



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Farmacia



USO DE COMPUESTOS NATURALES FRENTE A LA ANISAKIDOSIS

CARMEN RAMÍREZ ORMEÑO



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Trabajo Fin de Grado

Facultad de Farmacia

Grado en Farmacia

USO DE COMPUESTOS NATURALES FRENTE A LA ANISAKIDOSIS

Alumna: Carmen Ramírez Ormeño

Facultad de Farmacia, 5 Julio 2017, Sevilla

Departamento de Parasitología

Tutora: Rocío Callejón Fernández

Trabajo de fin de grado de revisión bibliográfica

RESUMEN

La anisakidosis es una enfermedad parasitaria causada por la ingestión de pescado crudo o poco cocinado infectado con larvas de *Anisakis* principalmente por *Anisakis simplex* y *Anisakis pegreffii*. Se trata de una zoonosis de distribución mundial con mayor incidencia en Japón seguido de España por el alto nivel de consumo de pescado como merluza, jurel y bacaladilla.

Como tratamiento se utilizan antibióticos como el albendazol, mebendazol y tiabendazol, antiestamínicos y/o corticoides aunque no hay suficientes pruebas que avalen su eficacia.

Como metodología se ha buscado información sobre la actividad de compuestos naturales frente a la larva en tercer estadio de *Anisakis simplex* recogida de revistas científicas, libros, tesis e informes a través de bases de datos y búsquedas en Pubmed, Medline, Scopus, Mendeley, Google scholar y Science direct. Utilizando para ello los términos de: ***Anisakis*, therapy y biological products.**

El resultado obtenido en el presente trabajo de revisión ha sido la recopilación y análisis de numerosos trabajos *in vivo* e *in vitro* en los que se prueba la actividad de los compuestos naturales frente *Anisakis* tipo I tales como extractos de plantas, aceites esenciales, compuestos fenólicos, terpenos y enzimas. De todos estos compuestos los autores sugieren seguir investigando algunos de ellos; citral, carvagol, nerolidol, farnesol, aceites esenciales de menta y el perillaldehído entre otros.

Las principales conclusiones del presente trabajo son: la existencia de alternativas terapéuticas con compuestos naturales frente a la anisakidosis que muestran prometedoras propiedades, que la sinérgia de algunos compuestos tiene un papel importante y abre muchos campos de estudio y que hay resultados *in vivo* no esperados que pueden ser debidos a el pH del medio en la cavidad gástrica.

Palabras clave: anisakidosis, tratamiento, *Anisakis*, compuestos naturales, *in vivo*.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Historia	5
1.2. Taxonomía	6
1.3. Morfología de la larva L3 de <i>Anisakis</i> spp.	6
1.4. Ciclo Biológico	9
1.5. Epidemiología	11
1.6. Patología y síntomas	12
1.6.1 Anisakidosis luminal o no invasiva:	12
1.6.2 Anisakidosis gástrica o intestinal:.....	12
1.6.3 Anisakidosis alérgica:	12
1.7. Diagnóstico.....	13
1.8. Tratamiento.....	14
1.9. Profilaxis	15
2. OBJETIVOS DE LA REVISIÓN.....	16
3. METODOLOGÍA.....	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
4.1. <i>In vitro</i>	20
4.1.1 Extractos.....	20
4.1.2 Aceites esenciales (AE)	22
4.1.3 Compuestos fenólicos	22
4.1.4 Terpenos.....	24
4.1.5 Enzimas.....	27
4.2. <i>In vivo</i>	29
4.2.1 Resultados positivos <i>in vivo</i>	30
4.2.2 Resultados no esperados <i>in vivo</i>	31
4.2.3 Sinérgia	33
4.2.4 Futuras investigaciones sobre compuestos naturales	34
5. CONCLUSIONES	35
6. BIBLIOGRAFÍA	36

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Historia

La anisakidosis es una enfermedad parasitaria producida por larvas de nematodos que pertenecen a la familia Anisakidae. Se trata de una zoonosis parasitaria de origen alimentario que se adquiere de forma accidental por la ingestión de pescado crudo o poco cocinado, especialmente sushi, sashimi y cebiche, con larvas en tercer estadio (L₃).

En la antigüedad no estaba muy claro si los helmintos, vermes invertebrados parásitos del hombre, eran beneficiosos o perjudiciales existiendo, en el siglo XIX un periodo de confusión que reinó durante mucho tiempo. Así el mismo Linneo llegó a afirmar que protegían a los niños de otras enfermedades, aunque atribuyó la lepra a nematodos parásitos de peces (anisakidos). Goeze (1782) y Joerdens (1801) consideraban que los helmintos estimulaban el peristaltismo e incluso ayudaban a consumir el exceso de alimentos (Cordero y Rojo, 2007).

El primer caso de anisakidosis fue detectado en Holanda en 1955 por la ingestión de arenques crudos y se empezó a conocer como “la enfermedad del gusano del arenque”. El primer caso del que se tiene constancia es el de un joven de Groenlandia en 1876, pero hasta 1960 este nematodo no fue identificado por Van Thiel que lo detectó en un paciente residente en los Países Bajos, que había consumido arenques crudos. Desde entonces en Japón se han registrado miles de casos cada año (Arizono y cols., 2012).

Anisakis simplex y *Anisakis pegreffii* son las especies más comúnmente implicadas en la anisakidosis, mientras que *Anisakis physeteris* y *Pseudoterranova decipiens* son menos frecuentes (Audicana y Kennedy, 2008). Otros géneros que producen anisakidosis humana son *Contracaecum* e *Hysterothylacium*, aunque este último parece más implicado en cuadros alérgicos (Shamsi y Butcher, 2011).

1.2. Taxonomía

La clasificación taxonómica de las especies responsables de la anisakidosis ha sido ampliamente estudiada. Por otra parte hay controversia en la clasificación del género *Anisakis* (Mattiucci y Nascetti, 2005; Mattiucci y Nascetti, 2008). La clasificación más aceptada es la sugerida por Smith y Wooten (1978) (izquierda), aunque posteriormente De Ley y Blaxter (2004) han sugerido una segunda sistemática de clasificación (derecha).

Phylum Nematelminthes	Phylum Nematelminthes
Clase Nematoda	Clase Chromodorea
Sub clase Secernentea	Sub clase Chromodoria
Orden Ascarida	Orden Rhabditida
Sub orden Ascaridina	Sub orden Spirurina
Super familia Ascaridoidea	Infra orden Ascaridomorpha
Familia Anisakidae	Familia Anisakidae
Subfamilia Anisakinae	Subfamilia Anisakinae
Género <i>Anisakis</i>	Género <i>Anisakis</i>

1.3. Morfología de la larva L3 de *Anisakis* spp.

En *A. simplex* y otras especies de *Anisakis*, la larva en tercer estadio viva es de color blanquecino marfil y pardo cuando están encapsuladas en el intestino de los peces, su longitud es 15-30 mm por 0,1-0,6 mm de ancho. En cuanto a la morfología, poseen un cuerpo vermiforme, sin segmentación y puntiagudo en los extremos.

Tiene un sistema digestivo completo; en el extremo anterior se encuentra una estructura triangular denominada **diente**, una **boca y tres labios** que se vuelven más prominentes cuando la larva se encuentra varios días en el tejido humano, un **poro excretor** situado entre los labios ventrolaterales, **esófago** que consiste en una porción muscular larga, un **ventrículo postesofágico** más corto que se une al intestino de forma oblicua y un **ano subterminal**. Adicionalmente, presenta una estructura espinal pequeña llamada **mucrón** en el extremo posterior del cuerpo (Fig. 1 y Fig. 2) (Chai, 2007).

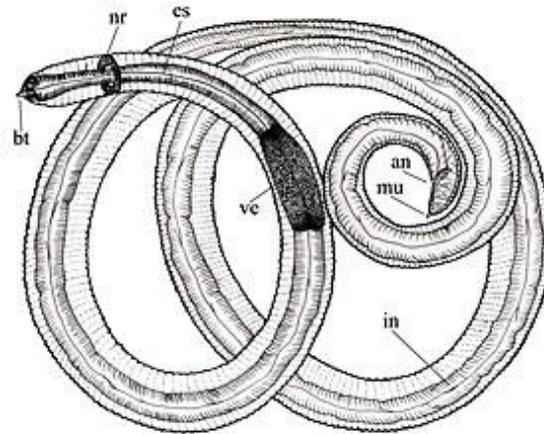


Figura 1: L₃ de *Anisakis simplex* tipo I, **bt:** diente perforador, **nr:** anillo nervioso, **es:** esófago, **ve:** ventrículo postesofágico, **in:** intestino, **an:** ano, **mu:** mucrón (Pardo-Gandarillas y cols., 2009).

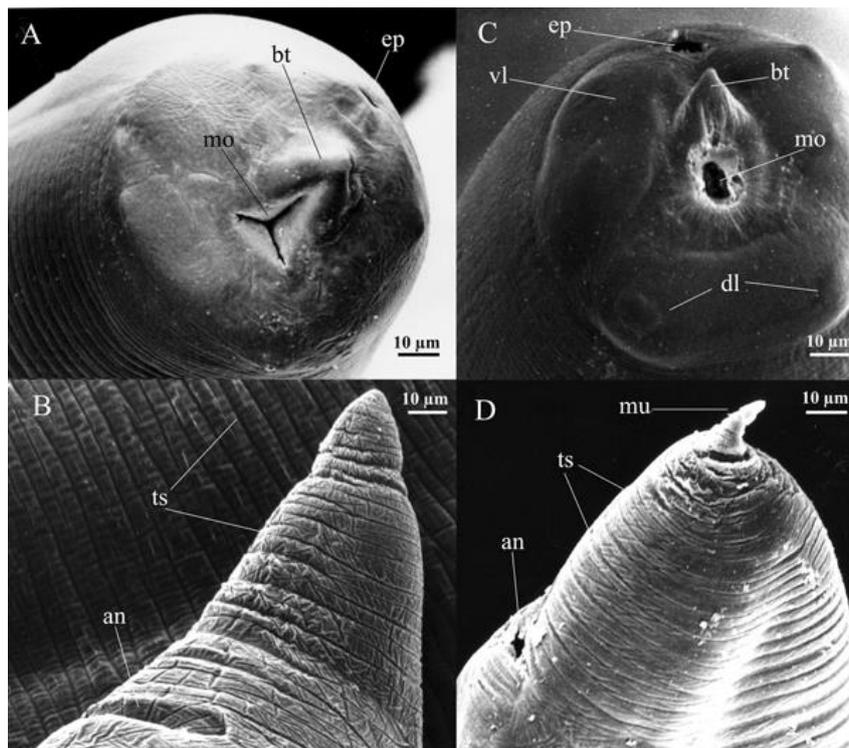


Figura 2: **A:** cabeza con boca triangular tipo II, **B:** cola postanal redondeada de A tipo II, **C:** cabeza mostrando la boca redondeada con labios dorsal y ventrolaterales con papilas tipo I, **D:** cola postanal redondeada, con un mucrón terminal tipo I **bt:** diente perforador, **an:** ano, **mu:** mucrón, **ep:** poro excretor, **mo:** boca, **vl:** labio ventral, **dl:** labio dorsal, **ts:** estricción transversal (Pardo-Gandarillas y cols., 2009).

