

Actividad nematocida de diversos extractos de *Artemisia* spp. en un modelo murino de *Trichinella spiralis*

Víctor Sebastián Pérez. Inés Elorza Angulo.

Licenciatura en Farmacia, Facultad Farmacia.
victorsebastianperez@estumail.ucm.es

Juan José García Rodríguez. Francisco Bolás Fernández. Mercedes Martínez Grueiro.

Facultad Farmacia.
jjgarc01@pdi.ucm.es francisb@farm.ucm.es mgrueiro@farm.ucm.es

Resumen: el continuo aumento de las resistencias frente a los antiparasitarios de referencia utilizados de forma convencional para el tratamiento de las nematodosis, el elevado coste y la baja disponibilidad en determinadas zonas geográficas de estos, hace necesario el desarrollo de nuevas alternativas de tratamiento antiparasitario. Actualmente muchas vías de investigación se centran en el ensayo de productos naturales procedentes de diversas especies de plantas (Hierro et al., 2006). En este estudio se pretende evaluar la eficacia como antihelmíntico de diferentes extractos de *Artemisia* spp., obtenidos mediante arrastre de vapor, comparándolos con la actividad del albendazol (fármaco de referencia) frente a nematodos gastrointestinales. Para demostrar tal efecto se llevó a cabo en primer lugar, un ensayo “*ex vivo*”, en el que los fármacos se pusieron en contacto directo con las larvas del nematodo (*Trichinella spiralis*), valorando posteriormente su viabilidad (tasa de asentamiento de adultos). En segundo lugar, se realizó un ensayo “*in vivo*” para el cual se utilizaron ratones Swiss CD1 de características homogéneas a los que se infectó experimentalmente con larvas L₁ de *Trichinella spiralis* GM1 (300 ± 50 larvas). Posteriormente se procedió a realizar los tratamientos con los extractos naturales, enfrentándolos siempre a un control de infección y a un control de tratamiento (albendazol en ciclodextrinas). Finalmente se probaron diferentes dosis de los extractos con el fin de ajustar la óptima. Transcurridos 7 días de la infección se valoraron los resultados, éstos mostraron una significativa reducción de la infección parasitaria.

Palabras clave: *Artemisia* spp. *Trichinella spiralis*. Antihelmíntico. Aceite esencial.

INTRODUCCIÓN

Las nematodosis intestinales son uno de los principales problemas veterinarios, puesto que representan una gran amenaza en la productividad del ganado. Esto tiene

especial relevancia en los países en vías de desarrollo donde la economía y su propia subsistencia dependen en gran medida de la cría extensiva de animales domésticos. Estas nematodosis causan gastroenteritis parasitarias, procesos generalmente endémicos, de curso crónico y mortalidad baja.

El continuo aumento de las resistencias frente a los antiparasitarios de referencia utilizados de forma convencional para el tratamiento de las infecciones por nematodos, el elevado coste y la baja disponibilidad en determinadas zonas geográficas de estos, hace necesario el desarrollo de nuevas alternativas de tratamiento antiparasitario.

El modelo murino de triquinelosis ha sido ampliamente utilizado en el cribado farmacológico de sustancias con posible actividad antihelmíntica, ello es debido a su ciclo biológico, capaz de cerrar todas sus fases en un mismo hospedador, afectando a diferentes niveles y permitiendo por ello, analizar el impacto de los fármacos evaluados tanto a nivel enteral, como parenteral (García-Rodríguez et al., 2001).

Uno de los géneros más ampliamente distribuidos de la familia Asteraceae, es *Artemisia*, dentro del cual se encuentran unas 300 especies. Estas son abundantes en la flora autóctona del Valle de Kashmir, en India y en Anatolia, Turquía. En la medicina tradicional de estos países, se usaban como vermífugos, insecticidas, tratamiento de fiebres crónicas e inflamación del hígado. Entre sus especies destacan aquellas que tienen efectos antipirético, analgésico, antiséptico y poseen especial interés, desde el punto de vista parasitario, aquellas que se caracterizan por su actividad antihelmíntica, frente a *Plasmodium*, *Leishmania*, o *Trichinella* (Tariq et al., 2009; Caner et al., 2008). A partir de las sumidades aéreas de la planta perteneciente a dicha especie, se obtienen los extractos objeto de este trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayo *ex vivo*

En el estudio *ex vivo* se han utilizado 4 aceites esenciales (ICA15, ICA16, ICA23 e ICA24) obtenidos mediante arrastre de vapor, valorando la actividad larvicida mediante la medida de la capacidad infectante de las larvas tras el contacto con los productos, frente a un control no expuesto.

