

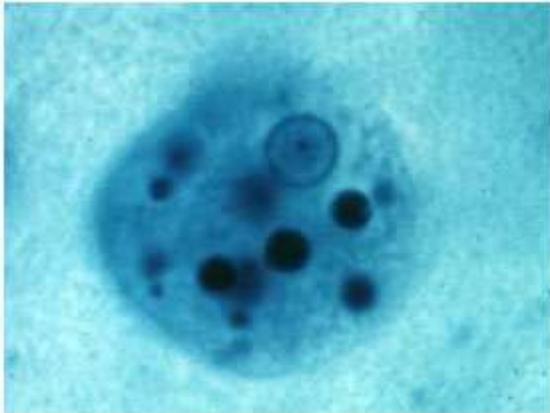
# ACCIÓN INHIBITORIA DE PROBIÓTICOS SOBRE EL CRECIMIENTO AXÉNICO *IN VITRO* DE *Entamoeba histolytica*

María P. Barrón-González<sup>1</sup>, Griselda C. Serrano-Vázquez<sup>1</sup>, Licet Villarreal-Treviño<sup>1</sup>, Benito D. Mata-Cárdenas<sup>2</sup>, Jorge A. Verduzco-Martínez<sup>1</sup> y Mario R. Morales-Vallarta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León (Nuevo León, México)

<sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica del Noreste (Nuevo León, México)

E.mail: [mv\\_mario2000@yahoo.com.mx](mailto:mv_mario2000@yahoo.com.mx)



## Introducción

El protozooario parásito cosmopolita *Entamoeba histolytica* es el agente causal de la amibiasis, esta es una enfermedad parasitaria infecciosa del tracto gastrointestinal, representa un problema de salud mundial y afecta a los países en vías de desarrollo principalmente las regiones tropicales, con mayor frecuencia en las áreas pobres y mal saneadas en donde de forma habitual predomina la desnutrición, el hacinamiento y un manejo inadecuado de las aguas y de las excretas en general, haciendo frecuente tanto la infección como la enfermedad y existiendo por lo tanto una fuerte correlación entre éstas condiciones y la frecuencia de la enfermedad. Se estima que el 10% de la población mundial está infectada por *E. histolytica*, la

amibiasis y sus múltiples manifestaciones clínicas ocupan 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. 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 (1).

*Entamoeba histolytica* presenta dos fases principales en su ciclo de vida: el trofozoito y el quiste, los trofozoitos representan la fase invasiva, son altamente móviles y pleomórficos, miden entre 10 y 40  $\mu\text{m}$  y son muy fagocíticos, se alimentan de bacterias, glóbulos rojos y células epiteliales, poseen una gran cantidad de enzimas que digieren la matriz extracelular las cuales le ayudan para abrirse camino durante la invasión al epitelio intestinal por parte del parásito, también se ha identificado una pequeña proteína llamada amebaporo la cual se inserta en la membrana de la célula blanco y le produce perforaciones(2) en tanto que el quiste mide de 10 a 15  $\mu\text{m}$  de diámetro, presenta cuatro núcleos y una gruesa pared constituida principalmente por quitina, que lo protege de los cambios ambientales(3), no se adhiere al epitelio intestinal por lo que se expulsa junto con las heces fecales, cuando los quistes han sido eliminados junto con las heces fecales contaminan manos, agua y alimentos en general, hasta encontrar a otro huésped al cual infecta, una vez que el quiste se ingiere, la pared de quitina se reblandece por acción de los jugos gástricos y a nivel de íleon terminal emerge un trofozoito tetranucleado el cual rápidamente se divide por fisión binaria generando ocho trofozoitos uninucleados.

El metronidazol es la droga de elección en contra de la amibiasis, que se caracteriza por provocar muerte selectiva de procariontes y eucariotes, en humanos causa efectos secundarios indeseables como meteorismo y náuseas. Por otra parte se ha demostrado en algunos estudios con ratones que el metronidazol es tanto mutagénico como carcinogénico (4) y recientes investigaciones reportan la inducción de *E.*

*histolytica* resistente al metronidazol a concentración de 1.7 mg/l (5). Recientemente se demostró que la coadministración de 250 mg de liofilizados de *Saccharomyces boulardii* con el tratamiento convencional para la amibiasis, el metronidazol (750 mg) e iodoquinol (630 mg) administrados tres veces al día durante 10 días, disminuyó considerablemente la duración de los síntomas en un 25% de la diarrea, 50% del dolor abdominal y fiebre, demostrándose que después de 4 semanas del tratamiento hay ausencia de quistes en las heces (6).

*Saccharomyces boulardii* es considerado como un microorganismo probiótico constituyente de la microflora intestinal, la cual desempeña un papel importante en el mantenimiento saludable del intestino, ya que ha sido demostrado en estudios realizados *in vitro* e *in vivo* el efecto beneficioso de probióticos en estados patológicos

como diarreas, vaginitis, infecciones del tracto urinario, desordenes inmunológicos, intolerancia a la lactosa, hipercolesterolemia y alergia alimentaria (7,8) y también se utilizan para prevenir las infecciones entéricas y gastrointestinales (9).