Larvas de *Anisakis* se han ido clasificando según sus caracteres morfológicos. Así Berland (1961) solo hablaba de dos tipos *A. simplex* (tipo I) y *A. physeteris* (tipo II) mientras que Davey (1971) añade a la clasificación *Anisakis typica* (tipo III) y finalmente Shiraki (1974) describió las diferencias morfológicas agrupando las larvas en cuatro tipos (Tabla 1 y 2).

Tabla 1: Clasificación de las larvas según Berland (1961) y Davey (1971).

LARVAS	BERLAND (1961)	DAVEY (1971)
TIPO I	<i>A. simplex</i>	<i>A. simplex</i>
TIPO II	<i>A. physeteris</i>	<i>A. physeteris</i>
TIPO III	-	<i>A. typica</i>
TIPO IV	-	-

Tabla 2: Características morfológicas de los tipos de larva según Shiraki (1974).

LARVAS SHIRAKI (1974)	VENTRÍCULO	UNIÓN CON EL INTESTINO	PORCIÓN TERMINAL	MUCRÓN	DIENTE	ESTRIACIONES CUTICULARES
<u>TIPO I</u>	Largo	Oblicua	Redondeada	Si	Corto	Si
<u>TIPO II</u>	Corto	Horizontal	Larga y cónica	No	Largo	No
<u>TIPO III</u>	Corto	Horizontal	Redondeada	No	-	-
<u>TIPO IV</u>	Corto	Horizontal	Corta y cónica	No	-	-

Dentro de *A. simplex sensu lato* (s.l.) tipo I encontramos dos especies idénticas morfológicamente pero distintas isoenzimáticamente; *A. pegreffii* y *A. simplex sensu stricto* (s.s) (Orecchia y cols., 1986), unos años más tarde definen una nueva especie gemela morfológicamente *Anisakis simplex C* o *Anisakis berlandi* (Mattiucci y cols., 1997) y *Anisakis ziphidarum* (Paggi y cols., 1998). Con respecto a *Anisakis* tipo II se determinó que *Anisakis brevispiculata* era una especie aislada reproductivamente de *A. physeteris* y que ambas pertenecían a esta morfología, en 2002 aislaron *A. typica* de tipo I y en 2005 *Anisakis paggiae*

también perteneciente al tipo II que se encontraba en el estómago de una ballena (Fig. 3) (Mattiucci y cols, 2001; 2002; 2005).

Recientemente mediante técnicas de análisis de ADN mitocondrial se han descubierto nuevos taxones genéticamente distintos a los ya conocidos de *Anisakis* llamados *Anisakis* sp. 1 con una fase larvaria de tipo I y *Anisakis* sp. 2 más relacionado con *A. physeteris*.

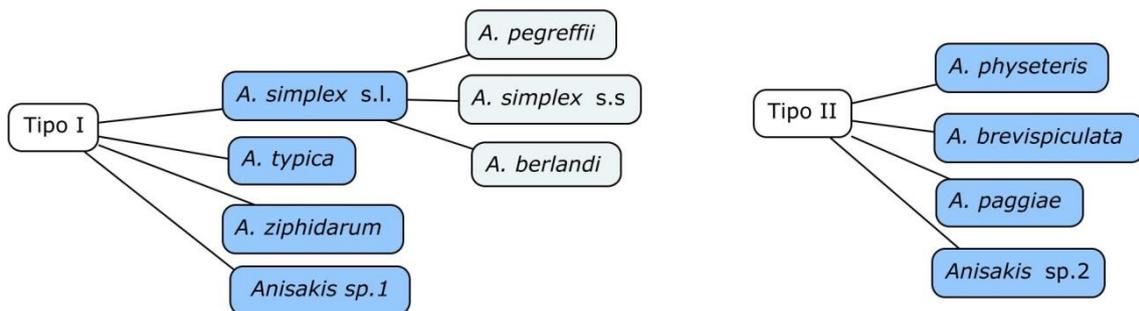


Figura 3: Resumen de la clasificación de las larvas de *Anisakis* tipo I y tipo II.

1.4. Ciclo Biológico

El ciclo de vida de *Anisakis* spp. es complejo y aunque no está definido totalmente se ha establecido que consta de: un estadio de huevo, cuatro fases larvarias y un estadio adulto (Rello y cols., 2004; Mattiucci y Nascetti, 2008) (Fig. 4).

Los adultos se localizan en el tracto digestivo de sus hospedadores definitivos que son grandes mamíferos marinos cetáceos (ballenas, cachalotes o delfines) y en ocasiones pinnípedos (focas o leones marinos). Los huevos de *Anisakis* spp. fecundados se eliminan con las heces de sus hospedadores al agua de mar. Estos huevos se desarrollan durante 20-27 días a una temperatura media entre 5-7 °C y alcanzan alrededor de unos 50 µm de diámetro. La larva L₃ que sale del huevo (L₃ inmadura) aún conserva la cutícula del segundo estadio larvario que le proporciona resistencia para sobrevivir libres en el medio marino hasta 7 semanas a 5-7 °C o 3-4 semanas a 13-18 °C. Posteriormente las larvas son ingeridas por copépodos y pequeños crustáceos (hospedador intermediario). Éstas penetran en las paredes del tracto digestivo alcanzando la cavidad corporal, se liberan de la cutícula del segundo estadio larvario,

pueden aumentar de tamaño y conservan su capacidad infectante (L₃ madura) (Fig. 4). Los pequeños crustáceos infectados son ingeridos por peces y cefalópodos que son la vía principal de transmisión. En estos hospedadores las larvas atraviesan la pared intestinal, se encapsulan sobre todo en vísceras, pueden migrar a la musculatura y moverse libremente en la cavidad intestinal (Klimpel y cols., 2004). La larva L₃ puede parasitar a los humanos (hospedadores ocasionales) que se infectan al consumir cefalópodos y peces (Field y Calderón, 2009) (Fig. 5).

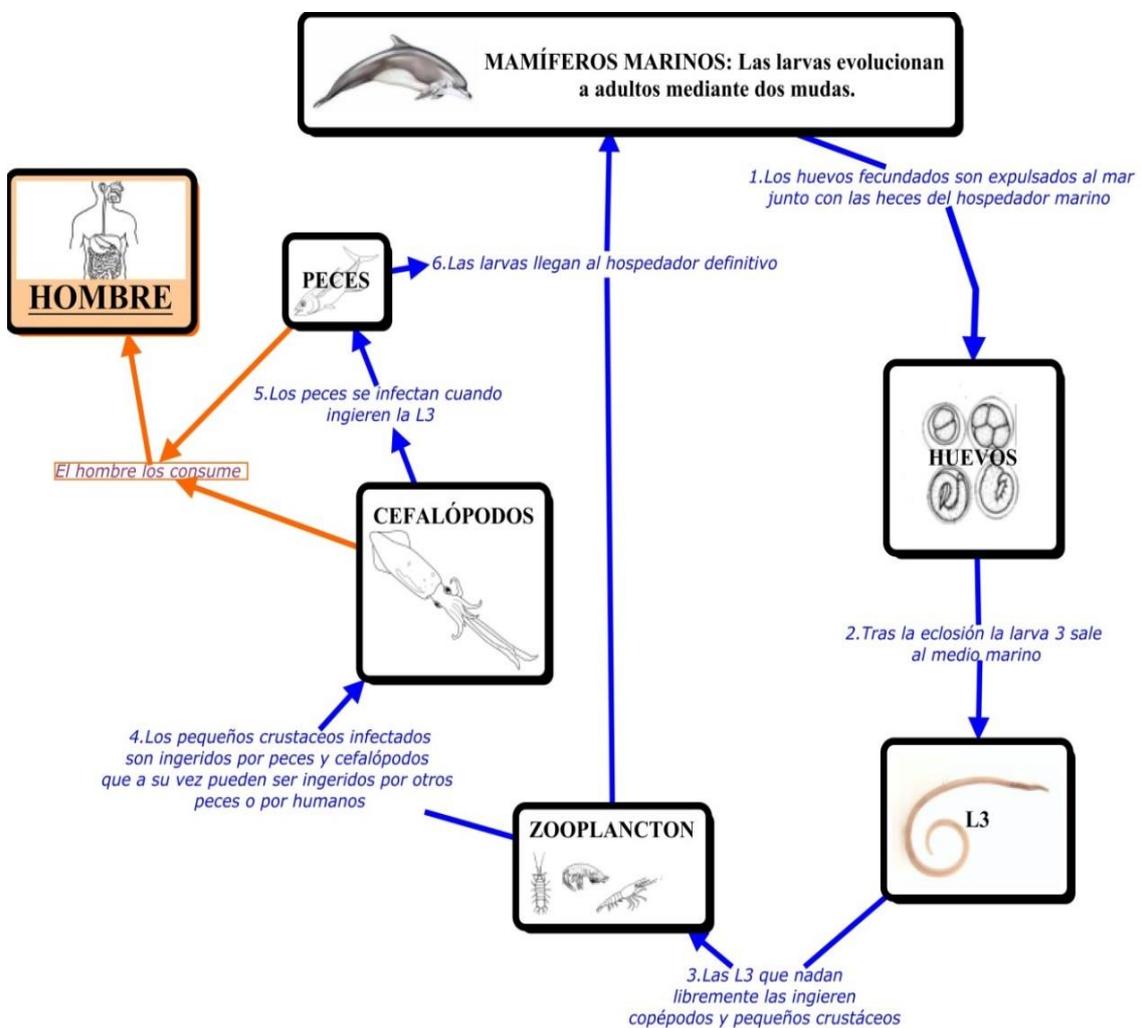


Figura 4: Ciclo biológico de *Anisakis* spp.; en rojo la fase infectiva del hombre.



Figura 5: En la foto de la izquierda se pueden observar larvas de *Anisakis* spp. enquistadas en la superficie hepática y en la imagen derecha larvas de *Anisakis* spp. enquistadas bajo la piel de una bacaladilla (Romero, 2014).

1.5. Epidemiología

La distribución mundial está favorecida en determinadas zonas por los hábitos alimenticios, el consumo del pescado crudo o poco cocinado asociado a culturas orientales es la principal causa de la parasitación del hombre, por esta razón se detectan miles de casos al año y los principales hospedadores son: *Scomber japonicus* (caballa) y *Tadarodes pacificus* (calamar).

El lugar donde la anisakidosis tiene mayor prevalencia es Japón aunque otros países muestran también alta prevalencia como Alemania, Holanda, Francia, Italia y España. Por otra parte el número de casos va aumentando en lugares como E.E.U.U., Australia, Canadá, Chile, Perú, Nueva Zelanda, Egipto, Croacia y Australia (Romero, 2014).

La especie predominante varía en función de la localización: en el Océano Atlántico tenemos como especie predominante *A. simplex* s.s., mientras que *A. pegreffii* se encuentra en el hemisferio sur y el mar Mediterráneo. En general las aguas que rodean la península ibérica son conocidas por ser una confluencia de las dos especies (Gómez-Mateos y cols., 2016).

Los pescados más parasitados suelen ser: merluza, jurel y bacaladilla. Hay pescados que en la península tienen diferente prevalencia, por ejemplo, la sardina suele tener escasa o nula parasitación en Cádiz y un 15% más de riesgo en La Coruña (Molina-Fernández, 2013).

