

III CONGRESO INTERNACIONAL SOBRE CAMBIO CLIMATICO Y DESARROLLO SUSTENTABLE

POTENCIAL DE INTERFERENCIA MICROBIANA DE PROBIÓTICOS SOBRE *Giardia lamblia*

Barrón-González MP*, Ramírez-Cabriales V, Quiñones-Gutiérrez Y, Morales-Vallarta M.

Departamento de Biología Celular y Genética, Cuerpo Académico de Biología Celular y Genética, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. México.

Tel.: 0181(8329-4110) - porfi_bagzz@yahoo.com.mx - maria.barrongn@uanl.edu.mx

La giardiasis es una enfermedad causada por el parásito *Giardia lamblia*, el cual causa problemas graves de salud que van desde una diarrea, hasta mala absorción de nutrientes y ocasionalmente causa la muerte; afecta principalmente a niños y adultos mayores. En México y países subdesarrollados representa un problema de salud importante llegando a ocasionar la muerte. El tratamiento de elección para la giardiasis es el metronidazol y sus derivados imidazólicos, sin embargo estos presentan efectos secundarios adversos en los pacientes. Entre los mecanismos de defensa del huésped se encuentra la flora natural del intestino, entre los cuales se encuentran las bacterias consideradas como probióticos.

Objetivo: Determinar el potencial de interferencia microbiana de probióticos sobre *Giardia lamblia*.

Metodología: Se evaluaron liofilizados del medio condicionado de *Bifidobacterium longum* sobre cultivos de *G. lamblia*. Resultados: Los liofilizados del medio condicionado con *B. longum* inhiben el crecimiento de *Giardia lamblia*.

Discusiones: Estos resultados dan evidencia de la capacidad de interferencia microbiana que presenta el liofilizado del medio condicionado con *B. longum* sobre *Giardia lamblia*, pudiendo representar en un futuro una alternativa al tratamiento contra la giardiasis.

1. INTRODUCCIÓN

La giardiasis es considerada como la enfermedad intestinal producida por protozoos más frecuente en países desarrollados y afecta un estimado de alrededor de 280 millones de personas a nivel mundial (Lane y Lloyd, 2002; Ali y Hill, 2003). En México las principales infestaciones intestinales por protozoarios parásitos son causadas por *G. lamblia*, éste parásito puede transmitirse a través del contacto oral-fecal y del agua contaminada con quistes, por lo que en instituciones cerradas como los círculos infantiles se puede presentar un riesgo mayor de transmisión. La tasas de reinfección por *G. lamblia* son altas en zonas endémicas, por lo que la infección por este protozoo, a diferencia de otras parasitosis intestinales, resulta muy difícil de controlar (Dorea *et al.*, 1996).

Desde el punto de vista clínico, la mayoría de los individuos infectados con *G. lamblia* son asintomáticos, sin embargo, otros pueden desarrollar manifestaciones clínicas, las que van desde trastornos digestivos ligeros hasta diarrea crónica y malabsorción intestinal (WHO, 1992; Hill, 1993; Marshall, *et al.*, 1997). La infección con este protozoo, está emergiendo como una de las principales causas de diarrea infecciosa no viral, en niños que asisten a círculos infantiles, lo que ha llevado a considerarlo como una enfermedad infecciosa reemergente (Thompson, 2000). El tratamiento de los niños asintomáticos es controversial. Aunque generalmente se recomienda no tratar estos casos, en ciertas ocasiones se recomienda basado en consideraciones de salud pública, como pudiera ser el control de brotes de giardiasis en guarderías infantiles, cuando otras medidas preventivas no son efectivas, o para prevenir la infección en los convivientes con un alto riesgo de enfermedad severa.

La droga de elección para el tratamiento de giardiasis es el metronidazol, sin embargo recientemente se ha reportado la resistencia de protozoarios parásitos patógenos al metronidazol considerado como droga sistémica de elección para el tratamiento de infecciones de parásitos. Por lo cual es necesario desarrollar tratamientos alternativos para el control de la giardiasis ya que en México representan un problema importante de salud. Por otra parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda realizar más investigaciones encaminadas a la búsqueda de terapias de interferencia microbiana (Terapias MIT) empleando para ello microorganismos probióticos y sus factores difusibles al medio, y así en un futuro poder controlar las infecciones de enfermedades parasitarias intestinales.

