

Evaluación de la actividad antibabésica de tres especies vegetales en ratones infectados con *Babesia microti*

Blanca Rosa Aguilar-Figueroa*, Abraham Oble-Hernández*, María de Lourdes Hernández-De-Jesus y Blanca Estela Barragán-Huerta*****

Dpto. de Parasitología, Campus Casco de Santo Tomás. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n México, Distrito Federal. Código Postal 11340 *Dpto. De Farmacia**, Dpto. de Ingeniería en Sistemas Ambientales*** Campus Zacatenco. Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Av. Wilfrido Massieu s/n y cerrada Manuel Stampa. Unidad Académica Adolfo López Mateos, México, Distrito, Federal, Código Postal 07700. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas – Instituto Politécnico Nacional mlheje@yahoo.com.mx México

Recibido: 8 de junio de 2015. Aceptado: 22 de septiembre de 2015.

Palabras clave: Actividad antiparasitaria, *Babesia microti*, Especies vegetales.

Key words: Antiparasitic activity, *Babesia microti*, Plant species.

RESUMEN. La babesiosis humana es una enfermedad zoonótica emergente producida por *Babesia* spp. En América central y México, se han confirmado casos humanos al igual que en Sudamérica y Brasil. La infección del hombre y de los animales se produce por la mordedura de garrapatas infectadas que inoculan esporozoítos que al transformarse en trofozoítos y reproducirse, rompen el eritrocito, liberando merozoítos que invaden otros eritrocitos. El tratamiento empleado, dependiendo del grado de la infección por *B. microti* es: Atovaquona con azitromicina y Clindamicina con quinina. Estos fármacos ocasionan efectos colaterales al paciente, por lo que no terminan su tratamiento, originando cepas resistentes. Una alternativa es la búsqueda de especies vegetales con actividad antiparasitaria. En el presente trabajo se evaluó la actividad antiparasitaria de los extractos metanólicos de *Ibervillea sonora*, *Krameria sonora* y *Phoradendrom californicum* en ratones infectados con *Babesia microti*. Se determinó la curva de parasitemia y se evaluó el efecto de los extractos por 30 días, calculando el porcentaje de parásitos viables de la fase estacionaria después de 24 horas del tratamiento a la dosis de 500mg/Kg de peso. Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico de Zigma Stat y Zigma Plot. Observándose que los extractos de *Phoradendrom californicum* y *Krameria sonora* presentan una reducción de la parasitemia, con respecto a los ratones no tratados. Por lo que podemos concluir que las especies vegetales son una fuente potencial de estructuras químicas, las cuales podrían ser una alternativa en el control de parásitos.

ABSTRACT. Human babesiosis is an emerging zoonotic disease caused by *Babesia* spp. In Central America and Mexico, human cases have been confirmed as in South America and Brazil. The infection of humans and animals occurs through the bite of infected ticks inoculated sporozoites that become trophozoites and reproduce, the erythrocyte rupture, releasing merozoites that invade other erythrocytes. Treatment regimes, depending on the degree of *B. microti* infection is used: azithromycin with clindamycin and atovaquone with quinine. These drugs cause in patient side effects so do not complete their treatment, resistant strains causing. An alternative is to search for plants with antiparasitic activity. In this paper the antiparasitic activity of the methanol extracts of *Ibervillea sonora*, *Krameria sonora* and *Phoradendrom californicum* in mice infected with *Babesia microti* was evaluated. Curve Parasitemia was determined and the effect of the extracts for 30 days was evaluated, calculating the percentage of viable stationary phase parasites after a 24-hr treatment at a dose of 500mg / kg. The results were subjected to statistical analysis and Zigma Zigma Stat Plot. Observed that extracts of *Krameria sonora* and *Phoradendrom californicum* show a reduction of parasitemia with respect to untreated mice. So we can conclude that the plant species are a potential source of chemical structures, which could be an alternative in controlling parasites.

