

ARTÍCULO ORIGINAL

Actividad IN VIVO del aceite esencial de *Origanum elongatum* frente a larvas L3 de *Anisakis pegreffii*
IN VIVO activity of essential oil *Origanum elongatum* against larva L3 of *Anisakis pegreffii*

**Abattouy N¹, Valero A¹, Romero MC¹, Martín-Sánchez J¹, González-Tejero MR³,
Lozano J¹, Navarro MC²**

¹Departamento de Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. avalero@ugr.es

²Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. cnavarro@ugr.es

³*Departamento de Botánica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

jlarias@ugr.es.

RESUMEN

En este trabajo se aborda la posible actividad larvicida in vivo del aceite esencial de *Origanum elongatum*, recolectado en Marruecos, frente a las larvas L3 de *Anisakis pegreffii*, que parasitan distintas especies marinas. Los resultados obtenidos son demostrativos del interés potencial de este aceite esencial como preventivo de la infección por *Anisakis*, tras ingestión del pescado parasitado.

PALABRAS CLAVE: *Anisakis pegreffii*, *Origanum elongatum*, aceite esencial, ensayo in vivo.

ABSTRACT

Anisakiasis is an emerging zoonotic disease caused by species of the genus *Anisakis*. In humans, this parasite is manifested by digestive symptoms. In the virtual absence of effective treatments against this infection, our working group has initiated a series of investigations aimed at finding natural products such as essential oils and their major components, which might be of interest in the treatment of the infectious form of these zoonoses. **OBJECTIVE:** Establishment of the possible in vivo activity of essential oil of *O. elongatum*, against L3 larva of *Anisakis pegreffii*. **METHODOLOGY:** For the study in vivo, parasites were isolated from the host *Scomber japonicus* (mackerel) and *Trachurus trachurus* (horse mackerel). The experimental animals (female Wistar rats) were infected with 6 *Anisakis* larva by gastric catheter, this technique was used also for the administration of *O. elongatum* (46.9 mg / 0.5 ml of olive oil), according to the following guidelines: infection and joint treatment and sacrifice at 4 hours. Parallel to this, a control test was performed, administering 0.5 ml olive oil together with six larvae of the parasite to a group of animals. The identification of the larvae was carried out using molecular techniques (PCR-RFLP). The identification of the main components of essential oil was performed by GC-MS.

KEYWORDS: *Anisakis*, anisakiasis, *Origanum*, essential oil.

Fecha de recepción (Date received): 15-04-2010

Fecha de aceptación (Date accepted): 10-06-2010

Ars Pharm 2010; 51.Suplemento 3: 107-111.

INTRODUCCIÓN

La anisakiosis es la afección parasitaria producida por larvas L₃ de nematodos del género *Anisakis* que el hombre adquiere por el consumo de pescado crudo o insuficientemente cocinado¹. Los cuadros clínicos descritos incluyen episodios gastrointestinales, alérgico y gastroalérgicos.^{2,3,4} Hoy día, su incidencia está aumentando como demuestran diversos estudios del Centro Nacional de Epidemiología y del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria (2006). Respecto al tratamiento, la mayoría de los autores coinciden en que el remedio más eficaz para los casos diagnosticados como anisakiosis gástrica es la exéresis de la larva con el endoscopio,^{5,6} siempre que el parásito se encuentre en lugar accesible. Por otro lado, en los casos de anisakiosis gástrica crónica así como en los cuadros agudos intestinales, la solución más común es la intervención quirúrgica. En definitiva, cuando no se retira la larva o la zona afectada no se acaba con el problema en sí. Teniendo en cuenta que no se conoce ningún fármaco en el mercado de eficacia contrastada, muchos investigadores han volcado sus esfuerzos en la búsqueda de moléculas de distinto origen (natural o sintético), para el tratamiento de esta enfermedad. En este sentido, cabe destacar los trabajos desarrollados por distintos autores con extractos vegetales, aceites esenciales y/o componentes aislados a partir de determinadas especies vegetales. Así, la posible actividad de distintos aceites esenciales y/o sus componentes frente a las larvas de *Anisakis* fue objeto de estudio por primera vez por Kasuya et al.,^{7,8} quienes pusieron de manifiesto el hecho de que el aceite esencial de *Perilla frutescens* (Lamiaceae) resultó activo en ensayos *in vitro* frente a este nematodo. Otros autores japoneses han continuado esta línea de investigación.^{9,10}

