

EFFECT OF AQUEOUS EXTRACTS OF GARLIC (*Allium sativum*) ON THE MORPHOLOGY AND INFECTIVITY OF A VENEZUELAN ISOLATE OF *Trypanosoma evansi*

M. S. Rossi S.^{a,b,*}, A.A. Boada-Sucre^c, A. Sosa^a, L. Di Stefano^a, J.P. Rodríguez^c, M.C. Pérez^a, G. Payares^d

^aSección de Investigación en Patología Ultraestructural y Biología Molecular, Instituto Anatomopatológico José A. O'Daly, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

^bUnidad de Toxoplasmosis y Protozoosis, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

^cLaboratorio de Microscopía Electrónica, Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos, Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez, Caracas, Venezuela.

^dLaboratorio de Inmunología y Quimioterapia, Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

*Corresponding author: Marcelo Rossi, E-mail: mrossi@isciii.es, phone: 0034673818996.

Recibido: Agosto 2013. Aprobado: Noviembre

Publicado: Enero 2013.

ABSTRACT

Trypanosoma evansi is the causative agent of Surra and the trypanosomiasis of domestic and wild animals and in Venezuela has a strong impact on livestock production. The objective of this study was to evaluate at parasitological and morphological level, the effect of aqueous extracts (AE) of garlic on *T. evansi*. For this garlic AE 20% was prepared and mixed with *T. evansi* infected blood from mice (10^8 trypanosomes/mL) to final concentrations of 2.5, 5 and 10%. The suspensions and controls were incubated at 37 °C for 1 hour and aliquots of them were used for the inoculation (500 trypanosomes/g of body weight) of mice (n=10) and for the scanning electron microscopy (SEM). The observations were made in a scanning electron microscope Hitachi S-4500 and parasitemia and survival of experimental and control groups were evaluated for 32 days. The 2.5% AE increased the prepatent period of infection, from 3 days (control group) to 10 days (experimental group). All of the control animals died by day 10, and 20% of those treated with 2.5% AE survived the infection from day 17 post-infection. The neutralization of infectivity by 5% and 10% AE was complete. The 10% AE produced contraction of the parasite, folding in on itself and surface alterations (pores and roughness). These results suggest that garlic AE modify *T. evansi* morphology and exhibits trypanocidal activity at 5-10% and trypanostatical at 2.5%.

Keywords: *Trypanosoma evansi*, Garlic, Infectivity, SEM, Morphology.

EFFECTO DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE AJO (*Allium sativum*) SOBRE LA MORFOLOGÍA E INFECTIVIDAD DE UN AISLADO VENEZOLANO DE *Trypanosoma evansi*

RESUMEN

Trypanosoma evansi es responsable de la tripanosomiasis equina, de animales domésticos y silvestres, y en Venezuela tiene un fuerte impacto sobre la producción pecuaria. El objetivo del trabajo, fue evaluar a nivel parasitológico y morfológico, el efecto de los extractos acuosos (EA) de ajo sobre *T. evansi*. Para ello se preparó un EA de ajo al 20%, que se mezcló con sangre de ratón infectada con *T. evansi* (10^8 tripanosomas/mL) hasta concentraciones finales del 2,5, 5 y 10%. Las suspensiones y sus controles se incubaron a 37°C durante 1 hora, y alícuotas de las mismas fueron inoculadas (500 tripanosomas/g de peso corporal) a ratones (n=10) y preparadas para la microscopía electrónica de barrido (MEB). Las observaciones se efectuaron en un microscopio electrónico de barrido Hitachi S-4500 y la sobrevivencia y parasitemias de los grupos experimentales y control, fueron evaluadas durante 32 días. El EA 2,5% incrementó el periodo prepatente de la infección, desde 3 días (grupo control) hasta 10 días (grupo experimental). El 100% de los animales del grupo control falleció el día 10, y un 20% de los tratados con el EA 2,5% sobrevivió a la infección a partir del día 17 post-infección. La neutralización de la infectividad por los EA 5% y 10% fue total. El EA 10% determinó la contracción del parásito, el plegamiento sobre sí mismo y alteraciones superficiales (poros y rugosidades). Las evidencias sugieren que los EA de ajo modifican la morfología de *T. evansi* y exhiben actividad tripanocida al 5-10% y tripanostática al 2,5%.

Palabras claves: *Trypanosoma evansi*, Ajo, Infectividad, MEB, Morfología

INTRODUCCION

El *Trypanosoma evansi* (KINETOPLASTIDA, TRYPANOSOMATIDAE) es una especie de tripanosoma africano que cuenta con una amplia distribución geográfica y rango de hospedador, distribuyéndose por Centro- y Sudamérica, Norte de África, Europa, Oriente medio, Asia y Oceanía, infectando una gran variedad de mamíferos domésticos y silvestres [1]. En Venezuela, la prevalencia de la infección en equinos [2,3] y chigüires o capibara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) [4,5], así como la infección natural de caninos [6] e infección experimental, de bovinos [7,8] y caprinos [9] ha sido documentada.

