

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

**EVALUACIÓN DE LA MICROBIOTA EN NIÑOS CON  
PARASITOSIS INTESTINAL**

RUTH PAMELA VASQUEZ PALACIOS

TESIS DE GRADO PRESENTADA COMO REQUISITO PARA LA  
OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE DOCTOR EN MEDICINA

Quito

Febrero, 2007

Universidad San Francisco de Quito  
Colegio de Ciencias de la Salud

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

**EVALUACIÓN DE LA MICROBIODA EN NIÑOS CON  
PARASITOSIS INTESTINAL**

RUTH PAMELA VASQUEZ PALACIOS

Dr. Manuel Baldeón.,MD., PhD Director de Tesis	..... (firma)
Dr. Marco Fornasini.,MD., PhD Miembro del Comité de Tesis	..... (firma)
Dra. Gabriela Naranjo., MD Miembro del Comité de Tesis	..... (firma)
Dr. Enrique Noboa., MD Decano Facultad Ciencias de la Salud	..... (firma)

Quito, Febrero 2007

© Derechos de Autor  
Ruth Pamela Vásquez Palacios  
2007

## **Resumen**

Las bacterias que normalmente habitan en el tracto gastrointestinal, microbiota, cumplen funciones de mantenimiento del medio ambiente intestinal, nutrición, estimulación del sistema inmune y resistencia a infecciones. Cualquier alteración en la composición de la microbiota del intestino resulta en graves alteraciones patológicas como diarrea, desnutrición, infecciones entre otras. Varios estudios epidemiológicos indican que la infección simultánea de microbios intestinales es un fenómeno frecuente. Mas importante es el hecho de que las alteraciones patológicas debido a la co-infección de parásitos intestinales y bacterias es mucho mayor de aquella que se observa por la infección solamente de parásitos o bacterias. Pocos estudios han evaluado la composición de la microbiota durante la infección por parásitos intestinales. La presencia de parásitos intestinales provoca una respuesta inmune caracterizada por la secreción de inmunoglobulinas y moco que alteran el medio ambiente del tracto digestivo. Este cambio a nivel intestinal podría llevar a alteraciones de la composición de la microbiota.

El presente estudio esta dirigido a comparar la composición de la microbiota en heces fecales de niños sin infección intestinal parasitaria y niños infectados con parásitos antes y después de su tratamiento antihelmíntico. Para este propósito se utilizaron técnicas de biología molecular que permiten la evaluación de la microbiota del intestino. La electroforesis en gel de degradación por gradiente, DGGE-PCR por sus siglas en ingles “Denaturing gradient gel electrophoresis- polymerase Chain reaction” facilita este análisis. El método de DGGE-PCR permite el estudio de los genes del ARNr 16S como marcadores individuales de cada componente de la microbiota. Los datos indican que la microbiota intestinal de sujetos infectados con parasitos es distinta a la de aquellos que no estan infectado y que la microbiota de sujetos infectados antes y despues del tratamiento es parecida. Los resultados de este estudio contribuirán a comprender mejor la fisiopatología de las enfermedades infecciosas intestinales.

## **Abstract**

The normal bacteria that are in the gastrointestinal flora, the microbiota, have some functions: to keep normal the intestinal environment, nutrition, stimulation of the immune system and to maintain resistant to infections. Any change in the intestinal microbiota composition, results in serious pathologic alterations like diarrhea, malnutrition, infections and others. Some epidemiologic studies show that the simultaneous infection of intestinal microbes is a frequent phenomenon. More important is the fact that because of the co-infection of intestinal parasites and bacteria exists more pathologic alterations than the observed because of the infection of bacteria or parasite alone. Few studies have evaluated the microbiota composition during the infection of intestinal parasites. The presence of intestinal parasites induces an immune response characterized by the immunoglobulin and mucus secretion that alters the gastrointestinal tract environment. This change at the intestinal level could bring some alters in the microbiota composition.

The present study is to compare the microbiota composition in fecal feces from children without infection of intestinal parasites and children with infection of intestinal parasites before and after their antihelminthic treatment. For these purpose we used molecular biology techniques that allow the intestinal microbiota evaluation. The DGGE-PCR (Denaturing gradient gel electrophoresis- polymerase Chain reaction) helps in this analysis. The DGGE-PCR method allows the study of the genes of RNAr 16S like individual markers of each component of thee microbiota. Data indicate that the microbiota of infected and non-infected individuals is different, and that the microbiota of infected individuals, before and after treatment are similar. The results of this study will helps to understand better the physiopathology of the intestinal infections diseases.

## Tabla de Contenido

1. Introducción	1
2. Revisión de la literatura	3
2.1 Diarreas y su clasificación	3
2.2 Etiología	4
2.3 Infecciones conjuntas parásitos – bacterias	7
2.4 Respuesta inmune a infecciones intestinales	9
2.5 Microbiota como elemento protector infeccioso	13
2.6 Como se ha estudiado la flora y como se estudia hoy	15
2.7 Justificativo	17
2.8 Hipótesis	18
2.9 Objetivo	18
3. Sujetos y Métodos	18
3.1 Población y diseño de estudio	18
3.2. Instrumentos	19
3.3 Plan estadístico	25
3.4 Comité de ética	25
4. Resultados	25
4.1 Población de estudio	25
4.2 Resultados de coproparasitario	26

4.3 Extracción de ADN y análisis de la microbiota por DGGE-PCR	26
4.4 PCR con primers universales de la V3 del ARNr 16S	27
4.5 Patrones de bandas por PCR-DGGE de muestras de heces de niños con y sin infección helmintos	27
5. Discusión	29
6. Conclusiones y recomendaciones	31
7. Material de referencia	33
7.1 Bibliografía	33
8. Anexos/ Apéndices	35
8.1 Tablas	35
8.2 Figuras	40
8.3 Protocolo MoBio	46
9. Índice	47

## 1.- INTRODUCCION

Las infecciones intestinales son problemas de salud pública mundiales que afectan principalmente a los niños que viven en países en vías de desarrollo (8). En Latinoamérica en zonas rurales de Venezuela, la prevalencia de parasitosis intestinal es de 95.7%, en Chile 61.8%, en Argentina la prevalencia está entre 43 y 53% y en Brasil un 54% (16). En nuestro país las enfermedades parasitarias intestinales se han presentado en 1996 con 193.352 casos, especialmente en niños menores de 5 años (17). Las infecciones intestinales son importantes causas de morbilidad y mortalidad infantil por egresos hospitalarios con un 11.4% (7), afectando a la nutrición, crecimiento y desarrollo. La infección con *E. histolytica* tiene una distribución universal y genera una enfermedad cosmopolita. Junto con *Giardia lamblia*, son las infecciones preponderantes en EUA. Se ha descrito que la infección por *E. histolytica* afecta entre el 10 al 20% de la población mundial y alcanza prevalencias de 30% hasta 55% en regiones tropicales y subtropicales. Se ha estimado que para el año 2000, la infección por *E. histolytica* en Colombia y Brasil tenía una prevalencia 40% y en Costa Rica entre el 27 y 55%. Estas parasitosis posiblemente relacionadas también con altas prevalencias de desnutrición (11).

Las infecciones intestinales son causa de diarrea, misma que puede llevar a la deshidratación, estados de mala absorción y desnutrición. Estos datos indican que los problemas infecciosos son muy prevalentes y que son necesarias varias medidas para solucionarlos entre ellas conocer mas sobre su patogenicidad y las respuestas inmunológicas del huésped.



Estudios en animales y varias observaciones clínicas en humanos indican que la coinfección intestinal bacteriana y parasitaria es común. Más aún la coinfección por estos agentes infecciosos son causa de daños intestinales mayores que cuando existe infección por un único organismo (10). Por ejemplo en cerdos, la coinfección por *Trichuris suis* y *C. jejuni* causan severos cambios patológicos y funcionales del intestino como incremento de complejos linfoglandulares y diarrea profusa. Estas alteraciones patológicas fueron menores cuando los cerdos estaban infectados por *Trichuris suis* o *C. jejuni* (10). Un reporte de caso en humanos presenta como hipótesis que la infección con *T. trichiura* potencializa la patogenicidad de *C. jejuni*. Sugiere que la larva de *Trichuris* ataca al epitelio colónico, liberando productos excretores y secretores como metaloproteasas, proteasas y glicoproteínas; estos producen daño epitelial exponiendo a la mucosa y promoviendo la unión del *Campylobacter* por adhesión molecular (18).

