



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID – FACULTAD DE FARMACIA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

DIARREA INFANTIL PRODUCIDA POR ROTAVIRUS:

EL PAPEL POTENCIAL DE LAS PLANTAS MEDICINALES

Presentado por Miriam Fuentes Verdugo

DNI 48991712x

Tutora

Dra. Paulina Bermejo Benito

Convocatoria

30 de Junio 2015

1. Resumen

La infección por rotavirus es la causa más frecuente de diarrea en niños menores de dos años. Los rotavirus del serotipo A son los responsables de la mayor parte de las infecciones intestinales a nivel mundial. Se estima que en los países en vía de desarrollo se infectan cada año 100 millones de niños por rotavirus y de 600.000 a 1 millón fallecen por deshidratación. En los países desarrollados las muertes por rotavirus se producen de forma muy esporádica, ya que cuentan con muchas más opciones terapéuticas. Por lo que en países subdesarrollados siguen accediendo a la terapia con plantas medicinales para tratar los síntomas de esta patología. Existen extractos de plantas muy útiles para cortar la diarrea, que deben su acción a un tipo de principio activo, concretamente a los taninos, por su acción astringente ya que producen la contracción de los tejidos y la sequedad de las mucosas, contribuyendo a que el organismo pueda realizar deposiciones más secas. Como es el caso de la *Tormentilla*, *Gayuba*, *Algarrobo*, *Diente de león*, *Acai*... También existe ciertas drogas medicinales como *Nelumbo nucifera* *Aspalathus linearis*, *Glycyrrhiza glabra*, *Olea europaea*, *Artocarpus integrifolia*, *Tylosema esculentum* (*Marama*), *Spongia lutea*... que se ha comprobado que inhiben la acción del virus sobre las células, interfiriendo directamente sobre la replicación del virus con una tasa de inhibición entre 80-97%. Se ha observado que en ocasiones la inhibición es mayor cuando se asocian varios extractos como es el caso de *Glycyrrhiza glabra* o *Nelumbo nucifera*... por lo que las plantas continúan siendo la oportunidad para encontrar solución a los problemas de salud pública en los países más desfavorecidos.

2. Introducción

La diarrea aguda es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en la infancia y actualmente se considera uno de los principales problemas de salud pública en todo el mundo. Se estima que, a escala mundial, hay 1,5 billones de casos de diarrea aguda cada año, y de 1,5 a 2,5 millones de muertes anuales en la población infantil menor de 5 años según la organización mundial de la Salud. Los rotavirus son la causa más frecuente de enfermedad diarreica grave en bebés y niños pequeños de todo el mundo; se calcula que en 2004 las infecciones por rotavirus causaron unas 527 000 defunciones, sobre todo en los países subdesarrollados. Existe una gran diversidad de cepas víricas, son 5 los serotipos responsables de la mayoría de esas infecciones. La principal vía de transmisión del virus es fecal-oral, directamente de persona a persona. La infección por rotavirus afecta principalmente a los enterocitos maduros en la superficie de las vellosidades intestinales. La destrucción de las células afectadas reduce la digestión y absorción de nutrientes, lo que provoca diarrea secretoria con pérdida de líquidos y electrolitos por vía intestinal.

En 1999, RotaShield™, una vacuna antirrotavírica de gran eficacia aprobada en los Estados Unidos, fue retirada del mercado en menos de un año después de su lanzamiento por su asociación con invaginación intestinal. En 2006 se autorizaron dos nuevas vacunas vivas atenuadas orales contra rotavirus: la vacuna antirrotavírica humana monovalente (Rotarix™) y la vacuna antirrotavírica reagrupada 1 (1), (2).

Según datos obtenidos de la OMS más del 80% de las personas sólo tienen acceso a tratamientos tradicionales, siendo estos sus únicos recursos. Entre las plantas que más se están utilizando, son las ricas en taninos por su potente efecto astringente como la *Tormentilla*, *Gayuba*, *Espino blanco*, *Agrimonia*... En dosis controladas acorta la duración de la diarrea y la disminución de la necesidad de soluciones de rehidratación. Además, existen una serie de plantas medicinales que destacan por su acción directa sobre el ciclo de replicación de los rotavirus, como la *Nelumbo nucifera*, *Aspalathus linearis*, *Urtica dioica*, *Glycyrrhiza glabra*, *Olea europaea*...

3. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es estudiar el papel potencial de algunas plantas medicinales y sus principales actividades frente a la diarrea en niños producida por rotavirus, aparte de un estudio completo del virus y las principales características de la enfermedad, incluyendo la fisiopatología, sintomatología, epidemiología, tipos de prevención, y los tratamiento más utilizados y eficaces.

4. Métodos

Para el estudio de las características del virus, de la enfermedad, así como la fisiopatología y diagnóstico, se emplearon diversas referencias bibliográficas de publicaciones de revisión o recopilación de información especializada. Para llevar a cabo este proceso de búsqueda, se emplearon diversos buscadores. El principal fue Thomson Reuters WEB OF SCIENCE®, que recoge las referencias de las principales publicaciones de cualquier disciplina de conocimiento científico, tecnológico y humanístico desde 1900 y le aporta un complemento importante con citas y factor de impacto. Los resultados fueron filtrados por número de citas y publicaciones de mayor factor de impacto. Las palabras empleadas para la búsqueda fueron: “rotavirus and plants”, “vaccination-rotavirus”, “medicinal plants and rotavirus” entre otros. Entre las bases de datos más utilizadas se encuentran: Pubmed, Plos (public of science), así como algunas páginas web como OMS.

5. Aspecto y Fisiopatología de la Enfermedad

La enfermedad está caracterizada por vómito, diarrea acuosa, fiebre y dolor abdominal. Es rara en neonatos; los anticuerpos maternos transplacentarios, los cambios dependientes de la edad en la mucosa intestinal y la leche materna, probablemente juegan un papel en la protección de este grupo de niños. Así mismo, la infección es inusual después de los dos años por la inmunidad acumulada por infecciones repetidas. En niños, la gastroenteritis por rotavirus generalmente se inicia entre las 12 horas a 4 días después de la exposición y dura de 4 a 8 días (3),(4). Los mecanismos fisiopatológicos de la diarrea inducida por estos rotavirus son múltiples. Tienen la capacidad de adherirse al revestimiento epitelial del tracto gastrointestinal y el principal sitio de replicación son los enterocitos maduros sobre las vellosidades del intestino delgado. Al producirse la infección se desarrolla un metabolismo alterado de las disacaridasas (como resultado de la destrucción selectiva de las puntas de las vellosidades intestinales) y de otras proteínas de membrana del enterocito, que induce una diarrea osmótica/malabsortiva, con la disminución de la absorción de sales, agua y carbohidratos. Además se activa el sistema nervioso entérico con secreción de fluidos y electrolitos (diarrea secretora). Se producen cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular, después de la infección de los enterocitos maduros, aumenta la concentración de Ca^{2+} intracelular (probablemente por la participación de NSP4). Este aumento de calcio conduce a la inhibición de los cotransportadores de Na^+ y como consecuencia se reduce la capacidad de absorción de las moléculas del epitelio. El intestino aumenta la osmolaridad de los contenidos intestinales y empieza a absorber agua desde el epitelio, causando el aumento en la concentración del Ca^{2+} en el citoplasma (5),(6).