Existen numerosos trabajos que demuestran los efectos benéficos de las bacterias ácido lácticas (BAL) consideradas como probióticos en el tratamiento y prevención de trastornos digestivos en el hombre (10,11,12,13), 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 puede atenuar por ingestión de bacterias ácido lácticas, ya que se favorece el equilibrio bacterias ácido lácticas/microbiota de putrefacción, posiblemente por la reducción del pH. Mediante el uso de determinadas cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* se ha logrado un efecto significativo en la prevención y el tratamiento de diarreas infantiles (14) diarreas asociadas con antibióticos, así como en la prevención de la "diarrea del viajero" (15). Se ha reportado que el consumo de

yogurt (16) o de leches fermentadas con *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium longum* y mezclas de distintas bacterias ácido lácticas conllevó a un aumento significativo de distintos parámetros inmunológicos (17). En trabajos realizados con voluntarios humanos se ha demostrado que la ingestión de leche fermentada con *Lactobacillus acidophilus* ( $5 \times 10^9$  UFC), consecutiva a una vacunación oral con una cepa atenuada de *Salmonella typhi* aumenta significativamente los niveles séricos de inmunoglobulina A contra el lipopolisacárido patógeno (18). Se ha considerado que el efecto de probióticos para el tratamiento de la diarrea aguda y crónica es muy favorable demostrando que algunos son muy efectivos y aportando ventajas costo beneficio en los tratamientos (19).

Experimentos realizados con *Giardia lamblia* demostró que los factores extracelulares liberados por parte de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus johnsonii* La1 inhiben el crecimiento *in vitro* de *Giardia lamblia* en la fase G1 impidiendo que se forme el quiste que es la forma infectiva (20).

Debido a que no se cuenta actualmente con una droga efectiva contra la amibiasis, que no cause en humanos efectos secundarios indeseables, es imperante desarrollar nuevas estrategias para el control de la amibiasis, ya que se han realizado relativamente pocos estudios sobre los efectos de los probióticos contra protozoarios causantes de enfermedades gastrointestinales. En este trabajo se estudia el efecto que los liofilizados de medios condicionados con las bacterias ácido lácticas (BAL) *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Lactococcus lactis* presentan sobre el crecimiento de *Entamoeba histolytica* cultivada bajo condiciones axénicas *in vitro*.

## **Material y Métodos**

El presente trabajo se efectuó en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Para el cultivo de las bacterias ácido lácticas (BAL) se emplea frecuentemente el medio MRS(21) en tanto que para el cultivo de *Entamoeba histolytica* se emplean los medios TYI-S-33(22) y PEHPS(23). Para este trabajo formulamos un medio en el cual crecen en forma eficiente las bacterias ácido lácticas (BAL) *Lactococcus lactis* cepa MG1363, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*, así como el protozoario *Entamoeba histolytica*.

**MEDIO DE CULTIVO PARA BACTERIAS ACIDO-LACTICAS Y *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS.** Se formuló el medio MPT pesando los siguientes componentes: Extracto de levadura 2.5 g, NaCl 0.50 g, L-cisteína 0.5g, ácido ascórbico 0.05 g,  $K_2HPO_4$  0.25g,  $KH_2PO_4$  0.15g, citrato férrico de amonio 0.000142g y D-glucosa anhidra 5.00g; se mezclaron todos los componentes, se agregó 0.25 mL de PACSR (Protozoa Axenic Culture Serum Replacement (24) y se aforó a 250 mL con agua desionizada, se ajustó el pH a 7.00 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 dejó temperar y enseguida se almacenó a 4°C hasta su empleo. Para la preparación del medio MPT-agar para cultivo de bacterias ácido-lácticas se pesaron las cantidades antes mencionadas y se agregó 5.75 g de agar nutritivo y 0.25 mL de PACSR. Se aforó a 250 mL con agua desionizada, se ajustó el pH a 7.00 con NaOH 12N. El medio se dejó hervir por unos segundos, se colocó en alícuotas de 5 mL en tubos para cultivo de 13 x 100 mm con tapón de rosca y se esterilizaron en autoclave por 15 min a 15 Lb de presión y 121°C. El medio se dejó solidificar con los tubos en posición inclinada a temperatura ambiente y enseguida se almacenaron a 4°C hasta su empleo.

**MANTENIMIENTO DE LAS BACTERIAS ACIDO-LACTICAS:** Se inocularon 0.05 mL del cultivo de *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* en tubos de 13x100 mm conteniendo 5 mL de medio MPT y se incubaron a 37°C/5 horas, posteriormente bajo condiciones de esterilidad se tomó una asada del cultivo y se sembró por estría en un tubo de 13 x 100mm conteniendo 5 mL de medio MPT-agar inclinado, se incubó a 37°C/5horas, enseguida se guardó a 4°C por no más de dos meses.

#### **CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS.**

**A) Método indirecto de turbidez .-** Se inocularon 3 tubos de 13x100 mm conteniendo 5 mL de medio MPT con 0.05 mL del cultivo de *Lactococcus lactis*, de igual manera para *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*. Se incubaron en un baño de agua a 37°C y cada hora se registraron los valores de absorbancia a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 635nm. Estas lecturas se realizaron empleando un espectrofotómetro Turner Sp-830.

