



**Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, A.C.**

**EFFECTO INMUNO-MODULADOR DEL ÁCIDO
LINOLEICO CONJUGADO EN LA RESPUESTA INMUNE
INNATA INTESTINAL EN UN MODELO MURINO DE
GIARDIASIS**

Por:

Puebla Clark Lucinda del Carmen

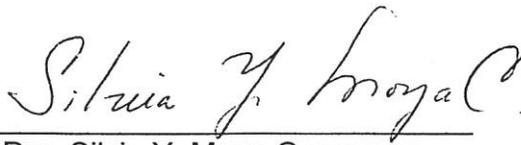
TESIS APROBADA POR LA
COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

Como requisito parcial para obtener el grado de

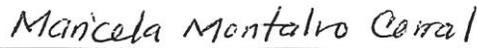
MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Lucinda del Carmen Puebla Clark, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



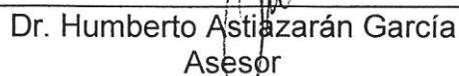
Dra. Silvia Y. Moya Camarena
Director de Tesis



Dra. Maricela Montalvo Corral
Asesor



Dr. Jesús Hernández López
Asesor



Dr. Humberto Astiazarán García
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por el apoyo económico para el proyecto SEP-CONACYT 2012-1 182422, otorgado a la Dra. Maricela Montalvo Corral, así como la beca de maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. por el apoyo en el proceso académico y las instalaciones de los laboratorios de Nutrición Molecular e Inmunonutrición y laboratorio de Inmunología.

A mi asesora la Dra. Silvia Y. Moya Camarena por todos sus consejos y apoyo durante todo este proceso, así como a la Dra. Maricela Montalvo por su ayuda para la elaboración de este trabajo.

A mis sinodales el Dr. Jesús Hernández y el Dr. Humberto Astiazarán por sus observaciones durante este trabajo.

Al Dr. Humberto González Ríos por su asesoría en el diseño y análisis estadístico.

Así como al Dr. Carlos Velázquez por su asesoría en los protocolos de infección. Al Dr. Guillermo López Cervantes por su apoyo en el análisis de histología.

Al Dr. Hiskias Keizer por su amable donación de CLA.

Al grupo del Dr. Humberto Astiazarán (Bertha Pacheco, Gemma Iñigo y Rocío León) por el entrenamiento en el manejo de cultivos de *Giardia lamblia*.

A Lupita Robles y Érika Silva por su apoyo, asesorías y tiempo dedicado en el análisis de citometría.

A Mónica Reséndiz por su ayuda durante este trabajo.

A Lorena Bustamante, por su amistad y ayuda durante todo este tiempo.

A Yamilette Durán, Marisela Rodríguez, Misael Vega, Jaudiel Salado e Itzel Reyes; por su apoyo en el cuidado de los ratones, así como por su amistad.

A mis amigos Mónica, Lulú, Atenas, Erandi, Glenda, Mariela, Alejandra, María José, Arturo, Karla, Josefina por su increíble amistad y apoyo moral durante todo este proceso.

A Adrian por ser el mejor compañero durante todo este proceso.

DEDICATORIA

A mi familia, porque sin su apoyo esto no sería posible. De todo corazón.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN	3
CLA: Generalidades e Isómeros.....	3
Efectos Inmuno-moduladores.....	4
Mejoras en la capacidad fagocítica y estallido respiratorio	5
Inmunidad Innata a Nivel Intestinal.....	6
Macrófagos y Dendríticas Intestinales: Función y Fenotipo	7
Reclutamiento de Monocitos a la Mucosa y su Función.....	10
Giardiasis.....	11
Hospederos y Patogenia.	12
Respuesta Inmune	13
Utilización de Modelo Murino para el Estudio de Giardiasis.....	15
III. HIPÓTESIS	17
IV. OBJETIVO GENERAL	18
Objetivos Específicos	18
V. MÉTODOS	19
Diseño Experimental	19
Unidades Experimentales.....	20
Dietas	20

CONTENIDO (continuación)

Inducción de Infección	20
Obtención de Tejidos para Análisis Histológicos	21
Conteo de trofozoítos y obtención de lavado intestinal	21
Obtención de células presentadoras de antígeno intestinales.....	22
Caracterización Fenotípica por Citometría de Flujo.....	23
Cuantificación de Citocinas por ELISA	23
Análisis de Datos.....	23
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
Establecimiento de la Infección con <i>Giardia lamblia</i>	25
Análisis de Citometría	27
Análisis de Histología	44
VII. CONCLUSIONES.....	46
VIII. REFERENCIAS	48

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Cinética de conteo total de trofozoitos	26
2	Cinética de conteo de trofozoitos en la infección por <i>G. lamblia</i> en ratones C3H/HeN.	27
3	Diseño de marcaje para distinción de poblaciones celulares	28
4	Marcaje con otros receptores	29
5	Clasificación de poblaciones celulares	30
6	Porcentaje de marcaje en las distintas poblaciones celulares de ratones suplementados	32
7	Porcentaje e IMF de diferentes marcadores en la población MHCII ^{hi} / CD11c ^{hi} de la muestra de intestino	35
8	Porcentaje e IMF de diferentes marcadores en la población MHCII ^{low} / CD11c ^{low} de la muestra de intestino	37
9	Porcentaje de IMF de diferentes marcadores en la población MHCII ⁺ / CD11c ⁺ de la muestra de placas de Peyer	39
10	Porcentaje de IMF de diferentes marcadores en la población MHCII ⁻ / CD11c ⁺ de la muestra de intestino	42
11	Porcentaje de IMF de diferentes marcadores en la población MHCII ⁻ / CD11c ⁺ de la muestra de placas de Peyer	43
12	Microfotografías que muestran las vellosidades de duodeno con tinción por hematoxilina-eosina en cortes transversales (aumento 600x).	45

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Fenotipo de las poblaciones de células dendríticas y macrófagos de intestino delgado	10
2	Hospederos para las diferentes especies del género <i>Giardia</i>	13
3	Grupos experimentales y sus tratamientos	19

RESUMEN

El ácido linoleico conjugado (CLA) tiene la capacidad para modular las respuestas de las células presentadoras de antígeno (APC) como la fagocitosis, producción de citocinas y especies reactivas de oxígeno. Estas funciones efectoras a nivel intestinal son muy reguladas para poder conservar la homeostasis del tejido. Ante la presencia de un patógeno el tejido puede reclutar células, y las APC pueden aumentar sus receptores de superficie promoviendo así el microambiente para estimular el proceso de inmunidad. Sin embargo, algunos parásitos, como *Giardia lamblia*, son capaces de evadir o suprimir estos mecanismos de defensa. La giardiasis puede iniciar algunos elementos del proceso de respuesta innata del intestino, aunque de manera limitada, siendo los mismos aspectos que el CLA puede estimular. En este estudio se evaluó el efecto inmunomodulador del CLA en un modelo murino de giardiasis, mediante el análisis de la cinética de recuperación de trofozoitos y el análisis las poblaciones de APC y sus receptores de superficie. Se estableció la cinética de infección con *Giardia lamblia* en los ratones C3H/HeN, obteniendo un pico de infección a los seis días post-infección, manteniendo la carga parasitaria hasta los veintidós días. Se compararon las cinéticas de recuperación de trofozoitos en ratones infectados con *G. lamblia*, sin y con suplementación con CLA (mezcla 50:50 de cis-9, trans-11-CLA y trans-10, cis-12-CLA). En los ratones del grupo control se obtuvo un pico de máxima recuperación de trofozoitos a los seis días post-infección, mientras que en el grupo tratado con CLA no hubo aumento significativo de la carga parasitaria a los 6 y 8 días post infección. Con el análisis de las poblaciones

celulares por citometría de flujo, se obtuvo que los ratones suplementados con CLA presentaron porcentajes elevados de APC antes de la infección y fueron disminuyendo a los 6 y 8 días post infección. En el grupo control los porcentajes de estas células fueron aumentando, en congruencia con el aumento observado en la carga parasitaria. Los marcadores CD103 y F4/80, asociados con la activación de linfocitos T reguladores, tuvieron una mayor expresión por cada célula (determinado mediante el índice medio de fluorescencia) en el grupo de CLA, comparado con el control, dando como resultado una mejor respuesta con menor número de células. Nuestros resultados sugieren que la suplementación con CLA provee al intestino la protección necesaria para regular la carga parasitaria en el intestino, al proporcionarle una mayor eficiencia en la respuesta contra *G. lamblia*.

Palabras clave: CLA, innata, APC, *Giardia lamblia*.

ABSTRACT

Conjugated linoleic acid (CLA) has the ability to modulate the responses of antigen presenting cells (APC), such as phagocytosis, production of cytokines and reactive oxygen species. These effector functions in the intestine are regulated in order to maintain tissue homeostasis. In the presence of a pathogen the tissue can recruit cells and APCs may increase their surface receptors thereby promoting a microenvironment to stimulate immunity process. However, some parasites, such as *Giardia lamblia*, are able to evade or suppress these defense mechanisms. Giardiasis can initiate some elements of the innate immune response process of the intestine, but in a controlled manner, and those are the same aspects that CLA can stimulate. In this study we evaluated the immunomodulatory effect of CLA in a murine model of giardiasis by analyzing the kinetics of recovery of trophozoites and analyzing populations and APC surface receptors. The kinetics of infection with *Giardia lamblia* was established in *C3H/HeN* mice, achieving a peak of infection at six days post-infection, keeping the parasite load until twenty two days. The recovery trophozoites kinetics were compared, in *G. lamblia* infected mice, with and without supplementations with CLA (50:50 mixture of cis-9, trans-11-CLA and trans-10, cis-12-CLA). In mice in the control group we obtain a maximum peak of recovery trophozoites at six days post-infection, whereas in the group treated with CLA there was no significant increase in parasite burden at six and eight days post-infection. Analysis of cell populations by flow cytometry showed that supplemented mice had higher percentages of APC before infection and were decreased at six and eight days post-infection. In the control group the

percentages of these cells were increasing, consistent with the observed increase in parasite load. The CD103, and F4/80, markers associated with the activation of regulatory T cells, had a higher expression per cell (determined by the Mean Fluorescence Intensity) in the CLA group, compared to control, resulting in a better response with fewer cells. Our results suggest that supplementation with CLA provides to the intestine the necessary protection to regulate the parasite load in the gut, to provide a more efficient response against *G. lamblia*.

Key words: CLA, innate, APC, *Giardia lamblia*.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se ha incrementado el interés por las diversas funciones que pueden ejercer en el cuerpo ciertos alimentos además de la de nutrir (Ramírez, 2010). Un ejemplo de esto es el ácido linoleico conjugado (CLA), acrónimo que se refiere a isómeros del ácido linoleico con dobles enlaces conjugados es decir, doble enlaces separados por uno sencillo que se encuentra en diversas configuraciones cis y trans. Se encuentran principalmente en la leche, carne y productos lácteos de los rumiantes. Estos isómeros han probado tener efectos antiinflamatorios, anticancerígenos, antidiabéticos, etc. (Benjamin y Spener, 2009; Bhattacharya et al., 2006), así como beneficios en la producción de citocinas e inmunoglobulinas (Wahle et al., 2004; McDonald, 2000) y potenciar la respuesta inmune en mucosas.

La mucosa del tracto gastrointestinal es una gran vía de entrada a patógenos por ser la superficie mucosa más grande de todos los sistemas de mamíferos (Dwivedy y Aich, 2011). El intestino está colonizado por una amplia gama de bacterias con las que mantiene una relación simbiótica, la inmunidad intestinal debe ser capaz de responder a agentes infecciosos sin dañar a su microflora residente. Sin embargo, los mecanismos de defensa del sistema inmune sobre todo innato a nivel intestinal no están bien elucidados y las infecciones intestinales por parásitos son problemas de salud pública (Schenk y Mueller, 2008).

Un parásito muy común es *Giardia lamblia* que es un gran contaminante de aguas superficiales alrededor del mundo afectando a diferentes vertebrados y ocasiona la infección intestinal conocida como giardiasis (Solarczyk y

Majewska, 2010; Lee y Faubert, 2006). Este protozoo estimula la respuesta de algunos mecanismos de defensa innata en su hospedero (Smith y Paget, 2007; Roxtröm-Lindquist et al., 2006) lo que lo hace un buen modelo de infección para el estudio de las propiedades inmuno-moduladoras del CLA en el sistema inmune innato del intestino.

II. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

CLA: Generalidades e Isómeros.

Todas las funciones que lleva a cabo nuestro organismo están relacionadas con el tipo de alimentación que consumimos así como el estilo de vida. En la actualidad existe mucho interés sobre los efectos que tienen los ácidos grasos poliinsaturados sobre la funcionalidad del organismo; un ejemplo de estos es el CLA.

El CLA se sintetiza *in vivo* por las bacterias del rumen a partir del ácido linoleico por medio de vías oxidativas y de isomerización enzimática. De los diferentes isómeros generados por esta microflora, el cis-9, trans-11-CLA o ácido ruménico es el más abundante seguido por el trans-10, cis-12-CLA (Fig.1). En los lácteos existe una concentración de 2.9 a 8.9 mg de CLA por gramo de grasa y del 73% al 93% de esa cantidad corresponde al isómero cis-9, trans-11 (Kelly, 2001; Steinhart, 1996). En aceites vegetales, margarinas y grasas de animales no rumiantes se han encontrado concentraciones de 0.6 a 0.9 mg de CLA por gramo de grasa. Esto indica que la microflora intestinal de animales no rumiantes también tiene capacidad, aunque limitada, de isomerizar el ácido linoleico en CLA (McDonald, 2000).

Se han realizado varios estudios tanto en animales como en humanos que han demostrado que cada isómero de CLA tiene diferentes efectos sobre el metabolismo y la función celular del organismo. Los isómeros cis-9, trans-11-CLA y trans-10, cis-12-CLA, han sido los más estudiados ya que a éstos se les atribuye una gran actividad biológica (Or-Rashid et al., 2010). Existen muchos

estudios sobre el CLA, pero ha sido difícil llegar a un acuerdo en cuanto a los mecanismos de acción y efectos de estos isómeros, sobre todo *in vivo*. Algunos se han enfocado en los mecanismos de acción molecular del CLA, donde éste actúa como ligando para los receptores nucleares PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors). Estos receptores son mediadores para la expresión génica en la regulación de procesos metabólicos, inmunológicos, inflamatorios y síntesis enzimática (Benjamin y Spener, 2009; Moya-Camarena et al., 1999). Otros autores discuten que la actividad del CLA es debida a su integración en la membrana plasmática de las células, específicamente en las balsas lipídicas (Dowling et al., 2012).

Efectos Inmuno-moduladores

Dentro de las propiedades estudiadas del CLA, se ha visto que es capaz de regular varios mediadores de la inflamación como las citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-1, etc.) y el óxido nítrico (NO). Por ejemplo, Ramírez-Santana et al. (2011) realizaron un estudio con esplenocitos de ratas Wistar suplementadas por 4 semanas con cis-9, trans-11-CLA, se observó un incremento de IL-6, al compararlo con ratas con dieta control. En esas mismas células al tratarlas con el agente mitogénico acetato de forbol miristato (PMA), observaron un menor índice de mortalidad, que en células de ratas con dietas control.

