



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Efecto de la separación materna durante la lactancia sobre el grado de infección por *Giardia Lamblia* en un modelo animal con roedores.

María Fernanda Gerena Cruz

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Maestría en Fisiología

Bogotá, Colombia

2017

Efecto de la separación materna durante la lactancia sobre el grado de infección por *Giardia Lamblia* en un modelo animal con roedores.

María Fernanda Gerena Cruz

Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Fisiología

Directora:

Ph.D., Zulma Dueñas

Co-Director

Dr. Rafael Guerrero Lozano

Línea de Investigación:

Estrés

Grupo de Investigación:

Neurobiología y Comportamiento

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Maestría en Fisiología

Bogotá, Colombia

2017

Dedicatoria

*“A mi familia por ser el motor que cada día me motiva a seguir
adelante y a creer en mi...”*

Agradecimientos

Le agradezco a Dios y a la vida por permitirme iniciar y culminar un proyecto más. Por permitirme salir adelante con el propósito de crecer personal y profesionalmente, ya que por medio de este logro pude ser mejor persona.

A mi familia agradezco inmensamente por todo su apoyo, a mi madre por guiarme y motivarme cada día a seguir adelante y a creer en mí, a mi padre por su apoyo moral y económico en cada uno de las metas que me propongo, a mi hermano por ser mi consejero en cada uno de los proyectos que inicio y por su colaboración, a mis tías por su apoyo absoluto y por todo su cariño.

A mi roomate y gran amiga Gabriela García por estar siempre ahí en todo momento orientando mi trabajo y ayudándome a tomar las mejores decisiones, trabajando juntas en este proyecto, a mi querida amiga Nany por su apoyo incondicional, colaboración y motivación a continuar con mis sueños y mis amistades que pusieron un grano de arena para impulsarme a lograr este sueño.

A mi tutora la Dra. Zulma Dueñas por su apoyo, orientación y guía, por todas sus enseñanzas, consejos y direccionamientos, por ser la persona quien me impulsó en esta travesía y quien creyó en mí desde el inicio. A mi Codirector el Dr. Rafael Guerrero, quien desde el principio del estudio me orientó y me dio las mejores ideas para iniciar este proyecto, gracias a su apoyo durante el proceso se desarrolló el estudio de la mejor forma.

Al Departamento de Ciencias Fisiológicas de la Universidad Nacional de Colombia, cuyos laboratorios me permitieron llevar a cabo los experimentos y procedimientos realizados, al personal y a la Sra. Rocío que estuvo presente durante varios procedimientos del proyecto y al Dr. Ángel por su colaboración y enseñanzas. A la Maestría en fisiología por permitirme crecer académicamente en conocimiento y apoyarme económicamente con procesos de la tesis. A la Facultad de medicina de la Universidad Nacional por apoyarme económicamente con el descuento en la matrícula en mis últimos periodos y permitirme llevar a cabo este trabajo.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, que me permitieron trabajar en el bioterio para llevar a cabo el proceso experimental inicial de mi tesis, a los auxiliares de laboratorio Don Arturo Sánchez y Camilo Sánchez quienes con sus conocimientos y enseñanzas fueron de gran apoyo.

Resumen

Estudios con roedores señalan que la separación materna durante la lactancia (SMDL) genera estrés, cambios en el comportamiento, en la regulación de diferentes funciones fisiológicas de la descendencia, además de efectos adversos como alteraciones relacionadas con ansiedad y depresión. Los beneficios de la lactancia materna incluyen protección ante infecciones parasitarias gastrointestinales. Dentro de las infecciones intestinales parasitarias la infección por *Giardia lamblia* es una de las principales causas de diarrea en niños menores de 5 años. No hay estudios que correlacionen la interrupción de la lactancia materna causada por la separación materna con el grado de infección intestinal por *Giardia*. En este sentido, el objetivo del presente estudio fue identificar si la SMDL incide en el grado de infección por *Giardia*, en ratas Wistar. El protocolo de SMDL se realizó desde el día postnatal 1 al día postnatal 21 durante 360 minutos al día. En el día postnatal 22 las ratas fueron distribuidas por sexo y tratamiento. Se trabajó con 4 grupos: grupo control total sin SMDL y sin infección (n=26), un grupo control infección con SMDL y sin infección (n=16), un grupo control separación sin SMDL y con infección (n=20) y el grupo experimental con SMDL y con infección (n=22). La inducción de la infección se realizó vía oral utilizando quistes de *Giardia Lamblia*, obtenidos y aislados de heces infectadas, (inóculo entre 5.000 a 10.000 quistes en 0,2 ml de solución salina normal). El curso de la infección se analizó por cuantificación directa de los quistes en heces de las ratas, recolectadas durante los días 5, 10, 15 y 20 después de la infección. Adicionalmente se hizo el análisis histológico de 40 muestras de tejido intestinal, 10 por grupo 50% machos y 50% hembras; dicho tejido se cortó transversalmente y se fijó en láminas para su posterior tinción y observación microscópica de dos variables: la relación vellosidad/cripta y recuento de eosinófilos como marcador de infección aguda. Los resultados indicaron que independientemente del sexo, la SMDL incide significativamente en el grado de infección medido por número de quistes liberados ($p < 0,05$). Se observó además, que sólo los machos infectados con SMDL presentaron diferencias significativas en la liberación de quistes, en comparación con su grupo control ($p < 0,05$). En el análisis de tejido intestinal en cuanto a la relación vellosidad/cripta se observan diferencias estadísticamente significativas tanto para hembras como para machos ($p < 0,05$). Finalmente, en relación con el conteo de eosinófilos se identifica cómo la SMDL incide significativamente sobre el grado de infección siendo

mayor el conteo de eosinófilos en el grupo con separación materna infectado para ambos sexos ($p < 0,05$). Los resultados sugieren que la separación materna, que implica interrupción de la lactancia, predispone a un mayor grado de infección por Giardia, aumentando el riesgo de la enfermedad en el tejido intestinal de la rata, apoyando la hipótesis del papel protector de la lactancia materna ante infecciones intestinales, particularmente Giardiasis.

Palabras clave: Separación Materna Durante la Lactancia, Estrés, Giardia, Infección intestinal, Ratas Wistar.

Abstract

Studies with rodents indicate that maternal separation during lactation (MSDB) generates stress, changes in behavior and in the regulation of different physiological functions of the offspring, as well as adverse effects. The benefits of breastfeeding include being a protective factor against parasitic gastrointestinal infections. Among parasitic intestinal infections, Giardia infection is a major cause of diarrhea in children under 5 years of age. There are no studies that correlate the interruption of breastfeeding caused by maternal separation with the degree of intestinal infection by Giardia. In this sense, the objective of the present study was identified in the MSDB affects the amount of Giardia infection in Wistar rats. The MSDB protocol was performed from postnatal day 1 to postnatal day 21 for 360 minutes a day. On postnatal day 22 the rats were distributed by sex and treatment. Four groups were used: total control group without MSDB and without infection (n=26), control group of infection means without infection with MSDB (n=16), control group without MSDB and with infection (n=20), and experimental group with MSDB and with infection (n=22). Induction of the infection was done orally using Giardia Lamblia cysts, obtained and isolated from infected feces, (between 5,000 and 10,000 cysts in 0.2 ml of normal saline). The course of infection was analyzed by direct quantification of cysts in feces of rats, collected on 5, 10, 15 and 20 days after infection. In addition, the histological analysis of 40 samples of intestinal tissue, 10 per group 50% male and 50% female was performed. This tissue was cut transversally and fixed in sheets for subsequent staining and microscopic observation of two variables: villus / crypt ratio and eosinophil count as a marker of acute infection. The results indicated that regardless of sex, MSDB significantly affects the degree of infection measured by the number of cysts released ($p < 0.05$). It was also observed that only males infected with MSDB presented significant differences in cystic release compared to their control group ($p < 0.05$). In the intestinal tissue analysis in the villus / crypt ratio, statistically significant differences were observed for both females and males ($p < 0.05$). Finally, in relation to eosinophil counts, MSDB is significantly affected by the amount of infection, with eosinophil counts being higher in the group with infected maternal separation for both sexes ($p < 0.05$). The results suggest that maternal separation, which implies interruption of lactation, predisposes to more Giardia infection, increasing the risk of disease in rat intestinal tissue, supporting the hypothesis that breastfeeding is A protective factor against intestinal infections particularly Giardiasis.

Keyword: Maternal Separation During Breastfeeding, Stress, Giardiasis, Intestinal infection, Wistar Rats

Contenido

| | |
|--|----|
| Resumen..... | 7 |
| Abstract | 9 |
| 1. Introducción | 12 |
| 2. Marco Teórico | 13 |
| 2.1. Giardia y Giardiasis..... | 13 |
| 2.2. Tejido intestinal de la rata | 17 |
| 2.3. Mucosa Intestinal y Giardiasis..... | 19 |
| 2.4. Aspectos inmunológicos en la Giardiasis | 21 |
| 2.5. Lactancia materna..... | 22 |
| 2.6. Lactancia y Giardia..... | 25 |
| 2.7. Separación materna..... | 26 |
| 2.8. Separación materna y enfermedades gastrointestinales | 27 |
| 3. Planteamiento del problema | 28 |
| 4. Justificación | 30 |
| 5. Pregunta de investigación..... | 32 |
| 6. Objetivos | 33 |
| 6.1. General..... | 33 |
| 6.2. Específicos | 33 |
| 7. Hipótesis | 34 |
| 8. Metodología..... | 35 |
| 8.1. Diseño del estudio..... | 35 |
| 8.2. Sujetos | 35 |
| 8.3. Muestra | 36 |
| 8.4. Definición operacional de las variables..... | 37 |
| 8.5. Separación materna durante la lactancia | 39 |
| 8.6. Infección con el parásito Giardia..... | 39 |
| 8.7. Evaluación Histopatológica de la infección – Giardiasis | 40 |
| 8.8. Consideraciones Éticas | 40 |
| 8.9. Análisis Estadístico | 43 |

| | | |
|------|---|----|
| 9. | Resultados..... | 44 |
| 9.1. | Población y muestras..... | 44 |
| 9.2. | Peso corporal..... | 45 |
| 9.3. | Cuantificación de quistes en heces..... | 46 |
| 9.4. | Análisis histológico del tejido intestinal..... | 51 |
| | | 54 |
| | | 54 |
| | | 54 |
| 10. | Discusión..... | 59 |
| 11. | Conclusiones..... | 66 |
| 12. | Propuestas..... | 67 |
| 13. | Bibliografía..... | 68 |
| 14. | ANEXOS..... | 74 |
| | ANEXO No. 1..... | 74 |
| | ANEXO No. 2..... | 76 |
| | ANEXO No. 3..... | 78 |
| | ANEXO No. 4..... | 82 |

1. Introducción

La infección con *Giardia Lamblia* es una de las enfermedades parasitarias más comunes en todo el mundo, conocida como giardiasis. Tiene mayor incidencia en áreas tropicales y subtropicales y es más frecuente en niños preescolares. Se ha estudiado de la Giardiasis sus efectos adversos en lo niños, demostrando que afecta el crecimiento y desarrollo del menor, además de generar malabsorción de nutrientes. (Berkman DS, Lescano AG, Gilman RH, & Lopez, 2002). Con relación a la separación materna, considerada como un modelo de estrés en las primeras etapas de la vida, se han estudiado los efectos que tiene esta experiencia negativa temprana sobre el desarrollo del menor. (Moriceau , Roth , & Sullivan, 2010). Sin embargo, no existen estudios que correlacionen dicho evento de estrés temprano con los posibles efectos que pueda tener sobre infecciones parasitarias adquiridas en la primera infancia. Por otro lado, se ha demostrado que la lactancia materna ofrece múltiples beneficios para el lactante gracias a su composición nutricional. La leche materna contribuye al crecimiento y desarrollo saludable, disminuye morbilidad y mortalidad infantil y le confiere al infante mayor resistencia a las infecciones. (Díaz Tabares, Soler Quintana, Ramos Rodríguez, & González Masón, 2001). Dentro de los beneficios están la disminución de infección respiratoria aguda, disminución de diarrea y se ha identificado como factor protector sobre infecciones parasitarias gastrointestinales. (Alzate Meza, Arango, Castaño Castrillón, & Vallejo Chávez, 2011)

Actualmente no existen estudios que correlacionen la interrupción de la lactancia y el estrés producidos por la separación materna con el desarrollo de la infección intestinal por *Giardia*. Con base en estos antecedentes y utilizando el modelo de separación materna durante la lactancia, en la presente tesis se quiso estudiar si la Separación Materna Durante la Lactancia, que implica una interrupción de la lactancia, tiene efectos sobre el grado de infección intestinal por *Giardia Lamblia*, en un modelo animal con roedores (Ratas Wistar). En el presente estudio se aplicó el protocolo de separación materna durante la lactancia en las ratas Wistar durante los primeros 21 días de nacidas, para luego de ser infectados con quistes de *Giardia Lamblia*, y posteriormente analizar el patrón de liberación de quistes y los cambios histológicos del tejido intestinal, con el fin de determinar el grado de infección.

2. Marco Teórico

2.1. Giardia y Giardiasis

Giardia Lamblia es un protozoo que parasita el intestino delgado de prácticamente todos los vertebrados mediante la unión directa a la superficie mucosa. A nivel mundial es una causa de infección intestinal y de diarrea. Existe gran controversia acerca de la clasificación de la célula, discutiendo si es un eucariota temprano o no y se ha considerado un excelente modelo para los estudios evolutivos. Existen dos fases morfológicas o estadios de este protozoo: el trofozoito (forma vegetativa) cuyo hábitat es el intestino delgado y el quiste (forma de resistencia) responsable de la transmisión del parásito (Imagen 1). Los quistes son entre redondos u ovals y miden de 8 a 14 por 7 a 10 μm . Cada uno de ellos tiene cuatro núcleos y contiene estructuras como axonemas y cuerpos medianos. Los flagelos, al igual que los axonemas, están enrollados. (Adam, 2001). Los trofozoitos tienen simetría bilateral, miden de 10 a 20 μm de largo por 5 a 15 μm de ancho y tienen la forma de “una gota lagrimal” cuando son vistos en sentido dorsal o ventral. Son convexos en sentido dorsal y presentan un disco adhesivo, cóncavo en su porción ventral. Poseen cuatro pares de flagelos dispuestos simétricamente. De ellos, dos son anterolaterales y dos posterolaterales, dos ventrales y un par caudal, los que tienen su origen en ocho cuerpos para-basales colocados simétricamente en la línea media, a la altura del borde superior de los núcleos. Además, presentan dos axonemas y dos cuerpos medianos. Los trofozoitos tienen dos núcleos que son idénticos, ambos ovoides y con el endosoma central bien diferenciado (Beaver, Jung , & Cupp , 1984).

Giardia presenta un citoesqueleto complejo compuesto principalmente de las estructuras que contiene tubulina, implicada en la locomoción celular, la unión celular a substratos y mantenimiento de la forma. Comparte muchas características comunes con otras células eucariotas por ejemplo, un núcleo con envoltura nuclear, un citoesqueleto y un sistema de endomembrana, pero carece de algunas estructuras como los peroxisomas, típico complejo de Golgi y mitocondrias. (Corrêa, Vilela, & Midlej, 2009). Su metabolismo anaerobio, similar al de los procariotas, hace que sea sensible a algunos fármacos antibacterianos especialmente los nitroimidazoles, los que son activados para formar radicales tóxicos (Upcroft & Upcroft , 1998).

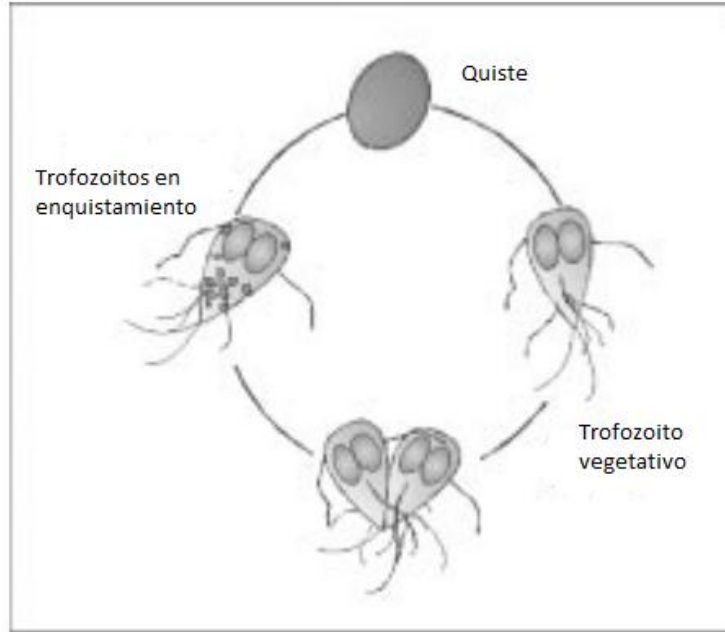


Imagen 1. Ciclo de vida de *Giardia Lamblia*. Esquema representativo del ciclo vital de *Giardia*. Tomado de (LUJAN, 2006)

“La infección por *Giardia* se inicia con la ingesta de los quistes, los que desenquistan en el intestino superior liberando los trofozoítos, la forma del parásito que prolifera en el intestino y es responsable de los síntomas de la enfermedad. Al descender por la luz intestinal, algunos trofozoítos comienzan a enquistarse, lo cual se manifiesta por la aparición de gránulos de secreción específicos que transportan los materiales que luego formarán la pared del quiste maduro y que protegen al parásito fuera del intestino del hospedador.” (LUJAN, 2006)

G. lamblia es un protozoo flagelado que ha sido ubicado taxonómicamente según la clasificación de Levine et al. (1980), como se refiere a continuación:

- Reino: *Protista*.
- Subreino: *Protozoa*.
- Phylum: *Sarcomastigophora*.

Protozoos que presentan un solo tipo de núcleo, reproducción asexual, cuando existe, esencialmente singámica. Poseen flagelos, seudópodos, o ambos tipos de organelas locomotrices.

- Subphylum: *Mastigophora*.

Trofozoitos que poseen típicamente uno o más flagelos, reproducción asexual, la que básicamente se produce por fisión binaria longitudinal; en algunos grupos presentan reproducción sexual.

- Clase: Zoomastigophorea.

Cloroplastos ausentes, uno o varios flagelos presentes, formas ameboides con o sin flagelos en algunos grupos.

- Orden: Diplomonadida.

Con uno o dos cariomastigotes, cada uno, con uno o cuatro flagelos; al menos, uno de esos flagelos es recurrente; con dos núcleos, sin mitocondrias o aparato de Golgi. Con quistes. Pueden ser parasitarias o de vidas libres.

- Familia: Hexamitidae.

De 6 a 8 flagelos, dos núcleos y algunas veces axostilos y cuerpos medianos o parabasales; presentan simetría bilateral.

- Género: Giardia.

Difieren de otros miembros de la familia Hexamitidae porque poseen un disco adhesivo, el que sirve como una organela para la fijación, en la superficie ventral del trofozoito.

- Especie: lamblia.

Es la única especie del género que ha sido descrita en humanos. En los últimos tiempos la taxonomía de los protozoos parásitos del hombre ha sufrido importantes modificaciones pues los flagelados que antes caían en un sólo phylum: Sarcocystophora, ahora se dividieron en cuatro phylla: Parabasalia, Percolozoa, Euglenozoa y Metamonada. La especie Giardia lamblia cae precisamente en este último Phylum.

El ciclo de vida de la Giardia tiene una duración aproximada de 4 a 5 días. (Martínez Fernández, Sánchez Acedo, & Hernández Rodríguez, 2002). Está compuesto por dos estados fundamentales: el quiste y el trofozoito. El *quiste* cuyas dimensiones son de 9-13 X 7-9 μm , es la forma infecciosa, de resistencia y diseminación del protozoo, se caracteriza por ser relativamente inerte y resistente a los cambios ambientales, aunque puede ser destruido por la desecación y el calor. Sin embargo, es viable en agua fría hasta por 16 días y es resistente a las concentraciones de cloro utilizadas habitualmente en los sistemas de acueductos. Después de la ingestión, ocurre la exquistación que comienza en el estómago y se completa en el duodeno, como resultado de la exposición al pH ácido del estómago y

a las enzimas pancreáticas quimiotripsina y tripsina, se producen dos trofozoitos (estado vegetativo) de cada quiste. Los *trofozoitos* cuyas dimensiones son 12-17 X 7-10 μm , 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 trofozoitos pueden enquistarse en el íleon, posiblemente como resultado de la exposición a sales biliares o a la ausencia de elementos nutritivos como el colesterol. (Núñez Fernández, 2004)

Durante su ciclo de vida, la Giardia tiene cambios bioquímicos y morfológicos que le permiten adaptarse y sobrevivir en ambientes adversos. Para subsistir fuera del intestino del hospedero, los trofozoitos de Giardia se diferencian a quistes, los que se caracterizan por poseer una rígida pared glicoproteica externa que les permiten resistir inclusive frente a la acción de los desinfectantes más comunes. Otro de los mecanismos de adaptación de este parásito es la variación de los antígenos de superficie que le permite a los trofozoitos evadir la respuesta inmune del huésped y generar infecciones tanto agudas como crónicas o recurrentes en individuos infectados.

