

Evaluación *in vitro* de extractos de invertebrados marinos frente a *Leishmania amazonensis*

In vitro evaluation of marine invertebrates extracts against *Leishmania amazonensis*

Lic. Abel Piñón Tápanes, MSc Marley García Parra, MSc Judith Mendiola Martínez, Lic. Aneisy Pérez Hernández, DrC. Lianet Monzote Fidalgo

Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”. La Habana, Cuba.

RESUMEN

La leishmaniasis es una parasitosis causada por protozoos del género *Leishmania*, la cual es endémica en 98 países donde incide con alrededor de 2 millones de nuevos casos por año. Los fármacos utilizados en su tratamiento, presentan numerosos efectos tóxicos, elevado costo y un largo período de aplicación, se añade también la emergencia de la resistencia a los mismos. La medicina natural y el empleo de los recursos naturales se utilizan como alternativas a la terapia actual. El objetivo del trabajo, evaluar la actividad antileishmanial de 15 extractos de invertebrados marinos. Para ello, se determinó la inhibición del crecimiento causada por los extractos frente a promastigotes y amastigotes de *Leishmania amazonensis*, así como su citotoxicidad frente a macrófagos peritoneales de ratón BALB/c. De los productos evaluados solo 4 (26,7 %) causaron inhibición del crecimiento de los parásitos, mientras que solo el extracto de *Echinometra lucunter* mostró selectividad (IS = 5) y actividad frente a amastigotes intracelulares (CI_{50} de $28,1 \pm 6,0 \mu\text{g/mL}$). Estos resultados promisorios brindan conocimientos acerca de la posibilidad de utilizar el extracto de *E. lucunter* como agente anti-leishmanial.

Palabras clave: invertebrados marinos, leishmaniasis, enfermedades tropicales.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a parasitosis caused by protozoa of the genus Leishmania. It is endemic in 98 countries, where the disease incidence is about two million new cases per year. The drugs used in the disease's treatment have numerous toxic effects, high cost and a long application period; besides, the emergence of resistance to them is also added. Natural medicine and the use of natural resources are used as alternatives to current therapy. The study aims to evaluate the antileishmanial activity of 15 marine invertebrates extracts. For this, growth inhibition caused by the extracts against *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes was determined, together with its cytotoxicity against BALB/c mice peritoneal macrophages. Among the evaluated products, only four (26.7%) caused parasite growth inhibition, while only the *Echinometra lucunter* extract showed selectivity (SR=5) and activity against intracellular amastigotes ($CI_{50}=28.1\pm6.0$ mg/ml). These promising results provide insights about the possibility of using *Echinometra lucunter* extract as an antileishmanial agent.

Keywords: marine invertebrates, leishmaniasis, tropical diseases.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis forma parte del grupo de enfermedades tropicales que afecta un gran número de personas (con alrededor de 350 millones en riesgo). Tiene una incidencia de 2 millones de nuevos casos reportados por año, en 98 países donde es endémica.¹ La terapia actual involucra fármacos con diversas limitantes como: elevada toxicidad, administración parenteral, largo período de aplicación, alto costo y la generación de mecanismos de resistencia a los mismos.² Debido a estos aspectos, es esencial el descubrimiento de nuevos compuestos con propiedades anti-leishmanial para el desarrollo de alternativas a la terapia vigente.³ Entre las diversas estrategias utilizadas en la actualidad se ha promovido y respaldado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) el uso de la medicina natural y tradicional, en especial en aquellos lugares donde los servicios de salud apropiados son inaccesibles.⁴

Durante muchos años el ambiente marino ha sido reconocido como una de las mayores fuentes de biodiversidad de todo el mundo. Los organismos marinos sobreviven en su complejo hábitat gracias a sus capacidades metabólicas y fisiológicas, la cual posibilita también la producción de numerosos metabolitos secundarios que no se encuentran en los organismos adaptados al medio terrestre.⁵⁻¹⁰ Reciente, especial énfasis ha sido dirigido a la búsqueda de nuevos compuestos químicos debido a su actividad biológica, son cada vez más utilizado en las diferentes ramas de la ciencia como en bioquímica, biología, ecología, química orgánica y farmacología.^{5,11,12} Numerosos compuestos marinos han sido descritos en la literatura, demuestra su valor biológico como antibiótico, anti-fúngico, neurotóxico, anti-viral, anti-inflamatorio, anti-tumoral y anti-microbiano.^{6,10} En particular, en las últimas décadas se evidenció un continuo desarrollo e incremento de fármacos derivados de organismos procedentes del medio marino frente a diversos protozoos.⁷ Entre estos podemos mencionar los invertebrados, compuesto por especies de más de 30 familias y 40 géneros.¹³ En este trabajo, se evalúa la actividad de 15 extractos de invertebrados marinos en modelos *in vitro* frente a *Leishmania amazonensis*.

