

Compendio Investigativo de Academia Journals Celaya 2015



Libro en CDROM
ISBN
978-1-939982-18-6



celaya.academiajournals.com

<http://www.academiajournals.com/inicio-celaya/>

Recopilación de Ponencias del Congreso Internacional de Investigación
Academia Journals Celaya 2015

ISBN 978-1-939982-18-6

Instalaciones del Instituto Tecnológico de Celaya
Celaya, Guanajuato, México
4, 5, y 6 de noviembre de 2015

DETERMINACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE UN PROBIÓTICO EN RATAS INFECTADAS CON *T. spiralis*

Claudia Herminia Maldonado Tapia, Juan Román Núñez, Jesús Muñoz E, Alejandra Moreno Garcia.

Unidad Académica de Ciencias Biológicas, Unidad Académica de Ciencias Químicas, Unidad Académica de Odontología. UAZ.

Email: clau26_85@hotmail.com

RESUMEN: La Trichinellosis enfermedad zoonótica cosmopolita, se propuso la administración del probióticos, se recolecto sueros de 9 ratas, divididos; G1, G2, GC. G1 y G2 infectadas con *Trichinella spiralis*. G1 se administró 0.2ml VO el probiótico un día pos infección/38 días. Los días 0, 15, 30, 38 se recolecto suero, se realizó frotis sanguíneo, talla y peso, se sacrificaron el día 38, se realizó técnicas directas, (D/A) se obtuvo diferencia significativa de $p < 0.01$ entre G1 y G2, CP resultado diferencia significativa $p < 0.05$, $p < 0.01$ entre G1 y G2. Técnicas indirectas observó en la eosinofilia diferencia entre G1 y G2 del 10% el día 15, el da 30 fue 20 %, la diferencia entre estos grupos el día 38 fue del 12%, no se considera significativa, comparada con GC la eosinofilia de ambos grupos fue significativa ($p < 0.01$), se realizó MIDD, Dot-ELISA e resultando positivos a partir del día 15 en ambos grupos, WB observó triplete característico de *T. spiralis* a partir del 15 días. Sugerimos administrar probióticos para la parasitosis, disminuye carga e implantación parasitaria.

Palabras claves: *Trichinella spirali*, Probiótico

INTRODUCCIÓN

La Trichinellosis, es una zoonosis parasitaria causada por *Trichinella spiralis*, estimula el desarrollo de diversas patologías, es un helminto de aspectos morfológicos distintivos con dimorfismo sexual, puede habitar en diferentes hospederos incluido el humano (Pozio *et al.*, 2009).

La *Trichinella* spp. se han reportado en animales domésticos como salvajes en 66 países (Pozio y Murrell, 2011) la prevalencia mundial estimada de Trichinellosis alcanza los 11 millones de personas (Riva *et al.*, 2007), lo que representa un gran problema de salud pública. Los parásitos nematodos del género *Trichinella* muestran una amplia distribución a nivel mundial, actualmente se conocen doce especies, la cual *T. spiralis* es el agente patológico más importante (Gottstein *et al.*, 2009). La Trichinellosis humana se produce por consumo de carne infectada (Pozio y Murrell, 2011), principalmente de cerdo mal cocida (Chávez *et al.*, 2012); en México, se han registrado brotes de trichinellosis en los estados de Jalisco, México, Chihuahua y Zacatecas (Moreno *et al.*, 2012). En la actualidad, diferentes estudios se han enfocado en la biología de este parásito, ampliando el conocimiento en el campo de su biología, sin embargo en el ámbito terapéutico contra dicha parasitosis, aún sigue siendo un campo directo a nuevas propuestas (Abramowicz *et al.*, 2007).