Los mecanismos fisiopatológicos, microbiológicos, e inmunológicos que se desencadenan en la coinfección bacteriana y parasitaria no han sido estudiados sistemáticamente.

La microbiota intestinal, un sistema complejo de microorganismos que colonizan el intestino, tiene entre sus varias funciones la de proteger el medioambiente intestinal de agentes infecciosos. La microbiota sirve de barrera contra las infecciones limitando el crecimiento de microorganismos patógenos y estimulando la respuesta inmune intestinal (2). Cómo la respuesta inmune contra microbios intestinales (bacterias) puede modificar la microbiota no está claramente establecido.

El presente estudio tiene por objeto analizar la composición de la microbiota intestinal, tanto en niños sanos como en los que están infectados con parásitos intestinales.

## 2.- REVISION DE LA LITERATURA

### **2.1.- Diarreas, clasificación y etiologías:**

La gastroenteritis sigue siendo un problema de importancia en los países en vías de desarrollo y aún en los países industrializados especialmente en la población de niños. La diarrea puede llevar a deshidratación y a sus graves complicaciones incluyendo la muerte (8).

La clasificación de esta enfermedad se puede hacer por la duración, mecanismo de producción, o por la forma de presentación. En cuanto a la duración de la sintomatología, se considera diarrea aguda la que dura 7 a 14 días y crónica si es de 2 a 3 semanas. Los casos leves autolimitados duran solo 2-3 días.

Atendiendo al mecanismo de producción, la diarrea puede ser de varios tipos: inflamatoria, secretora, osmótica, por motilidad intestinal alterada, o facticia (autoinducida). Entre las diarreas crónicas se encuentra la diarrea osmótica, o facticia. La diarrea osmótica se debe a la presencia de sustancias no absorbidas en la luz intestinal; ocurre en síndromes de malabsorción. La diarrea secundaria a motilidad intestinal alterada, se debe a tránsito acelerado; ocurre en enfermedades neurológicas o en colon irritable o por estrés psicológico (6), (Tabla 1).

Por la forma de la presentación puede darse en dos grupos: no inflamatoria o secretora y en inflamatoria o disentería (Tabla 2; 6).

La diarrea no inflamatoria o secretora está controlada por toxinas que inician los mecanismos secretores intestinales. Se diferencia por ser líquida, acuosa y sin productos patológicos; esta relacionada con la producción de enterotoxinas y el clásico ejemplo es el cólera donde se produce una deshidratación grave (6).

La diarrea inflamatoria o disentería en cambio, está dada por bacterias invasivas o parásitos, o por citotoxinas; es un proceso destructivo y el daño se ubica con frecuencia en el colon. Su clínica es con fiebre, dolor abdominal, y heces con sangre, moco y leucocitos.

## **2.2.-Etiología:**

La diarrea aguda casi siempre es de causa infecciosa (Tabla 3). También puede estar producida por intoxicaciones, fármacos, alergias, nutrición enteral, por impactación fecal o por situaciones de estrés psicológico o físico después de grandes esfuerzos. Asimismo puede ser manifestación de enfermedades del aparato digestivo, como isquemia intestinal aguda (6).

Finalmente la diarrea aguda puede ser la primera manifestación o el principio de un cuadro de diarrea crónica secundario a tumores intestinales, hipertiroidismo, intestino irritable.

### PARASITOS

Dentro de los parásitos tenemos dos grupos grandes los eucariotas - protozoarios (unicelulares) y los helmintos (gusanos) o también conocidos como metazoarios.

Los protozoarios son organismos pequeños usualmente con una celda (amebas), ciliados, flagelados, presentan varias formas morfológicas durante su ciclo de vida; su diseminación se da por alimentos contaminados, el contacto con otros humanos y animales contaminados o por vectores artrópodos. Estos organismos pueden ser manejados con medicamentos, adecuada higiene y control de los vectores. Las enfermedades causadas por el principal representante de los protozoarios las amebas, incluyen la disentería y encefalitis (8).

Los helmintos son gusanos multicelulares con adaptaciones especializadas en estructura y ciclo de vida para la alimentación, reproducción y transmisión del huésped. Los helmintos incluyen los nemátodos (gusanos redondos), trematodos (fasciolas) y céstodos (gusanos planos). El control de la infección por helmintos se da gracias a la administración de medicamentos que paralizan o matan a los gusanos e interrumpen su ciclo de vida. A continuación se revisa las características más sobresalientes de los protozoarios y helmintos que más frecuentemente infectan a los niños.

-Entamoeba histolytica: Dentro del grupo de las amebas es la más significativa, tiene un ciclo de vida simple donde un trofozoito que es móvil gracias a los seudópodos y tiene una forma de quiste inmóvil pequeño y compacto. El trofozoito tiene un solo núcleo, el quiste maduro es revestido con una delgada pero resistente pared que contiene cuatro núcleos y un grupo de ribosomas llamados cromatoides. Los humanos son los principales huéspedes de la *E. histolytica*, la infección es adquirida por la ingesta de comida o agua contaminada con quistes liberados por un transportador asintomático, como se transmite vía fecal-oral o anal también se considera como enfermedad de transmisión sexual. Cuando el quiste luego de ser tragado llega al intestino delgado donde el pH alcalino y los jugos digestivos lo estimulan y luego se liberan cuatro trofozoitos que viajan al ciego y al intestino grueso, donde se sujetan por unos finos seudópodos, se multiplican, se activa su movimiento y se alimentan. Un 90% de los pacientes son asintomáticos o con leves síntomas. Una característica importante de este parásito es el daño al tejido, ya que libera una enzima que disuelve el tejido y eso le permite penetrar en las capas profundas de la mucosa, creando ulceraciones y manifestaciones clínicas como heces sanguinolentas, dolor abdominal, fiebre, diarrea y baja de peso. Existe infección extra intestinal cuando invade la cavidad

peritoneal, el sitio más común es el hígado donde se producen abscesos y causa hepatitis por amebas; los pulmones, bazo, riñones, piel y cerebro también son otros sitios de invasión en menor frecuencia. El tratamiento efectivo para disentería amebiana incluye iodoquinol que actúa en las heces y metronidazol o cloroquinas que actúa en los tejidos, también se pueden dar otros medicamentos que para disminuir los síntomas como diarrea y calambres, reponer la pérdida de fluidos y electrolitos con rehidratación oral o intravenosa (9).

-Giardia lamblia: Es del grupo de los protozoos flagelados en enfermedades intestinales, se observa un trofozoito con forma de corazón con organelos que le dan una forma de cara y cuatro pares de flagelos salen de la parte ventral; en su forma de quiste es pequeño, compacto y multinucleado. La enfermedad de este protozoario es la giardiasis, se encuentra en los intestinos de los portadores como ganado, gatos y humanos. Los quistes de giardia pueden sobrevivir en el medioambiente hasta por dos meses, pueden ser adquiridos por medio de aguas, alimentos contaminados o través de persona a persona. Los quistes de *Giardia* son muy infecciosos, sólo 10-25 quistes pueden causar la infección aunque solo 25-50% de los expuestos desarrollan síntomas. Los quistes ingresan al duodeno donde germinan para luego ir al yeyuno alimentarse y multiplicarse, algunos trofozoitos se mantienen en la superficie mientras que otros invaden las criptas glandulares en varios grados. La invasión superficial causa daño celular epitelial, edema e inflamación. Los síntomas típicos son distensión abdominal, náuseas, diarrea, anorexia y flatulencias, después de un período de incubación de 1-3 semanas.

Su diagnóstico puede ser difícil porque el organismo se cubre en las heces intermitentemente, existe un test de ADN para detección de quistes en las muestras. El tratamiento es con clorhidrato de quinacrine o con metronidazol.