**B) Recuento bacteriano en placa .-** Se reactivaron las células de *L. lactis*, *L. casei* y *L. acidophilus*, tomando una asada del cultivo en MPT-agar y se depositó en 2 tubos de 13x100 mm conteniendo 5 mL de medio MPT, se procedió a incubar a 37°C durante 18 horas, transcurrido este tiempo se inocularon 2 tubos de 13x100 mm con 5 mL de medio MPT con un inóculo al 1% y se incubó a 37°C/5 horas, transcurrido este tiempo se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC)/mL empleando la técnica de dilución en placa; para realizar esta determinación se realizaron diluciones hasta  $10^{-8}$ . A partir de las últimas cuatro diluciones se transfirió 1 mL a una caja petri enseguida se agregaron 15 mL de medio MPT-agar, inmediatamente se giró la placa suavemente para distribuir el inóculo a través del medio, se dejó solidificar, se invirtió y se incubó a 37°C/24 horas, después de lo cual se contaron las colonias.

**PRODUCCIÓN DE LIOFILIZADOS DE MEDIOS CONDICIONADOS CON LAS BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS (BAL)** *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*.- Cada microorganismo fue reactivado 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, se separó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente, este paso se repitió hasta observar la ausencia de precipitado, el sobrenadante se esterilizó filtrándolo tres veces empleando un filtro Millipore de 0.22  $\mu$ m; al sobrenadante estéril obtenido lo denominamos medio condicionado con bacterias ácido lácticas (BAL). Este sobrenadante se colocó en frascos de 500 mL y se centrifugó a 4,000 rpm durante 20 minutos, enseguida se separó el sobrenadante, se prefiltró con papel Whatman no. 1 por tres veces, empleando sistemas de filtración al vacío de 600 mL (Pressure vessel) y finalmente se esterilizó con filtros de Millipore de 0.22  $\mu$ m. El sobrenadante filtrado se congeló por 40 minutos a -20°C y se llevó la muestra congelada a un liofilizador, el liofilizado obtenido se colocó en frascos de vidrio estériles y estos se colocaron en un desecador hasta su empleo.

**MANTENIMIENTO DE *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS.**- Se realizaron resiembras sucesivas de  $1 \times 10^4$  células/mL del medio MPT el cual se encontraba en tubos con tapón de rosca de 16x125 mm, se adicionó con una mezcla de antibióticos (400 UI penicilina y 4 mg de estreptomycin) y 1.0 mL de suero bovino, posteriormente se incubó a 37°C por 72 horas. Los tubos se colocaron en agua-hielo por 10 min para despegar las células adheridas al tubo, el tubo se agitó suavemente por inversión (15 veces) y se procedió a determinar el número de células/mL empleando una cámara de Neubauer. Las resiembras y bioensayos se realizaron cuando las células se encontraban a la mitad de la fase logarítmica de su crecimiento.

**CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Entamoeba histolytica*.**- Se dispuso de 24 tubos conteniendo un volumen de 10 mL del medio MPT, adicionados con una mezcla de antibióticos (400 UI penicilina y 4 mg de estreptomycin) y 1.0 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 por triplicado.

**ENSAYOS CON 1, 10, 20 y 100 mg/mL DE LIOFILIZADOS DE MEDIOS CONDICIONADOS CON BAL EN EL CRECIMIENTO DE *Entamoeba histolytica*.**- Se inocularon 24 tubos conteniendo un volumen de 10 mL del medio de cultivo MPT a concentración de 1, 10, 20, y 100mg/mL de cada uno de los liofilizados de medios condicionados con cada una de las BAL, se adicionó con una mezcla de antibióticos (400 UI penicilina y 4 mg de estreptomycin), 1.0 mL de suero bovino y un inóculo de  $1 \times 10^4$  cél/mL. Se incubaron a 37°C y se determinó por triplicado el número de células cada 24 h para cada concentración, los resultados obtenidos se compararon con nuestro grupo control el cual consistió de 24 tubos conteniendo 10 mL del medio de cultivo MPT adicionado con 0.1 mL de solución de penicilina-estreptomycin, 1.0 mL de suero bovino estéril, inoculados con  $1 \times 10^4$  células/mL, se incubaron a 37°C y cada 24 h se determinó la densidad celular de 3 tubos de cultivo hasta el día 8 de incubación.