En un estudio con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de cerdos que fueron aisladas, cultivadas y tratadas con una mezcla (1:1) de cis-9, trans-11-CLA y trans-11, cis-12-CLA se suprimió la expresión de TNF- α , IL-6, e IL-1. También se realizó una estimulación con LPS a cerdos alimentados con 2% de la mezcla de CLA y a otros con dieta control, y se observó que el aumento en la concentración de estas citocinas en suero era menor en los cerdos suplementados que en los controles (Changhua et al., 2005).

Hay estudios que prueban que el CLA actúa a nivel transcripcional afectando las señalizaciones necesarias para la respuesta inflamatoria ante un estímulo. En células HEK-TLR4-CD14-MD-2 cultivadas con cis-9, trans-11-CLA y estimuladas con LPS se observó la supresión del factor nuclear κ B (NF- κ B) y del factor de transcripción regulado por interferón -3 (IRF-3) (Dowling et al., 2012). En otro estudio con células dendríticas de ratones BALB/c cultivadas con este isómero y estimuladas con LPS, se observó menos producción de la citocina proinflamatoria IL-12 y mayor producción de la citocina antiinflamatoria IL-10, asociada a una reducción en la actividad de NF- κ B (Loscher et al., 2005).

Mejoras en la Capacidad Fagocítica y Estallido Respiratorio

Los isómeros cis-9, trans-11-CLA y trans-10, cis-12-CLA también han demostrado ser potenciadores de la capacidad fagocítica y producción de NO en macrófagos, monocitos y granulocitos. En un cultivo de macrófagos de la línea celular THP-1 estimuladas con estos isómeros se aumentó la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS). Los autores de este estudio creen que en macrófagos cultivados con CLA la cadena respiratoria mitocondrial y los radicales libres producidos en la oxidación mitocondrial son una fuente de ROS. Además, demostraron que la síntesis de ROS es controlada por la activación de PPAR- α por el CLA, ya que PPAR- α es necesario para la inducción de genes involucrados en la β - oxidación (Stachowska et al., 2008).

Un estudio muestra una mejora en la actividad bactericida y la síntesis de NO en macrófagos de ratones albinos suizos que fueron alimentados con 7 dosis de 5 mg de CLA por gramo de peso de ratón, al compararlo con ratones alimentados con dieta control. En el mismo estudio a otros ratones se les aplicó una dosis de hidrocortisona para inmunosuprimirlos sometiendo a unos a dieta control y a otros suplementándolos con CLA. Se observó mejor capacidad bactericida y síntesis de NO en los ratones suplementados con CLA

comparados con los que fueron alimentados con dieta control, incluso en los ratones en estado de inmunosupresión (Kumar et al., 2010).

Cho et al. (2008) estudiaron el efecto del isómero trans-10, cis-12-CLA en células polimorfonucleares (PMN) y PBMC de caninos al estimularlas con perlas de látex. Las PBMC estimuladas con perlas de látex y suplementadas con CLA aumentaron la producción de TNF- α en el sobrenadante de cultivo, Mismo que se utilizó para mejorar el estallido respiratorio y capacidad fagocítica de PMN. Se obtuvieron resultados muy similares en el estudio de Kang et al. (2007) donde utilizaron el mismo isómero de CLA y las mismas células pero de un modelo porcino. En este estudio buscaron los efectos de la expresión de PPAR- γ y observaron que el CLA logró estimular la producción de TNF- α en PBMC.

Todos estos resultados crean una controversia en cuanto a si el CLA actúa como antiinflamatorio o proinflamatorio, por lo cual creemos que es importante elucidar los efectos que tiene este ácido graso. Dado que el CLA se absorbe a nivel intestinal, creemos que sus efectos tendrán un mayor impacto en el sistema inmune de mucosas en el que está siendo captado y sobre el cual no existen muchos estudios.

Inmunidad Innata a Nivel Intestinal

Las principales funciones de la mucosa intestinal son la absorción de nutrientes y servir como barrera de protección para evitar la invasión y colonización de patógenos. Si el intestino se ve en peligro la mucosa tiene una reacción inmunológica controlada (Dwivedy y Aich, 2011; Rautava y Walker, 2008). Los movimientos peristálticos, el continuo lavado de la mucosa, el pH y algunas enzimas secretadas evitan que se adhieran posibles patógenos al epitelio (Aguilera et al., 2004).

Adicionales a las defensas no inmunológicas del intestino, los mamíferos cuentan con otras respuestas innatas contra patógenos, en las cuales se genera una respuesta mediada por el sistema inmune del organismo. El sistema

inmune innato del intestino se encarga de reconocer, eliminar o contener microorganismos. Para esto cuenta con barreras físicas como el epitelio de las mucosas, químicas como el nivel bajo de pH, tiene proteínas séricas como el complemento y proteínas de fase aguda así como barreras biológicas, es decir, la microbiota residente (Murphy et al., 2008). También cuenta con varias células efectoras que incluyen macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, dendríticas y células NK (Natural Killers) (Smith et al., 2005). Estas células tienen receptores de reconocimiento a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP'S) que son heredables, altamente especializados así como genética y evolutivamente conservados. Esto hace de la inmunidad de la mucosa la primer línea de defensa de los mamíferos (Dwivedy y Aich, 2011).

El intestino posee una gran cantidad de bacterias (hasta 10^{14}) con las cuales mantiene una relación de simbiosis (Aguilera et al., 2004). Esta microbiota protege a su hospedero de posibles invasiones ya que ocupa potenciales sitios de unión, compite por nutrientes y secreta sustancias bactericidas como productos de su metabolismo (Harrison y Maloy, 2011). Aparte de ser un nicho y proveedor de nutrientes, el hospedero controla cualquier reacción inmunológica que pueda tener contra otros microorganismos para proteger la salud de la microbiota y la integridad de los tejidos intestinales (Hooper y Macpherson, 2010). Sin embargo, la mayoría de los parásitos han desarrollado una gran capacidad para contrarrestar los mecanismos de defensa que el hospedador genera, provocando que los medicamentos disponibles no sean eficaces y pueden tener efectos adversos para el hospedador (Lujan, 2006).

Macrófagos y Dendríticas Intestinales: Función y Fenotipo

El censo de agentes patógenos a nivel intestinal por parte de las células del sistema inmune innato es crítico para la ejecución efectiva de la respuesta inmune adaptativa y la defensa del huésped. Existen subconjuntos específicos de células presentadoras de antígeno (APC), que incluye a las células

dendríticas así como a macrófagos, que expresan varios niveles de marcadores de superficie tales como CD11c, CD11b, F4/80, CD4, etc. y responden de manera diferente ante un estímulo (Denning et al., 2011).

La mucosa del tracto gastrointestinal contiene la mayor reserva de macrófagos en el cuerpo posicionados en la lámina propia donde reciben una gran cantidad de estímulos antigénicos. Los macrófagos intestinales se encargan de proteger a la mucosa contra daños provocados por patógenos así como de la eliminación de células muertas y desechos celulares (Smith et al., 2005). Si un patógeno llega a romper la barrera del epitelio intestinal, el macrófago lo elimina rápidamente a través de proteínas anti-microbianas y ROS. Sin embargo, hay patógenos que logran evadir el ataque de los macrófagos, lo que les permite escapar del lumen intestinal o permanecer sin ser atacados (Hooper y Macpherson, 2010).

Debido a que la mucosa se encuentra en constante contacto con antígenos luminales, se esperaría que estuviera siempre en un estado de inflamación, pero no es el caso. Los macrófagos residentes del intestino, a diferencia de los que se encuentran en los otros tejidos, no funcionan como células presentadoras de antígeno ni activan a células T vírgenes. El mecanismo de defensa que ellos utilizan es por medio de su gran capacidad fagocítica y actividad bactericida evitando así la invasión de patógenos sin la secreción de citocinas pro-inflamatorias (Schenk y Mueller, 2008). Esto probablemente se deba a que la célula efectora se adaptó a la alta carga bacteriana en el intestino y cambió su plan de ataque para evitar respuestas inflamatorias en condiciones normales (Hooper y Macpherson, 2010). Los macrófagos intestinales expresan una gama de receptores que les permiten distinguir entre lo propio y los microorganismos. Tales como son, MHC-II y algunos TLRs 3-9 (receptores tipo toll) que reconocen patrones conservados en algunos patógenos como el lipopolisacárido y ácido lipoteicoico de las superficies de las bacterias Gram- y Gram +, ARN de cadena sencilla, fragmentos de ADN y flagelina. También expresan receptores para lipoproteína y fosfolípidos en células apoptóticas (CD36) y C5aR para el componente 5a para la quimiotaxis y fagocitosis de

bacterias, así como el marcador F4/80 que se cree está involucrado en la inmuno tolerancia. A pesar de generar una respuesta inmune innata en el intestino, estos macrófagos no son capaces de dar inicio a la respuesta inmune adaptativa ya que carecen de los receptores para IgA e IgG (Fc) que ayudan a la integración de estos dos mecanismos de defensa (Smith et al., 2011; Lin et al., 2010).

Las células dendríticas (DC) son las únicas células capaces de conectar la respuesta inmune innata y adaptativa al activar a los linfocitos T vírgenes. Las DC del intestino pueden inducir una respuesta inmune contra microorganismos infecciosos, pero son capaces de tolerar las bacterias comensales así como a alimentos y auto-antígenos. Las DC pertenecientes a la lámina propia son capaces de extender sus dendritas a través de la capa epitelial hacia el lumen para buscar agentes infecciosos que después serán presentados a los linfocitos. Esta captación y procesamiento del antígeno se lleva a cabo en un medio poco dañino para el tejido ya que al igual que los macrófagos las células dendríticas secretan citocinas antiinflamatorias como IL-10 e IFN- β (Iwasaki, 2007).

Las DC intestinales producen y responden a quimiocinas ya que poseen receptores como CCR1, CCR5, CCR6, CCR7 y CCR9 que les permite captar a las quimiocinas que se secretan constantemente en la mucosa para poder migrar de la mucosa a los órganos linfoides. Existen poblaciones CD11b y CD8 α , y expresan TLRs 2 y 4 así como MHC-II. A pesar de su naturaleza antiinflamatoria se cree que las células dendríticas intestinales son capaces de producir una respuesta inmune adaptativa, aunque la función de presentación de antígeno se cree que está disminuida en comparación con los otros tipos de células dendríticas (Iwasaki, 2007; Meza; 2009).

Existe una nueva clasificación realizada por Chang et al., (2014), que por medio de una revisión bibliográfica, logra clasificar a las poblaciones de células de intestino en: MHCII^{high}/CD11c^{high} como células dendríticas y a la población MHCII^{low}/CD11c^{low} como macrófagos en el intestino delgado. En la tabla 1 se muestra el fenotipo de estas poblaciones celulares según Chang et al., (2014).

Tabla 1: Fenotipo de las poblaciones de células dendríticas y macrófagos de intestino delgado (adaptada de Chang et al., 2014).

MHCII hi/CD11c hi: células dendríticas				MHCII low/CD11c low: macrófagos		
Siglec H⁺ CD11b⁻	CD103 ⁺ CD11b ⁻	CD103 ⁺ CD11b ⁺	CX3CR1 ⁺ CD11b ⁺ F4/80 ⁺ F480 ⁻	CX3CR1 ⁺ CD11b ⁺ F4/80 ⁺	Siglec F ⁺ CD11b ⁺ F4/80 ⁺	CCR2 ⁺ CD11b ⁺

Reclutamiento de Monocitos a la Mucosa y su Función

Ya que los macrófagos y células dendríticas residentes del intestino carecen de algunos receptores claves para poder montar la respuesta inmune contra un antígeno, la mucosa intestinal se encarga de reclutar células que si tienen la capacidad de reconocerlo y atacarlo. Los monocitos son células efectoras del sistema inmune que se originan en la médula ósea y pasan a circulación. El monocito circulante está equipado con receptores de quimiocinas y de adhesión que son necesarios para su migración de la sangre a tejidos infectados. Además producen citocinas proinflamatorias, expresan CD14⁺, receptores Fc y TLRs que son necesarios en un evento de inflamación/infección (Smith et al., 2011; Geissmann et al., 2010).

Aún se estudian los mecanismos del reclutamiento de monocitos circulantes a la lámina propia del intestino. Se ha identificado al factor de crecimiento transformante β (TGF- β) e IL-8 como uno de los causantes. En una mucosa inflamada estas moléculas son producidas constantemente por las células epiteliales y mastocitos que las liberan a la matriz extracelular ejerciendo una fuerte acción de quimiotaxis sobre los monocitos circulantes. Estos nuevos reclutas se encargan de unir a la respuesta inmune innata y adaptativa ya que son los que cuentan con los receptores necesarios para esta acción (Smith et al., 2011; Smith et al., 2005).

Durante un proceso de reclutamiento por inflamación, el monocito es capaz de diferenciarse en macrófago o en célula dendrítica dependiendo del

microambiente en el que esté la célula. Si el monocito se convierte en una célula dendrítica bajo estas condiciones tendrá propiedades proinflamatorias y será capaz de llevar a cabo la presentación del antígeno a células T vírgenes, uniendo así la respuesta inmune innata y adaptativa. En el caso de un reclutamiento en homeostasis las dendríticas se encargan de mantener este estado al producir citocinas antiinflamatorias (Geissmann et al., 2010; Denning et al., 2007).

El monocito puede convertirse en macrófago de tipo M1 o M2 dependiendo de la necesidad del tejido. Los macrófagos M1 son efectores proinflamatorios con una gran capacidad microbicida, producen IL-12, son activados por el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e IFN- γ y muestran un fenotipo tipo Th1. En el caso de reclutamiento de monocitos a intestino sano se obtienen macrófagos M2, con fenotipo Th2, que ayudan en la desinflamación y curación del tejido. Bajo estas circunstancias el monocito aumenta su contenido de enzimas lisosomales e hidrolíticas, así como el tamaño y número de mitocondrias que son requisito para poder convertirse en macrófagos intestinales bien diferenciados (Schenk y Mueller 2008; Duque y Rojas, 2007).

Giardiasis.

Puesto que la mayoría de los estudios relacionados con los efectos del CLA en el sistema inmune se han realizado en sujetos sanos, falta información sobre cómo actúa el CLA durante una infección. En el presente trabajo se utilizó un modelo de infección intestinal por *Giardia lamblia* en ratones. Esto nos permitió evaluar de manera sensible cómo modula el CLA la respuesta inmune innata en el organismo infectado. La giardiasis es una infección que afecta a humanos y otros vertebrados y puede transmitirse por la ingestión de agua y comida contaminada con quistes, o por contacto con superficies y fómites contaminados. Esta infección se propaga cuando el protozoario *G. lamblia* se encuentra en la etapa de quiste que posteriormente se desenquista en

trofozoíto y coloniza la porción duodeno-yeyuno del intestino delgado, causando así la giardiasis (Adam, 2001). Las manifestaciones por giardiasis en humanos varían desde una infección asintomática a la enfermedad aguda o crónica (Lujan, 2006). Los síntomas como diarrea, náusea, dolor abdominal, pérdida de peso, etc., también son señales de otras enfermedades gastrointestinales. (Buret, 2005; Roxström-Lindquist et al., 2005). Hay hospederos inmunocompetentes capaces de controlar la infección (Li et al., 2004). Algunos factores que contribuyen a la defensa del hospedero son: el número de quistes ingeridos, la edad del individuo y el estado de su sistema inmune al momento de la infección (Faubert, 2000). Existen hospederos, principalmente niños y adultos mayores que no son capaces de eliminar al parásito por sí mismos, requieren tratamiento con metronidazol y otros nitromidazoles cuyos principios activos no son muy eficaces. Esta terapia contra la giardiasis puede presentar algunos efectos secundarios; además se han registrado cepas resistentes a estos medicamentos, facilitando la re-infección (Müller et al., 2007; Lujan, 2006).

