

ISSN 0716-8756



INFORMACION TECNOLOGICA

REVISTA INTERNACIONAL

SEPARATA



Plaza de Armas, La Serena - Chile

EMPLEO DE TECNICAS Y MATERIALES BIOLÓGICOS EN LA BUSQUEDA DE PRODUCTOS ACTIVOS CONTRA LA MALARIA

M. Chinchilla, O. M. Guerrero (1), G. Tamayo (2) y A. Sittenfeld (3)

Univ. de Costa Rica, (1) Fac. de Microbiología, Depto. de Parasitología (CIET), (2) Esc. de Química, (3) Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), San José - Costa Rica

RESUMEN

Se describen los métodos empleados en el estudio del efecto de extractos de insectos preparados en el Instituto Nacional de Biodiversidad de Costa Rica, sobre un tipo de malaria murina producida por el *Plasmodium berghei*. Fueron estudiados un total de 306 extractos de varios artrópodos. Tratamientos posteriores permitieron obtener dos extractos: hidroalcohólico (Et-1) y orgánico medianamente polar (Hex-2). Fueron utilizados ratones blancos (NGP) para el mantenimiento de los parásitos y la realización de pruebas *in vivo*, en donde se usó el colorante azul de cresil brillante para determinar la muerte de los parásitos causado por los extractos en cuestión. Se llegó a establecer que la supervivencia, el hematocrito y la parasitemia, fueron parámetros bastante eficaces para demostrar el efecto de algunos extractos.

ASSESSMENT OF TECHNIQUES AND BIOLOGICAL MATERIALS IN THE QUEST OF EFFECTIVE ANTI-MALARIAL PRODUCTS

ABSTRACT

Different methods used in the study of the effects of insect extracts prepared at the National Biodiversity Institute of Costa Rica against murine malaria produced by *Plasmodium berghei*, are described. A total of 306 extracts from various arthropods were studied. Later treatments allowed obtaining two extracts: hydroalcoholic (Et-1) and a moderately polar (Hex-2). White mice (NGP) were used to harbor the parasites and for *in vivo* testing, where cresil brilliant blue dye was used to determine death of parasites produced by the extracts being tested. It was found that survival, hematocrite, and parasitemia were highly efficient parameters for demonstrating the effects of some extracts.

Keywords: malaria treatment, anti-malarial, arthropod extracts, Plasmodium berghei

INTRODUCCION

Actualmente existe una tendencia hacia el estudio de productos de origen natural, en busca de posibles agentes terapéuticos contra diferentes protozoosis. Es el caso de los trabajos en relación con leishmaniasis (Hazra *et al.*, 1987; Croft *et al.*, 1985; Fournet *et al.*, 1992), con tripanosomiasis americana (Pinto *et al.*, 1987; Rojas de Arias *et al.*, 1990) pero sobre todo en cuanto a la malaria, muchos estudios se han realizado al respecto (O'Neill *et al.*, 1985; Arnold *et al.*, 1990; Basco *et al.*, 1993), relacionados especialmente con el uso de compuestos de la artemisinina en el tratamiento de esta enfermedad.

En Costa Rica se iniciaron hace unos años (Benavides, 1991) los primeros estudios en donde se establecía que *Cedrela tonduzii* ejerce un efecto curativo sobre la malaria murina. Posteriormente Castro *et al.*, (1996), evaluaron química y biológicamente la actividad de varias plantas sobre la infección experimental de ratones blancos con *Plasmodium berghei* y Chinchilla *et al.*, (1998) describieron el diseño experimental que se ha empleado y se viene usando en otros estudios similares.

A raíz de varios trabajos que se realizan en Costa Rica, dirigidos fundamentalmente a la realización de un inventario de la biodiversidad de este país y a la búsqueda de usos sostenibles para recursos biológicos (Sittenfeld y Villers, 1993) coordinados por el Instituto de Biodiversidad (INBio), surgió un proyecto colateral tendiente a encontrar productos activos antimaláricos presentes en los artrópodos encontrados en el Área de Conservación Guanacaste, localizada en el Noroeste del país y que forma parte del Programa de "International Cooperative Biodiversity Groups" (Grifo, 1996). Para determinar la actividad de tales productos se determinaron algunos métodos de laboratorio *in vivo* e *in vitro*, algunos de los cuales son modificaciones de lo previamente publicado (Chinchilla *et al.*, 1998); además otras técnicas son aplicadas por primera vez en estos estudios. Una descripción de tales análisis y algunos hallazgos previos que corroboran la utilidad de la mencionada metodología, son la base de la presente publicación.