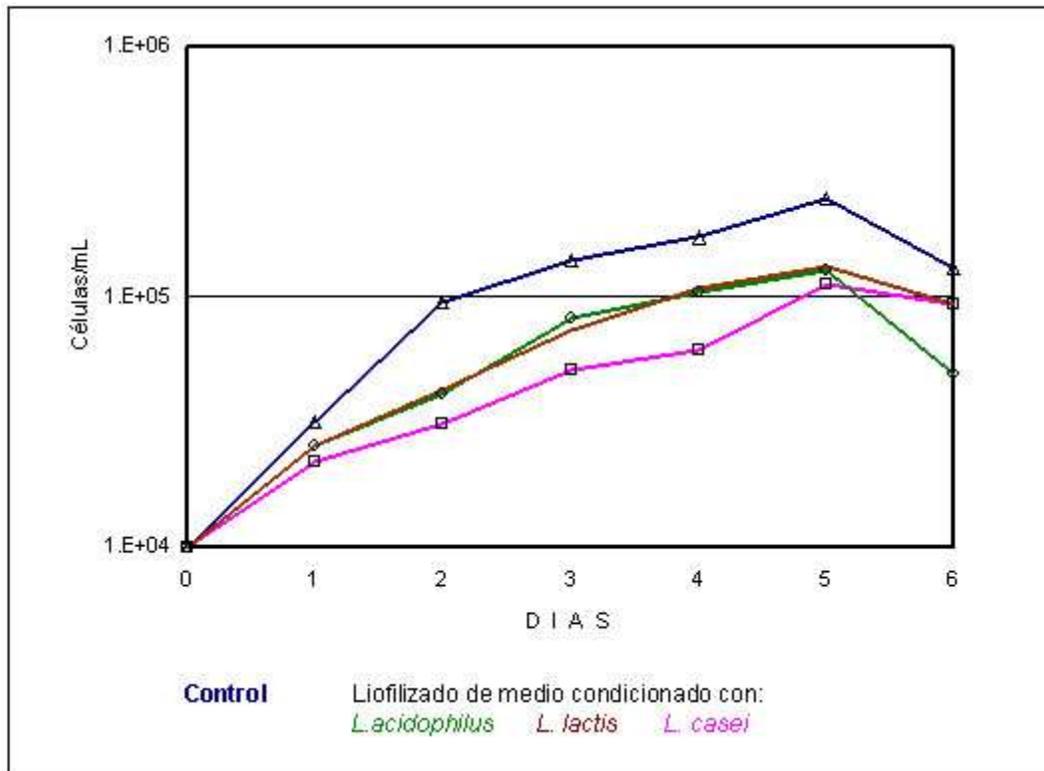
**ANÁLISIS ESTADÍSTICO.-** Para determinar el efecto de los liofilizados de medios condicionados con bacterias ácido lácticas en el crecimiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* se realizaron experimentos independientes por triplicado. Se promediaron los rendimientos obtenidos en los diferentes 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 10.0 para Windows.

## Resultados

### I.- EFECTO DE LIOFILIZADOS DE MEDIOS CONDICIONADOS CON BAL EN EL CRECIMIENTO DE *Entamoebahistolytica*

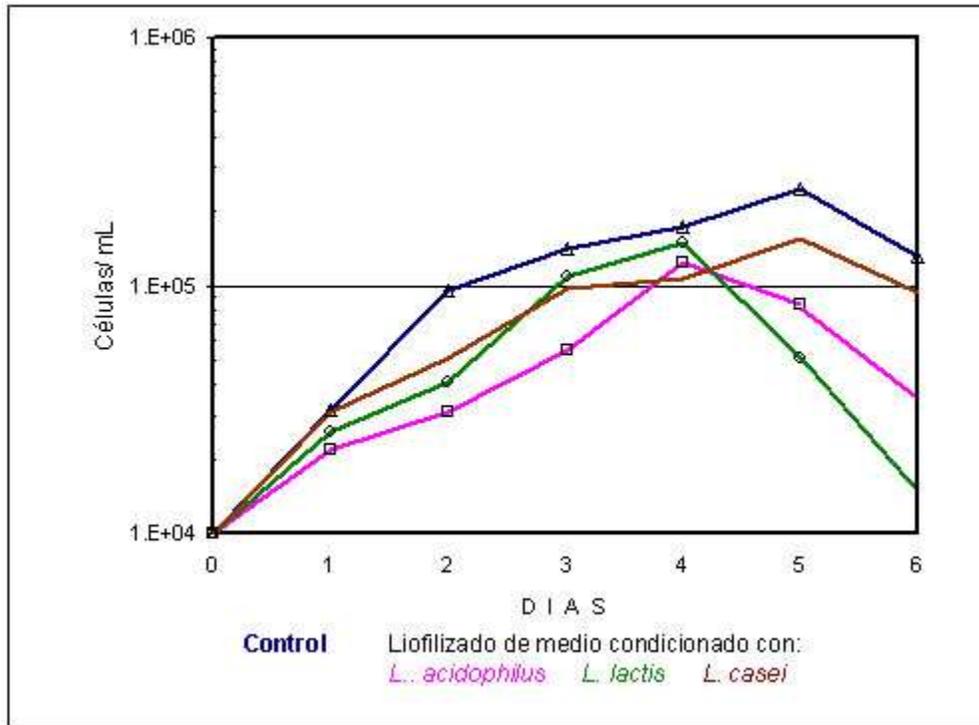
La Figura 1 muestra las cinéticas de crecimiento de *E. histolytica* al adicionar al medio de cultivo 1 mg/mL de liofilizado de medios condicionados con BAL. Del segundo al quinto día se observa disminución del crecimiento celular en los cultivos tratados con liofilizado en comparación con el crecimiento celular del control. El control como los cultivos tratados con liofilizados de BAL presentaron su rendimiento máximo al quinto día de incubación, pero los tratados con BAL presentaron rendimientos menores en comparación con el control presentando diferencia estadística significativa ( $p>0.05$ ).

**Figura 1.-** Cinéticas de crecimiento de *Entamoeba histolytica* en medio MPT adicionado con 1 mg/mL de liofilizado de medio condicionado con BAL.



