

Aumento de la resistencia contra la infección experimental murina por *Trichinella spiralis* utilizando *Lactobacillus casei*

Increase of resistance against murine experimental *Trichinella spiralis* infection using *Lactobacillus casei*

Carlos Ramón Bautista Garfias**

Alma Rosa Fernández Román***

Adriana Posadas Beltrán**

Olga Ixta Rodríguez**

Abstract

Previous studies demonstrated that *Lactobacillus casei* induces protective responses in heterogenic mice (NIH) against infection due to parasites such as *Hymenolepis nana* and *Trichinella spiralis*. The aim of the present study was to determine the protection induced by the intraperitoneal (ip) inoculation of viable *Lactobacillus casei* into congenic mice against *T. spiralis* infection. Twenty-two parasite-free female adult BALB/c mice were allocated at random into four groups (Lc-1, Lc-2, Lc-3 and C) of five to six animals each. Each mouse from groups Lc-1, Lc-2 and Lc-3 was inoculated by the ip route with 1.8×10^9 viable *Lactobacillus casei* as follows: In Lc-1, on days -14 and -7; in Lc-2, on days -11 and -4; and in Lc-3, on days -7 and -1. Animals from the control Group (C) did not receive any treatment. All animals from the four groups received 500 *T. spiralis* infective ISS3 strain larvae/mouse by the oral route on day 0. Five days later, mice were sacrificed to obtain adult worms from their intestines. Data was analyzed by the Kruskal-Wallis test. The mean \pm standard error of mean (SEM) of *T. spiralis* adult specimens for Group C was 22 ± 7.1 ; while for Lc-1, Lc-2 and Lc-3 groups it was of 14 ± 3.6 , 12.66 ± 5.1 , and 2 ± 1.2 , respectively. Reduction of the worm load related to that of the control group was of 36.4%, 42.45% and 90.9% for Lc-1, Lc-2 and Lc-3 groups, respectively. Such a reduction was only significant in the Lc-3 Group ($P < 0.05$). Results indicate that viable *L. casei* inoculated twice (days -7 and -1) in congenic BALB/c induces a significant protective response against *T. spiralis* infection.

Key words: NON-SPECIFIC RESISTANCE, BALB/C MICE, *LACTOBACILLUS CASEI*, *TRICHINELLA SPIRALIS*.

Resumen

/En estudios previos se demostró que *Lactobacillus casei* induce respuestas protectoras en ratones heterogénicos (NIH) contra la infección por parásitos como *Hymenolepis nana* y *Trichinella spiralis*. El objetivo del presente trabajo fue determinar la protección conferida por la administración intraperitoneal (ip) de *Lactobacillus casei*

Recibido el 17 de septiembre de 2001 y aceptado el 27 de noviembre de 2001.

* Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, km 11.5, Carretera Federal Cuernavaca-Cuatla, Jiutepec, 62550, Morelos, México.

** Departamento de Parasitología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala, Col. Casco de Santo Tomás, 11340, México, D. F.

*** Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Chamilpa, Morelos, México.

Correspondencia: Carlos Ramón Bautista Garfias. Apartado. Postal 206, CIVAC, 62500, Morelos, México, Tel. 01 (777) 319-2850, fax 01 (777) 320-5544, E-mail: bautir@pavet.inifap.conacyt.mx

