

## Efecto de extractos de artrópodos sobre la multiplicación del *Toxoplasma gondii* dentro de macrófagos peritoneales de ratón

Misael Chinchilla Carmona,<sup>1</sup> Marlen Herrera Corrales,<sup>2</sup> Olga Marta Guerrero Bermúdez,<sup>1</sup> Alberto Jiménez Somarribas,<sup>2</sup> Guiselle Tamayo,<sup>2</sup> Ana Sittenfeld Appel,<sup>3</sup> Vanessa Nielsen<sup>2</sup> & Priscila Hurtado<sup>2</sup>

- 1 Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Departamento de Parasitología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. 2060, Costa Rica.
- 2 Instituto Nacional de Biodiversidad (INBIO).
- 3 Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica, 2060, Costa Rica.

Recibido 13-XII-2000. Corregido 03-VII-2002. Aceptado 05-IX-2002.

**Abstract:** Treatment of toxoplasmosis usually causes secondary effects. It is important to find active substances extracted from natural organisms. In this work we studied some arthropod extracts that have effect against *Toxoplasma* multiplication inside mouse macrophages. After studying 382 extracts, 23 were selected on the basis of the activity and we found that 13 extracts from orders Polydesmida, Lepidoptera, Orthoptera and Hymenoptera exerted an important inhibition of *Toxoplasma* multiplication.

**Key words:** Toxoplasmosis, insect extracts, treatment, natural products.

Las drogas de elección en el tratamiento de la toxoplasmosis son pirimetamina y sulfadiazina, en donde la acción de la segunda es sobre la dihidropteroato sintetasa (DHPS) del parásito (Pashley *et al.* 1997) mientras que en el caso de la pirimetamina el efecto es contra el paso de ácido fólico a folínico.

Estas drogas afectan al ser humano especialmente a nivel de médula ósea y tejidos epiteliales, efecto que puede ser contrarrestado administrando simultáneamente ácido fólico en forma de levadura de cerveza o Leucovorin (Hirt *et al.* 1974). Además, más del 40% de los pacientes, no pueden completar el tratamiento debido a las reacciones adversas a las sulfonamidas (De Diego *et al.* 1996) ocurriendo recaídas en más del 80% de los casos después de concluida la terapia clásica, lo que hace necesaria una segunda administración profiláctica.

Algunas complicaciones observadas son leucopenia, trombocitopenia, anemia, modificaciones megaloblásticas en la médula, inde-

pendientemente de la dosificación (Hirt *et al.* 1974) así como hepatotoxicidad y un rash severo en piel (Ulf y Belshe 1998). Por lo anterior se hace imperativa la necesidad de encontrar nuevos componentes terapéuticos que posean baja toxicidad y sean de alta eficiencia contra la toxoplasmosis activa.

Al respecto se conocen algunas plantas con actividad antimalárica dentro de la Familia Cucurbitaceae tales como *Cucurbita maxima* y *Momordica charantia*. Igualmente están en la Familia Simaroubaceae, las especies *Azadirachta indica*, *Pisum sativum*, *Alstonia boonei*, *Morinda lucida* entre otros (Zuany *et al.* 1991 Castro *et al.* 1996).

Como los agentes de la malaria son, al igual que el *Toxoplasma gondii*, organismos intracelulares, se podría pensar en productos naturales de acción antiparasitaria similar. De esta manera se ha visto experimentalmente que en forma análoga con lo que sucede para *Plasmodium*, las semillas de melón y sandía

(Familia Curcubitaceae), tienen algún efecto contra el *T. gondii*, incrementando la acción de la sulfadiazina al elevar el tiempo de supervivencia de los ratones estudiados (Chinchilla *et al.* 1990). Los artrópodos son invertebrados que podrían considerarse como una fuente en la cual los componentes de plantas se concentran e inclusive pueden producir por sí mismos productos bioactivos importantes. Por lo tanto se ha establecido un nuevo modelo que pretende demostrar alguna actividad antitoxoplásmica de tales extractos *in vitro*, tanto a nivel de penetración como de la multiplicación del parásito dentro de macrófagos.

