independientes.

En base a los datos obtenidos en nuestro estudio, el grupo infectado (G) presentó una mayor proporción de células T CD4<sup>+</sup> en PP a los 2 días post-infección, mostrando cómo el modelo responde localmente a la infección. Estos resultados serían compatibles con estudios realizados sobre otros modelos murinos, que muestran que la población de células T es necesaria para resolver la infección y controlar el parásito, particularmente a través de las células T CD4<sup>+</sup> (Singer y Nash 2000a). El aumento podría atribuirse a un incremento en la proliferación de LT en la mucosa, sin llegar a provocar infiltrados celulares

fuera de las placas de Peyer, el cual ya no se observa luego de transcurridos 7 días desde la infección.

Por otro lado, la administración de kefir en los ratones infectados normalizó el porcentaje de LT CD4<sup>+</sup> en PP. Estos resultados concuerdan con los publicados previamente por otros autores donde se postula que, si bien el tratamiento con distintos microorganismos probióticos puede incrementar otras poblaciones celulares como la de células B con producción de algunas inmunoglobulinas, esto no siempre se correlaciona con un aumento en el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Vitiñi *et al.* 2000, Maldonado Galdeano *et al.* 2006, Humen 2009). Asimismo, y en línea con los resultados presentados en el capítulo 1, es evidente que el sistema no necesita montar una respuesta celular tan importante en el caso del grupo de animales infectados y tratados con kefir, donde el número de trofozoítos activos en intestino es significativamente menor.

Sin embargo, existen evidencias de que la administración de probióticos aumenta la población de células T CD4<sup>+</sup>, como ocurre en el caso del suministro de *L. helveticus* R389 (Vinderola *et al.* 2007). Asimismo, otros estudios han mostrado un efecto estimulador sobre las células T CD4<sup>+</sup> tanto en PP como en bazo por administración de microorganismos probióticos, tal como describieron Benyacoub y colaboradores para la administración de *E. faecium* SF68 en un modelo murino de infección por *Giardia* (2005). Esto

indica, como se ha demostrado en otros estudios, que la respuesta inmune que se desarrolla como resultado de la administración de un probiótico es dependiente de la cepa utilizada.

Por otro lado, la infección por *Giardia*, como se mencionaba anteriormente, puede inducir una respuesta local y/o sistémica. En nuestro modelo de estudio, no observamos modulación de la activación de los linfocitos T en los MLN, lo cual sugeriría que la infección se resuelve con la activación de los IEL y la activación de las células en las PP, entre otros efectores. Asimismo esta observación nos induce a pensar que no hubo traslocación de microorganismos (ni de la microbiota comensal ni del kefir administrado) a los MLN, limitando la acción de los microorganismos del kefir al intestino.

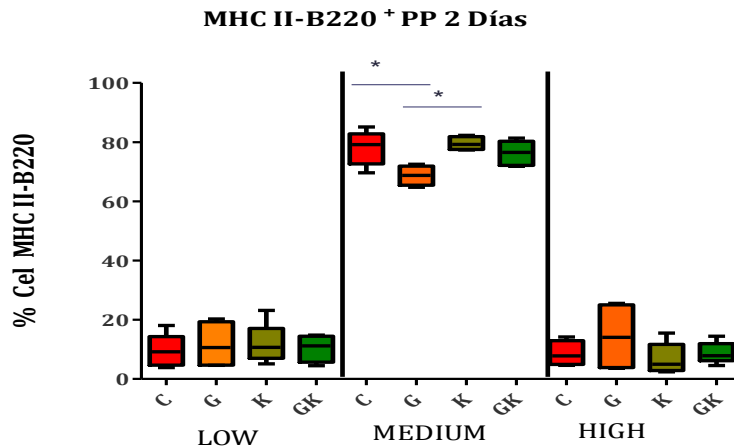
### **EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS MHC CLASE II EN CÉLULAS DE PLACAS DE PEYER Y GANGLIOS LINFÁTICOS MESENTÉRICOS.**

La inmunidad adaptativa o específica involucra la activación de linfocitos T con receptores para epitopes específicos presentados en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). La activación de los linfocitos T requiere no sólo del complejo MHC, sino también de moléculas coestimuladoras en la superficie de las células presentadoras de antígenos. Estas células incluyen macrófagos, células dendríticas y linfocitos B. Como resultado, distintas subpoblaciones de linfocitos T helper pueden ser activadas. En base a

observaciones previas elaboradas por nuestro grupo de trabajo, se estudió la expresión de moléculas del MHC-II en linfocitos B (células B220<sup>+</sup>), como indicador de activación celular.

De acuerdo a la intensidad de fluorescencia correspondiente a MHC-II, las células B220<sup>+</sup> se subdividieron en células con baja, media y alta expresión de MHC-II, (MHC-II Low, Medium y High respectivamente, Figura 11).

El porcentaje de células B220<sup>+</sup> MHC-II Medium disminuyó en el grupo de animales infectados (grupo G) respecto de los otros grupos ( $P < 0,05$ ) a los 2 días post-infección (Figura 11). En el grupo tratado con Kefir (K) y en el tratado con kefir e infectado con *Giardia* (GK) hubo una normalización de esta población. No se observaron diferencias significativas en las poblaciones B220<sup>+</sup> MHC-II Low y B220<sup>+</sup> MHC-II High de los cuatro grupos en estudio a los 2 días post-infección (Figura 11) ni luego de transcurridos 7 días de infección (datos no mostrados).



**Figura 11:** Cuantificación de células B220<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> en placas de Peyer. Los porcentajes de células MHC-II Low, Medium y High fueron calculados dentro de la población de células B220<sup>+</sup>.

\* $P < 0,05$ . Datos representativos de uno de al menos dos ensayos independientes.

Al analizar el número de células diferentes de linfocitos B con capacidad de presentación de antígenos por MHC-II (células B220<sup>-</sup> y MHC-II<sup>+</sup>), no se observaron diferencias entre los distintos grupos de animales (resultados no mostrados).

De acuerdo con estos resultados se puede ver que la infección con *Giardia* provocaría una disminución en la capacidad de presentación antigénica, probablemente como un mecanismo de evasión propio del parásito para lograr permanecer en el hospedador sin ser detectado y eliminado. La administración de kefir logra restablecer la respuesta frente al parásito, llevando la capacidad de presentación antigénica a lo observado en los animales control sin infectar. En nuestro laboratorio, utilizando cepas aisladas de kefir en un modelo murino, se observó un aumento en el número de células B en la población de media y alta expresión de MHC-II en PP (Humen 2009). Asimismo Medrano y colaboradores, demostraron que la administración de kefirán (polisacárido del kefir) a ratones induce un aumento de las células MHC-II<sup>+</sup> en PP (2011). Esta característica brindaría a los animales tratados con el probiótico una mayor capacidad de presentación de antígenos, llevando a estos animales a estar mejor preparados para enfrentarse a la infección con el parásito.

Por otro lado, se analizaron las poblaciones de células B220<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup> y de células no-B con capacidad de presentación de antígenos por MHC-II (células B220<sup>-</sup> MHC-II<sup>+</sup>) en MLN, como indicador de activación celular. En ninguno de los casos se encontraron diferencias significativas entre los grupos estudiados a diferentes tiempos del ensayo (datos no mostrados).

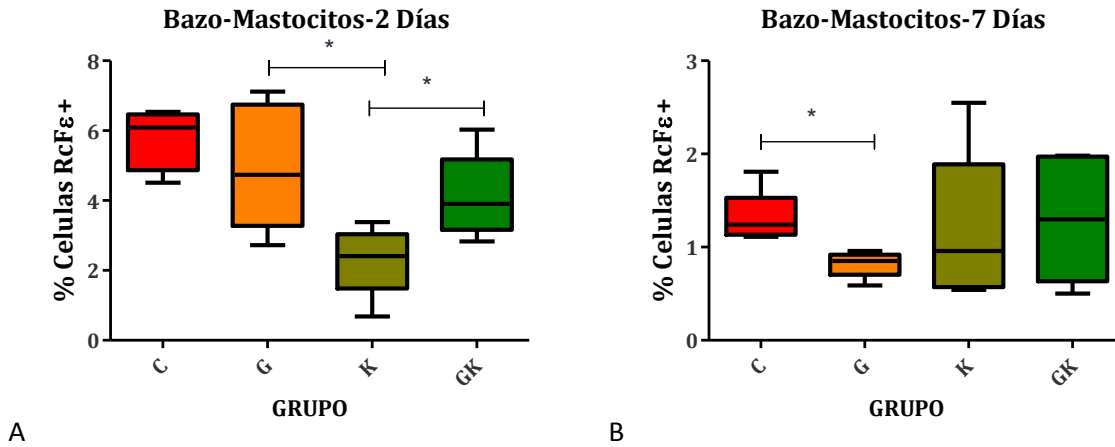
### **CUANTIFICACIÓN DE MASTOCITOS EN BAZO.**

Los mastocitos son células importantes para la inmunidad frente a la infección por helmintos y pueden ser parte del proceso de respuesta ante *Giardia*. En este sentido se ha reportado que, ratones deficientes en esta población celular desarrollan giardiasis crónica. A su vez, estos mastocitos podrían contribuir a la inducción de la producción de IgA específica contra el parásito (Li *et al.* 2004). En estudios previos llevados a cabo en nuestro grupo de trabajo, se demostró que la administración de una mezcla de microorganismos aislados de kefir (dos lactobacilos y una levadura), logró normalizar el porcentaje de mastocitos en bazo inducido por la infección con trofozoitos de *G. intestinalis* a los 7 días post-infección (Humen 2009). Por lo tanto, se decidió cuantificar esta población en el bazo, utilizando como marcador la expresión en superficie del receptor para IgE (células R<sub>c</sub>F<sub>cε</sub>).

