

Efecto de la interacción de *Enterococcus faecalis* CECT 7121 en el ciclo biológico *Toxocara canis*.

Becario: Paula Gabriela Chiodo

Cátedra de Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP

e-mail: paula_chiodo@yahoo.com.ar

Director: Juan A Basualdo. Codirector: Marta C. Minvielle.

Resumen

Se describe los primeros resultados obtenidos sobre el efecto de la colonización intestinal por *Enterococcus faecalis* CECT 7121 (un potencial probiótico) sobre el ciclo evolutivo de *Toxocara canis* en el modelo murino. Se inocularon oralmente ratones N:NIH-Swiss de 25-30 g con una suspensión de 3×10^8 UFC/ml de la cepa del enterococo. A las 72 h cada animal fue desafiado con 100 huevos larvados de *T. canis*. A las 48 h post-infección se realizó el recuento de larvas presentes en hígado y pulmón. Los resultados demostraron una diferencia significativa en el número de larvas entre los ratones colonizados por el enterococo versus los no colonizados (promedio de 2,88 y 27,75 larvas por ratón, respectivamente). Estos resultados ameritan continuar los estudios sobre los posibles factores implicados que interfieren en el ciclo evolutivo de este parásito.

Palabras claves: *Toxocara canis*, probióticos, *Enterococcus faecalis*, modelo murino

Introducción

Toxocara canis es un áscarido intestinal cuyo hospedador es el perro. Una hembra adulta de *T. canis* tiene una vida media de 4 meses y puede eliminar 200.000 huevos no infectivos por día contaminando el ambiente. Los huevos desarrollarán el estadio larvario 2 con adecuadas condiciones de humedad y temperatura. Los mismos pueden infectar al hombre al ser ingeridos con alimentos contaminados o por geofagia. Las larvas se distribuyen por todo el organismo, y han sido descritas en el hígado, corazón, cerebro y otros órganos (Minvielle et al., 1999a). Los síndromes clásicos asociados a toxocariasis humana son larva migrans visceral (L.M.V.), larva migrans ocular (L.M.O.) y toxocariasis encubierta (Laufer, 2004). El modelo experimental murino ha sido utilizado como modelo biológico de toxocariasis humana (Minvielle et al., 1997, 1999b), ya que tanto el hombre como el roedor constituyen hospedadores paraténicos. Estudios previos del grupo de trabajo han demostrado que la mayor recuperación larval en hígado y pulmón se presenta a las 48 h post-infección (Basualdo et al., 1995).

Los probióticos son tradicionalmente definidos como microorganismos no patogénicos, viables, que cuando son ingeridos, tienen efectos beneficiosos en la prevención y tratamiento de varias enfermedades entéricas (Rolfe, 2000). Han sido utilizados en parasitosis tales como criptosporidiosis, giardiosis y triquinelosis (Alak et al., 1999; Bautista-Garfias et al., 2001; Humen et al., 2005)

Sparo y colaboradores han recuperado a partir ensilado natural de maíz la cepa de *Enterococcus faecalis* CECT 7121 y demostrado su actividad inhibitoria sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas (Sparo & Mallo, 2001; Sparo M, 2004). Además presenta la capacidad

de adherirse y persistir en el epitelio intestinal murino sin producir factores de virulencia. (Castro y col., 2003).

El objetivo de la primera etapa de esta beca fue evaluar el efecto de la colonización por *Enterococcus faecalis* CECT 7121 en el ciclo evolutivo de *Toxocara canis* en el modelo murino.

Materiales y métodos

Los huevos de *T. canis* obtenidos de la disección de hembras grávidas fueron incubados siguiendo la técnica de Oshima (1961), durante 3-4 semanas. Los mismos fueron contados por microscopía óptica.

La cepa *E. faecalis* CECT 7121 fue incubada en caldo BHI (Britania®) a 35°C durante 18 h. El cultivo fue centrifugado 15 minutos a 5800 x g y luego lavado 3 veces con PBS estéril. Se prepararon suspensiones de 3×10^8 UFC/ml.