Entre los años 2005 y 2006, el reporte de un caso humano [10] y los estudios seroepidemiológicos realizados en la India [11], han alertado a la comunidad científica sobre el posible riesgo del ser humano a la infección y la emergencia de la infección por *T. evansi* como una nueva zoonosis.

A pesar de que en Venezuela no se cuenta con estadísticas sobre los costos y pérdidas económicas que la tripanosomiasis animal acarrea a la producción pecuaria, se estima que la infección por *T. evansi*, *Trypanosoma vivax*, *Anaplasma marginale*, *Babesia* sp y el virus de la encefalitis equina, genera grandes pérdidas en términos de la producción de proteína animal (carne y leche) [12], reproducción de los rebaños y energía para la tracción animal, útil en las labores de campo de las explotaciones extensivas de ganado bovino [13,14].

En Venezuela el tratamiento de la tripanosomiasis de tipo africano se fundamenta en el uso de tres fármacos clave: las Pentamidinas para la quimioprofilaxis, la Suramina y Quinapiramina para el tratamiento de los estadios tempranos de la enfermedad y la Melarsomina para el tratamiento de los estadios avanzados con compromiso del sistema nervioso central. El aceturato de diminaceno y el cloruro de isometamidio, eficaces en el tratamiento de las infecciones por *T. vivax*, son poco eficaces sobre *T. evansi* por carecer de efecto profiláctico y eliminarse rápidamente [3].

Estos hechos han estimulado a diferentes grupos de investigación a la búsqueda de nuevos fármacos tripanocidas, por la vía de desarrollos basados en enfoques racionales o empíricos. Los primeros implican la identificación y validación previa de blancos moleculares (enzimas, rutas metabólicas, procesos celulares, etc.) susceptibles de ser bloqueados en los parásitos, mientras que los segundos se fundamentan en el desarrollo de nuevos fármacos, a partir de extractos de productos naturales que exhiban alguna actividad biológica de interés frente a la infección. Entre estos últimos, se tienen aquellos basados en la identificación de productos herbales [15].

Entre los productos herbales utilizados en el tratamiento de enfermedades, el ajo (*Allium sativum*:LILIACEA), es una planta bulbosa ampliamente utilizada como alimento, que también ha sido empleada desde hace más de 4.000 años por la medicina tradicional, en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, neo-plásicas e infecciosas, así como en la profilaxis y tratamiento de enfermedades del tracto gastrointestinal, disentería, fiebre tifoidea, cólera y tuberculosis [16]. En el campo de la tripanosomiasis y leishmaniasis, los productos derivados de este bulbo, han demostrado ser efectivos frente a la infección experimental por *Trypanosoma brucei* [16] y proliferación *in vitro* de *Trypanosoma cruzi* [17] y *Leishmania* [18].

Por estas razones y sobre la base de las estrechas relaciones filogenéticas existentes entre *T. evansi*, *T. brucei* y otras especies de la familia Trypanosomatidae [19], así como los resultados de pruebas moleculares recientes, que apuntan al hecho de que *T. evansi* y *Trypanosoma equiperdum*, son cepas de *T. brucei* que tuvieron su origen en procesos mutágenicos (pérdida parcial o total del ADN del cinetoplasto) ocurridos sobre este último durante la evolución [20]. El objetivo del presente trabajo fue el de evaluar el efecto que tienen los extractos acuosos de ajo sobre la infectividad, morfología

y el curso de la infección experimental de *T. evansi* en ratones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Para el mantenimiento de los parásitos en el laboratorio se utilizaron ratas albinas heterocigóticas de la cepa Sprague-Dawley. En la evaluación del efecto de los extractos de acuosos de ajo sobre la infectividad y curso de la infección experimental con *T. evansi*, se utilizaron un total de 100 ratones albinos heterocigóticos de la cepa NMRI, adquiridos en el bioterio del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) y mantenidos en el bioterio del Instituto de Biología Experimental (IBE) de la Universidad Central de Venezuela. Los mismos fueron alimentados *ad libitum* con Ratarina[®] y agua filtrada y ozonizada.

Parásitos

En el desarrollo del trabajo se utilizó una población heterogénea de *T. evansi* aislada de un caballo infectado del Hato Mantecal (Estado Apure, Venezuela) en el año 1997. La misma fue establecida en el laboratorio por pasajes sucesivos en ratas albinas, y estabilizada por criopreservación a -196°C en nitrógeno líquido, utilizando dimetilsulfóxido al 10% en tampón fosfato salino glucosado pH 8 (PSG) [0,81 mM fosfato de sodio dibásico, 0,036 mM fosfato de sodio monobásico, 0,26 mM cloruro de sodio, 1% m/v D-glucosa] como crioprotector.

Los parásitos fueron identificados como *T. evansi* en base a criterios morfológicos, clínicos y de infección en roedores de experimentación [3], no habiéndose descrito refractoriedad a la infección por este aislado, en ratones de experimentación de las cepas NMRI, NIH, C57BL/6, BALB/c.