Se estudiaron 23 extractos de artrópodos escogidos por su actividad antimalárica dentro

de todos los recolectados por el Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio). La preparación de los extractos es motivo de una publicación que está en proceso. Todos los extractos tenían un peso seco que varió entre 0.09 a 0.1 g y aquellos de extracción alcohólica fueron diluidos 1:10 en solución salina al 0.85% mientras que los extractos hexánicos y diclorometánicos fueron diluidos en dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%. El origen de los extractos así como la clasificación taxonómica de los insectos estudiados y otros aspectos importantes se presentan en el cuadro 1.

Los extractos fueron esterilizados usando filtros Millipore de 0.4 µm y 0.22 µm, y congelados a -20°C.

CUADRO 1  
Clasificación taxonómica y estado evolutivo correspondiente a los extractos de insectos con alguna actividad antitoxoplásmica

Extracto	Orden	Familia	Género	Estado evolutivo	% Inhibición
33 Hex	Polydesmida	Rhacodesmidae	<i>Aceratophallus</i>	Adulto	62.8
34 Hex	Orthoptera	Acrididae	<i>n. i.</i>	Adulto	16.7
38 Hex	Lepidoptera	Mimallonidae	<i>Mimallo</i>	Larva	<b>50</b>
47 Hex	Lepidoptera	Sphingidae	<i>Erynnis</i>	Pupa	<b>65.2</b>
50 Hex	Polydesmida	Rhacodesmidae	<i>Nyssodesmus</i>	Adulto	<b>69.5</b>
84 Hex	Orthoptera	Acrididae	<i>Rhachicreagra</i>	Adulto	<b>74.7</b>
94 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Orthoptera	Tettigoniidae	<i>Silphochlora</i>	Adulto	43.5
104 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Hymenoptera	Vespidae	<i>Polybia</i>	Adulto	<b>50.0</b>
119 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Araneae	Filistatidae	<i>Filistata</i>	Adulto	30.0
145 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Lepidoptera	Arctiidae	<i>n. i.</i>	Pupa	<b>62.5</b>
147 ETOH	Lepidoptera	Noctuidae	<i>Ascalapha</i>	Adulto	26.1
153 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Orthoptera	Tettigoniidae	<i>Philophyllia</i>	Adulto	<b>77.5</b>
156 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Lepidoptera	Pyralidae	<i>n. i.</i>	Larva	<b>61.0</b>
158 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Lepidoptera	Pyralidae	<i>n. i.</i>	Pupa	<b>66.7</b>
381 ETOH	Polydesmida	Rhacodesmidae	<i>Chondrodesmus</i>	Adulto	36.5
382 ETOH	"	"	"	"	13.5
383 ETOH	"	"	"	"	10.5
383 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	"	"	"	"	<b>65.2</b>
384 ETOH	"	"	"	"	8.1
384 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	"	"	"	"	26.1
385 ETOH	"	"	"	"	-34.8
386 ETOH	"	"	"	"	-40
386 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	"	"	"	"	28.6

Hex: hexánico

ETOH: etanólico

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: diclorometánico

Números en negrita indican inhibición igual o mayor del 50% que se estableció como parámetro de positividad.

n.i.: No identificado

Para la infección de los macrófagos peritoneales murinos se utilizó la cepa RH de *T. gondii*, de características conocidas.

Los taquizoitos de *T. gondii* fueron liberados de las células para hacer los cómputos y diluciones del caso según se ha descrito previamente (Chinchilla *et al.* 1995).

Los macrófagos se obtuvieron del líquido peritoneal de ratones blancos NGP de 20-30 gramos, estimulados con caseinato de sodio al 0.5%, 4 a 5 días antes de su extracción, cultivados en cubreobjetos 22 X 22 estériles en una cantidad de  $5 \times 10^5$  a  $10^6$  células por cubreobjetos (Chinchilla *et al.* 1995).

Después de 24 horas de incubación los macrófagos fueron infectados con taquizoitos de *Toxoplasma* en una relación de uno a uno. Después de 1 hora, los cubreobjetos fueron lavados de nuevo con MEM y tratados con los extractos en estudio. Uno de los grupos de cubreobjetos sirvió como control pues no se trató con ningún extracto.