Expertos de la FAO y la OMS en el 2006 establecieron a los probióticos como "microorganismos vivos, administrados en cantidades apropiadas, confieren al huésped beneficio para la salud". Hace un siglo, Elie Metchnikoff (Científico ruso Premio Nobel, profesor del Instituto Pasteur de París) postuló que las bacterias ácido lácticas (BAL) conferirían beneficios a la salud, promovían conservación. Sugería que la "autointoxicación intestinal" la pérdida que resultaba podrían suprimirse modificando la microbiota intestinal, reemplazando los microorganismos proteolíticos (*clostridium*, produce sustancias tóxicas, fenoles, indoles, amoniaco., a partir de digestión de proteínas por microorganismos logrados. Desarrolló dieta a base de leche fermentada, "Bacilo búlgaro" (Guarner, *et al.*, 2011). En 1917, el profesor alemán Alfred Nissle aisló una cepa no patógena de *Escherichia coli* a partir de heces de un soldado de la Primera Guerra Mundial que no había desarrollado enterocolitis durante un brote severo de shigellosis. Los trastornos intestinales eran tratados (bacterias no patógenas viables), con el fin de modificar o reemplazar la microflora intestinal (Guarner, *et al.*, 2011). Los profesionales de la salud prestan cada vez más atención a los efectos benéficos de los probióticos en la salud humana, en particular de los productos lácteos en los niños y otros grupos de alto riesgo de la población. Se registró que los probióticos desempeñan un papel importante en funciones inmunitaria, digestiva, respiratoria que ayudaría de forma significativa a aliviar enfermedades infecciosas en niños (FAO y OMS., 2006).

En el epitelio intestinal los probióticos pueden ayudar a la interacción entre la respuesta inmune intestinal específica como inespecífica, esto está relacionado con su efecto-benéfico sobre el hospedador. En estudios se reporta que los lactobacilos modifican el sistema inmune intestinal, secundariamente al evitar la implantación de los microorganismos patógenos, debido a la producción de inmunoglobulina A, activación de células K (natural killer) (Arribas., 2009). En la acción de inmunitaria del epitelio intestinal el 60% de las células inmunitarias están presentes en mucosa intestinal. Controla las respuestas inmunitarias contra (Proteínas de la dieta, Prevención de alergias alimentarias, Microorganismos patógenos, Virus (rotavirus, poliovirus), bacterias (*Salmonella*, *Listeria*, *Clostridium*) y Parásitos (*Toxoplasma*, etc.) (Guarner, *et al.*, 2011).

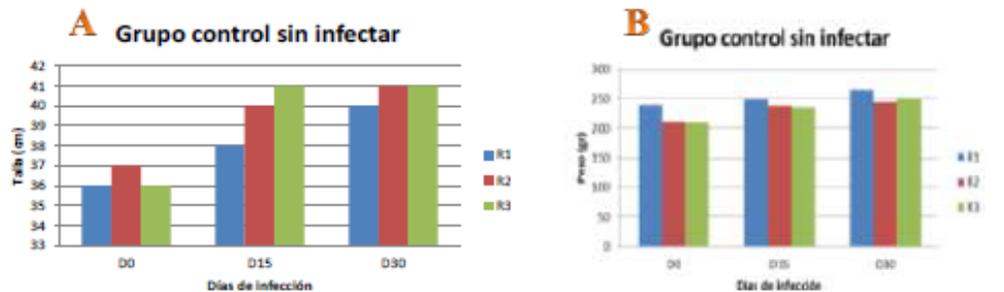
Objetivo General: Determinar el efecto protector de un probiótico comercial en la infección por *T. spiralis*.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