Hospederos y Patogenia.

Actualmente el género *Giardia* está compuesto por seis especies distintas, diferenciadas por sus características morfológicas y por los hospederos que son capaces de infectar (Tabla 2) (Smith y Paget, 2007). Por ser un parásito, *G. lamblia* debe competir por el nicho biológico que comparte con las células residentes y al mismo tiempo desarrollar un mecanismo de supervivencia dinámico. Al internalizar L-arginina para obtener energía disminuyendo la producción de NO por el sistema inmune del hospedero, el trofozoíto logra extender su tiempo de vida y aumenta la probabilidad de proliferar a un nuevo hospedero. Se están realizando más estudios para ampliar el conocimiento sobre la interacción parásito-hospedero (Rópolo y Touz, 2010). En cuanto a la patogenia e infección de *G. lamblia* se han presentado resultados

contradictorios. Hay autores que describen una afección en las microvellosidades del intestino en algunos modelos murinos, que afectan la actividad de enzimas digestivas (Smith y Paget, 2007; Scott et al., 2004). Este fenómeno puede ser causado por la fuerza de succión generada por el trofozoíto para adherirse al epitelio, deteriorando la microvellosidad del intestino. Incluso es posible que el mismo parásito genere una barrera física entre el epitelio y el lumen, aumentando así la permeabilidad intestinal y el daño a la flora nativa del hospedero (Faubert, 2000). Por el contrario, en algunos estudios con animales y humanos infectados, no fue posible observar tales fisiopatologías ni respuesta inflamatoria. Es posible que esta controversia tenga origen en el uso de distintos modelos de investigación y las diferencias en la respuesta que montan cada uno contra la infección, las dosis de quistes administradas, etc. (Dressen et al., 2012; Roxström-Lindquist et al., 2006).

Tabla 2: Hospederos para las diferentes especies del género *Giardia* (adaptada de Smith y Paget, 2007).

Especie	Hospedero(s)
<i>G. duodenalis</i>	amplia gama de mamíferos, incluidas mascotas y humanos
<i>G. muris</i>	Ratón
<i>G. microti</i>	Rata almizclera y topillo
<i>G. psittaci</i>	Periquitos
<i>G. ardeae</i>	Garza
<i>G. agilis</i>	Rana

Respuesta Inmune

Los trofozoítos pertenecientes al género *Giardia* se encuentran recubiertos de una proteína de superficie que el hospedero reconoce como antígeno, lo que le permite dar inicio a la respuesta inmune. A estas proteínas se les conoce como

proteínas variables de superficie o VSP (Lujan, 2006; Vinayark et al., 1989). Existen alrededor de 200 genes que codifican estas proteínas, pero el parásito solo es capaz de expresar uno de estos. Sin embargo el trofozoíto puede cambiar su VSP de manera espontánea, acción que probablemente le permita evadir las defensas del hospedero al cambiar la especificidad de su antígeno (Prucca y Lujan, 2009). Por el contrario, hay estudios que prueban que el cambio en el VSP del protozoario favorece una endosimbiosis con algunas bacterias de la flora intestinal, las cuales son capaces de estimular a las células de Paneth y a su secreción de defensinas (El-Shewy y Eid, 2004).

La giardiasis puede ser controlada tanto por el mecanismo de respuesta innata, como por la respuesta inmune adaptativa. En el caso de la primera los trofozoítos son atacados, por el humano, a través de defensinas y lactoferrinas, que son importantes péptidos antimicrobianos secretados por el epitelio intestinal. Aunque las células del sistema inmune innato son las que realizan la principal función contra el parásito (Smith y Paget, 2007; Roxtröm-Lindquist et al., 2006).

Los macrófagos tienen un rol importante en la defensa del hospedero, ya que son capaces de fagocitar al trofozoíto (Owen et al., 1981). También se ha estudiado el daño que pueden causar las ROS y el NO a *G. lamblia*. Por ejemplo hay estudios que demuestran que NO puede inhibir el crecimiento, enquistamiento y desenquistamiento pero no tiene efecto en la viabilidad del parásito (Roxtröm-Lindquist et al., 2006). Otros autores afirman que el trofozoíto puede disminuir la producción de NO ya que se alimenta de L-arginina, aminoácido necesario para la producción de NO (Rópolo y Touz, 2010). No obstante se clasifica al NO como un mecanismo de defensa del hospedero contra la giardiasis (Mokrzycka et al., 2010).

Las células dendríticas junto con la IL-6 también han demostrado ser necesarias para la erradicación de la infección por *G. lamblia*, en un estudio realizado por Kamda et al. (2012). Utilizando ratones deficientes de IL-6 se realizó una transfección de células dendríticas a las que se les dio un pulso de extracto de la cepa GS(M)/H7 de *G. lamblia*. Dos semanas después se infectó a

los ratones con la misma cepa y se sacrificaron 5 días post-infección encontrando una disminución del 70% de la carga parasitaria en ratones con células dendríticas pulsadas en comparación con ratones a los que solo se les inyectó el extracto de *G. lamblia*.

En la respuesta inmune adaptativa contra giardiasis, se ven involucrados tanto la parte humoral como la celular de la respuesta. La infección con *G. lamblia* en humanos y *G. muris* en ratones, conlleva la producción de anticuerpos específicos en mucosa y suero contra el parásito. En el caso específico de los recién nacidos, la madre es capaz de donarle IgA contra *Giardia* al infante a través de la leche materna, asegurando su protección durante la infancia temprana (Roxtröm-Lindquist et al., 2006; Faubert, 2000). Los linfocitos T CD4+ son responsables de la producción de citocinas necesarias para el reclutamiento de más células al sitio de infección, potenciando las respuestas defensivas (Pavanelli et al., 2010).

Utilización de Modelo Murino para el Estudio de Giardiasis

La mayoría de los estudios sobre giardiasis se han llevado a cabo en modelos murinos para analizar, con mayor facilidad, la patología y respuesta inmune hacia el parásito. Los ratones poseen muchas similitudes en el funcionamiento de su sistema inmune, con respecto al del humano. Esto se refleja en los estudios de la secuenciación y comparación de los genes de ambas especies (Mestas y Hughes, 2004).

Una ventaja en el uso del ratón para el estudio de la giardiasis, es que su respuesta contra la infección es similar a la del humano (Prucca 2011). Dado que el ratón ha sido usado en muchos modelos de infección, su sistema inmune está bien caracterizado y existen muchos reactivos específicos para él, facilitando su estudio (Velázquez et al., 2005).

Los elementos de la inmunidad innata como las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-6 e IL-1 que se activan en la respuesta inmune del hospedero como el

ratón, contra una infección ocasionada por *G. lamblia*, son los que la bibliografía ha mostrado evidencia que el CLA puede potenciar. A pesar de la controversia en cuanto al resultado final del uso de CLA como inmuno-modulador, creemos que ante un reto de infección se observará un efecto benéfico contra el patógeno, ya que el organismo infectado utilizará todos los nutrientes, incluido el CLA para potenciar sus mecanismos de defensa.

III. HIPÓTESIS

El CLA mejora las proporciones de las poblaciones de las células presentadoras de antígeno de intestino promoviendo sus funciones y la respuesta inmune innata contra la infección de *Giardia lamblia* en ratones *C3H/HeN*.

IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos inmuno-moduladores del ácido linoleico conjugado en las poblaciones de células presentadoras de antígeno intestinales en ratones *C3H/HeN* infectados con *Giardia lamblia*.

Objetivos Específicos

Establecer y caracterizar el modelo de infección de *Giardia lamblia* en ratones *C3H/HeN*

Evaluar el efecto del CLA sobre el fenotipo y porcentajes de células presentadoras de antígeno (macrófagos y células dendríticas) de intestino de ratones *C3H/HeN* infectados con *G. lamblia*.

Evaluar el efecto del CLA sobre la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF- α) en intestino de ratones *C3H/HeN* infectados con *G. lamblia*.

Observar los parámetros inmunológicos en función de la carga parasitaria, el peso y los cambios a la mucosa intestinal en ratones *C3H/HeN* suplementados con CLA e infectados con *G. lamblia*.

V. MÉTODOS

Diseño Experimental

Para evaluar los efectos de inmuno-modulación del CLA sobre la respuesta innata contra la giardiasis, se planteó la evaluación de la mezcla de 50:50 de cis-9, trans-11-CLA y trans-10, cis-12-CLA en un bioensayo de dos semanas. En este bioensayo se utilizaron 44 ratones de 10-13 semanas. Se asignaron 22 ratones, a cada tratamiento (Tabla 3). La suplementación se realizó 3 días pre-infección y 1 post-infección. Se sacrificaron 5 ratones de cada tratamiento a los 0, 2, 6 y 8 días.

Tabla 3: Grupos experimentales y sus tratamientos

Grupo Experimental	Tratamiento	Infección Experimental
I	placebo	Infectados
II	cis-9,trans-11-CLA y trans-10,cis-12CLA (mezcla 50:50)	Infectados

Unidades Experimentales

Animales de 6-7 semanas, cepa *C3H/HeN* fueron adquiridos en Harlan (Bar Harbor, ME, USA). Los animales se mantuvieron en condiciones de bioterio con temperatura, humedad controlada y 12 horas de fotoperiodo, siguiendo los lineamientos del Comité de Ética institucional para el manejo y cuidado de animales.

Dietas

Los animales recibieron la dieta de formulación comercial Global Diet (Harlan Teklad, Madison, WI) que cubre sus requerimientos de nutrientes para su crecimiento óptimo durante el bioensayo. El agua y la dieta estériles fueron suministradas *ad libitum* y los tratamientos se dividieron en 2 grupos: un grupo recibió diariamente por sonda oral, 0.6 mL (50 mg/día) de ácido linoleico conjugado (94% de CLA: cis-9, trans-11 y trans-10,cis-12, mezcla 50:50) amablemente proporcionado por el Dr. Keizer Hiskias de la compañía Stepan-Lipid Nutrition (Wormeer, The Nertherlands), así como 1 grupo experimental asignado al control o placebo sin CLA. La suplementación se hizo durante 2 semanas.

Inducción de Infección

Los animales se infectaron con 5×10^6 trofozoitos de *G. lamblia* clona GS/M-83-H7 (proporcionados el Dr. Humberto Astiazarán) usando una jeringa estéril de alimentación para inoculación perioral. El inóculo de *G. lamblia* se preparó lavando trofozoitos cultivados in vitro, con PBS frío y estéril, y se

resuspendieron en 200 μ L de PBS estéril. Se indujo una infección primaria de 0-8 días para la respuesta de macrófagos y células dendríticas.

Obtención de Tejidos para Análisis Histológicos

Se realizó la eutanasia de los animales por métodos humanitarios y de acuerdo a los lineamientos del Comité de Ética institucional. Se removió el intestino delgado para obtener cortes de 1.5 cm de tejido correspondiente duodeno, los cuales fueron fijados en formaldehído al 10%. Se tiñeron con hematoxilina-eosina 6 secciones en parafina de cada ratón en los grupos con la suplementación y control, usando técnicas de tinción estándar y la asesoría del patólogo Dr. López Cervantes. La evaluación de los cambios en la arquitectura del epitelio intestinal y el infiltrado inflamatorio fue realizada por el Dr. López Cervantes.

Conteo de Trofozoítos y Obtención de Lavado Intestinal

Se evaluó la carga de trofozoítos en lavado intestinal, a los 0, 2, 6 y 8 días post infección, por medio de una incubación del tejido intestinal por una hora a 4°C en PBS estéril y frío, posteriormente se centrifugó (Benchtop centrifuge, Beckman coulter cat. 366816) la solución a 1663 g por 8 minutos y este lavado intestinal (sobrenadante) se congeló a -80°C. El pellet con los trofozoítos se resuspendió y se realizó el conteo en una cámara de Neubauer colocando 10 μ L de la suspensión y se contaron los trofozoítos en los cuatro cuadrantes de las esquinas, la suma se dividió en 4 y el promedio se multiplicó por 100,000 para obtener la carga parasitaria por mL.

Obtención de Células Presentadoras de Antígeno Intestinales

Se utilizó un protocolo modificado de Drakes et al. (2004). De los ratones sacrificados se extrajo el intestino delgado y se cortó en 4 partes iguales, lavando con 15 mL de solución salina balanceada de Hank sin calcio y sin magnesio (HBSS) a 4°C a la que se adicionó 0.5% de penicilina/estreptomicina (10 mg/mL) y 0.4% de amfotericina B (250 µg/ml). Posteriormente se extrajeron las Placas de Peyer presentes en el tejido, se contaron para llevar un registro de las mismas, y se abrió longitudinalmente el tejido lavándose con 20 mL de la solución HBSS con antibióticos, por medio de agitación en un tubo de 50 mL.

Se cortó el intestino en trozos de aproximadamente 1 cm y se lavó 3 veces el tejido en 15 mL de la solución HBSS con los antibióticos más 20 mM de EDTA y 2% de suero fetal bovino a 37°C en un rotador por 15 minutos. Después del tercer lavado el tejido se dejó reposar en un tubo con 15 mL de medio RPMI suplementado con 0.5% de penicilina/estreptomicina (10 mg/mL), 0.4% de amfotericina B (250 µg/ml), 0.2% de gentamicina (160 mg/mL), 1% de piruvato de sodio (100 mM), 20 mM de Hepes y 5% de suero fetal bovino para lavar el exceso de EDTA.

Posteriormente el tejido se cortó en trozos de medio centímetro y se colocó en un matraz con 25 mL de medio RPMI suplementado como se mencionó anteriormente y con 42.5µL de colagenasa (100 µg/mL) y 50 µL de DNAsa (0.5 mg/mL) dejándose incubar por 1.5 horas a 37°C y 150 rpm en un agitador orbital. Se procedió a filtrar el contenido con tela de organza descartando el tejido y el filtrado que contiene a las células se centrifugó a 329 g por 8 minutos a 15°C, se decantó y al pellet se le agregaron 5 mL de medio RPMI con antibióticos, Hepes y suero fetal bovino como se explicó arriba y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones. Se resuspendió el pellet de células en 3 mL del mismo medio y se contaron las células viables con una dilución 1:10 de azul de tripán al 0.4%.

Caracterización Fenotípica por Citometría de Flujo

Para hacer el marcaje de las células con los anticuerpos de interés estas se centrifugaron a 329 g por 8 minutos a 15°C para retirar el medio y se lavó el pellet celular con 6 mL de PBA (PBS 1X más 0.01% de albúmina) y se centrifugó a 447 g por 7 minutos y se resuspendió en PBA ajustando el volumen para tener 3×10^5 células. Las células se marcaron con los anticuerpos anti ratón F4/80-Alexa Fluor 488 clona BM8, MHC II-PE-Cyanine5 clona NIMR-4, CD206-Alexa Fluor 647 clona MR5D3, CD11c- PE-Cyanine7 clona N418, y CD103-(Integrin alpha E) PE clona 2E7; conjugados a fluorocromos, (BD Biosciences, Pharmingen). El análisis se realizó en un citómetro de flujo FACSCanto II™ (BD Biosciences). El análisis de datos se llevó a cabo utilizando el programa FACSDiva y la edición de imágenes con el programa Inkscape versión 0.48.5 y el programa GIMP versión 2.8.