La mayoría de las cepas bacterianas consideradas como probióticos pertenecen al grupo de bacterias productoras de ácido láctico", que comporten la propiedad de generar esta molécula como principal producto de su metabolismo fermentativo. Miembros de este grupo son bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, y *Bifidobacterium* (Klein *et al.*, 1998).

Actualmente las bacterias empleadas como probióticos pertenecen al género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Una de las razones es que estos dos géneros han sido aislados del intestino del ser humano, pudiendo sobrevivir y funcionar en el mismo. Otra de las razones es que estas bacterias no presentan efectos dañinos en el hospedero, en contraste con otras bacterias intestinales.

Se ha demostrado que las bifidobacterias constituyen el 95% de la población total bacteriana del intestino en recién nacidos alimentados con leche materna (Harmsen, *et al.*, 2000). La población de *Bifidobacterium* decrece en el intestino de humanos adultos, además permanece relativamente estable, representando del 3 al 6 % de la flora fecal. Bifidobacteria, así como otros organismos productores de ácido láctico exhiben un efecto protector contra los efectos devastadores de las enfermedades diarreicas agudas. Bifidobacteria, en particular *Bifidobacterium longum* en distintos estudios, ha mostrado que puede reducir la incidencia y duración de la diarrea asociada a antibióticos, otra propiedad encontrada a *Bifidobacterium* es que en combinación con otras cepas probióticas muestra una reducción frecuente de diarrea del viajero (Black, *et al.*, 2000).

Estudios realizados a bifidobacterias han arrojado datos que muestran sus efectos antagónicos contra otros microbios patógenos, estos incluyen producción de varios ácidos, bacteriocinas o peróxido de hidrógeno, la competencia por nutrientes o receptores de adhesión, acción anti-toxinas y estimulación del sistema inmune (Fooks y Gibson, 2002; Rakoff-Nahoum, *et al.*, 2004).

Las bifidobacterias representan un papel importante en la limpieza del ambiente intestinal, por lo cual es necesario que sea el grupo dominante en la microflora. Esto se demostró en un estudio de dos grupos de niños, unos alimentados con leche adicionada con bifidobacterias y factores promotores, y un segundo grupo con leche de vaca, presentando los niños del segundo grupo una tendencia ocho veces mayor a infecciones intestinales (Kaloud y Stögmann, 1968). Con la presencia continua de antígenos (constituida o por la flora patógena) y su paso por la mucosa, el sistema inmune se ve constantemente estimulado. Sin embargo, hay otros factores que inciden en la resistencia del individuo a infecciones intestinales: La competencia de nutrientes esenciales (Savage, 1977).

Pocos estudios han sido publicados apoyando la hipótesis de que la terapia del tipo prebiótico o probiótico, pudieran ser efectiva en el tratamiento de estas condiciones: *Bifidobacterium longum* empleando como probiótico, han logrado prevenir una translocación de bacterias (Ontiveros, L.H. *et al.*, 2008).

Hoy en día, los cultivos probióticos poseen gran relevancia a nivel mundial, debido a que mediante numerosos estudios se ha logrado demostrar diversos efectos benéficos para el ser humano, tales como el favorecer el equilibrio de la microflora intestinal, estimular el sistema inmune, competencia contra patógenos, entre otros (Saavedra J.M., 1994).

2. OBJETIVO

En este trabajo el objetivo principal fue evaluar la actividad giardicida del liofilizado del medio condicionado con *Bifidobacterium longum* sobre cultivos de *G. lamblia* bajo condiciones axénicas *in vitro*.

3. METODOLOGÍA

Se utilizó *Giardia lamblia* cepa IMSS:0889 y *Bifidobacterium longum*.