1.6. Patología y síntomas

Durante la parasitación de un humano con *A. simplex* se generan cambios en el aparato digestivo, especialmente en el tracto gastrointestinal por la invasión tisular y las sustancias liberadas contenidas en los parásitos. Desde los años 70 se propuso que estas sustancias liberadas tenían propiedades proteolíticas y de gran importancia desde el punto de vista inmunológico, que unidas al diente oral de la larva eran los principales responsables de que se produjera esa penetración tisular. El asentamiento más frecuente es en el tracto digestivo (Gago y cols.,2008). Los cuadros clínicos los podemos clasificar en:

1.6.1 Anisakidosis luminal o no invasiva: El parásito se adhiere a la mucosa digestiva, puede no tener sintomatología o ser leve, la cual aparecería a las pocas horas de la ingesta. Se diagnostica al identificar larvas en el vómito, las heces o incluso expulsadas al toser (Rello y cols., 2004).

1.6.2 Anisakidosis gástrica o intestinal: Se caracteriza por dolor abdominal localizado en epigastrio, a menudo acompañado de náuseas, vómitos o incluso alteración de la función intestinal. Las larvas llegan hasta la submucosa gracias a la acción de las hialuronidasas y del diente que poseen, penetran tisularmente gracias a las proteasas que son las responsable de la destrucción del tejido. La larva puede alojarse en el estómago o en intestino de manera que se pueden clasificar en anisakidosis gástricas o intestinales y dentro de ellas según la evolución y duración del parasitismo podemos clasificarlas en agudas o crónicas. Para evitar la cronicidad y que invadan otros órganos como pulmón, hígado, bazo o páncreas se debe extraer el parásito (Audicana y Kennedy, 2008). Cuando el proceso es crónico hay una formación de granulomas eosinofílicos secundarios a *Anisakis* localizados en el estómago, en el intestino delgado o en el colon.

1.6.3 Anisakidosis alérgica: En forma de urticaria, angioedema o anafilaxia. Estas reacciones están mediadas por inmunoglobulinas E (IgE) inducidas por antígenos del parásito. Podemos diferenciar dos tipos: reacción anafiláctica sin presencia de larvas viables en el interior del pescado consumido y la anisakidosis gastroalérgica que se diagnostica en pacientes que tras la ingesta de pescado bien cocinado dan positivo al alérgeno y en las IgE específicas (Gómez y cols.,2003).

1.7. Diagnóstico

El diagnóstico se realiza por imagen ya que no es posible mediante un análisis coprológico parasitario. Debe realizarse una buena anamnesis por aparatos porque son diferentes los cuadros clínicos que podemos encontrar. La técnica más utilizada actualmente es la **endoscopia** y cuando la anisakidosis es aguda, tanto en intestinales como en gástricas se extrae el parásito con un fórceps de biopsia.

En caso de que existan cuadros intestinales se utiliza la **ecografía** pero como puede confundirse con apendicitis o con una obstrucción intestinal es necesario hacer una endoscopia para confirmar el diagnóstico. Las pruebas **radiológicas** se utilizan cuando por causa de alguna lesión del paciente no se le puede realizar una endoscopia.

El **diagnóstico postoperatorio** se lleva a cabo cuando se ha practicado una laparotomía con resección del tramo intestinal afectado y se observa la larva o se estudia del segmento intestinal reseñado (Romero, 2014; Dominguez, 2000).

Por otra parte el **diagnóstico inmunológico** se utiliza cuando no ha dado resultado la endoscopia o la radiología, su identificación por biopsia es difícil o hay sospecha de localizaciones ectópicas. Sólo es válido para individuos inmunocompetentes y a partir de la segunda semana en infecciones primarias. Cuando hay una infección por ascáridos las inmunoglobulinas IgM, IgG1 e IgG4 son las que se encuentran en mayor proporción e indican el estado en el que se encuentra la infección, por ejemplo la IgM es útil para el diagnóstico precoz en una infección primaria (Rodero y cols., 2012). Una vez que la larva ha penetrado en el organismo libera antígenos ES y frente a esto el organismo responde con anticuerpos IgE específicos que pueden mantenerse elevados durante más de 5 años.

En la prueba Prick-Test si aparece una pápula > 3 mm donde se aplicó el extracto de *Anisakis* se considera positivo. Esta prueba tiene baja especificidad ya que no distingue entre los verdaderos positivos y las reacciones cruzadas con otros parásitos como *Ascaris* o *Toxocara* (Gómez y cols., 2003). También hay otras técnicas para determinar la IgE específica como: Enzimo-inmuno-análisis (ELISA), fluoro-enizmo-inmuno-análisis (FEIA), inmunoblott y CAP-radioinmunoensayo, cada uno con diferente sensibilidad y especificidad, siendo este último el más sensible (100 %) pero a su vez el menos específico (50 %) (Romero, 2014).

1.8. Tratamiento

Varios tratamientos se han propuesto para esta enfermedad, mebendazol, tiabendazol y albendazol se utilizan para evitar la cirugía aunque no están aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) ya que no hay pruebas suficientes que avalen su eficacia (Valero y cols., 2015). A pesar de esto los autores han ido proponiendo diferentes formas de evitar la cirugía (Muñoz, 2002). Si la larva es inaccesible y los síntomas no son graves se utiliza un tratamiento conservador, pero si esos síntomas no ceden o se vuelven más graves (perforación o peritonitis), se recurre a una exploración quirúrgica del abdomen (laparotomía) y resección de la zona afectada. En las anisakidosis extradigestivas solo se interviene cuando hay alguna complicación y en las formas de hipersensibilidad inmediata a *Anisakis* se tratan con **antihistamínicos y/o corticoides** e incluso con **adrenalina**.

El tratamiento conservador consiste en **antibióticos** como: estreptomycin combinada con eritromicina (Oshima, 1972), tiabendazol 25 mg/kg cada 12 h durante 3 días (Kwee y Sautter, 1987), ivermectina en una concentración de 500 µg/ml a las 48 h y finalmente el más utilizado desde 2002, el albendazol, 400 mg por vía oral pero a diferentes pautas (Moore, 2002; Dziekonska-Rynko, 2002; Pontone, 2012). A pesar de ser muchos los tratamientos probados frente a *Anisakis* spp., hasta ahora ninguno ha mostrado una eficacia contrastada y aunque se han propuesto muchos tratamientos para evitar la cirugía los resultados son similares a un tratamiento conservador con antibióticos (Lorenzo y cols., 2000).

Sobre la búsqueda de nuevos tratamientos para encontrar una eficacia contrastada, hay experimentos **in vitro** en los cuales la larva L₃ de *Anisakis* pierde la movilidad en 24 h con extractos de plantas como *Perilla frutescens* (5 %), *Zingiber officinale* (5 % y 2,5 %), *Wasabia japonica* (5 % y 2,5 %), *Allium sativum* (5 %), y etanol (8 % v/v), también se consigue la letalidad máxima con [6]-shogaol (62,5 µg/ml) y [6]-gingerol (250 µg/ml) (Goto y cols., 1990).

Estos estudios **in vitro** solo son orientativos ya que los estudios más relevantes son **in vivo**. Así el aceite esencial de menta o de manzanilla tienen actividad larvicida **in vivo**, al igual componentes de aceites esenciales como el carvacrol, cirtral, citranelol, α-pineno y ocimeno (Valero y cols., 2015; Navarro y cols., 2008).

1.9. Profilaxis

Los métodos de inactivación de la larva según el informe de la European Food Safety Authority (EFSA, 2010) consideran que la aplicación de tratamientos de congelación y de calentamiento de *A. simplex* son suficientes para producir la muerte de las larvas (L₃) y evitar la infestación del hombre.

El actual reglamento de CE 853/2004 exige **congelar** a una temperatura no superior a los a -20 °C durante 24 h todos aquellos productos que se consumen crudos o casi crudos, productos de la pesca del arenque, la caballa, el espadín, el salmón de Atlántico y del Pacífico, productos pesqueros marinados y/o salados. El fabricante debe indicar el proceso al cual se han sometidos sus productos. En EE. UU. y en Canadá, la FDA exige que todos los pescados y mariscos destinados al consumo crudo o semi-crudo se congelen a -35 °C o por debajo durante 15 h, o se congelará completamente a -20 °C al menos durante 7 días (FDA, 1998).

Por otra parte, aplicar **altas temperaturas** de 60 °C durante un minuto es suficiente para acabar con las larvas, pero alcanzar esa temperatura central en el producto depende mucho de su espesor; si tiene tres centímetros de espesor la temperatura ideal son esos 60 °C durante diez minutos (Wootten y Cann, 2001). Temperaturas de calentamiento de ≥ 60 °C durante al menos 1 minuto al cocinar y temperaturas de hasta ≥ 74 °C durante al menos 15 segundos, es lo recomendado para inactivar a los parásitos y prevenir las infecciones (Audicana y Kennedy, 2008).

Los tratamientos químicos más utilizados son: **el salazón** para el cual son necesarios 28 días de almacenamiento en salmuera con 6,3 % de sal y 3,7 % de ácido acético en la fase acuosa de los peces (Karl y cols., 1994), por otra parte **el marinado** inhibe la acción de las bacterias y enzimas y ablandan el tejido conectivo cambiando las propiedades gustativas (Karl y cols., 1994). También se puede someter el pescado a **altas presiones** 200 megapascales (MPa) durante 10 minutos a 0-15 °C o 140 MPa cuando el tiempo es de 60 minutos (Molina-García y Sanz, 2002). Por último la **electrocución** y la **succión por vacío** son sistemas aun no comercializados (Gago y cols., 2008).

2. OBJETIVOS DE LA REVISIÓN

Hoy en día la anisakidosis cada vez está más extendida dada la popularidad del consumo de pescado crudo o insuficientemente cocinado, lo que representa un problema importante de salud. La enfermedad parasitaria es producida en la mayoría de los casos por la larva L₃ de *Anisakis* tipo I. Dado que actualmente no existe ningún tratamiento totalmente eficaz frente a la anisakidosis humana se ha planteado como objetivo general del trabajo realizar una revisión bibliográfica actualizada sobre los tratamientos naturales que existen frente a la anisakidosis.

Los objetivos de este trabajo son:

1. Revisar los principales compuestos naturales activos frente a la anisakidosis.
2. Evaluar los resultados obtenidos tras los ensayos clínicos con posible aplicación futura en la anisakidosis humana.

3. METODOLOGÍA

La metodología está basada en la búsqueda bibliográfica de información relacionada con el título de esta revisión “Uso de compuestos naturales frente a la anisakidosis” y otras búsquedas alternativas que han ido surgiendo mientras se ha llevado a cabo.

Como método de búsqueda se han utilizado las siguientes palabras clave: *Anisakis*, tratamiento (therapy), productos naturales (biological products). Como palabras clave secundarias: diagnóstico (diagnosis), plantas (plant), aceites esenciales (oils volatile), epidemiología (epidemiology), profilaxis (prophylaxis).

Los libros utilizados para obtener información sobre la morfología, diagnóstico, ciclo biológico, clasificación taxonómica, se han obtenido en la biblioteca de la Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia, CRAI Antonio de Ulloa. A estos recursos he accedido a través de la web: <http://encore.fama.us.es/iii/encore/?lang=spi>

- Gállego Berenguer J. Manual de parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. Barcelona: Edicions Universitat de Barcelona; 2003.
- Mehlhorn H, Piekarski G, Dignoes Torres-Quevedo O. Fundamentos de parasitología: parásitos del hombre y de los animales domésticos. Zaragoza: Acribia; 1993.
- Becerril Flores MA. Parasitología médica. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2014.
- Ash LR, Orihel TC. Atlas de parasitología humana. 5ª ed. Buenos Aires, Madrid: Médica Panamericana; 2010.
- Cordero del Campillo M. Parasitología general. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2007.