MATERIAL Y METODOS

Extractos de insectos

Fueron estudiados un total de 306 extractos de varios artrópodos cuya clasificación taxonómica se informa en los correspondientes cuadros informativos de resultados. Las muestras de insecto se recolectaron en el Área de Conservación Guanacaste, Provincia de Guanacaste, Costa Rica. Se depositaron especímenes testigo de la colecta en la colección de insectos del Instituto Nacional de Biodiversidad.

Las muestras congeladas se liofilizaron, homogeneizaron y se extrajeron con una mezcla diclorometano/metanol 2:1 (8 h), etanol 95% (16 h) y agua (8 h). El extracto etanólico se particionó entre diclorometano y agua y las particiones obtenidas se combinaron con los extractos diclorometano/metanol y agua respectivamente. Los disolventes orgánicos se evaporaron en un evaporador rotatorio y el agua fue eliminada mediante liofilización. Los dos extractos obtenidos se pesaron y almacenaron a -20 °C. Estos dos extractos por muestra de insecto recolectada fueron clasificados como hidroalcohólico (Et-1) y orgánico medianamente polar (Hex-2).

Animales y parásitos

Ratones blancos de la cepa NGP y de un peso de 20 a 25 g fueron usados para el mantenimiento de los parásitos y en la realización de las pruebas *in vivo*. Una cepa de *P. berghei* debidamente caracterizada (NK-strain. Dept. of Health Education and Welfare National Institute of Health) y que se mantiene en el laboratorio de Protozoología por pasajes semanales en ratones, fue usada en los experimentos en concentraciones de 10⁶ parásitos por animal.

Modelos de experimentación

Para el estudio *in vivo*, grupos de 5 animales fueron inoculados vía subcutánea con 10⁵ formas evolutivas de *P. berghei* y luego tratados con los extractos de insectos comenzando el tratamiento 2 días antes de la infección y continuándolo durante 7 días más después de ella. Los extractos liofilizados fueron diluidos 1:300 (p/v) y se les inoculó a los animales. Para determinar la existencia de cualquier efecto de los extractos sobre el parásito en estudio, los siguientes parámetros fueron establecidos:

a) Supervivencia. Los animales fueron revisados diariamente (por la mañana y por la tarde) con el fin de establecer los días que sobrevivían a la infección. Para establecer la verdadera diferencia en la supervivencia de los animales tratados con los extractos en comparación con los correspondientes controles, se estableció la siguiente fórmula para calcular el porcentaje de la diferencia en la supervivencia (%DS).

$$\%DS = \frac{D(Sx - Sc) \times 100}{Dc(ST - Sc)}$$

En donde:

D: diferencia

Sx: Supervivencia en días de los animales tratados con un determinado extracto.

Sc: Supervivencia en días de los animales control (no tratados).

Dc: Diferencia entre la supervivencia total o máxima de 30 días (límite de tiempo en el experimento) y el control.

St: Supervivencia total (30 d).

b) Parasitemia. Los ratones fueron sangrados de la cola dos veces por semana con el objeto de preparar extendidos que fueron fijados con alcohol metílico y teñidos con el colorante de Giemsa (10% en buffer pH 7.2). En estas muestras sanguíneas se determinó el número de glóbulos rojos infectados, calculándose el correspondiente índice de infección en comparación con los respectivos controles: animales no tratados como control negativo y animales tratados con cloroquina como control positivo.

c) Hematocrito. Igualmente los animales fueron estudiados dos veces por semana determinando por medio del uso de microhematocrito leído en una centrífuga (IEC MB), la concentración globular que indica el grado de anemia, aspecto muy importante en esta enfermedad.

Estudios previos (Chinchilla *et al.*, 1998) indicaron que los extractos por sí solos no alteraron los parámetros aquí escogidos, por lo que, aparte de un control general para ratificar esto, no se consideró necesario incluir ratones inoculados sólo con el extracto en todos los experimentos.

En el estudio *in vitro*, 0.005 g de cada extracto liofilizado fue disuelto en 500 µl de DMSO al 10%, en solución salina al 0.85%, se hicieron diluciones dobles partiendo desde 1:10 y luego, 50 µl de los mismos se mezclaron con 200 µl de sangre de ratón cuyos glóbulos rojos estaban infectados en un 50%, en una concentración del 3 al 5% en medio de cultivo de células (MEM+10% de suero fetal bovino). Las muestras así tratadas se incubaron a 37° C durante 2 horas. Como control positivo se utilizó la cloroquina y como control negativo la sangre con DMSO.