Esta infección tiene una distribución mundial con mayor incidencia en regiones tropicales y subtropicales. Está demostrado que este parásito es el más frecuente en niños preescolares, en quienes la infección persiste por más tiempo y con más intensidad, comparada con infecciones causadas por otros parásitos intestinales, causando efectos adversos tanto en el crecimiento y desarrollo, como en el aprendizaje del infante. (Berkman DS, Lescano AG, Gilman RH, & Lopez, 2002). La enfermedad es más común en áreas donde el saneamiento y la higiene son pobres. (Nygård, Schimmer, & Aavitsland, 2006). El parásito se adquiere principalmente por consumo de aguas no tratadas o mal desinfectadas. Además, la infección también se puede transmitir de persona a persona en grupos con deficiente higiene fecal-oral, como ocurre en la mayoría de los niños. Como ejemplo claro se encuentra el deficiente cuidado de los menores en las guarderías infantiles, siendo estos lugares focos endémicos, que constituyen un problema importante, ya que los niños infectados transmiten Giardia a los padres y a otros miembros de la familia y pueden contribuir a mantener una alta endemicidad en las comunidades (Núñez, López, Cruz, & Finlay, 2003). El aumento de la prevalencia en humanos, así como en algunos de los animales ofrece una preocupación emergente sobre el papel desempeñado por algunos animales en la Giardiasis humana. Cada individuo elimina hasta 900 millones de quistes por día. La prevalencia más alta se encuentra en áreas tropicales y subtropicales, en las zonas urbanas que en las zonas rurales, donde Giardia lamblia afecta hasta el 30% de la

población. Un estudio ha encontrado *Giardia lamblia* en el 68% de los niños de edades comprendidas entre 2 a 8 meses en Bangladesh y se ha reportado 11,08% infección por *Giardia lamblia* en un grupo de niños de 2 a 5 años de edad en Mirpur, una zona urbana en Dhaka. (Suman, Alam, Pun, & Uchida, 2011)

2.2. Tejido intestinal de la rata

A continuación, se presentan las características del tejido intestinal de la Rata comparado con el humano. (tabla 1)

Tabla No. 1 Comparación del tejido intestinal de la rata con el tejido intestinal del ser humano. (Piper M., Mark A, & Suzanne M, 2012)

| CARACTERISTICAS | | RATA | HUMANO |
|-----------------|-------------------------|---|---|
| GROSOR | Longitud | ~ 35 cm del píloro al ciego | 7 metros |
| | Duodeno | Vellosidades forma de hoja; glándulas de Brunner proximal | Vellosidades cortas y en forma de hoja |
| | Papilas duodenales | Páncreas (uno o múltiples) y los conductos biliar y común | Páncreas y conductos biliar común, se unen en la ampolla de Vater |
| TEJIDO | Mucosa | Tienen vellosidades relativamente altas; altura y forma varían según la región, la dieta, el embarazo | Tiene vellosidades relativamente cortas |
| CÉLULAS | Enterocitos absorbentes | Más abundantes; tienen microvellosidades | Son más numerosos a nivel proximal y disminuyen a nivel distal; tienen microvellosidades apicales |

La anatomía intestinal de la rata Wistar ha sido estudiada detalladamente, como se describe en la imagen 2. El estómago está fijado cranealmente por el omento menor que se extiende desde la curvatura menor del estómago hasta el hilio del hígado. En cuanto al duodeno está

sujeto por el mesoduodeno que tiene su origen hacia la derecha de la raíz del mesenterio. El pliegue duodenocólico se extiende entre la parte ascendente del duodeno y la hoja derecha del mesocolon descendente. La raíz del mesenterio da origen al mesoyeyuno y al mesoíleon desde donde derivaba la sujeción para el ciego, continuándose como pliegue ileocecal. El mesocolon ascendente se origina hacia la derecha del mesenterio y el colon transverso fijado por un corto mesocolon cranealmente a la raíz del mesenterio. El colon descendente se encuentra sujeto por el mesocolon descendente y la parte craneal del recto por el mesorrecto. (Bredo & Odo, 2010)

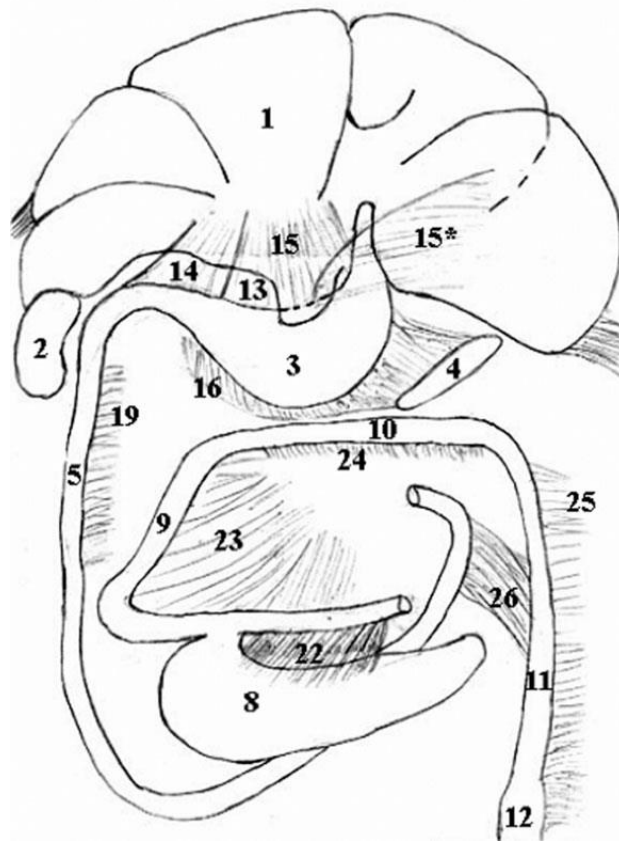


Imagen 2. Esquema donde se observan: 1 hígado, 2 riñón derecho, 3 estómago, 4 bazo, 5 duodeno, 8 ciego, 9 colon ascendente, 10 colon transverso, 11 colon descendente, 12 recto, 13 omento menor, 14 ligamento hepatoduodenal, 15 y 15* ligamento hepatogástrico, 16 omento mayor, 19 mesoduodeno, 22 pliegue ileocecal, 23 mesocolon ascendente, 24 mesocolon transverso, 25 mesocolon descendente, 26 pliegue duodenocólico. (Moller, Noelia, & Diana, 2013)

2.3. Mucosa Intestinal y Giardiasis

Siendo la Giardiasis la infección causante de manifestaciones clínicas que varían desde la infección asintomática a la enfermedad aguda o crónica asociada con diarrea y malabsorción de nutrientes, se resaltan los casos sintomáticos, donde se ha observado aplanamiento de las microvellosidades, infiltración linfocítica y malabsorción. En ocasiones, este acortamiento de las microvellosidades recuerda al de la enfermedad celíaca, sobre todo en individuos con hipogammaglobulinemia; sin embargo, no se ha observado invasión hística y a veces se ve un gran número de trofozoitos en las criptas duodenales sin evidencias de trastornos patológicos. (Procop, 2001).

La presencia de una toxina no ha sido bien y consistentemente demostrada hasta la fecha, y son pocos los mecanismos potenciales identificados a través de los cuales el protozoo pueda causar diarrea. Sin embargo, varias investigaciones han demostrado la presencia de sustancias citopáticas en los productos de excreción y secreción del parásito; dentro de las cuales se han identificado glicoproteínas, proteinasas y lectinas, las que pueden causar daño directo sobre la mucosa intestinal. Otros mecanismos propuestos incluyen disrupción del borde en cepillo y procesos inmunopatológicos, además de que se plantea la interferencia mecánica por efecto de tapizado, que pueden producir los trofozoitos adheridos al duodeno, acompañados de la inflamación consecuente (Núñez Fernández, 2004)

Se ha demostrado la presencia de una glicoproteína localizada en la superficie de los trofozoitos de *G. lamblia* (Kaur, Ghosh S, Samra, Vinayak , & Ganguly , 2001). La Giardiasis provoca una malabsorción de electrolitos y fluidos asociada con una afectación del borde en cepillo y una disminución del área de absorción, por lo que la diarrea asociada con esta parasitosis causa más bien, una malabsorción en vez de una secreción activa. 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 , Dutt , & Vinayak, 1991)

Dentro de las principales lesiones en el epitelio superficial, las cuales se deben a la acción del trofozoito y a la respuesta defensiva de la mucosa intestinal: el parásito produce inicialmente daño mecánico por acción del disco de succión ventral del trofozoito, con

disminución de la superficie de absorción. Una secreción de lectina por el trofozoito, para facilitar su adhesión a la mucosa y daño bioquímico a las células intestinales, además de secreción de proteína por el trofozoito que:

- A- bloquean la acción de la IgA secretora contra el trofozoito del parásito.
- B- lesión bioquímica contra el epitelio vellositario.
- C- promueven la apoptosis del epitelio vellositario.
- D- lesión y ruptura de las uniones del epitelio vellositario.

Por su parte, el huésped produce: hiperplasia de células caliciformes en las criptas y en el epitelio superficial, con secreción de glicoproteínas que cubren el epitelio e impiden la adherencia del trofozoito al epitelio vellositario. (Oramas, 2011). Así mismo se genera una respuesta inmune local de t8 activados citotóxicos, los cuales lesionan las microvellosidades de los enterocitos, además se genera un aumento del número de linfocitos t4 y t8, que provienen de ganglios mesentéricos, pasando de la lámina propia al epitelio, favoreciendo la apoptosis del epitelio vellositario. (Buret, 2005)

Los productos del parásito rompen la barrera epitelial, mediante el daño bioquímico a las células del epitelio vellositario, con inducción de apoptosis, lo que promueve la activación de la respuesta inmunológica de la mucosa intestinal, con secreción de IgA y la acción de t4 y de t8 citotóxicos, para eliminar los trofozoitos, que se constata con el aumento de estos linfocitos en la lámina propia y en el epitelio vellositario. (Oramas, 2011) Se ha comprobado que la respuesta inmunológica es fundamental en la lesión de las microvellosidades, en la disminución de la actividad de las enzimas disacaridasas y en la eliminación del parásito, pues en enfermos inmunodeprimidos, estas acciones están disminuidas o ausentes. (Raxstrom, Palm , Reinier , Ringqvist , & Svard , 2006)

Es importante aclarar que frente a la invasión de un agente infeccioso por vía digestiva se activa una respuesta inmunitaria a nivel de las mucosas, donde la inmunoglobulina A secretora (S-IgA) constituye el principal anticuerpo que limitará la invasión de muchos agentes patógenos. La principal función de esta inmunoglobulina es evitar la adherencia de las bacterias y los virus a las superficies epiteliales. La S-IgA refuerza a los mecanismos de respuesta inmune innata y es sintetizada principalmente por células plasmáticas o plasmocitos que se encuentran ubicados en la submucosa o en la lámina propia del tracto

gastrointestinal, ello ocurre como respuesta a la estimulación antigénica local. (Braathen, Hohman, & Brandtz, 2007)

Todas estas acciones lesivas contra el epitelio, ya sea por el parásito o por la respuesta del huésped disminuyen la masa biológica de células absorbentes, promoviendo la atrofia vellositaria en mayor o menor grado.

En cuanto a la sintomatología, la infección intestinal por el parásito *Giardia Lamblia*, puede causar diarrea aguda o crónica, deshidratación, malestar abdominal y pérdida de peso en humanos. La *Giardia* puede causar la enfermedad sin penetrar el epitelio, invadir los tejidos circundantes o entrar el torrente sanguíneo. Curiosamente, las anomalías epiteliales responsables de malabsorción intestinal y diarrea en *Giardiasis* parecen compartir similitudes con los observados en otros trastornos entéricos, tales como enteritis bacteriana, alimentaria crónica anafilaxis, enfermedad de Crohn y enfermedad celiaca. (O'Loughlin, Curtis , & Buret, 1990) Por lo tanto, una mejor comprensión de estos procesos fisiopatológicos puede ayudar a identificar nuevos blancos terapéuticos para una variedad de enfermedades gastrointestinales.

Por otra parte, estudios anteriores utilizando modelos *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la *Giardiasis* causa malabsorción de glucosa, sodio y agua, así como la reducción de la actividad de disacaridasas, debido a la pérdida de superficie del área de absorción epitelial. (Troeger, Epple, & Schneider , 2007). Las conclusiones de Troeger muestran por primera vez que, además de malabsorción, la *Giardiasis* crónica puede causar hipersecreción de cloruro en los seres humanos. Por lo tanto, una combinación de malabsorción y la secreción de electrolitos parece ser responsable de la acumulación de líquido en el lumen intestinal durante esta infección, lo cual implica que los productos de parásitos pueden romper la barrera epitelial, después de que activan los linfocitos T causando que el borde en cepillo se retraiga, lo que a su vez hace que las deficiencias de disacaridasas y malabsorción epitelial active reacciones en cascada siendo causantes de la diarrea. (Mueller & Von Allmen , 2005)

2.4. Aspectos inmunológicos en la *Giardiasis*

La literatura existente sugiere que la producción alterada de anticuerpos anti-*Giardia* es la principal razón por la cual los estados de inmunodeficiencia predisponen a infecciones

prolongadas por Giardia. (Eckmann, 2003). Desde la década de 1980 en adelante, se ha conocido que el ser humano infectado por Giardia y modelos no humanos generan respuestas de anticuerpos del suero y a nivel intestinal contra los Trofozoítos de Giardia (Heyworth & Vergara , 1994). La inmunoglobulina IgA “Anti-Giardia” está presente en la luz intestinal infectada, siendo también detectada en la leche humana. (O’Handley , Ceri, Anette, & Olson , 2003). El parásito protozooario *Giardia Lamblia* es un parásito intestinal de los seres humanos y diversos animales. Las manifestaciones de la enfermedad pueden variar de portador asintomático al portador con diarrea grave y malabsorción de nutrientes. El desarrollo de la enfermedad se piensa que está sustancialmente influido por el sistema inmune de un huésped infectado, pero los mecanismos inmunológicos relevantes para combatir la infección del parásito todavía no se entienden por completo (Eckmann, 2003). En la última década, la inmunología del parasito *G. Lamblia* fue especialmente investigada en términos de la capacidad del parásito al someterse a la variación antigénica. En *G. Lamblia*, la variación antigénica está mediada por una familia única de proteínas ricas en cisteína, las proteínas variantes de superficie (VSP). Los elementos que determinan la severidad de la Giardiasis no han sido profundamente estudiados; varios factores del huésped, como la presencia de inmunoglobulinas IgA secretora, son importantes (Faubert, 2000; Eckmann, 2003).

2.5. Lactancia materna

La lactancia materna es un proceso único que proporciona la alimentación ideal y contribuye al crecimiento y desarrollo saludable, reduce la incidencia y gravedad de enfermedades infecciosas, disminuye la morbilidad y mortalidad infantil, le confiere al niño mayor resistencia a las infecciones y rara vez causa problemas alérgicos. (Díaz Tabares, Soler Quintana, Ramos Rodríguez, & González Masón, 2001). La promoción de la lactancia materna es una estrategia básica para el control de la morbilidad y mortalidad infantil. Estudios actuales afirman que anualmente la prolongación del período de lactancia del seno materno podría salvar la vida a 1 millón de niños menores de 1 año en los países en desarrollo y los beneficios aumentan cuando el lactante es alimentado exclusivamente de forma natural durante los primeros 6 meses de vida y posteriormente se sigue, con un período prolongado de amamantamiento, combinado con una buena alimentación complementaria. (Orlando Díaz Tabares, 2001).

Algunos autores consideran que a partir de la segunda mitad del siglo XX ha existido una pérdida paulatina del hábito de lactancia natural en los países industrializados y lo que es peor aún, también en los países subdesarrollados, debido sobre todo a la gran diversidad de tipos de leche y de sus derivados industriales, así como su amplia comercialización, conjuntamente con factores socioculturales. Todo esto ha motivado una campaña a nivel mundial para la recuperación de la lactancia materna. Fundamentalmente en países subdesarrollados se ha comprobado la estrecha relación que hay entre la presencia de enfermedades infecciosas y desnutrición en los niños, con la no realización de esta importante práctica, a un grado tal, que se han señalado para Latinoamérica más de 500.000 muertes anuales por diarreas en menores de 5 años, resultantes de infecciones intestinales. (UNICEF, 2010)

Así pues, entre los principales beneficios encontrados en niños amamantados específicamente se encuentra menor frecuencia de eczema atópico, de síntomas similares al asma, mejores niveles en el neurodesarrollo, mejor agudeza visual, menor riesgo de maltrato, ligero efecto protector contra la obesidad y el sobrepeso, disminución del riesgo de síndrome metabólico, niveles algo menores de tensión arterial y colesterol en sangre, aunque esto no se comprobó que se asocie a menor riesgo de enfermedad coronaria en la edad adulta. (Rossato, 2008) Los mecanismos involucrados en todos estos aspectos beneficiosos, son la neutralización de los agentes infecciosos; por inmunoglobulinas A pasivamente transferidas, la formación de una barrera a nivel gastrointestinal, la presencia de sustancias con actividad antimicrobiana o un efecto modulador en la respuesta inmune del niño (lactoferrina, lisozima, interleukinas). Asimismo, la leche humana contiene factores bioactivos como hormonas (leptina, insulina) y presencia de ácidos grasos de cadena larga poli-insaturados. Como otro beneficio de la lactancia materna es que podría influir en la programación del eje del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (Michaelsen & Nielsen, 2007).

El mecanismo de protección de la lactancia materna es un fenómeno complejo que varía según el patógeno y por la edad de los bebés y niños. Un estudio in vitro ha demostrado que ciertos componentes de la leche no inmune son capaces de destruir los trofozoítos de Giardia. Otro estudio demostró que una lipasa inusual en la leche materna; cuya actividad era giardiácida (independiente de inmunoglobulina A secretora), destruyó rápidamente este parásito sobre la exposición a la leche humana normal, este resultado se observó in vitro.

También se reportó que la protección pasiva contra la infección por *Giardia Muris* fue conferido a ratones recién nacido a través de la leche de madres inmunes. Anticuerpos IgA secretora de *G. lamblia* se han detectado en otros estudios y podría desempeñar un papel importante contra las infecciones, como se ha demostrado contra *Campylobacter* y *Vibrio Cholerae* infecciones.

La biología de la leche humana y sus efectos en los hijos es un tema que ha generado una mayor investigación. La leche humana contiene numerosos compuestos relacionados con la inmunidad, por ejemplo, las células blancas de la sangre en vivo en la leche, una vez consumida, podría ejercer un efecto en el lactante también. En estudios con animales, parece que algunos glóbulos blancos en la leche son absorbidos en el torrente sanguíneo de la descendencia. Varios de estos componentes de la leche ofrecen protección pasiva en el sistema respiratorio superior y del tracto gastrointestinal, la prevención de la adhesión de patógenos a la mucosa y de ese modo proteger al bebé contra las infecciones invasivas. Hay datos que sugieren que la leche materna estimula el sistema inmunológico del niño (Schack-Nielsen & Michaelsen, 2007).