El rotavirus se transmite de una persona a otra vía fecal-oral y la infección es tan común en países industrializados como en países en vías de desarrollo por lo que se trata de un virus “democrático”; pero las consecuencias clínicas de la infección son solventadas en el mundo industrializado por la fácil disponibilidad de la terapia de soporte. El virus tiene un comportamiento temporal, es evidente en climas templados, donde los rotavirus son probablemente responsables del gran aumento de muertes por diarrea durante la época de invierno). El diagnóstico, se basa principalmente sobre el cuadro clínico aunque la detección del antígeno viral en la materia fecal o en escobillados rectales, se detecta mediante ensayos inmunoabsorbentes unidos a enzimas (ELISA) basados en el reconocimiento de VP4 /VP7 o por partículas de aglutinación de látex. La aglutinación de látex es particularmente útil en áreas con recursos limitados (6),(7) .

Es muy importante tener unas buenas prácticas higiénicas, como un lavado adecuado de las manos, para reducir la transmisión del virus. Otra medida de prevención eficaz, es la vacuna, ya que se

alcanza una mejor protección ante el rotavirus, porque se induce localmente respuestas inmunes en el intestino. La primera vacuna aprobada para rotavirus fue la RRV-TV (Rotashield, Wyeth). Esta era una vacuna recombinante humano-rhesus que contenía una mezcla de cepas con especificidades para los cuatro serotipos G más comunes en los humanos (G1-G4). Desafortunadamente, menos de un año después, la CDC (Centers for Disease Control) suspendió el uso de esta vacuna al demostrar su asociación frecuente con intususcepción. Actualmente existe una vacuna cuyo nombre comercial es Rotateq® (fabricada por Merck) y se trata de una vacuna pentavalente recombinante humano-bovino que contiene los serotipos humanos G1, G2, G3, G4 y P [8]: Cepa WC3, con muy buenos resultados entre la población infantil (8),(9).

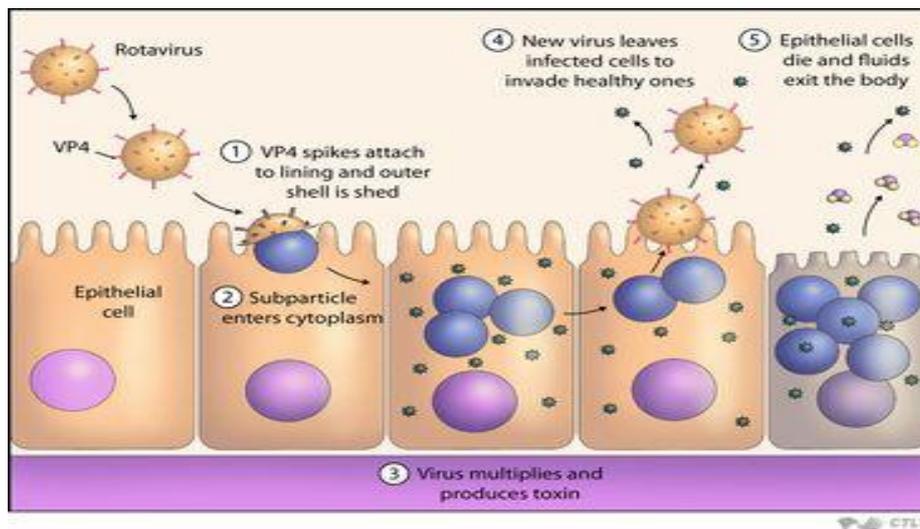


Figura.1 Mecanismo de acción del virus sobre los enterocitos. Tomada de Bernstein DI, 2009 (9).

6. Características de los rotavirus

Rotavirus es un género de virus perteneciente a la familia *Reoviridae* (Reovirus). Reoviridae son virus sin envoltura con cápsides proteicas de doble capa que contienen de 10 a 12 segmentos bicatenario. Estos virus son estables a amplias variaciones de temperatura y pH. Con respecto a la morfología del Rotavirus este es un virus sin envoltura, de 70 nanómetros de diámetro, en el que se reconocen tres capas estructurales, una cápside externa, una cápside interna y una estructura proteica central (core) que contiene el genoma que consiste en 11 segmentos de RNA doble-hebra que codifican por seis proteínas estructurales y seis no estructurales (uno de sus segmentos codifica para 2 proteínas). Las proteínas estructurales se designan como VP (proteína viral) seguida por un número y las no estructurales como NSP (estructuras no proteicas) seguidas por otro número (10).

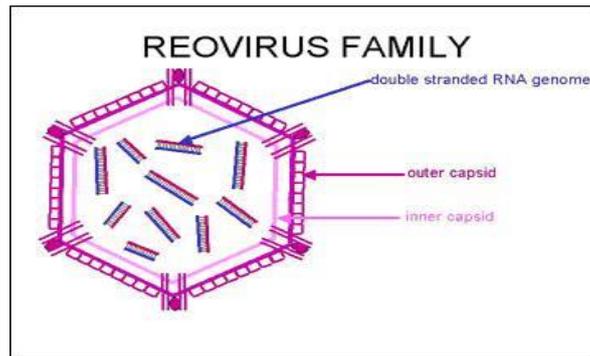


Figura 2. Estructura de un rotavirus. Tomada de Estes, MK.; Kapikian, AZ.; In Knipe, DM.; Griffin, D; Lamb, RA.; Straus, SE., et al. Fields virology. 5. Vol. 2. Philadelphia.

Los Rotavirus se clasifican en grupos y serotipos. La clasificación por grupo se basa en las características de la VP6, la proteína principal de la cápside interna, se reconocen 7 grupos de rotavirus (A, B, C, D, E, F y G), tres de los cuales (Grupo A, B y C) infectan a los humanos, el grupo A es el más común, es la causa más frecuente de diarrea aguda que puede conducir a deshidratación grave y que potencialmente puede poner en peligro la vida de niños menores de dos años de edad (10), (11).

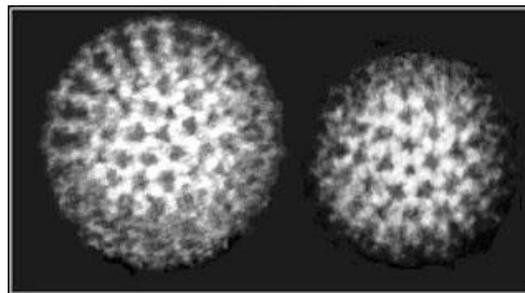


Figura 3. Cápside externa. Tomada de Estes, MK.; Kapikian, AZ.; In Knipe, DM.; Griffin, D; Lamb, RA.; Straus, SE., et al. Fields virology. 5. Vol. 2. Philadelphia.