Cuantificación de Citocinas por ELISA

Se cuantificaron IL-1, IL-6, IL-8 y TNF α en lavados intestinales mediante ELISA. Para ello, se utilizaron kits de detección de ELISA Cytosets (eBioscience) y se siguieron las instrucciones del fabricante.

Análisis de Datos

Se realizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x4, donde el primer factor corresponde a la suplementación o no suplementación de CLA y el segundo factor corresponde a los tiempos de sacrificio que fueron 4. El análisis estadístico se llevó a cabo con un ANOVA GLM y prueba de Tukey para

comparación de medias usando un nivel de significancia de $p < 0.05$. Estas pruebas se realizaron con el paquete estadístico NCSS versión 8.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento de la Infección con *Giardia lamblia*.

Existen trabajos con *G. lamblia* en diferentes cepas de ratón que son sensibles a este parásito, pero no se encuentran disponibles para el país. Tampoco existen trabajos sobre la respuesta inmune innata contra giardiasis, se desconocía completamente el comportamiento de la infección en las primeras horas y días por lo que fue primordial realizar la cinética de infección con nuestra cepa de ratón.

Se realizó un ensayo con 35 ratones machos *C3H/HeN* de 7-8 semanas los cuales se inocularon con 5×10^6 trofozoitos de *G. lamblia*. La infección se prolongó hasta 22 días haciendo conteo de trofozoitos a las 0, 6, 12, 24 y 48 horas, y a los 6, 8, 15 y 22 días trabajando con 2 ratones por tiempo. En la figura 1 se muestra la cinética de infección de los ratones a lo largo del ensayo. En nuestro modelo de estudio se mantuvo la infección hasta los 22 días probando ser un buen modelo tanto para la parte innata como adaptativa de la respuesta inmune contra *G. lamblia*. En lo correspondiente a este estudio que es la respuesta innata a la infección, se observó un pico de infección a los 6 días con un conteo de trofozoitos promedio de 5.5×10^5 . Un trabajo realizado por Velazquez et al. (2005) donde llevaron a cabo una infección por 6 semanas, con la misma carga parasitaria, a ratones *C3H/HeJ* observaron un pico de infección a los 14 días con 2.5×10^5 trofozoitos. Esto indica que nuestro modelo de estudio es capaz de infectarse con nuestra cepa de ratón.

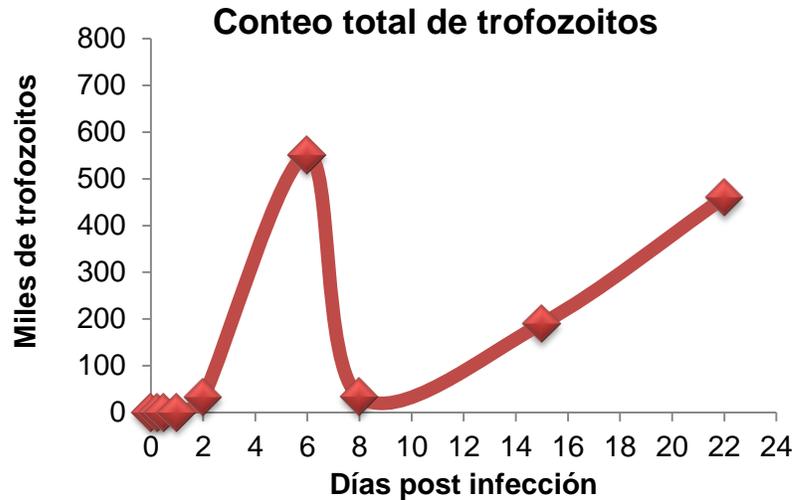


Figura 1: Cinética de conteo total de trofozoitos. Establecimiento de la infección por *G. lamblia* en ratones C3H/HeN.

Cinética de Infección por Conteo de Trofozoitos en Lavado de Intestino

Para conocer el efecto de la suplementación con CLA sobre la cinética de la infección, se realizó un ensayo con 44 ratones machos C3H/HeN de 10-13 semanas. Los ratones se dividieron en dos grupos de 22, uno de ellos recibió el tratamiento de 50 mg/ml de CLA, mientras que el grupo control recibió 60µl de PBS 1x. Los ratones de cada grupo se suplementaron con su respectivo tratamiento, tres días previos a la infección. El día de la infección, ambos grupos se inocularon con 5×10^6 trofozoitos de *G. lamblia*. La infección se monitoreó durante 8 días haciendo conteo de trofozoitos a los 0, 6 y 8 días. En la figura 2 se muestra la cinética de infección de los ratones durante el ensayo.

Se observó un pico máximo de infección al día 6 en el grupo control, con una media de 1.6×10^5 de trofozoitos. En cambio, el grupo que recibió CLA, el conteo de trofozoitos del día 6 post-infección fue significativamente menor ($p < 0.05$) con total de 5×10^4 trofozoitos (SD=35714). Un resultado similar se obtuvo en el trabajo de Franco et al. (2013) que trabajaron con hembras de ratón *C75BL/6* las cuales fueron alimentadas 7 días con yogur búlgaro (Kéfir). Posteriormente infectaron a los ratones con 4×10^7 trofozoitos de *G. intestinalis* y

sacrificaron a los ratones a los días 2 y 7 post-infección. Al día 7 post-infección, encontraron que los ratones tratados con probióticos tenían menor carga parasitaria (4×10^3 trofozoitos) que el control (2.8×10^4 de trofozoitos) ($p < 0.05$). Si bien en nuestro estudio el conteo de trofozoitos fue mayor, las diferencias pueden deberse a que se utilizaron cepas y sexos diferentes de ratones.

El grupo suplementado con CLA no mostró diferencias significativas en el número de trofozoitos en ninguno de los tiempos post-infección estudiados. Estos resultados sugieren que el tratamiento con CLA evita el aumento de la carga parasitaria en el intestino.

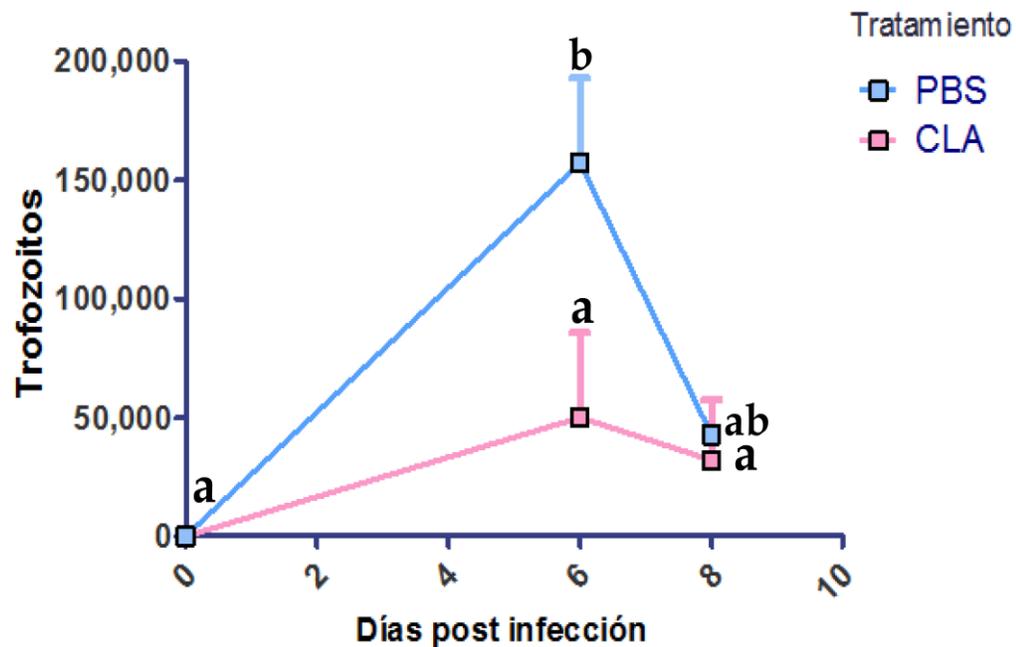


Figura 2: Cinética de infección por *G. lamblia*. Cada tiempo representa el conteo de trofozoitos en lavado de intestino de cuatro ratones *C3H/HeN* suplementados con CLA (pentágono) y PBS (rectángulo). Letras distintas indican diferencia estadística $p < 0.05$.

Análisis de Citometría

Se realizó la evaluación fenotípica, tanto en intestino como en placas de Peyer, con marcaje múltiple de las poblaciones de células APC a los 0, 2, 6 y 8 días de

infección (4 ratones por tiempo) para ver la evolución de la respuesta inmune innata en el ratón infectado con *Giardia*. Se adquirieron las células de intestino y de placas de Peyer, y se separaron con base en su tamaño y complejidad. Posteriormente se eliminaron los dobletes presentes, por medio de la altura y área de las células que se adquirieron, y así poder seleccionar el grupo de poblaciones celulares de interés (Fig. 3a). Las poblaciones seleccionadas fueron clasificadas con una base de marcaje (MHCII / CD11c) que son receptores presentes en las APC y que nos permitieron distinguir estas poblaciones de los linfocitos presentes en el tejido (fig. 3b).

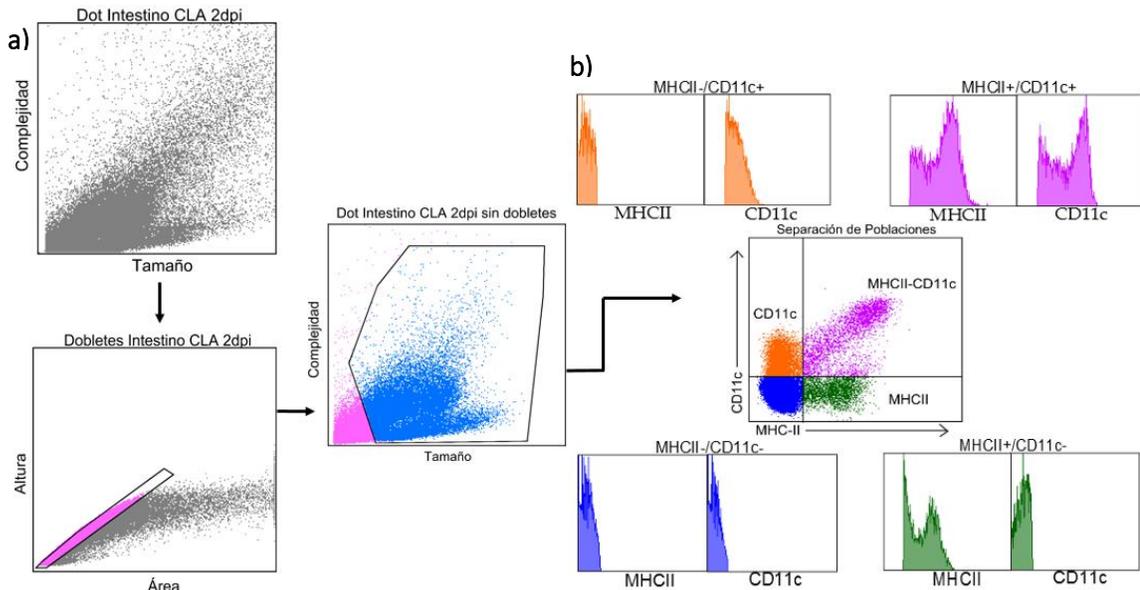


Figura 3: Diseño de marcaje para distinción de poblaciones celulares. a) Obtención de las células, eliminación de dobletes y clasificación por tamaño y complejidad. b) Base de marcaje MHCII / CD11c para la obtención de las diferentes poblaciones de APC y linfocitos.

La población que es MHCII- / CD11c+ consideramos está compuesta por precursores de células dendríticas, como lo demuestra del Hoyo et al. (2002) al estudiar células dendríticas de sangre, así como Wang et al. (2006) que estudió células de pulmón durante una infección respiratoria viral. En ambos trabajos se realizó una clasificación con varios marcadores, funcionalidad y morfología de

las células, concluyendo que las células que son sólo positivas a CD11c son precursoras de células dendríticas, es decir, células que aún no se diferencian en DC. Discuten que estas células no son especializadas en la presentación de antígeno por la falta de expresión de MHCII. En el caso del trabajo realizado por Wang et al. (2006), la población celular MHCII- / CD11c+ disminuyen durante el proceso de infección.

En nuestro diseño de marcaje se pueden observar 3 poblaciones: MHCII+ / CD11c+ y MHCII- / CD11c+ y MHCII+ / CD11c- (fig. 4a). En la población MHCII+ / CD11c+, pueden incluirse tanto macrófagos como dendríticas, de acuerdo con una revisión realizada por Pabst y Bernhardt (2010), donde discuten que ambos marcadores pueden estar presentes en los dos tipos de APC en lámina propia.

La población que sólo fue positiva a MHCII presenta en su mayoría linfocitos, los cuales juegan su principal papel en la respuesta inmune adaptativa por lo que fueron excluidas del análisis. De las poblaciones seleccionadas, se midieron otros marcadores que ayudan a clasificar a las células de acuerdo con su función: CD103, CD206 y F4/80 (fig. 4b).

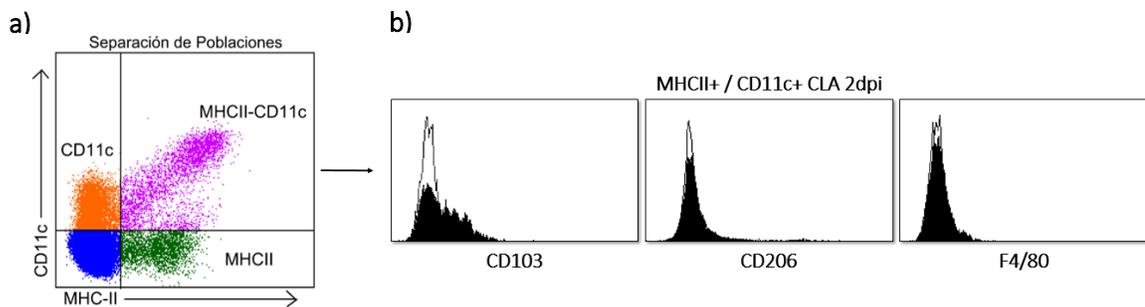


Figura 4: Marcaje con otros receptores. a) Separación de las diferentes poblaciones celulares. b) Ejemplo de marcaje para la población MHCII+/CD11c+, CD103, CD206 Y F4/80. Histogramas con fondo blanco corresponden a las células con doble marcaje, histogramas con fondo negro corresponden a las células con marcaje doble más el receptor de interés.

Gracias a la nueva clasificación de células de intestino, realizada por Chang et al., (2014), nos fue posible distinguir entre células dendríticas (DC) y

macrófagos de intestino (fig. 5). A estas poblaciones también se les realizó el marcaje con los receptores de membrana mencionados anteriormente.

