

# Efecto del tratamiento oral e intraperitoneal de ratones BALB/c con *Lactobacillus casei* sobre el establecimiento de adultos de *Trichinella spiralis*

## Establishment of *Trichinella spiralis* in BALB/c mice treated with *Lactobacillus casei* administered intraperitoneally and orally

Carlos Ramón Bautista Garfias<sup>a,c</sup>, Alma Rosa Fernández Román<sup>b</sup>, Adriana Posadas Beltrán<sup>c</sup>,  
Olga Ixta Rodríguez<sup>c</sup>

### RESUMEN

Se comparó la protección conferida por la administración oral o intraperitoneal (i.p.) de *Lactobacillus casei* viable en ratones congénicos, contra el establecimiento de adultos de *Trichinella spiralis*. Veintiún ratones BALB/c adultos, fueron distribuidos equitativamente al azar en tres grupos (Lc-IP, Lc-O, T). Cada ratón del grupo Lc-IP fue inoculado por vía i.p. en el día -7 con  $1.8 \times 10^9$  *L. casei*; mientras que en el grupo Lc-O cada animal recibió por vía oral  $1.8 \times 10^9$  *L. casei* en los días -7, -6, -5, -4, -3, -2 y -1. Los roedores del grupo testigo (T) no recibieron tratamiento. En el día 0 todos los animales fueron inoculados por vía oral con 500 larvas infectivas de *T. spiralis*/ratón, y en el día cinco fueron sacrificados para determinar el número de parásitos adultos: en el grupo T se colectaron 181 mientras que en los grupos Lc-IP y Lc-O se obtuvieron 102 y 97, respectivamente. Veinticuatro horas después del sacrificio, todos los gusanos del grupo testigo (181) presentaban movimiento, mientras que los de los dos grupos tratados con *L. casei* (102 + 97 = 199) no. La reducción de la carga parasitaria con relación a la del grupo testigo fue de 43.6 % ( $P < 0.05$ ) para el grupo Lc-IP y de 46.4 % ( $P < 0.05$ ) para el grupo Lc-O. Los resultados obtenidos indican que *L. casei* viable administrado por vía oral o intraperitoneal en ratones BALB/c induce una respuesta protectora significativa similar contra la infección por *T. spiralis*.

**PALABRAS CLAVE:** Resistencia inespecífica, Ratones BALB/c, *Lactobacillus casei*, *Trichinella spiralis*.

### ABSTRACT

A comparison of protection conferred against *Trichinella spiralis* adults by viable *Lactobacillus casei* administered either intraperitoneally (i.p.) or orally to congenic mice was carried out. Twenty-one adult BALB/c mice were distributed at random in three groups (Lc-IP, Lc-O, T). Each mice of the Lc-IP group was i.p. inoculated on day -7 with  $1.8 \times 10^9$  *L. casei* organisms, while in group Lc-O each mice was given orally  $1.8 \times 10^9$  *L. casei* organisms on days -7, -6, -5, -4, -3, -2 and -1. Rodents in group T weren't given any treatment. On day 0 every animal was inoculated with 500 infective *Trichinella spiralis* larvae and on day 5 all mice were humanely killed in order to determine the number of adult parasites: 181 adults were collected from group T, 102 from group Lc-IP and 97 from group Lc-O. Twenty four hours later, all 181 worms belonging to the control group were mobile, while the 199 (102+ 97) of the other two groups were not. A 43.6 % ( $P < 0.05$ ) reduction in parasite load relative to the control group for the Lc-IP group and of 46.4 % ( $P < 0.05$ ) for the Lc-O group was determined. These results indicate that viable *L. casei* administered either orally or i.p. to BALB/c mice produce a significant protective response against *Trichinella spiralis*.

**KEY WORDS:** Unspecific resistance, BALB/c mice, *Lactobacillus casei*, *Trichinella spiralis*.

Recibido el 27 de septiembre de 2001 y aceptado para su publicación el 5 de abril de 2002.

<sup>a</sup> CENID Parasitología Veterinaria. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-SAGARPA). Carretera Cuernavaca-Cuautla km 11.5, Col. Progreso, 62550 Jiutepec, Morelos. Tel (777) 319-2850; bautir@pavet.inifap.conacyt.mx. Correspondencia y solicitud de separatas.

<sup>b</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos.

<sup>c</sup> Departamento de Parasitología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN, México, D.F.

Tanto la evidencia, cada vez más común, de la resistencia de los parásitos a los fármacos, así como las dificultades para producir vacunas basadas en antígenos definidos en el corto plazo, han hecho evidente la necesidad de contar con nuevas alternativas para el control de enfermedades parasitarias. El uso de inmunoestimulantes es una de dichas alternativas; se ha demostrado que por medio de la inoculación intraperitoneal (i.p.) de distintos inmunoestimulantes en diferentes especies animales antes de la infección, es posible inducir resistencia no específica contra parásitos como *Fasciola hepatica*<sup>(1)</sup>, *Haemonchus contortus*<sup>(2)</sup>, *Toxoplasma gondii*<sup>(3)</sup>, *Eimeria tenella*<sup>(4)</sup> y *Trichinella spiralis*<sup>(5)</sup>. En experimentos relacionados, también se demostró que *Lactobacillus casei* viable administrado por vía i.p. en ratones heterogénicos (NIH) generó una resistencia significativa contra la infección por *T. spiralis*<sup>(6)</sup> e *Hymenolepis nana* (Bautista-Garfias *et al.*, datos no publicados). El objetivo del presente trabajo fue comparar la protección generada por la administración i.p. u oral de *Lactobacillus casei* viable en ratones congénicos contra el establecimiento de adultos de *T. spiralis* en una infección experimental.