La replicación del Rotavirus empieza con la ingestión de los virus, luego el virión completo será parcialmente digerido en el tracto gastrointestinal y activado por la escisión de la proteasa y por la pérdida de las proteínas externas de la cápside y se activa una RNA transcriptasa vinculada con el centro del virus, esta transcriptasa transcribe las moléculas del mRNA de la cadena de sentido negativo de cada segmento de RNA del genoma de doble cadena en el centro viral intacto. Los centros del virus contienen todas las enzimas necesarias para transcribir, coronar y expulsar los mRNA del centro viral y dejar los segmentos del genoma de RNA. Una vez expulsados del centro los mRNA se traducen en productos génicos primarios, algunos de los transcritos de longitud incompleta se encapsulan para formar partículas virales inmaduras (12).

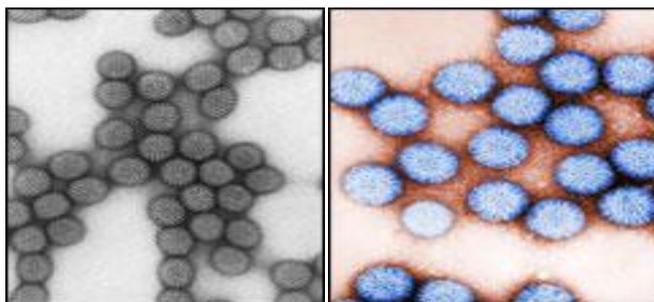


Figura 4. Rotavirus al microscopio. Tomado de Estes, MK.; Kapikian, AZ.; In Knipe, DM.; Griffin, D; Lamb, RA.; Straus, SE., et al. *Fields virology*. 5. Vol. 2. Philadelphia.

7. Plantas Medicinales y rotavirus

En los niños con sistemas inmunes saludables, la gastroenteritis por rotavirus es una enfermedad auto-limitada, que dura sólo unos cuantos días. El tratamiento no es específico, y consiste en terapia de rehidratación oral para prevenir la deshidratación y tratamiento de los síntomas.

La medicina tradicional como parte esencial de la cultura de los pueblos, ha sido durante siglos, casi el único recursos de las generaciones pasadas. En los países en vías de desarrollo, el uso de plantas medicinales constituye un recurso ancestral en el propio medio cultural, como una necesidad primaria en los sistemas de salud, ya que no pueden acceder a un sistema sanitario tan potente como en los países desarrollados. Entre las plantas que más se usan y de las que se ha visto que tienen mayor efecto para combatir la diarrea, son las que poseen taninos, por su acción astringente. Los taninos son compuestos de origen polifenólico muy astringente y sabor amargo que son producidos por algunas plantas. Se dividen en hidrolizables y condensados. El resultado de la acción astringente, es la contracción de los tejidos y la sequedad de las mucosas, contribuyendo a que el organismo pueda realizar deposiciones más secas. En la mayoría de estas plantas, los taninos se encuentran en las hojas y corteza, y son cultivadas en regiones mediterráneas cálidas de suelos calcáreos, en algunos lugares secos y pedregosos, no muy alejados del mar, también se pueden encontrar en bosques poco densos y brezales de montaña. Entre algunas de estas plantas medicinales se encuentran *Cedrón*, *Agrimonia*, *Espino blanco*, *Tormentilla*, *Acai*, *Diente de león*, *Algarrobo*, *Lentisco*, *los escaramujos de la rosa canina*, *Allium sativum* (ajo), *Eriobotrya japonica* (níspero), *Fragaria vesca* (fresa), *Prunus dulcis* (Almendro), *Rubus ulmifolius* (Zarza), *Smilax aspera* (zarzaparrilla), *Daucus carota* (zanahoria), *Tribulus terrestris* (espigón de romanza), *Llantén*, *Gayuba*... En esta última los taninos se encuentran en las hojas y abundan principalmente el ácido elágico, gálico y los galotaninos. Tiene un potente poder astringente, sin embargo hay que ser muy prudente en su administración, por la toxicidad que presenta cuando se

superan los límites permitidos, llegando a producir acúfenos, disnea, vómitos y convulsiones. En general son drogas seguras y muy útiles en la detención de la diarrea, que poseen la capacidad para actuar sobre la epidermis o las mucosas (13), (14), (15).

La *Tormentilla* es una de las plantas más comunes y de fácil acceso empleada para combatir la diarrea, es una planta originaria de Asia y EEUU que puede encontrarse también por toda Europa, pertenece a la familia de las Rosaceas. Contiene abundantes taninos catéquicos (15-20%), taninos elágicos (6,2%): elagitanino, trazas de aceite esencial... Debido a estos componentes ejerce una acción astringente sobre la mucosa epitelial. Por lo que se ha demostrado que la administración de extracto de raíz tormentilla en dosis controladas acorta la duración de la diarrea por rotavirus y la disminución de la necesidad de soluciones de rehidratación, por lo que el extracto de raíz tormentilla parece ser una medida eficaz para tratar la diarrea por rotavirus en niños (16).

Existe también un cierto número de extractos de plantas que son de gran interés por su actividad antiviral frente a rotavirus, que no se usan para paliar los síntomas, sino para actuar contra al virus directamente inhibiéndole, y que serían interesantes como acompañamiento al tratamiento sintomático, aunque algunas contienen además taninos en su composición. Estos extractos de plantas son: *Nelumbo nucifera*, *Aspalathus linearis*, *Annona squamosa*, *Anacardium occidentale*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Cassia occidentalis*, *Syzygium jambos*, *Psidium guajava*, *Averrhoa carambola*, *Urtica dioica*, *Glycyrrhiza glabra*, *Olea europaea*, *Artocarpus integrifolia*, *Tylosema esculentum* (Marama), *Myristica fragrans*, *Spongia lutea*, *Stevia rebaudina* y *Lippia graveolens*.

Olea europaea y su papel frente a los Rotavirus

Es curioso destacar el extracto de *Olea europaea* (Olivo), por sus multitud de propiedades, aparte de su abundante y accesible localización en nuestro País. Además de sus acciones antibacterianas, el ácido elenólico ha demostrado ser un potente inhibidor de un amplio espectro de virus. La sal de calcio aislado del ácido elenólico fue probado como un agente antiviral de amplio espectro activo contra todos los virus que fueron analizados in vitro, como mixovirus, herpes simplex, parainfluenza, rotavirus, etc.

El mecanismo de acción de la actividad antiviral incluye:

- i) Capacidad de interferir con el aminoácido crítico esencial para la producción del virus.
- ii) Capacidad de detener la infección mediante la inactivación de virus en la membrana celular.

- iii) Capacidad de penetrar directamente en las células infectadas y detener la replicación viral.
- iv) Es capaz de neutralizar la producción de la transcriptasa inversa y proteasa.
- v) Estimulación de la fagocitosis (17).