Después del tiempo de incubación, la muerte o no de los parásitos fue determinada por medio del colorante azul de cresil brillante a una concentración del 1% (1 g del colorante, 0,9 g de NaCl y 0,48 g de citrato trisódico). La dilución en que se observó un porcentaje de muerte menor al 50% de los parásitos se consideró negativa para todos los efectos de titulación de la eficiencia del extracto en estudio. Se consideraron con algún grado de actividad promisorio, los extractos que mostrara efecto contra el *Plasmodium* en una dilución mayor a 1:40.

RESULTADOS

En las figuras 1 y 2 se presentan los resultados del estudio de la supervivencia en un experimento típico *in vivo*.

En la fig. 3 se muestra un estudio de parasitemia en los animales; la curva del hematocrito en los

animales del mismo experimento se visualiza en la fig.4.

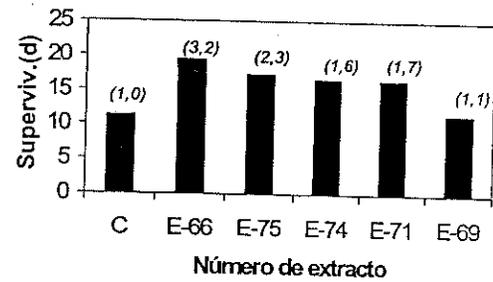


Fig. 1: Ejemplo típico de la determinación de la supervivencia de animales infectados con *P. berghei* y tratados con varios extractos. Se muestra la desviación estándar para cada columna en *italica* y entre paréntesis.

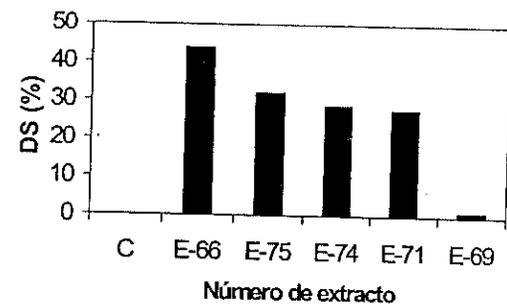


Fig. 2: El mismo experimento de la Fig. 1, determinando el factor diferencia de la supervivencia (DS), con respecto al control.

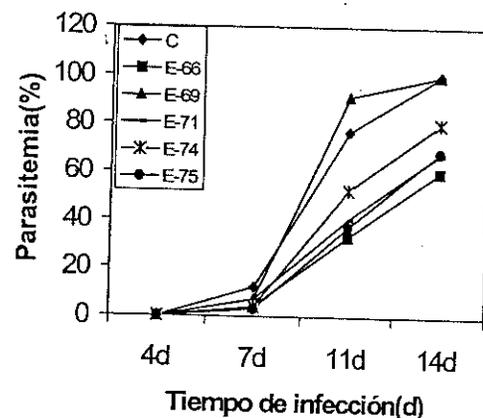


Fig. 3: Curvas típicas de parasitemia por *P. berghei* en el mismo experimento típico (Desviación estándar para todos los puntos entre 2,6 y 5,4).

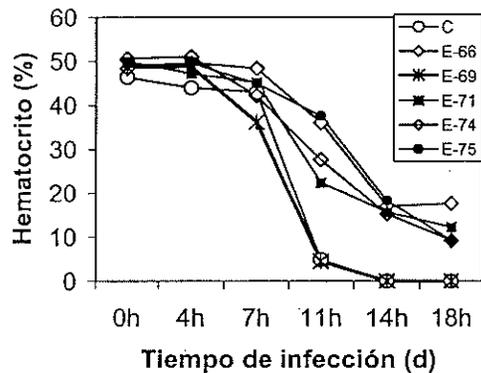


Fig. 4: Patrón seguido en el estudio de hematocrito de animales tratados y no tratados con extractos (Desviación estándar para todos los puntos de 0,3 a 0,8).