- Helmintos:

Los helmintos son animales multicelulares, comparativamente largos, con tejidos especializados y órganos similares a los del huésped que habitan. El ciclo de vida de los helmintos incluye huevos, larvas y estado adulto. La fuente para la infección humana es por comida y agua contaminada y animales infectados, y las rutas de contagio es por ingesta oral o penetración en heridas de la piel. Los helmintos adultos terminan en sitios como la mucosa intestinal, vasos sanguíneos, linfáticos, tejido subcutáneo, piel, hígado, músculos, cerebro y hasta en los ojos. (9)

### **2.3.- Infecciones conjuntas parásitos- bacterias:**

Varios estudios indican que la infección simultánea del intestino por bacterias y parásitos es muy común. Estudios en animales demuestran que la infección con parásitos y bacterias patógenas sinergizan causando mayores daños patológicos a nivel intestinal (10). Un estudio en cerdos presentó la asociación de infección con *Trichuris suis* y con *Campylobacter jejuni*, Se utilizaron 20 cerdos a los cuales los agruparon en 4 grupos, grupo 1: control no infectados, grupo 2: infectados solo con *T. suis*, grupo 3: infectados con *C. jejuni* y grupo 4: infectado con *T. suis* y *C. jejuni*. Este estudio indicó como resultados que los animales que tenían coinfección se presentaban con diarrea profusa y más frecuente además de presentar una patología más severa de aquellos que no estaban infectados o que tenían una sola infección; los cerdos infectados con ambos patógenos *T. suis* y *C. jejuni* tuvieron un incremento estadísticamente significativo en el tamaño y número de complejos linfoglandulares en el colon distal (10).

El grupo que se encontraba infectado solo con *T. suis*, presentaron 9 episodios de diarrea, histopatológicamente se observó hiperplasia de las criptas y engrosamiento de todas las capas del colon proximal, e hipertrofia de las células caliciformes. El grupo infectado con *C. jejuni* presentó 11 episodios de diarrea, histopatológicamente se encontró medianas lesiones y no hiperplasia de las criptas. Finalmente, el grupo infectado tanto con *T. suis* y con *C. jejuni* presentó 68 episodios de diarrea sanguinolenta y células inflamatorias, histopatológicamente se encontró con la mayor hiperplasia de las criptas con engrosamiento de todas las capas del colon (10). Los autores de este estudio indican que la infección con *T. suis*, facilitó la invasión de *C. jejuni* en tejidos más profundos del colon (10).

Así mismo un reporte de caso en humanos presenta como hipótesis que la infección con *T. trichiura* potencializa la patogenicidad de *C. jejuni*. Usualmente *C. jejuni* produce cuadros de diarrea que no es severa y es autolimitada. Sin embargo, en un paciente recientemente se ha reportado un caso que se presentó a emergencias con un cuadro de dolor abdominal tipo cólico, diarrea acuosa, náusea y vómito de un día de evolución posterior a la ingesta de alimento (pollo) en un restaurante local; los cultivos de heces dieron positivos para *Campylobacter jejuni* y en la microscopia de heces se encontraron larvas de *Trichuris trichiura*. Además, la colonoscopia demostró ulceración difusa de la mucosa del colon transversal y en la biopsia se encontró tejido de granulación consistente con daño de la mucosa (18). Los autores sugieren que la larva de *Trichuris* ataca al epitelio colónico, liberando productos excretorios y secretorios como metaloproteasas, proteasas y glicoproteínas; estos producen daño epitelial exponiendo a la mucosa y promoviendo la unión del *Campylobacter* por adhesión molecular (18). Al momento no existen estudios en los que se haya investigado específicamente la posible interacción entre nemátodos como el *trichuris* y bacterias patógenas como el *campylobacter*. Los estudios en animales y la

observación clínica hasta ahora reportados indican que esta coinfección predispone a que el curso de la infección por campylobacter sea más severa, incluyendo úlceras colónicas, megacolon tóxico y falla renal aguda (18).

Los mecanismos por los que el sinergismo entre parásitos y la infección bacteriana causan mayor daño intestinal no han sido aun dilucidados. Cambios deletéreos en la microbiota intestinal pondría explicar el mayor daño intestinal que se observa en las co-infecciones.

#### **2.4.- Respuesta Inmune a Infecciones Intestinales:**

Frente a la respuesta inmune tenemos la inmunidad innata y la inmunidad adquirida, dentro de la inmunidad innata intestinal está presente la mucosa intestinal, el pH, la temperatura, algunas lizocimas, a nivel celular se encuentran los macrófagos, neutrófilos y los Natural Killers en sus siglas en inglés (NK). Dentro de la inmunidad adquirida que es específica y de memoria, tenemos a los linfocitos T y B que después se van a diferenciar por ejemplo los linfocitos B van a producir anticuerpos; la activación de las células Th2 también es parte de esta inmunidad. En ambas inmunidades participan varios tipos de interleucinas las que activan y diferencian a las células para realizar diferentes funciones y a continuación se expone los dos tipos de inmunidades a nivel intestinal.

El epitelio intestinal presenta la primera línea de defensa ante cualquier invasor, además presenta una barrera física ante la entrada de microbios; este epitelio juega un papel activo, produciendo y secretando grandes cantidades de péptidos antimicrobianos. Estas células especializadas epiteliales tienen gránulos secretores que contienen altas concentraciones de proteínas microbicidas. Esta respuesta rápida antimicrobiana es parte del sistema inmune



innato. Por esta razón si se altera el medio ambiente intestinal normal, se altera también la composición normal de la microbiota (15).

En contraste, el sistema inmune adaptativo o adquirido se desarrolla lentamente pero es más específico y preciso en responder, como en otras partes del cuerpo la respuesta inmune adquirida en el intestino requiere la activación y multiplicación de linfocitos B y T, que en el intestino se desarrollan en estructuras linfáticas, placas de Peyer. Estas estructuras a lo largo del intestino delgado actúan como incubadores para el desarrollo de linfocitos B y T (15).

Un componente importante de la respuesta inmune contra los parásitos es la producción de anticuerpos tipo inmunoglobulina E (IgE); los antígenos de los parásitos estimulan a células T productoras de IL-4, IL-5, IL-13 las cuales a su vez selectivamente estimulan la producción de IgE de las células B, (19). Otro componente importante de defensa es la producción de una capa de moco producida a nivel del epitelio celular intestinal (20).

Existen varios modelos experimentales que han demostrado que anticuerpos IgE específicos sensibilizan los mastocitos en las mucosas del intestino, causando la liberación de mediadores que producen reacciones de hipersensibilidad inmediata locales las cuales crean un microambiente inhóspito al parásito y favorecen su expulsión (19). También están los eosinófilos que ejercen un papel importante de defensa a través de la activación de receptores de alta afinidad para IgE liberando mediadores que ejercen un efecto tóxico contra las larvas. Los parásitos especialmente los helmintos también causan una estimulación policlonal no específica de la síntesis de IgE, y en poblaciones humanas donde estas parasitosis son endémicas, los niveles de IgE sérica total son sumamente elevados (19).

Individuos infectados por parásitos usualmente responden con la producción relativamente rápida de citocinas tipo 2 como IL3, IL-4, IL-9 e IL-13 por parte de los linfocitos T CD4 y otras fuentes. En el medio ambiente intestinal las citocinas tipo 2, actúan sobre los mastocitos, sobre las células epiteliales no-linfoideas y sobre las células caliciformes para inducir la expulsión de parásitos a través de reacciones fisiológicas, como la producción de moco, péptidos antimicrobianos e hipercontractilidad muscular (20).

El epitelio intestinal es una barrera natural que separa el contenido del intestino y el medio interno evitando que este último se exponga al medioambiente “hostil” del intestino. Una de las funciones importantes para limitar el contacto de este medio hostil es la producción de moco por parte de las células epiteliales (21).