La evidencia de los países en desarrollo demuestra que la lactancia materna o la no lactancia materna puede ser una cuestión de vida o muerte para el niño en situación de riesgo. El riesgo relativo de muerte por infección respiratoria aguda y diarrea entre los niños que no son amamantados en los países en desarrollo ha sido estudiado, en comparación con los bebés alimentados con leche materna, la mortalidad de infantes no amamantados menores de 2 meses de edad tiene 6 veces mayor la mortalidad por infecciones respiratorias agudas y diarrea. (Organization., 2000)

Además del efecto protector de la leche humana, la alternativa a la lactancia materna en los países en desarrollo a menudo no es óptima desde ambas perspectivas nutricionales e higiénicas. En los países industrializados, con una incidencia mucho menor de enfermedades infecciosas, también hay varios estudios que demuestran que la lactancia materna protege contra las infecciones agudas. La protección parece ser más fuerte contra las enfermedades diarreicas y la otitis media. (Howie , Forsyth , Ogston , Clark , & Florey, 1990). En conclusión, la leche materna contribuye a la disminución de la prevalencia e incidencia de desnutrición, ya que es la medida más efectiva y menos costosa para evitar desnutrición durante los primeros meses de vida, también reduce el riesgo de diabetes

mellitus insulino-dependiente, el riesgo de alergias, diarreas e infección intestinales y de infección respiratoria. (Alzate Meza, Arango, Castaño Castrillón, & Vallejo Chávez, 2011)

2.6. Lactancia y Giardia

Son bien conocidas las múltiples ventajas de la leche materna para los niños y del amamantamiento para mujeres. Para niños, la composición nutricional es específica para el ser humano en sus diversas etapas de crecimiento y desarrollo; contiene factores inmunológicos y anti-infecciosos y fomenta el desarrollo psicoafectivo, entre muchas de sus ventajas. Para la madre, conlleva beneficios biológicos posparto como la pronta involución uterina, reducción de la probabilidad de cáncer de matriz y seno. Amamantar es práctico, sencillo y económico. La leche materna, acompañada de un adecuado esquema de alimentación complementaria, favorecen el crecimiento y desarrollo de niños. La Organización Mundial de la Salud (OMS), basándose en la reunión de consenso de expertos realizada en noviembre de 2007 en Washington, D.C, recomienda la lactancia exclusiva hasta los 6 meses que es un cambio de su posición del año 2005 de introducir alimentos complementarios de la leche materna entre a los 6 meses de edad. Además, se motiva a continuar amamantando al niño hasta los 24 meses de edad. Estas recomendaciones han sido reiteradas por Colombia en su Plan Decenal de Lactancia Materna 2010-2020. (MPS, 2010)

Aún cuando en Colombia la duración total de la lactancia materna (14.9 meses) y la lactancia materna exclusiva (2.2 meses) se ha incrementado, dista de las recomendaciones nacionales e internacionales. La región que presentó la menor duración fue la central (11.6 meses), y para lactancia exclusiva la Atlántica (1.2 meses). ENSIN 2010.

En el estudio de (Orlando Díaz Tabares, Aspectos epidemiológicos relacionados con el tipo de lactancia durante el primer año de vida, 2001) se identificó que el parasitismo intestinal por *Giardia lamblia* fue evidente en los casos donde se practicó la lactancia mixta o artificial y no en niños con lactancia materna exclusiva. Lo anterior se puede deber a que la leche humana contiene anticuerpos antibacterianos y antivirales con concentraciones altas de Inmunoglobulina A secretora, que impide que los microorganismos se adhieren a la mucosa intestinal. Además, la leche materna también es fuente de lactoferrina, proteína sérica ligadora de hierro, que tiene efecto inhibitor por ejemplo sobre el crecimiento de la *E. Coli* en el intestino, y adiciona de lipasa que destruye a la *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*.

2.7. Separación materna

Cuando nacen, las crías de mamíferos requieren fundamentalmente del cuidado de la madre para sobrevivir. Las necesidades específicas varían según la especie. Para la mayoría de mamíferos, la madre representa la principal fuente de alimento, calor, protección y formación esencial para el desarrollo de habilidades sociales. La pérdida de la atención materna significa una muerte casi segura por inanición o acción de depredadores. (Golubnitschaja, 2016)

Las experiencias estresantes o traumáticas que ocurren en los primeros años de vida afectan el desarrollo del cerebro y el comportamiento de los individuos, (Neigh , Gillespie , & Nemeroff , 2009). Los estudios clínicos que evalúan las consecuencias de primeras experiencias adversas tales como el abuso infantil, abandono materno y estrés psicosocial, sugieren que una historia de acontecimientos adversos podría promover el desarrollo de diversas psicopatologías. (Cicchetti & Manly , 2001) Para estudiar cómo la experiencia negativa temprana afecta el desarrollo del individuo, diversos estudios en modelos animales se han puesto en práctica incluyendo aquellas alteraciones que investigan en la interacción de las crías (Moriceau , Roth , & Sullivan, 2010). Uno de estos modelos es la separación materna temprana, el cual ha sido ampliamente utilizado como un modelo de la ansiedad, la depresión y el estrés causado por la negligencia (Duque, *et al.*) Como la separación materna es considerada un modelo de estrés (Litvin, *et al*), es posible relacionar la interrupción del vínculo maternal y de la lactancia materna con posibles consecuencias a futuro con relación a la salud y bienestar del lactante basado en dicho estrés.

En humanos las consecuencias negativas de la pérdida de la atención materna adecuada a largo plazo son el síndrome de la detención del crecimiento, la insuficiencia de conexión emocional con los cuidadores y retardo en el desarrollo neuroconductual. En los primates se ha evidenciado una profunda alteración del desarrollo del comportamiento, síntomas de una función inmune reminiscente de depresión humana durante las primeras fases de la

separación (Kuhn & Schanberg, 1998; Odeon, Yamauchi, Grosman, & Acosta, 2017; Murphy, Cohn, & Loria, 2017)

La decisión de amamantar es una decisión temprana de los padres que puede tener consecuencias importantes para el funcionamiento cognitivo y de comportamiento más tarde de un niño. El consenso predominante a partir de estudios epidemiológicos a gran escala es que los niños que fueron amamantados tienen, en promedio, más altos puntajes en las pruebas de coeficiente intelectual y el funcionamiento cognitivo en comparación con los niños que eran exclusivamente alimentados con fórmula. (Anderson, Johnstone, & Remley, 1999)

2.8. Separación materna y enfermedades gastrointestinales

Algunos estimados afirman que cada año mueren alrededor de 10 millones de niños menores de 5 años, casi la mitad de esas muertes están asociadas a desnutrición y cerca de 2 millones con diarrea. La mayor parte de esta mortalidad relacionada con diarrea ocurre en países menos desarrollados y sobre todo en niños con desnutrición. Adicionalmente, se estima que estas tasas son más altas en niños de 6 a 12 meses porque a esa edad el sistema inmune no está aun completamente maduro, los anticuerpos de la madre disminuyen y los alimentos introducidos para complementar la lactancia materna pueden estar contaminados. (Fidel Ángel Núñez Fernández, 2013)

Un estudio realizado en el año 2001 en una comunidad rural de Egipto (Mohammad A. Mahmud, 2001), tenía como objetivo identificar el efecto de la lactancia materna en las infecciones entéricas por el protozoo *Giardia Lambia*, a través del seguimiento de una población desde el nacimiento hasta el primer año de edad. En dicho estudio se encontró que los niños menores de 1 año de edad fueron los menos infectados con *G. Lambia*. Lo anterior quizá porque los lactantes están menos expuestos por el cuidado higiénico estricto de sus madres, teniendo menor contacto con otros niños, lo cual disminuye la posibilidad de transmisión directa (persona a persona). Adicionalmente de la posibilidad de un efecto protector de la lactancia materna contra la infección por este protozoo.

3. Planteamiento del problema

Las infecciones parasitarias están distribuidas prácticamente en todo el mundo con alta prevalencia en algunas regiones, afectando a individuos de todas las edades y sexos. Aunque la mortalidad de estas infecciones es relativamente baja, las complicaciones son comunes siendo responsables de al menos el 10 % de las diarreas y en muchos casos requiriendo cuidado hospitalario. (Agudelo Lopez, Gómez Rodríguez, Coronado, & Botero Palacio, 2008). Dichas infecciones constituyen aún un importante problema de salud, por sus altas tasas de prevalencia y amplia distribución mundial, sobre todo en las regiones tropicales y subtropicales. (Savioli, Bundy , & Tomkins , 1992).

Giardia Lamblia es el protozoo que con mayor frecuencia se encuentra en exámenes coproparasitoscópicos. A nivel mundial se ha estimado una frecuencia de 200 millones de individuos infectados, de los cuales 500.000 sufren enfermedad. Es la causa de diarrea en hasta un 20% de los casos en países en vías de desarrollo, pero sólo de un 3-7% en países desarrollados. (AMSE, 2013). En Colombia la prevalencia es del 12 % en la población general y del 28 % entre niños de 1 y 4 años. Según el Instituto Nacional de Salud, en la Investigación Nacional de Morbilidad realizada en 1980, se estableció que el 81,8 % de las personas en el país se encontraban parasitadas, de éstos el 63 % con parásitos patógenos y 18 % con parásitos no patógenos. (Jorge M. Giraldo-Gómez, 2005)

Por otra parte, la lactancia materna en la actualidad no es tomada como una práctica responsable, lo anterior se ve reflejado en los resultados de la Encuesta Nacional de Demografía y Salud ENDS 2010, donde se evidencia que el porcentaje de niños con lactancia materna exclusiva desciende rápidamente durante los primeros 6 meses de vida de los niños (de 63% en los primeros dos meses de vida a 24 % a los cinco meses). En cuanto a la duración de la lactancia materna exclusiva se hizo evidente que es de muy corta duración (con un promedio de 1,8 meses), siendo la recomendada hasta los 6 meses de edad. Con relación a la intensidad de la lactancia, en promedio a los niños menores de 6 meses se les amamantó 10 veces en 24 horas, distribuido en 6 veces durante el día y 4 veces por la noche. (MPS, 2010)

A pesar de que durante los últimos tiempos se ha venido tomando conciencia sobre la importancia para la salud pública de la infección por *Giardia* y de que ha aumentado el

interés por las investigaciones sobre este protozoo, aún existen muchas preguntas que no han sido respondidas totalmente. Una de esas, está relacionada con el posible efecto que tenga la separación materna durante la lactancia (estrés e interrupción e la lactancia) sobre el grado de infección por Giardia.

Teniendo en cuenta que actualmente no existen estudios que correlacionen el posible efecto del estrés temprano y la interrupción de la lactancia materna con la giardiasis, se buscar relacionar los efectos protectores de la lactancia materna, sumado a los efectos adversos del estrés, con el grado de infección. Por esta razón el presente estudio relaciona lo anteriormente mencionado en un modelo animal, con el propósito de lograr el objetivo propuesto e identificar la posibilidad de establecer bases para estudios posteriores en humanos que puedan dar cabida a recomendaciones en salud pública.

4. Justificación

La separación materna durante la lactancia se considera una experiencia que permite estudiar en el modelo animal el impacto de dicho evento estresante en la vida temprana, reflejando los efectos sobre el comportamiento y el funcionamiento fisiológico y neuroendocrino en la vida adulta. No se han reportado estudios que correlacionen los posibles efectos sobre infecciones intestinales producidas por parásitos. Un ejemplo claro de infecciones intestinales por parásitos es la causada por *Giardia Lamblia*, siendo éste un parásito con alta morbilidad tanto en países desarrollados como en los subdesarrollados, afectando principalmente a niños sobre todo en edades de 1 a 5 años. La mayoría de los individuos infectados son asintomáticos, pero algunos casos pueden desarrollar manifestaciones clínicas, que van desde trastornos digestivos ligeros hasta diarrea crónica y mala absorción intestinal. (Núñez, López, Cruz, & Finlay, 2003). Si se observa detalladamente las principales causas de morbi-mortalidad en niños menores de 5 años de edad, la enfermedad diarreica es una de ellas; por lo tanto, la prevención, control y manejo de la infección gastrointestinal por *Giardia*, se han convertido en ejes centrales de la atención primaria en salud.

Se reconoce que la lactancia materna es un proceso único que proporciona la alimentación ideal y contribuye al crecimiento y desarrollo saludable del menor; reduce la incidencia y gravedad de enfermedades infecciosas, disminuye la morbilidad y mortalidad infantil, le confiere al niño mayor resistencia a las infecciones, convirtiendo la práctica de la lactancia un factor de protección frente a distintos trastornos infecciosos (menor incidencia de gastroenteritis, de otitis media y de infecciones respiratorias bajas), efectos que persisten durante la infancia luego de suspender el amamantamiento (Rossato, 2008). En 1980, la Organización Mundial de la Salud (OMS) inició el programa de control de las enfermedades diarreicas por causas parasitarias, con el objetivo específico de reducir la mortalidad, la morbilidad y la desnutrición asociadas con diarrea en lactantes y niños preescolares, de los países subdesarrollados. (Fidel Ángel Núñez Fernández, 2013).

Dentro de los estudios que relacionan la lactancia materna con la infección por *Giardia*, son pocos en el mundo y ninguno realizado en Colombia. Entre los más destacados está el de (Mohammad A. Mahmud, 2001) cuya conclusión afirma que la lactancia materna debe ser

considerada como un medio eficaz para prevenir las infecciones por *Giardia Lamblia* y debe fomentarse en las regiones donde este parásito es altamente endémica.

En los países afectados, las infecciones parasitarias intestinales están estrechamente relacionadas a los procesos de desarrollo económico y social, ya que la malabsorción, la diarrea y la pérdida de sangre, generan disminución de la capacidad de trabajo y reducción en la velocidad de crecimiento. En poblaciones urbanas y peri urbanas, la presencia, persistencia y diseminación de los parásitos intestinales se relacionan en forma directa con las características geográficas y ecológicas específicas del lugar, así como con las condiciones de saneamiento básico disponibles y los factores socioeconómicos y culturales; por lo tanto, su control puede ser un elemento significativo social y político. (Agudelo Lopez, Gómez Rodríguez, Coronado, & Botero Palacio, 2008)

Debido a que el presente estudio se basa en la interrupción del vínculo materno, es pertinente mencionar que las crías de rata Wistar al estar expuestas a separación materna temprana durante la lactancia (SMDL), se podría influir en la periodicidad y cantidad de consumo de leche materna, aunque no se ha demostrado ni comprobado directamente a través de algún estudio. Adicionalmente son pocos los estudios que refieren el posible impacto del estrés sobre la mucosa intestinal o cómo el evento estresor influye en el sistema inmune de quien es sometido a separación materna en las primeras etapas de la vida. Por tanto, es una justificación más para que a través de los resultados obtenidos en el presente proyecto, se pueda dar apertura para otras investigaciones en humanos, las cuales puedan servir de soporte para establecer una medida de salud pública.

5. Pregunta de investigación

¿Puede la separación materna durante la lactancia incidir en el grado de infección por Giardia y en posibles cambios a nivel histológico en el intestino en modelo animal roedor?

6. Objetivos

6.1. General

Establecer si la separación materna durante la lactancia tiene efectos sobre el grado de infección por Giardia, en un modelo animal con ratas.

6.2. Específicos

1. Identificar si la interrupción del vínculo materno durante la lactancia influye en el grado de infección por Giardia en ratas Wistar.
2. Identificar los posibles cambios histológicos provocados por la infección con Giardia en el tejido intestinal del modelo animal que ha sufrido interrupción de la lactancia materna.
3. Identificar el marcador de infección intestinal por medio del conteo de eosinófilos en el tejido intestinal y su variación entre los grupos experimental y control.

7. Hipótesis

La separación materna durante la lactancia incide en el aumento del grado de infección por *Giardia Lamblia*, demostrado por medio del aumento de cambios histológicos en la mucosa intestinal del duodeno, así como el aumento de la presencia de eosinófilos en los enterocitos del duodeno de las Ratas Wistar infectadas.

8. Metodología

8.1. Diseño del estudio

- Estudio experimental controlado y aleatorizado.
- Se asignaron cuatro grupos, diferenciando hembras y machos de cada uno.
- Grupo control negativo, ratas Wistar que no se sometió a ningún procedimiento (no separación materna, no infección por Giardia)
- Grupo ratas Wistar sin separación materna durante la lactancia, pero con la inducción de la infección por Giardia.
- Grupo ratas Wistar con separación materna durante la lactancia sin la infección inducida.
- Grupo ratas Wistar con separación materna durante la lactancia más la inducción de la infección por Giardia.

8.2. Sujetos

Ratas de la cepa Wistar recién nacidas. Obtención del Bioterio de producción de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Las ratas pasaron por un proceso de habituación al medio donde estuvieron durante la experimentación, con el fin de lograr la adaptación al ciclo de luz invertido al cual fueron sometidas.

Se seleccionó el modelo animal de roedores la rata Wistar, teniendo en cuenta el protocolo de infección ya establecido por Roberts Thomson y Cols. en sus investigaciones. (ROBERTS-THOMSON, STEVENS, MAHMOUO, & WARREN, 1976) Además de soportar el modelo con el estudio realizado por Mahmood y Cols. en el cual se evidencia la posibilidad de la infección en ésta cepa. (Mahmood, Kaur, Mittal, & Mahmood, 2005)

8.3. Muestra

Para el cálculo de la muestra se utilizó la siguiente fórmula (Reynoso-Robles, Ponce-Macotela, Rosas-López, & Ramos-Morales, 2015):

$$n = \frac{Z^2 \cdot p \cdot (1-p)}{e^2} \qquad n = \frac{1,96^2 \times 0,88 \times (1 - 0,88)}{0,05^2}$$

Donde:

Z = nivel de confianza 95% (Z=1,96)

p = es la probabilidad positiva del fenómeno (88%)

e² = error de estimación (que para el 95% de confianza es de 0,0025)

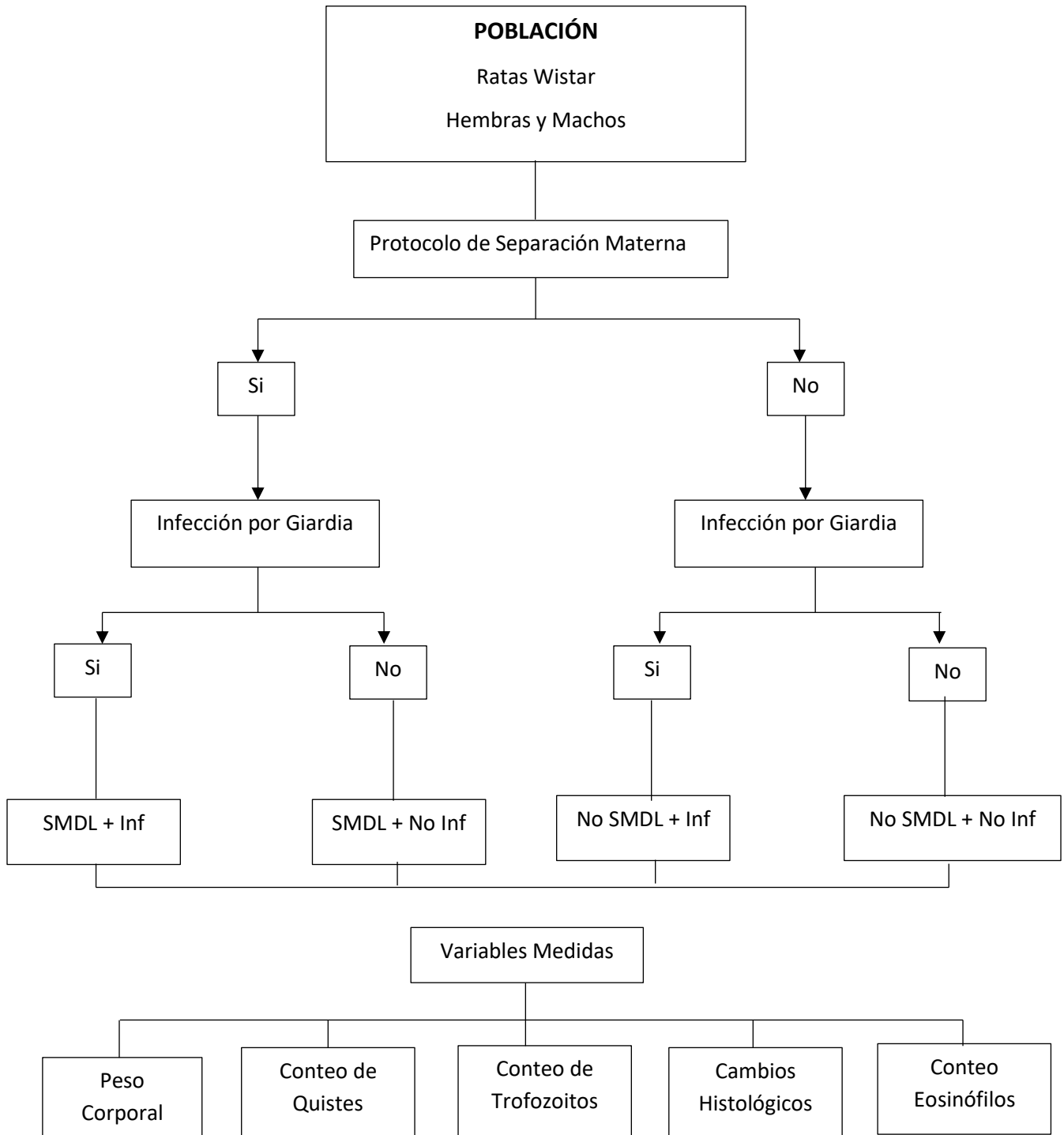
Con base en un Nivel de Confianza del 95%, se determina que el tamaño de muestra pertinente para encontrar posibles diferencias significativas es de 162, según el planteamiento de la fórmula anterior. Sin embargo, tomando como referencia el estudio realizado por J. Carl Craff y otros estudios donde se realizó inducción de infección con *Giardia* en un modelo animal (Safrun Mahmood, 2005), la muestra utilizada fue de 80 ratas. Con el fin de aplicar el principio de ética de las 3 "R" (reducción, reemplazar y refinar) se tomó en cuenta el valor "n" identificado en los estudios mencionados.

