

CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
CIUDAD DE LA HABANA, CUBA

Evaluación del estado inmunitario celular en niños con giardiasis

Por:

Dr. CARLOS A. GARCIA SANTANA*, Lic. ANA MARIA VAZQUEZ LOPEZ**,
Dr. ANTONIO DE ARMAS GONZALEZ*** y Dr. RAUL ALONSO FIEL****

García Santana, C. A. y otros. *Evaluación del estado inmunitario celular en niños con giardiasis*. Rev Cub Ped 55: 2, 1983.

Existen evidencias de que la inmunidad mediada por células interviene en los mecanismos de defensa del organismo contra la infección por *Giardia*. Son pocos los trabajos informados sobre estudios del estado inmunitario celular en pacientes con giardiasis. En el presente trabajo estudiamos 18 niños diagnosticados con giardiasis, utilizando la curva dosis-respuesta de los linfocitos a la fitohemaglutinina, la cual tiene más sensibilidad para medir la capacidad funcional de los linfocitos T. En nuestros resultados no obtuvimos diferencias significativas entre los niños con giardiasis y los niños sanos. Se sugiere que el estudio de la inmunidad celular en la giardiasis se debe realizar con antígenos específicos.

INTRODUCCION

La infección con *Giardia* se produce por la ingestión de agua o alimentos que contienen la forma enquistada madura del parásito. En nuestra población infantil es frecuente la giardiasis, sobre todo en la época de verano.

Se ha sugerido que en la respuesta inmunológica del organismo contra la *Giardia* se producen mecanismos complejos aún no esclarecidos, donde intervienen los sistemas inmunes humoral y celular.¹

Existen pocos trabajos informados sobre la inmunidad celular en la giardiasis. Muchos de ellos aportan evidencias de la participación que tiene la inmunidad celular en la enfermedad; así, en experiencias realizadas en ratones con aplasia congénita del timo, los cuales fueron infestados con *Giardia muris*, se observó que la enfermedad se hacía crónica y disminuía el tiempo de vida media de estos ratones, y que no ocurría lo mismo cuando se les transplantaba el timo.²

* Especialista de I grado en inmunología. Laboratorio de inmunología, CNIC.

** Licenciada en biología. Laboratorio de inmunología, CNIC.

*** Profesor auxiliar, especialista de I grado en pediatría. Hospital pediátrico "Pedro Borrás".

**** Profesor asistente, especialista de I grado en parasitología. Hospital Pediátrico "William Soler".

Por otro lado también se ha observado que los ratones atímicos tienen menos resistencia a la reinfestación por *Giardia muris* que los ratones normales,³ además de que la infestación tenía más tiempo de duración.⁴

En los pacientes con giardiasis y en el modelo experimental de la enfermedad, se ha señalado un incremento del número de linfocitos interepiteliales de la mucosa intestinal,^{5,6} los cuales se considera que tienen función timodependiente.^{7,8}

Los estudios que han valorado el estado inmunitario celular de los enfermos con giardiasis, no encontraron diferencias significativas con respecto a los individuos sanos.⁹

Nuestro trabajo está dirigido a estudiar el estado inmunitario celular de un grupo de niños con giardiasis, utilizando la prueba de la transformación blástica de los linfocitos a la fitohemaglutinina, la cual es específica para medir la capacidad funcional de los linfocitos T¹⁰ y que además al ser valorada mediante una curva dosis-respuesta adquiere mayor sensibilidad para detectar los diferentes grados de inmunodeficiencias.¹⁰⁻¹²

MATERIALES Y METODOS

Se estudian 18 niños eutróficos parasitados solamente con *Giardia lamblia*, los cuales fueron atendidos indistintamente en los hospitales pediátricos "Pedro Borrás" y "William Soler".

El diagnóstico positivo se realizó por la presencia de la forma enquistada del parásito en heces fecales o por la presencia de trofozoítos en el jugo duodenal. Ninguno de los niños presentó en el momento del estudio signos o síntomas de alguna otra enfermedad.