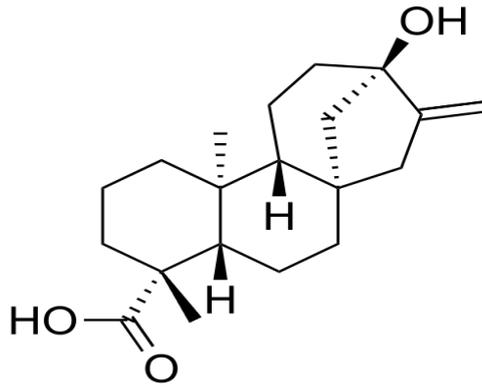
Quillaja saponaria

Existe un efecto sinérgico entre algunos de estos extractos de plantas, donde la combinación de dos o más extractos posee una acción mayor que la suma de los efectos individuales de cada extracto. Además con frecuencia, se está empleando en Brasil las saponinas de *Quillaja saponaria*, que son un extracto acuoso natural que se obtiene de un árbol chileno de la familia de las Rósacea. Este extracto está aprobado para su uso en humanos por la FDA y se ha demostrado que tiene un potente efecto contra el virus, reduciendo el número de muertes en este país (18).

Stevia rebaudiana

Es una especie del género *Stevia* de la familia de las Asteráceas nativa de la región tropical de Sudamérica muy empleada por sus propiedades edulcorantes. Los compuestos edulcorantes de la planta están contenidos en mayor porcentaje en las hojas. Los glucósidos que posee son los que provocan su sabor, llamados concretamente "esteviósidos" y "rebaudiósidos". Son entre 250–300 veces más dulces que la sacarosa, los glucósidos de esta especie no afectan a la concentración de glucosa en sangre, por lo que resultan inocuos para los diabéticos, de ahí su uso tan extendido. Se examinó sus propiedades frente al rotavirus humano (HRV), tras el análisis de los extractos acuosos sobre las células MA104 infectadas por el virus, se observó como se inhibía la replicación de los cuatro serotipos del HRV in vitro. Dicha inhibición se produce por el siguiente mecanismo:

Stevia rebaudiana bloquea la unión del virus a las células, porque inhibe la unión del anti-VP7 (anticuerpo monoclonal) a las células MA104 infectadas con HRV interfiriendo con los receptores celulares mediante impedimento estérico, lo que provoca dicho bloqueo (impidiendo la replicación del virus). Esto es debido a los glucósidos (polisacáridos aniónicos heterogéneos con distintas cargas de iones) que la componen, además de por los aminoácidos que la forman serina- alanina principalmente y al ácido urónico (19).



Estructura química del glucósido (Steviol)

A continuación se muestran algunas imágenes de estos extractos.



NELUMBO NUCIFERA (LOTO)



OLEA EUROPEA (OLIVO)



QUILLAY SAPONARIA (PALO DE JABÓN)



SPONGIA LUTEA



TYLOSEMA ESCULETUM

Tylosema esculentum

Tylosema esculentum (Burch.) (Marama) A. Schreib. (Familia Caesalpiniaceae), también conocido como "El Oro Verde de África", es una planta rastrera que se encuentra en las partes del sur de África, Sudáfrica, Namibia, y Botswana. Los extractos de frijol *Tylosema esculentum* y tubérculos se han utilizado en la medicina tradicional africana para tratar la diarrea y para el mantenimiento general de la salud humana. La investigación sobre los beneficios químicos y sobre la salud de esta planta, es parte de un proyecto de investigación en curso bajo el programa INCO-UE Marama II 6PM (contrato número 032059).



*Frijoles de *Tylosema esculentum**

Existen diversos constituyentes bioactivos que están presente en la planta de *T. esculentum*. Estos pueden incluir componentes fenólicos, hidratos de carbono, y ciertos ácidos grasos, entre muchos otros componentes. También se han detectado, el ácido gálico que se esterifica con la glucosa, los taninos hidrolizables resultantes (HTS), metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal, son conocidos por ser antagonistas eficaces contra virus. Altas cantidades de fitosteroles también se han encontrado en el aceite de *T. esculentum* (aproximadamente el 75 % de todos los fitosteroles son el 4 – desmetilesteroles y aproximadamente 15,72 % del total el 4,4-dimetilesteroles) (20).

Se estableció los siguientes mecanismos antivirales del extracto:

1. La interferencia con la replicación viral
2. Inducción de respuestas inmunes no específicos celulares (Por ejemplo, la liberación de óxido nítrico) e interferencia con la infectividad del virus.
3. Fortalecimiento de la pared epitelial intestinal, la función de barrera (TER- Ω / cm²).

Con esta información, y con informaciones relacionados con el apoyo empírico de otras plantas leguminosas, se planteó la hipótesis de que los frijoles y tubérculos de extractos *T. esculentum* pueden inhibir la infección por rotavirus, combatiendo la diarrea causada. Para demostrar esto, se realizo un estudio donde se examinó la actividad antirrotavirus de los extractos de agua y etanol a partir de cotiledones de frijol y los tegumentos de las semillas de frijol y de los tubérculos de *T. esculentum* mediante la investigación de su capacidad para aumentar la supervivencia de las células

del epitelio intestinal de cerdos y terneros, extrapolándose este efecto a humanos (21).

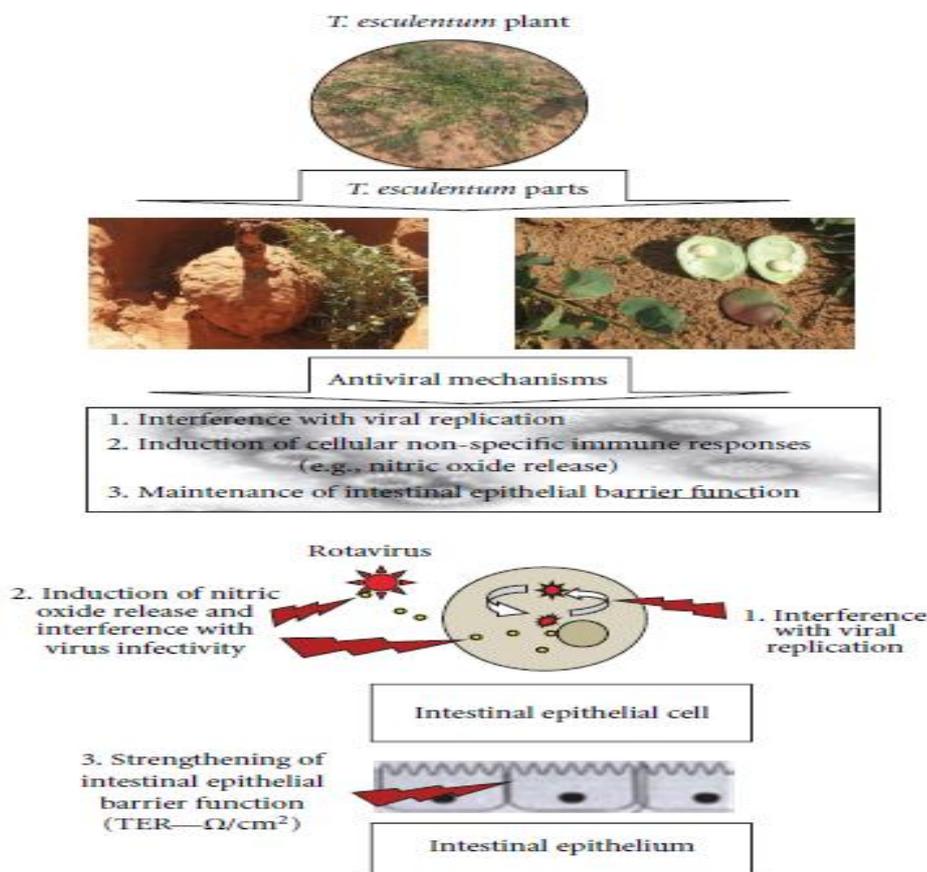


Figura 5. Inhibición del ciclo de replicación. Tomada de Van der Maesen .J, 2006.