Parásitos

Se utilizó la cepa MHOM/77//LTB0016 de *L. amazonensis*, donada por el Departamento de Inmunología de la Fundación Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil. Los parásitos se mantuvieron en medio Schneider (SIGMA, St. Louis, MO, EUA), suplementado con antibióticos (penicilina sódica 200 UI, estreptomicina 200 µg/mL) y 10 % de suero fetal bovino (SIGMA, St. Louis, MO, USA) inactivado con calor (56 °C, 30 min).

Organismos

Todos los organismos utilizados pertenecen al grupo de los invertebrados marinos. En la [tabla 1](#) se muestran las especies utilizadas, nombre de la familia, tipo de extracto, lugar de colecta, parte del cuerpo utilizada y número de espécimen. Los organismos evaluados fueron colectados en la costa Norte de zonas de La Habana y Pinar del Río y un ejemplar de cada uno fue depositado en la colección del Acuario Nacional de Cuba.

Tabla 1. Especies de invertebrados marinos evaluados frente a *Leishmania amazonensis*

Especie	Familia	Extracto	Parte utilizada	Zona de colecta	Fecha de colecta	Nº de espécimen ^a
<i>Bartholomea annulata</i> Lesueur, 1817	Apitasiidae	hidroalco hólico	cuerpo	Litoral Acuario Nacional	Febrero, 2012	IDO 03.3.2.010
<i>Cassiopea xamachana</i> Bigelow, 1892	Rhizostomae	hidroalco hólico	cuerpo	Santa Fe, La Habana	Septiembre, 2011	ANC 03.2.001
<i>Echinometra lucunter</i> Linnaeus, 1758	Echinometridae	hidroalco hólico	parte interna	Litoral Acuario Nacional	Septiembre, 2011	IDO 10.3.072
		hidroalco hólico	cuerpo	Litoral Acuario Nacional	Septiembre, 2011	IDO 10.3.072
<i>Hermodice carunculata</i> Pallas, 1766	Amphiniidae	hidroalco hólico	cuerpo	Litoral Acuario Nacional	Febrero, 2012	ANC 0039
<i>Holothuria mexicana</i> Ludwig Diels, 1875	Holothuriidae	hidroalco hólico	cuerpo	Puerto Esperanza,	Abril, 2006	IDO 10.4.011

				Pinar del Río		
<i>Lissodendoryx isodictyalis</i> Carter, 1882	Coelosphaeridae	hidroalco hólico	cuerpo	Costa Norte de La Habana y Pinar del Río	Abril, 2006	IDO 02.004 3
<i>Lytechinus variegatus</i> Lamarck, 1816	Toxopneustidae	hidroalco hólico	cuerpo	Costa Norte de La Habana y Pinar del Río	Abril, 2006	IDO 10.3.01 3
<i>Molgula occidentalis</i> Traustedt, 1883	Molgulidae	hidroalco hólico	cuerpo y túnica	Costa Norte de La Habana y Pinar del Río	Abril, 2006	IDO 11.1.00 8
<i>Phallusia nigra</i> Savigny, 1816	Asidiidae	hidroalco hólico	cuerpo y túnica	Costa Norte de La Habana y Pinar del Río	Abril, 2006	IDO 11.1.01 3
<i>Protopalythoa variabilis</i> Duerden, 1898	Sphenopidae	hidroalco hólico	cuerpo	Litoral Acuario Nacional	Febrero, 2012	ANC 03.3.5. 005
<i>Sabellastarte magnifica</i> Shaw, 1880	Sabellidae	hidroalco hólico	cuerpo	Litoral Acuario Nacional	Febrero, 2012	IDO 05.1.01 24
<i>Stichodactyla helianthus</i> Ellis, 1768	Stichodactylidae	acuoso	completo	Costa Norte de La Habana	Febrero, 2012	IDO 03.3.2. 006

^a : ANC (Acuario Nacional de Cuba), IDO (Instituto de Oceanología).