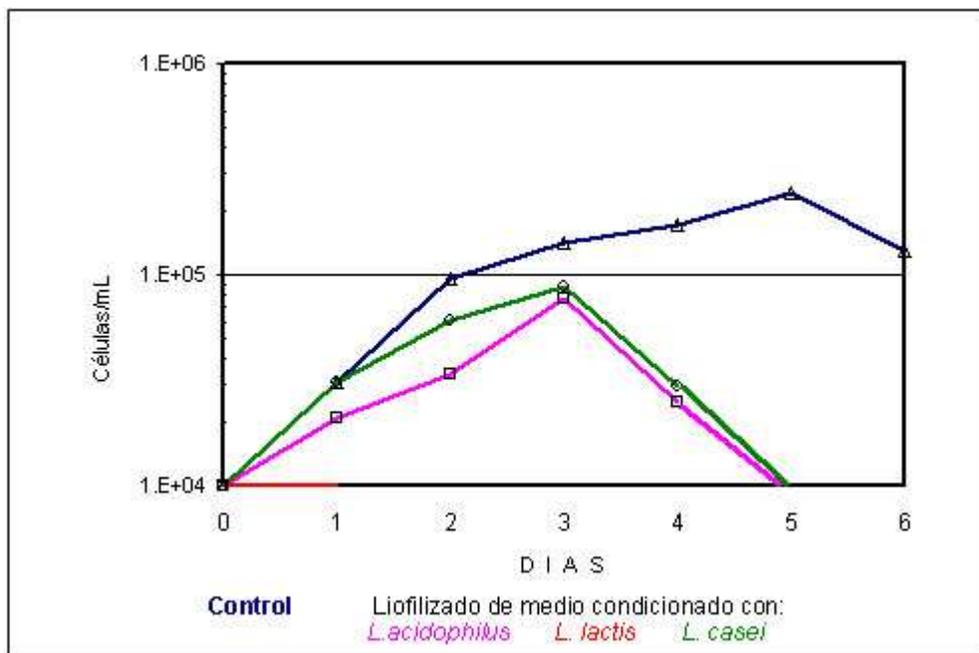
El efecto de 10 mg/mL de liofilizado de medios condicionados con BAL (figura 2). Al quinto día *L. lactis* y *L. acidophilus* presenta una inhibición del crecimiento de *E. histolytica* con una diferencia estadística significativa ( $p>0.05$ ), pero *L. casei* no presenta inhibición significativa en el crecimiento del parásito.

**Figura 2.-** Cinéticas de crecimiento de *E. histolytica* en medio MPT adicionado con 10 mg/mL de liofilizado de medio condicionado con BAL.



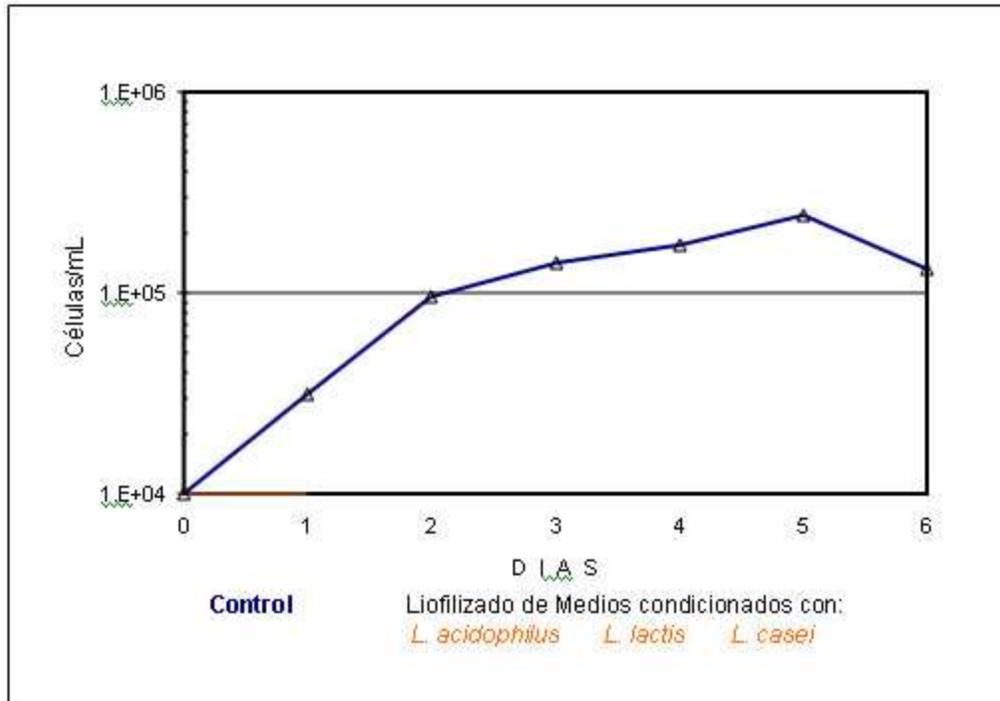
Un notable efecto sobre la inhibición del crecimiento de *E. histolytica* se observa en presencia de 20 mg/mL de medios condicionados con las tres especies de BAL ensayadas (Ver Figura 3). Desde las primeras 24 horas de incubación ya se aprecia inhibición significativa ( $p > 0.05$ ) del crecimiento de *E. histolytica* del 99.96% con *L. lactis*; al quinto día *L. acidophilus* y *L. casei* producen también una inhibición semejante (99.97% y 99.96% respectivamente).