Transcurridos 2 días post-infección, se observó una disminución significativa de esta población en aquellos animales que sólo recibieron kefir



(grupo K; 9 días de tratamiento), mientras que en los animales infectados (grupos G y GK) los valores se mantuvieron similares a los del grupo control sin infectar (grupo C) (Figura 12A).



**Figura 12:** Cuantificación de mastocitos (RcFcε+) a 2 días post-infección con *Giardia* (A) y 7 días post-infección con *Giardia* (B). Las células de bazo se extrajeron como se indicó en Materiales y Métodos. \*P<0,05 (prueba de Student). Corresponden a datos obtenidos en 2 experimentos independientes.

Asimismo, a los 7 días post-infección, correspondiente al pico de infección del parásito en el modelo, hubo una disminución de los mastocitos en el grupo infectado (G) con relación al grupo control (C) mientras que los grupos tratado (G) y (GK), no se diferenciaron del control.

Los mastocitos constituyen una de las poblaciones celulares implicadas en la inflamación de los tejidos, y acompañados de otras células, desencadenan la activación de mediadores inflamatorios. Esto inicia un proceso que culmina en la inflamación clínica, lo que puede generar un daño en el tejido (Hakansson y

Molin 2011). Como se ve en nuestro estudio, a los 2 días post-infección el grupo de animales que recibió kefir, presentó una disminución significativa en la población de mastocitos, que podría proteger al huésped de una inflamación más severa y consecuentemente de un daño tisular.

La giardiasis se ha asociado con un aumento de enfermedades alérgicas después de la resolución de la infección, lo que sugiere una alteración en la función inmune de la mucosa (Hardin *et al.* 1997). En este sentido, en nuestro estudio, la administración de kefir logró normalizar la población de mastocitos en el bazo al mismo tiempo en el que se presenta el pico de infección, lo cual podría redundar en una protección, tanto en el epitelio como a nivel sistémico. De todas maneras, empleando otros modelos *in vivo*, existen evidencias reportadas por otros investigadores donde se observa un aumento de los mastocitos en animales alimentados con probióticos (Vinderola *et al.* 2007).

## **ESTUDIO DE LA PRODUCCION DE CITOQUINAS Y QUIMOQUINAS RELEVANTES EN LA RESPUESTA DEL HOSPEDADOR FRENTE AL PARÁSITO**

Como se mencionó anteriormente, la infección de las mucosas puede inducir tanto la inmunidad innata como la adaptativa (respuesta humoral y mediada por células), a nivel local como sistémico. En este sentido, algunos de los mecanismos locales más relevantes son la producción de IgA secretoria, y la

producción de citoquinas y quimoquinas, las cuales pueden contribuir a proveer una primera línea de defensa frente al ataque de patógenos.

Para continuar con nuestro estudio, se realizaron ensayos para analizar la producción de ciertas citoquinas y quimoquinas en el tejido intestinal, mediante qRT-PCR. Esto nos permitió evaluar la respuesta inmunitaria frente al consumo de kefir y su interacción con el patógeno en el huésped.

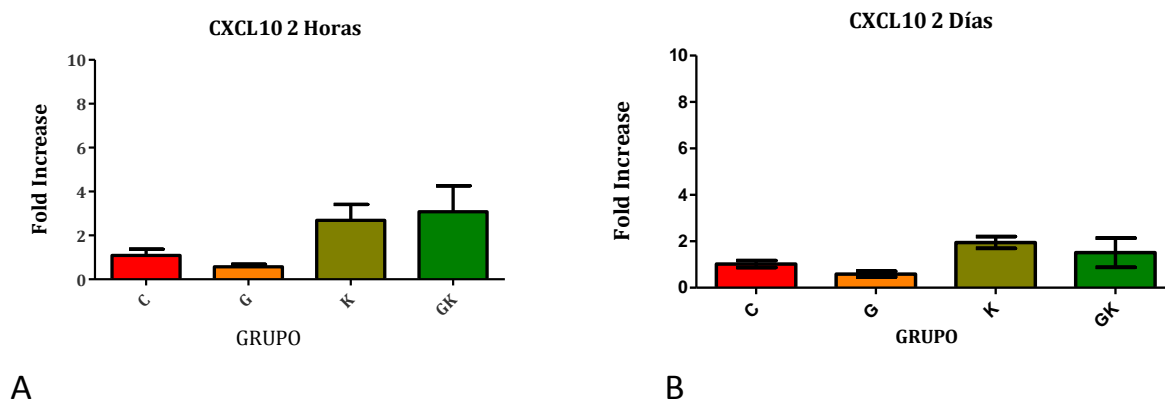
## **QUIMOQUINAS**

Las quimoquinas son moléculas con capacidad quimioattractante de células y participan en diversos procesos asociados al funcionamiento del sistema inmune. Algunas de ellas son marcadores de procesos inflamatorios, incluidos aquellos que pueden ocurrir a nivel del intestino. CCL20 es responsable de la quimioatracción de células dendríticas inmaduras, linfocitos T (efectores y de memoria) y linfocitos B. Es uno de los mediadores pro-inflamatorios más sensibles durante la estimulación del epitelio. Por otro lado, CXCL10 (también conocida como IP-10) es un mediador secretado por diversos tipos de células en respuesta a IFN- $\gamma$ .

En nuestro modelo, se determinó la expresión de CCL20 y CXCL10 a las 2 horas y a los 2 días post-infección.

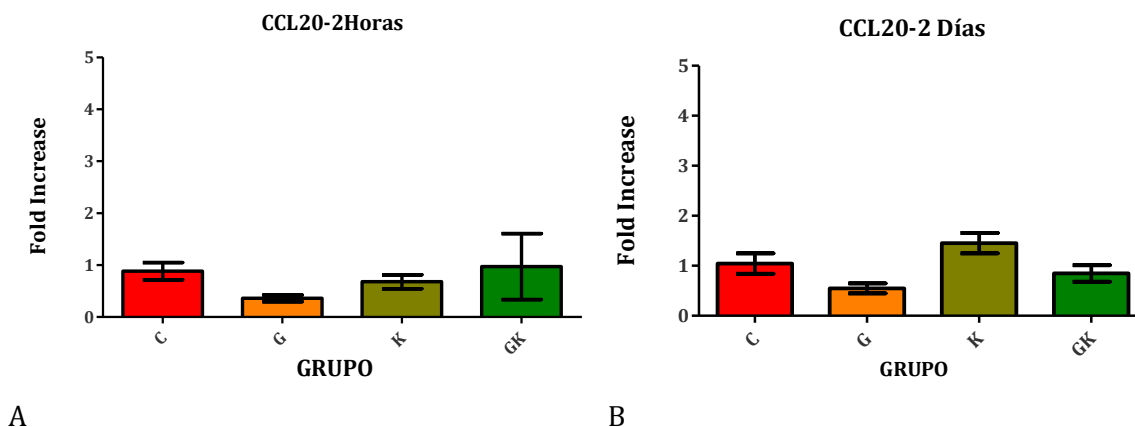
Para el caso de la expresión de CXCL10, no se encontraron diferencias significativas respecto del grupo de animales control sin infectar (grupo C)

(Figura 13A y 13B). Asimismo, la diferencias en el fold increase entre los grupos que recibieron kefir y el infectado con *Giardia* no resulta tan evidente como para asignarle una relevancia biológica, sumado al hecho que en ninguno de estos grupos se registró un proceso inflamatorio, a la vista de los preparados histológicos respectivos.



**Figura 13:** qRT-PCR realizada a 2 horas (A) y 2 días (B) post-infección, a los diferentes grupos en estudio: control sin infectar (C), grupo infectado con *Giardia* (G), grupo tratado con kefir (K), grupo infectado con *Giardia* y tratado con kefir (GK).

En cuanto a la expresión de CCL20, si bien se registró una disminución significativa en el grupo de animales infectados (G) respecto de los grupos control (C) y kefir (K), consideramos que la misma no reviste relevancia biológica (Figura 14A y 14B).

