



## Inhibición del crecimiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* por acción de probióticos

MARÍA PORFIRIA BARRÓN GONZÁLEZ, \*GRISelda CECILIA SERRANO VÁZQUEZ\*, LICET VILLARREAL TREVIÑO\*, JORGE ARMANDO VERDUZCO MARTÍNEZ\*, MARIO R. MORALES VALLARTA\*, BENITO DAVID MATA CÁRDENAS\*\*

La amibiasis, enfermedad parasitaria infecciosa del tracto gastrointestinal, ocasionada por el protozooario parásito *Entamoeba histolytica*, representa un problema de salud mundial. Afecta, principalmente, a los países en vías de desarrollo, con mayor frecuencia en las regiones tropicales, sobre todo en las áreas pobres y mal saneadas donde predominan la desnutrición, el hacinamiento y un manejo inadecuado de las aguas en general y de las excretas, que provocan la infección y la enfermedad. Existe, por lo tanto, una fuerte correlación entre estas condiciones y la frecuencia de la enfermedad. Se estima que 10% de la población mundial padece de amibiasis, la cual ocupa el tercer lugar como causa de muerte provocada por protozoarios, lo que resulta en aproximadamente 50 millones de casos de amibiasis invasora y hasta 100,000 muertes por año, la prevalencia de infección amibiana puede ser tan alta como 50% en ciertas áreas de los países en desarrollo.<sup>1</sup> Tasas elevadas de infección amibiana se reportan principalmente en la India, África y Centroamérica; en México constituye un problema muy importante de salud pública por su frecuencia y mortalidad.<sup>2</sup>

Para el tratamiento de la amibiasis y sus múltiples manifestaciones clínicas, la droga de elección

es el metronidazol. Sin embargo, se ha demostrado en estudios efectuados en ratones que el metronidazol es tanto mutagénico como carcinogénico.<sup>3</sup> Además, se ha reportado resistencia de *E. histolytica* a esta droga en concentración de 1.7 mg/L.<sup>4</sup>

Por otra parte, numerosos trabajos demuestran los efectos benéficos de las bacterias ácido-lácticas (BAL), consideradas como probióticos en el tratamiento y prevención de trastornos digestivos en el hombre.<sup>5-7</sup> En primer lugar, puede evitarse la intolerancia aguda a la lactosa por causas patológicas o congénitas mediante ingestión de yogurt no pasteurizado; el estreñimiento y meteorismo se pueden atenuar por ingestión de bacterias ácido-lácticas, ya que se favorece el equilibrio de bacterias ácido-lácticas/microbiota de putrefacción, posiblemente por la reducción del pH.<sup>8</sup>

Se ha reportado que factores extracelulares liberados por parte de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus johnsonii* La1 inhiben el crecimiento *in vitro* de *Giardia lamblia* en la fase G1, lo que impide que se forme el quiste, que es la forma infectiva.<sup>9</sup> Asimismo, se ha reportado que al

\* Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.  
contacto: my\_mario2000@yahoo.com.mx

\*\* Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS, Monterrey, N.L., México

coadministrar 250 mg de liofilizados de *Saccharomyces boulardii* con 750 mg de metronidazol (tratamiento convencional para la amibiasis) y administrada tres veces al día durante 10 días, disminuyó considerablemente la duración de los síntomas en 25% de la diarrea, 50% del dolor abdominal y fiebre; se demostró que a cuatro semanas del tratamiento desaparecieron los quistes en las heces.<sup>10</sup>

Se han realizado pocos estudios sobre los efectos de los probióticos en contra de protozoarios causantes de enfermedades gastrointestinales. En este trabajo se evaluó el efecto de liofilizados de medios condicionados (LMC) con bacterias ácido-lácticas (BAL) *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* sobre el cultivo axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica*.

Hipótesis. Existen metabolitos secundarios producidos por probióticos (*Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*) capaces de inhibir el crecimiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS.