INTRODUCCIÓN

La babesiosis humana es una enfermedad zoonótica emergente producida por *Babesia* spp. y es transmitida por garrapatas de la familia Ixodidae.¹ Los roedores son los principales reservorios de *Babesia microti*. En EUA el ratón de patas blancas (*Peromyscus leucopus*) es el reservorio principal² y es transmitida por *Ixodes scapularis*,³ *Ixodes ricinus*⁴, *Ixodes dammini*.⁵ Estas garrapatas presentan tres fases en su desarrollo: larva, ninfa y adulto. Las tres fases son hematófagas y necesitan sangre para su desarrollo. Se multiplican por lo general en verano, época de mayor frecuencia de la parasitosis.⁶

Agente etiológico. Taxonomía. El género *Babesia* pertenece a la familia Babesiidae, Este se se multiplica por fisión binaria exclusivamente en los eritrocitos del hospedador vertebrado. Posee dos formas invasivas denominadas esporozoítos y merozoítos y una forma de multiplicación, el trofozoíto.⁷

El ciclo biológico se inicia cuando la garrapata al alimentarse de sangre de un reservorio mamífero, por ejemplo un roedor infectado, ingiere gametocitos masculinos y femeninos que existen en la sangre periférica del hospedero, (eritrocitos parasitados).⁶

Los gametocitos de *Babesia* se liberan del glóbulo rojo mediante un sistema de digestión, la mayoría son destruidos en el intestino de la garrapata. En el intestino del vector biológico (garrapatas), se transforman en gametos, llevándose a cabo la fecundación originando un cigoto móvil, el ooquineto, que abandona el intestino y se distribuye por diversos tejidos, transformándose en esporoquistes (reproducción sexual). En el ovario y en las glándulas salivales de las garrapatas hay esporoquistes con esporozoítos.

Los esporozoítos de las glándulas salivales son los que diseminan la infección en los mamíferos. La infección del hombre y de los animales se produce por la mordedura de las garrapatas infectadas que inoculan esporozoítos que invaden los glóbulos rojos, diferenciándose en trofozoítos. Los trofozoítos maduran, rompen el glóbulo rojo, liberando así a merozoítos que invaden otros glóbulos rojos.⁶

La epizootiología de la babesiosis comprende un ciclo de transmisión por garrapatas ixódidas del reservorio mamífero infectado al no infectado. La naturaleza exacta del ciclo varía según la especie del vector, el parásito y el huésped reservorio. El hombre adquiere la infección por la mordedura de una garrapata infectada, por lo que es probable que esta enfermedad se produzca en personas que habitan en zonas rurales, en las que las garrapatas abundan.

El cuadro clínico producido por la babesiosis en diversos huéspedes mamíferos varía según la virulencia de la cepa. *Babesia microti* es la especie que predomina en América del Norte, la enfermedad leve aparece de uno a seis meses después de la picadura de la garrapata, y de uno a nueve semanas cuando se adquiere por transfusión. La sintomatología consiste en fiebre intermitente o sostenida que puede estar acompañada de escalofrío, sudoración, cefalea, mialgias, artralgias y anorexia.

Todo este cuadro clínico se acompaña de fatiga y debilidad. Los exámenes de laboratorio muestran: anemia hemolítica con hemoglobina y hematocrito bajos, bilirrubina alta y aumento de reticulocitos. Además presenta: leucocitos normales o levemente aumentados, trombocitopenia y pruebas hepáticas elevadas.⁸

Tratamiento.

En las infecciones sintomáticas leves por *B. microti* se utiliza tratamiento durante siete a diez días: Atovaquona y azitromicina. En adultos la atovaquona se administra a la dosis de 750 mg dos veces al día por vía oral. Conjuntamente se suministra azitromicina por vía oral, 500 a 1000 mg el primer día y 250 mg del segundo día en adelante en adultos.