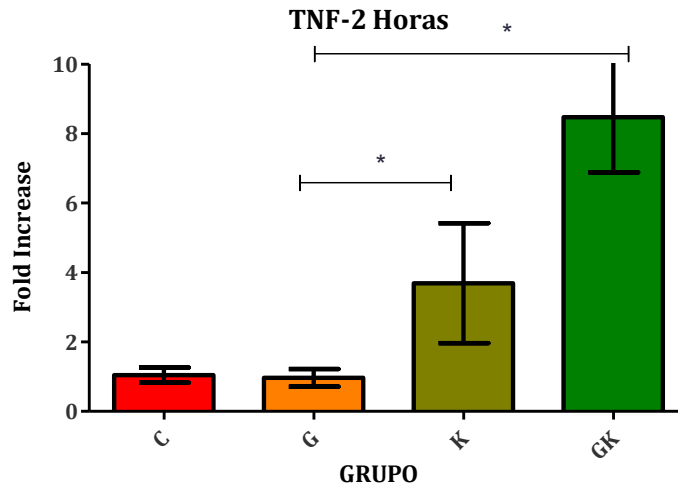


**Figura 14:** qRT-PCR realizada a 2 horas (A) y 2 días post-infección (B), a los diferentes grupos en estudio: control sin infectar (C), grupo infectado con *Giardia* (G), grupo tratado con kefir (K), grupo infectado con *Giardia* y tratado con kefir (GK).

### FACTOR DE NECROSIS TUMORAL $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

El TNF- $\alpha$  es una citoquina pro-inflamatoria, característica de la respuesta inmune innata y que aumenta muy rápidamente en el inicio de la respuesta frente a una infección. Dado que otros investigadores han reportado la capacidad de *Giardia* de modular negativamente la expresión de mediadores pro-inflamatorios tempranos con el fin de evadir la respuesta innata (Matowicka-Karna *et al.* 2009), se determinó la expresión de TNF- $\alpha$  2 horas después de la infección. Si bien no se observaron diferencias entre el grupo control (C) y el grupo de animales infectados (G) luego de 2 horas de haber sido inoculados los trofozoítos, los animales tratados con kefir (infectados o no) mostraron un aumento significativo de la expresión de TNF- $\alpha$  a ese tiempo post-infección, es decir, luego de 7 días de administración del probiótico (Figura

15). Estos resultados sugieren que el aumento de TNF- $\alpha$  podría atribuirse al consumo del kefir, independientemente de la infección con el parásito.



**Figura 15:** qRT-PCR realizada a 2 horas post-infección, a los diferentes grupos en estudio: control sin infectar (C), grupo infectado con *Giardia* (G), grupo tratado con kefir (K), grupo infectado con *Giardia* y tratado con kefir (GK).

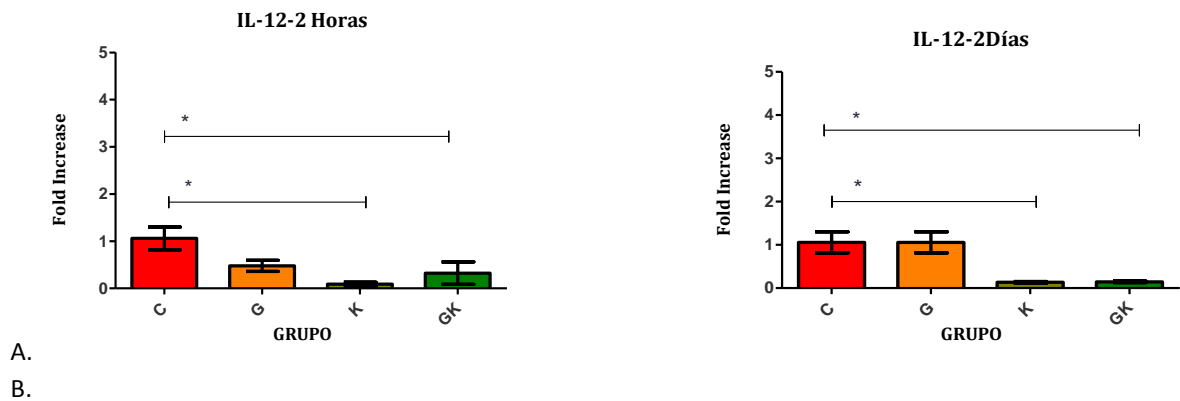
Tal como demostraron Vindelora y colaboradores (2006), el kefir tiene la capacidad de inducir la producción de una citoquina pro-inflamatoria como TNF- $\alpha$  luego de 2 y 5 días de consumo de kefir, sin producir daño al epitelio. En este sentido, estas observaciones correlacionan con nuestros estudios. El TNF- $\alpha$  mejora la expresión de moléculas implicadas en la adherencia de los macrófagos al endotelio, lo que aumenta la posibilidad de que otras células de memoria presentes en el sistema sean guiadas a los sitios de inflamación (Roitt y Delves 2003). En este sentido, una mayor producción de TNF- $\alpha$  podría indicar que el

sistema esta mejor preparado para acceder al sitio de la inflamación durante una infección. En nuestro sistema esto se ve reflejado en el aumento aún más pronunciado en la expresión de TNF- $\alpha$  en los animales tratados con kefir e infectados. Si bien la *Giardia* no es un parásito que desencadene un reacción inflamatoria agresiva en este modelo, es importante destacar que el kefir estaría protegiendo al epitelio de una respuesta más severa.

### INTERLEUQUINA 12 (IL-12)

La interleuquina 12 (IL-12) es una de las citoquinas promotoras de la inmunidad celular. Secretada por los macrófagos y células NK, promueve la diferenciación de los LT CD4<sup>+</sup> a un perfil colaborador de tipo I (Th1).

Se determinó la expresión de IL-12p40 a 2 horas y 2 días post-infección. Se encontraron diferencias significativas en la expresión de este marcador, sobre todo en los grupos que consumieron el probiótico (Figura 16).



**Figura 16:** qRT-PCR realizada a 2 horas (A) y 2 días (B) post-infección, a los diferentes grupos en estudio: control sin infectar (C), grupo infectado con *Giardia* (G), grupo tratado con kefir (K), grupo infectado con *Giardia* y tratado con kefir (GK).

Si bien para el estudio no parece biológicamente relevante, se destaca que parecería haber una modulación negativa en la expresión de IL-12 en los grupos K y GK. Se ha reportado que una inhibición o disminución en la expresión de esta interleuquina protege al huésped de la inmunopatología y la muerte causada por una respuesta inmune celular exacerbada, como la que puede ocurrir durante infecciones microbianas agudas (Sanchez *et al.* 2001). En este mismo sentido, en un estudio donde se suministraron dos microorganismos probióticos (*L. rhamnosus* GR-1 y *L. reuteri* RC-14) durante 30 días a pacientes con síndrome de intestino irritable, se encontró una disminución en la concentraciones de IL-12 en sangre periférica después del consumo (Lorea *et al.* 2007).

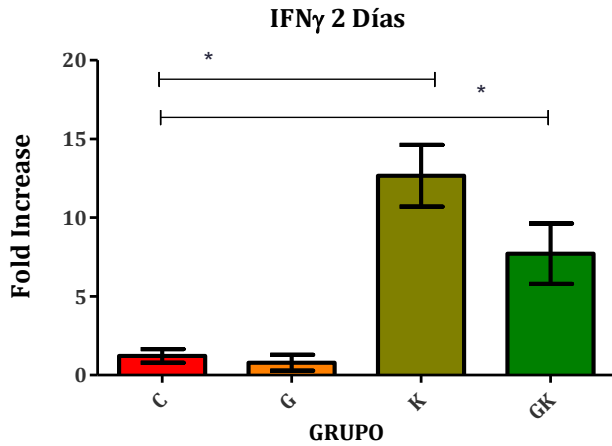
Por otro lado, Vinderola y colaboradores, mostraron en un estudio realizado en ratones donde se les suministró fracciones parciales de las leches fermentadas con kefir, que este tratamiento no indujo la modulación de IL-12 (2006).



## **INTERFERÓN- $\gamma$ (IFN $\gamma$ )**

El interferón- $\gamma$  es una citoquina pro-inflamatoria, producida por los linfocitos T y las células NK. Su función principal está asociada a la diferenciación de los linfocitos Th1, con la consecuente activación de macrófagos y células T citotóxicas, ramas efectoras fundamentales de la llamada respuesta inmune celular.