En placas de 24 pocillos se dispusieron 300 ± 50 larvas de *Trichinella spiralis* GM1 en medio HBSS y en presencia de los aceites a concentración de 1 mg por pocillo, disueltos en DMSO al 2,5%.

Tras incubación durante 24 horas en microaerobiosis (5% CO₂), las larvas fueron administradas mediante sonda buco-gástrica a ratones Swiss CD1 de características homogéneas, separados en grupos de 10 individuos. A los 7 días post infección se procedió al sacrificio de los animales y recuento de adultos asentados en la mucosa

intestinal, valorando así la pérdida de la capacidad infectiva analizando los resultados frente a los obtenidos en un grupo infectado con larvas no expuestas a ningún tratamiento. De los diferentes extractos se seleccionó el ICA23 para continuar los estudios *in vivo*.

Ensayo *in vivo*

Para los ensayos *in vivo* de actividad antihelmíntica se emplearon ratones Swiss CD1 de características homogéneas, que fueron infectados oralmente con 300 ± 50 larvas de *Trichinella spiralis* GM1.

Las larvas de infección fueron obtenidas previa digestión de la canal de ratones en los que habitualmente se mantiene la cepa. Comida y agua fueron administradas *ad libitum*. Se procede a la infección de los distintos grupos de ratones seleccionados al azar y de forma homogénea. Pasadas 24 horas se procede al tratamiento correspondiente según el grupo. Transcurridos 7 días post-infección, se procede al sacrificio por sobredosis de cloroformo. Se realizó la extracción del intestino delgado abriéndolo longitudinalmente y cortándolo en secciones de 7 cm aproximadamente, éstas se depositaron en gasas estériles que se llevaron a vasos conteniendo solución salina de NaCl al 9%, posteriormente fueron llevados a incubación durante 3 horas a 37°C para facilitar la salida de los nematodos adultos. Pasado este tiempo se realiza el recuento de larvas en placa de Petri rayada mediante lupa. (Denham et al., 1970)

Se realizaron dos experimentos *in vivo*, el primero de ellos consistente en determinar la actividad del aceite, comparado con un antiparasitario de referencia activo frente a *Trichinella* como es el albendazol. Para ello se formaron 4 grupos de 10 ratones cada uno, el primero de ellos se utilizó como grupo control de infección. El segundo grupo fue tratado con el vehículo de disolución del aceite esencial (aceite de oliva), usando este como placebo, los dos siguientes conjuntos se trataron respectivamente con albendazol (5 mg/kg) e ICA23 (aceite esencial de estudio) (150 mg/kg).

Una vez demostrada la actividad antihelmíntica del aceite esencial, se procedió a evaluar la dosis óptima para el tratamiento.

En una segunda etapa, los ratones fueron clasificados en seis grupos homogéneos y seleccionados al azar. El primer conjunto de ratones se utilizó como control, sin administrarse tratamiento alguno. A los siguientes se les trató respectivamente con dosis de 50, 150, 200, y 250 miligramos del aceite incluidos en un vehículo de disolución (aceite de oliva). Para verificar el posible efecto del vehículo se incluyó un grupo placebo, al igual que en los ensayos anteriores, al que se administró únicamente el aceite de oliva.

La diferencia de eficacia antihelmíntica entre las formulaciones fue evaluada mediante el análisis de varianza de una sola vía (ANOVA), considerando un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo *ex vivo*

En las pruebas realizadas *ex vivo*, se observó una elevada actividad para todos los aceites evaluados, con una reducción porcentual en todos los casos superior al 95% (Fig. 1). Tras la valoración correspondiente de estos resultados, se procedió a la realización de los ensayos *in vivo*, seleccionando el ICA23 como candidato al presentar la máxima reducción en el asentamiento larvario (99,94%).

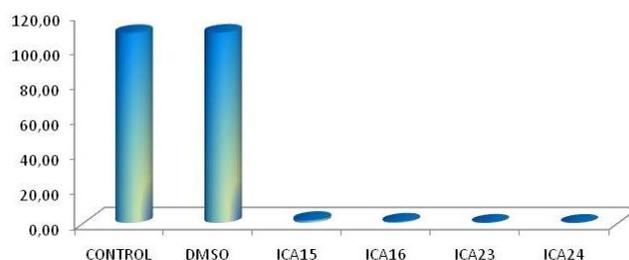


Figura 1. Recuento de adultos asentados en la mucosa intestinal tras el tratamiento *ex vivo* con los diferentes aceites esenciales de *Artemisia spp*

Ensayo *in vivo*

El primer ensayo trató de comparar la eficacia *in vivo* de una dosis de aceite esencial enfrentándola con el antiparasitario de referencia, albendazol, de esta forma se obtuvo un porcentaje de reducción del 93'52% respecto al número de larvas del grupo control para el fármaco de referencia, mostrando el extracto ICA23 una reducción del 45'31% (Fig. 2). Este resultado es estadísticamente significativo, confirmándose así la actividad antihelmíntica frente a *Trichinella spiralis* del aceite objeto del estudio.