Las muestras para su estudio fueron obtenidas a la 1, 24 y 48 horas después de la infección para observar el efecto de los extractos de insectos sobre la multiplicación intracelular del parásito. Estas muestras fueron fijadas y teñidas para su estudio posterior.

En cada cubreobjeto, perteneciente a un extracto de artrópodos, se procedió a contar 250 macrófagos, clasificándolos como infectados y no infectados, determinándose además la cantidad de taquizoitos intracelulares y extracelulares.

Con los datos obtenidos se calcularon las tasas o índices de multiplicación del *T. gondii*, tanto en 100 células totales (infectadas y no infectadas) como en 100 células infectadas.

Usando las tasas como parámetro se calculó el porcentaje de inhibición relacionándolo con el control de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{T(x) - T(c)}{T(x)} \cdot 100$$

En donde:

T: tasa de multiplicación del parásito dentro de los macrófagos.

(x): extracto estudiado.

(c): control sin extracto

Este porcentaje de inhibición es el que se tomó en cuenta para la elaboración del cuadro correspondiente, pues es el que realmente muestra el efecto de inhibición producido.

Los 23 extractos de artrópodos se ensayaron con respecto a su acción antitoxoplásmica en cuatro experimentos, todos realizados en condiciones estandarizadas según la metodología a seguir y las condiciones de incubación.

De acuerdo con los resultados obtenidos se logró demostrar que 5 extractos activos (38, 47 hexánico, 145, 156 y 158 diclorometánicos) provenían del Orden Lepidoptera, 3 (33 y 50 hexánicos y 383 diclorometánico) de Polydesmida, dos más (84 hexánico y 153 diclorometánicos) de Orthoptera y uno (104 diclorometánico) de Hymenoptera, Vespidae (Cuadro 1).

Usando el modelo antes descrito se demostró que la actividad antitoxoplásmica pudo ser observada, independientemente del sistema de extracción (alcohólico hexánico o diclorometánico).

En el análisis de los resultados, se tomó en cuenta la tasa de multiplicación del parásito a las 24 horas y no así a las 48 horas, ya que el pico máximo de proliferación de los taquizoitos en los macrófagos se da alrededor de 24 horas después de la infección (Hogan *et al.* 1960, Bommer *et al.* 1969). La primera hora sirve para tomar una idea de cómo es la tasa de penetración del parásito en los macrófagos (Reikvam 1976). Los diferentes resultados obtenidos en esta investigación utilizando extractos de artrópodos presentes en nuestro medio, se suman a las muchas que se están realizando hoy en día con el fin de encontrar en productos naturales presentes tanto en Costa Rica como en el resto del mundo, nuevas alternativas al tratamiento de la toxoplasmosis y otras parasitosis similares.

Las investigaciones al respecto, ya se han iniciado con diferentes agentes etiológicos: entre los hallazgos más recientes se encuentra el hecho de que los extractos de Polydesmida (milpiés) demostraron acciones lisantes y aglutinantes contra *Plasmodium berghei* (Chinchilla *et al.* 2001).

Otros estudios han demostrado también la acción de extractos de artrópodos como

antibacterianos y antifúngicos, tal es el caso de algunos extractos de Lepidoptera y Orthoptera en contra de *Staphylococcus aureus* (Salvatore *et al.* 1998), así como de Hemiptera actuando contra *Candida albicans* y de Coleoptera contra *Bacillus subtilis*.

Existe similitud entre nuestros resultados (Cuadro 1) y los obtenidos para la malaria, enfermedad causada por un parásito intracelular similar al *Toxoplasma gondii*, en los cuales se informa con mayor positividad a Lepidoptera (33%), Orthoptera (20%), Hymenoptera (15%), Polydesmida (12%) y otros artrópodos (16%).

Estos resultados estimulan a seguir investigando en el campo de los artrópodos como fuente de nuevos productos farmacéuticos contra protozoarios (Chinchilla *et al.* 1998, Chinchilla *et al.* 2001).