En nuestro estudio, se determinó la expresión de esta citoquina a los 2 días post-infección (Figura 17), observándose un incremento significativo de la expresión en los grupos K y GK respecto del grupo de animales infectados (G) y del grupo control (C). Estos resultados sugieren que el aumento observado podría atribuirse al consumo de kefir, y no a la infección con *Giardia*. En este sentido, Vinderola y colaboradores han reportado que la administración de kefir a ratones BALB/c induce al aumento del número de células IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en intestino delgado y en células de PP (2005). Por otro lado, se ha detectado una deficiencia en la secreción de esta citoquina en células de MLN de cepas de ratones susceptibles a la infección por *G. muris*, y no en cepas resistentes (Faubert 2000).



**Figura 17:** qRT-PCR realizada a los 2 días post-infección, a los diferentes grupos en estudio: control sin infectar (C), grupo infectado con *Giardia* (G), grupo tratado con kefir (K), grupo infectado con *Giardia* y tratado con kefir (GK). \*  $P < 0.05$

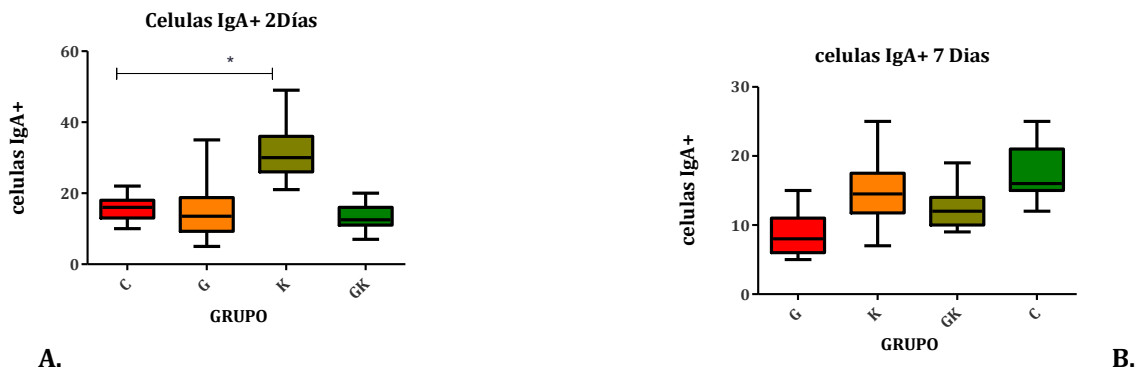
Todas estas observaciones, tomadas en conjunto, sugerirían que el aumento en la expresión de IFN- $\gamma$  debida a la administración del probiótico, podría contribuir al efecto protector en este modelo de infección. Por otro lado, en investigaciones realizadas en humanos se ha visto que el IFN- $\gamma$ , aumentó cuatro veces más en individuos infectados comparados con los individuos sanos. Esto sugiere que esta citoquina podría estar implicada en la resolución de la infección, y el consumo de kefir podría tener un efecto sinérgico para el eliminación del parásito.

Por otro lado, teniendo en cuenta las características pro-inflamatorias del IFN- $\gamma$ , correspondería determinar que sucede con la expresión de mediadores que modulan negativamente a esta citoquina (por ejemplo, IL-10) de manera de evaluar la activación de mecanismos de regulación que contribuyan el

mantenimiento de la homeostasis a nivel de la mucosa intestinal durante el consumo de kefir.

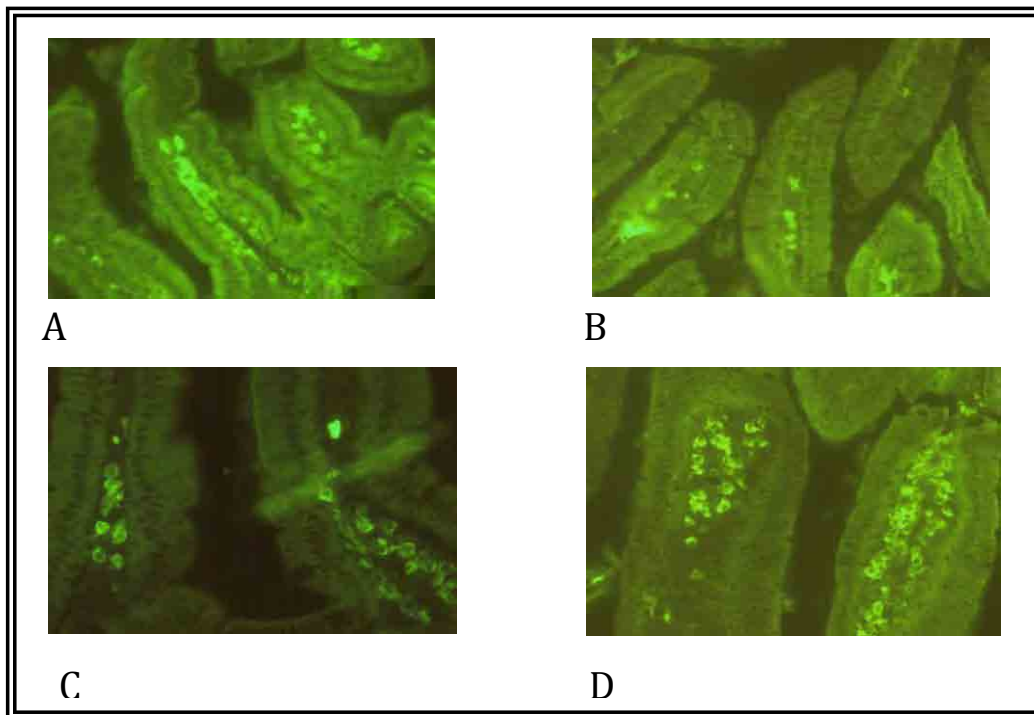
### DETERMINACIÓN DE CÉLULAS IgA<sup>+</sup> EN INTESTINO DELGADO

Dado que se ha demostrado que la IgA es una inmunoglobulina importante en la resolución de patologías intestinales, y especialmente en la giardiasis, se determinó el número de células IgA<sup>+</sup> en lamina propia mediante inmunofluorescencia. En este sentido, el grupo K mostró un aumento significativo del número de células IgA<sup>+</sup> respecto del grupo control (C) a los 2 días post-infección (Figura 18 A), mientras que no se observaron diferencias significativas en el resto de los grupos en estudio. A los 7 días post-infección no se encontraron diferencias entre ninguno de los grupos de animales (Figura 18 )



**Figura 18:** Recuento por inmunofluorescencia, de células IgA<sup>+</sup> en cortes de intestino de los diferentes grupos en estudio: control sin infectar (C), grupo infectado con *Giardia* (G), grupo tratado con kefir (K), grupo infectado con *Giardia* y tratado con kefir (GK). A los 2 días (A) y 7 días (B) post-infección con *Giardia*. \*P< 0,05

La Figura 19 muestra imágenes representativas de los cortes histológicos correspondientes a los diferentes grupos de animales.



**Figura 19:** Inmunihistoquímica de células IgA<sup>+</sup> en vellosidades intestinales. A. Control; B. *Giardia*; C. Kefir; D. *Giardia* + Kefir. Fotografías tomadas con microscopio de fluorescencia (40X), a 2 días post-infección con *Giardia* a cortes histológicos marcados con anticuerpos anti- IgA.

Se ha mencionado que la IgA secretoria juega un papel importante en la resolución de la infección por *Giardia*, y en los casos donde había una disminución de esta inmunoglobulina, se encontró mayor daño tisular (Faubert 2000, Hawrelak 2003). Asimismo, en trabajos previos desarrollados por otros investigadores, se ha reportado que la administración de kefir a ratones BALB/c

produce un aumento de células IgA<sup>+</sup> luego de 2 y 5 días de tratamiento (Vinderola *et al.* 2005). Por otro lado, Thoreux y Schmucker (2001) encontraron un incremento en la secreción de IgA específica en ratones que consumieron kefir frente al desafío con toxina colérica comparado con el grupo control. Estos autores concluyeron que el kefir, como otros probióticos, estaría ejerciendo un efecto adyuvante en el sistema inmune de mucosas, y lo relacionaron con la presencia de los componentes de pared bacterianos. Todos estos resultados concuerdan con nuestras observaciones. De esta manera, el aumento del número de células productoras de IgA en la lamina propria intestinal podría constituir uno de los mecanismos efectores que contribuye a la protección frente al parásito *Giardia intestinalis*.

**Conclusiones:**

Existen numerosas publicaciones que dan apoyo experimental y clínico al uso de probióticos en el mantenimiento de la homeostasis intestinal, y en la prevención de enfermedades infecciosas intestinales. Los efectos de muchos probióticos son mediados por la regulación del sistema inmune, particularmente a través del control del balance entre citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, convirtiendo a los probióticos en una herramienta eficaz para prevenir la acción de enteropatógenos, aliviar la inflamación intestinal, normalizar la función de la mucosa intestinal y disminuir las reacciones de hipersensibilidad (Isolauri *et al.* 2001, Ohland *et al.* 2010, Narayan *et al.* 2010, Hajela *et al.* 2012). El mantenimiento de la homeostasis intestinal podría inhibir la infección por *Giardia* constituyendo esto una alternativa para la utilización de probióticos en la alimentación. En este sentido, nuestro estudio constituye una nueva evidencia de la capacidad inmunomodulatoria del kefir, esta vez en el contexto de una infección parasitaria. Allí se pone de manifiesto la capacidad de modular la expresión de marcadores de la respuesta celular y humoral, como así también en mediadores de la respuesta innata, responsables de montar y orquestar la respuesta del hospedador. Esta capacidad de modular la respuesta inmune del hospedador puede ser un importante mecanismo a través del cual se logra el efecto anti-giardiasico del kefir en este modelo.