Remedios Tailandés con Hierbas efectivos contra la Diarrea

La medicina tradicional es extremadamente importante en China y en otros países asiáticos, en los que según la OMS en algunas poblaciones hasta el 80% de las personas la utilizan para el cuidado de su salud. El Krisanaklan, es un remedio de hierbas tailandés muy común, el cual contiene mayoritariamente ácido tánico, que se utiliza contra la diarrea secretora. Según un estudio realizado, este compuesto produce una inhibición de los canales intestinales de Cl^- sobre las células epiteliales (células T84) en respuesta a la estimulación del cAMP, un activador de la adenilato ciclasa, e IBMX, un inhibidor de la fosfodiesterasa. La IC_{50} para la inhibición de Cl^- fue $<0,01\%$ de Krisanaklan (1:10,000 dilución), obteniéndose una inhibición completa en concentraciones más altas. También se observó que el Krisanaklan inhibía CACC (canales de cloruro de calcio activado) en las células T84 después de la estimulación por el ATP, con $\text{IC}_{50}\% \sim 0.02$ Krisanaklan, por el contrario no inhibió la señalización del cAMP o Ca^{2+} en dichas células T84. Tras el análisis de estos datos fue probada su actividad antisecretora, ya que paraliza la salida de electrolitos de las células, deteniendo la diarrea eficazmente (22).

8. Resultados y discusión

Tras un estudio exhaustivo de la bibliografía correspondiente, se han extraído una serie de factores, datos de toxicidad, efectividad, y utilidad de ciertos extractos de plantas, que se explicarán a continuación.

8.1 Actividad de ciertas plantas frente a los rotavirus y Citotoxicidad:

Uno de los extractos que más se están empleando hoy día por su relación efectividad-toxicidad es *Artocarpus integrifolia*, cuya efectividad % esta entorno al 96,4 % y carece de toxicidad, sólo si se ingiere en exceso puede presentar problemas digestivos como efecto secundario, esta especie es de origen indio conocida también como “jacalina,” debido a las lecitinas tetraméricas glicosiladas que posee responsable de su alto % de efectividad contra los rotavirus. A continuación le sigue *Spondias lutea*, exactamente se utilizan sus semillas y hojas, dónde radica su actividad antiviral. Su % efectividad esta entorno a un 85 %, por lo que es muy efectividad tanto de forma preventiva a través de la alimentación como en terapia de inicio junto con otros tratamientos para paliar los síntomas e inhibir al virus. Esta planta pertenece a la familia de las Anacardiaceae, es nativa de América tropical, incluyendo las Indias Occidentales. En la república de Surinam y en algunos países europeos se emplean como infusión las hojas y se usa como tratamiento para la diarrea. También se emplea para hacer algunas bebidas como jaleas. La semilla posee un contenido graso de 31,5%, la actividad antiviral de esta especie se debe a los elagitaninos que contiene en sus hojas (23), (24).

Table 1
Cytotoxicity and anti-rotavirus activity of medicinal plants used in Brazil against diarrhea

Plant family, scientific name and voucher specimen number	Brazilian name	Plant part	Yield % (w/w)	MNTC ($\mu\text{g/ml}$)	PI	
					HCR3	SA-11
Annonaceae						
<i>Annona squamosa</i> L. (RFA 30816)	"fruta-de-conde"	Leaves	25.0	20.0	43.8	0
Anacardiaceae						
<i>Anacardium occidentale</i> L. (RFA 30820)	"cajueiro"	Leaves	16.2	4.0	25.9	84.5
<i>Spondias lutea</i> L. (RFA 30818)	"cajazeiro"	Leaves	22.8	160.0	97.0	96.2
		Bark	21.7	40.0	82.2	53.2
Lauraceae						
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn (RFA 30704)	"canela-do-Ceilão"	Leaves	19.6	40.0	32.4	16.8
		Bark	5.7	4.0	33.9	55.3
Caesalpiniaceae						
<i>Cassia occidentalis</i> L. (RFA 30705)	"fedegoso"	Leaves	26.7	320.0	68.4	0
Lythraceae						
<i>Punica granatum</i> L. (RFA 30703)	"romãzeiro"	Leaves	22.2	2.0	0	0
Moraceae						
<i>Artocarpus integrifolia</i> L. (RFA 30819)	"jaqueira"	Bark	14.6	480.0	99.2	96.4
Myristicaceae						
<i>Myristica fragrans</i> Houtt ^a	"noz-moscada"	Seeds	17.8	160.0	90.0	0
Myrtaceae						
<i>Syzygium jambos</i> (L.) Alston (RFA 30706)	"jambiro"	Leaves	18.4	20.0	20.6	0
		Bark	17.2	20.0	62.0	16.8
<i>Psidium guajava</i> L. (RFA 30817)	"goiabeira"	Leaves	20.3	8.0	47.5	93.8
		Bark	16.4	4.0	53.2	0
Oxalidaceae						
<i>Averrhoa carambola</i> L. (RFA 30834)	"caramboleira"	Leaves	22.6	20.0	66.8	43.8
		Bark	9.3	4.0	53.2	0

Figura 6. Gonçalves J.L, Lopez R.C, Oliveira D.B et al; "In vitro anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea, "Journal of Ethnopharmacology.

Once especies de plantas pertenecientes a 10 familias son las más utilizados por la población para tratar la diarrea. Se evaluaron diecisiete extractos vegetales acuosos para la citotoxicidad y la actividad antiviral contra el SA-11 (simio) y HCR3 rotavirus (humanos) encontrados con más frecuencia en las células MA-104. Las máximas concentraciones de los extractos variaban en el intervalo de 480 microgramos/ ml y 2 microgramos / ml. Los extractos menos citotóxicos fueron los obtenidos a partir de *Artocarpus integrifolia* (Moraceae) corteza (480 microgramos / ml). Extractos de la hoja de *Punica granatum* y las flores de *Rosa canina* fueron los más citotóxicos, con una concentración no tóxica de 2 g / ml. La actividad antiviral de cada extracto de la planta en el MNTC (máxima concentración no tóxica) se puede observar en la Tabla 1. Los extractos de plantas que presentaban una inhibición mayor del 80%, se consideraba que tenían actividad anti-rotavirus. Según este criterio, los extractos de la corteza de *Artocarpus integrifolia* (96,4%), las semillas de *Myristica fragrans* (90%), las hojas de *Lutea Spongias* (97%) y la corteza (82,2%) fueron capaces de inhibir la propagación de rotavirus humano in vitro en porcentajes muy elevados (24).