Objetivo general. Evaluar el efecto de liofilizados de medios condicionados con probióticos (*Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*) sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica*.

## Metodología

Material biológico. Se utilizó la cepa HM1-IMSS de *Entamoeba histolytica*, los probióticos *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Lactococcus lactis*, y suero bovino.

Medio de cultivo. Para el cultivo de *E. histolytica* se preparó el medio MPT, como se describe a continuación: se pesó peptona de caseína 5.0g, extracto de levadura 2.5g, NaCl 0.50g, L-cisteína 0.50g, ácido ascórbico 0.50g,  $K_2HPO_4$  0.25g,  $KH_2PO_4$  0.15g, citrato férrico de amonio 0.000142g y D-glucosa anhidra 5.0g, se mezclaron todos los componentes y se aforó a 250 mL con agua desionizada, el pH se ajustó a 7.0 con NaOH 12N. El medio se colocó en alícuotas de 10 mL

en tubos para cultivo de 16x 150 mm con tapón de rosca y se esterilizó en autoclave por 15 min a 121°C. Posteriormente, se almacenaron en oscuridad a 4°C hasta su empleo. Para preparar medio MPT para el cultivo de bacterias, se pesaron los componentes descritos anteriormente, se agregó 0.25 mL de PACSR (Protozoa Axenic Culture Serum Replacement)<sup>11</sup> para 250 mL de agua bidestilada, se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 12N, se colocó en alícuotas de 5 mL en tubos para cultivo de 13 x 100 mm con tapón de rosca, el medio se esterilizó en autoclave por 15 min a 121°C, se dejaron temperar y luego se almacenaron a 4°C hasta que se emplearon.

### A) *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS

Mantenimiento. Se realizaron resiembras sucesivas de *E. histolytica* HM1-IMSS en el medio MPT, el cual se encontraba en un volumen de 5 mL en tubos de 13x100 mm con tapón de rosca. Cada tubo se adicionó con 0.5 mL de suero bovino, 0.05 mL de solución de penicilina-estreptomicina y fueron inoculados con  $1 \times 10^4$  células/mL, se incubaron a 37°C por 72 h; posteriormente, se colocaron en agua-hielo por 10 min para despegar las células adheridas al tubo; cada tubo se agitó diez veces por inversión y se procedió a determinar el número de células/mL con una cámara de Neubauer. Las resiembras y bioensayos se realizaron cuando las células se encontraban a la mitad de la fase log de crecimiento.

Cinética de crecimiento. Se dispuso de 24 tubos, cuyo contenido fue de 5 mL del medio de cultivo MPT, 0.05 mL de solución de penicilina-estreptomicina y 0.5 mL de suero bovino, cada tubo se inoculó con  $1 \times 10^4$  células/ML. Posteriormente, se incubaron a 37°C, y cada 24 h se determinó el crecimiento celular de tres tubos de cultivo hasta el día 6 de incubación.

### B) Bacterias ácido-lácticas (BAL)

Mantenimiento. De las cepas de *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* que se encontraban en el medio MPT, se tomó una asada y se resuspendió en 5 mL de medio MPT, se incubaron a 37°C por 24 h, transcurrido este tiempo se tomó un inóculo del caldo y se sembró en medio MPT-agar inclinado y se incubó a 37°C por 24 a 48 h; posteriormente, se guardaron bajo refrigeración a 4°C, por un tiempo máximo de tres semanas.

Obtención de medios condicionados con BAL. Tanto *L. acidophilus*, *L. lactis*, y *L. casei* fueron reactivadas tres veces antes de cada experimento, el cultivo se colocó en un tubo cónico de 50 mL el cual se centrifugó a 1,500 rpm por 10 min, el sobrenadante se separó y se centrifugó nuevamente (este paso se repitió hasta observar la ausencia de precipitado). Enseguida, el sobrenadante se esterilizó tres veces con un filtro millipore de 0.22  $\mu$ m; al sobrenadante estéril obtenido se denominó medio condicionado con bacterias ácido-lácticas (BAL).