El moco esta formado por la proteína mucina altamente glucocilada y asociado con otras proteínas y grasas. El moco forma una capa continua en la superficie del intestino rica en bicarbonato para poder mantener un pH neutro protegiendo al epitelio de las proteasas de origen bacterial. En infecciones parasitarias especialmente con el helmintos, la proteína mucina, producida por el epitelio intestinal, se une y atrapa al parásito para eliminarlo (21). También se ha visto que el moco contiene péptidos antimicrobiales, como las defensinas, que alteran la integridad de la membrana microbiana al intervenir en la carga eléctrica de la misma, también regulan la inmunidad antimicrobiana. Las defensinas también estimulan la fagocitosis y la producción de citocinas pro - inflamatorias. Otro péptido antimicrobiano es el llamado “NK- lysin” por su nombre en inglés, el cual posee actividad antibacteriana como bactericida ya que destruye la membrana de la célula formando poros (21).

Las citocinas son también importantes mediadores en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria, son péptidos moleculares producidos por las células epiteliales intestinales, las citocinas estimulan la producción de mucina para la producción de moco principalmente

por medio de IL-13, esta interleucina también regula marcadores de superficie como MHC clase II y la producción de citocinas inflamatorias, creando resistencia frente a infecciones, particularmente infecciones por helmintos (24).

La IL-13, una citocina tipo 2, se ha demostrado en estudios en ratones que tiene un rol importante en la expulsión de nemátodos. En un estudio se infectaron a ratones libres de patógenos con *Trichinella spiralis* a la 6-8 semana de edad, se aislaron y analizaron secciones del yeyuno donde se demostró que la fuente innata de IL-13 son la células NK intraepiteliales, que inhabilitan el lumen intestinal por medio de la producción de TNF $\alpha$ , también produce atrofia de las vellosidades intestinales e hiperplasia de las criptas y de las células caliciformes, facilitando así la eliminación del parásito (25). Otra función de la IL-13 que comparte con la IL-4 en la barrera epitelial es que estas citocinas disminuyen la carga eléctrica de la misma, especialmente la IL-4 disminuye la secreción de CL, disminuyendo la actividad en los canales de CL por medio de la expresión de proteínas (26).

La infección por el parásito *Trichinella spiralis* estimula la producción de citocinas tipo 2 por las células T CD4. Así, en esta infección, en los nódulos linfáticos mesentéricos se expresa las citocinas IL-4, IL-5, IL-9 y también IL-10, estas interleucinas son secretadas en la mucosa intestinal. La infección por *T. spiralis* produce también marcada eosinofilia como respuesta a la producción de IL-5 llevando eventualmente a la eliminación de los parásitos del intestino. También contribuyen en la eliminación del parásito los mastocitos que producen IL-4 E IL-9 (25).

La IL-4 también se ha demostrado que cumple un importante rol en la resistencia de algunos nemátodos, especialmente con el *Trichuris muris*, en respuesta a la activación de células Th2 (24). En un estudio con ratones a los que se suprimió o interrumpió el gen de

IL-4 y el gen de IL-13 y se infectaron con *T. muris* estaban más susceptibles a la infección del nematodo, mientras que otro grupo de ratones sin supresión de IL-4 y de IL-13 demostraron que eran más resistentes a la infección y facilitaban la expulsión del parásito (24).

Es importante también resaltar que a más de la respuesta inmune como medida de defensa, la microbiota intestinal también cumple un papel crucial como barrera ante la presencia de parásitos.

## **2.5.- Microbiota como elemento protector infeccioso:**

La microbiota intestinal es un sistema complejo de microorganismos integrado por especies bacterias que normalmente habitan y coexisten en el tracto gastrointestinal, y que cumplen funciones de mantenimiento del medio ambiente intestinal, nutrición, estimulación del sistema inmune y resistencia a infecciones. Se ha atribuido al intestino humano con las más altas densidades celulares bacterianas de cualquier ecosistema, sin embargo la diversidad en los niveles de división es la más baja, solo 8 de 55 divisiones de bacterias conocidas han sido identificadas actualmente, y de esas 8 divisiones, 5 son raras (3). La microbiota se establece desde el nacimiento y su composición es definitiva a los dos años de edad. La microbiota está compuesta en un 99% por microorganismos anaerobios y el porcentaje restante por bacterias aerobias (1, 2).

Las funciones de la microbiota presentes en el intestino son:

1. Funciones **nutricionales** como por ejemplo fermentar los residuos de la dieta, los que generan ácidos grasos de cadena corta que ayudan a recuperar energía que van a promover el crecimiento y proliferación de la microbiota y del huésped. Las bacterias intestinales también sintetizan varias vitaminas como las del complejo B y vitamina K. La vitamina B12 permite la absorción de hierro. Otras funciones nutricionales de la microbiota están relacionadas con incrementos en la absorción de iones calcio y magnesio, además de el depósito de tejido graso.
2. Funciones de **resistencia a infecciones** al constituirse una barrera contra el establecimiento de bacterias patógenas. Además, la microbiota permite el desarrollo y mantenimiento del sistema inmune intestinal.

### 3. Mantenimiento de un **medioambiente adecuado** con un pH ácido constante (2).

Alteraciones en la cantidad y calidad de la microbiota resulta en alteraciones fisiológicas importantes. El uso de antibióticos por ejemplo, en algunos casos resulta en colitis pseudomembranosa por sobrecrecimiento de *Clostridium difficile* (4). Esto se debe a un desequilibrio en la microbiota intestinal, ya que afectan a las bacterias que habitan normalmente en el intestino destruyendo la microbiota, permitiendo de esta manera que *Clostridium difficile* colonice el tracto gastrointestinal. Otra posible forma de alterar la microbiota del intestino es la respuesta inmune a agentes infecciosos. Hemos indicado la capacidad del intestino para secretar péptidos antibacterianos y la producción de moco. Además de las funciones de barrera que tiene el moco, este puede ser utilizado por ciertos tipos de bacterias patógenas como sustrato energético.

La estructura y composición de la microbiota intestinal refleja una selección natural en dos niveles: en el nivel microbiano, donde las estrategias del estilo de vida afectan individualmente a la bacteria de una manera competitiva; y el nivel del hospedador donde la funcionalidad de la microflora puede reducir el bienestar del hospedador.

Inversamente, el grupo que promueve el bienestar del hospedador crea más bacterias, de este modo, en el tracto gastrointestinal existe una diversidad y unas pocas divisiones que son representadas por grupos de bacterias, puede reflejar una selección fuerte del hospedador por una bacteria específica que realiza un comportamiento beneficioso para el hospedador (11).

Para beneficiar al huésped, las bacterias deben organizarse en una estructura trófica que ayude rompiendo algunos nutrientes y proveyendo sustratos energéticos al hospedador (12). Este comportamiento cooperativo impone un costo al individuo mientras beneficia a la

comunidad y esta puede emerger entre grupos de bacterias. La selección debe actuar simultáneamente y en múltiples niveles de la organización biológica.

La mayoría de bacterias que constituyen la microflora intestinal son comensales, es decir, que coexisten con células epiteliales intestinales sin causarles ningún daño, Sin embargo algunos son simbióticos y eso es que tanto las bacterias como el hospedador se benefician de esa asociación (13).

Existen pocos estudios que hayan evaluado el impacto de la infección por helmintos, la secreción de moco y como esto afectaría la composición de la microbiota intestinal.

## **2.6.- Como se ha estudiado la flora y como se estudia hoy**

Tradicionalmente las bacterias del tracto gastrointestinal han sido estudiadas en base a técnicas de cultivo. Estos métodos tienen varias limitaciones por la intensidad de trabajo que demandan, solamente se pueden cultivar las bacterias de las cuales se conocen los requerimientos nutricionales por lo que no toda la microbiota intestinal puede cultivarse. Así estudios que comparaban la cantidad de bacterias observadas al microscopio no correspondían con el limitado número de bacterias que se podía cultivar (22). Estos métodos de cultivo han sido reemplazados por técnicas moleculares basadas en el estudio del gen 16S ribosomal, estas técnicas clasifican y cuantifican la microbiota y proveen un esquema de clasificación para agrupar en grupos filogenéticamente similares (22). Dentro de los métodos podemos enumerar: las estrategias de sondeo genético, “genetic fingerprinting”, que es una tipificación genética de un individuo y de la variabilidad genética presente en su ADN diferente de cada individuo (23). Estudios basados en el análisis del 16S ribosomal indican que la mayoría de las bacterias que se pueden identificar

por este método son diferentes de las bacterias que se describen cuando se cultivan las bacterias de la microbiota.