Queda pendiente el estudio de la acción específica de estos extractos, tal y como ya se ha hecho con las semillas de la planta *Coix lacryma*, en donde aparentemente existe una actividad sinérgica con el INF- $\gamma$  murino para aumentar la producción de compuestos citotóxicos intermediarios reactivos del O<sub>2</sub> y del N<sub>2</sub> (Chin-Thack *et al.* 1996).

Finalmente y tomando en cuenta los hábitos alimenticios de estos artrópodos, será importante estudiar las plantas de las cuales algunos de ellos se alimentan, pudiendo concentrar los productos activos capaces de ejercer un efecto curativo sobre los parásitos en cuestión, así como determinar y caracterizar los productos bioactivos que están en juego. Estudios al respecto ya están en progreso.

## REFERENCIAS

- Bommer, W., K.H. Höfling & H.H. Heunert. 1969. Multiplication of *Toxoplasma gondii* in cell cultures. German. Med. Monthly 14: 399-405.
- Castro, O., M. Barrios, M. Chinchilla & O.M. Guerrero. 1996. Evaluación química y biológica del efecto de extractos de plantas contra *Plasmodium berghei*. Rev. Biol. Trop. 1996. 4: 361-367.
- Chinchilla, M., O.M. Guerrero, G. Tamayo & A. Sittenfeld. 2001. Empleo de técnicas y materiales biológicos en la búsqueda de productos activos contra la malaria. Información Tecnológica 12: 187-192.
- Chinchilla, M., R. Marín & G. Catarinella. 1990. Increase of sulfadiazine effect against *Toxoplasma gondii* by using watermelon or cantaloupe seeds. Rev. Biol. Trop. 38: 235-241
- Chinchilla, M., L. Reyes & O.M. Guerrero. 1995. Resistance to intracellular parasites correlates with species differences in ability of macrophages to inhibit parasite replication. Immunol. Infec. Dis. 5: 83-87
- Chinchilla, M., O.M. Guerrero, G. Abarca, M. Barrios & O. Castro. 1998. An in vivo model to study the antimalarial capacity of plant extracts. Rev. Biol. Trop. 46: 35-39.
- Chin-Thack, S., S. Sook-Hyang, K. Kwang-Yong, P. Hyun, K. C. Hun-Taeg, K. Tae-Ue, J. Sung-Min & H. Yeong-Bok. 1996. Biostatic activity of *Coix lacryma* extract on *Toxoplasma gondii* in macrophages. Korean J. Parasitol. 34: 197-206.
- De Diego, J.A., P. Penin, P. Arribas, E. Vazquez & J.J. Vazquez. 1996. A clinical parasitological monotherapy cure in the treatment of experimental infection by a highly virulent strain of *Toxoplasma gondii*. Folia. Microbiol. Praha. 41: 513-516.
- Hirt, J. 1974. Toxoplasmosis. El Ateneo, Buenos Aires. pp. 1-6, 22-32.
- Hogan, M., C. Yoneda, L. Feeney, P. Zweigart & L. Lewis. 1960. Morphology and culture of *Toxoplasma*. Arch. Ophthal. 64: 655-665.
- Pashley, T.V., F. Volpe, M. Pudney, J.E. Hyde, P.F. Sims & C.J. Delves. 1997. Isolation and molecular characterization of the bifunctional hydroxymethyl dihydropterin pyrophosphokinase-dihydropteroate synthase gene from *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol. 86: 37-47.
- Reikvam, A. 1976. Macrophage proliferation and activation during *Toxoplasma gondii* infection in mice relationship to lymphocyte stimulation. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect C. 84: 124-130.
- Salvatore, M.J., A.B. King, A.C. Graham, R.O. Onishi, K.F. Bartizal, G.K. Abruzzo, C.J. Gill, H.G. Ramjit, S.M. Pitzanberger & K.M. Witherup. 1998. Antibacterial activity of lonchacarpol A. J. Nat. Prod. 61: 640-642.
- Ulf. W.T. & R. Belshe. 1998. Clindamycin therapy of cerebral toxoplasmosis in an AIDS patient. Scand. J. Infect. Dis. 20: 561-563.
- Zuany, C., A. Díaz & R. Balaro. 1991. Screening of the antimalarial activity of plants of the Cucurbitaceae family. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 86: 177-180.