Para las ciencias de salud, como para la industria alimentaria, se ha constituido en un desafío la necesidad de generar conciencia para la prevención de enfermedades y el mantenimiento de la buena salud incluso a través del consumo de alimentos. Se podría hablar, en definitiva, que estamos frente a la necesidad de ofrecer a la población de una dieta funcional, es decir, que aporte más que energía, y así permita mantener un adecuado estado de salud y una óptima inmunocompetencia.

El kefir ha sido consumido por muchos años como un alimento, desde tiempos en los que no se hablaba de la “funcionalidad” de los alimentos, atribuyéndole beneficios para la salud del consumidor, incluso como un elixir de la vida.

Hoy en día, cuando en el mundo entero existe una nueva tendencia con respecto a los alimentos y a las dietas, el kefir constituye un importante integrante de este grupo de alimentos que implican nuevos retos de la industria alimentaria.

Todos los sectores relacionados a los alimentos tienen una responsabilidad con el consumidor, de manera de ofrecer no solo alimentos inocuos, sino que también puedan producir un bien. Por eso ahora se escuchan términos que relacionan estas dos ramas, salud y alimentación, como “inmunonutrición” y en este concepto podemos englobar nuestra investigación. En este trabajo abordamos el estudio de un producto lácteo, de fácil acceso, y

recomendado tanto para las personas sanas como para aquellas con algunas patologías, como la hipertensión e hipercolesterolemia.

Como Podemos decir que la administración de kefir resultó efectiva para reducir la intensidad de una infección causada por *Giardia Intestinalis*, parásito que se ha relacionado con infecciones de tipo alimentario, mostrando un efecto antagónico de alta significancia biológica. Asimismo, la administración de este alimento logró modular la respuesta a nivel celular y tuvo implicancia en medidores de la respuesta humoral, como así también en la producción de citoquinas y quimoquinas que ayudan a la respuesta inmune frente al parásito y a la protección del huésped. En este contexto, si los alimentos funcionales se definen como “aquel que este demostrado que afecta beneficiosamente sobre una o más funciones del cuerpo, mas allá de su efecto nutricional, mejorando la salud y el bienestar y/ o reduciendo el riesgo de enfermedad” (Diplock *et al.* 1999), podemos decir que el kefir, en su acción de prevención de la infección por *Giardia intestinalis*, cumple con esta premisa.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la administración de microorganismos probióticos puede ser entendido como una estrategia alternativa para reducir los síntomas ciertas infecciones parasitarias y muestra el potencial de estos alimentos en la prevención de desórdenes del tracto gastrointestinal.



**Medio Keister's modificado (TYI-S-33)**

|  |         |
|--|---------|
| Digerido de Caseína                          | 20      |
| Extracto de levadura                         | 10 g    |
| Dextrosa                                     | 10 g    |
| Bilis bovina,                                | 0.75 g  |
| NaCl ,                                       | 2 g     |
| L-cisteína. HCl                              | 2 g     |
| Ácido ascórbico-sal sódica                   | 0.2     |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>              | 1 g     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>              | 0.6 g   |
| Citrato férrico- amónico                     | 22.8 mg |
| Suero bovino adulto                          | 100 ml  |
| 1000 IU/ml penicilina/1000 g/ml streptomycin | 15 ml   |
| Agua bidestilada                             | 1l      |

El pH se ajustó a pH 6.9 con NaOH 5N previo a la esterilización por filtración a través de una membrana de 0.22 µm.

**Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium (DMEM) completo**

|   |         |
|---|---------|
| Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium (DMEM) | 1000 ml |
| Penicilina/ Estreptomicina(1000 IU, 1000µg/ml)            | 13 ml   |
| Suero fetal bovino  | 180 ml  |
| Aminoácidos no esenciales                                 | 13 ml   |
| Gentamicina (50 mg/ml)                                    | 10 ml   |
| NaCO <sub>3</sub> H                                       | 2 g     |
| pH  | 7       |

El suero fetal bovino se inactiva 30 min a 60° C. Una vez preparado, el medio se esteriliza por filtración a través de una membrana de 0.22 µm.

**DMEM Adhesión**

|   |         |
|---|---------|
| Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium (DMEM) | 1000 ml |
| NaCO <sub>3</sub> H                                       | 2 g     |

Una vez preparado, el medio se esteriliza por filtración a través de una membrana de 0.22 µm.

**Buffer fosfato**

|   |         |
|---|---------|
| PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K (0.1M) | 50 ml   |
| NaOH (0.1M)                             | 29.1 ml |
| Agua bidestilada                        | 100 ml  |
| pH                                      | 7       |

**PBS**

|                                  |           |
|----------------------------------|-----------|
| NaCl                             | 8.02 g/l  |
| KCl                              | 0.231 g/l |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1.17 g/l  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 0.2 g/l   |
| pH                               | 7.4       |

- Abraham, A. G. and De Antoni, G. L. (1999). Characterization of kefir grains grown in cows' milk and in soya milk. *Journal of Dairy Research*, 66, 327-33
- Abramou W. M. (1993). Drugs for parasitic infection. *The Medical Letter*. 35, III - II2 .
- Ackers, J. P. (1980). Giardiasis: basic parasitology. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, UK: Elsevier, vol. 74, no. 4, pp. 427-430
- Acuña, A., Da Rosa, D., Colombo, H., Saur, S., Alfonso, A., Combolo, A. (1999). Parasitosis intestinales en guarderías comunitarias de Montevideo. *Rev Med Urug*. 15, 5-12.
- Adam, R. D. (1991). The biology of *Giardia* spp. *Microbiological reviews*, 55, 706-32.
- Adam, R. D., and Ortega, Y. R. (1997). *Giardia*: Overview and update. *Clinical Infectious Diseases*, 25, 545- 550.
- Aley, S.B., Zimmerman, M., Hetsko, M., Selsted, M.E. and Gillin, F.D. (1994). Killing of *giardia lamblia* by cryptdins and cationic neutrophil peptides. *Infect. Immun*. 62, 5397-5403.
- Al-Mekhlafi, M. S., Hesham, M., Azlin, U., Nor Aini, A., Shaik, A., Sa'iah, M. S., Fatmah, M. G., Ismail, M. S., Ahmad Firdaus, M. Y., Aisah, A. R., Rozlida, and Norhayati, M. (2005). Giardiasis as a predictor of childhood malnutrition in

Orang Asli children in Malaysia. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 99, 686–91.

- Amahmid, O., Asmama, S., Bouhoum, K. (1999). The effect of waste water reuse in irrigation on the contamination level of food crops by Giardia cysts and Ascaris eggs. Int J Food Microbiol. 49, 19–26.
- Angulo, L., Lopez, E. and Lema, C., (1993). Microflora present in kefir grains of the Galician region north-west of Spain. Journal of Dairy Research 60, 263–267
- Ashwell M. (2004) Conceptos sobre los alimentos funcionales. International Life Sciences Institute (ILSI). Bruselas:ILSI Press
- Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., Gordon, J.I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. Proc. Natl. Acad. Sci. 101, 15718–15723.
- Benyacoub, J., Pérez, P. F., Rochat, F., Saudan, K. Y., Reuteler, G., Antille, N., Humen, M., et al. (2005). *Enterococcus faecium* SF68 enhances the immune response to Giardia intestinalis in mice. The Journal of nutrition, 135, 1171–6
- Bielecka, M. Biedrzycka, E. Majkowska, A. (2002). Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their *in vivo* effectiveness. Food Res. Int. Amsterdam. 35, 125-131.
- Bolla, P. A, Serradell, M. D. L. A., De Urraza, P. J., & De Antoni, G. L. (2011). Effect of freeze-drying on viability and in vitro probiotic properties of a mixture

of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir. The Journal of dairy research, 78, 15–22.