Con lo anterior se utilizaron en total 84 ratas Wistar para el presente estudio, teniendo en cuenta que se buscó una distribución aproximada del 50% para hembras y 50% para machos por cada grupo.

8.4. Definición operacional de las variables

| VARIABLES CUANTITATIVAS | DEFINICIÓN |
|-----------------------------|--|
| Grado de Infección | Recuento quistes, trofozoitos y cambios histológicos generados por el parásito <i>Giardia Lamblia</i> en el modelo animal |
| Quistes en heces | <p>Refiere al conteo de la forma vegetativa infectante y de resistencia de la <i>Giardia Lamblia</i>, en las heces de la rata. Recolección de materia fecal de la rata diaria durante 20 días post-infección. Las muestras obtenidas se disolvieron en 0,5 g de heces en 5 ml de solución salina reguladora de fosfatos (PBS) 0,1 M, pH 7,2, y así se llegó al diagnóstico parasitológico de cada muestra. (Arévalo, Duque, & Nicho, 2005)</p> <p>El conteo de los quistes se realizó utilizando un hemocitómetro (Cámara de Neubauer) y los resultados del conteo se expresaron según la fórmula por campo evaluado. (Safrun Mahmood, 2005)</p> |
| Trofozoitos | Refiere al conteo de la forma vegetativa activa de la <i>Giardia Lamblia</i> , la cual está presente en lumen del lugar de infección (intestino delgado). |
| Cambios histológicos | Refiere a los cambios de la mucosa intestinal sobre la relación vellosidad/ cripta del tejido en el intestino delgado. |
| Eosinófilos | Referente al marcador de infección aguda en el tejido intestinal. Se realizó conteo de eosinófilos que se encontraban en la vellosidad del tejido intestinal analizado. |

Gráfica No. 1. Diseño experimental



8.5. Separación materna durante la lactancia

Se utilizaron ratas Wistar, criadas con ciclo invertido luz-oscuridad (luces encendidas a las 19 horas), sin restricciones de agua ni de comida. El día de nacimiento se estableció como día posnatal cero (DPN 0). Las crías se separaron de su madre durante todo el periodo de lactancia a partir del DPN 1 y hasta el DPN 21, siendo esta separación de 180 minutos durante la mañana y 180 minutos durante la tarde. A partir del día posnatal 22 los sujetos se alojaron por sexo y tratamiento, y se mantuvieron en condiciones normales de alimentación y crecimiento hasta el tiempo establecido para el sacrificio.

Ver **Anexo No. 1** *Protocolo de separación materna durante la lactancia*



Día Postnatal 0



Proceso de Separación



Día Postnatal 18

Fotografía 1. Tomadas en los diferentes días del proceso experimental.

8.6. Infección con el parásito *Giardia*

El protocolo de infección por *Giardia Lamblia* se inicia a partir del DPN 22 de las crías de rata. Para inducir la Giardiasis se utilizó el protocolo de infección en ratas descrito por Roberts-Thomson, et al, 1976. Dicho protocolo consiste en tomar un inóculo de aproximadamente 10.000 quistes / animal en 0,2 ml de solución salina normal y administrarlo por vía oral a cada rata. Los quistes se obtuvieron a partir de las heces humanas y se purificaron en gradiente de sacarosa según el protocolo descrito en el estudio de Safrun Mahmood, 2005. Ver **Anexo No. 2** *Protocolo de Infección por Giardia*

Previo a la inducción de la infección por Giardia se realizó una recolección de heces de las crías recién destetadas, con el fin de determinar que se encontraran libres de infecciones causadas por algún otro microorganismo.

8.7. Evaluación Histopatológica de la infección – *Giardiasis*

Se analizó el curso de la infección mediante la cuantificación directa de quistes en las heces de las ratas a través de la recolección de las mismas por 20 días (disolviendo 0,5 g de heces en 5 ml de solución salina reguladora de fosfatos (PBS) 0,1 M, pH 7,2) y así se estableció el diagnóstico parasitológico a cada muestra para determinar el grado de infección de cada cría. Posteriormente se realizó el sacrificio de las crías y se realizó la extracción del tejido intestinal, el cual fue fijado con paraformaldehído (PFA) para proceder con la evaluación histológica del tejido intestinal y la observación microscópica de trofozoítos de Giardia. Se suministró sólo agua a las ratas desde el día anterior a su sacrificio para estudiar la colonización de trofozoítos de Giardia en el intestino delgado. Se practicó individualmente el sacrificio a los animales con el uso de anestesia (ketamina xilacina) aplicando una sobredosis, la cual se ajustó al peso de cada cría de rata. El sacrificio se realizó en diferentes periodos de tiempo para determinar el patrón de la infección a nivel intestinal, los periodos fueron los días post-infección: 5, 10, 15 y 20. Posteriormente se realizó el recuento de los trofozoítos liberados de manera independiente, utilizando un hemocitómetro.

Finalmente se llevó a cabo la evaluación histológica del tejido infectado a través de la observación de los cambios sobre la relación cripta/vellosidades de la mucosa intestinal de la rata. Adicionalmente se realizó el conteo de eosinófilos que se encontraban dentro de la vellosidad del intestino delgado fuera del capilar de la misma, como marcador de infección aguda. Ver **Anexo No. 3** *Protocolo de análisis de la Infección por Giardia*

8.8. Consideraciones Éticas

Este estudio se realizó cumpliendo los requerimientos de la Resolución No. 008430 de 1993 en la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Los reactivos que se utilizaron son de categoría tóxica moderada y

baja, por lo tanto, el estudio no provoca alteraciones en el medio ambiente. Cabe aclarar que este estudio es de un riesgo mínimo y que no es duplicativo ya que posee un carácter científico y que la investigadora titular goza de total experiencia para la ejecución de los procedimientos descritos en este protocolo y conoce y aplica la normatividad internacional de la CIOMS, IACUC e ICLAS.

Como ya se mencionó, este estudio se rige éticamente y responde a la nación según la Resolución 8430 de 1993 “por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud”. El Título V, Artículo 87, expone las condiciones que el equipo investigador debe seguir al emplear animales como material de investigación, y el Artículo 88 del mismo título contempla la necesidad de una justificación ante el uso de animales como herramienta didáctica en las instituciones educativas: “El uso de animales en la investigación, enseñanza y ensayos es aceptado solamente cuando promete contribuir a la comprensión y avance del conocimiento de los principios fundamentales biológicos o al desarrollo de mejores medios para la protección de la salud y el bienestar tanto del hombre como del animal” (Ministerio de Salud, República de Colombia, 1993).

Institucionalmente existe la normatividad exigida por la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional, que coincide con parte de los decretos y leyes nacionales y que establece guías, pautas internacionales y principios éticos para la investigación a nivel mundial (Vicerrectoría de Investigación, Universidad Nacional de Colombia, 2014).

Es necesario ejercer un control sobre los niveles de dolor que se producen, asegurando condiciones óptimas de cuidado. Toda forma de vida deber ser respetada y protegida; el respeto hacia los animales, en trabajos como esta investigación, no es incompatible desde el punto de vista bioético con el valor del conocimiento, “teniendo claro que respetar no es no tocar: es valorar, comprender y estimar lo que se toca y, sobre todo hacerse responsable de todo lo que se toca” (Montenegro, Gayol, & Tarrés, 2011).

Para lograr la anestesia se utiliza una combinación de sedante, analgésico y relajante muscular, fármacos aprobados por la Asociación Colombiana de Veterinarios y Zootecnistas (ACOVEZ) y cuya eficacia ha sido previamente comprobada. En este trabajo se optó por el uso aprobado de Xilacina y Ketamina, aplicado de manera intramuscular con dosis calculadas según el peso.

La comprobación de la sedación y analgesia se realizó pinzando la punta de la cola del animal, si no reacciona, pero mantiene signos vitales normales, la sedación y analgesia se considera óptima.

En cuanto a la eutanasia del animal, una vez anestesiado y sedado el espécimen, se aborda intracardiamente y se hace un aclaramiento con solución salina y posterior fijación por la misma vía, lo que inevitablemente causa su deceso; es por esta razón que previamente se ha sedado, relajado y anestesiado con una verificación segura del efecto de los fármacos empleados.

Dentro de la Resolución 8430 de 1993 se considera lo establecido en el artículo 87, en su enunciado g, que explica que todo tipo de dolor debe ser evitado con una analgesia comprobada, y en su enunciado ante el fallecimiento inminente del animal, el investigador debe asegurarse de que el mismo sea sin dolor.

De igual manera, la ley 84 de 1989 del Congreso de Colombia, establece en su capítulo V, artículo 17, los casos en los cuales se permite el sacrificio de un animal no destinado para el consumo humano, para este caso con fines investigativos o científicos (Congreso de Colombia, 1989).

Es por ello que el animal de laboratorio tiene que ser respetado como ser vivo, entender que padece necesidades y sufre dolor, por ley es obligación del personal que lo cuida, mantiene y utiliza (investigador), asegurar su bienestar y confort mientras viva. El tema ético compete a todos los individuos, pero, con mayor razón, a los involucrados en la investigación biológica, desde el auxiliar a cargo de los animales hasta el directivo de la institución productora o usuaria.

La primera condición del personal que trabaja con animales de laboratorio es el respeto por la vida, el dolor o el sufrimiento a que éstos pueden ser sometidos en los trabajos de experimentación bajo su responsabilidad. Siempre que se usen animales en investigación, se debe considerar que un objetivo tan importante como el de obtener resultados experimentales, será el de minimizar cualquier dolor o angustia que dichos animales puedan sufrir. El refinamiento de los procedimientos para conseguir que estos no causen sufrimiento debe ser parte integrante de toda investigación científica. Esto es importante tanto desde el punto de vista de la preocupación humanitaria como para cumplir con los requisitos de la legislación sobre animales de investigación. El personal que trabaje y experimente con animales está moralmente obligado a mostrar tres tipos de actitudes: respeto, afecto y gratitud.

Así mismo, la investigación realizada en animales es éticamente aceptable, si se sigue el principio de las tres R de la experimentación humanizada para con los animales, propuesta

por William Russell (zoólogo y psicólogo) y Rex Burch (microbiólogo) en 1959: Reducir, Reemplazar y Refinar.

Una vez se extrajo el material biológico, los desechos fueron dispuestos en bolsa roja para su posterior incineración. En cuanto a los reactivos utilizados en caso de ser necesario fueron neutralizados con agentes químicos, según lo establecido por el protocolo de bioseguridad del laboratorio de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

El presente trabajo tuvo la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia, soportado en el acta No. 004 – 031 – 16 del 10 de Marzo del 2016.

8.9. Análisis Estadístico

Se realizó el agrupamiento de los valores de peso para los diferentes cortes en el tiempo durante la experimentación, teniendo en cuenta etapa pre y post-infección. Posteriormente se realizó conteo total de quistes y trofozoitos. Posteriormente se agruparon los valores para identificar la media y de acuerdo con la distribución, se realizó el análisis estadístico de los datos. Se determinó la estadística descriptiva de todas las variables, luego se identificó la normalidad de las variables numéricas para llevar a cabo un análisis inferencial. Se utilizó la prueba t de Student para comparar las medias. Se consideró significación estadística cuando $p < 0,05$. Todo fue realizado con la versión licenciada 12.0 Stata paquete estadístico utilizando la prueba t de Student para datos independientes con $p < 0.05$ como significancia estadística. Un valor medio para la relación vellosidades/criptas del intestino delgado se determinó para cada rata y las diferencias entre los grupos se realizaron mediante t de Student. Adicional Para todas las variables se realizó una comparación de medias a través de un análisis de varianza (ANOVA) de un factor tomando una variable dependiente que podría ser tratamiento.

9. Resultados

9.1. Población y muestras

Para el estudio se obtuvo una muestra final de 84 ratas Wistar, con una distribución por sexo como se muestra en la Tabla No. 2. Para la variable de peso los datos incluidos fueron 36 pesos de las ratas macho y 48 pesos de las ratas hembra. Para las muestras de heces, se realizó una única recolección diferenciada por sexo de cada grupo en los diferentes cortes de análisis (días post infección 5, 10, 15 y 20). Para las muestras de tejido intestinal de la rata se realizó el análisis histológico de 40 muestras, con una distribución de aproximadamente 50% hembras y 50% machos dentro de los cuatro grupos del estudio.

Tabla No 2. Muestra final del modelo experimental (ratas Wistar)

| GRUPOS | n | MACHOS | HEMBRAS |
|------------------|-----------|---------------|----------------|
| SMADL + Inf | 22 | 13 | 9 |
| SMDL + No Inf | 16 | 8 | 8 |
| No SMDL + Inf | 20 | 7 | 13 |
| No SMDL + No Inf | 26 | 8 | 18 |
| TOTAL | 84 | 36 | 48 |

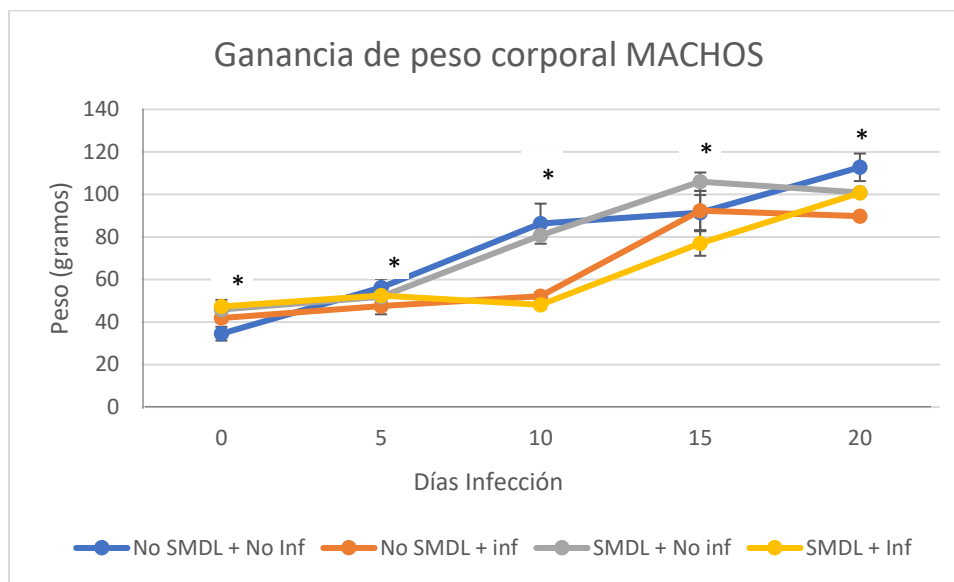


Fotografía 2. Tomada en el día postnatal 21.

9.2. Peso corporal

A continuación, se presentan los resultados de la ganancia de peso del modelo experimental en el transcurso del estudio. Se evidencia la ganancia de peso en las ratas de los 4 grupos, que va aumentando en el transcurso del tiempo, manteniéndose dentro del contexto fisiológico durante el curso de la experimentación. Para el análisis del peso de los cuatro grupos del estudio se aplicó la prueba ANOVA de un factor, teniendo en cuenta los diferentes cortes en el tiempo en los cuales se tomaron los datos: siendo el peso pre-infección (que corresponde al peso del día post-natal 22), día post-infección 5, día post-infección 10, día post-infección 15 y día post-infección 20, lo anterior discriminado por sexo. La prueba determinó que existen diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos en las cinco cortes de tiempo donde se tomaron los pesos ($p = 0,0000$).

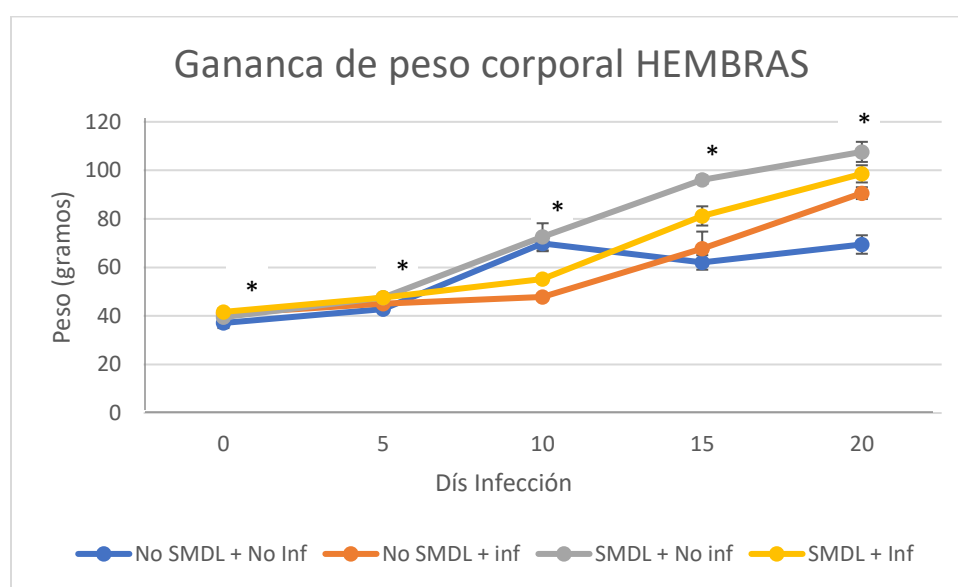
En cuanto a los machos se puede observar en la Figura 1 que la ganancia de peso es menor en el grupo con SMDL + infección en comparación con el grupo sin SMDL + infección a partir del día 10 post-infección. Así mismo es claro que la mayor ganancia de peso presentada al final del experimento se da en el grupo control total.



* $p < 0,05$.

Figura 1. Ganancia de peso corporal en gramos (gr) para los Machos durante el tiempo del experimento en cada uno de los grupos de estudio, diferenciado por los días de infección. Grupos control negativo No SMDL + No Inf ($n=9$), grupo No SMDL + Inf ($n=7$), grupo SMDL + No inf ($n=8$), grupo SMDL + Inf ($n=13$). Prueba ANOVA aplicada. Se grafica el promedio \pm Desv. Est.

Con relación a la ganancia de peso en las hembras de los diferentes grupos durante las cinco cortes analizada, se puede observar en la Figura 2 un comportamiento inverso en comparación con los machos, ya que la ganancia de peso es mayor en el grupo experimental con SMDL + infección en comparación con su control el grupo sin SMDL + infección. Así mismo se puede observar que la ganancia de peso es menor en el grupo de control negativo en comparación con los tres grupos restantes, en el último corte analizado (día 20 post-infección). El grupo que presentó mayor ganancia de peso a partir del día 5 post-infección fue el grupo que se sometió a separación sin infección.



* $p < 0,05$.

Figura 2. Ganancia de peso corporal en gramos (gr) para los Hembras durante el tiempo del experimento en cada uno de los grupos de estudio, diferenciado por los días de infección. Grupos control negativo No SMDL + No Inf (n=17), grupo No SMDL + Inf (n=13), grupo SMDL + No inf (n=8), grupo SMDL + Inf (n=9). Prueba ANOVA aplicada. Se grafica el promedio \pm Desv. Est.

9.3. Cuantificación de quistes en heces

Para determinar la normalidad de los datos se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk W test, la cual mostró que los datos son de distribución normal. Luego se aplicó el t-test para determinar las diferencias estadísticas entre el grupo experimental y su respectivo control.

Así se realizó la comparación de las medias de la cantidad de quistes totales del grupo con SMDL + Infección versus el grupo sin No SMDL + Infección, como se evidencia en la Figura 3 que las ratas del primer grupo experimental mencionado tienen mayor presencia de quistes de Giardia en comparación con su control, lo anterior con una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.0193$).

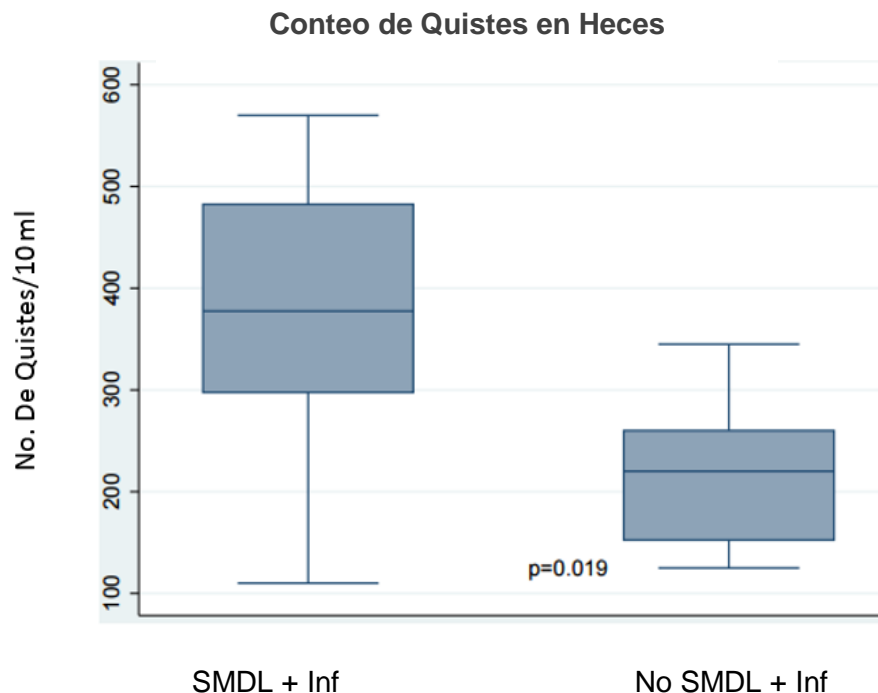


Figura 3. Conteo de quistes de Giardia totales liberados por las ratas en el grupo con SMDL + infección (n=22) en comparación con el grupo sin SMDL + infección (n=20), sin discriminación por sexo. Con una significancia estadística $p < 0,05$. Prueba t-Student aplicada. Se grafica el promedio \pm Desv. Est.