Uno de los métodos más comunes para estudiar ecosistemas microbianos es el llamado “denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), por su denominación en inglés”. Este método consiste en un análisis cuantitativo de la composición e identificación bacteriana, es un método efectivo para propósitos taxonómicos. El principio general es la separación individual de genes ADN ribosomales basados en sus diferencias de estabilidad química a temperaturas que separan las dos hebras de ADN en estos genes estudia la composición del gen 16S DNA ribosomal el cual es amplificado por medio de primers universales de PCR (10).

Es utilizado para diferenciar e identificar la complejidad de los tipos de bacterias aisladas, a más de su diversidad, incluyendo la diferenciación de subespecies de la microbiota intestinal. Se puede designar primer específicos de PCR basados en regiones variables de la molécula para diferenciar a la bacteria a nivel genético dentro de un ecosistema microbial complejo.

El método DGGE separa productos de PCR del mismo tamaño pero de diferentes secuencias por desnaturalización química, cada banda dentro del perfil de DGGE representa un grupo relacionado de organismos y si la especificidad del primer es alta, cada banda puede representar una especie de bacterias o hasta una bacteria individual.

Esta técnica ha sido utilizada satisfactoriamente en estudiar la dinámica y complejidad de la microbiota intestinal humana. El método DGGE puede ser utilizado para el análisis de una comunidad entera o para investigar una población específica o grupos dentro de una muestra.



Una de las limitaciones de la técnicas DGGE/TGGE es que las secuencias heterogénicas pueden migrar similarmente y así las bandas de la misma posición en el gel no necesariamente serían filogenéticamente relacionadas. Otra limitación es la formación de heteroduplex, la detección heterogénica de los operones de ARNr del mismo organismo y la poca detección de especies que se encuentran en cantidades bajas (10).

Los perfiles de DGGE representan al 90- 99% de la comunidad bacteriana. Asumiendo que las muestras fecales humanas contienen  $10^{11}$  células por gramo, esto sugiere un límite en la detección de  $10^9$ . Sin embargo la presencia de heteroduplex puede dar una sobreestimación de la diversidad bacteriana (11).

## **2.7.- Justificativo:**

Como ha sido expuesto anteriormente existe evidencia que la coinfección de parásitos y bacterias resulta en patologías más severas del intestino. Los mecanismos de la posible interacción entre los agentes infecciosos, la respuesta inmune y alteraciones en la microbiota no han sido estudiados en personas infectadas con parásitos intestinales. Es de interés por tanto estudiar la composición de la microbiota intestinal durante la infección por patógenos como en las infecciones parasitarias intestinales. Esto tiene gran importancia cuando se estima que cerca de 3.5 billones de personas están afectados con parasitosis intestinal. Mundialmente las parasitosis intestinales afectan principalmente a los [niños](#) de países en [desarrollo](#) y se estima que unos 1000 millones de habitantes están infectados con *Ascaris lumbricoides*, 500 millones con *Trichuris trichura*, un número similar con amebas y 200 millones con *Giardia lamblia* (14).

## **2.8.-Hipótesis.-**

La composición bacteriana de las heces fecales de niños sanos, niños con parásitos intestinales y niños con parásitos que han sido tratados son diferentes.

## **2.9.- Objetivo.-**

El objetivo general del presente trabajo es analizar la composición de la microbiota intestinal en niños sanos y aquellos que están infectados con parásitos intestinales antes y después de su tratamiento.

### **2.9.1.-Objetivos específicos.-**

- 1.- Hacer una evaluación nutricional de todos los niños participantes del estudio.
- 2.- Comparar la composición bacteriana de las heces fecales de niños infectados con parásitos intestinales con la composición bacteriana de niños sin infección intestinal.
- 3.- Comparar la composición bacteriana de las heces fecales de niños infectados con parásitos intestinales antes y después del tratamiento antiparasitario.
- 4.- Educar sobre principios de higiene a los niños participantes del estudio.

## 3. SUJETOS Y MÉTODOS

### **3.1.-Población y diseño del estudio.-**

Este es un estudio prospectivo, descriptivo mismo que incluyó a 15 niños entre 10 y 12 años de edad que asistían al programa de cobertura primaria de salud que mantiene la fundación Children International en los sectores urbano marginales en la ciudad de Quito. Los niños participantes pertenecen a los sectores de La Lucha de los Pobres, La Colmena y La ciudadela Roldós. En el estudio no se incluyeron a niños que habían recibido anteriormente tratamiento antiparasitario, historia de alguna enfermedad crónica o historia

de diarrea crónica o síndrome de malabsorción. La principal fuente de información para identificar los casos fueron las historias clínicas, donde se investigó el estado nutricional y antecedentes sociales.

### **3.2.- Instrumentos.-**

#### **3.2.1- EVALUACIÓN NUTRICIONAL.-**

Los siguientes criterios se utilizaron en la evaluación nutricional de los participantes. Historia clínica completa y antropometría (peso, talla).

#### **3.2.2- ANÁLISIS DE HECES FECALES.-**

Se realizó un análisis de heces fecales y para la cuantificación de la carga parasitaria se utilizó el método de Kato Katz, que permite cuantificar la presencia de huevos de helmintos. Se expresa en número de huevos por gramo de heces (14).

#### **3.2.3- ANÁLISIS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL.-**

Se utilizará el método de DGGE-PCR para diferenciar la complejidad y diversidad de la microbiota intestinal a partir de del ADN presente en las muestras de heces fecales de los sujetos participantes. Este método, DGGE-PCR, es relativamente nuevo y es uno de los pocos que permite el análisis de la microbiota. El método de DGGE-PCR permite el estudio de los genes del ADN ribosomal 16S como marcadores individuales de cada componente de la microbiota (14).

#### **3.2.4.- ANALISIS DEL COPROPARASITARIO.-**

- Se obtiene la muestra y se procede a una observación de la materia fecal recibida para identificar si hay elementos patológicos como moco, pus o sangre.
- colocar sobre una lámina portaobjetos 1 gota (0.05ml) de lugol diluido. Este colorante es de gran afinidad por los azúcares complejos, permitiendo coloraciones contrastadas que facilitan la observación de elementos intracelulares.
- colocar con un palillo un poco del material de heces y mezclar en la gota de lugol y colocar el cubreobjetos.
- observar en el microscopio iniciando por el lente 30X, para seguir progresivamente hasta llegar al lente de mayor aumento.
- observar la presencia de huevos o larvas de parásitos y protozoarios, identificar y anotar resultados.

### 3.2.5- COPROPARASITARIO POR LA TECNICA DE KATO KATZ.-

- Se basa en la técnica de Kato y que permite cuantificar la presencia de huevos de helmintos. Se expresa en número de huevos por gramo de heces (hpg).
- Con un aplicador (baja lengua) transferir la muestra fecal (0,5-1g) sobre el papel absorbente.
- Colocar una malla o nylon de 2 x 3 cm. sobre la muestra.
- Con el aplicador del kit comprimir la malla para tamizar la muestra.
- Colocar el molde de plástico sobre la lámina portaobjeto y rellenar la perforación con la muestra tamizada.
- Levantar el molde dejando el “cilindro” de la muestra en la lámina portaobjeto.
- Colocar la laminilla glicerizada con verde de malaquita sobre la muestra y con ayuda de un tapón de jebes presionar sobre la laminilla, buscando extender la muestra.

- Dejar para la diafanización a temperatura ambiente de 30 a 45 minutos.
- El número de huevos encontrados en la lámina se multiplica por k ( $k = 24$ ), el resultado es el número de huevos por gramo de heces (hpg).
- Deben contarse todos los huevos del preparado.