Las poblaciones de *T. evansi* se expandieron en ratones NMRI-IVIC (n = 5), descongelando un vial del

criopreservado de sangre de rata infectada en un baño de agua a temperatura ambiental, antes de inocular intraperitonealmente 0,2 mL/animal. Las parasitemias de los animales se evaluaron diariamente [21] y cuando alcanzaron valores del orden de 10⁸ tripanosomas/mL (trip/mL), se sacrificaron bajo anestesia con cloroformo, para obtener aproximadamente 1 mL de sangre, por punción cardíaca en presencia de 0,1 mL de ácido etilendiamino-tetracético (EDTA) al 10% m/v como anticoagulante. La sangre así obtenida se mantuvo en frío hasta el momento de su uso.

Preparación de los extractos acuosos (EA) de ajo

Los extractos de ajo se prepararon macerando 20 g de ajo troceado en 100 mL de tampón fosfato salino pH 8 (PS) [1,35 mM fosfato de sodio dibásico, 0,06 mM fosfato de sodio monobásico y 0,43 mM cloruro de sodio] a 80°C y con agitación durante 12 horas. El sedimento sólido se eliminó por centrifugación a 15.000 x g y el volumen del sobrenadante o extracto acuoso (EA) obtenido, se ajustó a 100 mL con PS, se alícuotó y almacenó a -80 °C hasta el momento de su uso.

Ensayos de neutralización de la infectividad

El efecto del EA de ajo sobre la infectividad y curso de la infección experimental de *T. evansi* en ratones, se realizó de acuerdo a lo descrito por Nok et al [16]. A manera general, sangre de ratones NMRI-IVIC infectados con *T. evansi* (parasitemias en el orden de 10⁸ tripanosomas/mL) fue obtenida por punción cardíaca bajo anestesia en presencia EDTA al 10% m/v como anticoagulante. La sangre así obtenida se diluyó con PSG frío hasta densidades de 10⁶ trip/mL, y alícuotas de esta suspensión se mezclaron (en microplacas de cultivo de 96 pocillos), con alícuotas del EA de ajo al 20% para alcanzar concentraciones finales del finales del 2,5, 5 y 10% del EA. Las suspensiones así preparadas y sus controles (sangre infectada más PS), se incubaron durante 1 hora a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de anhídrido carbónico.

Curso de la infección experimental en ratones albinos

Una vez finalizadas las incubaciones de las suspensiones de *T. evansi* con los EA, alícuotas de las suspensiones así tratadas, fueron inoculadas por vía intraperitoneal a grupos (n = 10) de ratones de experimentación (inóculo de 500 tripanosomas/g de peso corporal). El curso de la infección desarrollada por los animales se evaluó durante 32 días por recuento diario de las parasitemias de los grupos control y experimentales por el método de Brener [21] (cuando las parasitemias fueron del orden de 10^8 - 10^9 trip/mL) y por el método de Herbert-Lumsden [22] (cuando las mismas estuvieron entre $2,5 \times 10^5$ y $3,20 \times 10^7$ trip/mL). La sobrevivencia de los animales de cada grupo se evaluó por recuento diario del número de animales vivos en cada grupo.

Microscopía electrónica de barrido de las alteraciones morfológicas de *T. evansi*

Alícuotas de las suspensiones a ser estudiadas por microscopía electrónica de barrido se fijaron con solución de Karnovsky (2,5% v/v glutaraldehído, 4% v/v p-formaldehído en tampón fosfato de Millonig 0,1 M pH 7,4) durante 1 hora a 4 °C. El excedente de aldehidos se eliminó por 5 lavados con tampón fosfato de Millonig, después de dejar decantar el sedimento celular. El sedimento de células sanguíneas y tripanosomas así obtenido fue postfijado con 1% m/v tetróxido de Osmio por 1 hora a 4°C. El excedente de tetróxido de osmio se eliminó por lavados con agua destilada a 4°C antes de deshidratar las muestras en una batería de concentraciones crecientes de etanol hasta llevarlas a etanol absoluto. Alícuotas de las suspensiones en etanol absoluto fueron aplicadas a cubreobjetos de vidrio, circulares y tratados con poli-L-lisina al 0,1% v/v. Las muestras así preparadas se secaron en el punto crítico utilizando anhídrido carbónico como fluido de transición, para finalmente cubrirlas con Oro, antes de ser observadas en un microscopio electrónico de barrido Hitachi S-4500.

RESULTADOS

Curso de la infección experimental en ratones albinos

La Figura 1 muestra las curvas de parasitemia y la Figura 2, la de sobrevivencia de los grupos control e inoculados con suspensiones de *T. evansi* tratadas con EA de ajo al 2,5, 5 y 10%. En la Figura 1 se puede observar que el EA al 2,5% determina un incremento del período prepatente de la infección desde 3 días (grupo control) hasta 10 días (grupo experimental). La parasitemia del grupo experimental tratado con EA al 2,5%, registró dos picos de parasitemia, 10^9 trip/mL (día 10) y 3×10^8 trip/mL (día 16). No se desarrolló la infección en los grupos experimentales tratados con EA al 5% y 10%.