Para la utilización de bases de datos en inglés se ha empleado el traductor “Descriptores en ciencias de la salud” (DeCS): <http://decs.bvs.br/E/homepagee.htm>

Esos descriptores se han utilizado en la Biblioteca Virtual en Salud de España (BVS): <http://bvsalud.isciii.es/> y a través de bases de datos como MEDLINE, LIS ESPAÑA: sitios saludables (información al profesional) y otras.

Las búsquedas principales se han efectuado en bases de datos en las cuales se han obtenido los artículos científicos.

- **Pubmed:** Plataforma a partir de la cual se tiene acceso a la bases de datos MEDLINE, revistas de ciencia y libros online. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
- **Science Direct:** Base de datos bibliográficos multidisciplinar que proporciona revistas científicas y artículos de libros de alta calidad. <http://www.sciencedirect.com/>
- **Google académico:** Buscador de documentos académicos de interés y resúmenes de fuentes diversas como editoriales universitarias. <https://scholar.google.es/>
- **Scopus:** Base de datos bibliográfica de resúmenes y citas de artículos de revistas científicas. <https://www.scopus.com>

Además se ha utilizado **Mendeley** un programa de ordenador que ayuda a gestionar la bibliografía, se puede trabajar con el online, lee los documentos PDF, los almacena y organiza a la vez que tiene un buscador de información científica, te sugiere artículos de interés basándose en tus búsqueda. **ChemDraw pro 12.0** para hacer las moléculas de algunos compuestos naturales, **CmapTools** que se trata de un programa para crear esquemas visuales sobre algunos contenidos y **Mircrosoft Excel** para hacer gráficas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la literatura revisada encontramos numerosos trabajos sobre los tratamientos actuales para la anisakidosis, la mayoría de ellos hablan del uso de antibióticos como el albendazol, anticolinérgicos y corticoides, que tienen una eficacia poco clara (Oshima, 1972; Dominguez-Ortega y cols., 2000). Por otra parte hay nuevas líneas de investigación bastante interesantes, se trata de trabajos en los que se estudia la actividad *in vitro* e *in vivo* de compuestos naturales frente a la L₃ de *Anisakis* tipo I (Romero, 2014).

Desde la antigüedad se han utilizado las plantas y sus componentes naturales para el tratamiento de enfermedades humanas, debido a que constituyen la base de la medicina y el único recurso de salud disponible en muchas comunidades de países en desarrollo. Por esta razón la búsqueda de actividad larvicida en compuestos naturales y los buenos resultados de los trabajos de investigación, abren un nuevo camino para el descubrimiento de tratamientos eficaces.

Al observar que los tratamientos actuales no tenía suficiente eficacia contrastada se empezaron a buscar alternativas en compuestos naturales, y como tradicionalmente el pescado crudo se había comido con extractos de plantas como las hojas de *P. frutescens*, varios estudios epidemiológicos sobre una menor prevalencia en ciertas regiones donde se consume con esta especie hizo pensar que podía tener un efecto larvicida (Hierro y cols., 2006).

Los primeros estudios fueron *in vitro* en los que se observaba la pérdida de movilidad de las larvas L₃ de *Anisakis* a las 24 h gracias a extractos de plantas (Kasuya y cols., 1988), más tarde en 1990 se estudiaron los componentes de algunos de estos extractos anteriormente probados como el perillaldehído (Hierro y cols., 2004). Además los ensayos que hay desde 2004 hasta 2011 fueron tanto *in vivo* como *in vitro* para comprobar la eficacia de los aceites esenciales y de sus compuestos (Navarro y cols., 2008; Lin y cols., 2010). En 2013 Romero estudió dos aceites esenciales a la vez el de menta y manzanilla frente a *Anisakis* tipo I obteniendo importantes resultados que nos hablan también de los posibles efectos sinérgicos que se pueden encontrar utilizando varios productos naturales a la vez y Giarratana en 2014 estudió el aceite esencial de *Thymus vulgaris* contra las larvas de *Anisakis*.

4.1. *In vitro*

Para llevar a cabo estos estudios, se obtienen las larvas de huéspedes intermediarios, como puede ser la bacaladilla o pescadilla, se lavan las larvas con una solución de NaCl 0,9 % y se observan al microscopio sus características morfológicas. Solo se utilizan *A. simplex* tipo I L₃ con longitud > 2,0 cm (Gómez-Rincón y cols., 2014; Goto y cols., 1990).

Las larvas se introducen de manera individual en unos pocillos de placas de poliestireno con 2 ml de solución salina estéril y junto con las diferentes concentraciones de los compuestos que se prueban en el ensayo. Son utilizadas 10 ± 2 larvas incubadas a 37°C en 5 % de CO₂ durante 24 h.

De manera estándar la muerte de la larva se determina con la pérdida de movimiento total y para detectar los daños histológicos provocados se transfieren las larvas muertas a unos pocillos con un tampón 10 % de formalina y se preparan las tinciones con azul de toluidina (Navarro-Moll y cols., 2010).

Los tipos de compuestos que se han ensayado *in vitro* son extractos de plantas como *Z. officinale*, aceites esenciales como el de *Mentha piperita*, compuestos fenólicos como el [10]-shogaol, terpenos como el citral y algunas enzimas, se irán desglosando en los siguientes apartados.

4.1.1 Extractos

Los extractos son preparaciones que pueden tener consistencia líquida, semisólida o sólida, que se obtienen a partir de drogas vegetales o animales. En este caso hablaremos de los vegetales ya que son los que se han estudiado hasta el momento. Estos extractos se preparan mediante la separación de porciones biológicamente activas presentes en los tejidos de plantas, con el uso de un solvente (alcohol, agua, mezcla de estos u otro solvente selectivo como el etanol) y se lleva a cabo un proceso de extracción adecuado.

Así, los estudios *in vitro* basados en la utilización de extractos han demostrado que la actividad de una solución salina de los extractos de plantas como *Z. officinale* (jengibre) (5 % y 2,5 %), *P. frutescens* (5 %), *W. japonica* (rábano picante)(5 %) y *A. sativum* (ajo) (5 %) son eficaces frente a *Anisakis* L₃, ya que las larvas pierden la movilidad a las ≤ 24 h con una mortalidad del 100 % (Goto y cols., 1990; Kasuya y cols., 1988).

Extractos como *Allium fistulosum* (cebolleta), *Petroselinum sativum* (perejil), *Raphanus sativu* (rábano), *Brassica oleracea* (col), *Spinacia oleracea* (espinaca), *Lachemilla angustata*, *Capsicum annuum* (pimiento), *Toona sinensis* y *Punica granatum* (granada) fueron ineficaces a las concentraciones señaladas (Tabla 3) (Valero y cols., 2015; Kasuya y cols., 1988; Navarro-Moll y cols., 2005).

Tabla 3: Ensayos de extractos *in vitro* frente *Anisakis* tipo I (Valero y cols., 2015).

Extractos	Concentración (p/v)	Mortalidad (%)	Tiempo (h)
<i>A. fistulosum</i>	5%	0,0	24,0
<i>A. sativum</i>	5%	100,0	10,8
<i>B. oleracea</i>	5%	0,0	24,0
<i>C. annuum</i>	5%	0,0	24,0
<i>L. angustata</i>	5%	0,0	24,0
<i>P. frutescens</i>	5%	100,0	3,1
<i>P. granatum</i>	100%	0,0	48,0
<i>P. sativum</i>	5%	0,0	24,0
<i>R. sativu</i>	5%	0,0	24,0
<i>S. oleracea</i>	5%	0,0	24,0
<i>T. sinensis</i>	5%	0,0	24,0
<i>W. japonica</i>	5%	100,0	5,6
<i>Z. officinale</i>	5%	100,0	3,2

4.1.2 Aceites esenciales (AE)

Los AE son productos farmacognósticos resultados de mezclas complejas naturales que se obtienen de vegetales por métodos físicos sencillos (como es el arrastre por corriente de vapor de agua) y que en su composición tienen compuestos de naturaleza monoterpénica, sesquiterpénica y fenilpropánica.

La eficacia de algunos AE también ha sido probada *in vitro*, por ejemplo la actividad del AE del Árbol del té (*Maleuca alternifolia*) que se obtiene por hidrodestilación. Este AE tiene actividad antiinflamatoria, antitumoral, bactericida, fungicida, antiviral e insecticida, además hay estudios que demuestran su efectividad frente a *Leishmania major* o *Trypanosoma brucei* (Mikus y cols., 2000; Gómez-Rincón y cols., 2014). También actúa inhibiendo la acetilcolinesterasa del parásito lo que le causa la incapacidad de permanecer en el hospedador y facilita su eliminación. Provoca una mortalidad del 100 % de las larvas a unas concentraciones entre 7-10 µl/ml después de 48 h de incubación (Gómez-rincón y cols., 2014).

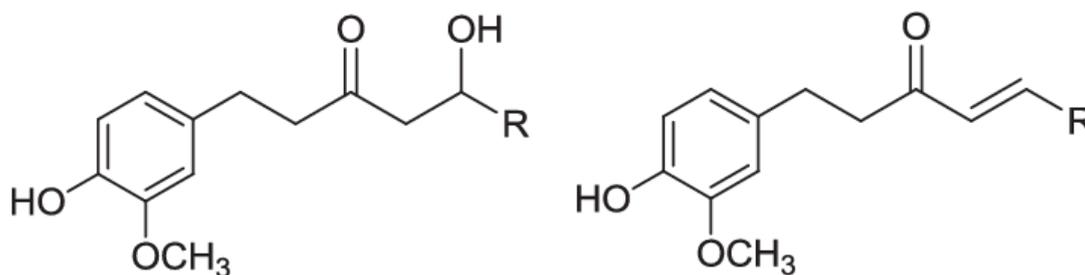
En cuanto a los AE de *M. piperita* y *Matricaria chamomilla* tienen un efecto larvicida del 100 % a las concentraciones de 250 y 187,5 µg/ml a las 4 h (Romero, 2014). Algunos autores citan aquellas plantas aromáticas cuyos AE tienen efectos similares entre las 4-48 h a una concentración de 125 µg/ml: *Cuminum cyminum* (comino), *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon winterianus*, *Litsea cubeba*, *Pelargonium graveolens* y *Origanum vulgare* (orégano). Algunos de ellos también son ampliamente utilizados como condimentos (Tabla 4) (Valero, 2006; González, 2001; Giarratana, 2014; Romero, 2014; Gómez-Rincón, 2014).

4.1.3 Compuestos fenólicos

En 1990 estudiaron algunos de los compuestos fenólicos de *Z. officinale* como el [6]-shogaol y el [6]-gingerol que tienen como mecanismo la destrucción del tracto digestivo y trastornos de la cutícula de las larvas de *Anisakis* tipo I. El [6]-shogaol se encuentra en mayor concentración en los jengibres conservados ya que este aumenta con el almacenamiento. Tiene una dosis mínima efectiva 62,5 µg/ml y una actividad hasta 20 veces más potente que el [6]-gingerol, además se ha demostrado que el [6]-shogaol es menos tóxico para ratones y que el [6]-gingerol es mutágeno (Fig. 6) (Goto y cols., 1990).