viable en ratones congénicos contra la infección con *Trichinella spiralis*. Veintidós ratones hembra BALB/c adultos, libres de parásitos, fueron distribuidos al azar en cuatro grupos (Lc-1, Lc-2, Lc-3, T) de cinco a seis animales. Cada ratón de los grupos Lc-1, Lc-2 y Lc-3 fue inoculado por vía intraperitoneal con 1.8×10^9 *Lactobacillus casei* viables, de la siguiente manera: En 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 ningún tratamiento. En el día cero todos los animales de los cuatro grupos recibieron 500 larvas infectivas de *T. spiralis*/ratón, cepa ISS3, por vía oral y cinco días después fueron sacrificados humanitariamente para obtener sus intestinos y coleccionar los ejemplares adultos del parásito. Los datos obtenidos fueron analizados por medio de la prueba de Kruskal-Wallis. La media \pm error estándar de la media (EEM) de ejemplares adultos de *T. spiralis* para el grupo T fue de 22 ± 7.1 , mientras que para los grupos Lc-1, Lc-2 y Lc-3 fue de 14 ± 3.6 , 12.66 ± 5.1 y 2 ± 1.2 , respectivamente. La reducción de la carga parasitaria con relación a la del grupo testigo fue de 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 ($P < 0.05$). Los resultados obtenidos indican que *L. casei* viable induce una respuesta protectora significativa contra la infección por *T. spiralis* en ratones congénicos BALB/c tratados en dos ocasiones (días -7 y -1).

Palabras clave: RESISTENCIA INESPECÍFICA, RATONES BALB/C, *LACTOBACILLUS CASEI*, *TRICHINELLA SPIRALIS*.

The growing evidence of parasite resistance to drugs, and the difficulties in producing vaccines based on defined antigens in a short term, have emphasized the need for new alternatives to control parasitic diseases. The use of immunostimulants is one of these alternatives. In this context, it has been demonstrated that by the intraperitoneal inoculation (ip) of immunostimulants into different animal species before infection, it is possible to induce non specific resistance against parasites such as *Fasciola hepatica*,¹ *Haemonchus contortus*,² *Toxoplasma gondii*,³ *Eimeria tenella*⁴ and *Trichinella spiralis*.⁵ It has also been demonstrated in other experiments that *L. casei*, administered by the ip route into heterogenic mice (NIH), generated a significant resistance against *T. spiralis*⁶ and *Hymenolepis nana* (Bautista-Garfias, Ixta, Aguilar, Martínez, Miralrío, data not published) infections. The aim of the present study was to determine the protection conferred by the ip administration of viable *Lactobacillus casei* into congenic mice against *T. spiralis* infection.

Twenty two adult female, parasite free BALB/c mice were obtained from the Instituto Nacional de Salud Publica animal's facility at the Secretaria de Salud in Cuernavaca, in the State of Morelos, Mexico. Animals were distributed at random into four groups (Lc-1, Lc-2, Lc-3, and the control- C) of five to six animals. Each mouse in groups Lc-1, Lc-2 and Lc-3 was inoculated ip with 1.8×10^9 viable, strain ATCC7469, *Lactobacillus casei* as follows: in Lc-1 at -14 and -7 days; in Lc-2 at -11 and -4 days, and in Lc-3 at -7 and -1 days, while animals from group C did not receive any treatment. At day 0, each mouse from the four groups received 500, strain ISS3, *T. spiralis* infective larvae by the oral route. These

La evidencia creciente de la resistencia de los parásitos a fármacos y las dificultades para producir vacunas basadas en antígenos definidos en el corto plazo, han enfatizado la necesidad de nuevas alternativas para el control de enfermedades parasitarias; el uso de inmunoestimulantes es una de dichas alternativas. En este contexto, se ha demostrado que por medio de la inoculación intraperitoneal de inmunoestimulantes en diferentes especies animales antes de la infección es posible inducir resistencia no específica contra parásitos como *Fasciola hepática*,¹ *Haemonchus contortus*,² *Toxoplasma gondii*,³ *Eimeria tenella*⁴ y *Trichinella spiralis*.⁵ En otros experimentos también se demostró que *L. casei*, administrado por vía intraperitoneal en ratones heterogénicos (NIH), generó una resistencia significativa contra la infección por *T. spiralis*⁶ e *Hymenolepis nana* (Bautista-Garfias, Ixta, Aguilar, Martínez, Miralrío, datos no publicados). El objetivo del presente trabajo fue determinar la protección conferida por la administración intraperitoneal (ip) de *Lactobacillus casei* viable en ratones congénicos contra la infección con *T. spiralis*.

