

EFFECTO DEL EXTRACTO HEXANOICO DE LA SEMILLA DEL AGUACATE CRIOLLO MEXICANO SOBRE *Trichomonas vaginalis*

Mendez Grimaldo Blanca Yessenia (1), Alva Murillo Patricia Nayeli (2)

¹ [Lic. Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato] | [by.mendezgrimaldo@ugto.mx]

² [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [pn.alva@ugto.mx]

Resumen

Trichomonas vaginalis es el patógeno responsable de la tricomoniasis, la cual es la infección de transmisión sexual no viral más común en el mundo. Esta enfermedad es tratada con derivados de imidazol como fármacos de elección; sin embargo, la situación se ha agravado debido a la resistencia a estos fármacos. En este sentido, las plantas medicinales son una fuente invaluable para descubrir nuevas drogas. México es el primer productor de aguacate a nivel mundial, este fruto se ha utilizado ampliamente por sus propiedades medicinales. Se sabe que el extracto hexanoico de la semilla de aguacate criollo (EHSA) ejerce efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores pero se desconoce si posee actividad antiparasitaria. Por lo que en este estudio se determinó la actividad tricomonocida (contra las cepas GT13 y GT21) del EHSA mediante ensayos de exclusión con azul tripano. Los resultados obtenidos indican que el EHSA (0.25-1 $\mu\text{g/mL}$) disminuyó la viabilidad (a las 24 h) de ambas cepas de manera dependiente de la concentración. Además, mediante el análisis "probit" se determinó la concentración letal 50, siendo de 0.28 y 0.26 $\mu\text{g/mL}$ para la cepa GT13 y GT21, respectivamente. En conclusión, el EHSA inhibe el crecimiento de *T. vaginalis*, lo cual es de interés farmacológico.

Abstract

Trichomonas vaginalis is the etiological agent of trichomoniasis, which is the most common nonviral sexually transmitted infection worldwide. Imidazol drugs are the classical treatment for this disease; however, there are reports indicating the parasite resistance to these drugs. In this way, medicinal plants are an invaluable source for discovering new drugs. Mexico is the first avocado producer in the world, and this fruit has been widely applied for its medicinal properties. It is known that the hexanoic extract of *Persea americana* var. *drymifolia* seed (HEAS) exerts anti-inflammatory and immunomodulatory effects but it is unknown its antiparasitic activity. Therefore, in this study the activity against *T. vaginalis* (strains GT13 and GT21) of HEAS was determined by trypan blue exclusion assays. Our results indicated that the HEAS (0.25-1 $\mu\text{g/mL}$) decreased the trophozoite viability (24 h) of both strains in a concentration-dependent manner. The lethal concentration 50 (LC₅₀) was determinate by Probit analysis, being 0.28 and 0.26 $\mu\text{g/mL}$ for GT13 and GT21 strains, respectively. In conclusion, the HEAS inhibits the *T. vaginalis* viability, which could be of pharmacological interest.

Palabras Clave

Trichomonas vaginalis, aguacate, tricomonocida

INTRODUCCIÓN

Trichomonas vaginalis es un protozoo flagelado, anaerobio, facultativo, que existe solamente en forma de trofozoíto. Este parásito reside en el tracto genital inferior femenino, así como en la uretra y próstata masculina, donde se replica por fisión binaria. Se transmite de persona a persona, principalmente por relaciones sexuales.

La tricomoniasis, enfermedad de transmisión sexual -no viral- con mayor incidencia en el mundo, es causada por *T. vaginalis*. Según la Organización Mundial de la Salud, se estima una incidencia anual de 273 millones de casos nuevos [1]. El hombre suele ser un portador asintomático, mientras que las mujeres pueden ser asintomáticas (hasta el 50%) o presentar inflamación crónica del tracto genitourinario [1]. Este parásito genera consecuencias dramáticas, como infertilidad, ruptura prematura de las membranas placentarias, liberación temprana del producto, lactantes con bajo peso al nacimiento y muerte neonatal; además, incrementa la predisposición a las infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), al cáncer de próstata o cervical [1,2].