Tabla 4: Ensayos de aceites esenciales *in vitro* frente *Anisakis* tipo I (Valero, 2006; González, 2001; Giarratana, 2014; Romero, 2014; Gómez-Rincón, 2014).

AE	Concentración (µg/ml)	Mortalidad (%)	Tiempo (h)
<i>C. cyminum</i>	125	100,0	48
<i>C. citratus</i>	125	100,0	4
<i>C. martinii</i>	125	100,0	8
<i>C. winterianus</i>	125	100,0	48
<i>L. cubeba</i>	125	100,0	48
<i>P. graveolens</i>	125	100,0	48
<i>O. vulgare</i>	125	100,0	8
<i>M. chamomilla</i>	125	100,0	4
<i>M. piperita</i>	250	100,0	4
<i>M. alternifolia</i>	7-10	100,0	48

[6]-gingerol → R= (CH₂)₄CH₃[6]-shogaol → R= (CH₂)₄CH₃[10]-gingerol → R= (CH₂)₈CH₃[10]-shogaol → R= (CH₂)₈CH₃**Figura 6:** Estructuras de los compuestos fenólicos de extractos de *Z. officinale*, [6]-gingerol y [10]-gingerol (izquierda) y [6]-shogaol con [10]-shogaol (derecha).

Posteriormente en 2010 se hizo un estudio sobre estos compuesto y todos mostraron un efecto larvicida, particularmente el [10]-gingerol y el [10]-shogaol, (200 μ M) procando la muerte al 80-100 % de las larvas en un periodo de 48-72 h (Lin y cols., 2010).

4.1.4 Terpenos

Los terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y triterpenos) son metabolitos que se biosintetizan por la ruta del mevalonato.

Monoterpenos naturales como el geraniol, citronelol, citral, carvacrol, cuminaldehido y eugenol fueron estudiados para ver su actividad larvicida *in vitro*. Se obtuvo un efecto máximo del geraniol entre las 8-24 h con una dosis de 12,50 μ g/ml y el citronelol fue 100 % letal a las 4 h a una dosis de 12,50 μ g/ml pero no tuvo ningún efecto a ninguna de las otras dosis probadas (6,25 y 3,12 μ g/ml) (Hierro y cols., 2004).

El citral fue el que obtuvo mejores resultados a una dosis de 3,12 μ g/ml ya que alcanza casi el 100 % de la mortalidad de las larvas a las 48 h, el carvagol por otra parte es eficiente a las 4 h pero no tiene efecto a la dosis de 3,12 μ g/ml (Hierro y cols., 2004).

Tabla 5: Actividad de los monoterpenos a diferentes concentraciones frente a L₃ *Anisakis* tipo I (Hierro y cols., 2004).

DOSIS (μ g/ml)	TIEMPO (h)	MORTALIDAD (%)	MONOTERPENOS ACTIVOS
1,50	24	100	Geraniol, citronelol, citral, carvacrol, cuminaldehido.
6,25	24	>90	Citral y carvacrol
3,12	24	>90	Citral

El eugenol fue el único inactivo de este estudio y a la vez mostró una importante actividad contra los radicales libres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), este método se utiliza para determinar la capacidad antioxidante. Los radicales libres podrían ser perjudiciales para L₃ de *A. simplex* en cuyo caso que tenga gran actividad contra los radicales libres permite la supervivencia de la larva (Hierro y cols., 2004).

En cuanto a sus estructuras, el efecto del citral no es atribuible al carbonilo ya que el otro aldehído el cuminaldehído tiene una actividad mucho menor. Por otra parte el geraniol y el citronelol son estructuralmente muy parecidos pero tienen un comportamiento muy diferente (Fig. 7) (Hierro y cols., 2004).

La actividad del carvacrol si es atribuible al grupo fenólico que se une con grupos amina e hidroxilamina de las proteínas de la membrana y altera su permeabilidad (Fig. 8) (Hierro y cols., 2004).

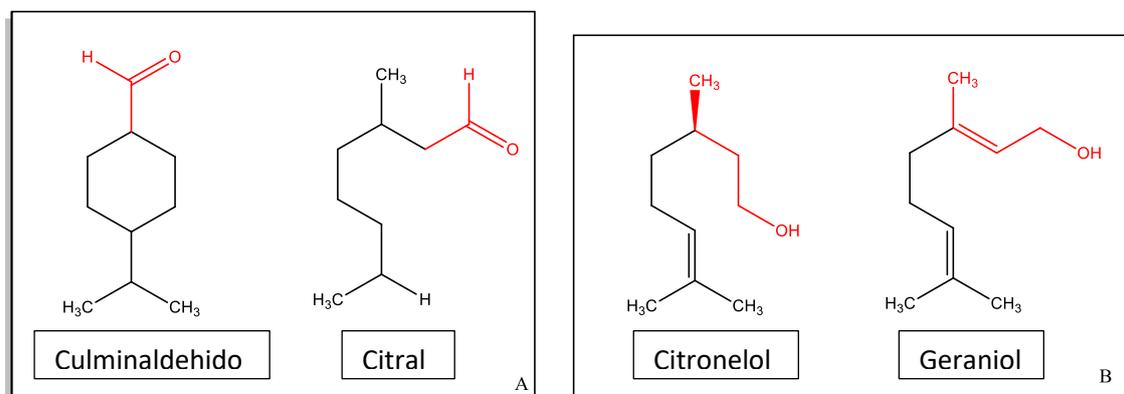


Figura 7: A: Estructuras del cuminaldehído y el citral, (rojo: grupo carbonilo que tienen ambas estructuras). B: Estructuras del citronelol y geraniol (rojo: las diferencias estructurales).

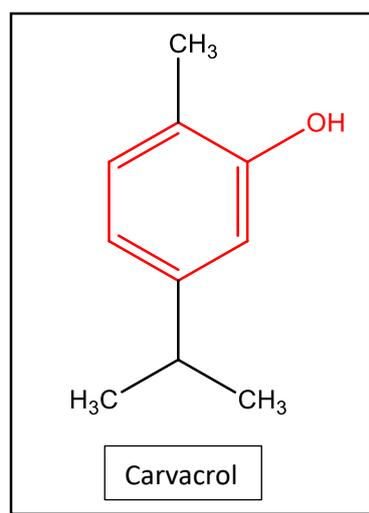


Figura 8: Estructura del Carvacrol (en rojo el grupo fenólico).

Las lesiones causadas por el citral en L₃ de *A. simplex* se extienden desde el esófago hasta el intestino con ruptura luminal y alteraciones cutáneas produciendo ondulaciones y el carvacrol causó la lisis de células excretoras y alteraciones cutáneas en la larva (Fig. 9).

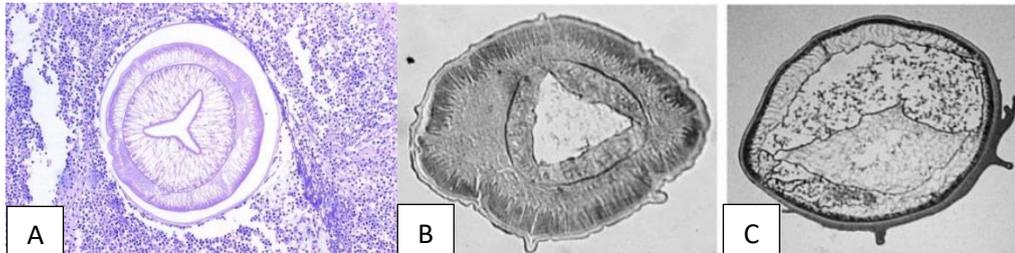


Figura 9: A: corte histológico de una larva de *Anisakis* (<http://www.vacunasyviajes.es/vacunasyviajes/Anisakiasis Atlas.html#1>), B y C: se aprecia el daño producido por dos monoterpenos en ensayos *in vitro*, B: citral, C: carvacrol (Hierro y cols., 2004).

Los resultados de los estudios *in vitro* de derivados monoterpénicos obtenidos de AE (α -pineno, β -pineno, ocimeno, mirceno, acetato de geranilo y cineol) fueron positivos para el α -pineno y el ocimeno ya que se obtuvo el 100 % letalidad a las 4 h a una dosis de 125 $\mu\text{g/ml}$ al igual que carvacrol, timol, citronelol y citral, mientras que el β -pineno y el mirceno fueron inactivos y el cineol necesitó 48 h para tener el mismo efecto. El timol, citral y ocimeno provocan daño histológico en la pared intestinal de las larvas y el α -pineno en los cordones laterales (Navarro y cols., 2008).

Los últimos estudios sobre sesquiterpenos han sido sobre el nerolidol, farnesol y elemol. De ellos solo el nerolidol y el farnesol provocaron la muerte de nematodos, alteraciones en la cutícula y ruptura de la pared intestinal de L₃ de *Anisakis* tipo I. Los tres fueron activos a dosis de 125 $\mu\text{g/ml}$ a las 4 h, a dosis de 62,5 $\mu\text{g/ml}$ el nerolidol tuvo el mismo efecto que el elemol y finalmente con una concentración de 31,2 $\mu\text{g/ml}$ el más efectivo fue el nerolidol y el elemol no tuvo efecto (Romero, 2014). Los tres alteraron la cutícula, mientras que el nerolidol también rompió la pared de la larva (Fig. 10). El nerolidol y farnesol tienen mayor efecto que otros monoterpenos investigados como el carvacrol, citral, citronelol, eucaliptol, geraniol, mirceno, perillaldehído, α y β -pineno, ocimeno y aldehído cumínico (Navarro-moll y cols., 2011).



Figura 10: Daño histológico *in vitro* del nerolidol, farnesol y elemol en las larvas L₃ de *Anisakis simplex* tipo I. Las flechas de líneas continuas indican las alteraciones cuticulares y la discontinua la alteración intestinal. **A:** nerolidol, **B:** farnesol, **C:** elemol (Navarro-moll y cols., 2011).

4.1.5 Enzimas

Los ensayos también han sido realizados con enzimas que se encuentran en plantas con propiedades antiinflamatorias ampliamente reconocidas como por ejemplo la papaína se obtiene del fruto de la papaya que a una concentración de 2,5 mg/ml tuvo efecto biocida de 90,9 % a las 24 h (Gómez-Mateos y cols., 2010), mientras que la actividad de otras enzimas como la bromelina enzima proteolítica del tallo o del fruto de *Ananas comusus* (piña) fue mucho menor 31,7 % (Valero y cols., 2015).

RESUMEN: Análisis de los trabajos sobre ensayos *in vitro*

Tras el estudio de los trabajos basados en ensayos *in vitro* con compuestos naturales frente a la anisakidosis, se han elaborados gráficos resumen donde se diferencian los diferentes tiempos de acción de cada uno de ellos (Fig. 11 y Fig. 12). En dichas gráficas se puede apreciar que de todos los **extractos** los que mejor perfil tienen son; *P. frutescens* y *Z. officinale*, de los **AE**; *M. chamomilla*, *M. piperita* y *C. citratus*. Dentro del grupo de los terpenos (125 µg/ml) no destaca ninguno. A dosis más bajas aunque tardan más tiempo en ejercer su efecto larvicida hay dos compuestos terpénicos con buen perfil el citral a 3,12 µg/ml y el carvagol a 6,25 µg/ml.