**Figura. 3.-** Cinéticas de crecimiento de *E. histolytica* en medio MPT adicionado con 20 mg/mL de liofilizado de medio condicionado con BAL.



En la Figura 4 se muestra la inhibición del crecimiento de *E. histolytica* con 100 mg/mL de liofilizados de medios condicionados con *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* o *Lactobacillus acidophilus*. En los tres tratamientos se produjo un 100% de inhibición significativa ( $p>0.05$ ) del crecimiento con lisis de los trofozoítos durante las primeras 24 h de incubación.

**Figura 4. Cinética de crecimiento de *E. histolytica* en medio MPT adicionado con 100 mg/mL de liofilizado de medio condicionado con BAL.**



La Tabla 1 resume los rendimientos celulares obtenidos a los 5 días de crecimiento en el medio MPT adicionado con 1, 10, 20 y 100 mg/mL de liofilizados de medio condicionado con BAL (figuras 1 a 4). El análisis estadístico (ANOVA  $p=0.05$ ) indica que los 4 tratamientos presentan diferencia estadística significativa con respecto al control, a excepción del tratamiento con 10 mg/mL de liofilizado del medio condicionado con *Lactobacillus casei*; en tanto que el tratamiento con 20 mg/mL de liofilizado de medio condicionado con *Lactococcus lactis* resultó altamente eficiente durante las primeras 24 horas de incubación (Ver Figuras 2 y 3).

**Tabla 1.- Rendimiento celular de *E. histolytica* al quinto día de incubación en el medio MPT adicionado con 1, 10, 20 y 100 mg/mL de liofilizado de medio condicionado con BAL. (n=9)**

Medio MPT adicionado con liofilizado de medio condicionado con:	Concentración mg/mL	Rendimiento celular (cél/ml)	Inhibición (%)	Dif. estadística (ANOVA p=0.05)
<b>Medio MPT (Control)</b>	----	245,555	----	----
<b><i>Lactococcus lactis</i></b>	1	128,333	47.40	Significativa
	10	50,833	79.30	Significativa
	20	82	99.96*	Significativa
	100	0	100.00*	Significativa
<b><i>Lactobacillus casei</i></b>	1	131,666	46.40	Significativa
	10	154,166	37.20	No Significativa
	20	78	99.96	Significativa
	100	0	100.00*	Significativa
<b><i>Lactobacillus acidophilus</i></b>	1	112,916	54.00	Significativa
	10	83,750	65.90	Significativa
	20	64	99.97	Significativa
	100	0	100.00*	Significativa

\*Presentaron inhibición del crecimiento de *E. histolytica* durante las primeras 24 h de incubación.

### Discusión

El medio MPT preparado para este trabajo resultó con alta eficiencia como medio de crecimiento tanto para las bacterias ácido-lácticas (BAL) aquí probadas como para *Entamoeba histolytica*, lo cual permitió tener un control más adecuado al poder cultivar ambos tipos de organismos por separado en el mismo medio de cultivo.

Aunque ya desde las concentraciones de 1 y 10 mg/mL de liofilizados de medios condicionados con BAL se produce una inhibición significativa del crecimiento de *E. histolytica* al quinto día de crecimiento con excepción de *Lactobacillus casei* (Ver Tabla 1), al emplear 20 mg/mL de liofilizado de medios condicionados con *Lactococcus lactis* la inhibición fue de 99.96% durante las primeras 24 h de crecimiento y resultados semejantes se obtuvieron al quinto día de crecimiento con los liofilizados de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* (Ver Figura 3 y Tabla 1). Con 100 mg/mL de liofilizado de medios condicionados con cada una de las tres cepas de las BAL probadas, la inhibición del crecimiento de *E. histolytica* fue del 100% desde el primer día. El efecto inhibitorio puede ser atribuido a la presencia en el medio de cultivo de algún o algunos de los metabolitos secundarios de las Bacterias Ácido-Lácticas.

En recientes estudios se ha demostrado la actividad antagonista de diversas bacterias ácido-lácticas como inhibidoras del crecimiento de diversas bacterias patógenas para el humano como *Listeria monocytogenes* (25), *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, Streptococcus Beta-hemolíticos (26) y *Helicobacter pylori* (27), sin embargo existen escasos estudios acerca de la acción de bacterias ácido-lácticas sobre otros agentes causales de diarreas en el humano como es el protozooario parásito patógeno *Entamoeba histolytica* (28), en este trabajo se reporta la disminución en la evacuación de quistes en pacientes con amibiasis al suministrarles liofilizados de *Saccharomyces boulardii*, y en estudios *in vitro* se observó que al agregar el sobrenadante de cultivos de *Lactobacillus johnsonii* La1 a los cultivos de *Giardia lamblia* (sinónimo: *Giardia intestinalis*) inhibió el crecimiento de este parásito (29). El mecanismo exacto de cómo se efectúan tales eventos es aún desconocido, sin embargo algunos avances acerca de estos mecanismos resaltan el papel que desempeñan las bacteriocinas como en el caso de las lactocinas, las cuales actúan sobre bacterias patógenas, pero las evidencias mostradas en el presente trabajo indican que las BAL producen también factores que actúan como inhibidores del crecimiento de protozoarios parásitos (¿protozocinas?) como *G. intestinalis* y *E. histolytica*. Los resultados obtenidos en este trabajo son semejantes a la inhibición de *Giardia intestinalis in vitro* por factores extracelulares de *Lactobacillus johnsonii* La1 y *Lactobacillus acidophilus* (30).