Transformación blástica de los linfocitos a la fitohemaglutinina (FHA)

Para la estimulación *in vitro* de los linfocitos, realizamos la curva dosis-respuesta a la FHA, tal y como la hemos descrito anteriormente¹³ y que en resumen exponemos a continuación.

Se purificaron los linfocitos a partir de sangre venosa heparinizada y utilizando el método de centrifugación en gradiente de densidad. Los linfocitos así obtenidos se lavaron dos veces en medio TC 199 (Wellcome, England). Se cultivaron 2×10^5 células vivas en 0,7 ml del mismo medio suplementado con el 15% de una mezcla de suero de sangre AB inactivado y 100 U y 100 µg de penicilina y estreptomycin, respectivamente, por 100 ml de medio.

Cada paciente fue estudiado por triplicado para las dosis de 0, 1,5, 12,5, 50 y 200 µg de FHA (Bacto-Phytohemagglutinin, Difco Lab., USA) por tubo. Se cultivaron a 37°C con 5% de CO₂ en atmósfera húmeda. A las 68 horas de cultivo se les dio un pulso de 4 horas con 2 µCi de timidina tritiada (The Radiochem. Center, England). Se detuvo el cultivo a 4°C y se lavó dos veces con salina amortiguada con fosfato r'

Se lavó dos veces con ácido tricloroacético al 7,5%. Se deshidrató con dos lavadas con metanol y se disolvió el precipitado con hidróxido de amoníaco. Cada muestra se pasó al líquido de centelleo y se leyeron en un espectrómetro de centelleo líquido con una eficiencia del 50%. Los resultados se expresan en conteos por minuto (cpm).

Procesamiento estadístico

Los resultados en cpm de la transformación blástica se procesaron considerando su distribución logaritmo normal.¹⁴ Para la comparación de las medias se utilizó el estadígrafo de la t de Student.

También se calculó para cada dosis, el índice de transformación (IT) por la relación:

$$IT = \frac{\text{cpm células estimuladas}}{\text{cpm células no estimuladas}}$$

RESULTADOS

Los resultados se resumen en el cuadro.

La curva dosis-respuesta a la FHA que se obtuvo en los niños con giardiasis, tiene el mismo comportamiento que la de los niños sanos, tal y como se muestra en el gráfico. Aunque todos los valores medios de los niños enfermos tendieron a ser menores a los valores medios de los niños

CUADRO

VALORES EN CONTEOS POR MINUTOS (cpm) OBTENIDOS CON LAS DIFERENTES DOSIS DE FITOHEMAGLUTININA EN LOS NIÑOS CON GIARDIASIS

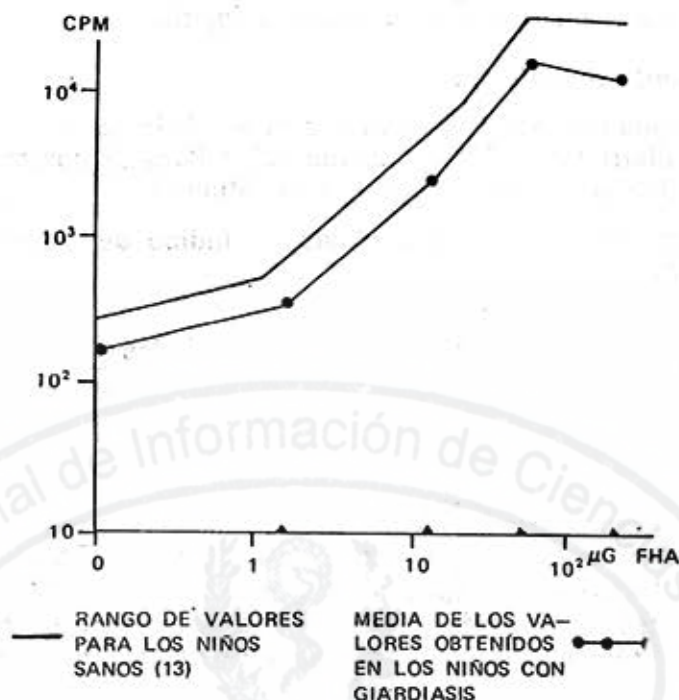
	Dosis de fitohemaglutinina (µg/cultivo)				
	0	1,5	12,5	50	200
Medias	164	343	2 425	10 716	10 254
Medias + 2 DS	263	568	4 510	22 710	22 406
Medias - 2 DS	102	206	1 303	5 056	4 692
IT	2,73	2,92	3,73	4,92	5,25
IT	—	2,1	14,7	65,3	62,5
P < 0,01 ^{a)}	NS ^{b)}	NS	NS	NS	NS

