

ISSN: 1988-2688

<http://www.ucm.es/BUCM/revistasBUC/portal/modulos.php?name=Revistas2&id=RCCV&col=1>

<http://dx.doi.org/10.5209/RCCV.55680>



Revista Complutense de Ciencias Veterinarias 2017 11(especial):241-246

HELMINTOS Y MICROBIOTA: LA COMUNIDAD DEL ANILLO

HELMINTHS AND MICROBIOTA: THE FELLOWSHIP OF THE RING

Escario Gómez, M. y Arroyo del Moral, A.

Facultad de Farmacia de la UCM. Madrid, España. Correspondencia del autor:

mescario@ucm.es

RESUMEN

La microbiota y los helmintos intestinales han co-evolucionado dentro del hospedador hasta alcanzar un equilibrio, cuya alteración puede afectar a la supervivencia del parásito. En este estudio se pretende evaluar la influencia de la modificación de la microbiota sobre el asentamiento intestinal del nematodo *Trichinella spiralis*, mediante el tratamiento prolongado, previo a la infección experimental, con dos antibióticos de perfiles diferentes, el aminoglucósido estreptomycin y el beta lactámico penicilina. Como era de esperar la alteración del entorno del parásito, a través de la modificación de la microbiota, perjudica el establecimiento del parásito.

Palabras clave: *Trichinella spiralis*, microbiota, estreptomycin, penicilina

SUMMARY

The intestinal microbiota and parasitic helminths have coevolved inside their host to reach a balance. Any alteration of this equilibrium may affect the parasite survival. This study aims to evaluate the influence of the microbiota modification on intestinal settlement of the nematode *Trichinella spiralis* by long term treatment prior to experimental infection with two antibiotics of different profiles, the aminoglycoside (streptomycin) and the beta-lactam

(penicillin). As expected, the experiment showed that antibiotic treatment changes the parasite environment so that makes your establishment less effective.

Keywords: *Trichinella spiralis*, microbiota, streptomycin, penicillin

INTRODUCCIÓN

El tracto gastrointestinal alberga una gran variedad de microorganismos comensales (microbiota), que regulan la homeostasis intestinal, favoreciendo el metabolismo de nutrientes y la respuesta inmune (Ivanov *et al.* 2009), dificultando la colonización de ese nicho ecológico por patógenos. El tratamiento con antibióticos debe afectar a la diversidad y prevalencia de las poblaciones bacterianas, y puede conducir a cambios en el microambiente intestinal.

Los helmintos intestinales comparten una larga historia evolutiva con sus hospedadores. El resultado es una adaptación que, en muchos casos, conlleva una pérdida o disminución de su letalidad e incluso efectos beneficiosos por fortalecimiento de la respuesta inmune. Se conoce el impacto que las infecciones parasitarias tienen sobre las poblaciones bacterianas (Reynolds *et al.* 2104; Holms *et al.*, 2015), pero no la influencia que las alteraciones en la microbiota puedan tener en el asentamiento y progresión de la infección por parásitos. Este es el objetivo de nuestro trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayos *in vitro*.- Larvas de primer estadio (L1) de *Trichinella spiralis*, obtenidas por digestión artificial, a partir de canales de ratones previamente infectados, se incubaron en placas de 24 pocillos (1000 L₁/pocillo en 1 ml de medio HBSS) con diferentes concentraciones (1, 2 y 5 mg/ml) de estreptomycin y penicilina. Después de 72 horas de incubación en condiciones de microaerobiosis, se sustituye el medio por MTT (sal de tetrazolio), y se incuba durante 1 hora, produciéndose la reducción del MTT a formazan por las enzimas mitocondriales de las larvas viables y el cambio de color. Tras esta incubación se retiró el MTT y se añadió DMSO para liberar el colorante metabolizado. La absorbancia fue medida a 525 nm. El ensayo se realizó por triplicado.