### 3.2.6.- AISLAMIENTO DE ADN.-

Se siguió el procedimiento del protocolo de MoBio para todas las muestras fecales (ver anexos).

1.- Lavar las muestras de heces fecales antes de la extracción de ADN:

- Pesar heces 0.25gr
- retirar “pedritas” de tubos de 2ml y poner en tubos ependorf.
- añadir 1.5ml de Solución Salina por tubo (750ul)<sup>2</sup>, mezclar y centrifugar a 10.000g por 1 minuto, botar el sobrante y repetir por 3 veces.

2.- Extracción de ADN de muestras fecales con Ultra Clean Fecal DNA Kit:

3.- Buffer de carga 6X:

- azul de bromofenol 0.03125gr al 1% en H<sub>2</sub>O 12.5ml
- glicerol estéril 3.75ml
- base de hidroxido de Na hasta que se torne de color azul

4.- Gel de Electroforesis de Agarosa al 1%:

- 40ml de TBE 1X, (previamente preparado con 54g de Tris base, 27.5g de ácido bórico y 20ml de EDTA 0.5M da TBE 5X)
- 3ul de Bromuro de Etidio
- colocar la mezcla en la cámara y dejar enfriar, luego poner TBE 180ml, y correr el gel a 80vots por 1 hora.

### 3.2.7.- PCR.-

Lista de Pimers.-

-16sV3F: CCTACGGGAGGCAGCAG

-16SV3R: ATTACCGCGCTGCTGG

-16sV3F+GCCLAMP:

CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGGGCCTACGGGAG  
GCAGCAG

### 3.2.8.- DGGE (DENATURING GRADIENT GEL ELECTROFORESIS).-

- Para análisis de DGGE:

1. Lavar los platos con agua jabonosa y limpiarlos con etanol
2. Adherir cinta adhesiva al inicio del plato largo.
3. Manteniendo cubierta de papel, preparar tira de papel cortándola del tamaño apropiado.
4. Manteniendo la cubierta de papel, coloque el film con el lado hidrofílico mirando al gel y el lado hidrofóbico mirando al vidrio. Presione el film a la cinta con hoja de afeitar.
5. Levante el film del lado no adherente (arriba) y riegue agua en el vidrio, poner el film en el vidrio evitando formar burbujas en el agua. Remover el exceso de agua presionando la cubierta de papel del gel con papel toalla.
6. Poner una delgada capa de sello de celofán en los espacios y dentro de las cámaras del sánduche.
7. Colocar los espaciadores en el film al borde de plato de vidrio largo (sin tocar el film)
8. Colocar pequeños platos de vidrio en el inicio de los espacios.
9. Colocar la cámara de sánduche en borde de los platos de vidrio y colocar el montaje en el molde.
10. alinear los espacios con la tarjeta de alinear.

11. Cuidadosamente ajustar el tornillo que sostiene los platos lo suficiente para sostenerlos en el lugar.

12. Chequear el alineamiento del fondo y realinear si es necesario.

13. Colocar un tapón de vaselina en el final del sánduche de las cámaras y de los platos de vidrio y también vaselina en el sello de goma.

14. Colocar el vidrio y sánduche montado en el molde y ajustar niveles de la cámara.

- Para fijar:

Acido acético 5% (15 ml para 300 ml dbH<sub>2</sub>O)

Etanol absoluto 10% (30 ml parar 300 ml dbH<sub>2</sub>O)

Lavar con dbH<sub>2</sub>O 3X

- Para teñir:

0.2 g de nitrato de plata AgNO<sub>3</sub> en 200 ml de dbH<sub>2</sub>O. Incubar el gel a temperatura ambiente por 20 min. “in belly dancer”

Colectar la solución para teñir en un apropiado contenedor descartable.

Lavar gentilmente con dbH<sub>2</sub>O 3X

- Para revelar:

Borohydrate de Sodio (NaBH<sub>4</sub>) 0.02 g.

Hidróxido de Sodio (NaOH) 3.0 g

37% Formaldehído 0.8 ml hasta 200 ml dbH<sub>2</sub>O

Incubar el gel por aproximadamente 10 min. en el revelador a temperatura ambiente en “belly dancer” para completar teñida.

Recolectar la solución reveladora en un apropiado contenedor descartable

Lavar el gel por lo menos 4 veces.

3.2.9.- OTROS MATERIALES.-

- 1.- muestras de heces fecales de los niños infectados, postratamiento y de control.
- 2.- Ultra Clean Fecal DNA Kit (paquete para extracción de ADN de muestras Fecales, MoBio).
- 3.- Solución Salina
- 4.- Gel de Agarosa 1%
- 5.- Ladder de mas de 1000 pares de bases
- 6.- TBE 5X
- 7.- Tris Base
- 8.- Acido Bórico
- 9.- EDTA 0,5 M
- 10.- Hidróxido de sodio (pellets)
- 11.- azul de bromofenol
- 12.- Glicerol estéril
- 13.- Bromuro de Etidio
- 14.- Glucógeno
- 15.- Lugol diluido
- 16.- porta y cubre objetos
- 17.- palillos

### 3.2.10.-INSTRUMENTOS.-

- 1.- cámara para gel de electroforesis “Horizon”
- 2.- mini centrífuga
- 3.- Vortex (mezclador)
- 4.- microscopio



5.- micropipetas 10ul, 100ul y 1000ul

### **3.3.- Plan estadístico.-**

El presente trabajo es un estudio cualitativo descriptivo para lo cuál se utilizará porcentajes y frecuencias y como tendencia centrar la mediana. Los datos obtenidos se expresaran como Media y Desviación Estándar.

### **3.5.- Comité de Ética.-**

El proyecto fué aprobado por el comité de ética de la USFQ.

## 4.-RESULTADOS

### **4.1.- Población de estudio**

En la tabla No 4 se detallan las características de los niños participantes del estudio. El peso de los niños participantes estuvo alrededor del percentil 50. Por otro lado, la talla de los niños varió entre los percentiles 10 y 25 (Tabla 4). El número de niños y niñas participantes fue similar y sus edades estuvieron comprendidas entre 10 a 12 años, no hubo diferencias en edad y sexo.

En los antecedentes de las historias clínicas de los niños del estudio, todos habían completado el esquema de vacunación del Ministerio, también se observó que todos tenían controles de peso y talla, unos niños con controles mas regulares que otros, se encontró un caso de un niño con sobrepeso.

#### **4.2.- Resultados de Coproparasitarios.-**

Inicialmente, se analizaron 15 muestras de heces fecales de cada uno de los niños de las cuales 9 resultaron positivas para parásitos intestinales y las restantes 6 fueron negativas para parásitos. Para determinar la gravedad de la parasitosis, la carga parasitaria de los niños se determinó con el método de Kato Katz (Tabla 5). En la Tabla No 5 se indica que el mayor número de huevos por gramo para *Ascaris lumbricoides*, fue de 1896, y de *Trichuris* 192.

Todos los niños con parásitos recibieron tratamiento antiparasitario con Thiabendazol 25mg/Kg./día en 2 tomas por tres días. Con el propósito de mantener a los niños libres de parásitos durante el periodo de estudio se realizó un seguimiento de los mismos mediante llamadas telefónicas a sus hogares para recordarles buenas prácticas de higiene. Luego de un mes de iniciado el tratamiento, nuevamente se recolectaron muestras de heces para un segundo coproparasitario de control. En este último examen no se identificaron helmintos intestinales. Pero se excluyó a 1 niño del grupo participante porque no entregó la muestra de heces (Tabla 6 y 7).

#### **4.3.- Extracción ADN y Análisis de la microbiota por DGGE-PCR.-**

Se extrajo ADN de las heces fecales de los niños no infectados y de los niños infectados antes y después de su tratamiento. La figura No1 indica la presencia de bandas definidas de alto peso molecular que son compatibles con la presencia de ADN. El análisis por PCR-DGGE se lo hizo en colaboración con el laboratorio de Inmunobiología de la universidad

de Illinois en Urbana. Para transportar las muestras de DNA, este se precipito y las muestras fueron secadas para su transporte.