Sin embargo, la ausencia de antecedentes acerca del efecto de los tres probióticos aquí ensayados, sobre el crecimiento de *Entamoeba histolytica*, destaca la importancia de este trabajo, ya que los efectos indeseables de las drogas antiamebianas usualmente empleadas podrían ser evitados a través del consumo de los productos activos de las BAL aquí probadas, además recientes investigaciones reportan la resistencia *in vitro* de *Entamoeba histolytica* a la droga antiamebiana de elección: el metronidazol (31), por lo cual resulta muy conveniente contar con alternativas sin efectos secundarios indeseables para el tratamiento de la amibiasis. Sin embargo es indispensable efectuar estudios que permitan detallar cuales son los mecanismo implícitos para efectuar la acción biocida sobre *E. histolytica*.

Los presentes resultados brindan así la posibilidad de contar con una nueva opción al alcance de la mayoría de la población, para la prevención y/o el tratamiento de la amibiasis sin presentar efectos secundarios indeseables.

En conclusión, consideramos que el crecimiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* cepa HM1-IMSS es inhibido por los medios condicionados con los probióticos *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*. El medio MPT puede ser utilizado para el cultivo de *E. histolytica* y BAL con una eficiencia semejante a los medios usualmente empleados para cada uno de los microorganismos aquí utilizados.

### **Resumen**

*Entamoeba histolytica* es el protozoo parásito cosmopolita causante de la amibiasis y sus múltiples manifestaciones clínicas afectando con mayor frecuencia a los países en vías de desarrollo en donde existe hacinamiento y condiciones sanitarias deficientes e inadecuadas; en México representa un problema de salud pública por su frecuencia, morbilidad, mortalidad y fácil dispersión; para el control de la amibiasis y sus manifestaciones clínicas, se administra metronidazol como droga de elección, sin embargo este fármaco produce efectos secundarios indeseables. Reportes recientes indican que cultivos *in vitro* de *E. histolytica* han desarrollado resistencia a este fármaco. En este trabajo evaluamos el efecto de 1, 10, 20 y 100 mg/mL de liofilizados de medios condicionados con probióticos (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Lactococcus lactis*) sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *E. histolytica*. Las concentraciones ensayadas mostraron diferencia estadística significativa (ANOVA  $p=0.05$ ) como inhibidores del crecimiento *in vitro* de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS. Estos resultados abren la posibilidad de contar con una alternativa nutricional para la prevención y tratamiento de la amibiasis sin presentar efectos secundarios indeseables.

**Palabras claves:** *Entamoeba histolytica*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, cultivo axénico, probióticos.

### **Abstract**

*Entamoeba histolytica* is the cosmopolitan parasitic protozoan causal agent of amoebiasis and its clinical manifestations, this is most frequent in the undeveloped countries, where the conditions of sanitation are deficient. In Mexico the amoebiasis for *Entamoeba histolytica* is an important problem in the health for the frequency, morbidity and mortality. For the control of amoebiasis and its clinical manifestations the best drug is the metronidazole but this present secondary effect in patients and effects carcinogenic and mutagenic in mice, meanwhile new reports present evidences of resistance for this drug. Recent researches which probiotics reports the use of probiotics in the treatment of specific diseases has evolved into an extremely valuable option yet to be optimally used in clinical medicine. Probiotics have been shown to have immunomodulating, bioterapeutic, bioprotective properties and enhance the mucosal barrier and various uses in diarrhea. In this work the hypothesis is the following: Is possible the inhibition of growth of *Entamoeba histolytica* employed conditioned media with probiotics (CMP). In this work we evaluated the effect of 1, 10, 20 and 100 mg/mL of CMP of the lactic acid bacteria (BAL) considered alike probiotics *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* in the axenic growth *in vitro* of *Entamoeba histolytica* meanwhile kinetic's growth, each one was repeated three times. The results obtained in this assays has been significant difference (ANOVA  $p=0.05$ ) in the inhibition of growth of *E. histolytica* in axenic culture *in vitro*. This results present an alternative for the control of amoebiasis and its clinical manifestations, this nutritional alternative is based on the secondary metabolites produced for the probiotics and this do not present secondary effects undesirable.