El tratamiento clásico de la tricomoniasis involucra agentes 5'-nitro-imodazoles (ej. metronidazol, tinidazol); sin embargo, el fracaso del tratamiento es un problema multifactorial que se asocia con las terapias inconclusas, la reinfección y/o a la falta del tratamiento de las parejas sexuales, el tratamiento inespecífico o la resistencia a los medicamentos [1,3]. En este sentido, se ha reportado que cerca del 4.3-9.6% de los aislamientos clínicos de *T. vaginalis* son resistentes a metronidazol [4] y esta cifra va en aumento. Estos casos no exitosos son tratados con dosis mayores de metronidazol, lo que aumenta los efectos adversos gastrointestinales y alérgicos -relacionados con la liberación sistémica del metronidazol- [1].

Por lo anterior, son primordiales las investigaciones enfocadas en la búsqueda nuevos compuestos que sean seguros y eficaces en el tratamiento y prevención de la tricomoniasis. En este sentido, las plantas medicinales son una fuente invaluable para descubrir nuevas drogas [5]; el bajo nivel de toxicidad y la mayor eficacia son algunas ventajas de las sustancias basadas en la etnofarmacología.

En cuanto a los anti-parasitarios aprobados por autoridades de salud entre 1981 y 2010, 15 (50%) de ellos han sido productos naturales o derivados de los mismos [6]. Los productos naturales de plantas con actividad anti-*Trichomonas* se han estudiado desde dos vertientes, ya sea utilizando (i) el extracto crudo de la planta o (ii) los compuestos caracterizados químicamente del extracto [6].

Entre las plantas atractivas, con propiedades antimicrobianas, se encuentra el aguacate (*Persea americana*). El aguacate nativo de México (*P. americana* var. *drymifolia*) se ha utilizado, por sus propiedades medicinales, para tratar afecciones en la salud del humano desde la época prehispánica [7,8]. En años recientes se han estudiado los efectos medicinales y antimicrobianos del aguacate. En este sentido, la semilla es atractiva por su contenido de compuestos bioactivos (ej. compuestos fenólicos, proantocianinas) y por el peso total (16%) que representa del fruto; se ha reportado que estos compuestos bioactivos pueden actuar como anticancerígenos, antiinflamatorios, antidiabéticos, antihipertensivos, hipocolesterolémicos, insecticidas, tóxicos y antimicrobianos [8], entre otros. Como antimicrobianos, el extracto (ej. metanólico, clorofórmico, de éter de petróleo) y compuestos (ej. acetogeninas) de la semilla de aguacate, tienen efecto contra microorganismos como *Listeria monocytogenes*, *Cryptococcus neoformans*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium sporogenes* (células vegetativas y esporas), *Salmonella enteritidis*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter aerogenes*, entre otros [8-11]. En cuanto a la actividad antiparasitaria, Jiménez-Arellanes et al (2013) reportaron que el extracto clorofórmico y etanólico de la semilla de *P. americana* ejercen un efecto anti-*Trichomonas* [12]. No obstante, hasta el momento no se ha evaluado el efecto del extracto hexanoico de la semilla del aguacate criollo que ha demostrado interesantes propiedades biológicas (ej. inmunomodulador) [13].

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del extracto hexanoico de la semilla de aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*) sobre *Trichomonas vaginalis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo del parásito

Las cepas de *Trichomonas vaginalis* GT-13 y GT-21 que se utilizaron en este estudio, estas cepas se aislaron de pacientes infectadas del estado de Guanajuato, y fueron donadas por Dr. F. Anaya-Velázquez y Dr. F. Padilla-Vaca. Además, el parásito se cultivó en 5 mL de medio TYI-S-33 (pH 7) suplementado con 6% de suero bovino, en tubos tapados con rosca, por 72 h a 36.5°C para mantener a los trofozoítos [14]. Para los bioensayos, se cultivaron los organismos en la fase logarítmica de crecimiento (24 h) que exhibieron más del 95% de viabilidad y morfología normal, se centrifugaron (2,500 rpm, 5 min) y resuspendieron en medio TYI fresco para la evaluación del extracto de aguacate [14].