#### **4.4.-PCR con primers universales de la región V3 del ARNr 16S.-**

Se utilizaron primers universales de la región v3 del 16s ARN ribosomal con el propósito de amplificar esta región de “todas” las especies bacterianas presentes en las heces fecales de los sujetos del estudio. La figura No 2 indica la amplificación de amplicones de 200 bp luego del PCR para cada una de las muestras de los sujetos participantes. Las bandas de 200 bp representan en teoría las distintas especies bacterianas presentes. Los productos de esta amplificación por PCR (bandas de 200 bp) fueron sometidos a separación por DGGE.

#### **4.5.- Patrones de bandas por PCR-DGGE de muestras de heces de niños con y sin infección por helmintos.-**

El DNA aislado de las heces fecales de niños sin infección e infectados por helmintos se sometió a análisis por PCR-DGGE de la región 16S ARNr (Figura No 3 y 4). El programa (software) “diversity database” se utilizo para analizar los patrones de bandas del análisis. Este “software” analiza los patrones de bandas mediante la medición de las distancias de migración y la intensidad de las bandas. Las figuras No 3 y 4 indican el perfil de bandas correspondientes a todas las muestras analizadas. Se puede observar que el patrón de bandas de niños sin infección, de los niños infectados y de los niños tratados con antiparasitarios es diferente, las diferencias son en la posición, intensidad y número de bandas presentes. Existen marcadas diferencias entre las bandas que se observan en niños sin infección cuando estas se comparan con los patrones de niños infectados y tratados. Sin

embargo, los patrones de bandas de los niños infectados antes y después del tratamiento son parecidos pero no son iguales ya que algunas bandas fueron comunes en todas las muestras. Estos resultados indican que la composición microbiana de las heces de niños sin infección es diferente que la composición bacteriana de niños infectados con helmintos.

En las figuras No 5 y 6 se ilustra el dendograma de la comparación de muestras de niños infectados, tratados y no infectados; donde se ve la comparación entre los participantes infectados y tratados con los participantes control en la región V3-16S ADN ribosomal.

El promedio de bandas de los niños infectados es de 14.5 bandas, el de los niños tratados es de 14.25 bandas y el de los niños del grupo control es de 13,5 bandas. Esta comparación indica que todas las muestras son similares, existen diferencias en la cantidad de bandas de ADN pero son muy pocas.

Por otro lado, el tratamiento antiparasitario aunque modifica la composición bacteriana este cambio no es muy marcado. El número de bandas del grupo control c (no infectados no tratados), tenía un rango entre 2 y 3 bandas diferentes del grupo de niños infectados y con tratamiento. Figura No 3 y No 4.

La Media,  $X = 311 / 22$  ;  $X = 14.1$

La Mediana,  $Md = 14.5$  equivalente al 50%

La Moda,  $M = 13$ , porque ese es el número de bandas que mayores veces se repite.

La desviación estándar es de:

$$S = \sqrt{\sum(X-X)^2 / (n-1)} \quad S = \sqrt{\sum(311-22)^2 / 22-1} \quad S = 64.7$$

## 5.- DISCUSION

El estudio de la microbiota intestinal en niños con parasitosis ha tenido poca atención. La dificultad en el análisis de un ecosistema complejo como el que se encuentra a nivel intestinal hace difícil esta clase de estudios. El gran número de especies presentes así como la dificultad de cultivo imposibilita el análisis global de la microbiota. En el presente trabajo se ha utilizado la técnica PCR-DGGE para demostrar que la composición de la microbiota intestinal es diversa y similar pero no igual, en niños sin infección por helmintos cuando se compara con la microbiota de niños con infección durante y después de su tratamiento. Los datos indican que la microbiota intestinal de sujetos infectados con parásitos es distinta a la de aquellos que no están infectados y que la microbiota de sujetos infectados antes y después del tratamiento es parecida. Las pequeñas diferencias que se observan entre los sujetos infectados y no infectados podría deberse no solamente a la presencia o ausencia de parásitos sino también a que cada persona tiene una microbiota distinta. Por otro lado, los datos indican que aunque hubieron perfiles microbianos diferentes en los sujetos infectados antes y después del tratamiento antiparasitario en general la composición de la microbiota fue más parecida que cuando se compara la microbiota con otros sujetos. Con este trabajo se demuestra también la utilidad de esta técnica para posteriores trabajos en los que se quiera evaluar la microbiota intestinal en respuesta a otras patologías o a cambios producidos por la dieta o tratamientos como uso de antibióticos o procedimientos quirúrgicos.

Los niños del estudio tenían en sus historias clínicas antecedentes de haber completado el esquema de vacunación del Ministerio, al mismo tiempo tenían controles de peso y talla unos más regular que otros, se encontraron casos de desnutrición crónica tanto en niñas como en niños, y un caso de un niño con sobrepeso.

En general la situación nutricional de los niños del estudio era buena se encontraban dentro de los parámetros normales de la curva de crecimiento entre los percentiles 10 y 25. Entre los niños infectados y no infectados casi no existían diferencias nutricionales, en el grupo de control se presentó un niño con sobrepeso.

Los extremos fueron: un caso de una niña del grupo infectado con percentil en peso  $< 5$  y en talla  $< 3$ , y un niño en grupo control con percentil en peso de  $>75$  y en talla  $> 50$ . Los problemas de malnutrición en nuestro país son muy comunes y más en las áreas rurales, esto afecta a la vez su crecimiento y desarrollo y a la vez hace que sean más propensos a otras enfermedades como las infecciones intestinales bacterianas y parasitarias.

Estudios en animales, como en los cerdos, demuestran que la infección con parásitos y bacterias patógenas sinergizan causando mayores daños patológicos a nivel intestinal (10). Se presentó una hipótesis en humanos que la infección con parásitos potencializa la patogenicidad de la infección bacteriana (18). Por eso es importante indicar que se deben realizar más estudios en humanos que comprueben esta hipótesis del daño de la coinfección entre parásitos y bacterias.

También es importante recalcar que se deben realizar estudios posteriores en donde se pueda identificar cuales son los grupos bacterianos que son distintos entre los niños infectados y los no infectados con parasitosis, así se podría determinar si los niños con parásitos tienen o no mayor riesgo de desarrollar enfermedades bacterianas (15).

## 6.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Como conclusiones podemos decir que se encontró que todas las muestras eran similares, existen pocas diferencias entre la microbiota de los niños estudiados y los niños control.

Los promedios de las bandas entre los grupos estudiados y el grupo de control son muy similares.

El análisis de los patrones de bandas en los geles de DGGE indica la presencia de bandas comunes en todos los grupos así como también algunas bandas que estaban presentes solamente en cada uno de los grupos.

Estas similitudes talvez se deban a la existencia de la coinfección con bacterias, ya que las características físicas y de desarrollo de los niños del estudio con los niños control eran muy parecidas, a pesar que no se reportaron en algunas historias clínicas previas infecciones intestinales, tenían condiciones nutricionales similares.

Es importante también acotar que la desnutrición de los niños es un factor favorable para la invasión de bacterias y parásitos, esto hace que a su vez se altere la microbiota intestinal y permita una nueva co-infección. Por eso es recomendable dar periódicamente a los niños recordatorios de buena salud e higiene, para procurar evitar futuras infecciones.

Además hay que seguir con un plan de alimentación adecuado para mejorar su estado nutricional y mantenerlo bajo condiciones normales.

Para posteriores estudios sobre la microbiota intestinal en niños, es necesario un mayor número de muestras de sujetos participantes, tanto de los niños infectados y tratados como de los niños control para obtener un valor más real de cada grupo. Los estudios posteriores servirán también para analizar mejor las causas de la coinfección y el daño a la microbiota y a su vez así tratar de evitar las infecciones en los niños para reducir las tasas de parasitosis e infecciones intestinales que existen mundialmente en países en desarrollo.