Veintidós ratones hembra BALB/c adultos, libres de parásitos, se obtuvieron del Bioterio del Instituto Nacional de Salud Pública de la Secretaría de Salud, en Cuernavaca, Morelos, México. Éstos fueron distribuidos al azar en cuatro grupos (Lc-1, Lc-2, Lc-3, testigo) de cinco a seis animales. Cada ratón en los grupos Lc-1, Lc-2 y Lc-3 fue inoculado por vía intraperitoneal (ip) con 1.8×10^9 *Lactobacillus casei* viables, cepa ATCC7469, de la siguiente manera: en 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

larvae were obtained by the artificial digestion method described by Peña-Piña *et al.*⁷ Five days later mice were euthanized in order to obtain their intestines, and collect the adult worms by the modified Baermann technique.⁸ Comparison of data among groups was carried out by the Kruskal-Wallis test.⁹ A value greater than $P = 0.05$ was considered as not significant.

The total number of adult *T. spiralis* specimen collected in groups C, Lc-1, Lc-2 and Lc-3 was of 110, 70, 76 and 12, respectively. The percentage reduction of the worm load with respect to that of the control group was of 36.4, 42.45 and 90.9 for groups Lc-1, Lc-2 and Lc-3, respectively. However, such a reduction was only significant in the Lc-3 group ($P < 0.05$) (Table 1).

Results obtained indicate that viable *L. casei* inoculated twice (-7 and -1 days) by the ip route before infection into congenic BALB/c mice, promotes a significant protective response against *T. spiralis* settlement, similar to that observed in heterogenic mice.⁶ It has also been possible to generate protective responses against the same nematode species in NIH mice treated by the oral route before the infection with viable or dead lactobacilli.¹⁰ Therefore, the protective response against *T. spiralis* generated by *L. casei* in mice was demonstrated, mainly acting against adult worms in the intestine. Part of the protection is a result of the interferon- γ production generated by the treatment with *L. casei*.⁶

ningún tratamiento. En el día cero cada uno de los ratones de los cuatro grupos recibió 500 larvas infectivas de *T. spiralis*, cepa ISS3 por vía oral, obtenidas por el método de digestión artificial descrito por Peña-Piña *et al.*⁷ Cinco días después los ratones fueron sacrificados humanitariamente para obtener sus intestinos y coleccionar los ejemplares adultos del parásito por medio de la técnica de Baermann modificada.⁸ La comparación de datos entre grupos se llevó a cabo por medio de la prueba de Kruskal-Wallis.⁹ Un valor más grande de $P = 0.05$ fue considerado como no significativo.

El número total de ejemplares adultos de *T. spiralis* colectado en los grupos T, Lc-1, Lc-2 y Lc-3 fue de 110, 70, 76 y 12, respectivamente. El porcentaje de reducción de la carga parasitaria con relación a la del grupo testigo fue de 36.4, 42.45 y 90.9 para los grupos Lc-1, Lc-2 y Lc-3, respectivamente. Sin embargo, dicha reducción sólo fue significativa en el grupo Lc-3 ($P < 0.05$) (Cuadro 1).

Los resultados obtenidos indican que *L. casei* viable inoculado por vía ip en dos ocasiones (días -7 y -1) antes de la infección en ratones congénicos BALB/c, promueve una respuesta protectora significativa contra el establecimiento de *T. spiralis*, al igual que en ratones heterogénicos.⁶ En estos últimos también ha sido posible generar respuestas protectoras contra la misma especie de nematodo en ratones NIH tratados

Cuadro 1

PROMEDIO DE GUSANOS ADULTOS DE *Trichinella spiralis* RECUPERADOS DEL INTESTINO DE RATONES BALB/c, TRATADOS O NO CON *Lactobacillus casei*, CINCO DÍAS DESPUÉS DE LA INFECCIÓN CON 500 LARVAS INFECTIVAS DEL PARÁSITO/RATÓN.
MEAN *Trichinella spiralis* ADULT WORMS RECOVERED FROM BALB/c MICE INTESTINE, TREATED OR NOT WITH *Lactobacillus casei*, FIVE DAYS AFTER INFECTION WITH 500 PARASITE INFECTIVE LARVAE/MOUSE