Ensayos *ex vivo*.- Para determinar el efecto de los antibióticos sobre la capacidad infectiva de las larvas, se incubaron en las condiciones ya indicadas 300 L₁/pocillo con los antibióticos durante 24 horas. Pasado este tiempo se retiraron 600 µl de sobrenadante y el resto de medio junto a las larvas fueron administradas por sonda buco-gástrica de forma individualizada a ratones Swiss CD1 (hembras de 6-8 semanas, de 20-25 g de peso), estableciéndose 4 grupos (control, 1,2 y 5 mg/ml de antibiótico) de 6 animales por grupo y antibiótico (estreptomycin y penicilina). Transcurridos 7 días de la infección se procedió al sacrificio de los ratones y al recuento del número de adultos.

Ensayos *in vivo*.- Para los ensayos *in vivo* se emplearon 3 grupos de ratones Swiss CD1, (grupos control, estreptomicina y penicilina), que eran pretratados 5 mg/ml de estreptomicina ó 2,5 mg/ml de penicilina, incorporados en el agua de bebida. El pre tratamiento se inició 14 días antes de la infección experimental y se mantuvo hasta el fin del experimento. Todos los grupos fueron inoculados mediante sonda buco-gástrica con 300 ± 50 L₁ de *T. spiralis*. Transcurridos 1, 3, 5 y 7 días post infección, los ratones fueron sacrificados y se procedió al recuento de adultos asentados en la mucosa intestinal.

RESULTADOS

Ensayos *in vitro*. Como se observa en la Figura 1, ni estreptomicina ni penicilina tienen efecto directo sobre las larvas a las concentraciones ensayadas.

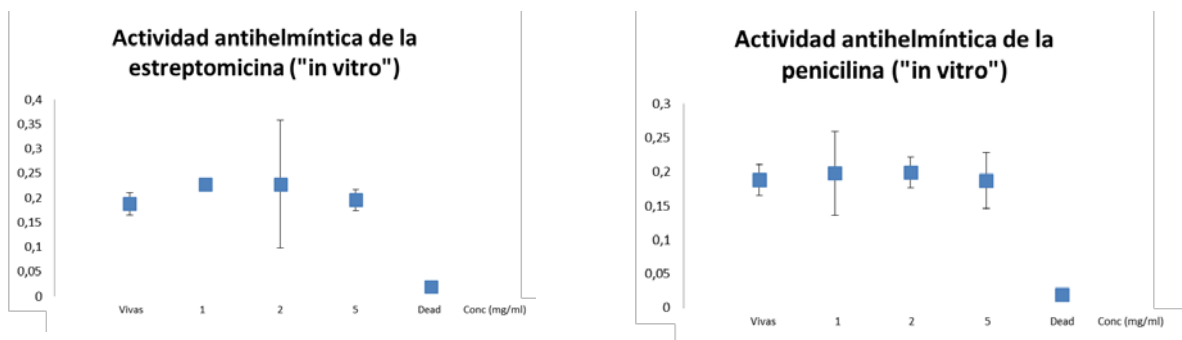


Figura 1. Evaluación de la posible actividad antihelmíntica de los antibióticos.

Ensayos *ex vivo*. Los resultados muestran que estreptomicina y penicilina (Figura 2) tampoco afectan a la capacidad infectante de las larvas.