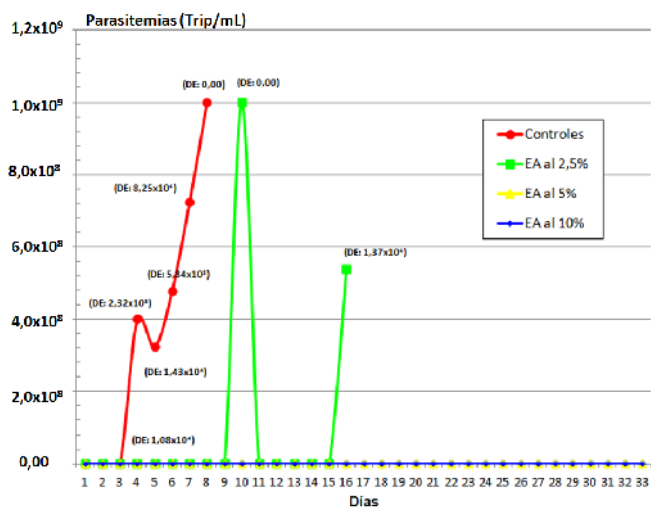


Fig. 1. Efecto de los EA de ajo sobre las parasitemias de ratones NMRI-IVIC inoculados con suspensiones de *T. evansi* tratadas por 1 hora a 37°C con: PS (Control)(●), EA de ajo al 2,5%(■), 5% (▲) y 10%(▼). DE (Desviaciones estándar de las parasitemias promedio)

A este respecto en la Figura 2 se puede observar que mientras el 100% (10/10) de los animales del grupo control muere el día 10 post-infección, un 20% (2/10) de los animales tratados con el EA 2,5% sobrevive a la infección a partir del día 17 y todos los animales (10/10) de los grupos tratados con EA al 5% y 10% sobreviven y se mantienen negativos durante los 32 días de experimentación.

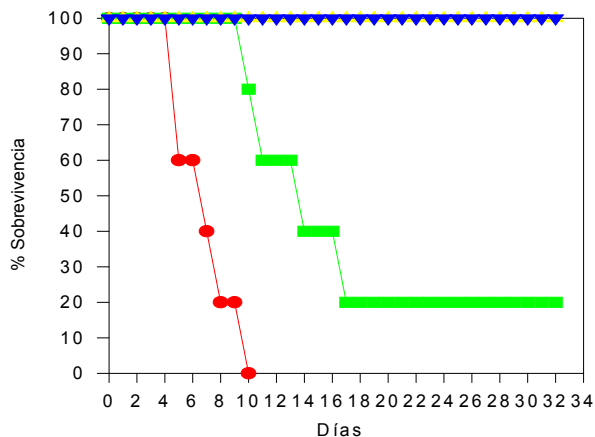


Fig. 2. Efecto de los EA de ajo sobre la sobrevivencia de ratones NMRI-IVIC inoculados con suspensiones de *T. evansi* tratadas por 1 hora a 37°C con: PS (Control) (●), EA de ajo al 2,5% (■), 5% (▲) y 10% (▼).

La neutralización de la infectividad fue total en los animales de los grupos inoculados *T. evansi* tratado con EA al 5% y 10% y parcial (20%) en los inoculados con EA al 2,5%. La aplicación de criterios radicales de neutralización de la infectividad, demostró que al 5 y 10%, el EA de ajo suprimió completamente la habilidad de los parásitos de infectar a ratones de experimentación. A este respecto, la inoculación de suspensiones de hígado y bazo procedentes de los animales sobrevivientes en estos grupos, fue incapaz de favorecer el establecimiento de la infección de *T. evansi* en grupos de animales sanos.

Microscopía electrónica de barrido de las alteraciones morfológicas de T. evansi

La micrografía electrónica de barrido de la Figura 3, muestra la morfología normal de los tripomastigote sanguíneos de *T. evansi* en las preparaciones control.

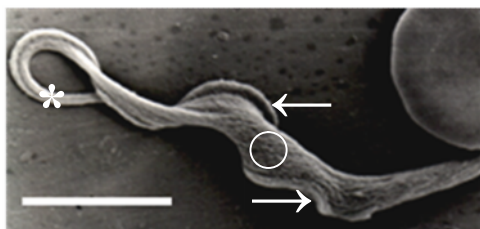


Fig. 3. Morfología normal de *T. evansi*. (Flagelo: *, Membrana ondulante:→, Ornamentos:○). Barra: 1,6 μm

Como se puede observar, *T. evansi* se caracteriza por tener forma lanceolada, extremo posterior cónico, un flagelo libre anclado al cuerpo por una membrana ondulante desarrollada y ornamentos de la superficie celular determinados por la red de microtúbulos subpeliculares. En las micrografías electrónicas de la Figura 4, se pueden observar los efectos de la acción del EA de ajo al 10% sobre la morfología normal de *T. evansi*.