Preparación de los extractos

Se prepararon un total de 15 extractos a partir de 13 especies de invertebrados marinos según se describe en la [tabla 1](#). Las muestras de cada organismo se maceraron con agitación ocasional durante una semana, se utilizó etanol al 80 %. De los organismos *Holothuria mexicana*, *Lissodendoryx isodictyalis*, *Lytechinus variegatus* y *Phallusia nigra*; se llevó a cabo un proceso de autolisis con agua destilada y regímenes intermitentes de homogenización mecánica con *Waring-Blender* durante 2 min en etanol al 80 %. Las suspensiones se mantuvieron en maceración a 4 °C durante 72 h con agitación ocasional. Estas se centrifugaron a 10 000 g y se colectó el sobrenadante. Todos los extractos fueron liofilizados y almacenados a -20 °C. Una muestra fue disuelta a 20 mg/mL en dimetilsulfóxido y almacenada a 4 °C para realizar las evaluaciones biológicas.

Fármaco de referencia

Se empleó la pentamidina (Richet, Buenos Aires, Argentina) a una concentración de 10 mg/mL, fármaco de uso clínico en el tratamiento de la leishmaniasis.

Actividad frente a promastigotes

Los extractos se adicionaron en concentraciones de 12,5 a 200 µg/mL a cultivos de promastigotes que se ajustaron a 10^5 parásitos/mL. A continuación, se incubaron durante 72 h a 26 °C. La actividad se determinó mediante un método colorimétrico con el uso de una solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolio) (MTT, SIGMA, St. Louis, MO, USA). Los resultados se expresaron como concentración inhibitoria media (CI_{50}). Los extractos que mostraron una CI_{50} menor que 100 µg/mL fueron seleccionados para realizar el estudio de citotoxicidad.

Citotoxicidad

Para evaluar la toxicidad se extrajeron macrófagos peritoneales de ratones BALB/c mediante lavados con RPMI (SIGMA, St. Louis, MO, USA) suplementado con antibióticos (penicilina sódica 200 UI, estreptomicina 200 mg/mL). Se sembraron a una concentración de 3×10^5 células/mL y se trataron con los extractos a concentraciones desde 12,5 hasta 200 µg/mL, durante 72 h a 5 % de CO₂ y 37 °C. La actividad se determinó mediante el uso de una solución de MTT como se explicó antes y se determinó la concentración citotóxica media (CC_{50}). Detrás, se calculó el índice de selectividad (IS) mediante la división de la CC_{50} entre la CI_{50} frente a promastigotes. Los extractos que mostraron un IS mayor o igual que 5, se evaluaron frente a amastigotes intracelulares de *L. amazonensis*.

Actividad frente a amastigotes

Se extrajeron macrófagos peritoneales de ratones BALB/c, como se describió previo. Estas células se infectaron con promastigotes estacionarios a razón de 4 parásitos por macrófago durante 4 h y se trataron con 10 µL de cada extracto a una concentración final entre 12,5 y 100 µg/mL. Después de 48 h de incubación a 37 °C y 5 % CO₂, se realizaron conteos directos en cultivos teñidos por Giemsa y se calculó la CI_{50} frente a amastigotes. Se seleccionaron como candidatos potenciales los extractos que mostraron una CI_{50} menor que 50 µg/mL.

Análisis estadístico

La CI_{50} y la CC_{50} en todos los ensayos realizados se obtuvieron solo de una curva de regresión lineal y fue el resultado de la media de tres réplicas realizadas por separado. Los valores fueron comparados por *Mann-Whitney*, con el uso del programa STATISTICA para Windows, Versión 4.5, 1993.