En el análisis entre los cuatro grupos se realizó la comparación de medias del conteo de quistes a través de un análisis de varianza (ANOVA) de un factor.

En la figura 4 se compara el conteo de los cuatro grupos para hembras, donde se observa que el día post-infección con mayor liberación de quistes en el experimental con SMDL + Infección fue el día 10, mientras que en el sin SMDL con Infección la mayor liberación de quistes se dio en el día 15 post-infección. La disminución del número de quistes durante el desarrollo de la infección presenta un patrón similar en el grupo experimental comparado con su grupo control. Sin embargo, al comparar el grupo experimental con SMDL + infección

con su respectivo control el grupo sin SMDL + infección se observa que para las ratas hembra no existen diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.2829$).

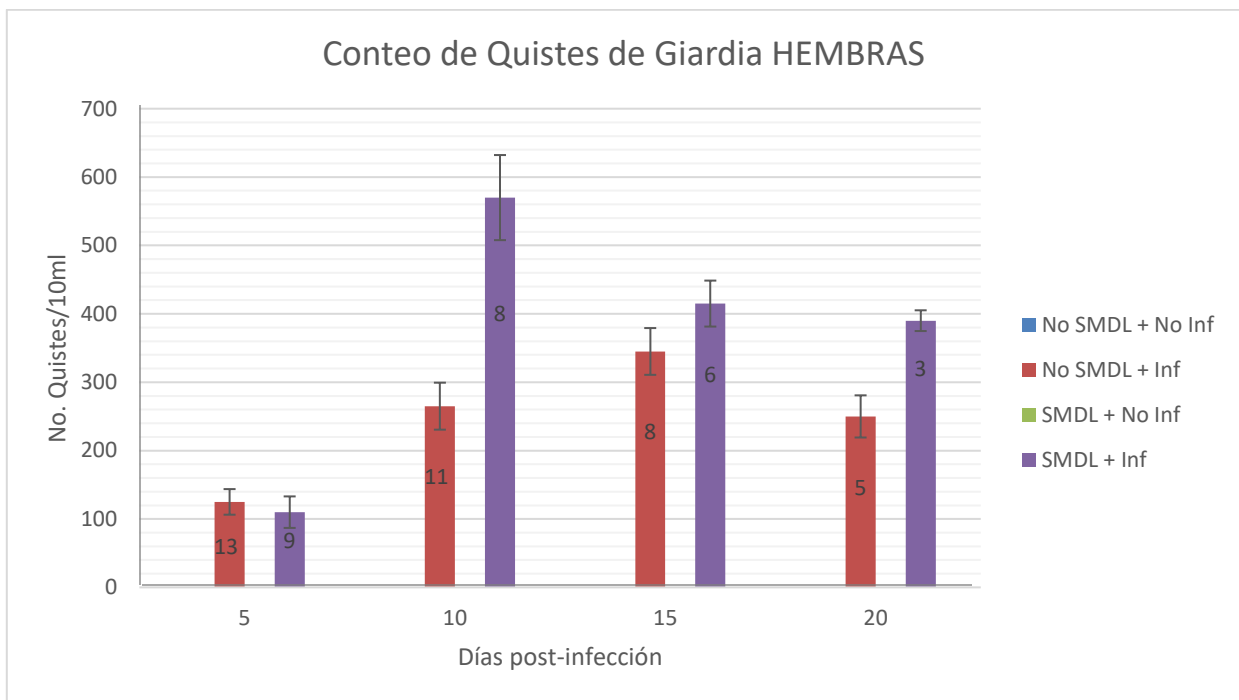
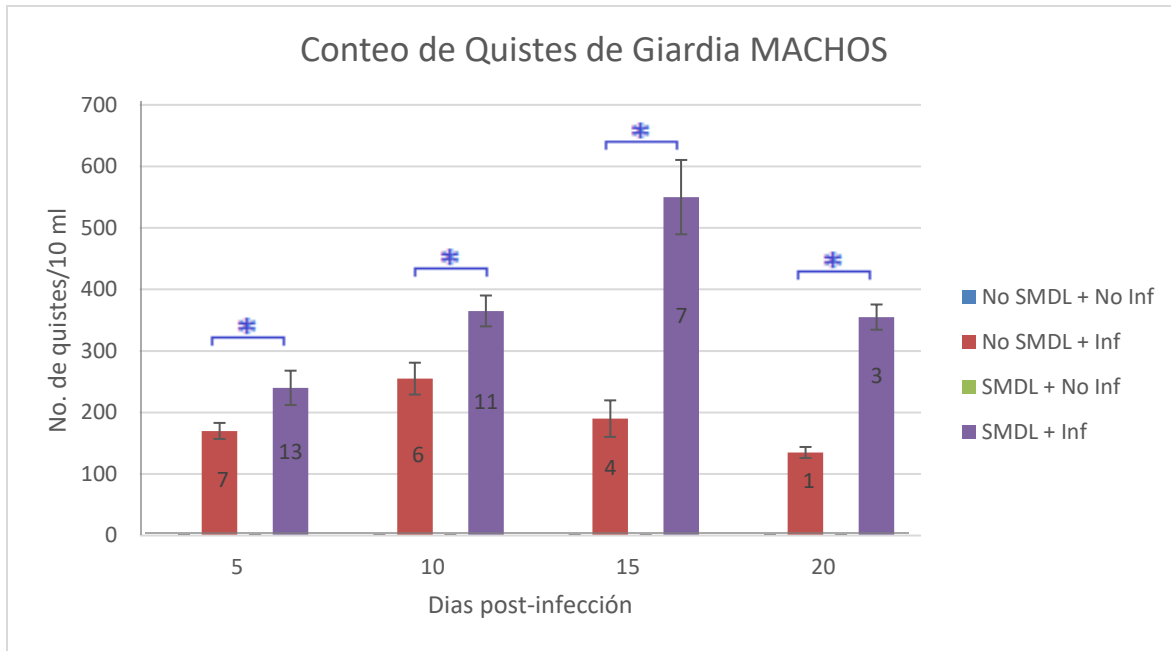


Figura 4. Conteo de quistes de Giardia en las ratas hembras para los días post-infección 5, 10, 15 y 20 en cada uno de los grupos de estudio. En los grupos sin infección no se observaron Quistes, por tanto no se evidencia barra en la gráfica. No se encontraron diferencias significativas. Prueba ANOVA aplicada. Se grafica el promedio \pm Desv. Est. El número dentro de cada barra corresponde a la n (total de sujetos analizados).

En cuanto al conteo de quistes para machos en los cuatro grupos se puede observar en la Figura 5 se compara el conteo de los cuatro grupos para machos, donde se observa que el día post-infección con mayor liberación de quistes en el experimental con SMDL + Infección fue el día 15, mientras que en el sin SMDL + Infección la mayor liberación de quistes se dio en el día 10 post-infección. La disminución del número de quistes durante el desarrollo de la infección presenta un patrón similar en el grupo experimental comparado con su grupo control. Al comparar el grupo experimental con SMDL + infección con su respectivo control el grupo sin SMDL + infección se observa que para las ratas macho si hay diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.0329$). Con relación a los grupos sin infección, no se observaron quistes durante la observación al microscopio de la muestra, por lo cual el conteo es cero y no se evidencian barras en la gráfica.



* $p < 0,05$.

Figura 5. Conteo de quistes de Giardia en las ratas machos para los días post-infección 5, 10, 15 y 20 en cada uno de los grupos de estudio. Significancia estadística $p < 0,05$. Prueba ANOVA aplicada. Se grafica el promedio \pm Desv. Est. El número dentro de cada barra corresponde a la n (total de sujetos analizados).

Adicionalmente se realizó la comparación de la liberación de quistes durante los días de recolección 5, 10, 15 y 20 post-infección en los cuales no se observan diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.7280$, $p = 0.1085$, $p = 0.1715$ y $p = 0.0958$ respectivamente). Finalmente se realizó una prueba t-test para comparar la diferencia entre hembra y macho del grupo experimental y del grupo control. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el grupo con SMDL + Inf ($p = 0.9585$) ni en el sin SMDL + Inf ($p = 0.3017$).

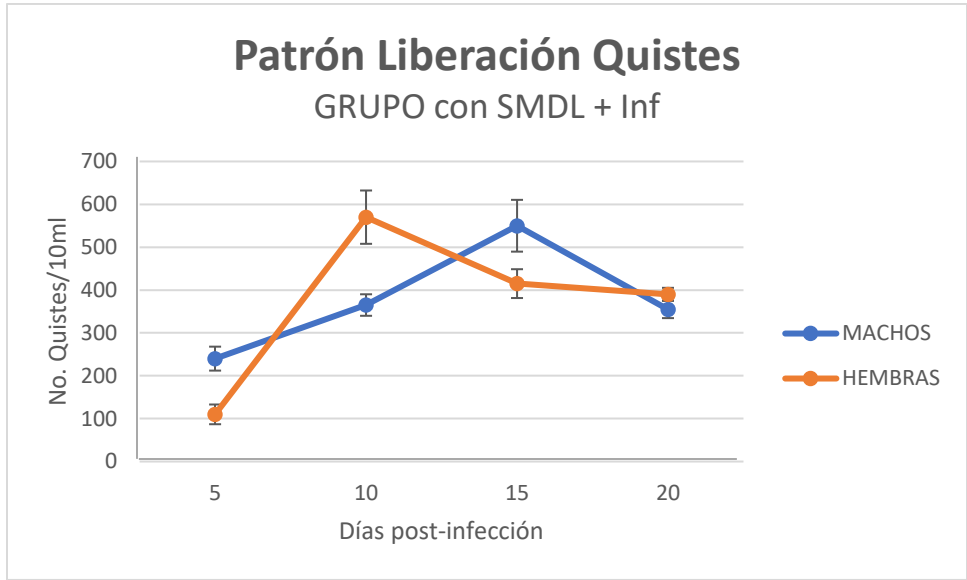


Figura 6. Patrón de liberación de quistes de Giardia del grupo SMDL + Infección en los días post-infección 5, 10, 15 y 20 comparando entre sexos: Machos (n=13) y Hembras (n=9). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Prueba t-Student aplicada. Se grafica el promedio \pm Desv. Est.

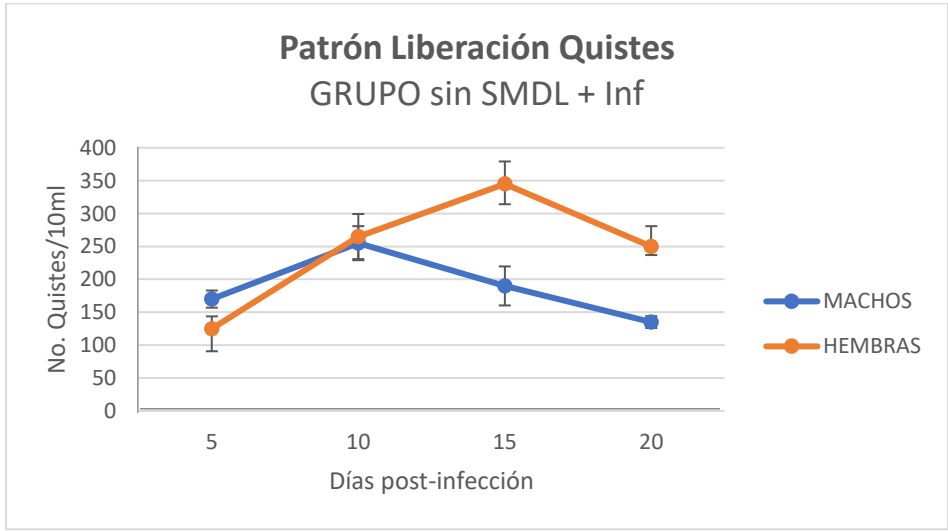
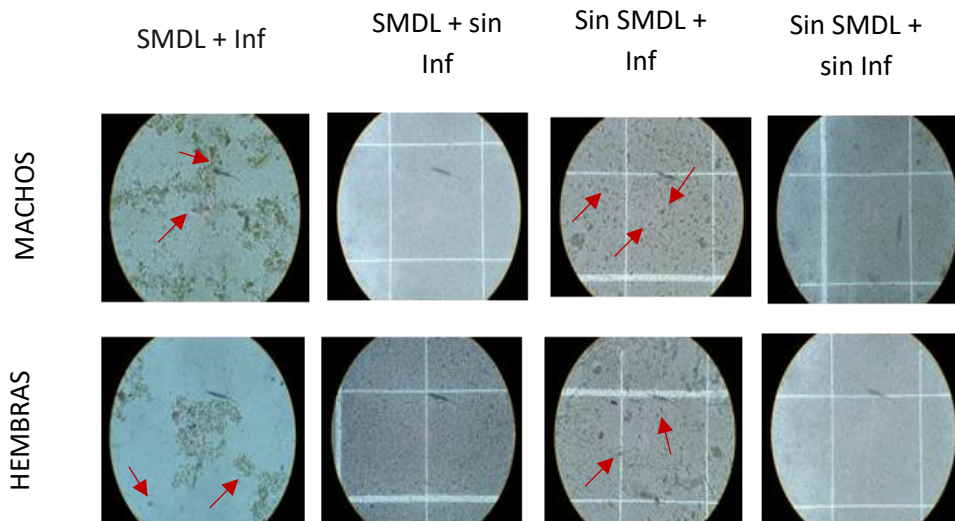


Figura 7. Patrón de liberación de quistes de Giardia del grupo 3 (sin SMDL + Infección) en los días post-infección 5, 10, 15 y 20 comparando entre sexos: Machos (n=7) y Hembras (n=13). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Prueba t-Student aplicada. Se grafica el promedio \pm Desv. Est.

En la Fotografía No. 2 se evidencia el conteo de quistes de *Giardia Lamblia* que se realizó a través de la observación microscópica a un aumento de 40 X, utilizando la cámara de Neubauer o Hemocitómetro, identificando la forma vegetativa infectante del parásito.



Fotografía 3. Evidencia del conteo de quistes por medio de microscopía a enfoque de 40 X en hemocitómetro. Las flechas señalan los Quistes de *Giardia Lamblia* observados.

9.4. Análisis histológico del tejido intestinal

El análisis histológico del tejido se realizó a través del corte, tinción y observación directa de la luz del tejido intestinal de la rata. Inicialmente se realizó la identificación de la relación vellosidad/cripta. Así mismo se realizó el conteo de los eosinófilos presentes en el tejido para determinar la posible infección aguda presente.

9.4.1. Relación Vellosidad/Cripta

El análisis de la relación Vellosidad/Cripta se realizó directamente de la observación microscópica de la luz intestinal del tejido en un enfoque de 20X. Se tomó en cuenta la altura en micras de la cripta para establecer la relación de la medida de la altura de la vellosidad a 1, es decir se representó la medida de la cripta sobre la vellosidad y se

estableció el número de veces que cabía en la altura de la misma, así se determinó la relación.

Para determinar la relación vellosidad/cripta normal se realizó la comparación con el grupo control negativo. Las medias de la relación se pueden observar en la Tabla No. 2. Al realizar la prueba de ANOVA para analizar las medias de la relación Vellosidad/Cripta de los cuatro grupos se observan diferencias estadísticamente significativas tanto para hembras ($p = 0.0004$) como para machos ($p = 0.0061$).

Tabla No 2. Medias de la relación Vellosidad/Cripta en el tejido intestinal de los cuatro grupos del estudio

| GRUPO | SEXO | MEDIA Relación Vellosidad /Cripta |
|------------------|-------------|--|
| SMDL + Inf | HEMBRA | 4/1 |
| | MACHO | 5/1 |
| SMDL + No Inf | HEMBRA | 5/1 |
| | MACHO | 4/1 |
| No SMDL + Inf | HEMBRA | 5/1 |
| | MACHO | 5/1 |
| No SMDL + No Inf | HEMBRA | 6/1 |
| | MACHO | 6/1 |

Comparando las diferencias entre los cuatro grupos, se puede observar en la Figura 8 que en las ratas Hembras hay un mayor valor de la relación vellosidad/cripta en el grupo control negativo (sin SMDL + sin Infección) y el menor valor se observa en el grupo experimental (con SMLD + infección). Así mismo se puede identificar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo experimental y su control $p = 0.7816$

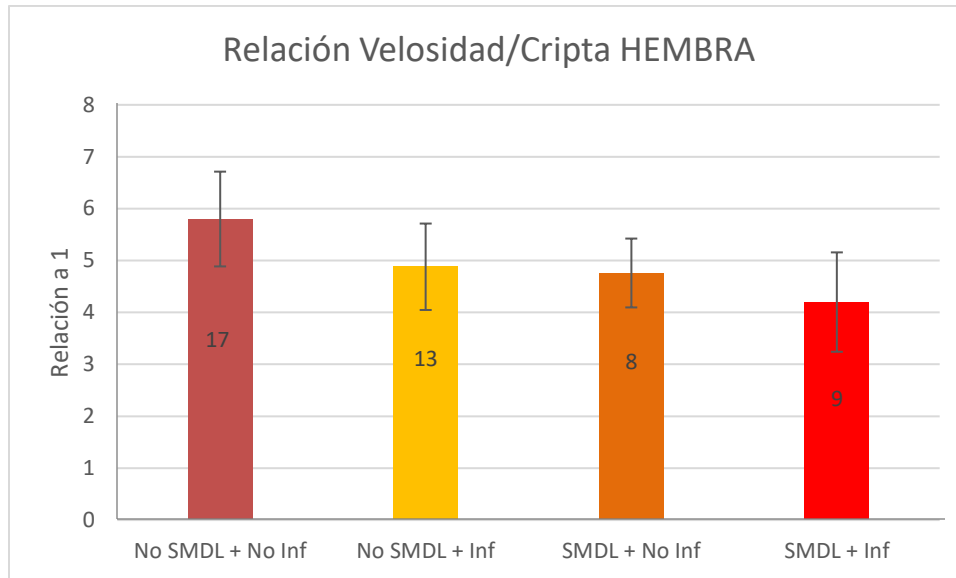


Figura 8. Medias de la Relación Velosidad/Cripta en las hembras de cada uno de los grupos del experimento. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas. El número dentro de cada barra corresponde a la n (total de sujetos analizados). La prueba ANOVA fue aplicada. Se grafica el promedio \pm Desv. Est.