Liofilización de medios condicionados con bacterias ácido-lácticas (BAL). Las muestras de medio condicionado con cada una de las bacterias ácido-lácticas (BAL) se congelaron durante 24 h a -20°C, y la muestra congelada se llevó a un liofilizador. El liofilizado que se obtuvo se colocó en frascos de vidrio estériles y éstos se colocaron en un desecador hasta su empleo. Los liofilizados de los medios condicionados con *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Lactococcus lactis* se denominaron LMC.

### C) Bioensayos

Para evaluar el efecto de 1, 10, 20 y 100 mg/mL de LMC con *L. lactis* sobre el crecimiento de *E. histolytica*, se dispuso de una serie de 27 tubos de 13 x 100mm con tapón de rosca para cada concentración a evaluar, cada tubo contenía 5 mL del medio de cultivo adicionado con 0.5 mL de sue-

ro bovino y 0.05 mL de solución de penicilina-estreptomicina, cada tubo se inoculó con  $1 \times 10^4$  células/mL de la cepa de *Entamoeba histolytica*; posteriormente, se incubaron a 37°C por cuatro días, finalmente se determinó por triplicado el número de células/mL a cada tubo. Este mismo procedimiento se aplicó para evaluar los liofilizados de los medios condicionados de *L. casei* y *L. acidophilus*. Nuestro control consistió de nueve tubos de 13 x 100 mm con tapón de rosca, cada tubo contenía 5 mL del medio de cultivo adicionado con 0.5 mL de suero bovino y 0.05 mL de solución de penicilina-estreptomicina, cada tubo se inoculó con  $1 \times 10^4$  células/mL de la cepa de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS e incubados a 37°C por cuatro días.

### D) Análisis estadístico

Para determinar el efecto de los liofilizados de los medios condicionados con los probióticos probados en el crecimiento axénico *in vitro* de *E. histolytica*, se realizaron experimentos por triplicado. Se promediaron los rendimientos obtenidos en los diferentes experimentos y se compararon contra el cultivo control mediante análisis de varianza con una  $P < 0.05$ , empleando la prueba de Dunnet-t (2-side) con el paquete estadístico SPSS.

## Resultados

Cinética de crecimiento de *E. histolytica* HM1-IMSS. En la cinética de crecimiento de *E. histolytica* (figura 1) se observa una ligera fase de adaptación durante las primeras 24 h de crecimiento, seguido de la fase logarítmica y presentando el máximo rendimiento celular al día 4 de incubación a 37°C, con aproximadamente 280,000 cel/mL. Posteriormente, la cinética presenta una paulatina disminución celular.

Efecto de liofilizados de medios condicionados (LMC) por BAL sobre el crecimiento de *E. histolytica* HM1-IMSS. En la figura 2 se muestran los rendimientos celulares obtenidos a los cuatro

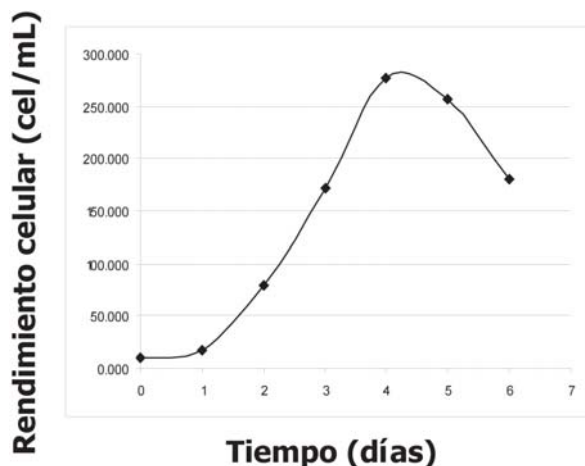


Fig.1. Cinética de crecimiento de *E. histolytica* HM1-IMSS.

días de incubación en el medio MPT adicionado con 1, 10, 20 y 100 mg/mL de liofilizados de medios condicionados con BAL (*L. lactis*, *L. casei* y *L. acidophilus*).