Veintiún ratones hembra BALB/c adultos, libres de parásitos, se obtuvieron del Bioterio del Instituto Nacional de Salud Pública de la Secretaría de Salud. Estos, fueron distribuidos al azar en tres grupos (Lc-IP, Lc-O y T) de siete animales. Cada ratón en el grupo Lc-IP fue inoculado por vía i.p. con  $1.8 \times 10^9$  *Lactobacillus casei* viables, cepa ATCC7469, en el día -7; en el grupo Lc-O cada roedor recibió la misma dosis de *L. casei*, pero por vía oral los días -7, -6, -5, -4, -3, -2 y -1; mientras que los animales del grupo testigo (T) no recibieron ningún tratamiento. En el día 0 cada uno de los ratones de los tres grupos recibió 500 larvas infectivas de *T. spiralis*, cepa ISS3 por vía oral, obtenidas por el método de digestión artificial descrito por Peña *et al.*<sup>(7)</sup>. 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<sup>(8)</sup>. La comparación de datos entre grupos se llevó a cabo por medio de la prueba de Kruskal-Wallis<sup>(9)</sup>.

Parasite resistance to diverse chemicals as well as the difficulty for producing in the short term vaccines based on antigens, have evidenced the need to come up with new alternatives for parasite control. Immunostimulants can be one of these alternatives, and through intraperitoneally (i.p.) inoculation in diverse animal species before an infection it is possible to induce non-specific resistance against several parasites, such as *Fasciola hepatica*<sup>(1)</sup>, *Haemonchus contortus*<sup>(2)</sup>, *Toxoplasma gondii*<sup>(3)</sup>, *Eimeria tenella*<sup>(4)</sup> and *Trichinella spiralis*<sup>(5)</sup>. In related experiments, viable *Lactobacillus casei* administered i.p. to heterogenic mice (NIH) has generated resistance to *Trichinella spiralis*<sup>(6)</sup> and *Hymenolepis nana* (Bautista-Garfias *et al.*, unpublished). The objective of this study was to compare protection generated against the establishment of *T. spiralis* by means of oral or i.p. viable *L. casei* administration to congenic mice in the course of an experimental infection.

Twenty-one female BALB/c adult mice, free of parasites, were obtained from the Instituto Nacional de Salud Pública Animal facility. These animals were distributed at random in three groups (Lc-IP, Lc-O and T) of seven rodents each. Each mice of the Lc-IP group was i.p. inoculated with  $1.8 \times 10^9$  viable *L. casei* organisms, strain ATCC7469 on day -7. In group Lc-O, each mice was given orally on days -7, -6, -5, -4, -3, -2 and -1 the same dose. No treatment was applied to control group (T). On day 0 all 21 mice were inoculated with infective *T. spiralis*, strain ISS3 larvae, obtained through an artificial digestion method described by Peña *et al.*<sup>(7)</sup>. Five days later, all mice were humanely killed in order to retrieve their intestines and collect the adult parasites through a modified Baermann technique<sup>(8)</sup>. Data comparison between groups was carried out through a Kruskal-Wallis test<sup>(9)</sup>.

Adult *T. spiralis* collected from group Lc-IP were 102, 97 from group Lc-O and 181 from group T. Parasite load reduction in comparison to group T was 46.4 % for group Lc-O ( $P < 0.05$ ) and 43.6 % for group Lc-IP ( $P < 0.05$ ) (Table 1). It is worth to point out that all adult worms obtained from group T were mobile at the time for counting (24 hours after being placed in the Baermann apparatus), while those belonging to the other two groups were not.

El número total de ejemplares adultos de *T. spiralis* colectado en los grupos T, Lc- IP y Lc-O fue de 181, 102 y 97, respectivamente. El porcentaje de reducción de la carga parasitaria con relación a la del grupo testigo fue de 43.6 y 46.4 % ( $P < 0.05$ ) para los grupos Lc-IP y Lc-O, respectivamente (Cuadro 1). Cabe señalar que todos los gusanos adultos recuperados del intestino de los ratones del grupo testigo presentaban movimiento al tiempo del conteo (24 horas después de colocarlos en el aparato de Baermann), mientras que todos los adultos de *T. spiralis* provenientes de los dos grupos tratados con *L. casei* no presentaban movimiento alguno.