En la experiencia se utilizaron 24 ratones machos N:NIH-Swiss de 25-30 g. (Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, U.N.L.P.). Los animales fueron divididos en cuatro grupos. El grupo experimental (Grupo IV) fue inoculado oralmente con 100 µl de la suspensión bacteriana. Esta dosis se repitió durante 3 días sucesivos. A las 72 h cada ratón fue infectado por vía oral con 100 huevos larvados de *T. canis*. Los animales fueron sacrificados a las 48 h. Se les extrajo el intestino, el hígado y el pulmón. Se emplearon 3 grupos control: I) ratones inoculados con huevos larvados de *T. canis* y PBS; II) ratones inoculados con la suspensión de *E. faecalis* CECT 7121 y III) inoculados con PBS solamente. Estos experimentos cumplieron con las normas vigentes sobre manejo de animales de laboratorio.

En el intestino se evaluó la colonización de *E. faecalis* CECT 7121 mediante recuento de UFC/g de intestino. La caracterización fenotípica de enterococos fue realizada por coloración de Gram y pruebas bioquímicas (Sparo et al., 2006). En hígado y pulmón se determinó el número de larvas de *T. canis* por microscopía óptica, previa digestión péptica (pepsina 1% en buffer glicina pH 1,5).

Los resultados se analizaron mediante Test de Student. Programa, GraPhad InStat, Versión 3.05, 2000.

Resultados

El recuento de *E. faecalis* CECT 7121 fue de $6,08 \times 10^4$ UFC/g ($s= 2,37 \times 10^4$) de intestino. El número de larvas de *T. canis* recuperadas en hígado y pulmón de los ratones se presentan en la Figura 1. En la misma se observa una diferencia significativa ($p = 0,012$) entre el grupo control I y el grupo experimental IV. En el grupo control II el recuento de *E. faecalis* CECT 7121 fue de $2,8 \times 10^5$ UFC/g ($s= 5,6 \times 10^4$) de intestino y en el grupo control III no se detectó la presencia del microorganismo.

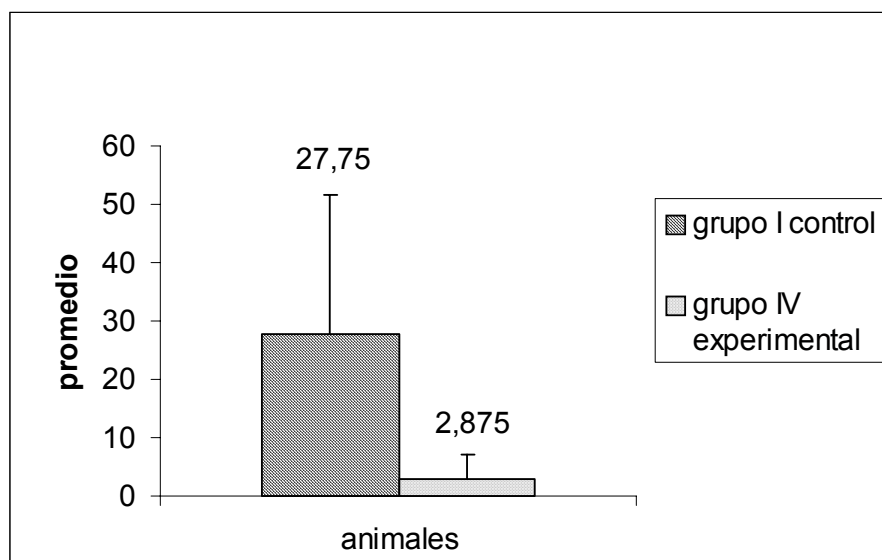


Figura 1

Promedio de larvas de *T. canis* recuperadas en hígado y pulmón de ratones inoculados con 100 huevos larvados. Grupo Control I: ratones inoculados con *T. canis* solamente. Grupo experimental IV: ratones tratados con *E. faecalis* CECT 7121 e inoculados con *T. canis*.

Discusión

Este estudio inicial del tema de Beca, demuestra una significativa disminución en la recuperación de larvas de *T. canis* en ratones colonizados con *E. faecalis* CECT7121. Este hecho alienta el desarrollo de futuras investigaciones para dilucidar su potencial aplicación en salud humana y animal.

Trabajos previos llevados a cabo por diversos autores demuestran la capacidad de bacterias probióticas de interferir en el ciclo evolutivo de diferentes parasitosis. Así por ejemplo, Alak y colaboradores. (1999) reportaron que ratones alimentados con *Lactobacillus reuteri* o *L. acidophilus* posteriormente infectados con *Cryptosporidium parvum*, tuvieron una corta y baja eliminación de ooquistes en comparación con los controles no alimentados con estos bacilos. Humen y colaboradores. (2005) encontraron que la administración de *L. johnsonii* La1 redujo la proporción de trofozoitos viables de *Giardia intestinalis* en el intestino de meriones y favoreció la resolución de la infección dentro de los 14 días post-infección. Bautista-Garfias y colaboradores (2001) reportaron la capacidad de *L. casei* viables, muertos y sobrenadante de cultivo de inducir resistencia contra la infección por *Trichinella spiralis* en ratones oralmente inoculados.