- Borruel, N. (2003). Interacciones bacterianas con el sistema inmunológico intestinal: inmunomodulación. Aplicaciones Clínicas, Y.S.U.S. 26, 13–22.
- Botero D, Restrepo M. (1998) Conceptos generales sobre parasitología. En: Botero D, Restrepo M. Eds. Parasitosis humana. 3ra Ed. Medellín-Colombia.p.64-7
- Bottazzi, V., Zacconi, C., Sarra, P. G., Dallavalle, P. and Parisi, M. G. (1994) Kefir. Microbiologia, chimica e tecnologia. L. Industria del latte 30, 41–62
- Buret, A. (2008). Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalis*. Parasite 15, 261-265.
- Buret, A., Hardin, J. A., Olson, M.E., Gall, D. G. (1992). Pathophysiology of small intestinal malabsorption in gerbils infected with *Giardia lamblia*. Gastroenterology. 103, 506–513.
- Burtin, P., A. Taddio, O. Ariburnu, T. R. Einarson, and G. Koren. (1995). Safety of metronidazole in pregnancy: a meta-analysis. Am. J. Obstet. Gynecol. 172, 525– 529.
- Calzada, F., Garcia-Rojas C. M., Meckes, M., Cedillo-Rivera, R, Bye, R, and Mata, R. (1999). Geranins A and B, new antiprotozoal A-type proanthocyanidins from *Geranium niveum*. J. Nat. Prod. 62:705–709.

- Ceu Sousa, M., Goncalves, C.A., Bairos, V.A. and Poiares-da-Silva, J. (2001). Adherence of *Giardia lamblia* Trophozoites to Int-407 Human Intestinal Cells. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8, 258-265.
- Chaves, P., Fernández, J. A., Ospina, I., López, M. C., Moncada, L., & Reyes, P. (2007). Tendencia de la prevalencia y factores asociados a la infección por *Giardia duodenalis* en escolares y preescolares de una zona rural de Cundinamarca, 345–351.
- Chavez, B., Knaippe, L., Gonzalez-Mariscal, Martinez-Palomo, A (1986). *Giardia lamblia*: a electrophysiology and ultrastructure of cytopathology in culture epithelial cells. Exp. Parasitol. 61, 379-389.
- Critchfield, J., Saskia, V. H. W., Ash, M., Mulder, L., and Ashwood, P. (2011). The potential role of probiotics in the management of childhood autism spectrum disorders. Gastroenterology research and practice. 161 - 358.
- Crivellato E, Vacca A, Ribatti D. (2004). Setting the stage: An anatomist's view of the immune system. Trends Immunol 25, 210-7.
- Cross, M.L. (2002) Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. FEMS Immunol Med Microbiol. 34, 245-253.
- Daly, E. R., Roy, S. J., Blahey, D. D.,(2007). Outbreak of giardiasis associated with a community drinking water source. Epidemiol Infect 138, 491–500.

- Danciger, M., Lopez, M. (1975) Number of Giardia in the feces of infected children *Am J Trop Med Hyg.* 24,237-242.
- Dawson, D. (2005). Foodborne protozoan parasites. *Int J Food Microbiol* 103, 207–27.
- Delcenserie, V., Martel, D., Lamoureux, M., Amiot, J., Boutin, Y., Roy, D. (2008). Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Curr Issues Mol Biol.* 10, 37-54
- Eckmann, L. (2003). Mucosal defences against Giardia. *Parasite immunology* 25(5): 259–70.
- Engel, G., Krusch, U. and Teuber, M. (1986). Microbiological composition of kefir I. Yeasts. *Milchwissenschaft.* 41, 418-421
- FAO/WHO (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food
- Farnworth, E. (2005). Kefir - a complex probiotic. *Food Science and Technology* 2, 1-17.
- Farthing, M. J., Pereira, M. E., and Keusch, G. T. (1986). Description and characterization of a surface lectin from Giardia lamblia. *Infection and immunity.* 51, 661–7.
- Farthing, M.J. (1997). The molucular pathogenesis of Giardiasis. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition* 24, 79-88.

- Fraser, D., Bilenko, N., Deckelbaum, R. J., (2000). *Giardia lamblia* carriage in Israeli Bedouin infants: risk factors and consequences. Clin Infect Dis 30, 419-24
- Fujisawa, T., Adachi, S., Toba, T., Arihara, K., & Mitsuoka, T. (1988). *Lactobacillus kefiranofaciens* sp. nov. isolated from kefir grains. International Journal of Systematic Bacteriology. 38, 12-14
- Fuller, R., Gibson, G. R. (1997) Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. Scand J Gastroenterol Suppl. 222, 28-31.
- Furness, B. W., Beach, M. J., Roberts, J. M. (2000). Giardiasis surveillance, United States, 1992-1997. In: Surveillance Summaries. 49, 1-13.
- Galdeano, C. M., De Moreno de LeBlanc, A, Vinderola, G., Bonet, M. E. B., & Perdigón, G. (2007). Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. Clinical and vaccine immunology. 14, 485-92.
- Gamboa, M.I., Basualdo, J.A., Córdoba, M.A., Pezzani, B.C., Minvielle, M.C., Lahitte, H.B. (2003). Distribution of intestinal parasitoses in relation to environmental and sociocultural parameters in La Plata, Argentina. Journal of Helminthology. 77, 15-20.
- Garrote G. L., Abraham A. G. and De Antoni G. L. (2010). Microbial Interactions in Kefir: A Natural Probiotic Drink. In Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications. 18, 327-340. Ed. Mozzi F., Raya R. & Vignolo G. M. .



- Garrote, G. L., Abraham, A.G. and De Antoni G. L. (2001). Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *The Journal of dairy research* 68, 639–52.
- Gill, H.S. (2003). Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Practical Research on Clinical Gastroenterology*. 17, 755–73.
- Gilman, R.H., Marquis, G.S., Miranda, E., Vestegui, M., Martinez, H. (1988) Rapid reinfection by *Giardia lamblia* after treatment in a hyperendemic third world community. *Lancet*. I, 343–345.
- Golowczyc, M. a, Mobili, P., Garrote, G. L., Abraham, a G., & De Antoni, G. L. (2007). Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *International journal of food microbiology*, 118, 264–73. .
- Grant, J., Mahanty, S., Khadir, A. (2001). Wheat germ supplement reduces cyst and trophozoite passage in people with giardiasis. *Am J Trop Med Hyg*. 65, 705-710.
- Hakansson, A., & Molin, G. (2011). Gut microbiota and inflammation. *Nutrients*, 3(6), 637–82.
- Hansen, W. R. and Fletcher, D. A. (2008). Tonic shock induces detachment of *Giardia lamblia*. *PLoS neglected tropical diseases* 2, e169.

- Hardin, J.A., Buret, A.G., Olson, M.E., Kimm, M.H., and Gall, D.G. (1997) Mast cell hyperplasia and increased macro- molecular uptake in an animal model of giardiasis. *J Parasitol* 83: 908–912.
- Havenaar, R., B., Brinky Huis in't Veld, J. H. J. (1992). Selection of strains for probiotic use, *Probiotics, the scientific basis.* 209–224
- Hawrelak, J. (2003). Giardiasis: pathophysiology and management. *Altern Med Rev.* 8, 129-142.
- Helander, I. M., Von Wright, A. and Mattila-Sandholm T. M. (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against gramnegative bacteria, *Trends in Food Science and Technology.* 8, 146–150
- Hill, D., and Pearson, RD. (1987). Ingestion of giardia lamblia trophozoites by human mononuclear phagocytes. *Infect Immun* 55, 3155-3161.
- Holberton, D. V. (1974). Attachment of Giardia-a hydrodynamic model based on flagellar activity. *J. Exp. Biol.* 60, 207-221.
- Hooper L.V. and MacPherson A. J. (2010) Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota, *Nature Reviews Immunology.* 10, 159–16
- House, S. A., Richter, D. J., Pham J. K., and Dawson S. C. (2011). *Giardia* flagellar motility is not directly required to maintain attachment to surfaces. *Plos pathogens* 7, 100-167

- Hugo, A. A., De Antoni, G. L., and Pérez, P. F. (2006). *Lactobacillus delbrueckii* subsp lactis strain CIDCA 133 inhibits nitrate reductase activity of *Escherichia coli*. *International journal of food microbiology*, *11*, 191–6.
- Humen M. A. (2009). Interacción de *Giardia intestinalis* con el hospedador efecto antagónico de probióticos intestinales. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata. Argentina
- Humen, A., Antoni, G. L. De, Benyacoub, J., Costas, E., Cardozo, M. I., Kozubsky, L., Saudan, K., et al. (2005). *Lactobacillus johnsonii* La1 Antagonizes *Giardia intestinalis* In Vivo. *73*, 1265–1269
- Inge, P. M., Edson, C. M. and Farthing, M. J. (1988). Attachment of *Giardia lamblia* to rat intestinal epithelial cells. *Gut*. *29*, 795–801.
- Isolauri, E., Sutas, Y., Kankaanpaa, P., Arvilommi, H. and Salminen, S. (2001) Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr*. *73*, 444S-450.
- Jamuna, M. and Jeevaratnam, K. 2004. Isolation and characterization of lactobacilli from some traditional fermented foods and evaluation of the bacteriocin. *Journal of General and Applied Microbiology* *50*: 79-90.
- Jenkins, M.C., O'Brien, C.N., Murphy, C., Schwarz, R., Miska, K., Rosenthal, B., Trout, J.M., (2009). Antibodies to the ventral disc protein delta-giardin prevent in vitro binding of *Giardia lamblia* trophozoites. *J. Parasitol*. *95*, 895–899