En infecciones severas de *B. microti* y en todas las formas producidas por *B. divergens*, el esquema de tratamiento es: Clindamicina y Quinina. La clindamicina para adultos es de 300 a 600 mg intravenoso cada 6 a 8 horas. La quinina se administra a la dosis de 650 mg por vía oral cada 6 a 8 horas en adultos.

La primera combinación puede producir diarrea y brote cutáneo; y la segunda, además de estas reacciones, puede causar la reacción de la quinina conocida como cinchonismo, principalmente deficiencia auditiva, tinnitus y vértigo.¹

La presencia de efectos colaterales en los pacientes ocasiona la interrupción del tratamiento, dando lugar a cepas resistentes aunado al costo de los medicamentos. Una alternativa al tratamiento podría ser el uso de plantas medicinales.⁹

México es un país que ha desarrollado una rica tradición alrededor de la práctica en la medicina tradicional, abarcando una amplia variedad de terapias y prácticas que varían entre regiones.

La Medicina Tradicional se viene utilizando desde hace miles de años, y sus practicantes han contribuido enormemente a la salud humana, en particular como proveedores de atención primaria de salud al nivel de la comunidad. Existe una variedad de plantas para el tratamiento de patógenos en especial contra parásitos; que son un problema de salud importante en áreas rurales.

Tomando en cuenta la gran biodiversidad que existe en México las tres especies vegetales en estudio son:

***Phoradendron californicum* (Santalaceae)**

Nombre(s) común(es): Toji, Mesquite, Muérdago del desierto. Planta parasita aérea de las ramas de diferentes tipos de arbustos y tronco de los árboles, principalmente leñosos como encino, palo verde, aunque está frecuentemente en *Prosopis* sp. (Mezquite); el toji no tiene hojas, este obtiene la humedad y los nutrientes de las plantas a las que se encuentra sujetado. El toji o muérdago del desierto produce pequeñas bayas blancas o rojizas que se vuelven traslucidas cuando maduran. Se encuentra ampliamente distribuida en los estados de Coahuila, Chihuahua, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Nuevo León, Oaxaca, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, y Zacatecas nativa del sur de California y desierto de Sonora.

Usos en la Medicina Tradicional: Se utiliza en enfermedades venéreas, tos, fiebre para estas se prepara en una infusión, y para diarrea de empacho. Para aliviar ulceraciones estomacales e intestinales.¹⁰

***Krameria sonorae* sinónimo de *Krameria grayi* (Krameriaceae)**

Nombre(s) común (es): Cosahui es una planta o arbusto perenne, parcialmente parasita, con la raíz muy ramosa, horizontal y no muy larga. Su corteza es gruesa, de color marrón rojizo y de color rojo su interior. El tallo es cilíndrico y ramoso, con ramas que miden 50-80 cm de longitud. Tiene las hojas alternas, sésiles, oblongas-ovadas y con peciolo corto. Las flores son de color rojo, el cáliz que tiene cuatro sépalos y la corola cuatro pétalos. Se encuentra en las zonas andinas del Perú, Bolivia, Colombia, Ecuador, al oeste de California, en México se encuentra en algunas aéreas del desierto de Sonora.

Usos en la Medicina Tradicional

Astringente: utilizado en tumefacciones de los labios, irritaciones y hemorragias de la mucosa gingival. Sistema digestivo: utilizado en el tratamiento de diarreas, enteritis simples y hemorrágicas, así como en amebiasis. Por vía externa se usa en forma de pomada o supositorios para tratar hemorroides o fisuras anales.¹¹

***Ibervillea sonorae* (Cucurbitaceae)**

Nombre común: Huereque, Guereque, Calabaza amarga, Melón de coyote. Es una planta dioica perenne. Llega a medir más de 3 metros de altura y 60 centímetros de diámetro, tiene una flor amarilla, de fruto redondo de color verde cuando es inmaduro y rojo cuando madura. Se localiza en zonas semiáridas de los estados de Sinaloa, Sonora y Baja California.