3.1 Obtención de medio condicionado de *B. longum*

La cepa se reactivó antes de iniciar cada bioensayo. A un litro de medio-caldo se le inoculó 1% del cultivo del probiótico (incubado previamente por 24 h a 37°C) se incubó a 37°C por 48 horas. El cultivo se colocó en frascos contenedores y se centrifugó a 2,500 rpm por 10 minutos, se separó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente; este paso se repitió hasta que se observó la ausencia del precipitado; el sobrenadante fue esterilizado por filtración cuatro veces con filtros Millipore de 0.22µm. Se realizó la prueba de esterilidad, tomando una alícuota y colocándolo en medio-caldo para probióticos, se incubó a 37°C por 48 horas y una vez aprobada dicha prueba de esterilidad, el sobrenadante estéril fue el medio condicionado con probióticos (FDP).

3.2 Bioensayo

Evaluación de la actividad biológica de factores difusibles al medio de *B. longum* o *L. casei* (FD) sobre crecimiento axénico *in vitro* de *G. lamblia*. Se dispuso de 54 tubos de borosilicato para cultivo de 13 x 100 mm con tapón de rosca, a cada tubo se añadió 0.05MI de solución penicilina-estreptomycin, 0.5 MI de suero bovino y dosis 1, 10, 25, 50 y 70% de FD de *B. longum*. Posteriormente se inoculó 1×10^4 trofozoítos/MI de trofozoítos de *G. lamblia*, se incubó a 37° C por 120 horas. Al quinto día, se colocó

en agua-hielo por 20 minutos los tubos, se agitó 10 veces por inversión suave, y el número de trofozoítos se determinó tomando una alícuota del cultivo, se colocó en una cámara de Neubauer y se determinó el número de trofozoítos/mL, se graficaron los datos. Los bioensayos se realizaron cuando las células se encontraban en buen estado y en la mitad de su fase logarítmica de crecimiento.

3.3 Análisis Estadístico

Se realizaron bioensayos independientes por triplicado. Se promediaron los rendimientos máximos que se obtuvieron durante los bioensayos y se compararon contra el cultivo control mediante el análisis de varianza con una $P < 0.05$ empleando la prueba de Dunnet t (2-way) con el paquete estadístico SPSS para Windows® versión 2000.

4. RESULTADOS

4.1 Cinética de crecimiento de *Giardia lamblia*

La cinética de crecimiento de *G. lamblia* se llevó a cabo en el medio MPT bajo condiciones axénicas, en la cual se observó una ligera fase de adaptación celular durante las primeras 24 h. Se observó una fase de crecimiento logarítmico a partir del día dos, alcanzando un rendimiento celular máximo de 1,074,375 trofozoítos/mL en el día cuatro. Posteriormente se observó un notable descenso en el rendimiento celular (Fig. 1). Observándose marcada diferencia significativa entre cada punto de la gráfica.