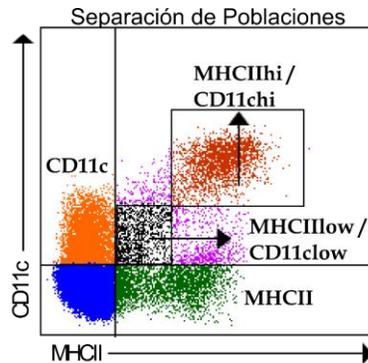


Figura 5. Clasificación de poblaciones celulares (según Chang et al., 2014). La población MHCII^{high} / CD11c^{high} son células dendríticas y a la población MHCII^{low} / CD11c^{low} son macrófagos en el intestino delgado de ratón.

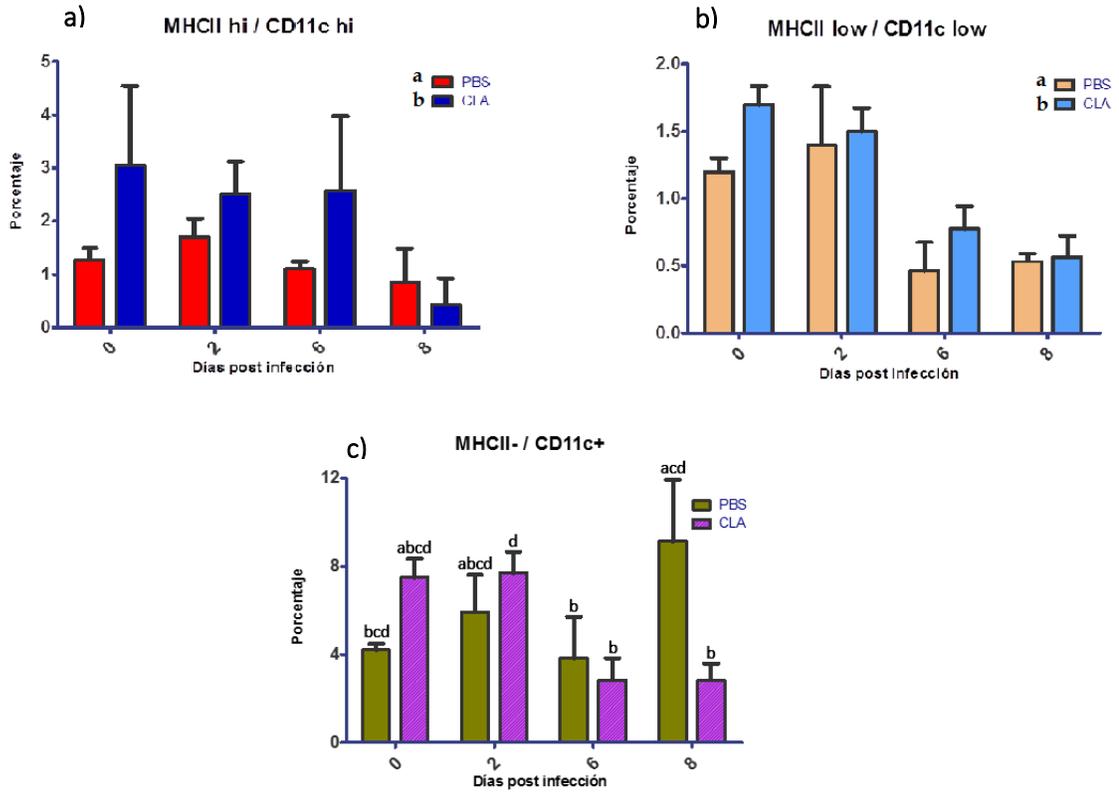
En la figura 6 se muestra el porcentaje de expresión de las poblaciones celulares elegidas de todo el complejo de células tanto para intestino como para placas de Peyer. En la figura 6a correspondiente a células dendríticas (MHCII^{hi}/CD11c^{hi}) de intestino se observa un mayor porcentaje de células para los ratones suplementados con CLA, comparando con el grupo control. Esto se observa desde el tiempo cero que corresponde a los ratones no infectados, lo cual puede servir de manera iniciar de forma más temprana la respuesta inmune cuando éste se ve ante un reto inmunológico, promoviendo una acción más eficiente.

Para el caso de los macrófagos (MHCII^{low}/CD11c^{low}) presentes en intestino (fig. 6b), también se observó un mayor porcentaje de estas células para el grupo de CLA. Ya que estos son macrófagos del tipo antiinflamatorios, podemos asumir que en el intestino de ratones suplementados con CLA, hay una mayor regulación en la respuesta del sistema inmune contra *G. lamblia*.

Los porcentajes de células CD11c+ presentan un comportamiento similar (fig. 6c), en donde podemos observar que en el grupo de CLA disminuye ésta población celular a los 6 y 8 días de infección. En el grupo de PBS hay un

aumento del día 6 al día 8. Esto puede ser debido a que se llevó a cabo un reclutamiento de células debido al aumento en la carga parasitaria el día 6. En placas de Peyer, se observa el mismo patrón de aumento de porcentaje de células CD11c+ durante la infección, el grupo de CLA mantiene su patrón preventivo en la población de APC (fig. 6d). Esto nos indica que al estar el tejido preparado con más células para actuar de manera rápida ante un peligro, no hay necesidad de reclutar más células a los tejidos. En nuestro grupo control disminuye la población celular del día 0 al 6, aumentando en el día 8 como consecuencia de un reclutamiento para responder al aumento de la carga parasitaria. En la población CD11c+ (fig. 6f) no observamos cambio en el grupo de CLA durante la infección, pero en PBS se observa un aumento al día 2 de infección y este disminuye en los días posteriores lo que puede indicar una necesidad en la maduración de estas células para que lleven a cabo la presentación del antígeno.

Poblaciones celulares de intestino



Poblaciones celulares de placas de Peyer

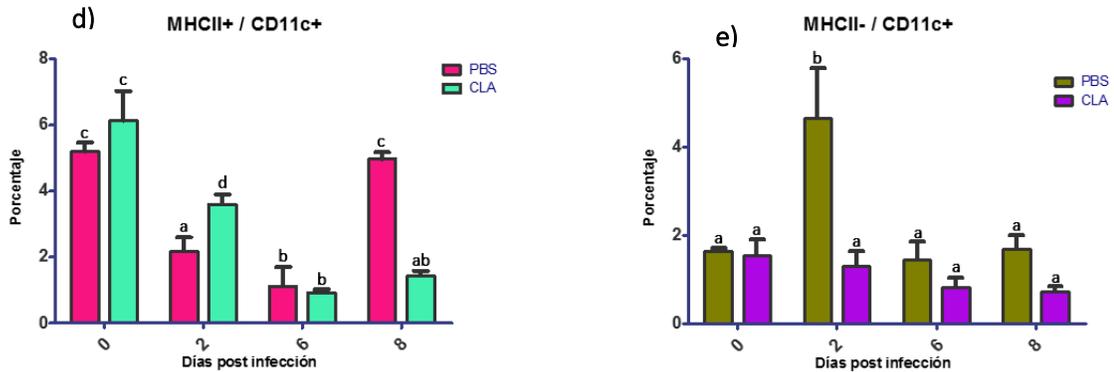


Figura 6: Porcentaje de marcaje en las distintas poblaciones celulares de ratones suplementados. a) Porcentaje de la población MHCII^{hi}/CD11c^{hi} en intestino. b) Porcentaje de MHCII^{low}/CD11c^{low} en intestino. c) porcentaje de la población MHCII⁻/CD11c⁺ en intestino. d) Porcentaje de MHCII⁺/CD11c⁺ en placas de Peyer. e) Porcentaje de MHCII⁻/CD11c⁺ en placas de Peyer. n=4 ratones. Letras distintas indican diferencia estadística p<0.05.

En la figura 7 se observa los porcentajes así como el número de receptores de membrana por célula (determinada por la cuantificación de la intensidad media de fluorescencia o IMF) de los distintos marcadores en la población MHCII^{hi} / CD11c^{hi}, correspondiente a células dendríticas para intestino. En el caso de CD103 (fig. 7a), se observa un mayor porcentaje de este tipo de células en el grupo de CLA a los tiempos 0 y 2 post-infección, y una disminución a los 6 días. Esta población celular es clasificada como células dendríticas de la lámina propia, las cuales están directamente relacionadas con la diferenciación de células T vírgenes a células T reguladoras que expresan Foxp3 y la producción de ácido retinoico que potencia la respuesta humoral, principalmente de IgA (Pabst y Bernhardt., 2010). Esto nos sugiere que en los ratones suplementados con CLA se lleva a cabo preferentemente una acción reguladora en el intestino sobre la reacción inflamatoria. También podemos observar (fig. 7b) que la suplementación previa a la infección con CLA, permitió que las propias células fueran más eficaces en su acción, al aumentar la expresión de este receptor en la membrana celular (IMF). La expresión fue disminuyendo conforme avanzó el tiempo de la infección, posiblemente porque se controló en una etapa más temprana en comparación con el grupo control, y no hubo un aumento en la carga parasitaria de estos ratones.

En la figura 7c vemos el porcentaje de células que expresan el receptor de manosa CD206. En el grupo de CLA se observa que el porcentaje de este receptor se mantiene sin cambios durante toda la infección. Para el caso del grupo control se observa un aumento en el porcentaje a los dos días de infección y después disminuye. En la expresión (IMF) de este marcador no se observaron cambios para el grupo control, mientras que el grupo de CLA muestra un aumento a los dos días de infección que posteriormente disminuye (fig. 7d). Mientras que el grupo control se aumenta el número de células con este receptor, en el grupo de CLA se aumenta el número de receptores en las células que ya se encuentran presentes en el tejido. Esto nos puede indicar que los ratones suplementados con CLA pueden llevar a cabo una respuesta más eficiente y eficaz que los del grupo control.

El receptor F4/80 (fig. 7e y 7d) está también ligado en la diferenciación de células T reguladoras (Lin et al., 2005). Al observar el porcentaje de células con este marcador (Fig. 7e), observamos que para el grupo de CLA hay una tendencia a disminuir en los días 6 y 8. Para el grupo control hay un aumento del número de células para este marcador del día 0 al 2 y mantiene el resto de la infección. Para IMF de F4/80 (fig. 7f) se obtuvieron mayores niveles de expresión para el grupo de CLA que de PBS, lo cual nos puede indicar que en el grupo de CLA hay un mayor efecto regulador de estas células sobre el tejido.

Intestino: MHCII^{hi} / CD11c^{hi}

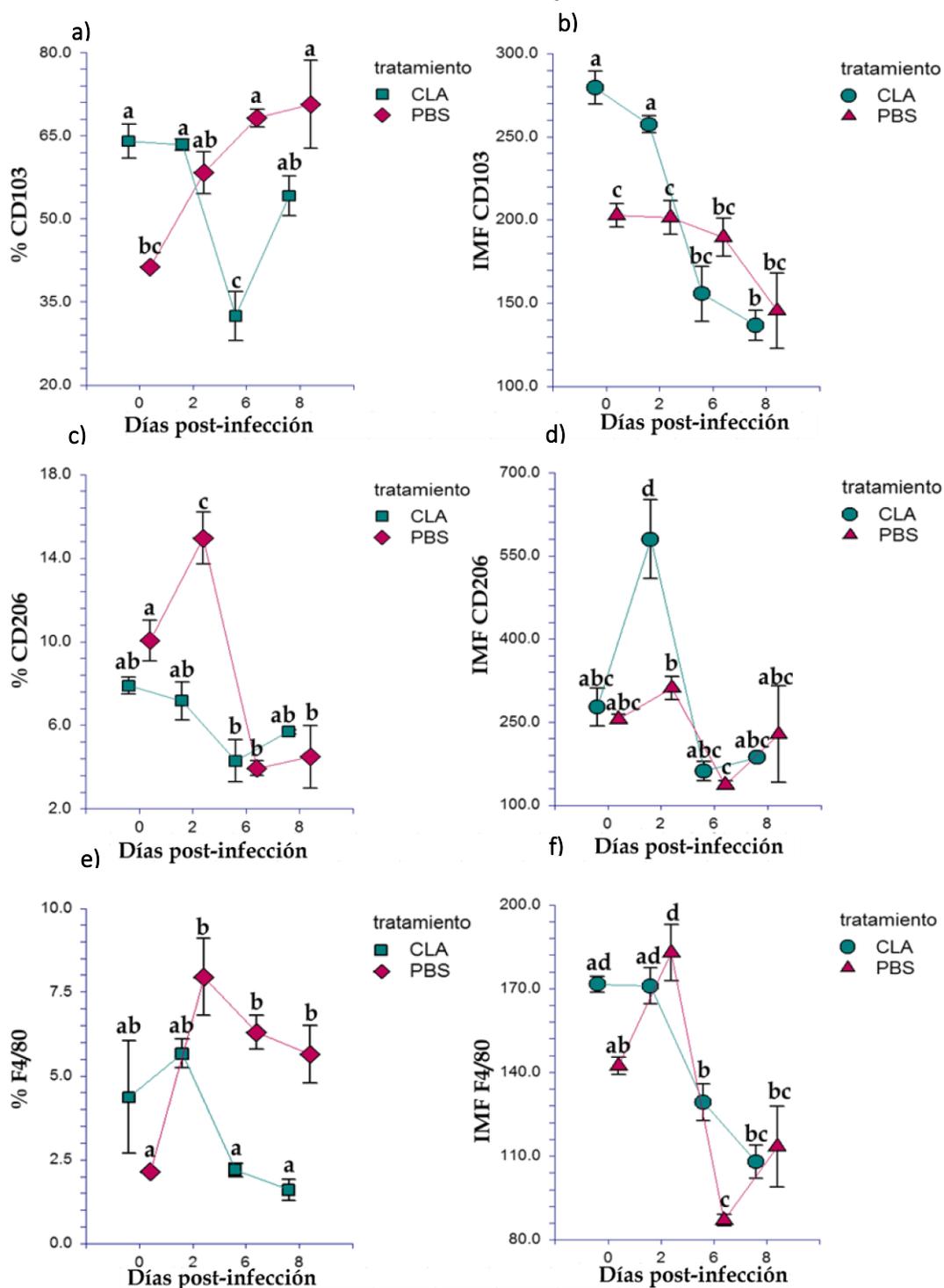


Figura 7: Porcentaje e IMF de diferentes marcadores en la población MHCII^{hi} / CD11c^{hi} de la muestra de intestino. a) Porcentaje del receptor CD103, b) IMF del receptor CD103, c) Porcentaje del receptor CD206. d) IMF del receptor CD206. e) Porcentaje del receptor F4/80. f) IMF del receptor F4/80. Letras distintas indican diferencia estadística p<0.05.

En la figura 8 se presentan los porcentajes y niveles de expresión de los distintos marcadores de la población MHCII^{low} / CD11c^{low}, que corresponde a los macrófagos intestinales. Para el caso del receptor CD103 se observa un aumento en el porcentaje (fig. 8a), a los dos días de infección, en el grupo de CLA y posteriormente baja. Para el grupo control se observa un aumento similar pero hasta los seis días de infección. Esto nos indica que los ratones suplementados con el aceite respondieron primero que el grupo control, con este tipo de células. La expresión de este receptor se mantiene para el grupo de CLA durante toda la infección (fig. 8b), mientras que para el grupo control disminuyó el día 6 de infección. Siendo este el día donde hubo una mayor carga parasitaria para el grupo de PBS, así como el aumento en el porcentaje de células con este receptor, pero disminuyó la expresión de receptores en las mismas. Puede ser que al haber una mayor presencia de trofozoitos el tejido optara por aumentar la población celular en vez del número de receptores por células.