De los 15 extractos evaluados frente a promastigotes de *L. amazonensis*, solo 4 mostraron inhibición del crecimiento de los parásitos. De estos, solo el extracto de *E. lucunter*, preparado a partir de la parte interna del organismo, mostró baja citotoxicidad, con un IS de 5 ([tabla 2](#)). Al evaluar dicho extracto frente a amastigotes intracelulares del parásito se obtuvo una CI_{50} de $28,1 \pm 6,0 \mu\text{g/mL}$; mientras que la pentamidina mostró valores de $1,3 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$.

Tabla 2. Actividad de extractos de invertebrados marinos evaluadas frente a *Leishmania amazonensis* y su citotoxicidad frente a macrófagos peritoneales de ratón BALB/c

Especie	$CI_{50}^a \pm DE^c$ Promastigotes ($\mu\text{g/mL}$)	$CC_{50}^b \pm DE^c$ Citotoxicidad ($\mu\text{g/mL}$)	IS ^d
Especie	$CI_{50}^a \pm DE^c$ Promastigotes ($\mu\text{g/mL}$)	$CC_{50}^b \pm DE^c$ Citotoxicidad ($\mu\text{g/mL}$)	IS ^d
<i>B. annulata</i>	$58,8 \pm 2,3$	$140,1 \pm 4,1$	2
<i>C. xamachana</i>	$284,8 \pm 7,7$	-	-
<i>E. lucunter</i> (parte interna)	$23,3 \pm 5,2$	$126,5 \pm 5,8$	5
<i>E. lucunter</i> (cuerpo)	> 200	-	-
<i>H. carunculata</i>	$105,9 \pm 5,9$	-	-
<i>H. mexicana</i>	$119,1 \pm 1,2$	-	-
<i>L. isodictyalis</i>	$111,0 \pm 3,5$	-	-
<i>L. variegatus</i>	> 200	-	-
<i>M. occidentalis</i>	> 200	-	-
<i>P. nigra</i>	$46,4 \pm 2,6$	$47,6 \pm 0,1$	1
<i>P. variabilis</i>	> 200	-	-
<i>S. magnifica</i>	> 200	-	-
<i>S. helianthus</i>	$105,9 \pm 5,9$	-	-
<i>T. ventricosus</i> (parte interna)	$42,7 \pm 3,2$	$173,9 \pm 1,9$	4
<i>T. ventricosus</i> (cuerpo)	> 200	-	-

^a: CI_{50} : concentración del producto evaluado que causa 50 % de inhibición.

^b: CC_{50} : concentración del producto que causa 50% de mortalidad en la célula.

^c: desviación estándar.

^d: IS: índice de selectividad = CC_{50} citotoxicidad/ CI_{50} promastigotes.

En este trabajo, el 26,7 % de los productos evaluados causaron actividad frente a promastigotes de *L. amazonensis*. Sin embargo, solo el 6,7 % mostró selectividad y actividad frente a amastigotes intracelulares.

En la literatura revisada no se encontraron trabajos que reporten la actividad anti-leishmanial del equinoideo *E. lucunter*. Sin embargo, otros invertebrados marinos como esponjas, octocorales, briozoos y ascidias han mostrado efecto frente a *Leishmania*.^{14,15} De ellos se puede mencionar el extracto de *Physalia physalis* que mostró resultados similares ($IC_{50} = 52,2 \mu\text{g/mL}$ en promastigotes y $IC_{50} = 40,5 \mu\text{g/mL}$ frente a amastigotes)¹⁴ a los hallados en este estudio, corroborándose así la potencialidad de los invertebrados marinos como posibles fuentes de metabolitos activos frente a este protozoo parásito.

Los valores de IC_{50} de *E. lucunter* ($28,1 \mu\text{g/mL}$) fueron superiores a los obtenidos con la pentamidina ($1,3 \mu\text{g/mL}$) frente a amastigotes de *L. amazonensis*. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que es probable que los principios activos en el extracto ocupen un bajo por ciento de la compleja mezcla de componentes que lo conforman. Para lograr una mejor eficiencia de su actividad anti-leishmanial, se podría realizar el fraccionamiento y purificación de sus componentes activos.