Usos en la Medicina Tradicional

Aantirreumáticos, antiinflamatorio, analgésico, cardiotónico y se dice que es efectiva para curar el cáncer y la diabetes.¹²

El objetivo en este estudio fue evaluar la actividad antiparasitaria de los extractos metanólicos de *Ibervillea sonorae*, *Krameria sonorae* y *Phoradendrom californicum* en ratones infectados con *Babesia microti*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta y preparación de los extractos.

Las plantas utilizadas en el presente trabajo fueron recolectadas en la zona de Caborca en el estado de Sonora. *Krameria sonorae* (cosahui), *Ibervillea sonorae* (huereque), y *Phoradendrom californicum* (toji), las cuales fueron identificadas botánicamente por el Herbario de la ENCB. Se llevo a cabo el secado y molido de cada especie y se prepararon los extractos por maceración con metanol. El disolvente fue filtrado y concentrado hasta sequedad en un rotaevaporador a presión reducida y temperatura controlada (40-60°C).

Establecimiento de un modelo de infección por *Babesia microti* en roedores NIH.

Se llevó a cabo la descongelación de la cepa Gray de *Babesia microti* colocando el criovial en baño maría a 37°C, posteriormente se inocularon por vía intraperitoneal 0.3ml del contenido del criovial a tres ratones hembra de la cepa NIH, de 25 g de peso. Al cabo de 9 días se realizó el primer monitoreo de la infección, sangrando a los roedores por la vena caudal, se realizaron extendidos sanguíneos, los cuales se fijaron con metanol absoluto y fueron teñidos mediante la técnica de Giemsa; este monitoreo se realizó cada 72 horas, hasta obtener un porcentaje de parasitemia de 20-35% el cual se obtuvo aproximadamente a los 16 días post infección figura 1.

Después se realizó un pase a un segundo lote de roedores sanos, sangrando al ratón por la vena caudal y recibiendo la sangre en solución salina estéril, obteniéndose una suspensión concentrada de eritrocitos, a partir de la cual se inocularon 0.3ml, para continuar con el mantenimiento de la cepa por medio de pases sucesivos de ratón a ratón.

Cuando se alcanzó una parasitemia entre el 20% y 35%, se realizó un conteo en cámara de Neubauer de glóbulos rojos totales/cm³ y se inoculó un lote de 6 ratones con 20000 eritrocitos parasitados; y con este lote se obtuvo la curva de parasitemia en la cual se muestran las fases de: establecimiento, progresión y resolución de la enfermedad.

El procedimiento de infección anterior fue repetido de igual forma para todos los lotes.

Determinación de la actividad antiparasitaria

Se realizaron diluciones de los tres extractos metanólicos, para obtener una concentración de 500 mg/mL en tween 80/agua (1:2). Se administró por vía oral 500mg/kg de peso, durante cuatro días consecutivos a 3 lotes de 6 ratones de la cepa NIH, un lote para cada extracto. Esta administración se hace un día después de la inoculación de 20000 glóbulos rojos parasitados con *Babesia microti*.

Otro lote de 6 ratones se inoculó con Tween 80/ agua (1:2) (control negativo) y otro lote de 6 ratones se inóculo con cloroquina a una dosis de 30mg/kg de peso, también diluido en tween 80/agua 1:2, Control positivo (Tabla 1).

El efecto sobre la parasitemia fue evaluado por medio de extensiones sanguíneas, teñidas por la técnica de Giemsa cada tercer día durante 33 días para cada uno de los ratones de los 5 lotes. Figura 2. Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico de Zigma Stat y Zigma Plot.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se llevó a cabo la colecta e identificación botánica de las tres especies vegetales, las cuales se secaron y molieron. Posteriormente se llevó a cabo la extracción por maceración con metanol y cada extracto se concentró en un rotaevaporador.