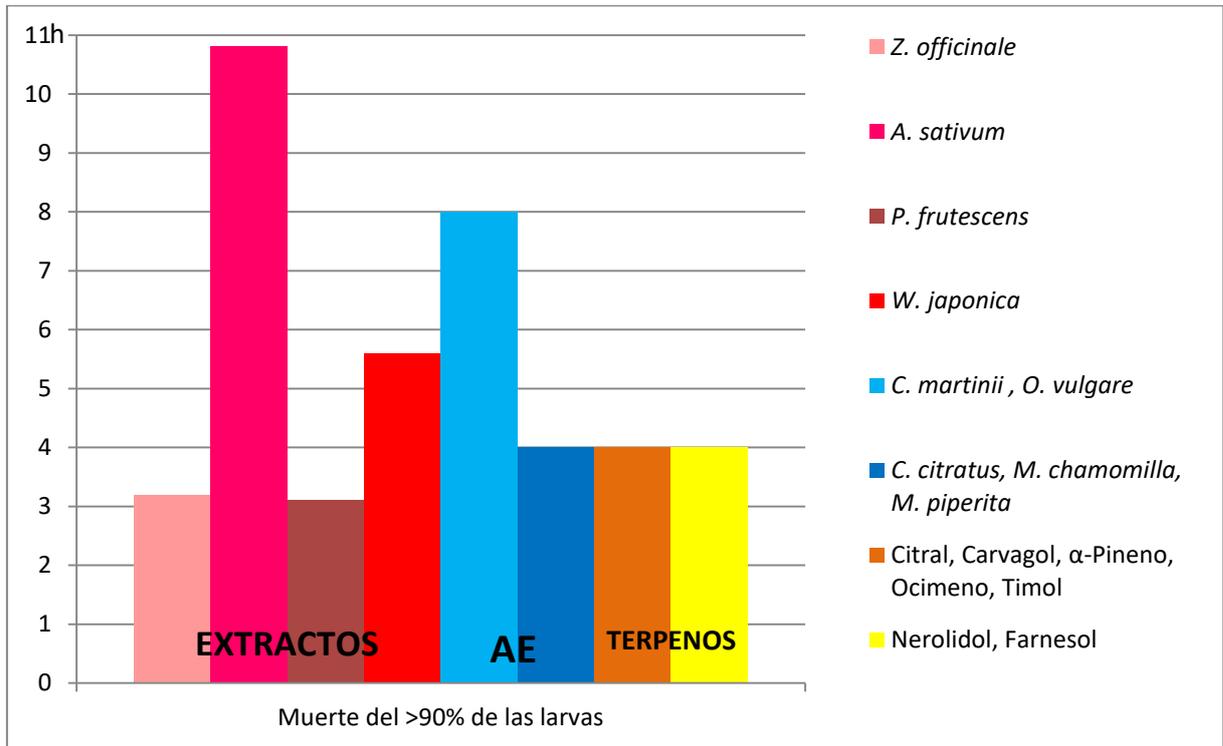


Figura 11: Compuestos ensayados que actúan antes de las 12 h causando la muerte a más del 90 % de las larvas. Las concentraciones más efectivas de los extractos fueron al 5 % (p/v) mientras que de los AE y terpenos 125 μ g/ml (excepto *M. alternifolia* 7-10 μ g/ml).

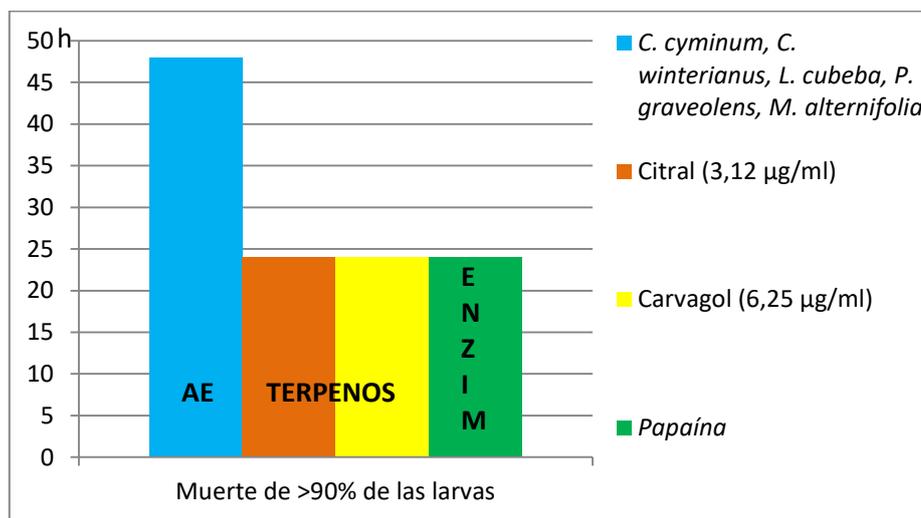


Figura 12: Efecto larvicida a las 24 o 48 h, AE a 125 μ g/ml, la enzima papaína a 2,5 mg/ml y dentro de los terpenos el citral a 3,12 μ g/ml y el carvagol a 6,25 μ g/ml.

4.2. *In vivo*

Son muchos autores los que han llevado a cabo estudios *in vivo* de compuestos naturales frente a la larva L₃ de *Anisakis* tipo I con el objetivo de demostrar la eficacia de aquellos productos experimentados *in vitro*.

Para llevar a cabo los ensayos *in vivo* primeramente se comprueba la pureza de los componentes mediante GC-MS (cromatógrafo de gases, combinado con un espectrómetro de masas). Solo se utilizan aquellos con una pureza de > 90 %, para poder tener unos resultados fiables. También hay que tener en cuenta la dosis que se debe utilizar, estas se eligen en base a estudios anteriores, por ejemplo; si son productos tóxicos se elige la dosis letal 50 (DL50) mientras que en los compuesto no tóxicos se toma como referencia las dosis calculadas para perillaldehído (Hierro y cols., 2006).

Para el estudio *in vivo* se utilizan 15 ± 1 ratas Wistar hembra que pesen alrededor de los 150 gramos, las cuales se infestan con 6 larvas de *A. simplex* tipo I mediante una sonda nasogástrica (Navarro-Moll y cols., 2011; Navarro y cols., 2008), estas larvas se obtienen de huéspedes como *Micromesistius poutassou* (bacaladilla). Se puede infestar de dos formas diferentes; que se infeste la rata solo con la larva o que a la vez se le introduzca por la sonda la larva y el compuesto que se está ensayando (Hierro y cols., 2006).

Finalmente para poder observar el daño histológico en las larvas se utilizan los colorantes tricrómicos de Masson con los que se diferencian el núcleo en color lila o marrón, el citoplasma y estructuras oxidadas en rojo y el colágeno en azul.

Durante estos estudios *in vivo* se comprueba también la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) ya que los AE pueden irritar las mucosas. Además es interesante saber si pueden provocar una reacción inflamatoria en el tracto gastrointestinal (Hierro y cols., 2006).

En estos ensayos se observan resultados positivos, como los conseguidos con el nerolidol, también se han obtenidos resultados no esperados de compuestos que *in vitro* son positivos pero *in vivo* no tienen perfiles tan buenos o viceversa y esto puede ser debido a la presencia de pH de 2,5 gástrico (Valero y cols., 2015).

4.2.1 Resultados positivos *in vivo*

Tres sesquiterpenos (nerolidol, farnesol y elemol) se ensayaron frente a un grupo control que llevaba como vehículo aceite de oliva. Cuando se observaron las lesiones de la pared gástrica en las ratas un 86,6 % tuvo lesiones en grupo control, un 40 % con el elemol y un 20 % las tratadas con farnesol y nerolidol. El nerolidol que es el componente principal del AE de *Strychnos spinosa* tiene un efecto biocida contra *T. brucei* y contra amastigotes y promastigotes de diferentes especies de *Leishmania* (Arruda y cols., 2005).

Se proponen dos mecanismos por los cuales pueden tener acción el nerolidol y el farnesol frente las larvas de *Anisakis* L₃: inhibición de la biosíntesis de compuestos de isopreno que son indispensables para que las proteínas de células eucariotas puedan glicosilarse y por otra parte el aumento de permeabilidad de la membrana, a pesar de esto, el nerolidol y el farnesol son menos activos que otros probados *in vivo* como citral o citronelol (Navarro-Moll y cols., 2011).

En el estudio histológico de compuestos ensayados se observó que afectó en mayor o menor medida al intestino del parásito produciendo rotura de la pared interna (citral y citronelol), ensanchamiento de los lúmenes intestinales (culminaldehído y carvacrol) y alteración de la cutícula del parásito con proyecciones en forma de espinas (carvacrol), rugosidad o deformaciones (citral y citronelol) (Fig. 13) (Hierro y cols., 2006).

En el modelo de ensayo en el cual la infestación y el tratamiento se dan ambos a tiempo cero se consiguieron recuperar el 85,90 % de las larvas muertas con el citral y ninguna de las ratas sufrieron hemorragias, un 67,53 % con el citronelol y con respecto al control con aceite de oliva todas las larvas se recuperaron vivas y el 92,86 % de las ratas sufrieron hemorragias. En los otros modelos en los cuales se dio el tratamiento dos horas después de la infestación, las larvas consiguieron desarrollar su patogenicidad en las ratas y provocaron hemorragias.

La lipofilia de los monoterpenos provoca cambios estructurales en las membranas, modifica su permeabilidad y a veces puede causar hinchazón (Hierro y cols., 2006), sin embargo estas alteraciones no justifican el daño producido contra el parásito por lo que esto podría indicar que es cierta la hipótesis de que estos monoterpenos actúan dañando el sistema nervioso del parásito (Kasuya y cols., 1990).

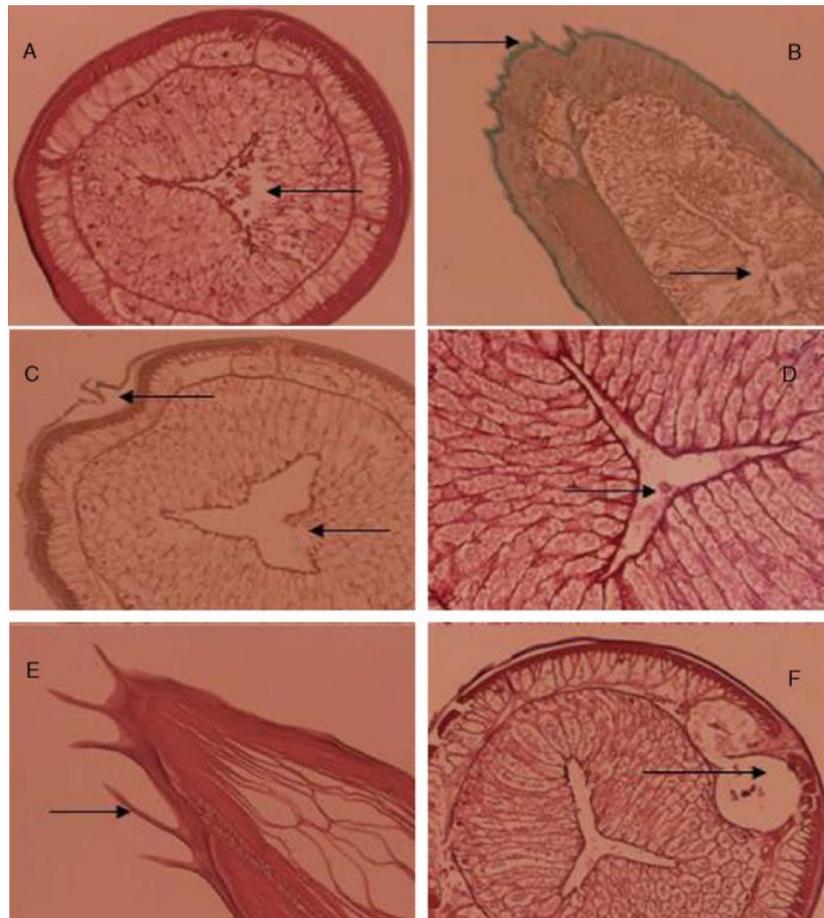


Figura 13: Daño producido por derivados monoterpénicos *in vivo* en *A. simplex* tipo I L3. **A y B:** citral, **C:** citronelol, **D:** cuminaldehído, **E:** carvacrol, **F:** carvacrol (Hierro y cols., 2006).