E. lucunter es un organismo que habita en rocas de aguas costeras hasta 45 m de profundidad, alimentándose de algas y animales que viven incrustados en la superficie de las rocas.¹⁶ Esta especie se encuentra distribuida desde Carolina del Norte (EUA) y Las Bermudas hasta Santa Catalina (Brasil), e incluye El Caribe y zonas del Este de África.¹⁶⁻¹⁸ Desde el punto de vista farmacológico, no se encontraron evidencias científicas sobre su utilidad terapéutica, por lo que este trabajo constituye el primer reporte sobre efecto farmacológico relacionado con esta especie. Este hallazgo permite sugerir a la comunidad científica internacional la exploración de *E. lucunter* como posible agente terapéutico, así como la utilización de los invertebrados marinos como fuentes de novedosos compuestos con actividad biológica.

Al tener en cuenta estos resultados, se puede considerar el extracto de *E. lucunter* como un promisorio agente anti-leishmanial. Se sugiere que sean realizados estudios químicos con el objetivo de identificar y purificar sus posibles metabolitos activos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alvar J, Velez ID, Bern C. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PloS ONE. 2012; 7:1-12.
2. Castillo E, Dea-Ayuela MA, Bolás-Fernández F, Rangel M, González-Rosende ME. The kinetoplastid chemotherapy revisited: current drugs, recent advances and future perspectives. Curr Med Chem. 2010; 17(33): 4027–51.
3. Cunha LC. Apropolisno combate a tripanosomatídeos de importancia médica: uma perspectiva terapéutica para doença de Chagas e leishmaniose. Pat Trop. 2011; 40(3): 105-24.
4. Rocha LG, Almeida JR, Macedo RO, Barbosa-Filho JM. A review of natural products with antileishmanial activity. Phytomedicine. 2005; 12(6-7): 514-35.
5. Faulker DJ. Marine natural products. Nat Prod Rep. 1998; 15: 113-58.

6. Lam KS. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Curr Opin Microbiol.* 2006; 9:245-51.
7. Sima P, Vetvicka V. Bioactive substances with anti-neoplastic efficacy from marine invertebrates: Porifera and Coelenterata. *World J Clin Oncol.* 2011; 2:355-61.
8. Brito IM. Asteróides e equiníodes do Estado da Guanabara a adjacencias. *Bolm Mus Nac Ser Zool.* 1968; 260: 1-51.
9. Blunt JW, Copp BR, Munro MHG, Northcote PT, Prinsep MR. Marine natural products. *Nat Prod Rep.* 2006; 23: 26-78.
10. Kelecom A. Chemistry of Marine Natural Products: Yesterday, Today and Tomorrow. *An Acad Bras Cienc.* 1999; 71:249-63.
11. Capon RJ. Marine bioprospecting-trawling for treasure and pleasure. *Eur J Org Chem.* 2001; 2001:633-45.
12. Haefner B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discov Today.* 2003; 8:536-44.
13. García M, Monzote L. Marine Products with Anti-Protozoal Activity: A Review. *Curr Clin Pharm.* 2014; 9:11.
14. García M, Monzote L, Castañeda O, García N, Pérez A. Antileishmanial activity for six extracts from marine organisms. *Rev Cub Med Trop.* 2012; 64(1):61-4.
15. Seleg him MHR, Lira SP, Kossuga MH, Batista T, Berlinck S, Hadju E, et al. Antibiotic, cytotoxic and enzyme inhibitory activity of crude extracts form Brazilian marine invertebrates. *Bras J Pharmacog.* 2007; 17(3):287-318.
16. Tommasi L. Lista dos equiníodes recentes do Brasil. *Ser Ocean Biol.* 1966; 11(1):1-50.
17. Bernasconi I. Equinoideos y Asteroideos de la colección del Instituto Oceanográfico de la Universidad de San Pablo. *Bolm Inst oceanogr S Paulo.* 1955; 6(1-2):51-77.
18. Hendler G. Sea stars, sea urchins, and allies: echinoderms of Florida and the Caribbean. *Smith Inst Press.* 1995; 1: 197-249.

Recibido: 18 de febrero de 2015.

Aceptado: 16 de julio de 2015.

Lianet Monzote Fidalgo. Departamento de Parasitología. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Autopista Novia del Mediodía Km 6 ½ AP 601, Municipio Lisa, La Habana, Cuba.

Correo electrónico: monzote@ipk.sld.cu