8.2 Efecto inhibitorio de una serie de extractos de plantas:

Partiendo de dieciséis tipos de extractos diferentes, que pudieran presentar actividad inhibitoria frente al virus, y por tanto resultar útil, sólo cinco de ellos tienen una fuerte actividad frente a rotavirus (IC₅₀ < 300 g / ml), y once una actividad moderada (CI₅₀ entre 300 y 550 g / ml), según los datos obtenidos Journal Virology (24). Las barras representan el promedio de análisis por duplicado + SD.

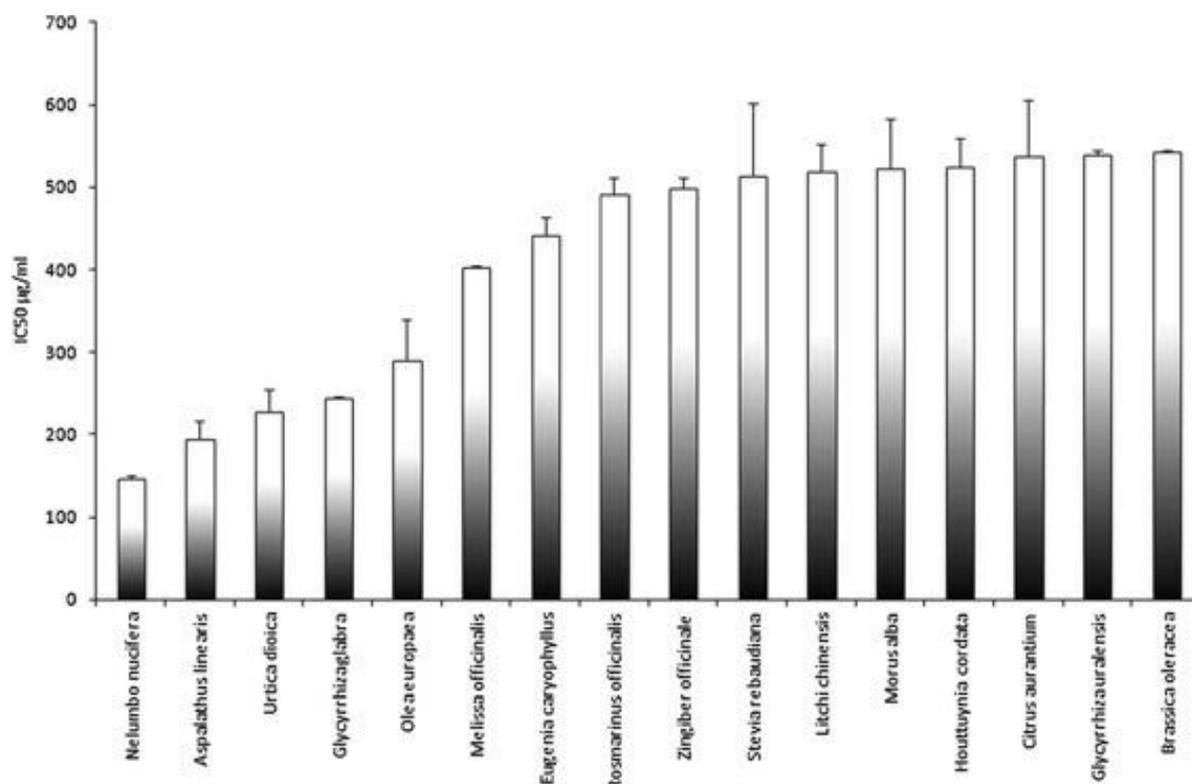


Figura 7. Tomada de Goncalves L.J, Lopez R.C, Oliveira D.B et al; "In vitro anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea, "Journal of Ethnopharmacology".

8.3 Sinergia entre diferentes combinaciones de plantas:

El regaliz deriva de la raíz de la hierba perenne *Glycyrrhiza spp.*, además de su uso como un agente edulcorante, ha sido una de las plantas medicinales más ampliamente utilizada. Los componentes farmacológicamente activos que más han sido estudiados incluyen: saponinas, triterpenos, glicirricina (GA), y el ácido 18β-glicirretínico (GRA), es el producto de la hidrólisis de la GA en el intestino mediada por las glucoronidasas bacterianas. Tanto la GA como el GRA han sido estudiados en varios sistemas para evaluar sus propiedades inmunomoduladoras. Los mecanismos de acción in vivo del extracto *Glycyrrhiza* son multifactoriales, demostrándose que la GA reduce la replicación del virus. Actuando directamente en las etapas de adsorción, penetración y

maduración de las partículas del ciclo de replicación y, en algunos casos, sobre la inactivación directa de partículas de virus. Según un reciente estudio realizado por la virology Journal (25) (Knipping et al. Virology Journal 2012). Hay una serie de plantas que poseen mayor actividad inhibitoria en combinación junto con otras que de forma individual como son el caso de: *Glycyrrhiza* junto *Nelumbo* o este con la *Urtica*. Los extractos por separados fueron probados en su concentración IC50, y las combinaciones se hicieron de la concentración IC25 de los extractos. La inhibición se calculó en contra del control de la infección viral (RRV: 100 %). Estos extractos tienen actividad antiviral frente a rotavirus, actuando en algunos de los mecanismos de replicación del virus, sólo pueden emplearse como medida preventiva en algunos países o para disminuir la virulencia del virus en ciertos casos o situaciones. Se representa la sinergia de la actividad antiviral en dos combinaciones. En la A *Glycyrrhiza glabra* L. + *Nelumbo nucifera* y en la B *Urtica dioica* L. + *Nelumbo nucifera*. Las barras representan la media de los valores por triplicado + SD. (26), (27),(28).