Como consecuencia de todo lo expuesto, este grupo de trabajo ha iniciado una serie de investigaciones que tienen como objetivo la búsqueda de tratamientos efectivos frente a esta enfermedad, entre los que destacan las actuaciones de distintos aceites esenciales y sus principales componentes.^{11,12,13}

II. MATERIALES Y MÉTODOS

1.-Las larvas L₃ del parásito fueron extraídas de los hospedadores *Scomber japonicus* (caballa) y *Trachurus trachurus* (jurel) procedentes del litoral marroquí. Las muestras se tomaron directamente de las embarcaciones que faenan en las aguas de Ceuta y Tánger. Para la identificación del hospedador se tuvieron en cuenta las características aportadas por Bauchot y Pras.¹⁴ Tras la disección de los pescados se extrajeron las larvas que se encontraban presentes en la cavidad corporal y en el paquete visceral y se depositaron en una placa de Petri que contenía solución de NaCl al 0,9%.

2.-Estudio *in vivo*. El ensayo se ha llevado a cabo en ratas Wistar hembras de 120-130 g de peso. La dosis administrada a los animales de experimentación fueron de 46'9 mg en 0'5 ml de aceite de oliva.

El estudio *in vivo* se llevó a cabo de la siguiente forma: 6 larvas L₃ de *A. simplex* tipo I se introducen en el extremo de una sonda gástrica de 2,5 mm de sección, conectada por el extremo opuesto con una jeringa de 2 ml de volumen con la dosis correspondiente del aceite esencial.^{12,15} Las ratas se mantuvieron en ayunas, con agua *ad libitum*, en jaulas individuales. A las cuatro horas del inicio de la experiencia se sacrificó el animal y se inició la necropsia reglada de éste,¹⁶ comprobando las lesiones producidas en tracto digestivo y la localización de cada una de las larvas en las ratas, tras un examen minucioso del contenido del tracto digestivo, cavidad corporal y órganos internos (hígado, páncreas, riñones, genitales y grasa adyacente). Con el fin de recuperar todas las larvas, se inspeccionaron las heces de las ratas, para lo cual se depositaron en una placa de Petri con solución de NaCl al 0,9%; a continuación se disgregaron procediéndose posteriormente, a la observación y búsqueda bajo microscopio estereoscópico.

De forma paralela, se realizó un ensayo control, en el que se administró 0,5 ml de aceite de oliva junto con 6 larvas del parásito a un grupo control, según el procedimiento anteriormente descrito.

3.-Identificación de los parásitos. La identificación específica de las larvas recuperadas se ha realizado con la técnica PCR-RFLP del ITS1-5,8S-ITS2 que permite la diferenciación de las especies hermanas *Anisakis simplex* s.s. y *A. pegreffii*, a través de los diferentes patrones de bandas obtenidas.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. pegreffii es la especie dominante en el litoral marroquí, de forma que todas las larvas utilizadas en este estudio se han identificado como la especie mencionada. Los datos obtenidos muestran una significativa actividad larvicida del aceite de *O. elongatum* frente a las larvas L₃ de *A. pegreffii*, ya que de las 15 ratas que componen el grupo tratado, tan sólo en una se observó una lesión gástrica de 4x4 mm en estómago. Estos resultados están de acuerdo con los expuestos por Navarro et al.,¹³ quienes han ensayado *in vivo* el aceite esencial de otra especie de orégano así como de su principal componente, el carvacrol.

Por otro lado, nuestros resultados indican que en un gran número de larvas recuperadas se detectó importantes alteraciones en la región esofágica y en la cutícula (Figura 1). Estos datos, se encuentran en consonancia con los resultados en cortes histológicos obtenidos por Navarro et al.,¹³ quienes indican alteraciones en la cutícula de las larvas provocadas por el carvacrol, uno de los principales componentes del orégano. Además, el timol, otros de los compuestos principales de esta planta aromática, actúa sobre la cara luminal del intestino de *Anisakis*, con destrucción de las células de la zona intestinal próxima al ventrículo.