Los resultados obtenidos indican que *L. casei* viable inoculado por vía oral o i.p. en ratones congénicos BALB/c promueve una respuesta protectora significativa contra el establecimiento de *T. spiralis* semejante a la observada en ratones heterogénicos<sup>(6)</sup>. También se ha demostrado la generación de respuestas protectoras contra *T. spiralis* en ratones NIH tratados por vía oral una sola vez, siete días antes de la infección, con lactobacilos vivos o muertos<sup>(10)</sup>. En este sentido, se demostró que la respuesta protectora contra *T. spiralis* inducida 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 interferon- $\gamma$  provocada por el tratamiento con el lactobacilo<sup>(6)</sup>.

Results obtained in this study show that congenic mice inoculated orally or by i.p. route with viable *L. casei* organisms achieve a significant protective response against *T. spiralis*, similar to the one seen in heterogenic mice<sup>(6)</sup>. Protective response generation against *T. spiralis* in NIH mice treated orally with a single dose, seven days before infection with dead or live lactobacilli<sup>(10)</sup>, has been verified. In this sense, it has been established that a protective response against adult *T. spiralis* worms in the intestine induced by *L. casei* in mice is due in part to interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) whose production is stimulated by the lactobacilli treatment. It has also been observed that a treatment of NIH mice with *L. casei* induces a protective response against *Hymenolepis nana* infections, and that adult worms obtained from these animals are significantly smaller than those obtained from control mice (Bautista-Garfias *et al.*, unpublished data). Other researchers<sup>(11)</sup> have suggested that IFN- $\gamma$  is of great importance in protective immunity against *H. nana* in mice.

All these studies point out that *L. casei* administered to heterogenic mice induces a nonspecific local immune response, which is effective against parasite helminths such as *T. spiralis* and *H. nana* and that IFN- $\gamma$  takes part in that response. However, more information is lacking, and it is necessary to carry out more research on this subject in order to elucidate which mechanisms take part in the protection induced by lactobacilli treatments.

Cuadro 1. Número de gusanos adultos de *Trichinella spiralis* recuperados del intestino de ratones BALB/c, tratados por vía oral o intraperitoneal con *Lactobacillus casei*

Table 1. Adult *Trichinella spiralis* worms recovered from the intestine of BALB/c mice, treated orally and intraperitoneally with *Lactobacillus casei*

Groups (n)	Treatment <sup>a</sup>	Adult worms recovered			
		Total	Mean + SE	Reduction, relative to control (%)	P value
Control (7)	----	181	25.85 + 4.0	---	---
Lc-IP (7)	<i>L. casei</i> (intraperitoneal) <sup>b</sup>	102	14.57 + 3.9	43.63	<0.05
Lc-O (7)	<i>L. casei</i> (oral) <sup>c</sup>	97	13.85 + 3.4	46.42	<0.05

a  $1.8 \times 10^9$  Viable *Lactobacillus casei* organisms per mice administered on specified days.

b Day -7.

c Days -7, -6-, -5, -4, -3, -2, -1.

De manera similar, se ha observado que el tratamiento de ratones NIH con *L. casei* induce una respuesta protectora contra la infección por el céstodo *Hymenolepis nana*, y que los gusanos adultos recuperados de estos ratones son significativamente más pequeños que aquéllos obtenidos de los animales testigo (Bautista-Garfias et al., datos no publicados). En este contexto, otros investigadores<sup>(11)</sup> han sugerido que el IFN- $\gamma$  es de gran importancia en la inmunidad protectora de ratones contra *H. nana*.

Estos estudios, indican que la administración de *L. casei* en ratones heterogénicos induce una respuesta inmune inespecífica local, que es efectiva contra el establecimiento de helmintos parásitos como *T. spiralis* y *H. nana* y que el IFN- $\gamma$  toma parte en dicha respuesta; sin embargo, se carece de más información al respecto, por lo que es necesario llevar a cabo más estudios para esclarecer los mecanismos que intervienen en la protección inducida por el tratamiento con lactobacilos.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio se financió con recursos del proyecto CONACYT clave 31524-B. Se agradece a los Drs. Mario Henry Rodríguez, Alberto Arzave y Fernando Romero, del Instituto Nacional de Salud Pública, SS, por la donación de los ratones BALB/c.

## LITERATURA CITADA

1. Bautista Garfias CR, Gómez A, Morilla A, Vera Y, Ibarra F. Inducción de resistencia inespecífica contra la infección por *Fasciola hepatica* en ovinos con adyuvante completo de Freund. Rev Mex Parasitol 1992;3:1-3.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded through CONACYT Project 31524-B. Our special thanks to Dr. Mario Henry Rodríguez, Dr. Alberto Arzave and Dr. Fernando Romero of the Instituto Nacional de Salud Pública for having donated the mice used in this research.

End of english version

2. Bautista-Garfias CR, Flores-Hernández O, Quiróz-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 Mex 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 Mex 1988;19:3121-327.
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 Sáenz E. Paquete de diseños experimentales FAUANL (versión 2.5) Marín, N.L.: Facultad de Agronomía UANL; 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. Asano K, Muramatsu K. Importance of interferon-gamma in protective immunity against *Hymenolepis nana* cysticercoid derived from challenge infection with eggs in BALB/c mice. Int J Parasitol 1997;27:1437-1443.