## 7. MATERIAL DE REFERENCIA

### 7.1.-BIBLIOGRAFIA

- 1.- Mims C., Playfair J., Roitt I., Wakelin D., Williams R., Anderson R., Medical Microbiology., Editorial Mosby., Cap 3., Hong Kong., China., 1993.
- 2.- Guarner F., El Colon como órgano: hábitat de la flora bacteriana., Unidad de Investigación de Aparato Digestivo. Hospital Universitario Vall d'Herbron., Barcelona., 2002.
- 3.- Bäckhed F., Ley R., Sonnenburg J., Peterson D., Gordon J., Host- Bacterial Mutualism in the Human Intestine., Science, vol 307., 25 marzo 2005
- 4.- Moraga R., Flora Microbiana Normal., Microbiología Médica, Enfermería., 2004.
- 5.- <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000259.htm>
- 6.- <http://www.tratado.uninet.edu/C030306.html>
- 7.- Avilés José., Perfil de la Salud Ambiental de la Niñez en el Ecuador., Ministerio de Salud Pública., octubre, 2001.
- 8.- Talaro Kathleen., Talaro Arthur., Foundations in Microbiology., Mc Graw Hill., 4ta edición., Cap 23., NY., EEUU., 2002.
- 9.- Mansfield., L., Gauthier D., Abner S., Jones K., Wilder S., Urban J., Enhancement of Disease and Pathology by Synergy of *Trichuris Suis* and *Campylobacter jejuni* in the Colon of Immunologically Naive Swine., The American Society of Tropical Medicine and Hygiene., 68(1), 2003, pp 70-80
- 10.- Mc Cartney. A.L., Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora., British Journal of Nutrition., 2002, Suppl. 1, S29-S37.
- 11.- Conde-Bonfil., Ma.Carmen., Mora-Zerpa Carlos, Entamoeba Histolytica: un desafío vigente., Salud Publica de México, mayo-junio de 2000, VOL.34, No.3,
- 12.- Ramnik J., Podolsky X., Podolsky D., How to Get Along-Friendly Microbes in a Hostile World., Science, vol 289., 1 septiembre 2000.
- 13.- World Health Organization Informal consultation on intestinal parasitic infections (NUT) 1981;3:32.

- 14.- Beltrán M., Tello R., Manual de procedimientos de Laboratorio para el Diagnóstico de los Parásitos Intestinales del Hombre, Ministerio de Salud, 2003, Lima, Perú.
- 15.- Heather L., Hooper C., Hooper L., Commensal Bacteria Shape Intestinal Immune System Development, ASM News, vol 71., Number 2., 2005.
- 16.- Devera Rodolfo., Cermeño Julman R., Prevalencia de Blastocistosis y otras Parasitosis Intestinales en una Comunidad rural del Estado Anzoátegui, Venezuela, FLAP, Parasitol Latinoam 58, 2003.
- 17.- Organización Panamericana de la Salud (OPS)., La Salud en las Américas, edición de 1998, Volumen II., publicación científica No 569., Washington DC.
- 18.- Shin Jennifer., Gardiner Geoffrey W., Does Whipworm Increase the Pathogenicity of *Campylobacter jejuni*? A Clinical Correlate of an Experimental Observation, Can Gastroenterol vol 18., No 3, Marzo 2004.
- 19.- Hagel, Isabel., Salgado Antonio., Factores que Influyen en la Prevalencia e Intensidad en las Parasitosis Intestinales en Venezuela, Gac Méd Caracas; Vol. 109, N° 1, marzo 2001.
- 20.- Maizels, Rick., Yazdanbakhsh, Maria., Immune Regulation by Helminth Parasites: Cellular and Molecular Mechanisms, Nature Reviews – Immunology., Vol 3., Septiembre 2003.
- 21.- Oswald, Isabelle P., Role of Intestinal Epithelial Cells in the Innate Immune Defence of the pig Intestine, INRA, EDP Sciences, Vet. Res. 37, pags. 359 - 368, 2006.
- 22.- Zoetendal, Erwin G., Collier, Chad T., Molecular Ecological Analysis of the Gastrointestinal Microbiota: A Review, America Society for Nutritional Sciences, pag 465-471, 2004.
- 23.- Claros, Gonzalo., Saladrigas, Verónica., Vocabulario Inglés Español de Bioquímica y Biología Molecular, REB 23, 2004.
- 24.- Bancroft, Allison J., McKenzie, Andrew N.J., A Critical Role for IL-13 in Resistance for Intestinal Nematode Infection, The American Association of Immunologists, 1998.
- 25.- McDermott, Jacqueline R., Humphreys, Neil E., Intraepithelial NK Cell-Derived IL-13 Induces Intestinal Pathology associated with Nematode Infection, The American Association of Immunologists, 2005.
- 26.- Zünd, Gregor., Madara, James L., Interleukin-4 and Interleukin-13 Differentially Regulate Epithelial Chloride Secretion, The journal of Biological Chemistry, Vol.271, No 13, March 1996.

## 8.- ANEXOS/APENDICES

## 8.1 Tablas

<b>TABLA 1</b> <b><u>MECANISMOS FISIOPATOLOGICOS DE LA DIARREA</u></b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Inflamatorio</li><li>• Secretor</li><li>• Osmótico</li><li>• Motilidad intestinal alterada</li><li>• Facticia.</li></ul>

<b>TABLA 2</b>
----------------

**FORMAS DE PRESENTACION DE LA DIARREA INFECCIOSA****1.NO INFLAMATORIA O SECRETORA**

- Producida por enterotoxinas o tóxicos
- Heces acuosas abundantes
- Aumento de secreción intestinal

**2.INFLAMATORIA O DISENTERIA**

- Producida por citotoxinas o gérmenes invasivos
- Heces hemorrágicas con pus y moco.
- Aumento de secreción intestinal y/o absorción alterada
- Leucocitos en heces.

TABLA 3	
<u>CAUSAS INFECCIOSAS DE DIARREA AGUDA</u>	
<b>1.VIRUS</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Rotavirus</i></li> <li>• <i>Virus Norwalk</i></li> <li>• <i>Otros virus</i></li> </ul>	<b>BACTERIAS (continuación)</b> <p><i>Vibrio cholerae</i></p> <p><i>Vibrio parahemolyticus</i></p> <p><i>Yersinia</i></p> <p><i>Escherichia coli</i></p> <p><i>Clostridium botulinum</i></p> <p><i>Clostridium difficile</i></p>
<b>2.BACTERIAS</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i></li> <li>• <i>Bacillus cereus,</i></li> <li>• <i>Clostridium perfringens</i></li> <li>• <i>Salmonella</i></li> <li>• <i>Shigella</i></li> <li>• <i>Campylobacter</i></li> <li>• <i>Listeria monocytogenes</i></li> </ul>	<b>3.PARASITOS</b> <p><i>Entamoeba hystolytica</i></p> <p><i>Giardia lamblia</i></p> <p><i>Cryptosporidium</i></p> <p><i>Isospora Belli</i></p>

Tabla 4

CARACTERÍSTICAS DE LOS NIÑOS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO

	PARTICIPANTES
Sexo (M/F)	7 / 8
Edad	10 – 12 años
Peso (Kg.) (M/F)	P 50 / P 50
Talla (cm.) (M/F)	P 10 / P 25

P: percentil

Tabla 5

RESULTADOS KATO KATZ

Sujetos	Huevos por gramo
1.- hombre	<i>ASCARIS 360</i>
2.- hombre	<i>ASCARIS 360 Y TRICOCEFALOS 72</i>
3.- mujer	<i>ASCARIS 1896</i>
4.- mujer	<i>ASCARIS 72</i>
5.- hombre	<i>ASCARIS 1296</i>
6.- mujer	<i>TRICOCEFALO 192</i>
7.- hombre	<i>TRICOCEFALO 72</i>
8.- mujer	<i>ASCARIS 240</i>
9.- hombre	<i>ASCARIS 480</i>

Tabla 6

COPROPARASITARIO MUESTRAS POSTRATAMIENTO

<b>Sujetos</b>	<b>Resultados</b>
----------------	-------------------

9.- hombre

ERROR: syntaxerror  
OFFENDING COMMAND: --nostringval--

STACK:

86  
11824  
3