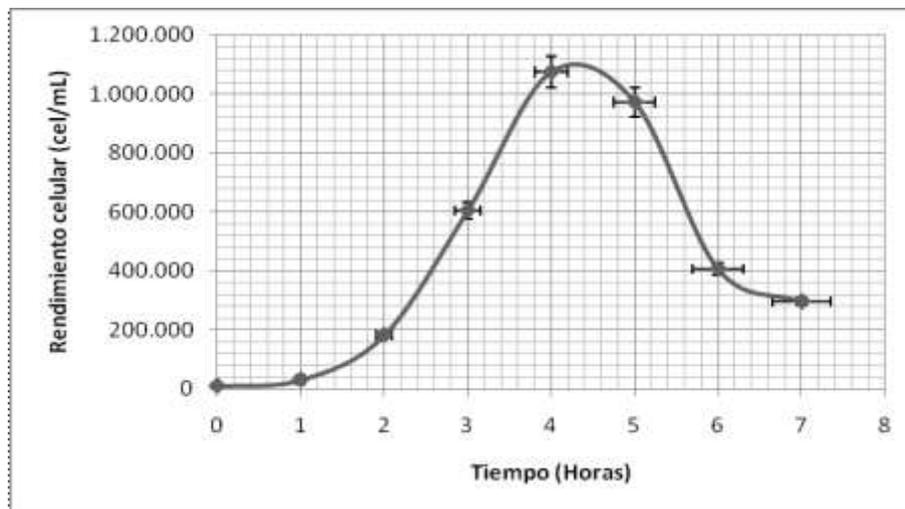


Figura 1. Cinética de crecimiento de *G. lamblia* en el medio MPT

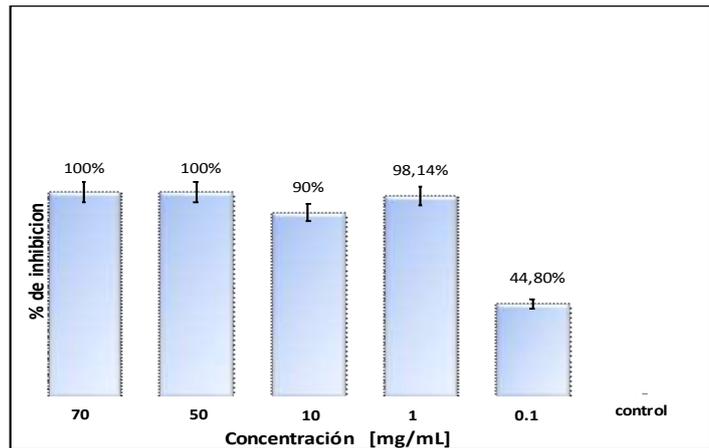
4.2 Actividad biológica de FD de *B. longum* sobre *G. lamblia*.

En este ensayo se determinó el porcentaje de inhibición del LMCBI sobre el cultivo de *Giardia lamblia*.

En la figura 2 se aprecia una inhibición del 100% a las concentraciones de 70 y 50mg/mL y un descenso significativo a las concentraciones de 10, 1 y .1 mg/mL. La inhibición observada a las dosis de 70, 50 y 1 mg/mL no presentan diferencia significativa entre ellas, la dosis de 10 mg/mL inhibió en un 90%, este resultado si presenta diferencia significativa con respecto a las dosis de 0.1 mg/mL presenta diferencia significativa con respecto a las demás concentraciones evaluadas. Siendo las dosis más eficientes como inhibidoras del crecimiento axénico *in vitro* de *G. lamblia* la dosis de 1 mg/mL. En estos resultados se observa marcada diferencia significativa entre el control (cultivo normal de *G. lamblia*) y las 5 dosis del LMCBI (0.1, 1, 10, 50 y 70 mg/mL) sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *Giardia lamblia*.

Figura 2.

Comparación del porcentaje de inhibición del LMCBI sobre el crecimiento de *Giardia lamblia*



DISCUSIONES

La inhibición del crecimiento axénico *in vitro* de *Giardia lamblia* por acción de factores difusibles al medio de *Bifidobacterium longum*, de momento pueden ser adjudicado a algún o algunos de los metabolitos producidos por *B. longum* y liberados al medio de cultivo, entre los cuales se encuentran ácidos grasos de cadena, producción de peróxido de hidrógeno, posible producción de ácido láctico, estos resultados son consistentes con lo reportado por (Fooks y Gibson, 2002; Rakoff-Nahoum, *et al.*, 2004), sin embargo deberán de realizarse una serie de investigaciones encaminadas a la elucidación del o los metabolitos relacionados con la acción giardicida de los factores difusibles de *B. longum*.

Debido a que las enfermedades parasitarias afectan principalmente a los habitantes de los países en vías de desarrollo entre los cuales se encuentra México, ya que la mayoría de la población está expuesta a una gran diversidad de parásitos protozoarios patógenos, debido a las condiciones de sanidad deficientes e inadecuadas; siendo afectados principalmente los sectores de población vulnerables, como son los niños, personas de la tercera edad, así como pacientes con inmunidad comprometida, siendo la amebiasis la principal parasitosis en el centro y sur de México, en la región norte la principal parasitosis endémica es la giardiasis ocasionada por *Giardia lamblia*.