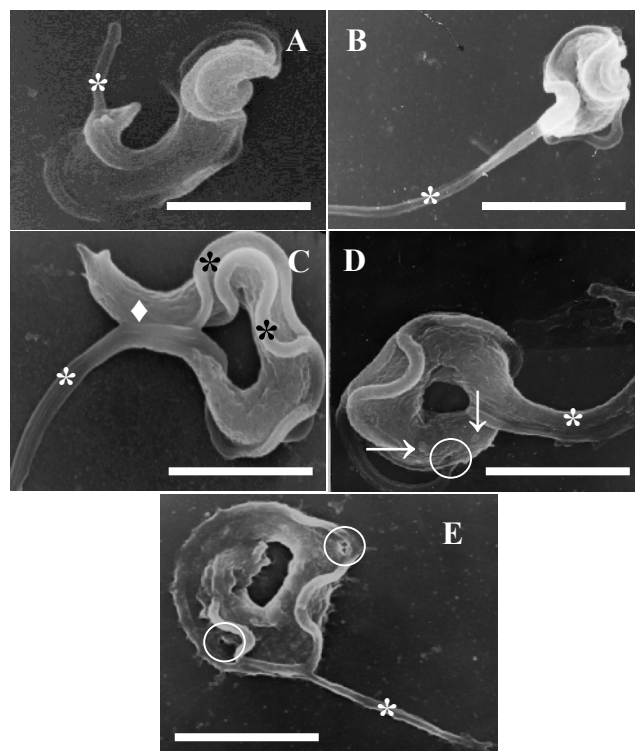


Fig. 4. Efecto del extracto acuoso (EA) al 10% sobre la morfología de *T. evansi*. (A, B) Contracciones del cuerpo celular, (C) Plegamiento del cuerpo celular sobre sí mismo, (D, E) Enrollamiento (“Rolling”). (Flagelo: *, Rugosidades: →, Poros: ○, Fusión de membranas: ◆). Barra: 1,6 μm.

El EA de ajo determinó alteraciones en la morfología normal de *T. evansi*, tales como: contracción del cuerpo celular, plegamiento del parásito sobre sí mismo y enrollamiento “Rolling”[23]. En la micrografía electrónica de la Figura 4C, se puede observar que el plegamiento del parásito sobre sí mismo, sugiere la ocurrencia de un proceso de fusión de la membrana plasmática del cuerpo celular con la membrana ondulante a nivel del flagelo libre. La ocurrencia de este evento

determina la morfología a manera de rosca “donut” que adoptó *T. evansi* después del tratamiento con el EA de ajo (Figura 4D y 4E). Adicionalmente, se observaron alteraciones de la superficie celular como poros, rugosidades, y desaparición de los ornamentos superficiales, en los tripomastigotes en los que se ha producido el plegamiento del cuerpo celular sobre si mismo, la fusión de membranas y la adopción de morfología de rosca.

DISCUSIÓN

La morfología normal y las características de la superficie celular de las formas sanguíneas [24,25] y de cultivo [25] de *T. evansi*, así como la ultraestructura de las formas sanguíneas [25,26,27] e intracelulares en las células de la corteza adrenal [25,26], endotelio de los capilares musculares [28], hepatocitos [27] y células plasmáticas del bazo [25] ha sido documentada.

De acuerdo con estas evidencias, en el trabajo no se produjeron cambios en la morfología e infectividad de las suspensiones de *T. evansi* tratadas tampón PS (controles) en los ensayos de neutralización de la infectividad de los EA de ajo.

La utilización de partes de plantas y animales en la práctica médica es tan antigua como las primeras civilizaciones humanas y ha sido ampliamente documentada en la antigua China, India y Egipto [15]. Estas prácticas ancestrales se establecieron gracias a una serie de ensayos y errores, para los cuales no se tuvo una explicación científica en el momento. En la actualidad y gracias a los avances científicos y tecnológicos, disciplinas como la etnobotánica y etnofarmacología, disponen no solo de conocimientos, procesos y mecanismos, sino también de herramientas tecnológicas, imprescindibles en la corroboración de la efectividad de estos productos naturales y tratamientos ancestrales.

Como consecuencia de estos avances, en los últimos 20 años se han generado una serie de publicaciones en las cuales se verifica la efectividad y actividad tripanocida de

los órganos de una gran variedad de especies vegetales. En este sentido, no solo se ha corroborado la actividad de los extractos de hojas de *Morinda lucida* en ratones infectados con *T. brucei* [29], sino también el potencial tripanocida de las hojas de *Azadirachta indica* frente a *T. brucei* [30], de sus semillas sobre *T. evansi* [31], así como de *Xanthium strumarium* [32] sobre tripanosomas y de *Parthenium hysterophorus* [33] sobre *T. evansi*.

La actividad tripanocida del ajo en ratones [16] y conejos [34] infectados experimentalmente con *T. brucei* también ha sido documentada. Por otro lado, la actividad de compuestos organosulfurados como el ajoene, dialildisulfuros (DAD) y dialiltrisulfuros (DAT), obtenidos a partir de este bulbo o por síntesis orgánica [35], ha sido ensayada para evaluar su actividad quimioterapéutica en infecciones experimentales de *T. brucei* [16], y antiproliferativa en cultivos *in vitro* de *T. cruzi* [17], *Leishmania* [18] y *T. brucei*, *T. brucei gambiense*, *T. brucei rhodesiense*, *T. evansi*, *T. equiperdum* y *T. congolense* [36].