Actividad antiparasitaria del extracto de aguacate

El extracto hexanoico de la semilla de aguacate (EHSA, *Persea americana* var. *drymifolia*) disuelto en DMSO al 5% fue proporcionado por el Dr. Joel Edmundo López Meza (CMEB-UMSNH).

Para determinar el efecto del EHSA sobre *T. vaginalis*, se incubarán 6×10^3 trofozoítos en cajas de 96 pozos (volumen final 100 μ L), por 24 h a 37°C (en atmósfera microaerófila) con concentraciones crecientes (0.25, 0.5 y 1 μ g/mL) del EHSA (diluidas en DMSO al 5%). El metronidazol (1 μ g/ml) se empleó como control negativo. El vehículo empleado fue DMSO al 5%. La viabilidad de los trofozoítos se evaluó mediante ensayos de exclusión con azul tripano.

Análisis Estadístico

Los resultados se obtuvieron del promedio de dos experimentos independientes por triplicado y se compararon mediante la prueba de *t* Student. Se realizó el análisis de Probit para calcular la concentración letal 50 (CL₅₀).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tricomoniasis es tratada con derivados de imidazol, especialmente metronidazol, pero actualmente hay antecedentes de resistencia a dicho fármaco, por lo que en el presente trabajo se utilizó como alternativa farmacológica el uso del extracto hexanoico de la semilla de aguacate (EHSA) para inhibir el crecimiento de *T. vaginalis*. Se utilizaron diferentes concentraciones del EHSA (0.25, 0.5 y 1 μ g/mL, por 24 h) para evaluar su actividad antiparasitaria contra las cepas de *T. vaginalis* GT-13 y GT-21 (virulenta) por medio de ensayos de exclusión del colorante azul tripano, empleando DMSO al 5% como vehículo.

Los resultados obtenidos mostraron que no existe diferencia significativa entre el crecimiento de *T. vaginalis* sin estímulo y tratadas con el vehículo (datos no mostrados). El metronidazol (1 μ g/mL) disminuyó la viabilidad de *T. vaginalis* en 60-80% (Figura 1 y 2).

El EHSA disminuyó la viabilidad de la cepa *T. vaginalis* GT-13 en un ~30% y 70%, a las concentraciones de 0.5 y 1 μ g/mL, respectivamente (Figura 1). Aunque al emplear la concentración de 0.25 μ g/mL no se observó modificación en la viabilidad del parásito (Figura 1). Paralelamente, se evaluó el efecto del EHSA sobre la cepa GT21, la concentración de 0.25 μ g/ml no alteró la viabilidad de *T. vaginalis* GT21 (Figura 2). No obstante, se observó un efecto inhibitorio en la viabilidad de los trofozoítos de ~30 y 70% con las concentraciones de 0.5 y 1 μ g/mL, respectivamente (Figura 2). Interesantemente, el efecto inhibitorio de la viabilidad es dependiente de la concentración en ambas cepas (GT13 y GT21). Hasta el momento no se había reportado el efecto antiparasitario del EHSA.