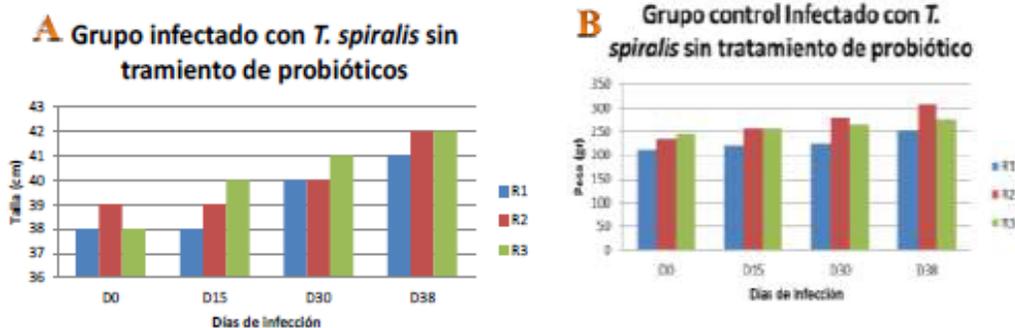
Modelo experimental

El presente estudio se realizó en nueve ratas Wistar hembras de 75 días de edad, clínicamente sanas, fueron identificadas como lo marca la NOM-062-ZOO 1999 utilizando la identificación parcial., A cada Grupo se pesó, midieron, se obtuvo muestra de sangre antes de infección, 15, 30, 45 día pos infección, y antes del sacrificio de los animales. Posteriormente se tomaron muestras de tejido muscular (diafragma, pierna, lengua, masetero y piel). Con las muestras de sangre y tejidos se realizaron técnicas directas e indirectas empleadas en el diagnóstico de *T. spiralis*. Los animales fueron divididas en 3 grupos experimentales; G1: grupo 1, G2: grupo 2, GC: grupo Control. El G1 y G2 fueron infectadas por vía oral con 500 LI de *Trichinella spiralis*. Al G1 se le administró 200 µl vía oral un probiótico (*Lactobacillus casei Shirota* de Yakult®), iniciando un día pos-infección por 38 días. Para obtención de suero se centrifugo a 3500 rpm 0 minutos la sangre, para las técnicas serológicas. Los animales fueron sacrificados de acuerdo a la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Las Técnicas directas utilizadas (Digestión Artificial DA, Compresión en placa C/P) y Técnicas indirectas (Eosinofilia, Microimmunodifusión doble MIDD y Dot-ELISA)

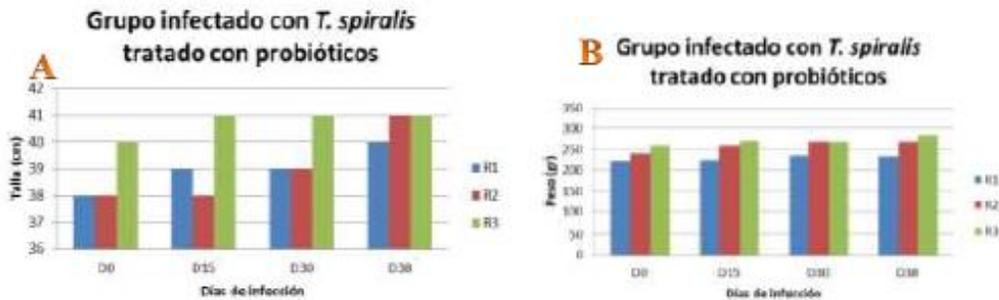
RESULTADOS



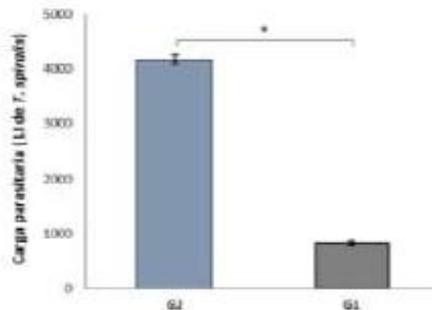
Gráfica 1. Se observa talla y peso GC, mostrando la talla (1-A), el peso (1-B) de las ratas del GC, durante todo el periodo de estudio. En las cuales se observa un aumento tanto de talla y peso gradualmente respecto al tiempo.



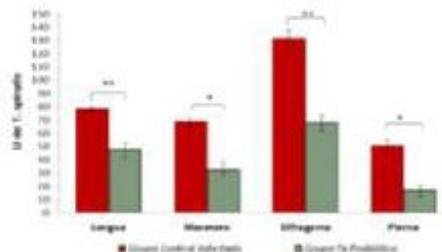
Gráfica 2A. Se muestra la Talla del G2, en 2-B el peso de los animales del Grupo infectado con *T. spiralis* sin tratamiento durante los día 0, 15, 30 y 38, haciendo evidente el aumento de talla como peso respectivamente.



Gráfica 3. Se observa la talla y peso respectivamente del G1. En donde muestra la talla (3-A) y el peso (3-B) de las ratas del Grupo infectado con *T. spiralis* y tratadas con el probiótico, durante todo el periodo de estudio, observándose aumento tanto de talla y peso respecto al periodo de estudio.