Tal como se ha descrito en los sistemas parasitarios antes mencionados, los resultados parasitológicos sobre la neutralización de la infectividad del aislado venezolano de *T. evansi* utilizado en el trabajo, podrían estar asociados con la acción de compuestos como los DAD, cuando las suspensiones parasitarias son suplementados con los EA de ajo. A diferencia de los DAT, los DAD son productos menos estables, derivados de la alicina que se produce en el bulbo por acción de la aliinasa sobre la aliína [37].

Los trabajos realizados por Nok et al [16], no solo demostraron que los DAD aislados de los extractos de ajo, son capaces de inhibir la infectividad de *T. brucei* en ratones, sino también la incorporación de esteroides a la membrana de las formas procíclicas, cuando son suplementados en el medio de cultivo a concentraciones de 50-300 mg/L. Por otro lado, los resultados de los ensayos de los DAD sobre la actividad de la fosfolipasa A₂ de *T. brucei*, *T. congolense* y *T. vivax*, ponen de

manifiesto que estos compuestos inhiben a esta enzima de manera no competitiva e irreversible a concentraciones de 10 mg/L.

La actividad inhibitoria de los DAD presentes en el EA de ajo sobre la fosfolipasa A₂, podría ser un factor clave en la génesis de las alteraciones morfológicas de *T. evansi* descritas en este trabajo. A este respecto, las fosfolipasas A₁ y A₂ son enzimas clave en el metabolismo e incorporación de los fosfolípidos de las membranas del hospedador a las membranas tripanosomales [38]. Para ello, la fosfatidilcolina del hospedador es transformada en lisofosfatidilcolina que en presencia de ácidos grasos y una liso-fosfatidil-colina-acil-CoA aciltransferasa, experimenta una trans-acilación con la formación de coenzima A (CoA-SH) y fosfatidilcolina que se incorpora a la membrana de los tripanosomas [39].

La inhibición de las mismas por los DAD, podría determinar deficiencias en la incorporación de fosfatidilcolina a las membranas tripanosomales y con ello cambios en sus propiedades fisicoquímicas. Por otro lado, la inhibición de la liso-fosfatidil-colina-acil-CoA aciltransferasa por estos compuestos, conduciría a un incremento de los niveles de lisofosfatidilcolina [39], un lisofosfátido con propiedades desestabilizadoras de las membranas biológicas, capaz de estimular la fusión de las membranas ondulante y plasmática del extremo posterior del cuerpo celular, descrita en este trabajo.

En este sentido, se ha descrito que la lisofosfatidilcolina, juega un papel importante en la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana acrosomal externa, en un proceso fisiológico que acelera la reacción del acrosoma durante la fecundación [40]. Por otro lado, también interviene en procesos patológicos como la desmielinización axonal acompañada de la formación de poros en los cuerpos neuronales, vesiculación, lisis de la mielina [41] y daño del endotelio vascular en ratones infectados experimentalmente con *T. evansi* [25,26,27,28], compatible con los daños del

endotelio aórtico tratado con concentraciones micromolares de este fosfolípido[42].

Estudios realizados por Liu et al [42] sugieren que el mecanismo inherente al daño causado por la lisofosfatidilcolina, se asocia con la activación de la producción intracelular de especies reactivas del oxígeno y activación de la ruta apoptótica mitocondrial. En la células endoteliales de aorta, estos daños pueden prevenirse por tratamiento previo de las células con moléculas (genisteína, vitamina E o 7-Difluoromethyl-5,4'-dimetoxigenisteína) que activan a enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa.

Las alteraciones morfológicas de *T. evansi* inducidas por los EA, parecen ocurrir en una secuencia que se inicia con el plegamiento del cuerpo celular y fusión de membranas, adopción de forma de rosca, desaparición de ornamentos superficiales y aparición de poros que debe comprometer el equilibrio osmótico y por tanto viabilidad del parásito. Estos cambios morfológicos, sumados a la disminución de la motilidad (resultados no mostrados), podrían contribuir (impidiendo el establecimiento de la infección) haciendo que los tripomastigotes de *T. evansi* sean más susceptibles a la eliminación por células del sistema fagocítico mononuclear de los ratones de experimentación.

Como consecuencia de los resultados presentados en este trabajo, en la actualidad se adelantan estudios para determinar, no solo el efecto que los extractos de ajo y compuestos organosulfurados puros (DAD y Ajoene entre otros), tienen sobre la morfología y ultraestructura de *T. evansi*, sino también sobre el tratamiento y profilaxis de la infección experimental de ratones.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren expresar sus agradecimientos al personal del bioterio experimental del Instituto de Biología Experimental de la UCV por su valiosa labor en el mantenimiento y trabajo con los animales de

experimentación. A la Dra. Ghislaine Céspedes (Directora del Instituto Anatomopatológico José A. O'Daly, UCV) por permitir y apoyar la realización de este trabajo en el IAP-UCV.

FINANCIAMIENTO

Este trabajo contó con financiamiento parcial del FONACIT (Proyecto N°: G-98003462).