Grupo (n)	Tratamiento	Gusanos adultos recuperados			Porcentaje de reducción con relación al testigo Percentage reduction with respect to the control	Valor p ^b
		Núm. mínimo- Núm. Máximo	Total Adult worms recovered	Media \pm EEM ^a		
Group (n)	Treatment	Range	Total	Mean \pm SEM ^b	p value ^b	
Testigo (5)	---	3-46	110	22 \pm 7.1		
Lc-1 (5)	<i>L. casei</i> i.p. días -14 y -7	5-25	70	14 \pm 3.6	36.4	NS ^c
Lc-2 (6)	<i>L. casei</i> i.p. días -11 y -4	1-30	76	12.66 \pm 5.1	42.45	NS
Lc-3 (6)	<i>L. casei</i> i.p. días -7 y -1	0-8	12	2 \pm 1.2	90.9	0.05

^a Mean standard error.

^b Kruskal-Wallis test.

^c Not significant.

ip= intraperitoneal route.

Similarly, it has been observed that the NIH mice treatment with *L. casei* induces a protective response against the *Hymenolepis nana* infection, and that adult worms recovered from these mice are significantly smaller than those obtained from the control group (Bautista-Garfias, Ixta, Aguilar, Martínez, Miralrío, data not published). Aforementioned studies indicate that *L. casei* inoculation in mice provokes a non-specific immune response that is effective against the parasite settlement such as *T. spiralis* and *H. nana*. Most probably, the resistance generated by the viable *L. casei* administration was caused by the stimulation of an innate or natural immune response, which is more complex than it was previously thought. This is closely linked to the acquired immune response,¹¹ giving rise to the production of pro-inflammatory Th 1 cytokines, such as IL-2 and interferon-gamma (IFN- γ , with many activities)¹² and, at the same time, to macrophage activation (with the consequent production of toxic substances such as nitric oxide and oxygen metabolites which are toxic for many pathogenic agents), lymphocyte activation, and accelerated antigen processing; in this case antigens from *T. spiralis*. However, it is necessary to carry out more studies to elucidate the mechanisms responsible for such protection. This study in congenic mice represents the first one of a series of studies designed to the analysis of the expression of different surface molecules on lymphocytes from mice treated or not with *L. casei*, and the relationship with the resistance to *T. spiralis* infection.

Acknowledgements

This study was supported with resources from Conacyt, project number 31524-B. Olga Ixta Rodríguez is COFFA fellow from IPN. Authors thank doctors Mario Henry Rodríguez, Alberto Arzave and Fernando Romero from the Instituto Nacional de Salud Pública at the Secretaría de Salud in Cuernavaca, Morelos, in Mexico for having donated BALB/c mice.

por vía oral, antes de la infección, con lactobacilos vivos o muertos.¹⁰ En este sentido, se demostró que la respuesta protectora contra *T. spiralis* generada por *L. casei* en ratones, actúa básicamente contra gusanos adultos en el intestino y que la protección, en parte, se debe a la producción de interferón- γ generada por el tratamiento con el lactobacilo.⁶