Gráfica 4. Se observa la carga parasitaria de LI de *T. spiralis* por la técnica de digestión artificial obteniendo los siguientes valores para el G2 se obtuvo 450 μ l, para el G1 se obtuvo 100 μ l de LI de *T. spiralis* por lo que mediante el estudio estadístico por prueba *t de Student*, donde se obtuvo un $*p < 0.01$, considerando los resultados significativos en donde el Grupo donde se administró probiótico disminuye considerablemente la *T. spiralis*.



Gráfica 5. Muestra la implantación de LI de *T. spiralis* mediante la técnica de CP, en donde observamos los tejidos de músculo lengua, masetero, diafragma y pierna, en el grupo infectado con *T. spiralis* se muestroen todos los músculos mayor cantidad de LI en comparación con el grupo infectado *T. spiralis*, tratado con un probiótico (*Lactobacillus casei Shirota*), es menor la implantación del parasito, entre el grupo infectado con *T. spiralis* tratado con *Lactobacillus casei Shirota*, y el grupo infectado con *T. spiralis* que no recibió tratamiento, los valores son significativos según la media \pm D.E. por prueba de *t de Student*, donde $*p < 0.05$; $**p < 0.01$.

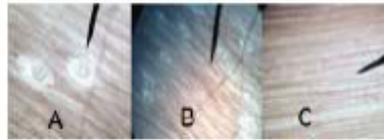


Figura 1. Se muestra en CP, A) tejido muscular infectado con *T. spiralis* a 40X, donde se logra apreciar la célula nodriza y ala LI su forma característica en espiral. En B) muestra las LI enquistadas de *T. spiralis* observado a 10X. C) se observa tejido sin LI, el cual corresponde al Grupo tratado con el probiótico.

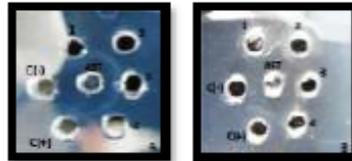


Figura 2. Con la técnica de MIDD se observa, A) complejo Ag-Ac en los pocillos 1, 2, 3, 4 y en el Control (+), haciéndose visible una línea de precipitación. B) Se muestra línea de precipitación en el pocillo del Control (+) y los sueros 1, 2, 3, 4 fueron negativos.



Figura 3. Con la técnica de Dot-Elisa se analizados 23 sueros problema, además de los sueros control (positivo y negativo). Resultado sueros positivos mediante la interacción Ag-Ac, mientras que en los sueros negativos no se observa ninguna tipo de reacción, en sueros de los días 15, 30 y 38, fueron positivos, no así para los sueros control negativo y los sueros del día 0.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se observó la implantación fue significativo entre los grupos de estudio se disminuyó la LI de *T. spiralis*. Los resultados fueron de $p < 0.05$ y $p < 0.01$ en animales que se administró *LcS* con respecto al grupo infectado con *T. spiralis* sin tratamiento, observándose disminución de LI en lengua el 39.75%, masetero el 52.18%, diafragma el 48.49% y pierna el 66.67%. Bautista *et al.*, en el 2001, observo disminución de LI por gramo de tejido muscular, al compararlos con los controles, (48.4 a 70.7 %), en roedores administrados de *L. casei* viable en comparación con los porcentajes de reducción de 65.9 y 24 %, respectivamente, obtenidos en los ratones tratados con lactobacilos muertos o con sobrenadante de *L. casei*. Bautista *et al.*, 2004 los porcentajes de reducción de TspMLAg observada en G3 (tratados por vía i.p. con *Lcv* e infectados con LI de *T. spiralis*) y G5 (infectados con LI de *T. spiralis* más adyuvante completo de Freund) fue significativa ($P < 0.01$) con respecto a los otros grupos (tratados con solución fisiológica y *Lcv* más infección con LI de *T. spiralis* más adyuvante incompleto de Freund). Martínez *et al.*, 2010, observaron cuando la infección con 200 LI la implantación disminuye en ratones NIH tratados con *L. casei* en un 80.9% con respecto a los controles que es el 100% , cuando la infección es de 25 y 50 LI de *T. spiralis*, la disminución de la carga parasitaria fue del 80% en roedores administrados con probiótico comercial en comparación con los que no tuvieron tratamiento. Bautista en el 2002 administró vía i.p. *L. casei* viables, en veintidos ratones hembra BALB/c adultos, libres de parásitos congénitos contra la infección de *T. spiralis*. Los ratones fueron distribuidos en cuatro grupos (Lc-1, Lc-2, Lc-3, T), la administracion de *Lactobacillus casei* viables, fue de la siguiente manera: el Lc-1 los días 14 y 7; en el Lc-2 los días 11 y 4 y en el Lc-3 los días 7 y 1; mientras que los animales del grupo testigo (T) no recibieron tratamiento. La reducción de la carga parasitaria en el intestino con relación al grupo testigo fue 36.4%, 42.45% y 90.9% para los grupos Lc-1, Lc-2 y Lc-3, respectivamente; dicha reducción sólo fue significativa en el grupo Lc-3 ($P < 0.05$). Existen estudios en donde se han demostrado que la