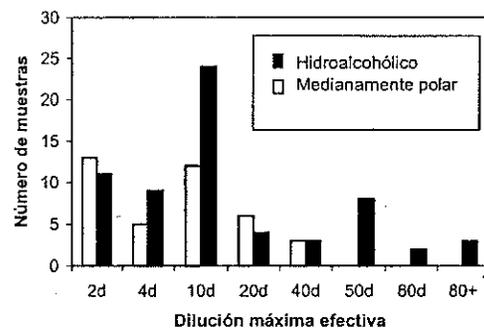


Fig. 5: Número de extractos con algún efecto *in vivo* sobre el *P. berghei* demostrado por los diferentes índices de supervivencia (véase material y métodos).

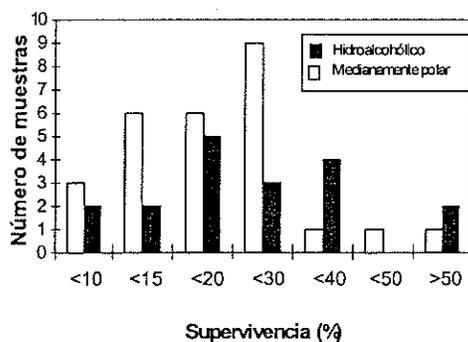


Fig. 6: Número de extractos con algún efecto *in vitro* sobre el *P. berghei* de acuerdo con la dilución máxima efectiva (véase explicación en el texto).

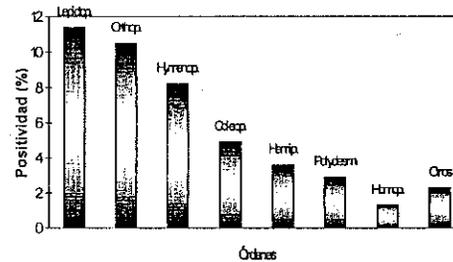


Fig. 7. Distribución de positividad de los extractos de acuerdo con los órdenes de Arthropoda estudiados.

Como se puede observar en tales figuras, existen diferencias entre los animales infectados con *P. berghei* tratados y no tratados con algunos extractos de artrópodos. Ejemplos de la positividad total de todos los órdenes de artrópodos estudiados de acuerdo a los métodos *in vivo* (fig.5) e *in vitro* (fig. 6) se presentan para dar una idea general de los resultados obtenidos.

Nótese que el gráfico del estudio *in vivo* indica el número de extractos que produjeron supervivencias con un %DS menor a 10 (-10), y así hasta más de 50. La mayor cantidad de extractos queda en el ámbito de menos de 15 a menos de 30, pero las muestras con índices arriba de 40 son bastante promisorias para el efecto en estudio. En el estudio *in vitro* el mayor número de muestras con alguna acción antiparasitaria presentó una positividad en la dilución 1:10, pero también existen algunos extractos cuyo efecto todavía se mantenía en diluciones mayores a 1:40 similar al efecto debido a la Cloroquina, lo que los hace muy interesantes.

Un resumen de lo encontrado en los 306 extractos en estudio en cuanto a la positividad total se refiere, se presenta en la fig. 7.

Es notoria la predominancia de extractos positivos provenientes de ejemplares del Orden Lepidoptera. Detalles de otros resultados se presentarán en trabajos posteriores dedicados a discutir las posibilidades terapéuticas de aquellos componentes promisorios encontrados.

DISCUSION

Los métodos para el estudio del efecto de drogas sobre los parásitos de la malaria humana han sido estandarizados por la Organización Mundial de la Salud (WHO,1984), especialmente usando Cloroquina, que ha sido la droga comúnmente empleada como fármaco tipo de comparación.

Con el advenimiento de los cultivos de *Plasmodium falciparum* en eritrocitos (Trager y Jensen, 1976; Chin, 1979), los métodos se refieren a los análisis que se hacen *in vitro*, lo cual estandariza

óptimamente cualquier determinación del efecto de la droga en estudio. Sin embargo, tales métodos presentan algunas dificultades técnicas difíciles de solventar en un país como el nuestro. Por lo tanto se hace necesario el establecer técnicas ya probadas en otros lugares, tal como han sido descritas o modificadas según los objetivos perseguidos. En nuestro país no se cuenta con la posibilidad de realizar cultivos de las especies de malaria humana, además de que no es factible realizar ningún tipo de experimentación *in vivo* en el hombre. Por ello se ha recurrido al modelo de malaria murina usando el *P. berghei* como parásito de prueba, modelo que ya ha sido desarrollado con el propósito de estudiar la actividad de ciertos fármacos antimaláricos (Fletcher y Sarikabhuti, 1978). Esta especie de *Plasmodium* es de muy fácil mantenimiento en el laboratorio lo que ayuda en los estudios realizados con ella. Además ya ha sido utilizado para probar el efecto antimalárico *in vivo* de varias plantas (Krettli *et al.*, 1993).