El estudio de los componentes del AE de *M. piperita* (mentol, mentona y acetato de mentona) mostraron mayor actividad que el albendazol, con la diferencia de que ninguna de las ratas tratadas con *M. piperita* tuvo lesiones en el tracto gastrointestinal, mientras que con el albendazol el 46,7 % presentaban lesiones en el estómago (Romero y cols., 2014).

4.2.2 Resultados no esperados *in vivo*

En 2008 dos de los monoterpenos que mostraron mayor actividad *in vitro* se ensayaron *in vivo*, el α -pineno y el ocimeno. En ambos casos no se encontraron larvas fijas en la cavidad gástrica o peritoneal a pesar de las lesiones, lo que indica que las larvas fueron liberadas después de producir la lesión (Navarro y cols., 2008). Los resultados del α -pineno no fueron los esperados ya que tan solo el 40 % de las larvas no tenían movilidad a diferencia de los

resultados *in vitro* 92 %. Por otra parte el ocimeno que mostró mayor actividad *in vitro* que el α -pineno, *in vivo* tuvo peores resultados, 11 de las 15 ratas tratadas tenían lesiones gástricas y ninguna larva había quedado inmóvil, además de que se observó migración de un 10 % de las larvas a la cavidad peritoneal (Navarro y cols., 2008). Es posible que la diferencia de actividad se deba a que el medio en la cavidad gástrica pueda influir en su capacidad de acción, la estructura del α -pineno es cíclica y la del ocimeno está abierta lo que teóricamente favorece la reducción de su doble enlace (Fig. 14) (Navarro y cols., 2008).

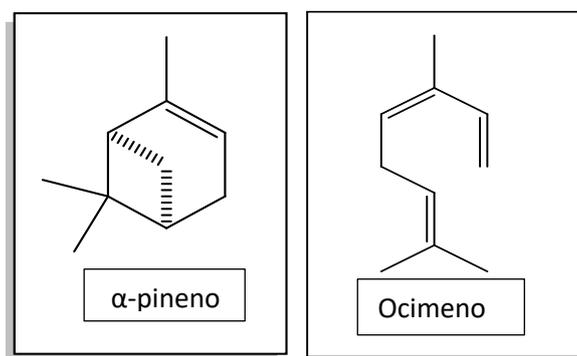


Figura 13: Estructuras de dos monoterpenos. **Izquierda:** α -pineno, **derecha:** el ocimeno.

El tratamiento del α -pineno y ocimeno inhiben de alguna manera la fijación de *A. simplex* tipo I pero en menor grado que el timol, geraniol, citral y citronelol (Navarro y cols., 2008), con los cuales no se encontró lesiones en los animales tratados y la tasa de mortalidad de las larvas fue de un 92,8 % (Hierro y cols., 2004; Navarro-Moll y cols., 2011; Hierro y cols., 2006).

En el estudio *in vivo* de AE de *M. chamomilla* y *M. piperita* se obtuvieron buenos resultados ya que tan solo 2,2 % de las ratas presentaba lesiones en la mucosa gástrica cuando se trataban con AE de manzanilla y ninguna lesión con AE de menta a diferencia del control que presentaba lesiones en el 93,3 % (Romero y cols., 2012).

A continuación se muestra una recopilación de diferentes compuestos naturales ensayados *in vivo* y las lesiones que han producido en las ratas (Tabla 6).

Tabla 6: Compuestos naturales, las concentraciones utilizadas y el porcentaje de lesiones en ratas infestadas con L₃ de *Anisakis* tipo I que presentaron lesiones (Hierro y cols., 2006; Valero y cols., 2006; Hierro y cols., 2004; Navarro y cols., 2008).

Componentes	Concentración	Lesión (%)
Perillaldehido	46,9 mg/ml	0
Geraniol	46,9 mg/ml	0
Citronelol	46,9 mg/ml	0
Citral	46,9 mg/ml	0
Carvacrol	9,5 mg/ml	28,6
Timol	17,3 g/ml	0
α - pineno	46,9 mg/ml	20,0
Ocimeno	46,9 mg/ml	73,3

4.2.3 Sinérgia

La sinérgia es una forma de interacción que da como resultado efectos combinados o aditivos con la administración de dos o más compuestos, los resultados que se obtienen son mayores que aquellos que podrían haberse alcanzado si alguno de los compuestos se hubiera administrado solo. En varios de los estudios revisados se hace referencia a que la actividad de los compuestos naturales puede ser debida al efecto sinérgico de varios de los componentes. En este apartado se resumen las citas que hay a cerca de ellos.

Los efectos de los compuestos de *Z. officinale*: [6]-gingerol y [6]-shogaol durante su estudio dieron lugar a una investigación sobre su actividad sinérgica. 50 μ g/ml de [6]-gingerol no tuvo ningún efecto en la larva pero al añadir 2,5 μ g/ml de [6]-shogaol pararon los movimientos espontáneos de todas ellas, la eficacia letal aumentó (Goto y cols., 1990). Navarro también hacía alusión a la necesidad de investigar in vivo la sinergia entre varios monoterpenos como el α -pineno, el ocimeno y el cineol (Navarro y cols., 2008).

Otros estudios *in vivo* sobre *M. chamomilla* sugirieron que la actividad larvicida del AE de manzanilla podía ser debida a la acción sinérgica de sus diferentes componentes (camazuleno y α -bisabolol). El camazuleno fue ineficaz de forma aislada y el α -bisabolol tuvo mejores resultados *in vitro* que el AE pero menos *in vivo*. Ya que en el AE se encuentra la mezcla de

ambos, esto lleva a pensar que puede existir un efecto sinérgico (Romero y cols., 2012). También en algunos estudios se descartan compuestos como agente principal biocida pero que puede contribuir indirectamente o sinérgicamente a la acción larvicida como es el caso del terpinen-4-ol que se encuentra en el AE del árbol del té (Gómez- Rincón y cols., 2014).

4.2.4 Futuras investigaciones sobre compuestos naturales

De acuerdo con los resultados obtenidos en los diferentes estudios sobre compuestos naturales frente a la L₃ de *A. simplex* tipo I, los autores aconsejan cuáles son los mejores candidatos para futuras investigaciones como agente biocidas. De tal manera se facilita la búsqueda de compuestos que sean útiles y sirvan como tratamientos de esta parasitosis.

- Citral y carvagol (Hierro y cols., 2004)
- Derivados terpénicos; geraniol, citral, citronelol y timol (Hierro y cols., 2006; Valero y cols., 2006; Hierro y cols., 2004)
- Nerolidol y farnesol (Navarro-Moll y cols., 2011)
- AE de menta y sus componentes; metol, mentona y acetato de metilo (Romero y cols., 2012)
- El perillaldehido (Valero y cols., 2015).

5. CONCLUSIONES

Este trabajo de revisión bibliográfica sobre tratamientos naturales frente a la anisakidosis nos lleva a las siguientes conclusiones:

1. Los compuestos naturales ha mostrado ser una alternativa terapéutica a los actuales tratamientos frente a la anisakidosis.
2. Hay diferencias importantes entre la actividad de los compuestos *in vitro* e *in vivo* pudiendo ser debido a los cambios de pH en la cavidad gástrica.
3. De todos los compuestos ensayados *in vivo* el perillaldehído fue el que mejor resultado tuvo teniendo en cuenta que no se encontraron lesiones en la mucosa de los animales y que su capacidad larvicida fue del 91 %.
4. La sinergia entre compuestos naturales como los componentes de *M. chamomilla*, *Z. officinale* y *M. alternifolia* pueden tener un papel importante en la actividad larvicida frente a *A. simplex* tipo I lo cual abre campos nuevos de investigación.
5. El AE de menta y sus componentes y derivados terpénicos como: geraniol, citral, carvagol, citronelol, timol, nerolidol y farnesol, han tenido prometedores resultados en sus estudios evitando la infección del animal y la aparición de lesiones, a la vez que no resultaban tóxicos a las dosis utilizadas.
6. Los radicales libres podrían ser perjudiciales para la supervivencia de la larva L₃ por lo que se pueden plantear nuevos estudios para comprobar esta hipótesis.
7. Se pueden plantear estudios sobre la capacidad profiláctica del citral ya que hay ensayos en los que evita la patogenicidad de L₃ de *A. simplex* tipo I en modelos en los que infestación y tratamiento se dan a tiempo cero.

6. BIBLIOGRAFÍA

- **Arizono N**, Yamada M, Tegoshi T, Yoshikawa M. *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii*: biological characteristics and pathogenetic potential in human anisakiasis. *Foodborne Pathog Dis.* 2012; 9(6): 517-521.
- **Arruda DC**, D Alexandri FL, Katzin AM, Uliana SR. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. *Antimicrobial Agents Chemotherapy.* 2005; 49: 1679– 1687.
- **Audicana MT**, Kennedy MW. *Anisakis simplex*: from Obscure Infectious Worm to Inducer of Immune Hypersensitivity. *Clin. Microbiol. Rev.* 2008; 21(2): 360–79.
- **Berland B**. Nematodes from some norwegian marine fishes. *Sarsia.* 1961; 2(1): 1-50.
- **Cordero del Campillo M**, Rojo Vázquez FA. *Parasitología general.* Madrid: McGraw-Hill España; 2007.
- **Chai J-Y**. Ash & Orihel's Atlas of Human Parasitology. 5ªed. The Korean Journal of Parasitology; 2007.
- **Davey J**. A revision of the genus *Anisakis dujardin*, 1845 (nematoda: Ascaridata). *Helminthology.* 1971; 45(11): 51-72.
- **De Ley P**, Blaxter M. A new system for Nematoda: combining morphological characters with molecular trees, and translating clades into ranks and taxa. In Cook R, Hunt DJ, editors, *Nematology Monographs and Perspectives.* Vol. 2. Leiden: E.J. Brill; 2004. p. 633-653.
- **Dziekonska-Rynko J**, Rokicki J, y Jablonowski Z. Effects of ivermectin and albendazole against *Anisakis simplex* in vitro and in guinea pigs. *Journal of Parasitology.* 2002; 88(2): 395-398.
- **Domínguez Ortega, J**; Martínez-Cócera, C. Guía de actuación en patología producida por *Anisakis*. *Alergología e Inmunología Clínica.* 2000; 15: 267-272.
- **EFSA** European Food Safety Authority. Scientific opinion on risk assessment of parasites in fishery products, EFSA panel on biological hazards (BIOHAZ), European Food Safety Authority. *EFSA Journal*; 2010. Serie de informes técnicos: 1543.
- **Gago L**, García E, Fernández JL, González JM. Detection and Inactivation Methods of *Anisakis simplex* and Diseases that this parasite produces. *Asociación ADEPESCA*; 2008.