- Jong, E. (2002). Intestinal parasites. Prim Care Clin Office Pract; 29,857-877
- Kakisu, E. J., Abraham, A. G., Pérez, P. F., & De Antoni, G. L. (2007). Inhibition of *Bacillus cereus* in milk fermented with kefir grains. Journal of food protection, 70, 2613–6
- Kandler, O. and Kunath, P. (1983). *Lactobacillus kefir* sp. Nov a component of the microflora of kefir. Systematic and Applied Microbiology. 4, 286-294.
- Karanis, P., C. Kourenti, and H. Smith. (2007). Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. J. Water Health 5, 1–38
- Katelaris, P., Naeem, A., Farthing, M. (1995). Attachment of *Giardia lamblia* trophozoites to a cultured human intestinal cell line. Gut 37, 512-518.
- Katz D.E., Heisey-Grove, D., Beach, M., Dicker, R.C., Matyas, B.T. (2006) Prolonged outbreak of giardiasis with two modes of transmission. Epidemiol Infect 134, 935–41.
- Klarin, B., Wullt, M., Palmquist, I., Molin, G., Larsson, A., Jeppsson, B. (2008). *Lactobacillus plantarum* 299v reduces colonization of *Clostridium difficile* in critically ill patients treated with antibiotics. Acta Anaesthesiol. Scand. 52, 1096–1102.

- Koji N (2005) Prevention of infection by Probiotics. J Biosci Bioeng 100(6):583–592
- Koroleva, N.S. (1991). Products prepared with lactic acid bacteria and yeasts. In: Therapeutic properties of fermented milks Ed.: Robinson, R. K., Elsevier Applied Sciences Publishers, London, UK. 159-179.
- Kruis, W., Fric, P., Pokrotnieks, J., (2004) Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. Gut. 53, 1617–23.
- Kuo Ch, Y. & Lin, Ch. W. (1999). Taiwanese kefir grains: their growth, microbial and chemical composition of fermented milk. Australian Journal of Dairy Technology. 54, 19-23
- Li, E., Zhou, P., Petrin, Z. and Singer, S.M. (2004). Mast Cell-Dependent Control of giardia lamblia Infections in Mice. Infect. Immun. 72, 6642-6649.
- Liu, L. X., and P. F. Weller. 1996. Antiparasitic drugs. N. Engl. J. Med. 334:1178–1184
- Lopitz-Otsoa, F., Rementeria, A., Elguezabal, N. and Garaizar, J. (2006). Kefir: A symbiotic Yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities, Rev. Iberoam. Micol. 23, 67–74
- Lorea Baroja, M., Kirjavainen, P.V., Hekmat, S., Reid, G. (2007). Anti-inflammatory effects of probiotic yogurt in inflammatory bowel disease patients. Clin. Exp. Immunol. 149, 470–479.

- Lu, L. Walker A. (2001) Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *Am J Clin Nutr* 73, 1124-30.
- Lujan, H. D., Mowatt, M. R., and Nash, T. E. (1997). Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 294–304
- Mangiaterra, M.L., Giusiano, G.E., Alonso, J.M., Pons de Storni, L., Waisman, R. (1998) Dermatophytosis in the greater Resistencia area, Chaco Province, Argentina. *Rev Arg Microbiol.* 30, 79-83
- Marjolein, M., Wells J. M., Taverne, N., Zeeuw Brouwer, M.L., Hilhorst, B., Venema, and K. Van Bilsen, J. (2012) Immunomodulatory effects of potential probiotics in a mouse peanut sensitization mode. *Immunology & Medical Microbiology* 3, 488 - 496
- Marshall, M.M., Naumovitz, D., Ortega, Y.R., Sterling, C.R. (1997). Waterborne protozoan pathogens. *Clin Microbiol Rev* 10, 67-85
- 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 / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*, 47, 93–7.
- Medrano, M., Racedo, S. M., Rolny, I. S., Abraham, A. G., & Pérez, P. F. (2011). Oral administration of kefir induces changes in the balance of immune cells in a murine model. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59, 5299–304.

- Menard S, Candalh C, Bambou JC, Terpend K, Cerf-Bensussan N, Heyman M. (2004). Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. *Gut*. 53, 821–8.
- Messens, W. and De Vuyst, L. 2002. Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs-a review. *International Journal of Food Microbiology* 72: 31-43.
- Mintz, E.D., Hudson, M., Mshar, P., Cartter, M., Hadler, J.L., (1993) Foodborne giardiasis in a corporate office setting. *Journ of Infect Dis*. 16 , 2500-2503.
- Minvielle, M., Pezzani, BC., Cordoba, MA., De Luca, MM., Apezteguia, MC., Basualdo, JA. (2004). Epidemiological survey of *Giardia lamblia* and *Blastocystis hominis* in an Argentinian rural community. *Korean J Parasitol*. 42, 121-127.
- Minvielle, M.C., Molina, N.B., Polverino, D. and Basualdo, J.A. (2008). First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animals feces in argentina South America. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 103, 98-103.
- Miyares, C., I. Hollands, C. Castaneda, T. Gonzalez, T. Fragaso, R. Curras, and C. Soria. 1988. Ensayo terapeutico con un preparado a base de propoleo “propolisina” en la giardiasis del humano. *Acta Gastroenterol. Latinoam*. 18,195–201

- Molska, I., Moniuszco, I., Komorows, K. A. M. & Merilanen, V. (1983). Characteristics of bacilli of *Lactobacillus casei* species appearing in kefir grains. *Acta Alimentaria Polo Unica*. 9, 80-88
- Mowat AM. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*. 3, 331-41
- Mukai, T., Watanabe, N., Toba, T., Itoh, T. & Adachi S. (1991). Gel-Forming Characteristics and Rheological Properties of Kefiran. *Journal of Food Science*. 56, 1017-1018.
- Müller, N., von Allmen, N. (2005). Recent insights into the mucosal reactions associated with giardia lamblia infections. *Int J Parasitol* 35(13),1339-1347.
- Muniz-Junqueira, M.I., Queiróz E.F.O. (2002). Relationship between protein-energy malnutrition, vitamin A, and parasitoses in living in Brasília. *Rev Soc Bras Med Trop*. 35, 133- 141.
- Nain, C.K., Dutt, P., Vinayak, V.K. (1991). Alterations in enzymatic activities of the intestinal mucosa during the course of *Giardia lamblia* infection in mice. *Ann Trop Med Parasitol*. 85, 515-522.
- Nash T. E. (1989). Antigenic variation in *Giardia lamblia*. *Exp. Parasitol*. 68:238-41
- Newberry, R.D. and Lorenz, R.G. (2005). Organizing a mucosal defence. *Immunol. Rev.*, 206, 6-21.



- OPS/OMS. (1996) Guía para el establecimiento de sistemas de vigilancia epidemiológica de enfermedades transmitidas por alimentos (VETA) y la investigación de brotes de toxi-infecciones alimentarias. [http://publicaciones.ops.org.ar/publicaciones/cursosvirtuales/VETA/bibliografia/Guia\\_veta](http://publicaciones.ops.org.ar/publicaciones/cursosvirtuales/VETA/bibliografia/Guia_veta)
- Ortega-Barria, E., Ward, H. D., Evans, J. E., Pereira, M. E. (1990) N-acetyl-D-glucosamine is present in cysts and trophozoites of *Giardia lamblia* and serves as receptor for wheatgerm agglutinin. *Mol Biochem Parasitol.* 43, 151-165.
- Ottogalli, G., Galli, A., Resmini, P. & Volonterio, G. (1973). Composizione Microbiologique, chimica ed ultraestructura dei granuli di Kefir. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*, 23, 109-121.
- Pavan, S., Desreumaux, P, and Mercenier, A. (2003) Use of mouse models to evaluate the persistence, safety, and immune modulation capacities of lactic acid bacteria. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 10 696–701
- Perez, P. F., Minnaard, J., Rouvet, M., Knabenhans, C., Brassart, D., De Antoni, G. L. and Schiffrin, E. J. (2001) Inhibition of *Giardia intestinalis* by extracellular factors from Lactobacilli: an in vitro study. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5037–5042
- Pickering, L.K., Woodward, W.E., DuPont, H.L., Sullivan, P. (1984) Occurrence of *Giardia lamblia* in children in day care centers. *J Pediatr.* 104, 522–6.