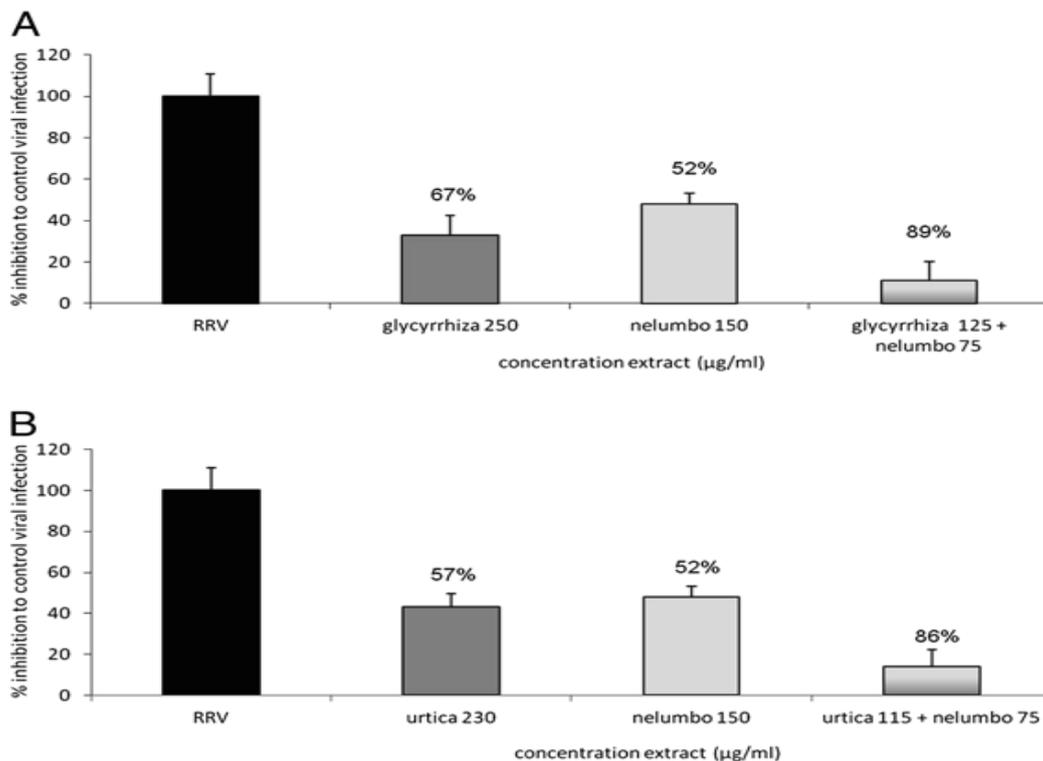


Figura 8. Tomada de Goncalves L.J, Lopez R.C, Oliveira D.B et al; "In vitro anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea, "Journal of Ethnopharmacology".

8.4 Diferencia entre los extractos de *T. esculentum*:

Los extractos de *T.esculentum* muestran la inhibición directa de la infectividad del rotavirus en las células del epitelio intestinal bovino (CIEB), de las células epiteliales intestinal del cerdo (CLAB), y células epiteliales intestinales humanas (H4). Abajo se muestran las barras de % de supervivencia

de las células epiteliales y la viabilidad después de la pre-exposición de rotavirus a los extractos *T. esculentum* frente al rotavirus. En cada uno de los pocillos con los diferentes extractos, se observa el efecto inhibitorio de estos extractos frente al rotavirus, mostrándose una variedad en los efectos de un pocillo a otro (21).

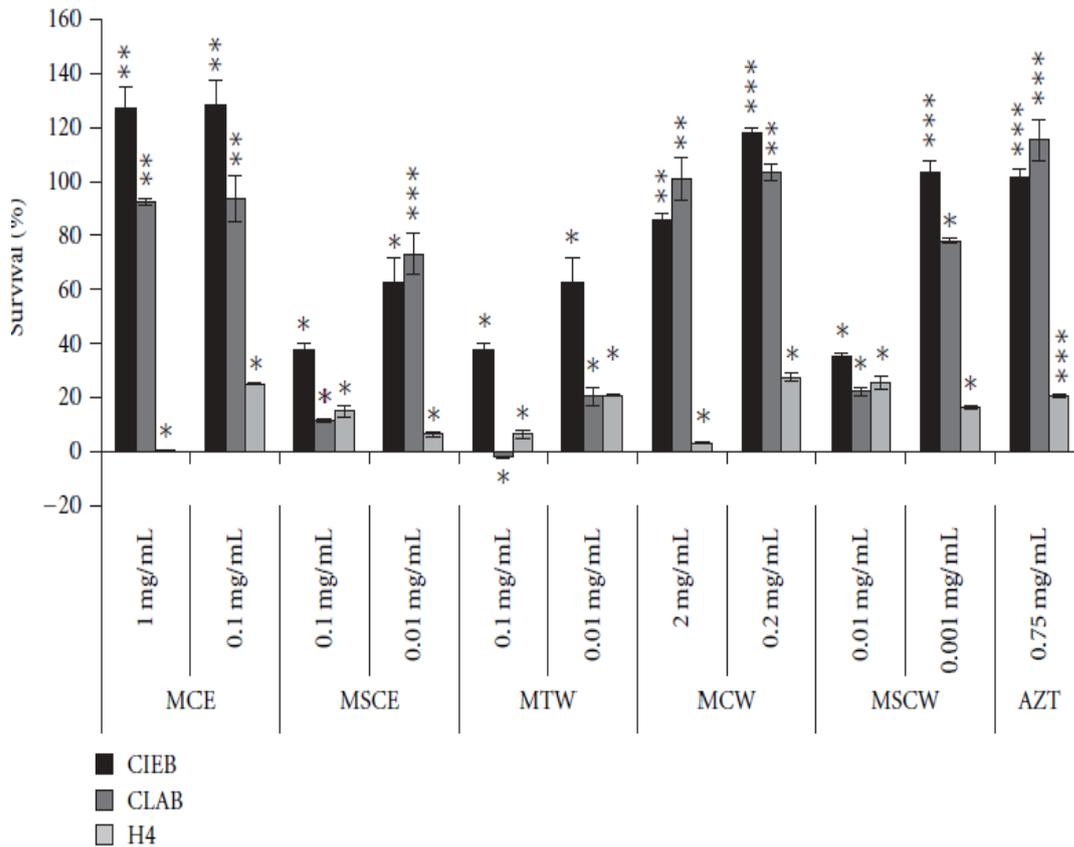


Figura 9 Tomada de Walter Chingwaru, T.Majinda Runner, Yeboah Sam O, Jackson Jose. *Tylosema esculentum* (Marama) Tuber and Bean Extracts Are Strong Antiviral Agents against Rotavirus Infection.

ABREVIATURAS

- CLAB:** Pig small intestine epithelial cell line
- MCE:** *Tylosema esculentum* (marama) cotyledon
- CIEB:** Bovine small intestine epithelial cell line
- H4:** Human small intestine epithelial cell line
- AZT:** Combivir (lamivudine and zidovudine)
- MSCE:** *Tylosema esculentum* (marama) seed coat ethanolic extract
- MTW:** *Tylosema esculentum* (marama) tuber water extract
- MCW:** *Tylosema esculentum* (marama) cotyledon water extract
- MSCW:** *Tylosema esculentum* (marama) seed coat water extract

9. Conclusión

La diarrea es una de las enfermedades más comunes durante la infancia de los niños, cerca del 85 % presenta como agente causal un virus, concretamente un rotavirus, por lo que tiene una tasa de propagación entre la población infantil muy alta, sobre todo en guarderías puesto que hay un mayor contacto. Esto hace que cada vez más padres preocupados por cómo prevenir la enfermedad, recurran a la vacuna, la cual no está incluida en el calendario propuesto por el sistema nacional de salud y esto hace que en los países pobres, con pocas opciones terapéuticas tengan que optar por otra medida de prevención más económica y de efectividad similar a la vacuna y por tratamientos alternativos, como es la terapia con extractos de plantas: el *T. eculentum*, *Myristica fragrans*, *Artocarpus integrifolia*, *Lutea Spongias* ... Cuyo mecanismo de acción consiste en interferir en el mecanismo de replicación del virus y en mantener la barrera epitelial intestinal. Para paliar los síntomas también existen numerosas plantas medicinales que se emplean como he indicado previamente con una mayor frecuencia entre la población más desfavorecida, puesto que en ocasiones es su única opción. Se ha demostrado que son muy efectivos para cortar la diarrea y disminuir el tiempo de duración, ya que contienen en abundancia taninos, los cuáles son muy astringentes ejerciendo esa acción sobre la mucosa intestinal. Entre ellas se encuentran: *Cedrón*, *Agrimonia*, *Gayuba*, *Espino blanco*, *Tormentilla*, *Acai*, *Diente de león*, *Algarrobo* ... En cambio en los países industrializados no son la primera opción, ya que tienen más fácil otros tipos de tratamientos convencionales y un sistema sanitario muy avanzado, por lo que es extraño que un niño muera, dado que cuentan con importantes medios a su alcance.