El análisis estadístico (ANOVA  $P < 0.05$ ) indica que de los doce tratamientos evaluados, once presentaron diferencia significativa con respecto al control. El único tratamiento que no presentó diferencia significativa con respecto al control fue el LMC con *L. casei* a 10 mg/mL; por otra parte, los tratamientos de 20 y 100 mg/mL de LMC con *L. lactis*, *L. casei* y *L. acidophilus* resultaron ser altamente eficientes para inhibir el crecimiento de *E. histolytica* bajo condiciones axénicas *in vitro*

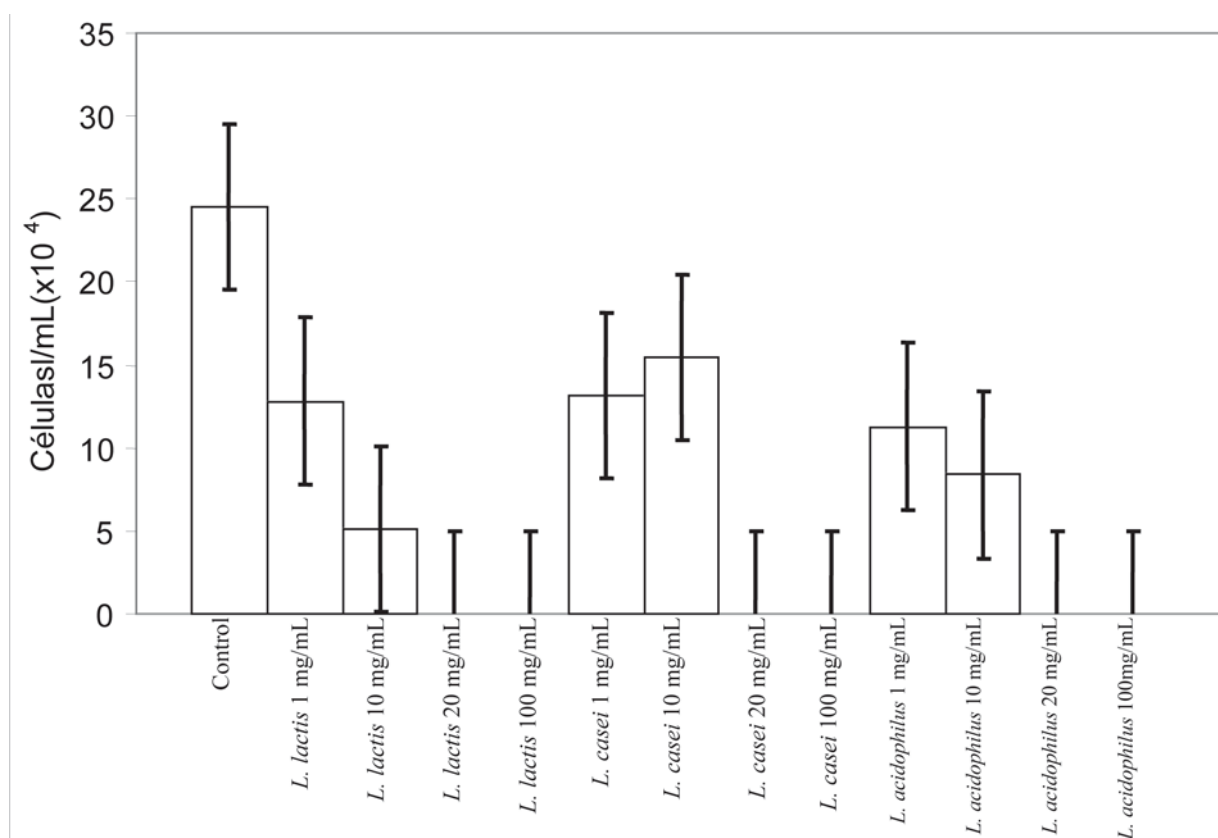


Fig. 2. Comparación del rendimiento celular de *Entamoeba histolytica* al emplear concentraciones de 1, 10, 20 y 100 mg/mL de liofilizados de medios condicionados con *L. lactis*, *L. casei* y *L. acidophilus*. La inhibición del crecimiento de *E. histolytica* se observó a partir de la concentración de 20 mg/mL al emplear LMC de *L. lactis*, *L. casei* y *L. acidophilus*, seguido de la concentración de 100 mg/mL de cada LMC; al emplear la concentración de 1 y 10 mg/mL de cada LMC el de *L. lactis*, *L. casei* y *L. acidophilus* el rendimiento es muy semejante. En todos los tratamientos se observa diferencia significativa con respecto al control a excepción del tratamiento con LMC de *L. casei* a 10 mg/mL.

## Discusión

Para llevar a efecto el objetivo planteado en este trabajo, se compararon los rendimientos celulares obtenidos en el cultivo de *Entamoeba histolytica* bajo condiciones axénicas *in vitro* contra los rendimientos celulares obtenidos al cultivar *E. histolytica* en presencia de liofilizados de medios condicionados de las bacterias ácido-lácticas *L. lactis*, *L. casei* y *L. acidophilus*. Las cuatro concentraciones evaluadas (1, 10, 20 y 100 mg/mL) de los tres probióticos probados presentaron diferencia significativa con respecto al control, excepto la concentración de 10 mg/mL de *L. casei*, la cual no presentó diferencia significativa con respecto al control. Cabe señalar que no hubo diferencia significativa entre los tres diferentes tratamientos. De acuerdo a los resultados obtenidos, la inhibición del crecimiento de *E. histolytica* se presentó a partir de la concentración de 20 mg/mL de los LMC de *L. lactis*, *L. casei* y *L. acidophilus*.