Para el caso del receptor CD206, se presentó un mayor porcentaje de células para el grupo de PBS (fig. 8c), mientras que la mayor expresión de este receptor fue a los 2 días en el grupo de CLA (fig. 8d). Choi et al. (2010) clasifica a las células que expresan este marcador como macrófago tipo M2, o antiinflamatorios ya que tienen un importante rol protector en el tejido. La razón por la cual se observa un mayor número de células en el grupo de PBS, puede ser por la alta presencia de parásitos y la necesidad que tiene el tejido de protegerse.

El receptor F4/80 se encuentra presente tanto en células dendríticas como en macrófagos (Chang et al., 2014), aunque es mayormente atribuido a los últimos. En nuestro trabajo no se observaron cambios significativos en el porcentaje de células con este receptor (fig. 8e). Sin embargo, hubo mayor expresión del mismo para el grupo de CLA en comparación con el de PBS (fig. 8f).

Intestino: MHCII low / CD11c low

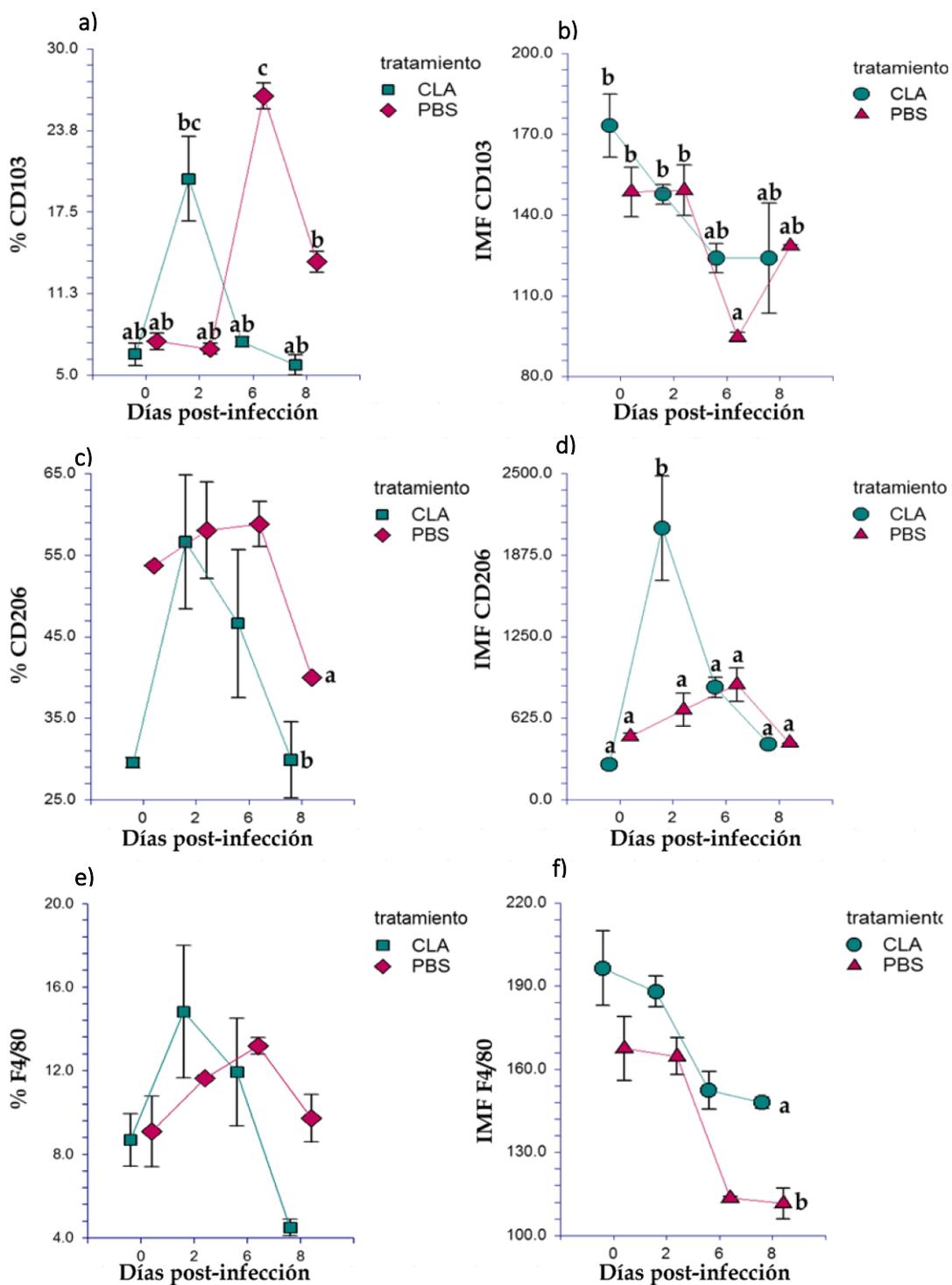


Figura 8: Porcentaje e IMF de diferentes marcadores en la población MHCII^{low} / CD11c^{low} de la muestra de intestino. a) Porcentaje del receptor CD103, b) IMF del receptor CD103, c) Porcentaje del receptor CD206. d) IMF del receptor CD206. e) Porcentaje del receptor F4/80. f) IMF del receptor F4/80. Letras distintas indican diferencia estadística p<0.05.

La figura 9 nos muestra los cambios que se presentaron en la población de APC, en placas de Peyer, durante la infección. Las células con el receptor CD103 mostraron un aumento en su porcentaje para el grupo de PBS, mientras que el de CLA se mantuvo sin cambios (fig. 9a). Esto puede deberse al aumento en la carga parasitaria del grupo de PBS el día 6 post-infección, generándose la necesidad de aumentar el número de células, o la migración de éstas del intestino a las placas. Sin embargo, las células en el grupo de CLA presentaron una mayor expresión de este marcador previo a la infección, el cuál fue disminuyendo al pasar el tiempo (fig. 9b). Mientras que en PBS va de una expresión menor a mayor teniendo un pico máximo el día 6 post-infección. Estos resultados sugieren que la respuesta puede ser más tardada para el grupo de PBS al no contar con células mejor capacitadas estando sanos, y sea por eso que el tejido de vea obligado a aumentar tanto IMF como porcentaje de éstas células para atacar a la infección.

Se produce un aumento en el porcentaje de células, con CD206, el día 6 post-infección para el grupo de PBS (fig. 9c). Mientras que en intestino el grupo de CLA mostraba un aumento, en placas no surge ningún cambio para este grupo. Lo cual puede deberse a que no hubo necesidad de migración al órgano linfoide en el grupo de CLA, dada la baja carga parasitaria.

El número de células con el receptor F4/80 aumenta al día 6 post-infección para el grupo de PBS, mientras que el de CLA no muestra cambios (fig. 9e). Este aumento puede ser generado por la migración de estas células del intestino al órgano linfoide, como parte del seguimiento de la respuesta inmune del ratón. La IMF muestra un aumento para CLA el día 8 post-infección (fig. 9f), esto puede mejorar la eficiencia de las células al diferenciar a los linfocitos T reguladores, mientras que para PBS el número de receptores disminuye del día 2 al 6 post-infección. El hecho de que disminuya la IMF en las células pudiera generar esa necesidad de aumentar el número de células con el receptor tratando de compensar la falta de receptores.

Placas de Peyer: MHCII+ / CD11c+

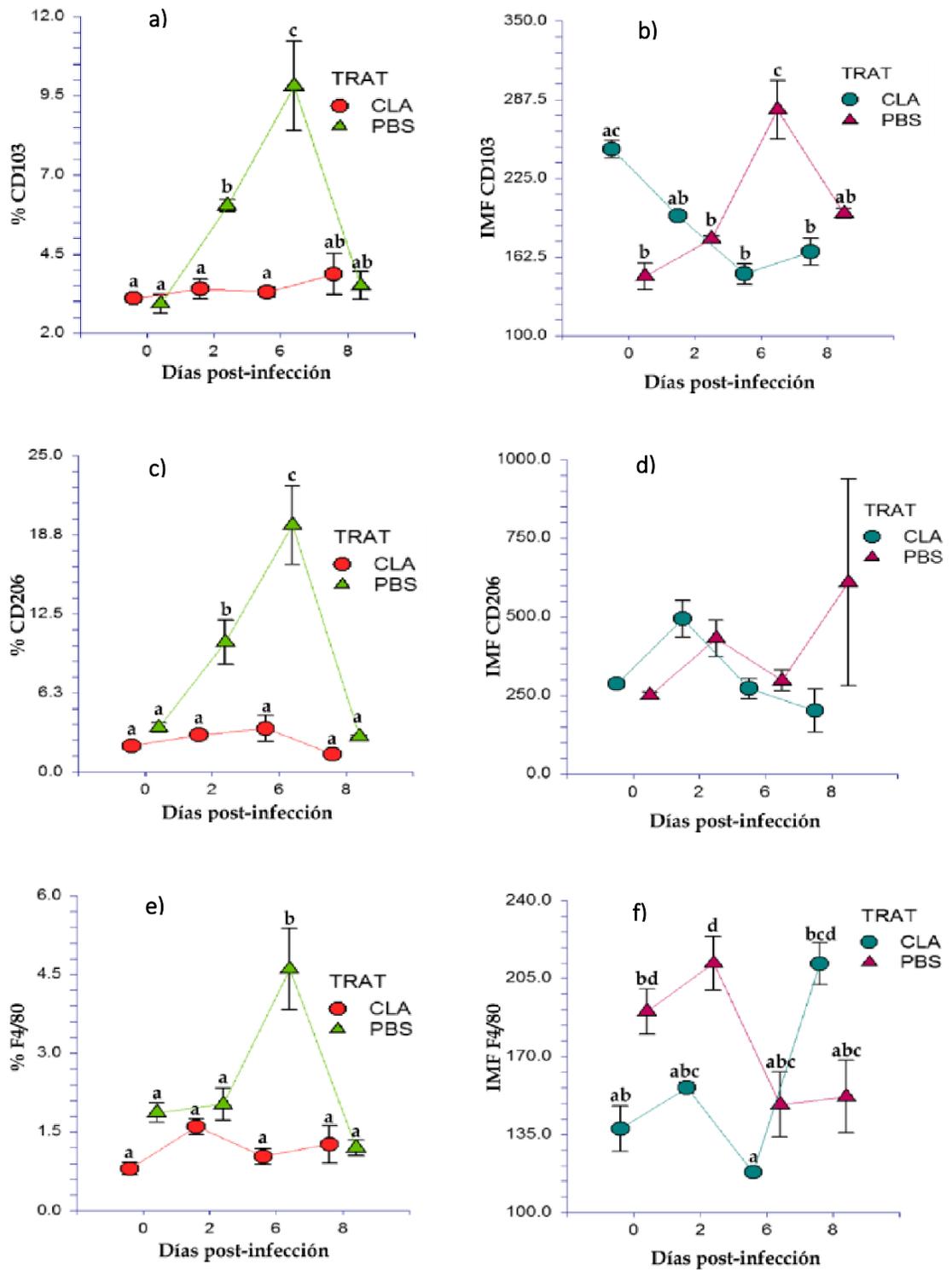


Figura 9: Porcentajes e IMF de diferentes marcadores en la población MHCII+/CD11c+ de la muestra de placas de Peyer. a) Porcentaje del receptor CD103, b) IMF del receptor CD103, c) Porcentaje del receptor CD206. d) IMF del receptor CD206. e) Porcentaje del receptor F4/80. f) IMF del receptor F4/80. Letras distintas indican diferencia estadística p<0.05.

Los distintos marcadores celulares para la población CD11c+ de intestino, se presentan en la figura 10. Para el porcentaje de células marcadas con CD103, se observa una tendencia a aumentar el día 2 por parte del grupo de CLA para después disminuir. El grupo de PBS parece aumentar de forma continua durante toda la infección (fig. 10a). En el caso de IMF la tendencia parece ser al revés, en donde para los dos grupos la expresión de este marcador por célula va disminuyendo (fig. 10b).

Un trabajo realizado por Lantier et al. (2013), comprueba la necesidad de este subtipo de célula dendrítica durante una infección por *Cryptosporidium parvum* en ratones recién nacidos *C57BL/6*. Ellos mencionan que estas células, a parte de su papel en la presentación de antígeno, tienen un rol muy activo durante la infección por protozoarios, gracias a la estrecha comunicación con otras células de la respuesta inmune innata como lo son las células asesinas naturales (NK), y la producción de citocinas. Los ratones recién nacidos no cuentan con un reservorio de este tipo de células, sino hasta el destete (22 días de nacido); sin embargo, durante una infección con el protozoario *C. parvum* a la semana de nacidos, se observa un claro reclutamiento de estas células a la mucosa intestinal, hasta los 6 días post-infección. Este aumento en el número de células CD11c+ / CD103+ fue indispensable para la resolución de la infección. Algo similar pudo haber ocurrido a los ratones del grupo de PBS, al aumentar el porcentaje de esta población conforme fue avanzando la infección, no siendo necesario para el grupo de CLA.

El receptor de manosa CD206 mostró un notorio aumento en su porcentaje al octavo día post-infección para el grupo de CLA (fig. 10c), acompañado por un aumento de IMF en el mismo día (fig. 8d). Es posible que el intestino reclutara más de éstas células para tratar de devolver la homeostasis al tejido después de una semana de respuesta contra *G. lamblia*.

En la figura 9e se observa un mayor porcentaje de las células con F4/80 en el grupo de CLA, mientras que en la figura 10f se muestra un valor máximo el día 6 en IMF para el grupo de PBS. Esto sugiere que el CLA crea un estado protector-preventivo al mantener este tipo de poblaciones celulares, ya que

éstas pueden inducir la diferenciación de las células T vírgenes a T reguladoras (Denning et al., 2011).

En placas de Peyer también se presentaron cambios para las CD11c+ (fig. 11). En el marcador CD103 se observó una disminución del porcentaje de células, para el grupo de PBS el día 6 post-infección (fig. 11a). Debido a ser el día de mayor carga parasitaria se esperaría que la respuesta contra el parásito fuese más notoria, sin embargo para el grupo control no lo fue. Caso contrario para el grupo de CLA donde se generó un aumento de estas células al pasar del día 0 al 2 de infección; también se produjo una mayor expresión de receptores en estas células para este grupo (fig. 11b). La respuesta del grupo de CLA muestra ser más eficiente y más rápida que para el grupo de PBS.

Para el receptor CD206 se observa un aumento en el porcentaje de células al sexto día de infección para el grupo de PBS (fig. 11c), así como un aumento de IMF al día 8 de infección (fig. 11d). No se observaron cambios para el grupo de CLA.

El grupo de PBS presenta un mayor porcentaje de células F4/80 que el grupo de CLA (fig. 11e). Sin embargo, surge un claro aumento de IMF en el grupo de CLA al día 8 post-infección (fig. 11f), esto puede deberse a que el tejido está tratando de reestablecer la homeostasis después de 8 días de infección.