- Pintado, M. E., Lopes Da Silva, J. A., Fernandes, P. B., Malcata, F. X. & Hogg, T. A. (1996). Microbiological and rheological studies on Portuguese kefir grains. *International Journal of Food Science & Technology*. 31, 15-26
- Plein, K. and Hotz, J. (1993) Therapeutic effect of *Saccharomyces boulardii* on mild residual symptoms in a stable phase of Crohn's disease with special respect to chronic diarrhea a pilot study. *Z Gastroenterol*. 31, 129-34.
- Procop GW. Gastrointestinal Infections. *Infect Dis Clin North Am* 2001; 15:1073-1108.
- Puig, R., E., Pérez C.F. J., Castellote, C., Franch, A., & Castell, M. (2008). El intestino: pieza clave del sistema inmunitario. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 100, 29–34
- Qin, J. Li, R., Raes, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, vol. 464, 59–65
- Quick, R., Paugh, K., Addiss, D., Kobayashi, J., Baron, R. (1992). Restaurant- associated outbreak of giardiasis. *J Infect Dis*. 166, 673–6.
- Rao, K., Brown, M. (2008). Mast Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1143, 83-104
- Reiner, D. S., Wang, C. S. and Gillin, F. D.. (1986). Human milk kills *Giardia lamblia* by generating toxic lipolytic products. *J. Infect. Dis*. 154, 825–832.

- Robert, D.N., Sean, R.M., Aldo, A.M.L., James, P.N., Richard, L.G., Cynthia, L.S., (2001). A longitudinal study of *Giardia lamblia* infection in northeast Brazilian children. Trop. Med. Int. Health 6, 624—634.
- Rodrigo, M. A., and Alegre, P. T. (2007.) Pediatría integral. Parasitosis intestinales, 149-160.
- Rohm, H. and Kovac, A. (1994). Effects of starter cultures on linear selected dairy products. Journal of Applied Bacteriology. 72, 370-376
- Rohm, H., Eliskases-Lchner, F. & Brauer, M. (1992). Diversity of yeasts in selected dairy products. Journal of Applied Bacteriology. 72, 370-376.
- Roitt, I.M., Delves, P.J., 2003. Immunologia. Fundamentos. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Rosi, J., and J. Rossi. (1978). I microorganismi del kefir: i fermenti lattici. Sci. Tech. Lattiero-Casearia 29, 291-305.
- Roxström-Lindquist, K., Palm, D., Reiner, D., Ringqvist, E., Svärd, SG. (2006). Giardia immunity-an update. Trends Parasitol. 22, 26-31.
- Rutledge, T. F., andc Boyd, M. F. (2010). Morbidity and Mortality Weekly Report Cryptosporidiosis Surveillance — United States , 2006 - 2008 and Giardiasis Surveillance — United States ,59, 2006–2008.
- Sackey, M.-E., Weigel, M.M. and Armijos, R.X. (2003). Predictors and Nutritional Consequences of Intestinal Ecuadorian Children Parasitic Infections in Rural. J Trop Pediatr 49, 17-23.

- Saito H, Kanamori Y, Takemori T, (1998). Generation of intestinal T cells from progenitors residing in gut cryptopatches. *Science*, 280, 275-8.
- Schultz, M., (2008). Clinical use of *E. coli* Nissle 1917 in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Disease* 14, 1012–1018.
- Scott, K. G., Yu, L. C. H., & Buret, G. (2004). Role of CD8 and CD4 T Lymphocytes in Jejunal Mucosal Injury during Murine Giardiasis, 72, 3536–3542.
- Shukla, G., Devi, P., & Sehgal, R. (2008). Effect of *Lactobacillus casei* as a probiotic on modulation of giardiasis. *Digestive diseases and sciences*, 53(10), 2671–9.
- Singer, S. M. and Nash, T. E. (2000b). The Role of Normal Flora in *Giardia lamblia* infection in mice. *The Journal of Infections disease*. 181, 1510-1512.
- Singer, S. M., and Nash, T. E. (2000a). T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. *Infection and immunity* 68, 170–5.
- Smith, H. V., Cacciò, S. M., Cook, N., Nichols, R. A., Tait, A. (2007) *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Vet Parasitol* 149, 29–40.
- Soriano, S., Barbieri, L.M., Pierangeli, N.B. (2001) - Intestinal parasites and the environment: frequency of intestinal parasites in children of Neuquén, Patagonia, Argentina. *Rev. Latinoamer. Microbiol.*, 43, 96-101,

- Svard SG, Meng TC, Hetsko ML, McCaffery JM, Gillin FD. (1998). Differentiation-associated surface antigen variation in the ancient eukaryote *Giardia lamblia*. *Mol. Microbiol.* 30,979–89
- Takizawa, S., Kojima, S., Tamura, S., Fujinaga, S., Benno, Y. & Nakase, T. (1998). The composition of the lactobacillus flora in kefir grains. *Systematic and Applied Microbiology.* 21, 121-127.
- Takizawa, S., Kojima, S., Tamura, S., Fujinaga, S., Benno, Y. & Nakase T. (1994). *Lactobacillus kefirgranum* sp. nov. and *Lactobacillus parakefir* sp. nov., two new species from kefir grains. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 44, 435-439.
- Tannock, G.W., Munro, K., Harmsen, H.J.M., Welling, G.W., Smart, J., Gopal, P.K. (2000). Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl Environ Microbiol.* 66, 2578–2588,
- Thompson, R.C. (2004). The zoonotic significance and molecularepidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Veterinary Parasitology* 126: 15-35
- Thoreux K and Schmucker D L (2001). Kefir milk enhances intestinal immunity in young but not old rats. *Journal of Nutrition* 131, 807-812.
- Toba, T., Uemura, H., Mukai, T., Fujii, T., Itoht, T. & Adachi S. (1991). A new fermented milk using capsular polysaccharide-producing *Lactobacillus*

kefiranofaciens isolated from kefir grains. *Journal of Dairy Research*. 58, 497-502.

- Torres, M. F., Uetanabaro, a P., Costa, a F., Alves, C. a, Farias, L. M., Bambirra, E. a, Penna, F. J., et al. (2000). Influence of bacteria from the duodenal microbiota of patients with symptomatic giardiasis on the pathogenicity of *Giardia duodenalis* in gnotoxenic mice. *Journal of medical microbiology*. 49, 209–15.
- Travers, M.-A., Florent, I., Kohl, L., & Grellier, P. (2011). Probiotics for the control of parasites: an overview. *Journal of parasitology research*, 2011, 610769. doi:10.1155/2011/610769
- Vanderhoof, J. A., Young, R. J. (1998). Use of probiotics in childhood gastrointestinal disorders. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 27, 323-332.
- Vinderola, C. G., Duarte, J., Thangavel, D., Perdigón, G., Farnworth, E., & Matar, C. (2005). Immunomodulating capacity of kefir. *Journal of Dairy Research*, 72(2), 195–202.
- Vinderola, G., Binetti, A., Burns, P., & Reinheimer, J. (2011). Cell viability and functionality of probiotic bacteria in dairy products. *Frontiers in microbiology*, 2(May),
- Vinderola, G., Matar, C., & Perdigón, G. (2007). Milk fermentation products of *L. helveticus* R389 activate calcineurin as a signal to promote gut mucosal immunity. *BMC immunology*, 8, 19.

- Vinderola, G., Perdigón, G., Duarte, J., Farnworth, E., & Matar, C. (2006). Effects of the oral administration of the products derived from milk fermentation by kefir microflora on immune stimulation. *The Journal of dairy research*, 73, 472-9.
- Vitiñi, E., Alvarez, S., Medina, M., Medici, M., de Budeguer, MV., Perdigón, G. (2000). Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria. *Biocell*. 24, 223-232.
- West, N. P., Pyne, J. M., Peake and a Cripps, W. (2009). Probiotics, immunity and exercise: a review. *Exercise immunology review*. 15, 107-26.
- Weymer, A., Huott, P., Liu, W., McRoberts, JA., Dharmasathaphorn, K. (1985). Chloride secretory mechanism induced by prostaglandin E1 in a colonic epithelial cell line. *J Clin Invest*. 76, 1828-1836
- WHO/PHO. (1992) Informal consultation on intestinal protozoal infections. Mexico DF: OPS.
- Wyder, M. T. (2001). Yeast in Dairy Products. *FAM Swiss Federal Dairy Research Station*. 4, 1-21
- Yoder, J. S., Beach M.J. (2007) Giardiasis surveillance—United States, 2003-2005. 56, 77-90
- Zacconi, C., Scolari, G., Vescovo, M. & Sarra, P.G. (2003) Competitive exclusion of *Campylobacter jejuni* by kefir fermented milk. *Ann Microbiol*. 53, 179-187.

- Zenian, A., Gillin, F. (1985). Interactions of Giardia Lamblia with human intestinal mucus: enhancement of trophozoites attachment to glass. J. Potozool. 32, 664-668
- Zourari, A. & Anifantakis, E. M. (1988). Le kefir caracteres physico-chimiques, microbiologiques et nutritionnels. Technologie de Production. Le Lait. 68, 373-392.