Respecto al ensayo biológico: se llevó a cabo la descongelación de la cepa Gray de *Babesia microti* y posteriormente se inoculó a un ratón determinando la curva de parasitemia por 33 días. (Figura 1). Posteriormente la parasitemia de los ratones tratados con los Extractos Metanólicos de las plantas de estudio (Figura 2).

Establecimiento de un modelo de infección de roedores hembra NIH con la cepa Gray de *Babesia microti*. Curva de Parasitemia.

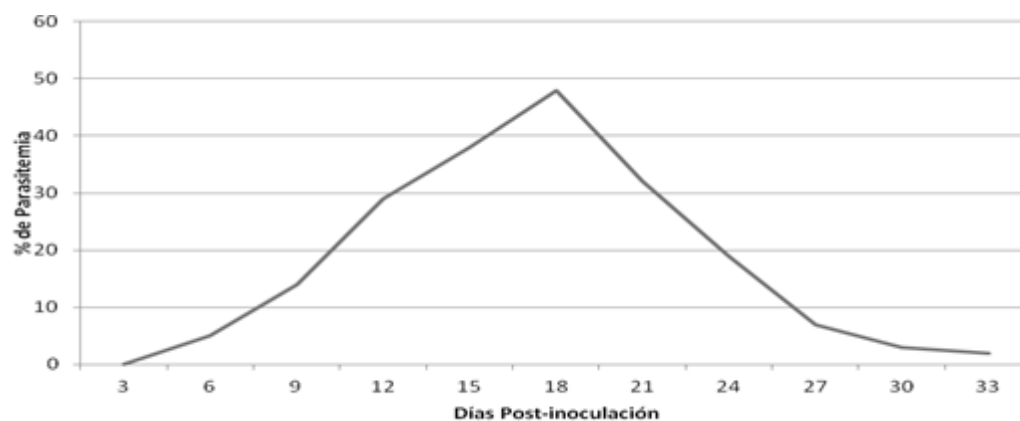


Fig 1. Curva Tipo de parasitemia de *Babesia microti* en ratones NIH.

En esta figura, se muestran las diferentes etapas de desarrollo del hemoprotozoario, la fase lag es corta presentándose en los primeros tres días una parasitemia del 5 %, la fase exponencial se mantuvo en aumento durante 12 días, alcanzando un punto máximo del 48% de parasitemia, posteriormente se observa la fase de muerte con una disminución importante en el porcentaje de parásitos presentes en sangre y al día 33 sólo se encontró un 2 % de eritrocitos parasitados.