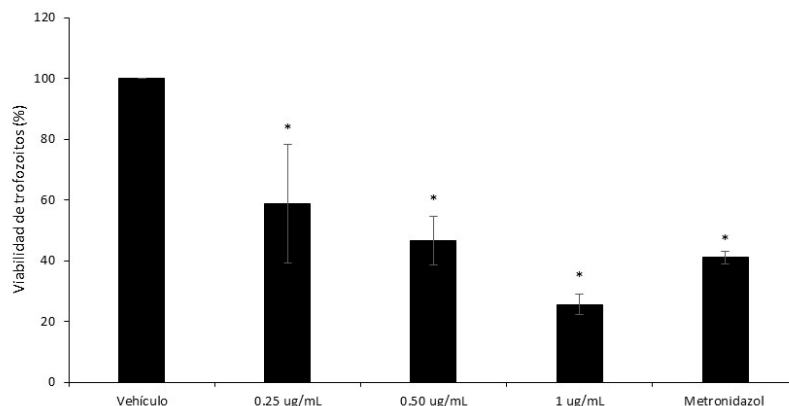


FIGURA 1: Efecto del extracto hexanoico de la semilla de aguacate sobre *Trichomonas vaginalis* GT13. Se cultivaron 6×10^3 trofozoitos con distintas concentraciones de EHSA por 24 h y se realizó en ensayo de exclusión del azul tripano. Se utilizó $1 \mu\text{g/mL}$ de metronidazol como control negativo. Cada barra representa el promedio de dos experimentos independientes por triplicado \pm error estándar. El símbolo “*” indica cambios significativos ($P \leq 0.05$) con respecto a los trofozoitos tratados con vehículo (DMSO 5%).

Se realizó un análisis Probit para determinar la concentración letal 50 (CL_{50}), siendo esta del $LC_{50}=0.28 \mu\text{g/mL}$ para la cepa *T. vaginalis* GT-13 y de $LC_{50}=0.26 \mu\text{g/mL}$ en *T. vaginalis* GT-21. Estudios realizados anteriormente reportaron la actividad antiparasitaria (contra *T. vaginalis* GT9) del extracto clorofórmico y etanólico de la semilla de aguacate, reportando una LC_{50} de 0.524 y 0.533 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente [12]. La caracterización del EHSA ya se ha reportado (moléculas de origen lipídico) [13]; no obstante, hacen falta más estudios para identificar el compuesto que ejerce el efecto antiparasitario.

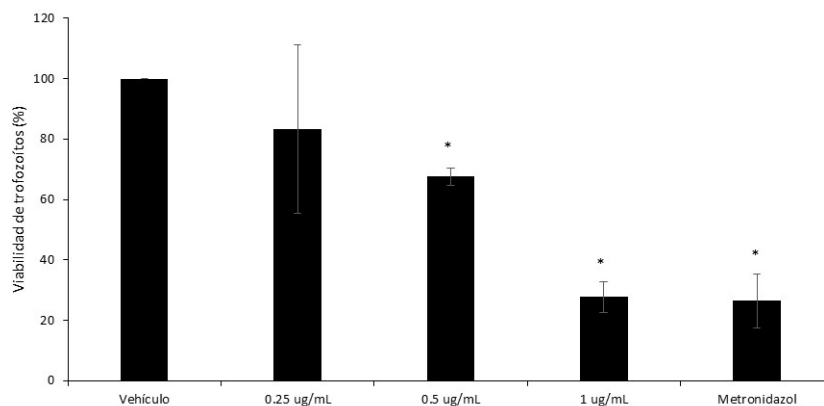


FIGURA 2: Efecto del extracto hexanoico de la semilla de aguacate sobre *Trichomonas vaginalis* G21. Se cultivaron 6×10^3 trofozoitos con distintas concentraciones de EHSA por 24 h y se realizó en ensayo de exclusión del azul tripano. Se utilizó $1 \mu\text{g/mL}$ de metronidazol como control negativo. Cada barra representa el promedio de dos experimentos independientes por triplicado \pm error estándar. El símbolo “*” indica cambios significativos ($P \leq 0.05$) con respecto a los trofozoitos tratados con vehículo (DMSO 5%).

CONCLUSIONES

El extracto hexanoico de la semilla de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) presenta actividad antiparasitaria, al inhibir del crecimiento de *Trichomonas vaginalis* de manera dependiente de la concentración, lo que podría ser de interés farmacológico como tratamiento contra la tricomoniasis.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Universidad de Guanajuato por el apoyo brindado a la estudiante Blanca Yessenia Méndez Grimaldo para la realización del Verano UG y por el apoyo financiero (Proyecto CIIC 175/2018). Los autores agradecen el apoyo brindado por el Dr. Joel Edmundo López Meza y la M.C. Marisol Báez Magaña en la obtención del extracto hexanoico de la semilla de aguacate criollo. Además, agradecemos el apoyo técnico por la Dra. Eva Edilia Ávila Muro, M.C. Marco Antonio Barajas Mendiola, M.C. Francisco Javier Rangel Mata, QFB. Mayra Rodríguez Solís. También agradecemos al Dr. Fernando Anaya Velázquez y al Dr Felipe Padilla Vaca por proporcionarnos las cepas GT13 y GT21.