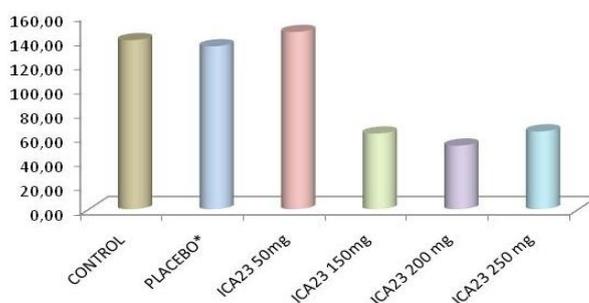


Figura 2. Recuento de adultos asentados en la mucosa intestinal tras el tratamiento con ICA23 a la dosis de 150 mg/kg de peso.

En este segundo ensayo, se comparó el porcentaje de reducción del aceite ICA23 según las diferentes dosis administradas. El intervalo de dosis óptimo se situaría alrededor de los 150 mg/kg de peso, ya que al aumentar la concentración del producto natural por encima de este valor, la reducción del número de larvas apenas incrementó un 5%, valor estadísticamente no significativo. Por tanto, al administrar concentraciones más elevadas, la actividad larvicida no se vio reflejada en un aumento proporcional de actividad (Fig. 3).

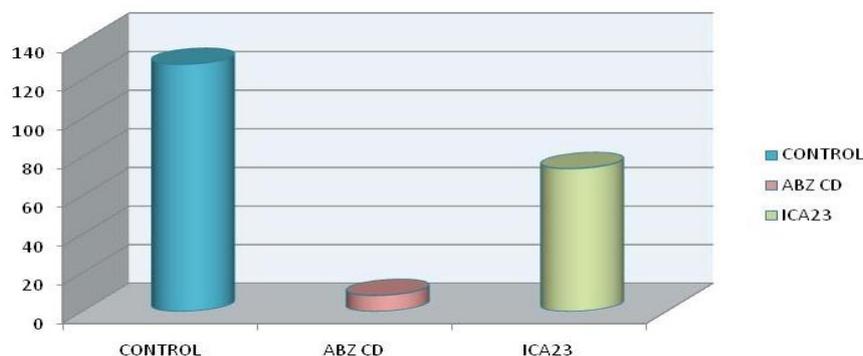


Figura 3. Recuento de adultos asentados en la mucosa intestinal tras el tratamiento con las diferentes dosis de ICA23

Concluimos, que todos los aceites evaluados en este estudio tienen una actividad larvicida *ex vivo* estadísticamente significativa y que a pesar de tener una efectividad antihelmíntica *in vivo* inferior al albendazol, el aceite esencial ICA23, seleccionado en la fase previa, tiene un porcentaje de reducción estadísticamente significativo al administrar una dosis de 150 mg. Esto justificaría nuevos estudios para evaluar estos aceites como una alternativa interesante al fármaco de referencia en aquellas zonas donde este último sea inaccesible.

BIBLIOGRAFÍA

1. Garcia-Rodríguez J.J., et al (2001). Improving bioavailability and anthelmintic activity of albendazole by preparing albendazole-cyclodextrin complexes. *Parasite*; 8:S188-S190.
2. Denham, D. A. *et al.* (1970) Studies with methyridine and *Trichinella spiralis*. The use of the drug to study the rate of larval production in mice. *Journal of helminthology*. 44, 357-363.
3. Tariq, K. A. *et al.* (2009) Anthelmintic activity of extracts of *Artemisia absinthium* against ovine nematodes. *Veterinary Parasitology*. 160, 83-88.

4. Caner, A. *et al.* (2008) Comparison of the effects of *Artemisia vulgaris* and *Artemisia absinthium* growing in western Anatolia against trichinellosis. *Experimental Parasitology*. 119, 173-179.
5. Hierro, I. *et al.* (2006) In vivo larvicidal activity of monoterpenic derivatives from aromatic plants against L₃ larvae of *Anisakis simplex* s.l. *Phytomedicine*. 13, 527-531.

Recibido: 16 marzo 2012.

Aceptado: 16 diciembre 2013.