REFERENCIAS

- [1] Desquesnes M. (1996) "Origin and Distribution of New World Livestock Trypanosomes and Their Affinity for Some Mammalian Hosts" *Proc First Symp New World Tryp* 5-11.
- [2] Reyna-Bello A., García F.A., Rivera M., Sansó B., Aso P.M. (1998) "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the detection of anti-*Trypanosoma evansi* equine antibodies" *Vet Parasitol* 80:149-157.
- [3] García F. (1995) "Estudio de la Tripanosomiasis Equina en un Hato Ganadero del Estado Apure". Trabajo de Ascenso a la categoría de Profesor Asociado, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela.
- [4] Morales G.A., Wells E.A., Angel D. (1976) "The capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) as a reservoir host for *Trypanosoma evansi*" *J Wildl Dis* 12:572-574.
- [5] Arias J.F., García F., Rivera M., López R. (1997) "*Trypanosoma evansi* in capibara from Venezuela" *J Wildl Dis* 33:359-361.
- [6] García F.A., Rivera M., Bermúdez V., Álvarez L. (1983) "Lesiones Oculares de un Perro Infectado Naturalmente con *Trypanosoma venezuelense*, Mesnil, 1910 (*T. evansi*)" *Rev Fac Ciencs Vets UCV* 30:127-136.
- [7] Díaz-Ungria C. (1960) "*Parasitología Venezolana Volumen I*" Caracas, Sociedad de Ciencias Naturales La Salle, Fundación La Salle de Ciencias Naturales, Editorial Sucre C.A., 500 páginas.
- [8] Rossi M.S. (1994) "Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) para el Diagnóstico de la Tripanosomiasis Bovina causada por *Trypanosoma vivax*". Tesis de Licenciatura en Biología mención Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.
- [9] Espinoza E., González N., Primera G., Rivero E., Hidalgo L., González B. (2002) "Efectos del *Trypanosoma evansi* en cabras (*Capra hircus*) infectadas experimentalmente" *Rev Cient FCV-LUZ* 12:103-107.
- [10] Joshi P.P., Chaudhari A., Shegokar V.R., Powar R.M., Dani V.S., Somalwar A.M., Jannin J., Truc P. (2006) "Treatment and follow-up of the first case of human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India" *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 100:989-991.
- [11] Shegokar V.R., Powar R.M., Joshi P.P., Bhargava A., Dani V.S., Katti R., Zare V.R., Khanande V.D., Jannin J., Truc P. (2006) "Short Report: Human tripanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in a village in India: preliminary serologic survey of the local population" *Am J Trop Med Hyg* 75:869-870.
- [12] Tamasaukas R., Ruíz H., Roa H., Baldizan A., González A., Guirre A. (1996) "Epidemiological Diagnosis of Trypanosomiasis of Cattle by *Trypanosoma vivax* in Venezuela". *Proc First Symp New World Tryp* 47-55.
- [13] Ruiz M. (1971) "Situación Actual de América Latina en Relación con las Enfermedades Infecciosas de los Equinos. En: *Patología Infecciosa del Caballo*" Caracas, Eds. Federación de Colegios de Médicos Veterinarios de Venezuela, Editorial Sucre C.A., pp. 558-562.
- [14] Ortega M. (1989) "Manejo y Plan Sanitario del Caballo de Trabajo en los Llanos Venezolanos. En: *Curso sobre la Problemática Sanitaria y las*

Parasitosis Bovina y Equina en el Estado Apure" San Fernando de Apure, Eds. Asociación de Ganaderos del Estado Apure, Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Central de Venezuela, 100 páginas.