Comparando las diferencias entre los cuatro grupos, se puede observar en la Figura 9 que en las ratas Machos hay un mayor valor de la relación velosidad/cripta en el grupo control negativo (sin SMDL + sin Infección) y el menor valor se observa en el grupo experimental (SMDL + sin infección). Así mismo se puede identificar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo experimental (SMDL + infección) y su respectivo control (sin SMDL + infección) $p = 0.0663$

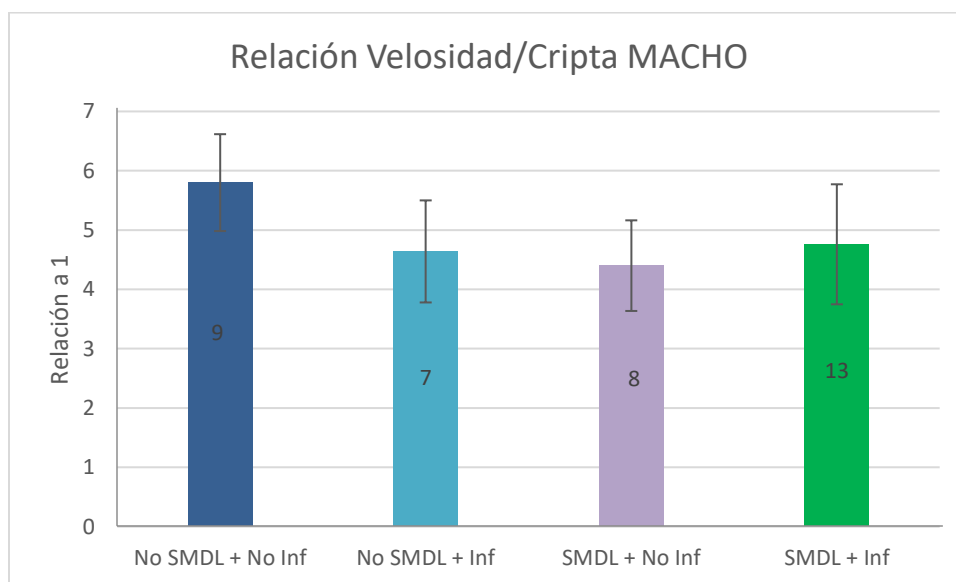
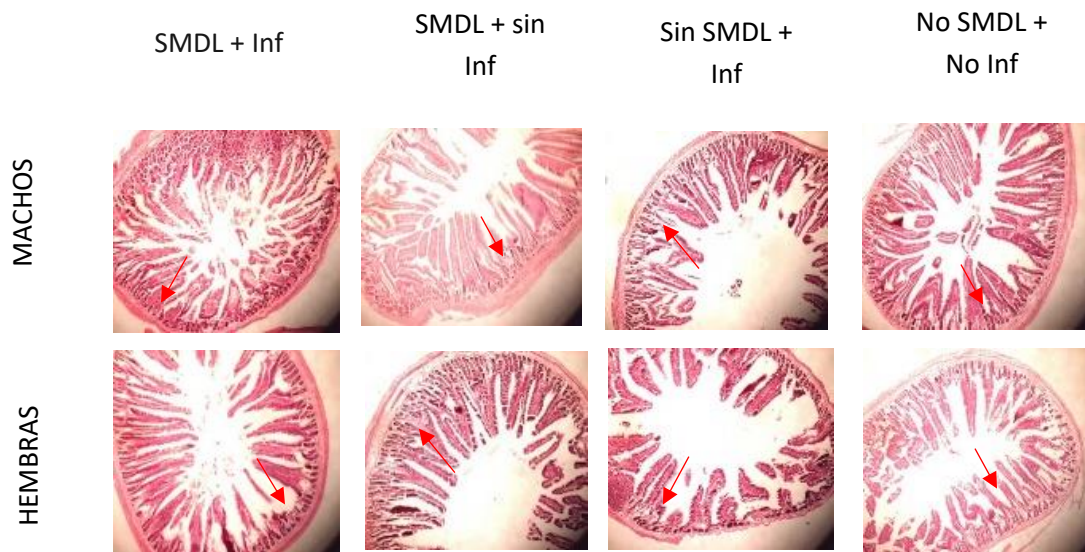


Figura 9. Medias de la Relación Velloso/Cripta en los machos de cada uno de los grupos del experimento. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas. El número dentro de cada barra corresponde a la n (total de sujetos analizados). La prueba ANOVA fue aplicada. Se grafica el promedio \pm Desv. Est.

En la fotografía No. 3 se puede observar el corte y tinción de la luz del tejido intestinal de la rata en los diferentes grupos del estudio y discriminado por sexo. Se observa un corte transversal del intestino delgado de la rata con la tinción de hematoxina-eosina a un aumento de 20 X, diferenciado por sexo y grupos del estudio.



Fotografía 4. Evidencia de la observación microscópica del análisis del tejido intestinal de la rata. Fotos tomadas en enfoque 40 X. Flechas señalan la altura de la cripta.

9.4.2. Conteo de Eosinófilos

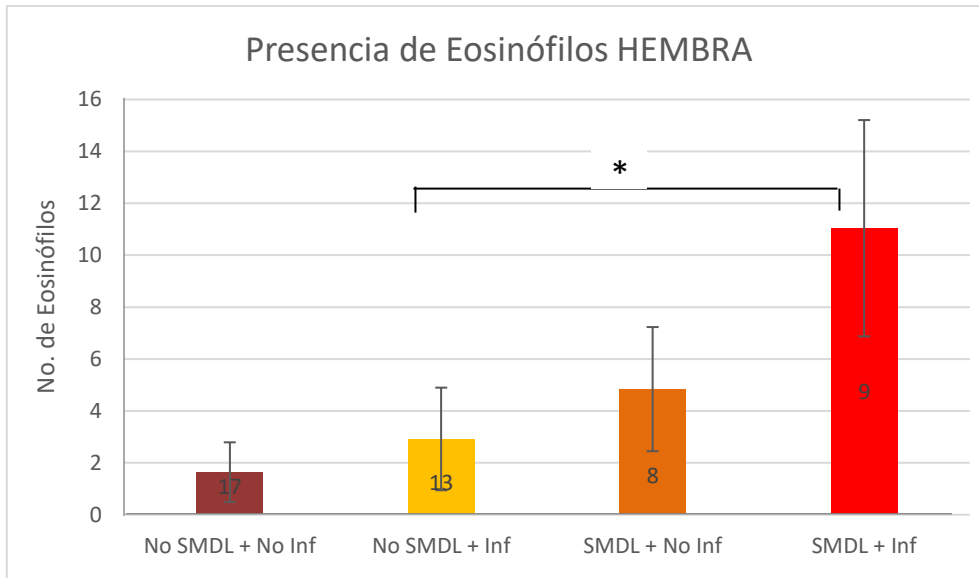
Como marcador de infección aguda se realizó el conteo de eosinófilos a través de la observación directa sobre el tejido intestinal, con el microscopio a un enfoque de 40X. Solo se tomaron en cuenta los eosinófilos que se encontraban por fuera del capilar de la vellosidad de la luz del intestino, teniendo en cuenta que las células polimorfo nucleares que se encuentran dentro del capilar de la vellosidad, se tomaron como presencia normal y no como marcador de infección aguda.

Para determinar la relación vellosidad/cripta normal se realizó la comparación con el grupo control negativo. Las medias de la relación se pueden observar en la Tabla No. 3. Al realizar la prueba de ANOVA para analizar las medias

Tabla No 3. Medias de la presencia de Eosinófilos en el tejido intestinal de las ratas de los cuatro grupos del estudio

| GRUPO | SEXO | EOSINOFILOS |
|-----------------------------|-------------|--------------------|
| SMDL + INFECCIÓN | HEMBRA | 12 |
| | MACHO | 9 |
| SMDL – SIN INFECCIÓN | HEMBRA | 5 |
| | MACHO | 3 |
| SIN SMDL + INFECCIÓN | HEMBRA | 3 |
| | MACHO | 3 |
| SIN SMDL – SIN INFECCIÓN | HEMBRA | 1 |
| | MACHO | 2 |

En la Figura 10 se puede observar que en las hembras el mayor número de eosinófilos se da en el grupo experimental (SMDL + infección) y el menor número se observa en el grupo control negativo. En cuanto a la presencia de eosinófilos como marcador de infección aguda se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo experimental (SMDL + infección) en comparación con el grupo sin SMDL + infección $p = 0.0003$. $p = 0.0000$



* p<0,05.

Figura 10. Medias de presencia de Eosinófilos en las Hembras de cada uno de los grupos del experimento. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas p<0,05. El número dentro de cada barra corresponde a la n (total de sujetos analizados). La prueba ANOVA fue aplicada. Se grafica el promedio ± Desv. Est.

Como se observa en la Figura 11 en los machos el mayor número de eosinófilos se da en el grupo 1 experimental (SMDL + infección) y el menor número se observa en el grupo 4 (control negativo). En cuanto a la presencia de eosinófilos como marcador de infección aguda se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo 1 experimental (SMDL + infección) en comparación con el grupo 3 (sin SMDL + infección) p= 0.0003.

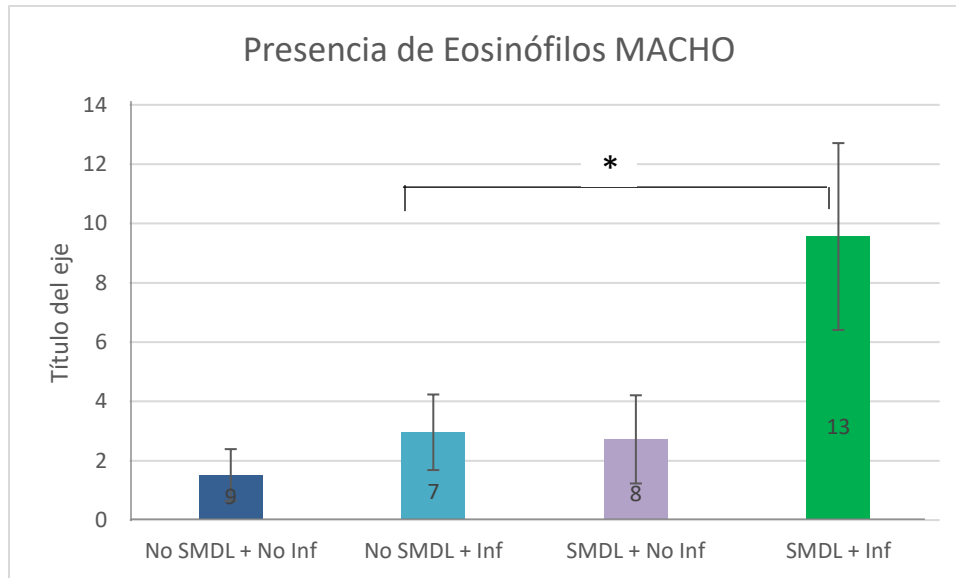
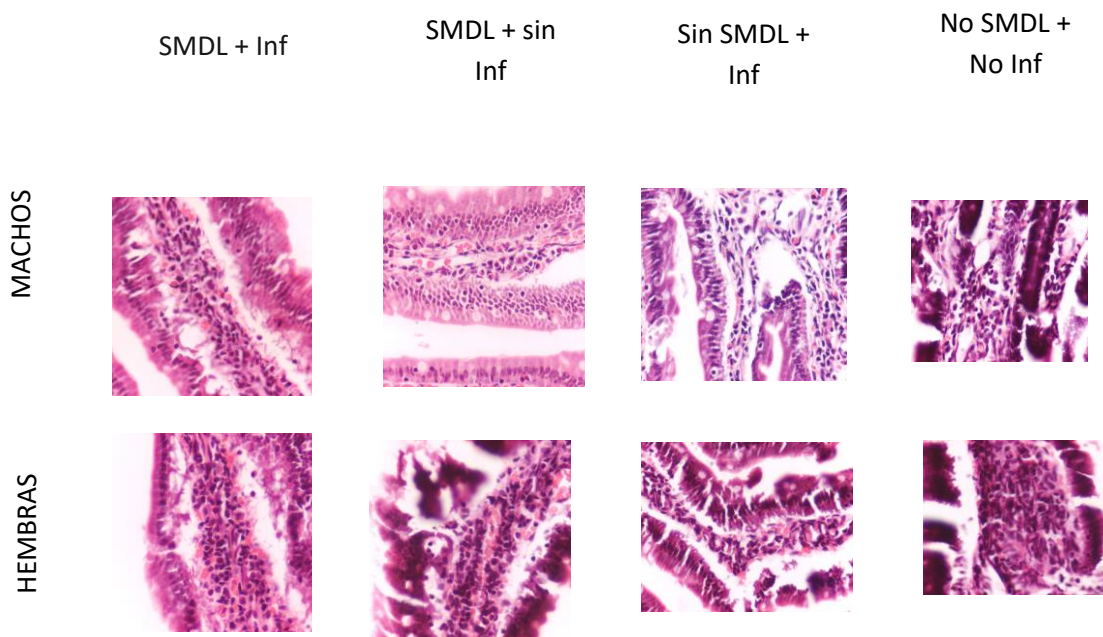


Figura 11. Medias de presencia de Eosinófilos en los Machos de cada uno de los grupos del experimento. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas $p < 0,05$. El número dentro de cada barra corresponde a la n (total de sujetos analizados). La prueba ANOVA fue aplicada. Se grafica el promedio \pm Desv. Est.



Fotografía 4. Evidencia de la observación microscópica del análisis del tejido intestinal de la rata. Evidencia de Eosinófilos. Fotos tomadas en enfoque 40 X.

9.4.3. Conteo de Trofozoitos

Con relación al conteo de trofozoitos en el tejido intestinal analizado, no se logró identificar la presencia exacta de la forma vegetativa del parásito, ya que la técnica de observación no permitió distinguir de otras formas celulares dentro de la luz del intestino de las ratas. Este aspecto no logrado será un tema para estudios posteriores en los cuales utilizando la técnica correcta como inmunohistoquímica se puedan detectar y cuantificar dichas formas y así determinar un grado de infección.

10. Discusión

El Grupo de Investigación de Neurofisiología Comportamental de la Universidad Nacional de Colombia ha realizado varios estudios utilizando un modelo animal de roedores, en los cuales se ha evidenciado alteraciones fisiológicas y comportamentales relacionadas con la ansiedad, ocasionadas por estrés que implican la disrupción del vínculo materno en la etapa neonatal. En este trabajo se optó por analizar si utilizando el mismo modelo animal de Separación Materna Durante la Lactancia, aumenta la incidencia en el asentamiento de enfermedades causadas por parásitos intestinales como la *Giardia Lamblia*. Este es el primer estudio que describe el efecto del modelo de separación materna y los efectos que tienen tanto el estrés causado como la disrupción de la lactancia sobre el grado de infección por *Giardia Lamblia*.

Es claro que el parasitismo intestinal constituye uno de los principales problemas de salud pública en países tropicales y en vía de desarrollo; sin embargo, este problema ha sido relegado a un segundo plano seguramente por su bajo índice de mortalidad y a que sus efectos son a largo plazo. En Colombia según la Investigación Nacional de Morbilidad el parásito *Giardia Lamblia* se comportó de manera ascendente en el tiempo, aumentando su prevalencia de 9,4 % reportada en 1965 a un 21,4 % en 1980. (Corredor & Arciniegas, 2000).

Entender cómo los enteropatógenos intestinales causan alteraciones agudas y crónicas tiene perspectivas directas de salud animal y humana. Se han hecho avances significativos en este campo mediante estudios sobre el parásito *Giardia Lamblia* identificando su impacto sobre la mucosa intestinal del huésped. El concepto de función de barrera intestinal es de la mayor importancia en el contexto de muchas enfermedades gastrointestinales tales como enteritis infecciosa, enfermedad inflamatoria intestinal y trastornos gastrointestinales post-infecciosos. (Allain, Amat, , Mott, Manko, & Buret, 2017)

Las infecciones debidas a *Giardia lamblia*, están probablemente entre las afecciones gastrointestinales más frecuentes causadas por los protozoos, particularmente en los niños, en todo el mundo y especialmente en los países en desarrollo. Este organismo flagelado se ha asociado con manifestaciones agudas tales como diarrea, calambres abdominales, pérdida de peso, náuseas y vómitos. (Rodríguez-Morales , Granados Álvarez, & Escudero Quintero, 2016)

Existen varios estudios que demuestran las principales manifestaciones clínicas de las infecciones de *Giardia Lamblia*, las cuales varían entre los individuos, que van desde la infección aguda hasta la infección crónica, mientras que algunos huéspedes son asintomáticos. Los pacientes con Giardiasis aguda presentan dolor abdominal, diarrea acuosa explosiva, esteatorrea, náuseas y vómito. Los pacientes con Giardiasis crónica presentan dolor abdominal, diarrea, pérdida de peso y malabsorción de nutrientes. (Cotton, Beatty , & Buret, 2011). En el presente estudio se pudo identificar cómo en las ratas Macho del grupo experimental (con SMDL + Infección) se presentó una menor ganancia de peso a partir del día post infección 10 comparado con su respectivo control. Este resultado se puede comparar con los síntomas ocasionados en la Giardiasis crónicas en infantes humanos en donde la pérdida de peso o la no ganancia del mismo en su etapa de desarrollo radica en la dificultad que empieza a tener el tejido intestinal por la absorción de los nutrientes básicos para nutrir el organismo. Así mismo se ha identificado que cuando la Giardiasis ocurre durante los primeros meses de vida, afecta el crecimiento y la función cognitiva de los recién nacidos. (Robertson, Hanevik, Escobedo, Morch, & Langeland, 2010). Con relación al comportamiento de ganancia de peso en las Hembra, se evidenció que el grupo con separación materna y sin infección fue el que presentó mayor ganancia de peso durante los 20 días analizados. Estos resultados pueden confirmar que la infección por *Giardia lamblia* si tiene un impacto sobre la ganancia de peso, ya que en los grupos que fueron infectados la ganancia total de peso fue menor.

Lo anterior se ha estudiado directamente en humanos en niños menores de 2 años, como lo indica el estudio de (Rogawski , Bartelt, & Platts-Mills, 2017), cuyos resultados mostraron que la incidencia de al menos una detección de *Giardia* fue mayor en el segundo año de vida. Cuando compararon las diferentes variables detectaron que aquellos niños con lactancia materna exclusiva, tuvieron una menor detección de *Giardia* (HR para la primera detección de *Giardia* en una muestra mensual de heces, 0,46 [intervalo de confianza del 95% (IC), 0,28-0,75]), en comparación con nivel socioeconómico (HR, 0,74 [IC del 95%: 0,56-0,97]) y otras variables medidas (0,69 [IC del 95%, 0,56-0,84]). Adicionalmente, la persistencia de *Giardia* antes de los 6 meses de edad se asoció con un déficit de -0,29 (IC del 95%, -0,53 a -0,05) en el z -score del indicador peso para la edad (P/E) y un déficit en el z- score del indicador longitud para la edad de -0,29 (IC del 95%: -0,64 a 0,07) a los 2 años. El reciente estudio mencionado anteriormente en el cual las detecciones repetidas se detectaron en el 40% de los niños sugieren que en edades tempranas persistente la

infección con *Giardia* y que se observa una alteración en la permeabilidad intestinal y una alteración en los indicadores que clasifican el estado nutricional del infante detectando una posible desnutrición aguda o riesgo en el crecimiento del menor.

Uno de los marcadores utilizados para medir el grado de infección intestinal causada por *Giardia Lamblia* en el presente estudio fue el conteo de Quistes (forma de resistencia) en la materia fecal de las ratas infectadas. Este protozoo es un parásito gastrointestinal de los vertebrados, incluyendo a los humanos, cuyo ciclo de vida se completa en un único huésped con la producción de quistes: estadios ambientales excretados por heces. (Thompson, 2004). Los resultados del presente proyecto evidencian un patrón de liberación mayor en el grupo sometido a separación materna durante la lactancia con la infección en comparación con su control que no fue sometido a separación. Lo anterior con resultados que muestran diferencias estadísticamente significativas, en donde la cantidad de quistes deja en claro un mayor grado de infección por el parásito en aquel grupo que sufrió el evento estresor temprano junto a la interrupción de la lactancia materna.

Con relación al patrón de liberación, queda claro que el día de mayor liberación de quistes de *Giardia Lamblia* fue el día 15 post-infección, resultado que coincide con los resultados evidenciados en el estudio de (Mahmood, Kaur, Mittal, & Mahmood, 2005). Lo anterior se explica por el ciclo de infección particular del parásito en estudio, en donde se identifica la duración aproximada entre el desenquistamiento, la liberación del trofozoito para colonizar la mucosa intestinal y su descenso por la luz intestinal hasta su nueva formación enquistada.

Teniendo en cuenta que *Giardia Lamblia* en su proceso de infección se adhiere a las células epiteliales del intestino delgado superior e induce grados variables de enteropatía, se realizó el estudio de los efectos que dicho parásito puede generar sobre el tejido del modelo animal infectado. Es así como se midió un marcado de alteración del tejido intestinal básico para indicar daño a nivel de la mucosa intestinal. Se reconoce que en las ratas la superficie de la mucosa está cubierta por pequeños dedos llamados vellosidades (0,5-1,5 mm), que maximizan la absorción de nutrientes aumentando en gran medida la pequeña área de la superficie intestinal. En ratas la altura de las vellosidades son casi el doble que la de los humanos, proporcionando aumento de la superficie. (Treuting, Valasek , & Suzanne M. , 2012).

La relación vellosidad/cripta se determinó como normal en el modelo animal de 5:1 a 7:1, teniendo en cuenta las mediciones realizadas por microscopio sobre el grupo control negativo, sumado al apoyo en la literatura sobre la histología del intestino en modelo animal, teniendo en cuenta que la arquitectura de las vellosidades difiere de la mucosa a lo largo de la longitud del intestino en la rata, va disminuyendo de proximal a distal (Treuting, Valasek , & Suzanne M. , 2012). En el presente estudio se logró determinar que existen diferencias observables en la gráfica; aunque no fueron estadísticamente significativas, entre los grupos experimentales infectados comparados con los no infectados, encontrándose valores de la relación vellosidad/cripta más cercanos a la normalidad en el grupo control no infectado. Adicional se observaron valores menores en los grupos infectados que tuvieron separación materna durante la lactancia, en comparación con el grupo que no fue sometido a dicho estrés temprano. Con base en la literatura, la cual indica que la altura de las vellosidades en las ratas se puede incrementar con ciertas dietas, embarazo y lactancia, y resección intestinal experimental, se puede inferir que la exposición a la interrupción de la lactancia materna y el estrés temprano tuvieron implicaciones sobre la histología intestinal de la rata, mostrando una mucosa anormal en comparación con el tejido sano del grupo control negativo.