^{a)} La comparación se hizo con los valores obtenidos en un grupo de niños sanos de nuestra población.¹³

^{b)} No significativo.

Gráfico

CURVA DOSIS-RESPUESTA A LA FHA OBTENIDA EN LOS NIÑOS CON GIARDIASIS



sanos, no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las dosis estudiadas.

DISCUSION

En nuestro estudio encontramos que la capacidad funcional de los linfocitos T, de responder a las diferentes dosis de FHA, en los niños con giardiasis fue normal. Otros estudios en los que se valoran algunos parámetros inmunitarios celulares en enfermos con giardiasis, informan que la población de los linfocitos T en sangre periférica^{9,15} y las pruebas cutáneas a la FHA y al PPD,⁹ no mostraron diferencias significativas con los individuos sanos.

Existen evidencias de que la inmunidad mediana por células interviene en los mecanismos de respuesta inmune del organismo contra la *Giardia*.^{1-6,16} El hecho de que los enfermos con giardiasis tengan los parámetros inmunitarios celulares dentro de los límites normales, no excluye la posibilidad de que exista un defecto de dicho sistema para responder contra la infección parasitaria. Este defecto podría estar expresado por una deficiencia y/o un "no reconocimiento" específico por parte de las células inmuno-

competentes responsables de la inmunidad celular contra los antígenos del parásito. De hecho, se ha sugerido que algunos parásitos pueden cambiar sus antígenos de superficie como un mecanismo de evasión de la inmunidad¹⁷ y por otro lado pueden existir inmunodeficiencias las cuales son específicas para un solo activador.¹⁸

Consideramos que para poder profundizar en el funcionamiento del sistema inmune de la giardiasis, los estudios deben realizarse utilizando antígenos específicos extraídos de la *Giardia*, para aprovechar la posibilidad que tiene este parásito de reproducirse en cultivo.¹⁹

Agradecimientos

Agradecemos la eficiente ayuda técnica de las compañeras Isabel C. Pérez y Juana G. Delgado; a la compañera Norma Falcón por la cuidadosa preparación de los materiales de trabajo y a los compañeros técnicos del laboratorio de cultivo de tejidos del CENIC, por la preparación de los medios de cultivo.

SUMMARY

García Sánchez, C. A. et al. *Evaluation of cell immune state in children with giardiasis*. Rev Cub Ped 55: 2, 1983.

There are evidences that cell-mediate immunity interferes in defence mechanism of the organism against infection by *Giardia*. There are few papers reported on cell immune state in patients with giardiasis. In this paper we study 18 children with diagnosis of giardiasis, using lymphocyte dose-response curve to phytohemagglutins which has a high sensitiveness for measuring functional capacity of lymphocytes T. In our results no significant differences were obtained between children with giardiasis and healthy children. It is suggested that the study of cell immunity in giardiasis must be performed with specific antigens.

RÉSUMÉ

García Santana, C. A. et al. *Evaluation de l'état immunitaire cellulaire chez des enfants atteints de giardiase*. Rev Cub Ped 55: 2, 1983.

Il existe des évidences de ce que l'immunité à médiation cellulaire intervient dans les mécanismes de défense de l'organisme face à l'infection par *Giardia*. Les travaux rapportés sur l'étude de l'état immunitaire cellulaire chez des patients atteints de giardiase sont peu nombreux. Dans ce travail les auteurs étudient 18 enfants diagnostiqués comme porteurs de giardiase, moyennant l'emploi de la courbe dose-réponse des lymphocytes à la phytohématagglutinine, laquelle est plus sensible pour mesurer la capacité fonctionnelle des lymphocytes T. Dans les résultats il n'a pas été obtenu de différence significative entre les enfants avec giardiase et les enfants sains. Les auteurs suggèrent que l'étude de l'immunité cellulaire dans la giardiase doit se réaliser avec des antigènes spécifiques.