- [15]Fajim A.K., Taiwo A.A. (2005) "Herbal remedies in animal parasitic diseases in Nigeria: a review" *Afr J Biotechnol* 4:303-307.
- [16]Nok A.J., Williams S., Onyenekwe P.C. (1996) "Allium sativum-induced death of African Trypanosomes" *Parasitol Res* 82:634-637.
- [17]Urbina J.A., Marchan E., Lazard K., Visbal G., Apitz-Castro R., Gil F., Aguirre T., Piras M.M., Piras R. (1993) "Inhibition of phosphatidylcoline biosynthesis and cell proliferation in *Trypanosoma cruzi* by Ajoene, an antiplatelet compound isolated from garlic" *Biochem Pharmacol* 45:2381-2387.
- [18]Ledezma, E.; Jorquera, A.; Bendezú, H.; Vivas, J. y Pérez, G. (2002) "Antiproliferative and leishmanicidal effect of ajoene on various *Leishmania* species: ultrastructural study" *Parasitol. Res* 88:748-753.
- [19]Brun R., Hecker H., Lun Z-R. (1998) "REVIEW. *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review)" *Vet Parasitol* 79:95-107.
- [20]Lai D.H., Hashimi H., Lun Z-R., Ayala F.J., Lukes J. (2008) "Adaptations of *Trypanosoma brucei* to gradual loss of kinetoplast DNA: *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi* are petite mutants of *T. brucei*" *Proc Natl Acad Sci USA* 105:1999-2004.
- [21]Brenner Z. (1962) "Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*" *Rev Inst Med Trop S Paulo* 4:389-396.
- [22]Herbert W.J., Lumsden W.H.R. (1976) "Trypanosoma brucei: A Rapid "Matching" Method for Estimating the Host's Parasitemia" *Exp Parasitol* 40:427-431.
- [23]Ormerod W.E., Venkatesan S. (1971) "An Amastigote Phase of the Sleeping Sickness" *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 65:736-741.
- [24]Hernández-Páez R. (1980) "Consideraciones Ultraestructurales sobre el *Trypanosoma venezuelense*, Mesnil 1910; Aspecto Morfológico Normal de *Trypanosoma venezuelense*" *Rev Fac Ciencs Vets UCV* 28:83-106.
- [25]Rossi M.S. (2009) "*Trypanosoma evansi*: Estudios Parasitológicos, Ultraestructurales, y Quimioterapéuticos en la Infección Experimental del Ratón". Tesis de Doctorado en Ciencias mención Zoología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.
- [26]Rossi M., Boada-Sucre A., Finol H.J., Tejero F., Aso P., Bello B., Hernández G. (1999) "Ultrastructural alterations in the adrenal gland cortex of mice experimentally infected with a Venezuelan isolate of *Trypanosoma evansi*" *J Submicrosc Cytol Pathol* 31:509-513.
- [27]Rossi S. M.S., Boada-Sucre A.A., Hernández G., Bello B., Finol H.J., Payares-Trujillo G., Aso P.M. (2009) "Análisis Ultraestructural del hígado en Ratones Infectados Experimentalmente con un Aislado Venezolano de *Trypanosoma evansi* (KINETOPLASTIDA:TRYPANOSOMATIDAE)" *Acta Microsc* 17:5-12.
- [28]Finol H.J., Boada-Sucre A.A., Rossi M., Tejero F. (2001) "Skeletal muscle ultrastructural pathology in mice infected with *Trypanosoma evansi*" *J Submicrosc Cytol Pathol* 33:65-71.
- [29]Azuzu I.U., Chineme C.N. (1990) "Effects of *Morinda lucida* leaf extract on *Trypanosoma brucei* infection in mice" *J Ethnopharmacol* 30:307-313.
- [30]Nok A.J., Esievo K.A.N., Longdet I., Arowosafe S., Onyenekure P., Gimba C.E., Kagbu D.A. (1993) "Trypanocidal potentials of *Azadirachta indica* in

- vivo* activity of leaf extract against *Trypanosoma brucei*” *J Clin Biochem Nutr* 15:113-118.
- [31]Habila N., Humphrey N.C., Abel A.S. (2011) “Trypanocidal potentials of *Azadirachta indica* seeds against *Trypanosoma evansi*” *Vet Parasitol* 180:173-178.
- [32]Talakal T.S., Dwivedi S.K., Sharma S.R. (1995) “*In vitro* and *in vivo* antitrypanosomal activity of *Xanthium strumarium* leaves” *J Ethnopharmacol* 49:141-145.
- [33]Talakal T.S., Dwivedi S.K., Sharma S.R. (1995) “*In vitro* and *in vivo* therapeutic activity of *Parthenium hysterophorus* against *Trypanosoma evansi*” *Indian J Exp Biol* 33:894-896.
- [34]Ajagbona O.P., Mikahil H.G., Muhammed B.Y., Onyeyili P.A. (2003) “Trypanocidal efficacy of *Allium sativum* (Garlic) in Rabbits infected with *Trypanosoma brucei*” *Proc 28th Ann Conf Nig Soc Anim Prod. IAR&T, Ibadan*, pp.11-12.
- [35]Block E., Ahmad S., Catalfamo J.L., Jain M.K., Apitz-Castro R. (1986) “Antithrombotic Organosulphur Compounds from Garlic: Structural, Mechanistic and Synthetic Studies” *J Am Chem Soc* 108:7045-7055.
- [36]Lun Z-R., Burri C., Menzinger M., Kaminsky R. (1994) “Antiparasitic Activity of Diallyl Trisulphide (Dasuansu) on Human and Animal Pathogenic Protozoa (*Trypanosoma* sp, *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*) *in vitro*” *Ann Soc Belg Med Trop* 74:51-59.
- [37]Block E. (1985) “The chemistry of garlic and onions” *Sci Am*. 252:114-119.
- [38] Igbokwe I.O. (1994) “Mechanism of cellular injury in african trypanosomiasis” *Vet Bull* 64:611-620.
- [39]Samad A., Licht B., Stalmach M.E., Mellors A. (1988) “Metabolism of phospholipids and lysophospholipids by *Trypanosoma brucei*” *Mol Biochem Parasitol* 29:159-169.
- [40]Santiani A., Risopatrón J., Sepúlveda, N., Sánchez R. (2004) “Effect of Lysophosphatidylcholine on Acrosome Reaction in Canine Spermatozoa”. *Rev Cient FCV-LUZ* 14:311-316.
- [41]Allt G., Ghabriel M.N., Sikri K. (1988) “Lysophosphatidyl choline-induced demyelination. A freeze-fracture study” *Acta Neuropathol* 75:456-464.
- [42]Liu F., Cao J.G., Li C., Tan J.S., Fu X.H. (2012) “Protective effects of 7-difluoromethyl-5,4'-dimethoxygenistein against human aorta endothelial injury caused by lysophosphatidyl choline” *Mol Cell Biochem* 363:147-155.