Intestino: MHCII-/CD11c+

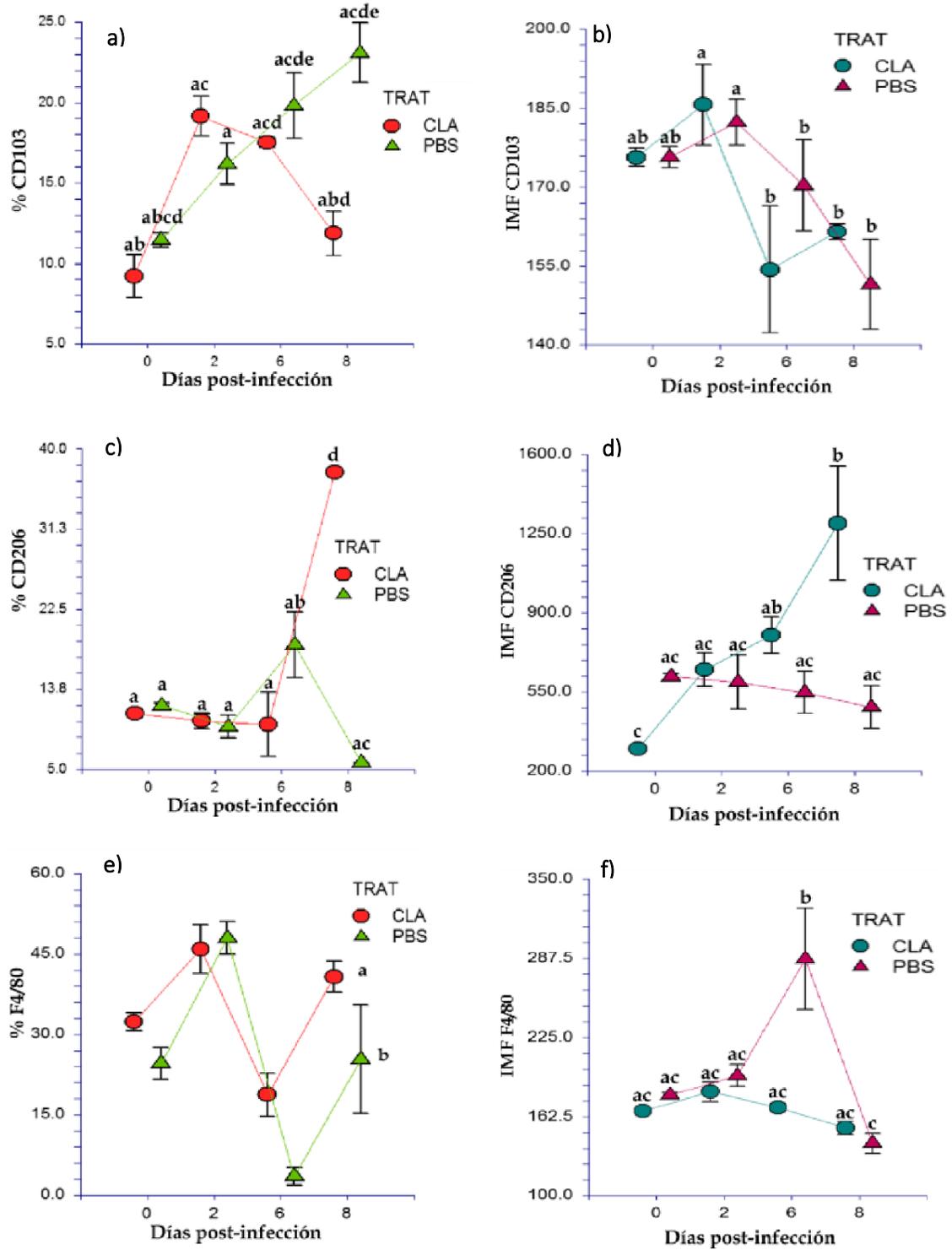


Figura 10: Porcentajes e IMF de diferentes marcadores en la población MHCII-/CD11c+ de la muestra de intestino. a) Porcentaje del receptor CD103, b) IMF del receptor CD103, c) Porcentaje del receptor CD206. d) IMF del receptor CD206. e) Porcentaje del receptor F4/80. f) IMF del receptor F4/80. Letras distintas indican diferencia estadística $p < 0.05$.

Placas de Peyer: MHCII-/CD11c+

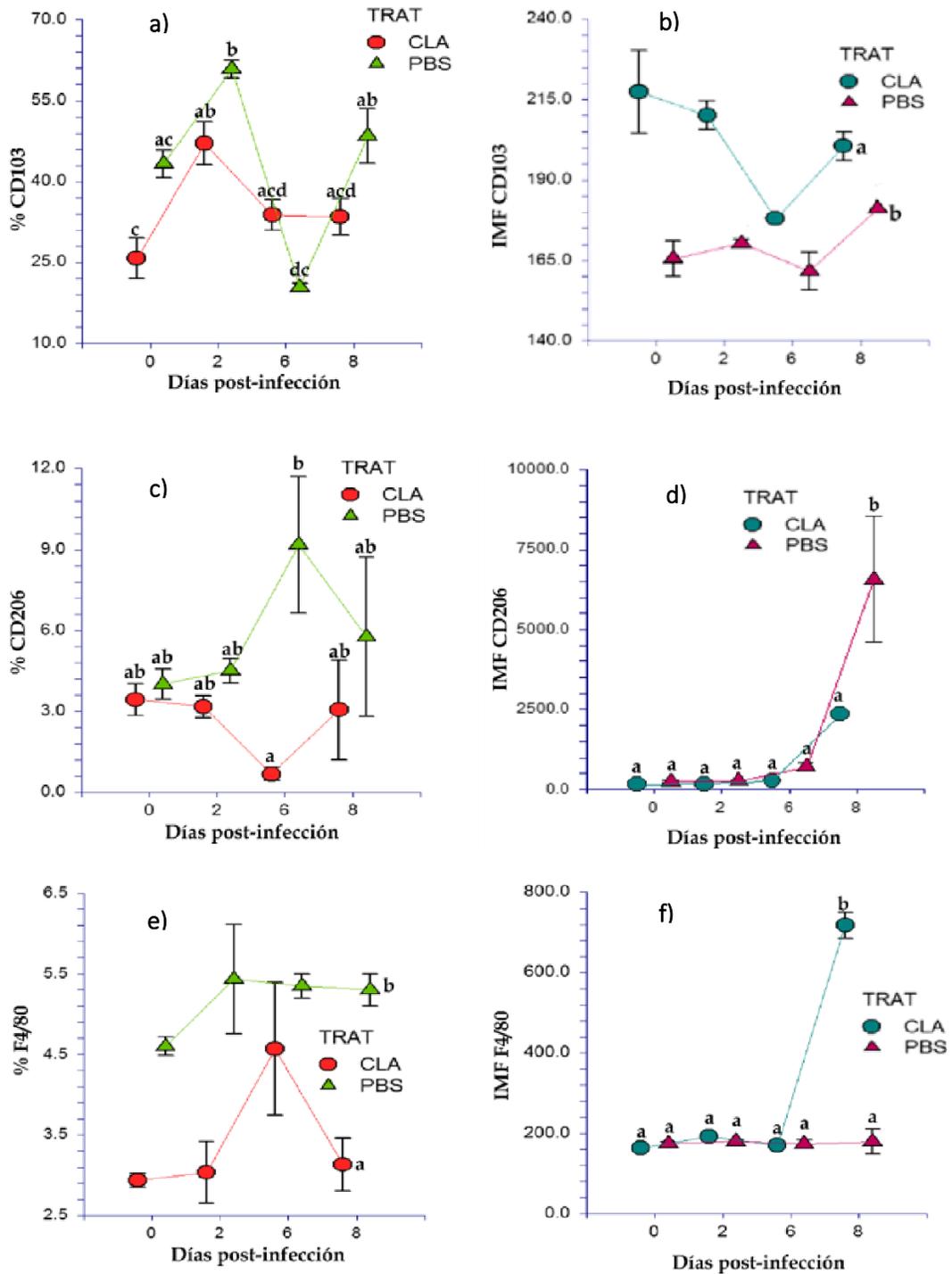


Figura 11: Porcentaje e IMF de diferentes marcadores en la población MHCII-/CD11c+ de la muestra de placas de Peyer. a) Porcentaje del receptor CD103, b) IMF del receptor CD103, c) Porcentaje del receptor CD206. d) IMF del receptor CD206. e) Porcentaje del receptor F4/80. f) IMF del receptor F4/80. Letras distintas indican diferencia estadística $p < 0.05$.

Producción de Citocinas Proinflamatorias

Se analizaron las citocinas IL-6, IL-1 y TNF- α de lavado intestinal, a los días 0, 2 y 6 post-infección, por inmunoensayo (ELISA). En ningún tiempo post-infección fue posible detectar la presencia de ninguna de estas citocinas, debido a que los niveles de éstas en lavado intestinal, estaban por debajo de límite de detección de la técnica utilizada (8 pg/mL). Se recomienda utilizar análisis más finos para la cuantificación de citocinas, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tiempo real.

Análisis de Histología

Se tomaron muestras del intestino correspondiente al duodeno (10 cm) de cuatro ratones antes de la infección (0 días), 6 y 8 días post-infección. A los 6 días post-infección se detecta la presencia de parásitos adheridos a las vellosidades intestinales para los grupos de CLA (fig. 12a) y PBS (fig. 12b), así como excreción de moco entre las vellosidades del intestino. Esto aparenta ser una combinación de residuo del trofozoito con el moco propio producido por las vellosidades. Al octavo día de infección no se encontraron trofozoitos en los cortes.

Un indicativo de que se está llevando a cabo una respuesta inmunológica en el ratón es el crecimiento de las placas de Peyer. Debido a que sólo se tomó una fracción del intestino para los análisis histológicos, la cantidad de muestras que presentaron placas de Peyer fue de 37.5%. Sin embargo, durante todo el estudio, y en todos los individuos el aumento de tamaño, así como de número de placas fue muy notorio conforme fue avanzando el tiempo de infección. Esto sugiere un aumento en la respuesta inmunológica en el ratón al aumentar el tiempo de exposición al parásito. En el estudio de Arévalo et al. (2010) se observó una frecuencia de estos folículos linfoides sólo en el 63.3% de los

casos lo que nos podría indicar que tal vez el ratón sea más susceptible a este parásito ya que la presencia de folículos linfoides fue durante toda la infección y en todos los ratones. Sin embargo los síntomas y reacciones a la infección en el humano son muy diversos, yendo desde una respuesta asintomática a una crónica dependiendo del estado inmunológico de la persona al momento de la infección. En el caso de los ratones las condiciones del sistema inmune son más similares entre individuos al ser de la misma cepa y mantenerse a las mismas condiciones de alimentación y cuidados.

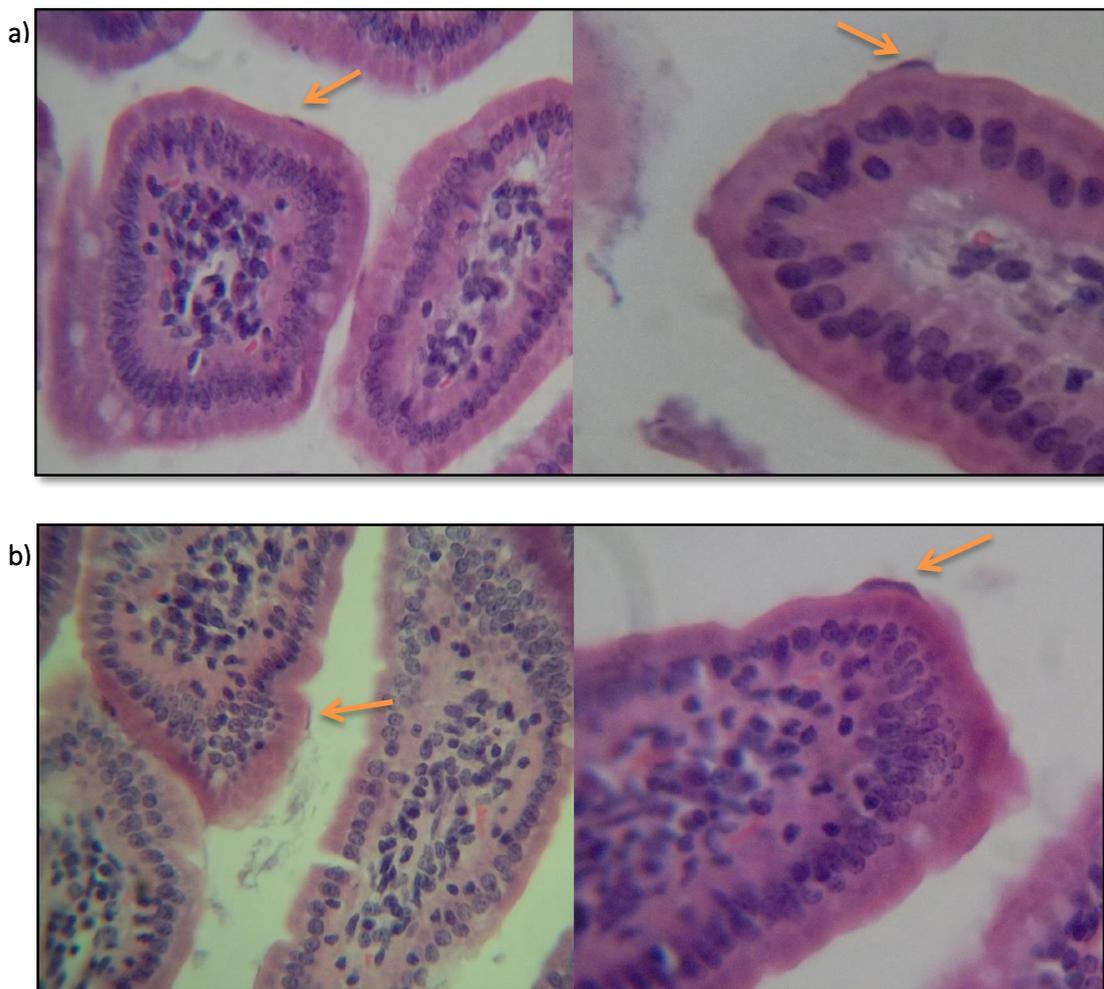


Figura 12: Microfotografías que muestran las vellosidades de duodeno con tinción por hematoxilina-eosina en cortes transversales (aumento 600x). a) Seis días post infección del grupo de CLA. b) Seis días post infección del grupo control. Se señala con flechas los trofozoitos. (Elaborado por el Dr. Guillermo López Cervantes)

VII. CONCLUSIONES

El CLA mostró tener una acción protectora en el intestino contra el parásito *Giardia lamblia*, al no permitir un aumento de la carga parasitaria en el intestino. Los ratones suplementados con CLA también mostraron un mayor porcentaje en las poblaciones de macrófagos y DC de intestino, que son las células principales de la respuesta inmune innata. Esto pudo contribuir a mantener una carga parasitaria menor en comparación con el grupo control.

Es muy notorio que el grupo tratamiento aumento marcadores como F4/80 y CD103 que activan a las células T reguladores y promueven la inmunidad humoral mediada por IgA, evitando que se lleve a cabo la respuesta inmune de una manera exacerbada en el intestino.