La interacción huésped-parásito y los procesos fisiopatológicos de la Giardiasis permanecen incompletos. La investigación actual sugiere que la enfermedad diarreica inducida por *Giardia* está mediada por malabsorción intestinal y mal digestión intestinal y aumento de las tasas de tránsito del intestino delgado. (Cotton, Beatty , & Buret, 2011). Se reconocen que a malabsorción intestinal y la mala digestión del intestino delgado se derivan del acortamiento difuso inducido por linfocitos CD8 + en las microvellosidades del borde de cepillo. La activación de los linfocitos CD8 + se produce secundaria a la disfunción de la barrera del intestino delgado, que resulta de las tasas aumentadas de apoptosis de enterocitos y la interrupción de las uniones estrechas epiteliales. (Cotton, Beatty , & Buret, 2011)

Las respuestas inmunes humorales tienen un papel activo en el esclarecimiento de la *Giardia Lamblia*. Los anticuerpos secretorios específicos pueden ser citotóxicos o causar aglutinación parasitaria, inhibición de la motilidad de los flagelos o posiblemente, bloqueo de la unión al epitelio intestinal. Así es como la respuesta inmune humoral puede reflejar un aumento en la infiltración de células mononucleares que pueden ser reconocidas

histológicamente en la lámina propia del intestino. (Goka, Rolston, Mathan, & Farthing, 1986).

El contenido evaluado en el tejido intestinal extraído de las ratas para la cuantificación de las células leucos mononucleares permitió identificar el número de eosinófilos que se encontraban dentro de la vellosidad intestinal de las ratas infectadas comparados con su control, en donde se observó mayor cantidad de presencia de dichas células mononucleadas en el tejido infectado por *Giardia* en comparación con el control negativo, siendo valores mayores que el número normal en un tejido sano. Se determinó como número normal por vellosidad hasta 3 células observadas por cada vellosidad fuera del capilar sanguíneo. (Treuting, Valasek , & Suzanne M. , 2012)

Aunque poco se sabe sobre los mecanismos inmunes celulares en la Giardiasis, se ha propuesto que en la Giardiasis sintomática la inmunidad mediada por células puede contribuir al daño de la mucosa. (Kraft, 1990). Los linfocitos intraepiteliales son posibles: en efecto, se ha informado que los linfocitos intraepiteliales y los linfocitos de lámina ejercen un efecto citotóxico directo citotóxico y dependiente del anticuerpo contra *Giardia Lamblia*. (Oberhuber & Stolte, 1990)

Se sabe que el reclutamiento basal de los eosinófilos gastrointestinales está regulado principalmente por la expresión constitutiva de eotaxina-1, un miembro de la familia de eotaxinas de quimiocinas que son producidas especialmente por células epiteliales. Estas células mononucleares son varios cientos de veces más abundantes en los tejidos que en la sangre, y los números de eosinófilos son mayores en aquellos tejidos con una interfase epitelial de la mucosa con el medio ambiente, incluidos los tractos gastrointestinal y respiratorio, entre otros. (Loscher & Saathoff, 2008). En este estudio el conteo de eosinófilos extravasados en las vellosidades fue el indicador de la infección intestinal por el parásito.

Como resultado se logró observar diferencias estadísticamente significativas de los grupos experimentales infectados, entre el que fue sometido a separación materna durante la lactancia versus el no separado, tanto en hembras como en machos. Puesto que se observó mayor número de eosinófilos en el tejido intestinal de la rata perteneciente al grupo con separación materna. Lo anterior deja en evidencia que el estrés temprano y la disrupción de la lactancia materna afectaron la respuesta inmune de las ratas infectadas, aumentando el grado de Giardiasis.

Es importante reconocer los beneficios de la leche materna que tiene sobre el lactante. Es los seres humanos se sabe que, a través de la lactancia materna la transferencia de factores inmunológicos de la madre al recién nacido, que había comenzado ya en el útero, continúa postnatalmente. (Zhou , Yoshimura, Huang, Suzuki, & Yokoyama , 2000). Estos factores maternos protegen al infante de las infecciones y ayudan en el desarrollo de la mucosa intestinal del lactante, la microflora intestinal. Los lactantes amamantados tienen un menor riesgo de enterocolitis necrotizante y una menor susceptibilidad a las infecciones gastrointestinales, respiratorias y de otro tipo que los no lactados con leche materna. (Hassiotou, Hepworth, Metzger, & Filgueira, 2013). Como se mencionó al comienzo, uno de los antecedentes de este trabajo es el estudio realizado en el año 2001 en una comunidad rural de Egipto (Mohammad A. Mahmud, 2001), tenía como objetivo identificar el efecto de la lactancia materna en las infecciones entéricas por el protozoo *Giardia Lambli*a, a través del seguimiento de una población desde el nacimiento hasta el primer año de edad. Los resultados de este estudio demostraron que, en la lactancia materna exclusiva, existe la posibilidad de disminuir significativamente la frecuencia y gravedad de la infección por *Giardia Lambli*a, presuntamente a través de la exposición reducida a alimentos infantiles contaminados, agua potable y utensilios de alimentación. El estudio concluye que el mecanismo protector de la lactancia materna es un fenómeno complejo que varía según el patógeno y la edad de los lactantes y los niños. Aunque en el estudio anterior no mencionan los beneficios que por composición tiene la leche sobre el sistema inmune, es interesante lograr comprobar dichos efectos protectores. Otro estudio realizado por (Ekhlas Hamed, Usama Salah , & Mohamed Abdellatif, 2013) indicó claramente que el porcentaje de infantes infectados por parásitos protozoarios en el grupo alimentado con leche materna era significativamente menor que el del grupo no amamantado. El número de lactantes infectados con los mismos parásitos protozoarios en el grupo alimentado con leche materna también fue significativamente menor que en el grupo no amamantado. Además, la intensidad de las infecciones parasitarias fue menor en el grupo alimentado con leche materna que en el grupo no amamantado.

Estudios tanto en seres humanos como en modelo animal, han demostrado que los trofozoítos de *Giardia Lambli*a no invaden el tejido intestinal, solo habitan el lumen y las microvellosidades del intestino, donde se asocian estrechamente con el epitelio intestinal e inician los cambios fisiopatológicos. (Buret A. G., 2008). En los resultados del presente trabajo se quiso identificar la forma vegetativa del parásito en estudio, siendo el trofozoito

uno de los indicadores del grado de infección por *Giardia*, sin embargo al no utilizar la técnica correcta de detección, no se logró una clara observación de la forma vegetativa del parásito. La observación a través de microscopía convencional solo permitió detectar eventualmente dos figuras similares a los trofozoítos que no se tomaron en cuenta. Aun así, en el estudio de (Reynoso-Robles, Ponce-Macotela, Rosas-López, & Ramos-Morales, 2015) describen que tanto en seres humanos y modelos animales se ha demostrado que los trofozoítos de *Giardia* no invaden el tejido intestinal, la fisiopatología de la Giardiasis sólo ocasionalmente incluye aumento de linfocitos intraepiteliales y atrofia parcial de las vellosidades del tejido intestinal. Sin embargo el modelo utilizado en el estudio mencionado fue el Gerbo, en el cual describe que específicamente éste modelo animal es altamente susceptible a la infección por *G. lamblia* mediante la inoculación oral de quistes y trofozoitos, y muchos quistes se eliminan en las heces, lo que provoca las mismas alteraciones fisiopatológicas observadas en los seres humanos. (Amorim, 2010). En dicho estudio se observa el potencial invasivo de los trofozoitos en el tejido duodenal. Dentro de las variables identificadas se demostró una deficiencia de linfocitos B CD5 + y la deficiencia de respuestas Th1-Th2 en los Gerbos. Además indicaron que los trofozoítos de *Giardia* pueden atenuar la producción de mediadores inflamatorios de tejidos intestinales de diferentes orígenes. Los resultados anteriores permiten inferir la importancia del estudio más detallado del comportamiento de los trofozoitos en el tejido intestinal de huésped. Por tanto, será un tema de estudio para posteriores investigaciones.

Finalmente, en esta investigación se logró establecer una relación entre el efecto de la separación materna durante la lactancia y el grado de infección por *Giardia*, involucrando ambos sexos del modelo experimental, teniendo en cuenta que ambos sexos son vulnerables a desarrollar una infección parasitaria.

11. Conclusiones

- La separación materna junto a la interrupción de la lactancia es un evento estresor que influye en el aumento del grado de infección por el parásito *Giardia Lamblia* en la rata, aumentando el riesgo de enfermedad en el tejido intestinal.
- La interrupción de la lactancia materna tuvo un impacto significativo en la liberación de la forma vegetativa infecciosa (quiste), aumentando la colonización del parásito en el grupo sometido a separación materna.
- El grupo con separación materna durante la lactancia mostró mayor presencia de eosinófilos extravasados en el tejido intestinal por el aumento en la respuesta inflamatoria a la colonización por *Giardia lamblia*.
- Los resultados obtenidos en este estudio apoyan el papel protector de la lactancia materna y del vínculo materno, en el menor desarrollo de la infección intestinal por *Giardia Lamblia*.
- El vínculo materno y la lactancia materna juegan un papel importante en la disminución de la morbilidad causada por la Giardiasis, teniendo en cuenta que puede contrarrestar los efectos secundarios como lo son la malabsorción de nutrientes y las alteraciones en el crecimiento y desarrollo que llevan a la desnutrición del individuo infectado.

12. Propuestas

- Aplicar una prueba estandarizada (*IgA Rat ELISA Kit ab157735*) para lograr identificar la actividad intestinal de la inmunoglobulina IgA “Anti-Giardia” que está presente en la luz intestinal infectada por Giardia, siendo también detectada en la leche humana.
- Realizar otro tipo de observación para identificar las formas vegetativas reproducibles del microorganismo (trofozoitos) en el tejido intestinal que se vaya a analizar, por ejemplo a través de inmunohistoquímica.
- Para futuras investigaciones realizar un análisis del peso del tejido intestinal extraído de la rata, con el fin de identificar posibles efectos sobre la masa de los intestinos con base en la relación proteína:DNA y relación RNA:Proteína.
- Estudiar posibles cambios que genere un evento estresor como la separación materna durante la lactancia sobre la microbiota intestinal en un estudio transversal que involucre desde el modelo animal y humanos.

13. Bibliografía

- Diez Rodríguez, G., García Pérez, W., Wade Mateoy, M., & Douglass Malcom, B. (1995). Inmunoglobulina a secretoria en el contenido duodenal. Estudio de 120 niños. *Revista Cubana de Medicina General Integral*.
- Goka, A. J., Rolston, D. D., Mathan, V. I., & Farthing, M. G. (1986). Diagnosis of giardiasis by specific IgM antibody enzyme linked immunosorbent assay. *Lancet*, 184-186.
- Kraft, S. C. (1990). The intestinal immune response in giardiasis. *Gastroenterol*, 877-979.
- Adam , R. (2001). Biology of Giardia lamblia. *Clin Microbiol Rev* , 447-475.
- Adreollo, N. A., Santos, E. F., Rachel, A. M., & Lopes, L. R. (2012). Rat's age versus human's age: What is the relationship? *ABCD Arq Bras Cir Dig*, 49 - 51.
- Adreollo, N. A., Santos, E. F., Rachel, A. M., & Lopes, L. R. (2012). RAT'S AGE VERSUS HUMAN'S AGE: WHAT IS THE RELATIONSHIP? *ABCD Arq Bras Cir Dig*, 49 - 51.
- Agudelo Lopez, S., Gómez Rodríguez, L., Coronado, X., & Botero Palacio, L. E. (2008). Prevalencia de Parasitosis Intestinales y Factores Asociados en un Corregimiento de la Costa Atlántica Colombiana. *Salud Pública*, 633 - 642.
- Al-Emarah , G. a., & Al- Saad, R. A.-j. (2013). EXPERIMENTAL INFECTION OF CALVES BY GIARDIA LAMBLIA CYST ISOLATION FROM HUMAN. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 159 - 167.
- Allain, T., Amat , C. B., Mott, J.-P., Manko, A., & Buret, A. G. (2017). Interactions of Giardia sp. with the intestinal barrier: Epithelium, mucus, and microbiota. *Tissue Barriers*, 1-5.
- Alzate Meza, M. C., Arango, C., Castaño Castrillón, J. J., & Vallejo Chávez, S. H. (2011). A cross-sectional study of maternal breastfeeding as protection factor for prevalent diseases in children up to 5 years of age in some Colombian educational institutions, 2009. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57 - 63.
- Amorim, R. M. (2010). Giardia duodenalis: kinetics of cyst elimination and the systemic humoral and intestinal secretory immune responses in gerbils (Meriones unguiculatus) experimentally infected. *Exp. Parasitol*, 297 - 303.
- AMSE, A. (03 de 06 de 2013). *Giardiasis. Epidemiología y situación mundial*. Recuperado el 27 de 01 de 2016, de Asociación de Médicos de Sanidad Exterior AMSE: http://www.amse.es/index.php?option=com_content&view=article&id=204:giardiasis-epidemiologia-y-situacion-mundial&catid=42:inf-epidemiologica&Itemid=50

- Anderson, J. W., Johnstone, B. M., & Remley, D. T. (1999). Breast-feeding and cognitive development: a meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr*, 525-535.
- Arévalo, A., Duque, S., & Nicho, R. S. (2005). Comportamiento de la infección experimental por aislamientos colombianos de *Giardia duodenalis* en el modelo animal del gerbo (*Meriones unguiculatus*). *Biomédica - Scielo*.
- Beaver, P., Jung, R., & Cupp, E. (1984). Clinical Parasitology. En P. Beaver, *Clinical Parasitology* (págs. 52 - 56). Philadelphia: Lea and Febiger-9th ed.
- Berkman DS, D., Lescano AG, A., Gilman RH, R., & Lopez, S. (2002). Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. *Lancet*, 564-571.
- Bienenstock, J., & Befus, A. D. (1980). Mucosal immunology. *Inmunology*, 249 - 270.
- Braathen, R., Hohman, V. S., & Brandtz, P. (2007). Secretory Antibody Formation: Conserved Binding Interactions between J Chain and Polymeric Ig Receptor from Humans and Amphibians. *The Journal of Immunology*, 1589 - 1597.
- Bredo, R., & Odo, N. (2010). Divisões do aparelho digestório em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*). *Vet. e Zootec.*, 415 - 420.
- Buret, A. (2005). Immunopathology of Giardiasis: the role of lymphocytes of intestinal epithelial injury and malfunction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 185 - 190.
- Buret, A. G. (2008). Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalis*. *Parasite*, 261-265.
- Carl Craft, J. (1982). Experimental Infection with *Giardia lamblia* in Rats. *THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASE*, 495 - 498.
- Cicchetti, D., & Manly, J. (2001). Operationalizing child maltreatment: Developmental processes and outcomes. *Dev Psychopathol*, 755 - 757.
- Corrêa, G., Vilela, R., & Midlej, V. (2009). Cell death induction in *Giardia lamblia*: Effect of beta-lapachone and starvation. *Parasitology International. ELSEVIER*, 424-437.
- Corredor, A., & Arciniegas, E. (2000). Parasitismo Intestinal. *Instituto Nacional de Salud*.
- Cotton, J. A., Beatty, J. K., & Buret, A. G. (2011). Host-parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. *Parasitol*, 925 - 933.
- Díaz Tabares, O., Soler Quintana, M. L., Ramos Rodríguez, A. O., & González Masón, L. (2001). Aspectos epidemiológicos relacionados con el tipo de lactancia durante el primer año de vida. *Rev Cubana Med Gen Integr*, 336 - 346.

- Duque, A., Coman, D., Carlyle, B., Papademetris, X., George, E., & Bordner, K. (2011). Neuroanatomical changes in a mouse model of early life neglect. *Brain Struct-Funct*, 459-472.
- Eckmann, L. (2003). Mucosal defences against Giardia. *Parasite Immunology*, 259 - 270.
- Ekhlas Hamed, A. H., Usama Salah, B., & Mohamed Abdellatif, M. Z. (2013). Breast-Feeding Protects Infantile Diarrhea Caused by Intestinal Protozoan Infections. *Korean J Parasitol*, 519-524.
- Farthing, M. J. (1997). The molecular pathogenesis of giardiasis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr*, 79-88.
- Faubert, G. M. (1996). The immune response to Giardia. *Parasitol*, 140 - 145.
- Fidel Ángel Núñez Fernández, S. M. (2013). Hallazgos epidemiológicos en infecciones parasitarias intestinales de un grupo de niños ingresados por diarreas. *Revista Cubana de Medicina Tropical*.
- Golubnitschaja, O. D. (2016). Breast cancer epidemic in the early twenty-first century: evaluation of risk factors, cumulative questionnaires and recommendations for preventive measures. *Tumor Biol*, 12941-12957.
- Hassiotou, F., Hepworth, A. R., Metzger, P., & Filgueira, L. (2013). Maternal and infant infections stimulate a rapid leukocyte response in breastmilk. *Clinical & Translational Immunology*, 1 - 10.
- Heyworth, M., & Vergara, J. (1994). Giardia muris trophozoite antigenic targets for mouse intestinal IgA antibody. *Journal of Infectious Diseases*, 395 - 398.
- Howie, P., Forsyth, J., Ogston, S., Clark, A., & Florey, C. (1990). Protective effect of breast feeding against infection. *BMJ*, 6 - 11.
- Jorge M. Giraldo-Gómez, F. L. (2005). Prevalencia de Giardiasis y Parásitos Intestinales en Preescolares de Hogares atendidos en un programa estatal en Armenia, Colombia. *Revista Salud Pública*, 327 - 338.
- Kaur, H., Ghosh S, S., Samra, H., Vinayak, V., & Ganguly, N. (2001). Identification and characterization of an excretory-secretory product from Giardia lamblia. *Parasitology*, 347-356.
- Kuhn, C., & Schanberg, S. (1998). Responses to maternal separation: mechanisms and mediators. *Int J Devl Neuroscience*, 3(4), 261-70.

- Litvin, Y., Tovote, P., Pentkowski, N., Zeyda, T., King, L., & Vasconcellos, A. (2010). Maternal separation modulates short-term behavioral and physiological indices of the stress response. *HormBehav*, 241 - 249.
- Loscher, T., & Saathoff, E. (2008). Eosinophilia during intestinal infection. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 511-536.
- LUJAN, H. D. (2006). GIARDIA Y GIARDIASIS. *MEDICINA (Buenos Aires)*, 70 - 74.
- Luján, H. D. (2006). Giardia y giardiasis. *Medicina (Buenos Aires)*. SCIELO.
- Mahmood, S., Kaur, K., & Mitta, N. (2005). Giardia lamblia: Expression of alkaline phosphatase activity in infected rat intestine. *Experimental Parasitology*, 91 - 95.
- Mahmood, S., Kaur, K., Mittal, N., & Mahmood, A. (2005). Giardia lamblia: Expression of alkaline phosphatase activity in infected rat intestine. *Experimental Parasitology*, 91 - 95.
- Martínez Fernández, A. R., Sáñez Acedo, C., & Hernandez Rodríguez, S. (2002). *Parasitología Veterinaria*. Madrid - España: Mc Graw Hill - Interamericana.
- Michaelsen, K. F., & Nielsen, L. S. (2007). Advances in Our Understanding of the Biology of Human Milk and Its Effects on the Offspring. *The Journal of Nutrition*, 503-510.
- Mohammad A. Mahmud, C. L. (2001). Impact of Breastfeeding on Giardia Lamblia Infections Inbilbeis, Egypt. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 257-260.
- MOHAMMAD A. MAHMUD, C. L. (2001). IMPACT OF BREAST-FEEDING ON GIARDIA LAMBLIA INFECTIONS INBILBEIS, EGYPT. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 257-260.
- Moller, R., N. V., & D. T. (2013). Peritoneo del Aparato Digestivo de la Rata Wistar (Rattus norvegicus). *International Journal of Morphology*, 128 - 130.
- Moriceau, S., Roth, T., & Sullivan, R. (2010). Rodent model of infant attachment learning and stress. *Dev Psychobiol*, 251 - 260.
- MPS, M. d. (2010). *Encuesta Nacional de Demografía y Salud ENDS*. Bogotá.
- Mueller, N., & Von Allmen, N. (2005). Recent insights into the mucosal reactions associated with Giardia lamblia infections. *Int J Parasitol*, 1339 - 13347.
- Murphy, M., Cohn, D., & Loria, A. (2017). Developmental origins of cardiovascular disease: Impact of early life stress in humans and rodents. *Neurosci Biobehav Rev*, 74, 453-465.
- Nain, C., Dutt, P., & Vinayak, V. (1991). Alterations in enzymatic activities of the intestinal mucosa during the course of Giardia lamblia infection in mice. *Ann Trop Med Parasitol*, 515-522.