- **Giarratana** F, Muscolino D, Beninati C, Giuffrida A, Panebianco A. Activity of *Thymus vulgaris* essential oil against *Anisakis* larvae. *Exp Parasitol*. 2014; 142: 7-10.
- **Gómez** B, Lasa E, Arroabarren E, Garrido S, Anda M, Tabar AI. Allergy to *Anisakis simplex*. *An. Sist. Sanit. Navar*. 2003; 26(2): 25–30.
- **Gómez-Mateos** M, Valero A, Morales-yuste M, Martín-sánchez J. International Journal of Food Microbiology Molecular epidemiology and risk factors for *Anisakis simplex* s.l. infection in blue whiting (*Micromesistius poutassou*) in a confluence zone of the Atlantic and Mediterranean: Differences between *A. simplex*. *Int. J. Food Microbiol*. Elsevier B.V. 2016; 232: 111–6.
- **Gómez-Mateos** M, Romero MC, Polo-Vico R, Navarro MC, Valero A. Actividad larvica de la papaina frente a L3 de *Anisakis* tipo I. IX Cong Cienc Vet Biomed. Madrid: España; 2010
- **Gómez-Rincón** C, Langa E, Murillo P, Valero MS, Berzosa C, López V. Activity of Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Essential Oil against L3 Larvae of *Anisakis simplex*. *BioMed Research International*; 2014.
- **González** P, Hierro I, Pérez P, González P, Cabo MM, Valero A, y cols. Actividad de aceites esenciales de los géneros *Litsea* y *Cymbopogon* frente a las larvas de *Anisakis simplex* s.l. In Proceedings of the I Congreso Nacional Cienc Tecn de los alimentos. Granada; 2001.
- **Goto** C, Kasuya S, Koga K, Ohtomo H, y Kagei N. Lethal efficacy of extract from *Zingiber officinale* (traditional Chinese medicine) or [6]-shogaol and [6]-gingerol in *Anisakis* larvae *in vitro*. *Parasitology research*. 1990; 76(8): 653-656.
- **Hierro** I, Valero A, y Navarro MC. In vivo larvicidal activity of monoterpenic derivatives from aromatic plants against L3 larvae of *Anisakis simplex* s.l. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*. 2006; 13(7): 527-531.
- **Hierro** I, Valero A, Pérez P, González P, Cabo MM, Montilla MP, et al. Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* s. l. L3 larvae. 2004; 77–82.
- **Hierro** I, Valero A, González de Selgas JM, Navarro MC. Actividad larvica del timol frente a *Anisakis simplex* s.l. *Rev Fitoter*. 2004; 4(2): 175-176.
- **Karl** H, Roepstorff A, Huss HH, y Bloemsma B. Survival of *Anisakis* larvae in marinated herring fillets. *International Journal of Food Science and Technology*. 1994; 29(6): 661-670.

- **Kasuya S**, Goto C, y Ohtomo H. Studies on prophylaxis against *anisakiasis* a screening of killing effects of extracts from foods on the larvae. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases. 1988; 62(12): 1152-1156.
- **Klimpel S**, Palm HW, Rucker S, y Piatkowski U. The life cycle of *Anisakis simplex* in the norwegian deep (northern north sea). Parasitology Research. 2004; 94(1): 1-9.
- **Kwee HG**, y Sautter RL. Anisakiasis. American Family Physician. 1987; 36(2): 137- 140.
- Lin RJ, Chen CY, Lee JD, Lu CM, Chung LY, Yen CM. Larvicidal constituents of *Zingiber officinale* (ginger) against *Anisakis simplex*. Planta Med. 2010; 76(16): 1852-1858.
- **Lorenzo S**, Iglesias R, Leiro J, Ubeira F M, Ansotegui I, Garcia M, y Fernández de Corres L. Usefulness of currently available methods for the diagnosis of *Anisakis simplex* allergy. Allergy. 2000; 55(7): 627-633.
- **Mattiucci S**, Nascetti G. Capitulo 2. Advances and Trends in the Molecular Systematics of *Anisakis* Nematodes with Implications for their Evolutionary Ecology and Host-Parasite Coevolutionary Processes. Parasitology BT-A in, editor. Academic Press; 2008. p.47–148.
- **Mattiucci S**, Nascetti G, Cianchi R, Paggi L, Arduino P, Margolis L, Bullini L. Genetic and ecological data on the *Anisakis simplex complex*, with evidence for a new species (nematoda, ascaridoidea, anisakidae). The Journal of Parasitology. 1997; 83(3): 401-416.
- **Mattiucci S**, Nascetti G, Dailey M, Webb S. C, Barros N. B, Cianchi R, y Bullini L. Evidence for a new species of *Anisakis dujardin*, 1845: Morphological description and genetic relationships between congeners (nematoda: Anisakidae). Systematic Parasitology. 2005; 61(3): 157-171.
- **Mattiucci S**, Paggi L, Nascetti G, Abollo E, Webb SC, Pascual S et al. Genetic divergence and reproductive isolation between *Anisakis brevispiculata* and *Anisakis physeteris* (Nematoda: Anisakidae)s. International Journal for Parasitology. 2001; 31(1): 9-14.
- **Mattiucci S**, Paggi L, Nascetti G, Portes Santos C, Costa G, Di Benedetto A. P, Bullini L. Genetic markers in the study of *Anisakis typica* (diesing, 1860): Larval identification and genetic relationships with other species of *Anisakis dujardin*, 1845 (nematoda: Anisakidae). Systematic Parasitology. 2002; 51(3): 159-170.
- **Mikus J**, Harkenthal M, Steverding D, and Reichling J. In vitro effect of essential oils and isolated mono- and sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. Planta Médica. 2000; 66(4): 366–368.

- **Molina-Fernández D.** *Anisakis* spp. en sardinas (*Sardina pilchardus*) en las costas sur y norte españolas: epidemiología molecular. (Trabajo Final de Máster), Universidad de Granada, Granada; 2013.
- **Molina-García A,** y Sanz P. *Anisakis simplex* larva killed by high-hydrostatic-pressure processing. *Journal of Food Protection.* 2002; 65(2): 383-388.
- **Moore D,** Girdwood R, y Chiodini P. Treatment of anisakiasis with albendazole. *The Lancet.* 2002; 360: 54.
- **Muñoz Batet C** Anisakidosis y anisakiosis. Servei de Microbiologia. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. 2002 Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/parasitologia/Anisakiosis.pdf>
- **Navarro MC,** Noguera MA, Romero MC, Montilla MP, Gonzalez de Selgas JM, y Valero A. *Anisakis simplex* s.l.: Larvicidal activity of various monoterpenic derivatives of natural origin against L3 larvae in vitro and in vivo. *Experimental Parasitology.* 2008; 120(4): 295.
- **Navarro-Moll MC,** Carmen M, Pilar M, Valero A. *Experimental Parasitology* In vitro and in vivo activity of three sesquiterpenes against L3 larvae of *Anisakis* type I. 2011; 127: 405.
- **Navarro-Moll MC,** Abatoy AH, Hierro I, Ruiz-Negrillo A, Romero MC, Montilla P. In vitro and in vivo activity against *Anisakis simplex* s.l. L3 of an extract proceeding from the subterranean parts of *Curcuma longa*. *Acta Parasitol Port.* 2005; 12(1–2): 526.
- **Navarro-Moll MC,** Carmen M, Pilar M, Valero A. *Experimental Parasitology* In vitro and in vivo activity of three sesquiterpenes against L3 larvae of *Anisakis* type I. 2011; 127: 405–8.
- **Orecchia P,** Paggi L, Mattiucci S, Smith J. W, Nascetti G, y Bullini L. Electrophoretic identification of larvae and adults of *Anisakis* (ascaridida: Anisakidae). *Journal of Helminthology.* 1986; 60(4): 331-339.
- **Oshima T.** *Anisakis* and anisakiasis in Japan and adjacent area. *Progress of Medical Parasitology in Japan IV.* 1972; 4: 305-393.
- **Paggi L,** Nascetti G, Webb SC, Mattiucci S, Cianchi R, y Bullini L. A new species of *Anisakis dujardin*, 1845 (nematoda, anisakidae) from beaked whales (ziphiidae): Allozyme and morphological evidence. *Systematic Parasitology.* 1998; 40(3): 161-174.
- **Pardo-Gandarillas MC,** Lohrmann KB, Valdivia AL, Ibáñez CM. First record of parasites of *Dosidicus gigas* (d' Orbigny, 1835) (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Humboldt Current system off Chile. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 2009; 44(2): 397–408.

- **Pontone S**, Leonetti G, Guaitoli E, Mocini R, Manfredelli S, Catania A, et al. Should the host reaction to anisakiasis influence the treatment? different clinical presentations in two cases. *Revista Española de Enfermedades*. 2012; 104(11): 607-610.
- **Rello Yubero FJ**, Adroher Auroux FJ, Valero-López A. Anisákidos parásitos de peces comerciales. Riesgos asociados a la salud pública. *An. la Real Acad. Ciencias Vet. Andalucía Orient*. 2004; 17(1): 173–98.
- **Rodero M**, Daschner A, Cue C. The Anisakis allergy debate: does an evolutionary approach help? 2012; 28(1).
- **Romero MC**. Capacidad infectiva de las larvas L3 de *Anisakis* y búsqueda de nuevos compuestos naturales activos frente a la anisakiosis. Universidad de Granada, Departamento de Parasitología y Departamento de Farmacología; 2014.
- **Romero MC**, Navarro MC, Martín-Sánchez J, Valero A. Peppermint (*Mentha piperita*) and albendazole against Anisakiasis in an animal model. *Trop Med Int Health*. 2014; 19(12): 1430-1436.
- **Romero MC**, Valero A, Martín-Sánchez J, Navarro-Moll MC. Activity of *Matricaria chamomilla* essential oil anisakiasis. *Phy- tomedicine*. 2012; 19(6): 520-523.
- **Shamsi S**, Butcher AR. First report of human anisakidosis in Australia. 2011; 194(4): 199.
- **Shiraki T**. Larval nematodes of family anisakidae (nematoda) in the northern sea of Japan as a causative agent of eosinophilic phlegmone or granuloma in the human gastrointestinal tract. *Acta Medica et Biologica*. 1974; 22: 57-98
- **Smith JW**, y Wootten R. *Anisakis* and anisakiasis. *Advances in Parasitology*. 1978; 16: 93-163.
- **Terán Angel G**, Rojas J. Anisakidosis, inflamación e hipersensibilidad. 2012; 1(1): 30–7.
- **Valero A**, Hierro I, Gozález P, Montilla P, Navarro MC. Activity of various essential oils and their main components against L3 *Anisakis simplex* s.l. In: Govil JN, Singh VK, Arunachalam P, editors. *Recent progress in medicinal plants. Drug development from molecules*. Houston: Studium Press. 2006; 11: 247-265.
- **Valero A**, Romero MC, Hierro I, Navarro MC. Natural products: Perspectives in the pharmacological treatment of gastrointestinal anisakiasis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2015; 8(8): 612–617.

- **Wooten** R y **Cann** C. Round worms in fish Food and Drug Administration. (2001). [Consultado 17 de Mayo de 2017] Disponible en: <http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5951E/x5951e00.htm>