Este modelo *in vivo* tiene la ventaja, a nuestro juicio, de que determina lo que realmente sucede en el animal como un todo, incluyendo todos los efectos fisiológicos inherentes al ser vivo. Así, la prueba de cualquier sustancia para determinar algún efecto sobre un parásito determinado, parece ser más real. Sin embargo, existen inconvenientes del método como lo son las cantidades de sustancia a probar que se necesitan, generalmente bastante considerables, además del número y calidad de los ratones que se utilizan en el proceso. Por ello se ha tenido que realizar paralelamente el modelo *in vitro* anteriormente descrito y que a pesar de ser relativamente simple, es bastante confiable pues está basado en el uso de colorantes vitales que indican la viabilidad celular. Tiene la desventaja de que al ser un análisis llevado a cabo fuera del organismo viviente, carece de todos los factores fisiológicos mencionados en el modelo *in vivo*. En este estudio, se nota entonces una diferencia importante entre la positividad encontrada según cada uno de los métodos y en cada uno de los órdenes de artrópodos estudiados (Fig. 7).

Los hallazgos de extractos activos contra *P. berghei*, correlacionaron en porcentajes superiores al 80% con los estudios realizados en el Instituto Walter Reed Army Research Institute de los Estados Unidos, usando *P. falciparum* como parásito y los mismos extractos por nosotros estudiados. Se debe señalar que existen diferencias importantes entre los resultados que se presentan para los extractos, producto de métodos de extracción diferentes. Así, el porcentaje de sustancias aparentemente activas contra el parásito, no es igual, aún si provienen del mismo orden de artrópodos, si la extracción es alcohólica o de otro tipo (Figs. 5 y 6). Para facilitar los extractos se separaron en dos tipos: alcohólico polar (Et-1) y hexánico no polar (Hex-2), incluyéndose en este último caso también lo extraído con diclorometano. La contradicción en la actividad encontrada podría deberse a

que dadas las diferencias en reactivos y procesos de extracción, los componentes obtenidos son diferentes por lo que la actividad antiparasitaria también debe ser diferente. Por otro lado existen algunos problemas de solubilidad, especialmente en los extractos no alcohólicos, por lo cual se podría perder parte del efecto buscado. Además, las diferencias experimentales propias de los modelos *in vitro* e *in vivo* también producen variables importantes.

Los resultados preliminares obtenidos en estos experimentos, indican que existen algunas sustancias extraídas de artrópodos que muestran algún efecto antiparasitario, demostrado por lo menos en el caso de las infecciones de malaria murina. Dado que los artrópodos de algunos de los órdenes estudiados se alimentan de plantas, el efecto podría proceder de componentes de estas últimas, ya que como se ha demostrado, algunas especies vegetales por nosotros estudiadas (Castro *et al.*, 1996) presentan un efecto antimalárico importante. Además de que se han realizado algunos estudios relacionados con la de actividad antibacteriana (Salvatore *et al.*, 1998), se llevan a cabo otros análisis tendientes a confirmar los hallazgos para malaria, así como a determinar si tales extractos tienen también algún efecto contra otros parásitos intracelulares tales como *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania sp.*

CONCLUSION

Después de todo este proceso experimental, se llegó a establecer que la supervivencia, tanto en números absolutos como calculado en porcentaje respecto al control, así como el hematocrito y la parasitemia, fueron parámetros bastante eficaces para demostrar el efecto de algunos extractos con *P. berghei in vivo*. Además, los extractos que presentaron alguna actividad provenían de los órdenes de artrópodos Lepidoptera, Orthoptera, Hymenoptera, Polydesmida y Homoptera. Tal efecto fue más evidente en diluciones de 1:10 (p/V), pero en algunos casos la actividad fue observada aún en diluciones mayores. Estas investigaciones abren una nueva línea de investigación en un campo hasta ahora inexplorado, que podría concluir con el análisis de las plantas hospedadoras de los artrópodos positivos en cuestión.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al personal del Área de Conservación Guanacaste y al personal del INBio: Priscilla Hurtado, Vanessa Nielsen, Alberto Jiménez y Allan Jiménez su participación activa. Este trabajo se realizó con financiamiento del grant número 5U01TW/CA00312 de National Institutes of Health y está inscrito en la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica con los números VI 430-91-589 y 801-96-582.