BIBLIOGRAFIA

1. Meyer, E. A.; E. L. Jarroll. Review and Commentary: Giardiasis. Am J. Epidemiol 111: 1-22, 1980.
2. Boorman, C. A. et al.: Hexamita and Giardia as a cause of mortality in congenitally thymus-less (nude) mice. Clin Exp Immunol 15: 623-627, 1973.

3. *Stevens, D. P. et al.*: Thymus dependency of host resistance to *Giardia muris* infection: Studies in nude mice. *J Immunol* 120: 680-682, 1978.
4. *Roberts-Thomson, I. C.; G. F. Mitchell*: Giardiasis in mice I. Prolonged infections in certain mouse strains and hypothyroid (nude) mice. *Gastroenterol* 75: 42-46, 1978.
5. *Ferguson, A.*: Intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *GUT* 18: 921-937, 1977.
6. *Mac Donald, T. T.; A. Ferguson*: Small intestinal epithelial cell kinetics and protozoal infection in mice. *Gastroenterol* 74: 496-500, 1978.
7. *Guy-Grand, D. et al.*: The gut-associated lymphoid system: nature and properties of the large dividing cells. *Eur J Immunol* 4: 435-443, 1974.
8. *Arnaud-Battandier F.*: Thèse pour le Doctorat en Médecine. Manifestations Digestives des Déficiés Immunitaires Congénitaux. 1976.
9. *Nalk, S. R. et al.*: Immunological studies in giardiasis. *Ann Trop Med Parasitol* 73: 291-292, 1979.
10. *Stites, D. P.*: Laboratory methods of detecting cellular immune function. In *Basic and Clinical Immunology*. 2nd Edition, Ed. H. H. Fudenberg et al., Lange Medical Publication, cap. 28, 1978. Pp. 375.
11. *Hosking, C. S. et al.*: Quantified deficiency of lymphocyte response to phytohaemagglutinin in immune deficiency diseases. *Clin Exp Immunol* 9: 467-476, 1971.
12. *Faguet, G. B.*: Lymphocyte responsiveness to phytohemagglutinin (PHA): quantitative aspects and reproducibility. *J Reticuloendothel Soc* 16: 114-121, 1974.
13. *García Santana, C. A.*: Curva dosis-respuesta de los linfocitos a la fitohemaglutinina en niños sanos. *Rev Cub Ped* 52: 385-391, 1980.
14. *Ziegler, J. B. et al.*: The PHA dose-response curve: Validation of the use of logarithmic graph paper by computer analysis results. *J Immunol* 113: 2035, 1974.
15. *Vázquez López, A. M.*: Comunicación personal.
16. *Owen, R. L. et al.*: Ultrastructural observations on giardiasis in a murine model. I. Intestinal distribution, attachment and relationship to the immune system of *Giardia muris*. *Gastroenterol* 76: 757-769, 1979.
17. *Welch, T. M.*: Parasitic disease. In *Basic and Clinical Immunology*. 2nd, Edition, Ed H. H. Fudenberg et al., Lange Med. Pub. cap. 41. 1978. Pp. 662.
18. *Stites, D. P.; J. L. Caldwell*: Phylogeny and Ontogeny of the immune response. In *Basic and Clinical Immunology*. 2nd Edition, Ed. H. H. Fudenberg et al., Lange Med. Pub., cap 13, 1978. Pp. 141.
19. *Meyer, E. A.*: *Giardia lamblia*: isolation and axenic cultivation. *Exp Parasitol* 39: 101-105, 1976.

Recibido: 5 de abril de 1982.
Aprobado: 21 de abril de 1982.

Dr. Carlos Alberto García Santana
Instituto Oncología
Lab. de Inmunología
29 y E. Vedado
Ciudad de La Habana, Cuba.