- Neigh , G., Gillespie , C., & Nemeroff , C. (2009). The neurobiological toll of child abuse. *Trauma Violence Abuse*, 389-410.
- Núñez Fernández, F. A. (2004). *Estudio de factores asociados con la reinfección por Giardia lamblia en niños de círculos infantiles*. La Habana: SUBDIRECCIÓN DE PARASITOLOGÍA.
- Núñez, F. Á., López, J. L., Cruz, A. M., & Finlay, C. M. (2003). Factores de riesgo de la infección por Giardia lamblia en niños de guarderías infantiles de Ciudad de La Habana, Cuba. *Cadernos de Saúde Pública*.
- Nygård, K., Schimmer, B., & Aavitsland, P. (2006). A large community outbreak of waterborne giardiasis- delayed detection in a non-endemic urban area. *BMC Public Health* , 1 - 10.
- O'Handley , R., Ceri, H., Anette, C., & Olson , M. (2003). Passive immunity and serological immune response in dairy calves associated with natural Giardia duodenalis infections. *Veterinary Parasitology*, 89-98.
- O'Loughlin, E., Curtis , G., & Buret, A. (1990). Effect of acute Yersinia enterocolitica infection on small intestinal ultrastructure. *Gastroenterology*, 1401 -1407.
- Oberhuber, G., & Stolte, M. (1990). Giardiasis: analysis of histological changes in biopsy specimens of 80 patients. *J Clin Pathol*, 641-643.
- Odeon, M., Yamauchi, L., Grosman, M., & Acosta, G. (2017). Long-term effects of repeated maternal separation and ethanol intake on HPA axis responsiveness in adult rats. *Brain Res*, 1657, 193-201.
- OMS, O. M. (1987). *Infección y control de las infecciones parasitarias intestinales*. Ginebra, Suiza: Organización Panamericana de la Salud.
- Oramas, D. C. (2011). ALTERACIONES HISTOLÓGICAS Y SUS MECANISMOS, EN LA MUCOSA YEYUNAL, DEBIDAS A GIARDIA LAMBLIA. . *ALTERACIONES HISTOLÓGICAS Y SUS MECANISMOS, EN LA MUCOSA YEYUNAL, DEBIDAS A GIARDIA LAMBLIA.* , (págs. 1 -18).
- Organization., W. H. (2000). Effect of breastfeeding on infant and child mortality due to infectious diseases in less developed countries: a pooled analysis WHO Collaborative Study Team on the Role of Breastfeeding on the Prevention of Infant Mortality. *Lancet*, 451 - 455.
- Orlando Díaz Tabares, M. L. (2001). Aspectos epidemiológicos relacionados con el tipo de lactancia durante el primer año de vida. *Rev Cubana Med Gen Integr*, 336-343.
- Orlando Díaz Tabares, M. L. (2001). ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS RELACIONADOS CON EL TIPO DE LACTANCIA DURANTE EL PRIMER AÑO DE VIDA. *Rev Cubana Med Gen Integr*, 336-343.
- P. T., M. V., & S. D. (2012). *Upper Gastrointestinal Tract*. Seattle, WA, USA: Elsevier. University of Washington School of Medicine.

- Ponce , M., González, A., Reinoso, R., & Martínez , M. (2007). Globet cells: are they an unspecific barrier against *Giardia intestinalis* or a gate? *Parasitol*, 88-92.
- Procop, G. (2001). Gastrointestinal Infections. *Infect Dis Clin North Am*, 1037 - 1108.
- Raxstrom, K., Palm , D., Reinier , D., Ringqvist , E., & Svard , S. (2006). *Giardia* immunity an update. *Trends in Parasitology*, 27 - 21.
- Reynoso-Robles, R., Ponce-Macotela, M., Rosas-López, L. E., & Ramos-Morales, A. (2015). The invasive potential of *Giardia intestinalis* in an in vivo model. *Scientific Reports* , 1 - 8.
- Robertson, L. J., Hanevik, K., Escobedo, A. A., Morch, K., & Langeland, N. (2010). Giardiasis – why do the symptoms sometimes never stop? *Trends Parasitol*, 75-82.
- ROBERTS-THOMSON, I. C., STEVENS, D. P., MAHMOUO, A. A., & WARREN, K. S. (1976). GIARDIASIS IN THE MOUSE: AN" ANIMAL MODEL. En I. C. ROBERTS-THOMSON, *Gatroenterology* (págs. 57 - 61). USA: The Williams & Wilkins Co.
- Rodríguez-Morales , A. J., Granados Álvarez, S., & Escudero Quintero, H. (2016). Estimating and mapping the incidence of giardiasis in Colombia, 2009–2013. *International Journal of Infectious Diseases*, 204 - 209.
- Rogawski , E., Bartelt, L., & Platts-Mills, J. (2017). Determinants and Impact of *Giardia* Infection in the First 2 Years of Life in the MAL-ED Birth Cohort. *J Pediatric Infect Dis Soc.* , 153-160.
- Roitt , I. M. (1991). *Inmunología*. Barcelona: Salvat.
- Rossato, N. (2008). Breast feeding and immunity. New aspects. *Arch Argent Pediatr*, 385-386.
- Safrun Mahmood, K. K. (2005). *Giardia lamblia*: Expression of alkaline phosphatase activity in infected rat intestine. *Experimental Parasitology*, 91 - 95.
- Savioli, L., Bundy , D., & Tomkins , A. (1992). Intestinal parasitic infections: a soluble public health problem. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86:353-4. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 353-354.
- Schack-Nielsen , L., & Michaelsen, K. F. (2007). Advances in Our Understanding of the Biology of Human Milk and Its Effectson the Offspring. *The Journal of Nutrition*, 503 - 510.
- Stitis , D. P. (1991). *Basic and Clinical Immunology*. California: Appleton and Lange: 7 ed. San Maceo.
- Suman, M. S., Alam, M. M., Pun, S. B., & Uchida, R. Y. (2011). PREVALENCE OF GIARDIA LAMBLIA INFECTION IN CHILDREN AND CALVES IN BANGLADESH. *Bangladesh Society of Veterinary Medicine* , 177 – 182.
- Thompson, R. (2004). The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitol*, 15–35.

- Treuting, P. M., Valasek , M. A., & Suzanne M. , M. (2012). Upper Gastrointestinal Tract. En P. M. Treuting, *Comparative Anatomy and Histology* (págs. 155- 175). Seattle: Elsevier.
- Troeger, H., Epple, H.-J., & Schneider , T. (2007). Effect of chronic Giardia lamblia infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut*, 328-335.
- UNICEF. (2010). Alimentación y Nutrición del niño pequeño. *UNICEF - OMS - PMA*.
- Upcroft , J., & Upcroft , P. (1998). My favorite cell: Giardia. *Bioessays*, 256 - 263.
- Vargas DE, D. E., & Bedoya, M. (2010). La separación materna temprana provoca disminución en las conductas maternas y de autocuidado en hembras adultas. *Tesis psicológica. Facultad de Psicología*, 57 - 75.
- Yebra Yebra, M. J., Pérez Martínez, G., & Sarmiento Rubiano, L. A. (2008). *INFLUENCIA DEL CONSUMO DE SORBITOL EN LA MICROBIOTA INTESTINAL DE UN MODELO AMINAL*. Valencia: UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA.
- Yel, L. (2010). Selective IgA Deficiency. *Journal of Clinical Immunology*, 10 - 16.
- Zhou , L., Yoshimura, Y., Huang, Y., Suzuki, R., & Yokoyama , M. (2000). Two independent pathways of maternal cell transmission to offspring: through placenta during pregnancy and by breast-feeding after birth. *Immunol* , 570 - 580.
- Zinneman, H. H., & Kaplan, A. P. (1972). The association of giardiasis with reduced intestinal secretory immunoglobulin A. *American Journal of Digestive Diseases*, 793 -797.

14. ANEXOS

ANEXO No. 1. PROTOCOLO DE SEPARACIÓN MATERNA DURANTE LA LACTANCIA RATAS WISTAR BIOTERIO EXPERIMENTAL MEDICINA VETERINARIA

NOTA: El día del nacimiento es considerado día cero (Do). El protocolo va del día 1 al día 21.

1. Se verificar la disponibilidad de un cuarto que no esté pegado al que tiene los sujetos.
2. Llevar el calentador al cuarto de separación y conectarlo. Verificar que el ventilador y la temperatura estén en 1 y 3 respectivamente, donde están las marcas rojas.

3. Tomar la jaula con la camada, sacar cuidadosamente la mamá a otra jaula, contar las crías e ir las colocando con un poco de su mismo aserrín y complementarlo con aserrín nuevo, en una jaula pequeña y taparla.
4. Marcar la jaula con las crías separadas que coincida con la camada.
5. Si es necesario cambiar la cama de la jaula realizar el cambio de una vez.
6. Retornar a la mamá a su jaula y marcar con fecha de inicio del protocolo de Separación.
7. Continuar así con cada camada verificando que todas queden en promedio con el mismo número de crías, es decir si alguna tuvo más o menos que otra, se contrabilancean colocando crías de otras camadas tratando de mezclar el aserrín y unir las bien para que no haya rastros de olor diferente.
8. Llevar las crías al cuarto calentico y dejarlas sobre una caja de icopor, sobre una mesa o sobre una jaula (no directamente sobre el piso) a una distancia entre 30 y 50cms del calentador
9. Repetir el procedimiento con cada camada.
10. Siempre debe quedar al menos una camada control por dos separadas ojalá todas nacidas en la misma fecha o muy cercana.
11. Al completar 3 horas de separación se desconecta el calentador y se retornan las crías a la mamá.

ANEXO No. 2 PROTOCOLO DE INFECCIÓN CON GIARDIA EN RATAS WISTAR

NOTA: Antes de realizar la inducción de la infección por Giardia, se realizó una recolección de heces a las crías recién destetadas con el fin de determinar que se encontraran libres de infecciones causadas por algún otro microorganismo. Lo anterior se realizó a través del análisis microscópico de la muestra.

Preservación de quistes del parásito

1. La muestra inicial es la recolección de muestras de materia fecal de heces de pacientes con Giardiasis.
2. Diluir las muestras de heces (1:10) con agua destilada filtrada a través de cuatro capas de gasa.
3. Almacenar el filtrado a 4°C hasta cuando vaya a ser utilizado.

Aislamiento del inóculo de quistes

1. Homogenizar 5 ml del filtrado de materia fecal almacenado a 4°C y completar a un volumen de 14 ml con agua destilada.
2. Lavar el filtrado mediante centrifugación a 400 g (2114 rpm) durante 5 minutos a 18°C y resuspender el sedimento con agua destilada.
3. Adicionar a 3 ml de suspensión fecal unos 2,5 ml de sacarosa 1 M en un tubo de plástico y se centrifuga a 400 g (2114 rpm) durante 15 min a 20 ° C, como resultado los quistes se concentran en la interfase sacarosa-agua.
4. Remover los quistes de Giardia concentrados en la interfase agua-sacarosa, retirarlos cuidadosamente con una pipeta pasteur.
5. Lavar la resuspensión en 4 ml de solución salina normal, para sedimentar por centrifugación a 600 g (2590 rpm) durante 10 min.
6. Retirar el sobrenadante de quistes y resuspender en solución salina normal para contar los quistes en una cámara de hemocitómetro.
7. Verificar a través de observación la presencia de los quistes.
8. Volver a resuspender en 1 ml de agua destilada y guardar la suspensión a 4°C

Infección experimental en ratas Wistar

- 1.** Infeccionar los grupos experimentales # 1 (SMDL + INF) y # 3 (NO SMDL + INF) Cada grupo con un número de animales de 20 (aproximadamente el 50% serán hembras y el 50% machos).
- 2.** Se realizará a través de un inóculo entre 5.000 a 10.000 quistes / animales en 0,2 ml de solución salina normal.
- 3.** Un día previo al suministro del inóculo, dejar a las crías de rata sin agua, con el fin de garantizar la toma de la solución.
- 4.** El día de infección: suministrar vía oral por medio de tubos de Ryle o a través de una aguja de punta roma de calibre 18 o a través de goteros los 0,2 ml de solución salina con los quistes a cada cría de rata.

ANEXO No. 3 PROTOCOLO DE ANÁLISIS DE LA INFECCIÓN CON GIARDIA EN RATAS WISTAR

Estudio de la infección experimental

1. Recolectar la materia fecal de cada una de las ratas Wistar durante 20 días consecutivos (días post-infección: 5, 10, 15 y 20) para establecer el patrón de liberación de quistes de Giardia.
2. Homogenizar la muestra con solución salina normal.
3. Adicionar una solución conservadora como formaldehído (PFA) 4%.
4. Almacenar hasta su uso.
5. Disolver 0,5 g de heces en 5 ml de solución salina reguladora de fosfatos (PBS) 0,1 M, Ph 7,2 para el diagnóstico parasitológico de cada muestra.
6. Realizar observación microscópica de quistes y trofozoítos de Giardia y la cuantificación de los mismos

Cuantificación de quistes y trofozoítos de Giardia

La cuantificación de quistes y trofozoítos del parásito de manera independiente, utilizando un hemocitómetro (como medida de tendencia central será la media). Los resultados del conteo de trofozoítos se deben expresar como número de trofozoítos por mililitro en el perfundido intestinal drenado.

El conteo de quiste se realizará como método de recuento de células blancas en sangre para determinar la dosis de infección, en esta operación se utilizará yodo como solución de dilución.

1. Colocar una hoja de cubierta sobre la cámara de recuento
2. Llenar las plataformas con 10 uL de perfundido intestinal drenado
3. Contar los 4 cuadrados de las esquinas (1mm² cada uno) en cada plataforma
4. Calcular la densidad de quistes de la siguiente manera:

$$\text{Quistes/mL} = (\text{No. Quistes} / \text{mm}^2) \times (10/1\text{mm}) \times (1\text{mm}^3/\text{ml})$$

No. Quistes = Número de quistes en 4 cámaras

4 mm² = área total

1 mm³ = Volumen total

- El conteo total se multiplica por el volumen total de la muestra. Teniendo en cuenta que la relación de dilución es de 1:10 (Muestra/Solvente)

Análisis de la infección experimental

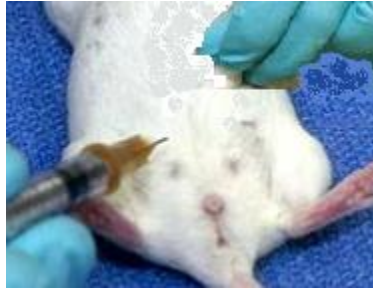
1. Suministrar sólo agua a las ratas un día anterior a su sacrificio para estudiar la colonización de trofozoítos de Giardia en el intestino delgado.
2. Sacrificar individualmente por medio de sobredosis de anestésico (Hidrato de Coral).
3. El sacrificio se realizará en diferentes periodos de tiempo para determinar el patrón de la infección a nivel intestinal, los periodos serán los días post-infección: 5, 10, 15 y 20.
4. Realizar disección del peritoneo: se localizará el intestino delgado y se retira para ser suspendido en 13 ml de PBS.
5. Realizar el recuento de los trofozoítos liberados en una alícuota de 20 ml para observación bajo el microscopio de luz con aumento de 400 X.

(Mahmood , Kaur, & Mitta, Giardia lamblia: Expression of alkaline phosphatase activity in infected rat intestine, 2005)

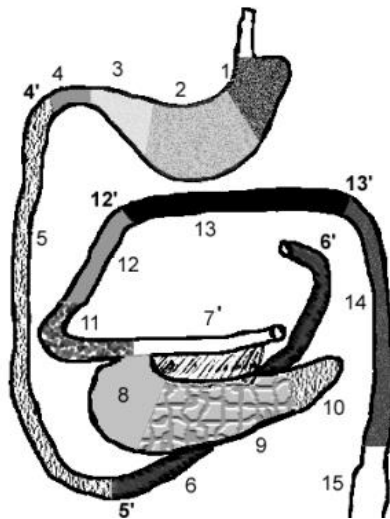
Estudio Histológico

1. Suministrar sólo agua a las ratas un día anterior a su sacrificio para estudiar la colonización de trofozoítos de Giardia en el intestino delgado.
2. Sacrificar individualmente por medio de sobredosis de anestésico (Hidrato de Cloral).
Técnicas de inoculación: Inoculación subcutánea con aguja de insulina de 10 unidades, utilizando una dosis de acuerdo al peso de la rata. Con la rata correctamente inmovilizado, (evitando cualquier movimiento durante el procedimiento) se inclinó caudalmente y trazando una línea imaginaria se levanta la piel del abdomen con los dedos índice y pulgar. Se inserta la aguja en la base de la zona de piel que estamos sujetando manteniendo la aguja paralela al cuerpo del ratón para evitar inocular en capas inferiores a la piel. Se aspirar ligeramente para

asegurar de no haber penetrado en algún vaso sanguíneo. Se inyecta el volumen de muestra a una velocidad moderada.



3. Retirar todo el intestino delgado cuidadosamente y fijar el tejido en paraformaldehído al 4 %.
4. Tomar los primeros 10 cm de intestino delgado desde la unión gastroduodenal, con el fin de selección todo el duodeno.



5. Se realizan cortes transversales en los primeros 10 cm de intestino de a 1 cm con el fin de ser fijados en parafina y cortarse de forma exacta en el micrótopo.
6. Realizar 10 incisiones transversales de 3 micras cada una y fijar en una lámina.
7. Realizar el procesamiento de tinción con hematoxilina y eosina, de acuerdo al Protocolo de *tinción con hematoxilina y eosina* ya establecido.
8. Examinar la biopsia con un microscopio Olympus Vanox unido a una cámara de televisión vidicón escáner y monitor. El aumento logrado por este método (x 400) permite mediciones precisas de la altura de las vellosidades y las criptas.
9. Medir la altura en las últimas dos porciones separadas de cada biopsia.

ANEXO No. 4 PROTOCOLO PRAPARACIÓN Y TINCIÓN HEMATOXILINA -EOSINA

PREPARACIÓN

Eosina:

- Eosina.....0,3 g
- Ácido acético glacial.....0,025 ml
- Agua destilada.....100 ml

Hematoxilina:

- Hematoxilina.....0.2 g
- Agua destilada.....100ml

TINCIÓN

- Hematoxilina durante 5 minutos.
- Agua destilada, lavamos hasta que quede claro.
- Alcohol ácido (HCL al 1% más alcohol de 70°), 2 o 3 inmersiones. El alcohol ácido actúa como diferenciador (elimina el exceso de colorante).
- Agua destilada que frena la acción del diferenciador.
- Eosina durante 1 minuto.
- Agua destilada.
- Deshidratar en alcohol al 96° durante 5 minutos
- Deshidratar en alcohol al 100° durante 5 minutos
- Montar con resina y colocar cubreobjetos

NOTA: La hematoxilina es un colorante natural sin capacidad tintorial, por lo que hay que oxidarla. La Hematoxilina es un compuesto que se obtiene de la planta leguminosa *Haematoxylum campechianum*, conocida también con el nombre de palo de Campeche. Es un producto natural que al ser oxidado constituye una sustancia de color morado oscuro denominada hemateína. El proceso de oxidación de la hematoxilina se conoce como maduración de la hematoxilina. La hemateína no posee fijación por los tejidos por lo que hay que añadir un mordiente que actúe como vinculante entre el tejido y el colorante, acrecentando la unión entre ambos. El mordiente más utilizado es el alumbre potásico K_2SO_4 y también se utiliza el sulfato de aluminio potásico. La unión de hemateína más mordiente se llama hemalum o hemalumbre. La hematoxilina es un colorante básico que va a teñir estructuras ácidas y basófilas (núcleos celulares).

La Eosina es un colorante basofilo (afinidad con lo básico, porque es acida), en forma de polvo rojo cristalino, de uso ampliamente extendido en el ámbito industrial, desde la industria textil hasta el estudio biológico e histológico. La eosina es un compuesto ácido cuya propiedad está basada en su polaridad negativa, lo que le permite enlazarse con constituyentes celulares de carga positiva. Por ello colorea componentes y orgánulos citoplasmáticos, colágeno y fibras musculares, pero no los núcleos (que son básicamente ácidos nucleicos y están cargados negativamente). Aquellos componentes que se tiñen con eosina son conocidos como acidófilos o eosinófilos. La coloración resultante de la tinción con eosina es rosada-anaranjada para citoplasmas, y rojo intenso en el caso de los eritrocitos.