Los resultados obtenidos en este trabajo se asemejan a los obtenidos en la inhibición de *Giardia intestinalis in vitro*, atribuida a factores extracelulares de *Lactobacillus johnsonii* La1 y *Lactobacillus acidophilus*.<sup>9</sup> El efecto inhibitorio puede atribuirse también a la presencia en el medio de cultivo de algún o algunos de los metabolitos secundarios producidos por las bacterias ácido-lácticas o debido a la sinergia de algunos de estos metabolitos. Entre los metabolitos secundarios más frecuentes producidos por las bacterias ácido-lácticas se encuentran: las biocinas o bacteriocinas, ácidos grasos de cadena corta, ácido láctico y diacetilo, entre otros.<sup>13,14</sup>

La ausencia de antecedentes acerca del efecto de los tres probióticos aquí ensayados, sobre el crecimiento de *E. histolytica*, destaca la importancia de este trabajo, ya que los efectos colaterales indeseables de las drogas antiamibianas podrían evitarse a través del consumo de los productos activos de las BAL aquí probadas. Además, recientes investigaciones reportan la resistencia *in*

*vitro* de *E. histolytica* a la droga antiamibiana de elección, el metronidazol,<sup>15</sup> por lo cual es muy conveniente contar con alternativas para el tratamiento o prevención de la amibiasis que no produzcan en el hombre efectos secundarios indeseables. Los presentes resultados abren la posibilidad de contar con una alternativa nutricional al alcance de la mayoría de la población, para la prevención y el tratamiento de la amibiasis, sin que se presenten efectos secundarios indeseables.

## Conclusiones

El crecimiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* cepa HM1-IMSS es inhibido por los liofilizados de los medios condicionados con los probióticos *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*.

## Resumen

Para el control de la amibiasis y sus múltiples manifestaciones clínicas, la droga de elección es el metronidazol; sin embargo, esta droga ocasiona diversos efectos secundarios indeseables en los pacientes, y recientemente se ha reportado resistencia de algunas cepas de *E. histolytica* al metronidazol. En este trabajo se reporta la inhibición del crecimiento de trofozoitos de *E. histolytica* por acción de los liofilizados de medios condicionados con *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*, probióticos que pueden considerarse como alternativa de prevención o tratamiento contra la amibiasis.