Similarmente se ha observado que el tratamiento de ratones NIH con *L. casei* induce una respuesta protectora contra la infección por *Hymenolepis nana* y que los gusanos adultos recuperados de estos ratones son significativamente más pequeños que aquellos obtenidos de los animales testigo (Bautista-Garfias, Ixta, Aguilar, Martínez, Miralrío, datos no publicados). Los estudios mencionados señalan que la inoculación de *L. casei* en ratones provoca una respuesta inmune inespecífica que es efectiva contra el establecimiento de parásitos como *T. spiralis* y *H. nana*. Es probable que la resistencia generada por la administración de *L. casei* viable se haya debido a la estimulación de una respuesta inmune innata o natural, que es más compleja de lo que se pensaba y que está estrechamente vinculada con la respuesta inmune adquirida,¹¹ dando lugar a la producción de citocinas proinflamatorias Th 1, como son la IL-2 y el interferón-gamma (IFN- γ , con múltiples actividades¹²) y, a su vez, a la activación de macrófagos (con la consecuente producción de sustancias tóxicas como el óxido nítrico y radicales del oxígeno, tóxicos para muchos agentes patógenos) y de linfocitos, así como al procesamiento acelerado de antígenos, en este caso de *T. spiralis*. Sin embargo, se requiere llevar a cabo más estudios para esclarecer los mecanismos responsables de dicha protección. En este sentido, el presente estudio en ratones congénicos representa el primero de una serie de estudios diseñada para el análisis de la expresión de diferentes moléculas de superficie en los linfocitos de ratones tratados o no con *L. casei* y su relación con la resistencia a la infección con *T. spiralis*.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado con recursos del proyecto Conacyt, clave 31524-B. Olga Ixta Rodríguez es becaria de COFFA del IPN. Los autores agradecen a los doctores Mario Henry Rodríguez, Alberto Arzave y Fernando Romero, del Instituto Nacional de Salud Pública, de la Secretaría de Salud, en Cuernavaca, Morelos, México, por la donación de los ratones BALB/c.

References

1. Bautista-Garfias CR, Gómez A, Morilla A, Vera Y, Ibarra F. Inducción de resistencia inespecífica contra la infección por *Fasciola hepática* en ovinos con adyuvante completo de Freund. *Rev Mex Parasitol* 1992;3:1-3.
2. Bautista-Garfias CR, Flores-Hernández O, Quiroz-Romero H. Non-specific resistance of sheep against *Haemonchus contortus* with Freund's complete adjuvant. *Parasite Immunol* 1991;13:565-569.
3. Bautista-Garfias CR, Daza H, Ixta O, Martínez F. Inducción de resistencia contra *Toxoplasma gondii* en ratones NIH tratados con concanavalina A. *Vet Méx* 1995;26:113-116.
4. Bautista-Garfias CR, Trejo L, Rojas E, Pérez P. Efecto del adyuvante completo de Freund, equimune y concanavalina A sobre la resistencia a la infección experimental por *Eimeria tenella* en pollos. *Téc Pecu Méx* 1996;34:183-188.
5. Bautista-Garfias CR, Zerón-Bravo F, De La Jara-Alcocer F, Flores-Castro R. Effect of three immunostimulants on the resistance against *Trichinella spiralis* infection in mice, (preliminary report). *Arch Med Res* 1995;26:91-93.
6. Bautista-Garfias CR, Ixta O, Orduña M, Martínez F, Aguilar B, Cortés A. Enhancement of resistance in mice treated with *Lactobacillus casei*: effect on *Trichinella spiralis* infection. *Vet Parasitol* 1999;89:251-260.
7. Peña-Piña A, Bautista-Garfias CR, Castilla-García M. Comparación de la prueba de inmunoensayo en capa delgada (ICD) con la técnica de hemoaglutinación pasiva (HP) para la detección de anticuerpos anti-*Trichinella spiralis* en roedores. *Vet Méx* 1988;19:321-327.
8. Manson-Smith DF, Bruce RG, Parrott DMV. Villous atrophy and expulsion of intestinal *Trichinella spiralis* are mediated by T cells. *Cell Immunol* 1979;47:285-292.
9. Olivares-Saéñz E. Paquete de diseños experimentales FAUANL, versión 2.5. Marín (NL): Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, 1994.
10. Bautista-Garfias CR, Ixta-Rodríguez O, Martínez-Gómez F, López MG, Aguilar-Figueroa BR. Effect of viable or dead *Lactobacillus casei* organisms administered orally to mice on resistance against *Trichinella spiralis* infection. *Parasite* 2001;8:S226-S228.
11. Berczi I, Bertóc L, Chow DA. Natural immunity and neuroimmune host defense. *Ann NY Acad Sci* 2000;917:248-257.
12. Elenkov IJ, Chrousos GP, Wilder RL. Neuroendocrine regulation of IL-12 and TNF- α /IL-10 balance. *Ann NY Acad Sci* 2000;917:94-105.