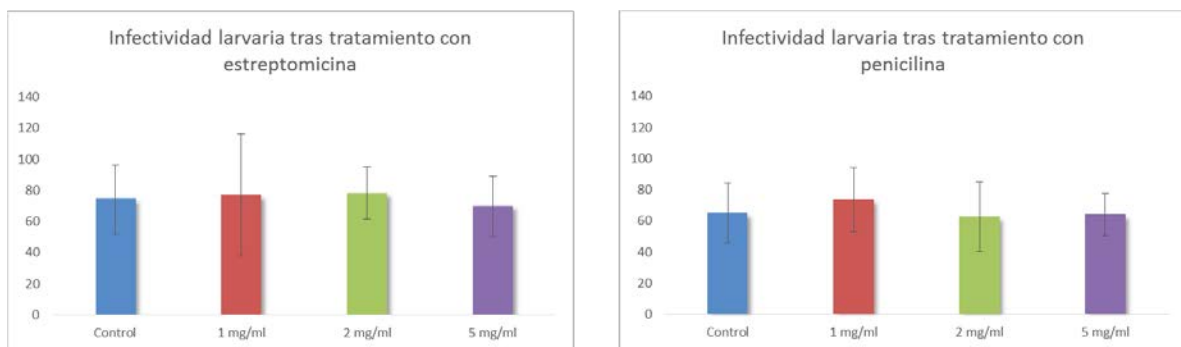


Figura 2. Análisis de la infectividad larvaria tras los tratamientos antibióticos.

Ensayos *in vivo*. Los ensayos *in vivo* demostraron cómo la modificación de los perfiles bacterianos en la microbiota intestinal tiene un efecto directo sobre la capacidad de establecimiento de las larvas infectantes de *Trichinella spiralis*, no así sobre su permanencia, al evaluarse la historia natural de la infección intestinal desde el día 1 hasta el día 7 post infección (Figura 3). Estreptomicina (60 - 67% reducción vs control). Penicilina (37 - 43% vs control)

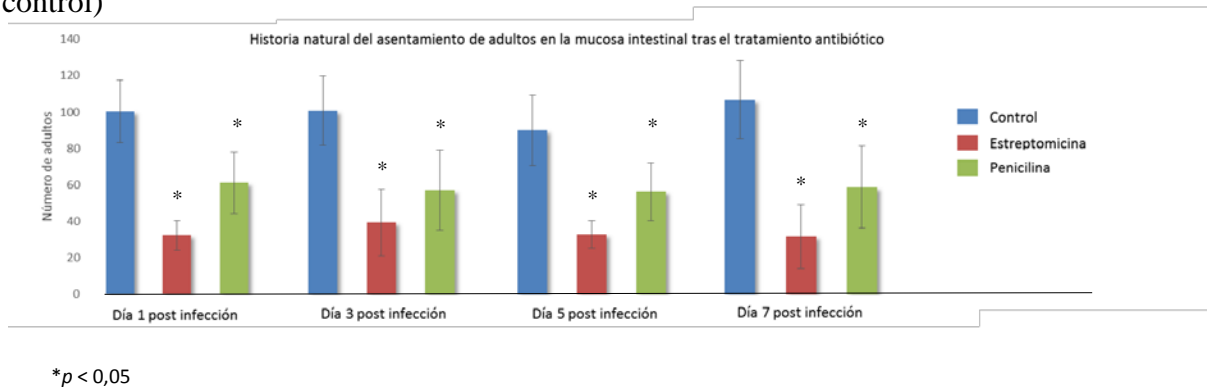


Figura 3. Progresión de la infección a lo largo del ciclo intestinal.

En cuanto a los estudios histológicos, en el día 1 p.i., los segmentos de duodeno, yeyuno e íleon de los ratones de los tres grupos muestran en la lámina propia un componente inflamatorio habitual, de escasa intensidad, constituido por linfocitos, células plasmáticas y polimorfonucleares neutrófilos aislados.

Los hallazgos obtenidos en los días 5 y 7 p.i muestran un proceso inflamatorio moderado en todos los grupos, con polimorfonucleares y criptitis. Se observa la presencia de parásitos en los cortes realizados. No se observaron diferencias entre los grupos control y los tratados con antibiótico en ninguno de los días evaluados.