Figura 1. Alteración de la región esofágica de *Anisakis* provocada por el aceite esencial de *O. elongatum*.



AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por el proyecto: P07-CVI-03249

BIBLIOGRAFÍAS

1. Cuende E, Audicana MT, García M, Anda M, Fernández Corres L, Jiménez C, Vega JC. (1998). Rheumatic manifestations in the course of anaphylaxis. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 6: 303-304.
 2. Del Pozo MD, Audicana M, Díez J, Muñoz D, Ansotegi IJ, Fernández E, García M, Etxenagusia M, Fernández de Corres L. (1997). *Anisakis simplex* a relevant etiologic factor in acute urticaria. *Allergy*, 52: 576-579.
 3. Daschner A, Alonso Gómez A, Cabañas R, Suárez de Parga JM, López Serrano MC. (2000). Gastroallergic anisakiasis: borderline between food allergy and parasitic disease: Clinical and allergologic evaluation of 20 patients with confirmed acute parasitism by *Anisakis simplex*. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 105:176-81.
 4. Audicana M, Ansotegui I, Fernández de Corres L, Kennedy M. (2002). *Anisakis simplex*: dangerous-dead and alive? *Trends Parasitol.*, 18, 20–25.
 5. Cocheton JJ, Cabou I, Lecomte I. (1991). Anisakiasis et infections par le anisakidés. *Ann. Med. Interne*, 142 :121-130.
 6. De Montigni S, Prevot S, Basset D. (1991). Anisakiase gastrique: guérison par extraction endoscopique retardée. *La Presse Medicales*, 20:180.
 7. Kasuya S, Goto C, Ohtomo H. (1988). Studies on prophylaxis against anisakiasis-A screening of killing effects of extracts from foods on the larvae. *Jpn. Assoc. Infect. Dis.*, 62: 1152-1156.
 8. Kasuya S, Goto C, Koga K, Ohtomo H, Kagei N, Honda G. (1990). Lethal efficacy of leaf extract from *Perilla frutescens* (traditional Chinese medicine) or perillaldehyde on *Anisakis* larvae in vitro. *Jpn. J. Parasitol.*, 39: 220-225.
 9. Goto C, Kasuya S, KogaK, Ohtomo H, Kagei N. (1990). Lethal efficacy of extract from *Zingiber officinale* (traditional Chinese medicine) or [6]-shogaol and [6]-gingerol in *Anisakis* larvae in vitro. *Parasitol. Res.*, 76: 653-656.
 10. Suzuki J, Murata I, Enokida R, Yasuda I. (1994). Effects of Chinese medicine for helminth (VII). Minimum lethal concentration on 3rd stage larvae of *Anisakis simplex* with natural compounds, isolated from crude drug and several kinds of derivatives. *Ann. Rep. Tokio Metropol. Res. Lab. Pub. Health*, 45:35-41.
 11. Hierro I, Valero A, Pérez P, González P, Cabo M, Montilla MP, Navarro MC. (2004). Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* s.l. L3 larvae. *Phytomed.*, 11: 77-82.
 12. Valero A, Hierro I, González P, Montilla P, Navarro MC. Activity of various essential oils and their main components against L3 larvae of *Anisakis simplex* s.l. In: J.N. Govil, V.K. Singh, P. Arunachalam, Editors, *Recent Progress in Medicinal Plants, Drug Development from Molecules* vol. 11, Studium Press, LLC, Houston (2006), pp. 247–265.
 13. Navarro MC, Noguera MA, Romero MC, Montilla MP, González de Selgas JM, Valero A. (2008). *Anisakis simplex* s.l.: Larvicidal activity of various monoterpenic derivatives of natural origin against L3 larvae in vitro and in vivo. *Exp. Parasitol.*, 120 295-299.
 14. Buchot ML, Pras A. (1987). *Guía de los peces del mar de España y de Europa*. Editorial Omega, p.170, Barcelona, España.
 15. Hierro I, Valero A, Navarro MC. (2006). In vivo larvicidal activity of monoterpenic derivatives from aromatic plants against L3 larvae of *Anisakis simplex* s.l. *Phytomed.*, 13: 527–531.
 16. Feldman DB, Seely JC. *Necropsy Guide: Rodents and the rabbit*. CRC Press, Boca Ratón (1988).
-