REFERENCIAS

- Arnold, K., Hien, T. T., Chinh, N.T., Phu, N. H. Y P.P. Mai. A randomized comparative study of artemisinin (qinghaosu) suppositories and oral quinine in acute falciparum malaria. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*:84, 499-502 (1990).
- Basco, L.K. y J. Le Bras. In vitro activity of artemisinin derivatives against african isolates and clones of *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49, 301-307 (1993).
- Benavides, M.E. Efecto antimalárico de un extracto de *Cedrela tonduzii*, Meliaceae. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica (1991).
- Castro, O., Barrios, M., Chinchilla, M. Y O. M. Guerrero. Evaluación química y biológica del efecto de extractos de plantas contra *Plasmodium berghei*. *Rev. Biol. Trop.* 44(2), 361-367 (1996).
- Croft, S.L., Evans, A.T., y R.A. Neal. The activity of plumbagin and other electron carriers against *Leishmania donovani* and *Leishmania mexicana amazonensis*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*: 79, 651-653 (1985).
- Chin, W. A method for large volume cultivation of malaria parasites based on the principle of the Trager-Jensen culture method. *Trans. Roy.Soc. Trop. Med. Hyg.* 73, 334-335 (1979).
- Chinchilla, M., Guerrero, O.M., Abarca, G., Barrios, M y O. Castro. An *in vivo* model to study antimalaric capacity of plant extracts. *Rev. Biol.Trop.* 46,35-39 (1998).
- Fletcher, K.A. y B. Sarikabhuti. Lack of Cloroquine inhibition of erythrocytic glucose-6-phosphate dehydrogenase in malaria (*Plasmodium berghei*). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 72, 489-490 (1978).
- Fournet, A., Angelo, A., Muñoz V., Roblot, R.H. y A. Cavé. Biological and chemical studies of *Pera benensis*, a Bolivian plant used in folk medicine as a treatment of cutaneous leishmaniasis. *J. Ethnopharmacol.* 37, 159-164 (1992).
- Grifo, F.T. Chemical Prospectivy: An overview of the International Cooperative Biodiversity, biotecnologya and sustainable development in health and agriculture. emerging connectious Washington, D.C. PAHO. Scientific Publication 560. pp 12-26 (1996).
- Hazra, B., Saha, A.K., Ray, R., Roy, D.K., Sur, P. y A. Banerjee. Antiprotozoal activity of diospyrin towards *Leishmania donovani* promastigotes in vitro. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*: 81, 738-741 (1987).
- Krettli, A.U., M.G.L. Brandas, L.H. Carvalho, A.E.G. Santana, A.J. Lapa, H. Marinuzzi y L.R. Soares. Antimalarial activity of plants used as remedies in Brazil tested against *P. falciparum* in vitro or in mice with *P. berghei*. *Cec/Latin American Conference*. Pag. 39 (1993).
- O'Neill, M.J., Bray, D.H., Boardman, P., Phillipson, J.P. y D.C. Warhurst. Plants as sources of antimalarial drugs. Part. 1. In vitro test method for the evaluation of crude extracts from plants. *Planta Médica*: 47, 394-398 (1985).
- Pinto, A.V., Ferreira, V.F., Capella, R.S., Gilbert, B., Pinto, M.C.R. y J.S. da Silva. Activity of some naphthoquinones on bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*: 81, 609-610 (1987).
- Rojas de Raias, A. Inchausti, A. Y A. Fournet. Activity in vitro de produits naturels sur les trypomastigotes de *Trypanosoma cruzi*. *7eme Congrès Interntational de Parasitologie, Paris* (1990).
- Salvatore, M.J., King, A.B., Graham, A.M., Onishi, R., Bartizal, K.F., Abruzo, G.K., Gill, Ch.J., Ramjit, H.G., Pitzemberger y K.M. Witherup. Antibacterial activity of Lonchocarpol A.J. *Nat. Prod.* 61:640-642 (1998).
- Sittenfeld, A. y R. Villers. Exploring and preserving biodiversity in the tropics: The Costa Rican case. *Current Opinion in Biotechnology* 4:280-285 (1993).
- Trager, W. Y J.B. Jensen. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*: 193, 673-675 (1976).
- WHO. Advances in malaria chemotherapy. Report of a WHO Scientific Group. Technical report series. No. 71 (1984).