administración de *L. casei* genera una respuesta protectora dirigida contra los gusanos adultos en el intestino (GAI) Bautista, *et al.*, 1999, 2001, 2002; 2004, Randazzo y Costamagna en el 2005 y 2010 obtuvieron resultados semejantes, indican que el *L. casei* administrado vía oral produce efecto antagónico sobre la penetración del parásito en la mucosa intestinal, evitando que llegue a la fase muscular, coincidiendo con lo descrito por Martínez *et al.*, 2009 y 2011.

El ciclo de vida de *T. spiralis* fue afectado en intestino debido a la administración de LcS, las BAL ya que compiten con los patógenos *T. spiralis* por los nutrientes, se instalan en la pared intestinal haciéndolo más grueso Grellier y Silveira., 2011 lo que provoca que las HA se sitúen en mucosa de duodeno, yeyuno e ileon, evitando que LRN penetren a mucosa intestinal Randazzo y Costamagna., 2005, en este texto Rodríguez y Guillen en el 2013 observaron en grupo sano al que se le administró LcS presentó vellosidades más alargadas y borde de cepillo más engrosado que un grupo control sano sin administración de solo NaCl, encontramos una significancia estadística en el recuento de células productoras de moco por campo es mayor en ratas tratadas con LcS comparadas con control, la función del moco (formado por la combinación de agua y mucina) en el intestino es lubricar la capa que recubre internamente (epitelio) al tracto gastrointestinal, protegerlo contra el daño mecánico, contra efectos nocivos del ácido estomacal (el moco mantiene separados a los ácidos y las enzimas del tejido intestinal) así como contra patógenos (Ricard., 2008). Los probióticos modulan el peristaltismo intestinal donde se da la expulsión, no le permite la maduración y reproducción, Bautista *et al.*, 1999; lo describe como expulsión rápida, evita que llegue a circulación, por consecuencia a fase muscular. Así mismo Bautista *et al.*, 2001 indicaron que la inmunoestimulación de los probióticos es importante en la expulsión del parásito, los probióticos pueden inducir la modulación inmune. Randazzo y Costamagna en el 2005 dicen que las BAL activan la producción de IgA, el cual tiene efectos inmunoestimulantes así como efectos antitumorales, en la prevención de infecciones entéricas. Tales efectos son el resultado de un tratamiento cíclico y prolongado con bacterias probióticas. En este contexto, se ha demostrado que el tratamiento de ratones por vía intraperitoneal con *L. casei* Shirota aumentó la producción de IgA intestinal contra *T. spiralis* y que la IgA específica anti-*Trichinella*, como una parte de la respuesta inmunitaria general contra el parásito Martínez *et al.*, 2009, actúa al impedir el establecimiento de parásitos infectantes de *Trichinella* en el intestino del ratón. *L. casei*, como probiótico, influye y modula respuestas inmunitarias, en parte mediadas por el tejido linfóide asociado al intestino, promueve protección inmunitaria mediante la producción de interferón gama (IFN) e interferón alfa, y un estímulo de las células T helper (Th) 1, productoras de citocinas, activación de macrófagos y procesamiento acelerado de antígenos (Randazzo y Costamagna., 2010).