**Key words:** *Entamoeba histolytica*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, axenic culture, probiotics.

## Referencias

- 1.-World Health Organization. 1997. Amoebiasis-an expert consultation. Weekly Epidemiological Rec. Apr.4; 72(14):97-99.
- 2.-Lynch, E.C., M.I. Rosenberg and C. Gitler. 1982. An ion channel forming protein produced by *E. histolytica*. EMBO. J. 1:801-804
- 3.-Campos, G.E. 1996. Incremento de la síntesis de quitina en quistes de *Entamoeba histolytica* por efecto de  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , y  $Co^{2+}$ . Tesis de Postgrado Nivel Maestría de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.
- 4.-Legator, M.S., T.H. Connor and M. Stoeckel. 1975. Detection of mutagenic activity of metronidazole and niridazole in body fluids of human and mice. Science. 188:1118-1119.
- 5.-Samarawickram, N.A., D.M. Brown, J.A. Upcroft, N. Thammapalerd and P. Upcroft. 1997. Involvement of superoxide dismutase and pyruvate: ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. J. Antimicrob. Chemother. 40:833-840.
- 6.-Fariborz, M.G., D. Najaf, Y. Kamyar and S. Afshin. 2003. Efficacy of *Saccharomyces boulardii* with antibiotics in acute amoebiasis. World J. Gastroenterol. Aug; 9 (8):1832-1833.
- 7.-Mombelli, B. and M. Gismondo. 2000. The use of probiotics in medical practice. Int. Antimicrob. Agents. 16 (4) 531-536.
- 8.-Mc Farland, L.V. 2000. Beneficial microbes. Health or hazard?. Eur. Gastroenterol Hepatol, 12 (10) 1069-1071.
- 9.-Penna, F.J. 1989. Diarrea y Probióticos. Simposio sobre utilidad de los probióticos en el manejo de las diarreas. Revista de enfermedades infecciosas en pediatría. Vol X1, número 6, p 182.
- 10.-Saxelin, M. 1997. Lactobacillus gg: A human probiotic strain with thorough clinical documentation. Food Rev. Int. 13(2): 293-313.
- 11.-Tannock, G.W. 1997. Properties of lactic-acid bacteria: Plenty of scope for fundamental research. TBITECH. 15:270-274.
- 12.-Salminen, S., M. Deighton and S. Gorbach. 1993. Lactic acid bacteria in health and disease. In: Lactic acid bacteria (S. Salminen and von Wright, eds.), Marcel Decker, Inc. New York. Pp.199-225.
- 13.-Saloff-Coste, C.J. 1997. Beneficios de las leches fermentadas y de los probióticos sobre la salud: una revisión, Danone World Newsletter. 15: 1-11.
- 14.-González, S., G. Ibarra, R. Locascio, M. Pesce, M. Male, M.C. Apella, R. Pesce, A. Holgado and G. Oliver. 1990. Prevention of infantile diarrhoea by fermented milk. microbiologie aliments nutrition. 8 (4) 349-354.
- 15.-Salminen, S., *et al.*, Op. cit.
- 16.-Portier, A., N.P. Boyaka, F. Bougoudogo, M. Dubarry, I. Huneau, D. Tomé, A. Dodin and M. Coste. 1993. Fermented milks and increased antibody responses against cholera in mice. Int J. Immunother. 9:217-224.
- 17.-Reid, G. 2000. Probiotics in the treatment of diarrheal diseases. Curr. Infect. Dis. Res. 2 (1):78.
- 18.-Link-Amster, H., F. Rochat, K.Y. Saudan, O. Mignot and J.M. Aeschlimann. 1994. Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. Fems. Immun. Med. Microbiol.10:55-64.

- 19.-Robinson, R.K. and A. Samona. 1992. Health aspects of bifidus products: a review. *Int. J. Food. Sci. Nutr.*, 43:175-180.
- 20.-Perez, P.F., J. Minnard, M. Rouvet, C.H. Knabenhans, D. Brassart, G.L. De Antoni and E.J. Shiffrin. 2001. Inhibition of *Giardia intestinalis* by acellular factors from *Lactobacilli*: an *in vitro* study. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5037-5042.
- 21.-De Man, J.C., M. Rogosa and T. Shapre. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23:130-135.
- 22.-Diamond, L.S. 1968. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn. 1903 and *E. histolytica*-like amebae. *J. Parasitol* 54:1047-1056
- 23.-Saíd-Fernández, S., J. Vargas-Villegas, J. Castro-Garza, B.D. Mata-Cárdenas, L. Navarro- Marmolejo, G. Lozano-Garza and H. Martínez-Rodríguez. 1988. PEHPS medium: an alternative for axenic cultivation of *E.histolytica* and *E. invadens*. *Trans.R.Soc.Trop Med. Hyg* 82:249-253.
- 24.-Mata-Cárdenas, B.D., M. R. Morales-Vallarta, J. Vargas-Villegas and S. Saíd-Fernández. 1996. PACSR: A Serum Replacement for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Trans. Roys. Soc. Trop. Med. Hyg.* 90:586.
- 25.-De Waard, R., J. Garssen, G. Bokken and J.G. Vos. 2002. Antagonistic activity of *Lactobacillus casei* strain shirota against gastrointestinal *Listeria monocitogenes* infection in rats. *Int. J. Food Microbiol.* 73:93-100.
- 26.-Glück, U. and G. Jan-Olaf. 2003. Ingested probiotics reduce nasal colonization with pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, and Beta-hemolytic streptococci). *Am. J. Clinical Nutrition.* 77:517-520.
- 27.-Sgouras, D., P. Maragkoudakis, K. Petraki, B. Martínez-González, E. Michopoulos, G. Kalantzopoulos, E. Tsakalidou and A. Mentis. 2004. *In vitro* and *in vivo* inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Appl. Environ Microbiol.* 70 :518-526.
- 28.-Fariborz, M.G., *et al*, Op. Cit.
- 29.-Perez, P.F., *et al*, Op. Cit.
- 30.-*Idem*.
- 31.-Samarawickream, N.A., *et al*, Op. Cit.