Diversos mecanismos han sido propuestos para explicar los efectos de los probióticos contra patógenos intestinales. (Rolfe 2000; Humen et al., 2005). Entre los mismos figuran: producción de sustancias inhibitorias que reduzcan la viabilidad de los patógenos, bloqueo de los sitios de adhesión, competición por nutrientes y la modulación de la respuesta inmune innata y adquirida.

Aunque el mecanismo que disminuye la recuperación de larvas de *T. canis* en los animales de nuestro experimento no se ha estudiado aún; nuestros resultados ameritan continuar los estudios sobre los posibles factores implicados que interfieren en el ciclo evolutivo de este parásito.

Bibliografía

- Alak, J.I.; Wolf, B.W.; Mdurvwa, E.G.; Pimentel-Smith, G.E.; Kolavala, S., Abdelrahman, H., Suppiramaniam, V., 1999. Supplementation with *Lactobacillus reuteri* or *L. acidophilus* reduced intestinal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in immunodeficient C57Bl/6 mice. Cell. Mol. Biol. 45, 855-863.
- Basualdo, J., Minvielle, M., Pezzani, B., Niedfeld, G., 1995. Relationship between parasitological inoculum and immunologic parameters in experimental toxocariasis. Zbl. Bakt. 282, 465-73.
- Bautista-Garfias, C.R., Ixta-Rodríguez, O., Martínez-Gómez, F., López, M.G., Aguilar-Figueroa, B.R., 2001. Effect of viable or dead *Lactobacillus casei* organisms administered orally to mice on resistance against *Trichinella spiralis* infection. Parasite. 8, S226-8.
- Castro, M., Andino, J., Lavigne, V., Ceci, M., Sparo, M., Manghi, M. 2003. *Enterococcus faecalis* MR 1024, posible candidato a prebiótico: estudio de implantación intestinal en ratones BALB/C. Jornadas Científicas de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica. Buenos Aires.
- Humen, M., De Antoni, G., Benyacoub, J., Costas, M., Cardozo, M., Kozubsky, L., Saudan, K., Boenzli-Bruand, A., Blum, S., Schiffrin, E., Pérez, P., 2005. *Lactobacillus johnsonii* La1 antagonizes *Giardia intestinalis* in vivo. Infect. Immun. 73, 1265-1269.
- Laufer, M., 2004. Toxocariasis <http://www.emedicine.com/PED/topic2270.htm>
- Minvielle, M.C., Pezzani, B.C., Basualdo, J.A., Niedfeld, G., 1997. Effect of fasting in experimental toxocarosis. Neotropica 43, 21-25.
- Minvielle, M.C., Niedfeld, G., Ciarmela, M.L., Basualdo, J.A., 1999a. Toxocarosis causada por *Toxocara canis*: aspectos clínico epidemiológicos. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 17, 300-306.
- Minvielle, M.C., Basualdo, J.A., Ciarmela, M.L., Niedfeld, G., 1999b. Anthelmintic efficacy of tinidazole against the progression of *Toxocara canis* larvae to the brain in mice. Parasitol. Res. 85, 830-832.
- Oshima, T., 1961. Standardization of techniques for infecting mice with *Toxocara canis* and observations on the normal migration routes of the larvae. J. Parasitol. 47, 652-656.
- Rolfe, R. D., 2000. The role of probiotic culture in control of gastrointestinal health. J. Nutr. 130, 396-402.
- Sparo, M. & Mallo R. 2001. Evaluation of the bacterial flora in natural corn silage. Rev. Argent. Microbiol. 33, 75-80.
- Sparo, M., 2004. Investigación de bacteriocinas en bacterias lácticas de la zona agropecuaria del partido de Tandil. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires
- Sparo, M., Castro, M., Andino, P., Lavigne, M., Ceriani, C., Gutiérrez, G., Fernández, M., De Marzi, M., Malchiodi, E., Manghi, M., 2006. Partial characterization of enterocin MR99 from a corn silage isolate of *Enterococcus Faecalis*. J. Appl. Microbiol. 100, 123-134.