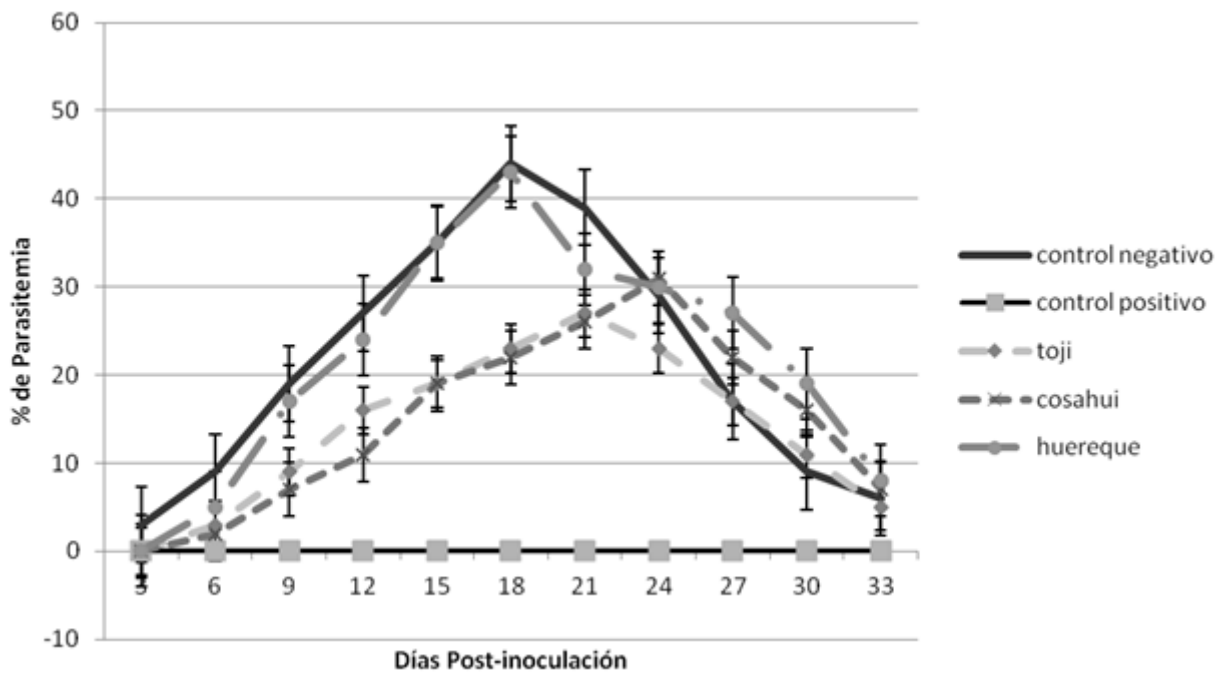


Fig 2. Curva de Parasitemia de ratones tratados con los extractos metanólicos de las plantas en estudio comparadas con el Control Negativo y el Control Positivo.

Determinación del efecto antiparasitario de los extractos metanólicos sobre *Babesia microti* in vivo.

En la Tabla 1. Se observan los resultados correspondientes a los diferentes tratamientos que recibieron los ratones y su efecto sobre la parasitemia causada por *Babesia microti* figura2.

Tabla 1. Porcentaje de parasitemia de los ratones tratados con los tres extractos sobre *Babesia microti* in vivo.

DÍAS	LOTE 1 <i>P. californicum</i> (Toji) %	LOTE 2 <i>K. sonorae</i> (Cosahui) %	LOTE 3 <i>I. sonorae</i> (Huereque) %	LOTE 4 CONTROL NEGATIVO Tween /agua %	LOTE 5 CONTROL POSITIVO Cloroquina %	CURVA DE PARASITEMIA Infectado sin tratamiento %
3	0	0	0	3	0	0
6	3	2	5	9	0	5
9	9	7	17	19	0	14
12	16	11	24	27	0	29
15	19	19	35	35	0	38
18	23	22	43	44	0	48
21	27	26	32	39	0	32
24	23	31	30	29	0	19
27	17	22	27	17	0	7
30	11	16	19	9	0	3
33	5	7	8	6	0	2

En los resultados obtenidos se observa una disminución de la parasitemia del extracto metanólico de *Krameria sonorae* (Cosahui) 22% y del extracto de *Phoradendrom californicum* (Toji) un 23% en el día 18, en comparación con el control negativo que presenta una máxima parasitemia del 44% el mismo día.

Durante el tiempo en que se monitoreó la parasitemia, es claro el efecto de cada extracto, el de *Ibervillea sonorae* (Huereque), su efecto antiparasitario sobre *Babesia microti*, muestra un comportamiento deficiente, ya que se alcanzó un porcentaje de parasitemia del 43%, mismo que frente a la curva de parasitemia solo difiere en un 10,4%; lo que sí se observa es un retraso en el inicio de la parasitemia (figura 2).

En el caso del extracto de *Phoradendrom californicum* (Toji) y de *Krameria sonorae* (Cosahui), presentan una mejor respuesta, con el extracto de Toji se alcanzó un porcentaje máximo de parasitemia del 27 %, y su fase exponencial se

inicia al día 6 post infección lo cual indica un retraso en el inicio de la parasitemia, en el caso de Cosahui, este extracto presentó un pico de parasitemia del 31 %, difiriendo en un 35.4 % con respecto a la curva de parasitemia presentada en los ratones sin tratamiento, y su fase exponencial inicia también en el día 6 post infección, indicando al igual que Toji un retraso en el inicio de la parasitemia(figura2).