Otro resultado muy interesante que se observó en el grupo de CLA, es que el tejido en vez de recurrir al reclutamiento de células para mejorar la respuesta, aumentó el número de receptores en la membrana celular. Esto se observó en el receptor CD103 para células de placas de Peyer CD11c+, de intestino CD11c+, de placas de Peyer MHCII+/CD11c+, así como en macrófagos y DC de intestino. El receptor F4/80 mostró este mismo comportamiento para los macrófagos y DC de intestino. Esto hace que la respuesta se lleve a cabo de una manera más eficiente en el tejido, ya que se evita el daño tisular que puede generar el reclutamiento de células, pero se potencia la respuesta al aumentar los receptores de membrana.

Si bien el análisis histológico no mostró daños en el tejido, para ningún grupo experimental, el estudio se llevó a cabo por sólo 8 días en la fase aguda de la infección y es posible que este tiempo no sea el suficiente para observar un daño en la vellosidad intestinal. Así pues podemos concluir que el CLA tiene un

efecto protector contra *G. lamblia* modulando la carga parasitaria, al regular de una manera eficiente la respuesta inmune innata.

VIII. REFERENCIAS

1. Adam, R. D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev.*14(3):447-75.
2. Aguilar-Díaz, H., J. C. Carrero, R. Argüello-García, J. P. Laclette, and J. Morales-Montor. 2011. Cyst and encystment in protozoan parasites: optimal targets for new life-cycle interrupting strategies?. *Trends Parasitol.* doi:10.1016/j.pt.2011.06.003.
3. Aguilera Montilla, N., M. Pérez Blas, M. López Santalla, J. M. Martín Villa. 2004. Mucosal immune system: a brief review. *Inmunología.* 23(2): 207-216.
4. Benjamin, S., F. Spener.2009. Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits. *Nutr Metab.* doi: 10.1186/1743-7075-6-36.
5. Bhattacharya, A., J. Banu, M. Rahman, M. O'Shea, G. Fernandes. 2006- Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *J Nutr Biochem.* 17(12):789-810.
6. Bhattacharya, A., Md. M. Rahman, D. Sun, R. Lawrence. 2005. The Combination of Dietary Conjugated Linoleic Acid and Treadmill Exercise Lowers Gain in Body Fat Mass and Enhances Lean Body Mass in High Fat-Fed Male Balb/C Mice1. *J. Nutr.* 135(5): 1124-1130.
7. Buret, A. G. 2005. Immunopathology of giardiasis: the role of lymphocytes in intestinal epithelial injury and malfunction. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 100(1): 185-190.
8. Chang, S. Y., H. J. Ko, M. N. Kweon. 2014. Mucosal dendritic cells shape mucosal immunity. *Exp Mol Med.* 46(3): e84.
9. Changhua, L., Y. Jindong, L. Defa, Z. Lidan, Q. Shiyan, X. Jianjun. 2005. Conjugated linoleic acid attenuates the production and gene expression of

10. proinflammatory cytokines in weaned pigs challenged with lipopolysaccharide. *J Nutr.* 135. 2: 239-244.
11. Cho, M. H., J. H. Kang, M. P. Yang. 2008. Immunoenhancing effect of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on the phagocytic capacity and oxidative burst activity of canine peripheral blood phagocytes. *Res Vet Sci.* doi: 10.1016/j.rvsc.2007.12.005.
12. Choi K. M., P. C. Kashyap, N. Dutta, G. J. Stoltz, T. Ordog, T. S. Donohue, A. J. Bauer, D. R. Linden, J. H. Szurszewski, S. J. Gibbons, G. Farrugia. CD206-positive M2 macrophages that express heme oxygenase-1 protect against diabetic gastroparesis in mice. 2010. *Gastroenterology.* 138(7): 2399–2409.
13. Denning, T. L., B. A. Norris, O. Medina-Contreras, S. Manicassamy, D. Geem, R. Madan, C. L. Karp, B. Pulendran. 2011. Functional specializations of intestinal dendritic cell and macrophage subsets that control Th17 and regulatory T cell responses are dependent on the T cell/APC ratio, source of mouse strain, and regional localization. *J Immunol.* 187(2):733-47.
14. Denning, T. L., Y. C. Wang, S. R. Patel, I. R. Williams, B. Pulendran. 2007. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat Immunol.* 8(10):1086-94.
15. Dowling, J. K., C. E. McCoy, S. L. Doyle, N. Benlarbi, M. Canavan, L. A. O'Neill, C. E. Loscher. 2012. Conjugated linoleic acid suppresses IRF3 activation via modulation of CD14. *J Nutr Biochem.* doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.06.010.
16. Drakes, M. L., S. J. Czinn, T. G. Blanchard. 2004. Isolation and purification of colon lamina propria dendritic cells from mice with colitis. 2004. *Cytotechnology.* 46: 151-161.
17. Dreesen, L., M. Rinaldi, K. Chiers, R. Li, T. Geurden, W. Van den Broeck, B. Goddeeris, J. Vercruysse, E. Claerebout, P. Geldhof. 2012. Microarray analysis of the intestinal host response in *Giardia duodenalis* assemblage E infected calves. *PLoS One.* doi: 10.1371/journal.pone.0040985.
18. Duque M. A., M. Rojas. 2007. Activación alternativa del macrófago: la diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmunología.* 26(2): 73-86

19. Dwivedy, A., P. Aich. 2011. Importance of innate mucosal immunity and the promises it holds. *Int J Gen Med*. doi: 10.2147/IJGM.S1752.
20. El-Shewy, K. A., R. A. Eid. 2005. In vivo killing of *Giardia* trophozoites harbouring bacterial endosymbionts by intestinal Paneth cells: an ultrastructural study. *Parasitology*. 130(3):269-74
21. Faubert, G., 2000. Immune Response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev*.13(1): 35–54.
22. Franco M. C., M. A. Golowczyk, G. L. De Antoni, P. F. Pérez, M. Humen, M. de L. Serradel. 2013. Administration of kéfir-fermented milk protects mice against *Giardia intestinalis* infection. *J Med Microbiol*. 62(Pt):1815-22.
23. Geissmann F., M. G. Manz, S. Jung, M. H. Sieweke, M. Merad, K. Ley. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. doi: 10.1126/science.1178331.
24. Gottig, N., E. V. Elías, R. Quiroga, M. J. Nores, A. J. Solari, M. C. Touz, H. D. Luján. 2006. Active and passive mechanisms drive secretory granule biogenesis during differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *J Biol Chem*. 281.26:18156-66.
25. Harrison O. J., K. J. Maloy. 2011. Innate Immune Activation in Intestinal Homeostasis. *J Innate Immun*. 3:585–593.
26. Hooper, L. V., A. J. Macpherson. 2010. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol*. 10(3):159-69.
27. del Hoyo, G. M., P. Martín, H. H. Vargas, S. Ruiz, C. F. Arias, C. Ardavin. 2002. Characterization of a common precursor population for dendritic cells. *Nature*. 415(6875):1043-7.
28. Iwasaki, A. 2007. Mucosal Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol* 25:381–418.
29. Kamda, J. D., T. E. Nash, S. M. Singer. 2012. *Giardia duodenalis*: dendritic cell defects in IL-6 deficient mice contribute to susceptibility to intestinal infection. *Exp Parasitol*. 130(3):288-91.

30. Kang, J. H., G. S. Lee, E. B. Jeung, M. P. Yang. 2007. Trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid increases phagocytosis of porcine peripheral blood polymorphonuclear cells in vitro. *Br J Nutr.* 97(1):117-25.
31. Kelly, G. S. Conjugated Linoleic Acid: a Review. 2001. *Altern Med Rev.* 6(4): 367-382.
32. Kumar, R., D. Arora, A. Bhatia. 2010. Therapeutic Potential Of Bioconverted Conjugated Linoleic Acid In Drug Induced Immunosuppressed And Infective Organism Induced Plasmodium Berghei. *Int J Pharm Pharm Sci,* 3(1): 212-214.
33. Lantier, L., S. Lacroix-Lamandé, L. Potiron, C. Metton, F. Drouet, W. Guesdon, A. Gnahoui-David, Y. Le Vern, E. Deriaud, A. Fenis, S. Rabot, A. Descamps, C. Werts, F. Laurent. 2013. Intestinal CD103+ dendritic cells are key player in the innate immune control of *Cryptosporidium parvum* infection in neonatal mice. *PLoS Pathog.* 9(12):e1003801.
34. Lee, P., G. M. Faubert. 2006. Expression of the Giardia lamblia cyst wall protein 2 in Lactococcus lactis. *Microbiology.* 152(7):1981-90.
35. Li, E., P. Zhou, Z. Petrin, S. M. Singer. 2004. Mast Cell-Dependent Control of *Giardia lamblia* Infections in Mice. *Infect. Immun.* 72(11):6642
36. Lin, H. H., M. Stacey, J. Stein-Streilein, S. Gordon. 2010. F4/80 the macrophage-specific adhesion-GPCR and its role in immunoregulation. *JEM.* doi: 10.1084/jem.20042307.
37. Lin, H. H., D. E. Faunce, M. Stacey, A. Terajewicz, T. Nakamura, J. Zhang-Hoover, M. Kerley, M. L. Mucenski, S. Gordon, J. Stein-Streilein. 2005. The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific effector regulatory T cells in peripheral tolerance. *J Exp Med.* 201(10):1615-25.
38. Loscher, C. E., E. Draper, O. Leavy, D. Kelleher, K. H. G. Mills, H. M. Roche. 2005. *J Immunol.* 175: 4990-4998.
39. Luján Hugo D. 2013. Giardia y giardiasis. *Medicina (B. Aires).* 66(1): 70-74.
40. MacDonald H.B. 2000. Conjugated linoleic acid and disease prevention: a review of current knowledge. *J Am Coll Nutr.* 19(2):111S-118S.

41. Mestas, J., C. C. W. Hughes. 2004. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol.* 172:2731-2738.
42. Mokrzycka, M., A. Kolasa, A. Kosierkiewicz, B. Wiszniewska. 2010. Inducible nitric oxide synthase in duodenum of children with *Giardia lamblia* infection. *Folia Histochem Cytobiol.* 48(2):191-6.
43. Moya-Camarena, S. Y., J. P. Vanden Heuvel, S. G. Blanchard, L. A. Leesnitzer, M. A. Belury. Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPARalpha. *J Lipid Res.* 40(8):1426-33.
44. Müller, J., J. Wastling, S. Sanderson, N. Müller, A. Hemphill. A novel *Giardia lamblia* nitroreductase, GINR1, interacts with nitazoxanide and other thiazolides. *Antimicrob Agents Chemother.* 51(6):1979-86.
45. Or-Rashid, M. M., O. Alzahal, B. W. McBride. Comparative studies on the metabolism of linoleic acid by rumen bacteria, protozoa, and their mixture in vitro. *Appl Microbiol Biotechnol.* 89(2):387-95.
46. O'Shea, M., J. Bassaganya-Riera, I. C. Mohede. 2004. Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid. *Am J Clin Nutr.* 79(6):1199S-1206S.
47. Owen, R. L, C. L. Allen, D. P. Stevens. 1981. Phagocytosis of *Giardia muris* by macrophages in Peyer's patch epithelium in mice. *Infect. Immun.* 33(2):591.
48. Pavanelli, W. R., F. R. Gutierrez, J. J. Silva, I. C. Costa, M.C. Menezes, F. J. Oliveira, E. N. Itano, M. A. Watanabe. The effects of nitric oxide on the immune response during giardiasis. *Braz J Infect Dis* 14(6):606-12.
49. Pabst O., G. Bernhardt. 2010. The puzzle of intestinal lamina propria dendritic cells and macrophages. *Eur. J. immunol.* 40:2085-2130.
50. Prucca, C. G., F. D. Rivero, and H. D. Luján. 2011. Regulation of Antigenic Variation in *Giardia lamblia*. *Annu. Rev. Microbiol.* 65: 611-630. Prucca, C. D., H. D. Lujan. Antigenic variation in *Giardia lamblia*. 2009.doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01367.x.
51. Ramírez-Santana, C., C. Castellote, M. Castell, C. Moltó-Puigmartí, M. Rivero, F. J. Pérez-Cano, A. Franch. 2010. Enhancement of antibody synthesis in rats by feeding cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid during early life. *J Nutr Biochem* 22(5):495-501.

52. Rautava, S., W. A. Walker. 2008. Immunophysiology and nutrition of the gut. In Nutrition in pediatrics: basic science AND clinical applications. Duggan, C.;Watkins, J. B.;Walker, W. A. eds. 4th ed.
53. Rópolo, A. S., M. C. Touz. 2010. A lesson in survival, by Giardia lamblia. *ScientificWorldJournal*. 12(10):2019-31.
54. Roxström-Lindquist, K., D. Palm, D. Reiner, E. Ringqvist, S. G. Svärd. 2006. Giardia immunity-an update. *Trends Parasitol*. 22(1):26-31.
55. Schenk, M., C. Mueller. 2008. The mucosal immune system at the gastrointestinal barrier. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 22(3):391-409.
56. Scott, K. G., L. C. Yu, A. G. Buret. 2004. Role of CD8+ and CD4+ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. *Infect Immun*. 72(6):3536-42.
57. Smith, P. D., L. E. Smythies, R. Shen, T. Greenwell-Wild, M. Gliozzi, S. M. Wahl. 2011. Intestinal macrophages and response to microbial encroachment. *Mucosal Immunol*. 4(1):31-42.
58. Smith, P. D., C. Ochsenbauer-Jambor, L. E. Smythies. 2005. Intestinal macrophages: unique effector cells of the innate immune system. *Immunol Rev*. 206:149-59.
59. Smith, H. V., T. Paget. Giardia. 2007. *Food borne diseases*. Doi: 10.1007/978-1-59745-501-5-11.
60. Solarczyk, P., A. C. Majewska. 2010. A survey of the prevalence and genotypes of Giardia duodenalis infecting household and sheltered dogs. *Parasitol Res*.106.5:1015-9.
61. Stachowska, E., M. Baškiewicz-Masiuk, V. Dzieziejko, I. Gutowska, I. Baranowska-Bosiacka, M. Marchlewicz, B. Dołęgowska, B. Wiszniewska, B. Machaliński, D. Chlubek. 2008. Conjugated linoleic acid increases intracellular ROS synthesis and oxygenation of arachidonic acid in macrophages. *Nutrition*. doi: 10.1016/j.nut.2007.10.018.
62. Steinhart, C. 1996. Conjugated Linoleic Acid The Good News about Animal Fat. *J.Chem.Educ*. 73:A302

63. Velazquez, C., M. Beltran, N. Ontiveros, L. Rascon, D. C. Figueroa, A. J. Granados, J. Hernandez-Martinez, J. Hernandez, H. Astiazaran-Garcia. 2005. Giardia lamblia infection induces different secretory and systemic antibody responses in mice. *Parasite Immunol.* 27(9):351-6.
64. Wahle, K .W., S. D. Heys, D. Rotondo. 2004. Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health?. *Prog Lipid Res.* 43(6):553-87.
65. Wang H., N. Peters, V. Laza-Stanca, N. Nawroly, S. L. Johnston, J. Schwarze. 2006. Local CD11c+ MHC class II- precursors generate lung dendritic cells during respiratory viral infection, but are depleted in the process. *J Immunol.* 177(4):2536-42.
66. Yang, M., M. E. Cook. Dietary conjugated linoleic acid decreased cachexia, macrophage tumor necrosis factor-alpha production, and modifies splenocyte cytokines production. *Exp Biol Med (Maywood).* 228(1):51-8.