En mi opinión las plantas continúan siendo nuestra oportunidad para encontrar solución a problemas de salud pública actuales, siempre estarán a nuestro alcance, siempre se podrá descubrir algo nuevo de ellas...

10. Bibliografía

1. World Health organization (WHO). Child mortality by cause among children aged 1-59 months. Part epidemiological diary of the OMS/ dc 10 August 2007. Available at: <http://www.who.int/healthinfo/statistics/mortality-child-cause/index.htm>.
2. López Pío, Cáceres DC, López Medina E. Enfermedad por rotavirus, características epidemiológicas, clínicas, manejo y prevención, vol: 6, no.2, pp. 41-62, 2004.
3. Parashar VD, Bresee SJ, Gentsch RJ, and Glass RI. "Rotavirus". *Emerg Infect Dis*, (4), pp. 561-570, 1998.
4. Napeert G, Barrios JM, Zello GA, Naylor JM. Oral rehydration solution therapy in the management of children with rotavirus diarrhea. *Nutr Rev*; 2000 Mar; 58 (3 pt1): 80-7.
5. Hart CA, Cunliffe Na. Viral gastroenteritis. *Curr Opin Infect Dis*; 1999; 12 (5): 447-457.

6. Miño S, Kern A, Barrandeguy M, Parreño V. Comparison of two commercial kits and an in-house Elisa for the detection of equine rotavirus in foal feces. *J. Viral Methods*, 2015 May 13.
7. Hibbs B.F, Moro P.L, Lewis P, Miller E.R, Shimabukuro T. Vaccination errors reported to the vaccine adverse event reporting system, United States, 2000-2013. *Vaccine*, 2015;(15) 00620-9.
8. Estes MK, Kapikian AZ, Knipe IN, Griffin DM, Lamb D, Stans R; et al *Fields virology*.5.vol.2 Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. Rotavirus; p.1917-4.
9. Bernstein DI. Rotavirus overview. *Pediatr Infect Dis J*.2009 Mar;28(3 Suppl):S50-3
10. Ianiro G, Delogu R, Fiore L, Ruggeri FM. Genomic characterization of common human GP3 (6) rotavirus stains causing diarrhea in Children in Italy in 2009. *Infect Genet Evol*. 2015; 51567-1348 (15) 00157-4.
11. Parashar V.D, Gibson C.j,Bresee JS, Glass RI. Rotavirus and Severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 2006; 12:304-306.
12. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J, Parashar V.D. Estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus in 2008. *Vaccin progra. Expert Opin Biol Ther*.2009; 9(9): 1235-1240.
13. El Mundo de las plantas (Internet). Listado de plantas medicinales. Disponible en:www.botanical.online.com
14. Temas farmacognosia (Internet). Plantas medicinales. Disponible en: www.plantas-medical-farmacognosia.comBruneton, J. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales. 2ª Educación. Zaragoza. Acribia, S.A (2001).
15. Buzzini, P, Arapitsas M. Goretti et al. “Antimicrobial and antiviral activity of hydrolysable tannis”, *Mini- Reviews in Medical Chemistry*, (8),12, pp. 1179-1187, 2008 .
16. Subbotina MD, Timchenko VN, Vorobyov MM, KonunovaYS, Aleksandrovih YS, Shushunov S. Effect of oral administration of tormentil root extract (*Potentilla tormentilla*) on rotavirus diarrhea in children: a randomized, double blind, controlled trial. *Pediatr Infect Dis J*. 2003 Aug; 22(8):706-11.
17. EMA: Agencia europea del medicamento (Internet). *Olea europa* .Disponible en:www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_HMPC_assessment-report/2012/04/wc500125459paf
18. Ka Lan Tom and Michael R.Rpner. “Chatacterization of in vivo anti.rotavirus activities of saponin extracts from *Quillaja Saponaria*”. Published in find edited form as: *Antiviral Res*. 2011; 90 (3): 231-241.
19. Kazuo Takahashi, Masahiro Matsuda, Kazutaka Ohashi, Koki Taniguchi, Osamu Nakagomi, Yurika Abe, Shuichi Mori, Naohiko Sato, Koichi Okutani, Shiro Shigeta. Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *STEVIA REBUDIANA*. *Antiviral Research*. 2001 JAN; 1(49):15-24.
20. *T. esculentum* (Marama) Tuber and Bean Extracts Are Strong Antiviral Agents against Rotavirus Infection. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* (11), pp 11, 2011.
21. Van der Maesen LJG. “ *T. esculentum* (Burch) A, Schreib, “in Protal: Cereals ans Pulses, M.Brink and G. Belay, Eds; Wageningen, The Netherlands, Protal, 2006.
22. Tradtrantip L, Ko EA, Verkman AS. Antidiarrheal efficacy and cellular mechanisms of a Thai herbal remedy. *PLoS Negl Trop Dis*.2014 Feb 13;8(2):e2674.

23. Knipping Karen, Garssen Johan and van Land Berlinda. An evaluation of the inhibitory effects against rotavirus infection of edible plant extracts. *Virology journal* 2012; <http://www.virologyj.com>
24. Cecilio AB, de Faria DB, Oliveira PD, Caldas D, de Oliveira DA, Duarte MG, Moreira CP. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. *J. Ethnopharmacol.* 2012 Jun 14; 141 (3): 975-81
25. Pompei R, Flore O, Marcialis MA, Pani A, Loddo B. Glycyrrhizic acid inhibits virus growth and inactivate virus particles. *Nature* 1979, 281:689-690.
26. Goncalves J, Lopez RC, Oliveira DB et al; "In vitro anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea. "Journal of Ethnopharmacol.", (99), no.3, pp.403-407, 2005.
27. Michele E, Hendricks MJ, Paulson MJ and Faunce N. 18 β -glycyrrhetic acid inhibits rotavirus replication in culture. *Virology journal* 2012; <http://www.virologyj.com>.
28. Talukder MJ, Nessa J. Effect of *Nelumbo nucifera*, rhizome extract on the gastrointestinal tract of rat. *Bangladesh Med Res. Council Bull.* 1998 Apr; 24 (1): 6.