Por su parte el Control negativo (Agua más Tween) no produce ningún efecto ante la infección, ya que muestra una tendencia muy similar a la curva de parasitemia tipo.

El lote control positivo (tratado con Cloroquina), muestra buenos resultados ya que ni siquiera permite el establecimiento del parásito, se abatió el desarrollo del parásito, manteniendo en cero por ciento la parasitemia (figura2).

CONCLUSIONES

Los extractos metanólicos de *Phoradendron californicum* (Toji) y *Krameria sonora* (Cosahui) reducen el inicio y aumento de la parasitemia de *Babesia microti*. El extracto de *Ibervillea sonora* (Huereque) no presentó actividad. Por lo que podemos concluir que las especies vegetales son una fuente potencial de estructuras químicas, las cuales podrían ser una alternativa en el control de parásitos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Botero D, Restrepo M. (2012). Parasitosis humanas. Vol.10. Medellín, Colombia. Editorial Corporación para Investigaciones Biológicas; 2012. p.404- 407.
2. Telford S, Gorenflot A, Brasseur P, Spielman A. Babesia infections in humans and wild life in parasitic protozoa.Vol. 5, ed. Kreier J. P. 2nd ed. San Diego, California: Academic Press; 1993. p.1- 47.
3. Homer M, Aguilar-Delfin I, Telford S, Krause T, Persing D. Babesiosis. Clinical Microbiology. Rev.2000; 13:451-469.
4. Lewis D, Young E, The transmission of a human strain of *Babesia divergens* by *Ixodes ricinus* ticks. J. Parasitol.1980; 66:359- 360.
5. Armstrong P, Katavolos P, Caporale D, Smith R, Spielman A, Telford III S. Diversity of Babesia infecting deer ticks (*Ixodes dammini*). Am. J Trop. Med. Hyg.1998; 58:739-742.
6. Werner L. Parasitología Humana. Apt B.1^ªedición. México. Mc Graw Hill; 2013. p. 335-337.
7. García J. Identificación Molecular de las Especies de Piroplasmas en las Poblaciones de Ixódidos de la Comunidad Autónoma del País Vasco.1^ª edición. Editorial Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco; 2010. p. 105- 111.
8. Chester P, Rodney C. Parasitología Clínica.2^a ed. Editorial Salvat Editores; 1986. p. 223- 226.
9. Amirmohammadi M, Khajoenia S, Bahmani M, Rafieian-Kopaei M, Eftekhari Z, Qorbani M. *In vivo* evaluation of antiparasitic effects of *Artemisia abrotanum* and *Salvia officinalis* extracts on *Symphyla obvelata*, *Aspicularis tetrapetra* and *Hymenolepis nana* parasites. Asian Pacific Journal of tropical Disease. 2014;4(Suppl 1): S250-S254.
10. Varela B., Fernández T., Ricco A., Cerdá Zolezzi P., Hajos S., Gurni A., Alvarez E., Wagner M. (2004). *Phoradendron liga* (Gill. ex H. et A.) Eichl. (Viscaceae) used in folk medicine: anatomical, phytochemical, and immunochemical studies. Journal of Ethnopharmacology 2004; 94: 109-116.
11. Espinosa C. Estudio Químico de *Krameria interior* y *Aristolochia brevipes*. (Tesis en opción del título de Maestro en Ciencias Química de Productos Naturales). Facultad de Ciencias Biológicas Instituto Tecnológico Estudios de Monterrey. Ciudad de Monterrey, Nuevo León, México. Universidad Autónoma de Nuevo León; diciembre; 1990.
12. Alarcón-Aguilar E, Calzada F, Hernández E, Ruiz C, Román R. Acute and chronic effect of *Ibervillea sonora* root extracts-II. Journal of Ethnopharmacology. 2005; 97: 447-452.