Existen otros estudios experimentales donde se observa un efecto protector de los probióticos ante diferentes parásitos como *Cryptosporidium parvum* (Alak, *et al.*, 1997, 1999), *Giardia* (Humen, *et al.*, 2005), *Toxocara canis* (Chiodo, *et al.*, 2008, 2010; Ávila, *et al.*, 2013), *Plasmodium chabaudi* (Agnés *et al.*, 2011), *Trypanosoma cruzi* (Bautista, *et al.*, 2008).

En la técnica de MIDD, obtuvimos resultados positivos a partir de la segunda semana p.i., sin embargo la nitidez de la línea de precipitación de sueros positivos fue aumentando al aumentar los días de infección en roedores, Venturiello *et al.*, 1987. Observaron la línea de precipitación que indica la interacción Ag-Ac en rata se observó a partir de los 10 días p.i., en ratón a los 30 días posterior al reto con *T. spiralis*. Moreno *et al.*, 2004, encontraron la presencia de Ac anti-*T. spiralis* a la cuarta semana post infección en modelo experimental de cerdo, por la técnica de MIDD. Alvarado (2009) reporto positivo a partir de la tercera semana de infección por *T. spiralis* en modelo murino, mediante la técnica de MIDD.

Por Dot-ELISA se evaluó la presencia de anticuerpos IgG anti-*T. spiralis*, observando sueros positivos a partir de la segunda semana de infección. Zuñiga en el 2002 en un modelo murino obtuvo todos sus sueros positivos después de tres meses de infección con 200 y 100 LI. En un estudio de Aguilar *et al.*, 2000, observó en suero de cerdo positivo a anticuerpos anti-*T. spiralis* por Dot-ELISA a las cuatro semanas post-infección, y no así para 2 sueros cerdos los cuales mostraron resultados positivos una semana post-infección.

En nuestros estudios de los sueros de rata infectados experimentalmente por vía oral con *T. spiralis* de nuestros dos grupos (G1 y G2), analizados por técnicas serológicas obtuvimos diferencias en la línea de precipitación por MIDD, en la reacción de color (Dot-ELISA), siendo positivos en todos ellos. Bautista *et al.*, 2011 obtenían la media de los niveles séricos de IgG anti-*T. spiralis* fue significativamente mayores en los ratones tratados con *L. casei*, en las tres dosis de infección de *T. spiralis*, al 4 días y 10 días, en comparación con los niveles observados en los ratones de control, nosotros no realizamos cuantificación de niveles séricos de IgG anti-*T. spiralis* sugerimos que este es el motivo por el cual disminuye la carga parasitaria en las ratas tratadas con LcS e infectadas con *T. spiralis* a pesar de tener una reducción de la carga parasitaria en comparación al grupo infectado con *T. spiralis* sin tratamiento

CONCLUSIÓN

En presente estudio demuestra que la utilización de un probiótico comercial tiene un efecto de protección en la infección por *Trichinella spiralis* estadísticamente significativo.