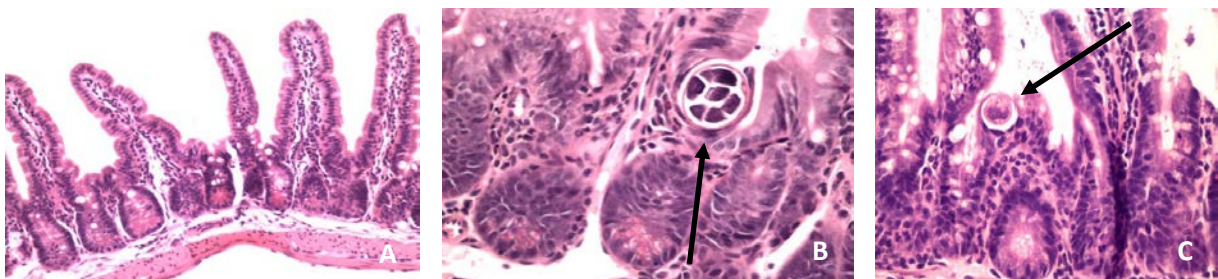


Figura 4. Cortes histológicos de muestras de intestino delgado en los diferentes días evaluados. A: día 1 post infección (control). B: día 5 post infección (estreptomicina) C: día 7 post infección (penicilina). Las flechas indican secciones de adultos de *Trichinella spiralis*.

DISCUSIÓN

Numerosos trabajos han estudiado la interacción entre los parásitos y el sistema inmune (Weinstock *et al.*, 2009), microbiota y sistema inmune (Clemente *et al.*, 2012), pero aún se ha estudiado poco acerca de la interacción parasito-microbiota. Claramente los antibióticos juegan un papel fundamental en la comunicación entre la salud intestinal y el estatus fisiológico del hospedador (Ferrer *et al.*, 2014). Además, la microbiota intestinal representa un factor relevante que puede interferir en el éxito o fracaso de las infecciones por helmintos (Berrilli *et al.*, 2012). Muchos helmintos modifican los perfiles bacterianos intestinales para asegurar su establecimiento (Reynolds *et al.*, 2014; Holms *et al.* 2015), de manera que podemos pensar que modificaciones en la microbiota intestinal producidas por el consumo de antibióticos pueden generar entornos hostiles que obstaculicen o impidan la infección parasitaria. Nuestros resultados muestran que el pre-tratamiento con los antibióticos estreptomicina y penicilina disminuyen significativamente el establecimiento de *T. spiralis*, si bien este se produce a diferentes niveles (alrededor del 63% vs al 39% de reducción de población adulta por estreptomicina y penicilina, respectivamente).

CONCLUSIONES

- 1.- Los antibióticos no presentan actividad antihelmíntica
- 2.- El contacto de las larvas con el antibiótico no modifica su capacidad infectiva para el hospedador.
- 3.- La microbiota parece jugar un papel fundamental en el establecimiento de *Trichinella spiralis* en su nicho intestinal.
- 4.- Las poblaciones bacterianas (Gram negativas, gram positivas) pueden tener diferentes grados de implicación en el establecimiento del parásito

BIBLIOGRAFÍA

- Berrilli, F; Di Cave, D; Cavallero, S y D'Amelio, S. 2013. Interaction between parasites and microbial communities in the human gut. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2(141): 68-73
- Clemente, J; Ursell, L; Wegener, L y Knight, R. 2012. The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view. *Cell*. 148(6): 1258-70
- Ferrer, M; Martins dos Santos, V; Ott, S y Moya, A. 2014. Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy. *Gut microbes*. 5(1): 64-70

- Holm, JB; Sorobetea, D; Kiilerich, P; Ramayo-Calds, Y; Estellé, J; Ma, T; Madsen, L; Kristiansen, K y Svensson-Freg, M. (2015). Chronic *Trichuris muris* infection decreases diversity of the intestinal microbiota and concomitantly increases the abundance of lactobacilli. Plos One. DOI:10.1371/journal.pone.0125495.
- Ivanov, II; Atarashi, K; Manel, N; Brodie, EL; Shima, T; Karaoz, U. 2009. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. Cell. 139(3): 485-98
- Reynolds, LA; Smith, K; Filbey, K; Harcus, Y; Hewitson, J; Redpath, S; Valez, Y; Yebra, M; Finlay, B. y Maizels, R. 2014. Commensal-pathogen interactions in the intestinal tract. Gut microbes. 5(4): 522-32
- Weinstock, J y Elliot, D. 2009. Helminths and the IBD hygiene hypothesis. Inflammatory Bowel Diseases. 15(1): 128-33