Al evaluar la capacidad de interferencia microbiana del liofilizado del medio condicionado con *B. longum* (LMCBI) sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *Giardia lamblia*, se observó inhibición total del crecimiento de *G. lamblia* al emplear las concentraciones de 70 y 50mg/mL de LMCBI, a la dosis de 10 mg/mL se obtuvo 90% de inhibición y al emplear 1.0 mg/mL del LMCBI se obtuvo un 98% de inhibición del crecimiento de *G. lamblia*, no observándose diferencia significativa entre estos resultados, lo cual sugiere que a concentraciones entre 1.0 y 10 mg/mL de LMCBI podría encontrarse la concentración más eficiente, considerando la relación dosis-respuesta, esto se podrá corroborar haciendo más bioensayos utilizando concentraciones entre este rango señalado.

Este efecto inhibitorio del LMCBI se puede atribuir a la producción de ácidos orgánicos, compuestos carbanílicos o bacteriocinas de *Bifidobacterium longum* (Marteau, *et al.*, 2001). El efecto inhibitorio de LMCBI podría ser atribuido a la formación de poros en la membrana celular del parásito, ya que en las observaciones efectuadas en el desarrollo de este bioensayo, las dosis evaluadas con mayor concentración de LMCBI lisaron las células del *Giardia lamblia*, y las dosis más pequeñas se observó una disminución de células de éste parásito.

De acuerdo a estos trabajos es evidente la actividad de interferencia microbiana que exhibe *Bifidobacterium longum* por lo cual consideramos que es necesario realizar mayor cantidad de estudios empleando otros organismos así como identificar que compuestos orgánicos están participando en esta interferencia microbiana, así como el o los mecanismo de acción relacionados con esta interferencia microbiana.

5. CONCLUSIONES

El liofilizado del medio condicionado con *Bifidobacterium longum* inhiben el crecimiento axénico *in vitro* de *Giardia lamblia*.

6. LITERATURA CITADA

- Ali SA, Hill DR. 2003. *Giardia intestinalis*. Current Opinion of Infectious Diseases;16:453-460.
- Black CM, Stephen AM. 2000. The use of molecular techniques for the diagnosis and epidemiologic study of sexually transmitted infections. Current Infectious Diseases Report; 2:31-43.
- Dorea RC, Salata E, Padovani CR, dos Anjos GL. 1996. Control of parasitic infections among school children in the peri-urban area of Botucatu, Sao Paulo, Brazil. Revista de la Sociedad Brasileña de Medicina Tropical.; 29:425-430.
- Fooks, L., and G. Gibson. 2002. Probiotics as modulators of the gut flora. Br. J. Nutr. 88:S39–S49.
- Harmsen HJM, Wildeboer-Veloo ACM, Raangs GC, Wagendop AA, Klijn N, Bindels. JG, Welling GW. 2000. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. J Ped Gastroenterol Nutr. 30:61-67
- Hill DR. 1993. Giardiasis. Issues in diagnosis and management. Infectious Disease Clinics of North America. 7:503-525.
- Kaloud y Stögmann, 1968. A bifidus milk food in a clinical experiment. Arch. Kinderheilkd 177(1):29-35.
- Klein Günter, Alexander Pack, Christine Bonaparte and Gerhard Reuter, 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology. 41(2):103-125.
- Lane S, Lloyd D. 2002. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. Critical Review Microbiology. 28:123-47.
- Marshall MM, Naumovitz D, Ortega YR, Sterling CR. 1997. Waterborne protozoan pathogens. Clinical Microbiology Review; 10:67-85.
- Marteau P., Vrese M., Cellier C.J., Schrezenmeir J. (2001). Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. American Journal of Clinical Nutrition. 73: 430-436.
- Ontiveros Moreno, LH., (2008). Efecto del liofilizado del medio condicionado con *Bifidobacterium longum* sobre el enquistamiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.
- Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. Cell 118: 229–241.
- Savage, D.C. 1977. Microbial ecology of gastrointestinal tract. Annual Review microbiology. 31: 107-133.
- Saavedra J.M., Bauman N., Oung Y., Perman J., Yolken R.H., (1994). Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus, Lancet, 344:1046-49.
- Thompson, 2000. Diccionario de 3 especialidades farmacéuticas. 48ª. Edición, México. PLM, SA de CV.
- Material electrónico:
- FAO/WHO (1992). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002. Available from World Wide Web <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>.