REFERENCIAS

- Abramowicz, M., M. Rizack, D. Goodstein, A. Faucard, P. Hansten and N. Steigbigel. "Drugs for parasitic infections." *Med Lett Drugs Ther* 2007 5: e6.
- Alvarado I "Evaluación de la intradermorreacción en el diagnóstico de *Trichinella spiralis* en modelo murino. Zacatecas, México". *Tesis de licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo*. Unidad académica de Ciencias Químicas Unidad Académica de Biología Experimental. Universidad Autónoma de Zacatecas. 2009. 1-60.
- Arribas Arribas M. B. "Probióticos: una nueva estrategia en la modulación del sistema inmune". *Tesis doctoral para aspirar al grado de Doctor en Farmacia*. Granada. España. Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada. 2009. 1-213.
- Ávila, L.F.C., Telmo, P.L., Martins, L.H.R., Glaeser, T.A., Conceição, F.R., Leite, F.P.L. y Scaini, C.J. "Protective effect of the probiotic *Saccharomyces boulardii* in *Toxocara canis* infection is not due to direct action on the larvae". *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 55(5). 2013.363-365.
- Bautista Garfías C.R., Ixta Rodríguez O., Orduña M., Martínez F., Aguilar B., Cortés A. "Enhancement of resistance in mice treated with *Lactobacillus casei*: Effect on *Trichinella spiralis* infection". *Veterinary Parasitology*. 8. 1999. 251-260.
- Bautista Garfías C.R., Torres Álvarez M. del C., Martínez Gómez F. "La inoculación de *Lactobacillus casei* en ratones NIH induce una respuesta protectora contra la infección por *Trypanosoma cruzi* (cepa Ninoa)". *Vet. Mex.* 39(2). 2008. 139-144.
- Chávez, G. E. G., V. M. R. Morales, E. S. J. Saldivar, H. G. Reveles, J. J. Muñoz and G. M. A. Moreno. "Efecto del Albendazol en ratas Long Evans gestantes e infectadas con *T. spiralis*." AVFT-Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica, 2012. 29(4).
- FAO y OMS. "Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación". *Informe del Grupo de Trabajo Conjunto FAO/OMS sobre Borrador de Directrices para la Evaluación de los Probióticos en los Alimentos*. 2006. 1-52.
- Grellier Philippe y. Silveira José F. "Probiotics for the Control of Parasites: An Overview". *Journal of Parasitology Research*. 2011. 1-11.
- Guarner Francisco, Khan A. G., Garisch J., Eliakim R., Gangl A., Thomson A. "Probióticos y prebióticos". *Guttes Mundiales de la WGO*. 2011. 1-29.
- Gottstein, B., E. Pozio and K. Nöckler. "Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of trichinellosis." *Clinical Microbiology Reviews*. 2009. 22(1): 127-145.
- Humen, M., De Antoni, G., Benyacoub, J., Costas, M., Cardozo, M., Kozubsky, L., Saudan, K., Boenzi-Bruand, A., Blum, S., Schiffrin, E., Pérez, P. "Lactobacillus johnsonii La1 antagonizes Giardia intestinalis in vivo". *Infect. Immun.* 73(2). 2005. 1265-1269
- Martínez Gómez Federico, Fuentes Castro Beatriz Eugenia, Bautista Garfías Carlos Ramón. "The intraperitoneal inoculation of *Lactobacillus casei* in mice induces total protection against *Trichinella spiralis* infection at low challenge doses". *Parasitol Res.* 109. 2011. 1609-1617.
- Martínez Gomez Federico, Santiago Rosales Rocio, Bautista Garfías Carlos R. "Effect of *Lactobacillus casei* Shirota strain intraperitoneal administration in CD1 mice on the establishment of *Trichinella spiralis* adult worms and on IgA anti-*T. spiralis* production". *Veterinary Parasitology*. 162. 2009. 171-175.
- Moreno, A., C. Maldonado, I. C. Ruvalcaba, R. G. Reveles and Z. Quiroz. "El estudio de *Trichinella spiralis* en modelos experimentales." REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria. 2012. 13(7): 1-12.
- Pozio, E., E. Hoberg, G. La Rosa and D. S. Zarlenga. "Molecular taxonomy, phylogeny and biogeography of nematodes belonging to the *Trichinella* genus." *Infection, Genetics and Evolution*. 2009.9(4): 606-616.
- Pozio, E. and K. Murrell. (2011). "Worldwide occurrence and impact of human trichinellosis." *Emerging infectious diseases*. from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3311199/?report=printable#1986-2009>
- Randazzo V., Costamagna S. R. "Comparación del efecto de la administración oral de dos probióticos en ratones infestados con *Trichinella spiralis*". *Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol.* 69 (1). 2010. 60-65
- Riva, E., P. Steffan and C. Fiel. "Trichinellosis: Aspectos múltiples de una zoonosis global." libro: Mejoramiento del control de la trichinellosis. FAO América Latina y el Caribe, Roma. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2007: 94-109
- Rodríguez Hernández Adán I., Guillén Martín del Campo J. A. "Hallazgos histológicos en intestino de ratas tratadas con Pre y probióticos Yogurt Kéfir + Vs bebida láctea fermentada (*Lactobacillus casei* Shirota). *Centro de Rehabilitación Infantil Teletón Aguascalientes*. 2013. 123-127.