REFERENCIAS

- [1] Bouchemal K, Bories C, Loiseau PM. 2017. Strategies for prevention and treatment of *Trichomonas vaginalis* infections. Clin Microbiol Rev 30:811-825. doi: 10.1128/CMR.00109-16.
- [2] Menezes CB, Tasca T. 2016. Trichomoniasis immunity and the involvement of the purinergic signaling. Biomed J 39:234-243. doi: 10.1016/j.bj.2016.06.007.
- [3] Menezes CB, Frasson AP, Tasca T. 2016. Trichomoniasis - are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide? Microb Cell. 3:404-19. doi: 10.15698/mic2016.09.526.
- [4] Paulish-Miller TE, Augustini P, Schuyler JA, Smith WL, Mordechai E, Adelson ME, et al. 2014. *Trichomonas vaginalis* metronidazole resistance is associated with single nucleotide polymorphisms in the nitroreductase genes ntr4Tv and ntr6Tv. Antimicrob Agents Chemother. 58:2938-43. doi: 10.1128/AAC.02370-13.
- [5] Mehriardestani M, Aliahmadi A, Toliat T, Rahimi R. 2017. Medicinal plants and their isolated compounds showing anti-*Trichomonas vaginalis*-activity. Biomed Pharmacother. 88:885-93. doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.149.
- [6] Bala V, Chhonker YS. 2018. Recent developments in anti-*Trichomonas* research: An update review. Eur J Med Chem. 143:232-43. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.11.029.
- [7] Ramos-Jerz MDR. Phytochemical analysis of avocado seeds (*Persea americana* Mill., c.v. Hass): Göttingen Cuvillier 2007; 2007.
- [8] Dabas D, Shegog RM, Ziegler GR, Lambert JD. 2013. Avocado (*Persea americana*) seed as a source of bioactive phytochemicals. Curr Pharm Des. 19:6133-40. Doi: 10.2174/1381612811319340007.
- [9] Salinas-Salazar C, Hernandez-Brenes C, Rodriguez-Sanchez DG, Castillo EC, Navarro-Silva JM, Pacheco A. 2017. Inhibitory activity of avocado seed fatty acid derivatives (acetogenins) against *Listeria monocytogenes*. J Food Sci. 82:134-44. doi: 10.1111/1750-3841.13553.
- [10] Falodun A, Imieje V, Erharuyi O, Ahomafor J, Jacob MR, Khan SI, et al. 2014. Evaluation of three medicinal plant extracts against *Plasmodium falciparum* and selected microorganisms. Afr J Tradit Complement Altern Med. 11:142-6.
- [11] Rodriguez-Sanchez DG, Pacheco A, Garcia-Cruz MI, Gutierrez-Urbe JA, Benavides-Lozano JA, Hernandez-Brenes C. 2013. Isolation and structure elucidation of avocado seed (*Persea americana*) lipid derivatives that inhibit *Clostridium sporogenes* endospore germination. J Agric Food Chem. 61:7403-11. doi: 10.1021/jf401407s.
- [12] Jimenez-Arellanes A, Luna-Herrera J, Ruiz-Nicolas R, Cornejo-Garrido J, Tapia A, Yopez-Mulia L. 2013. Antiprotozoal and antimycobacterial activities of *Persea americana* seeds. BMC Complement Altern Med. 2013 May 16;13:109. doi: 10.1186/1472-6882-13-109.
- [13] Baez-Magaña, M. 2014. Efecto de los ácidos grasos de semilla de aguacate y sus derivados sobre la respuesta inmune innata durante la internalización de *Staphylococcus aureus* en células epiteliales mamarias bovinas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.
- [14] Hernandez-Flores JL, Rodriguez MC, Gastelum Arellanes A, Alvarez-Morales A, Avila EE. 2015. Effect of recombinant prophenin 2 on the integrity and viability of *Trichomonas vaginalis*. Biomed Res Int. 2015:430436. doi: 10.1155/2015/430436.