**Palabras clave:** *Entamoeba histolytica*, Probióticos, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus casei*.

## Abstract

Metronidazole is currently the best drug used in the control of the clinical manifestations of

amebiasis. This drug however comes with secondary effects. There have been recent reports of *E. histolytica* resistance to metronidazole. In this work we report the growth inhibition of *E. histolytica* trophozoites through the lyophilized conditioned with *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis*, and *Lactobacillus casei* media, which can be considered as an alternative of treatment or prevention of amebiasis.

**Keywords:** *Entamoeba histolytica*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis*, Probiotics and *Lactobacillus casei*.

## Referencias

1. OMS.1997. Amoebiasis-An expert consultation. Weekly Epidemiological Record, Ginebra; 14.
2. Newton-Sánchez O.A., Strum-Ramírez K., Romero-Zamora J.L., Santos-Preciados J.L. and Samuelson J. 1997. High rateo of ocult infection with *Entamoeba histolytica* among non-dysenteric Mexican children. Arch. Med. Res. 28:311-313.
3. Legator M.S., Connor T.H., Stoeckel M. 1975. Detection of mutagenic activity of metronidazole and niridazole in body fluids of human and mice. Science. 188:1118-1119.
4. Samarawickream N.A., Brown D.M. Upcroft J.A., Thammapalerd N., Upcroft P. 1997. Involvement of superoxide dismutase and pyruvate: ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. J. Antimicrob. Hemother. 40:833-40.
5. Saxelin M. 1997. *Lactobacillus gg*: A human probiotic strain with thorough clinical documentation. Food Rev. Int. 13:293-313.
6. Tannock G.W. Properties of lactic-acid bacteria: Plenty of scope for fundamental research. Bitec. 1997; 15:270-274.
7. Salminen S., Deighton M., Gorbach, S. 1993. Lactic acid bacteria in health and disease. En: Lactic acid bacteria (S. Salminen and von Wright, eds.), Marcel Decker, Inc. New York.; 199-225.
8. Saloff-Coste C.J. 1993. Beneficios de las leches fermentadas y de los probióticos sobre la salud: una revisión, Danone world newsletter; 15: 1-11.
9. Pérez P.F., Minnard J., Rouvet M., Knabenhans CH., Brassart D., De Antoni G.L. Shiffrin E.J. 2000. Inhibition of *Giardia intestinalis* by acellular factors from *Lactobacilli*: an in vitro study. Appl. Environ. Microbiol; 67:5037-5042.
10. Fariborz Mansour-Ghanaei, Najaf Dehbashi, Kamyar Yazdanparast Afshin Shafaghi. 2003. Efficacy of *Sacharomyces boulardii* with antibiotics in acute amoebiasis. World J. Gastroenterol; 9 (8):1832-1833.
11. Mata-Cárdenas B.D., Morales-Vallarta M.R., Vargas-Villegas J. Said-Fernández S. 1996. PACSR: A Serum Replecement for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. Trans. Roys. Soc. Trop. Med. Hyg; 90:586.
12. González-Martínez B.E., Gómez-Treviño M., Jiménez-Salas Z. Bacteriocinas de probióticos, Revista electrónica RESPyN. 2003; Vol. 4.
13. Juárez-Tomás M.S., Ocaña V.S, Wiesse B., Nader-Macías ME. 2003, Growth and lactic acid production by vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259, and inhibition of uropathogenic *Escherichia coli*. Journal of Medical Microbiology.; 52:1117-1124.
14. Samarawickream N.A., Brown D.M., Upcroft, J.A., Thammapalerd, N., Upcroft, P. 1997. Involvement of superoxide dismutase and pyruvate: ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. J. Antimicrob. Hemother.; 40:833-40.

Recibido: 26 de julio de 2007

Aceptado: 06 de agosto de 2007