

# ENSAYO RÁPIDO COLORIMÉTRICO PARA DETERMINAR VIABILIDAD DE TRYPANOSOMA CRUZI. APLICACIÓN: EVALUACIÓN DE EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES

Jorge Carrasco,

Inés Ruíz

Departamento de Microbiología,

Departamento de QQ y FF.

UNAH

## RESUMEN

Debido a la circulación de cepas de *Trypanosoma cruzi* resistente a nifurtimox en Honduras, urge investigar la existencia de plantas medicinales con acción antichagásica. Se desarrolló *in-vitro* un método colorimétrico para evaluar la viabilidad de los parásitos. Los parásitos crecidos en medio líquido y en fase logarítmica fueron mezclados con sales de tetrazolium, sales que se reducen a formazan por el succinato- tetrazolium reductasa. La correlación entre el número de parásitos y la señal colorimétrica fue de 0.987. El nifurtimox y otras drogas tóxicas inhibieron la viabilidad de los parásitos, mientras fitohemaglutinina mostró un efecto estimulador. Tres plantas medicinales fueron evaluadas: *ludwigia*, *octovalvis* y *cordia dentata*; estas plantas mostraron un efecto inhibitorio en la viabilidad de los parásitos hasta un 90%.

Estos resultados muestran que el método colorimétrico es una buena herramienta para ser usado en la evaluación de la viabilidad de los parásitos y que las plantas medicinales estudiadas contienen metabolitos tóxicos para el *T. cruzi*

## SUMMARY:

As the result of widespread circulation of *Trypanosoma cruzi* which is resistant to nifurtimox in Honduras, it has become greatly urgent to look into the existence of medicinal plants with anti-chagasic effects. A colorimetric method *in vitro* has been developed to quantify the viability of the parasites. Parasites grown in liquid environment and in logarithmic phases were mixed with tetrazolium salts, salts that are reduced to formazan resulting from the reductasa tetrazolium-succinate. The correlation between the number of parasites and the colorimetric signal measured 0.987. The nifurtimox and other toxic drugs inhibited the viability of the parasites, while the fitohemaglutinina showed a stimulating effect. Three medicinal plants were evaluated: *Ludwigia octovalvis*, *Triunfeta botensis* and *Cordia dentata*, These plants showed an inhibiting effect upon the parasites of up to 90%. These results show that the colorimetric method is a good tool to use in evaluating the viability of parasites and that the three medicinal plants studied contain toxic metabolites for the *Trypanozoma cruzi*.

**E**n Honduras, poco se conoce acerca de la eficacia del beznidazole droga de elección para el tratamiento

de la enfermedad de Chagas, pero se ha reportado experimentalmente que el 62% (5/8) de las cepas de *Trypanosoma cruzi* que

circulan en el país son resistentes a nifurtimox (Carrasco J, 1990). Además, esta droga es altamente tóxica, por lo tanto es importante

identificar nuevas drogas anti-chagasicas evaluando extractos de plantas medicinales contra *T. cruzi* mediante una aproximación etnobotánica. Se han descrito dos bioensayos tripanocida, uno se basa en el recuento de parásitos expuesto a plantas medicinales IN-VITRO (González et. al., 1990) y otro evalúa la actividad leishmaniacida y tripanocida de las plantas medicinales bolivianas (Fourquet, et. al., 1994). Para minimizar error en el sistema de conteo, nosotros describimos un método colorimétrico para estudiar la proliferación o viabilidad del parásito. Este método fue adaptado por lo informado por Mosmann en 1983, donde describió un método colorimétrico para estudiar la proliferación y viabilidad de los linfocitos. Este método se basa en reducir las sales de tetrazolium [3-[4, 5-dimethyl-thiazol-2yl]-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)] a formazan por el succinato-tetrazolium reductasa localizado en la cadena respiratoria de las mitocondrias (Slater, 1963).

Cerca de 22 plantas medicinales endémicas de Honduras han sido tamizadas en animales de experimentación para estudiar sus efectos en el aparato respiratorio (Cámbar P., 1997) y algunas de estas plantas han sido estudiadas para evaluar sus efectos cardiovasculares (Solórzano et al., 1990, Cámbar P., 1996). Sin embargo, ninguna de ellas ha sido evaluada, si tienen acción antiparasitaria.

En este artículo se describe: a) un método colorimétrico para evaluar viabilidad de parásitos, b) diferentes métodos de extracción con solventes orgánicos en plantas medicinales no descritas y c) evaluación de la presencia de metabolitos tóxicos con acción antitripanosida mediante el método colorímetro.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos:

Ciclofosfamida (SIGMA), mitomicina C (SIGMA), bromuro de etidio (SIGMA), higromicina (SIGMA), fitohemoglutina (DIFCO), sales de tetrazolium o MTT [(3-[4, 5-dimethylthiazol-2yl])-2,5-diphenyltetrazolium Bromide] (SIGMA) nifutimox (doctora Elsa Segura. Fatala Chaben, Buenos Aires, Argentina).

### Recolección de plantas

En la tabla 1, se resume el origen, nombre común, nombre científico, uso medicinal en la comunidad, parte usada para estudio biológico y composición química de *Ludwigia ocatavalvis Triunfeta bogotensis* y *Cordia dentata*.

### Extracción de las Plantas.

Cien gramos de cada parte de la planta fue extraída sucesivamente con éter, cloroformo o metanol concentrándose a sequedad en un vapor rotatorio al vacío y a 50°C.

## Parásitos

Epimastigotes de la cepa "CL" de *T. cruzi* (Brasil) fue proporcionado por el doctor Antonio González (Instituto de Biomedicina, Granada-España), se mantuvo en el medio de LIT (Liver Infusion Tryptose) con 10% de suero bovino fetal (SBF) A 26°C.

### Ensayo colorimétrico para evaluar viabilidad del parásito

Los parásitos en fase logarítmica (100 µl, 1x10<sup>6</sup>/ml) fueron depositados en la microplaca, luego se añadieron 20µl de MTT (10 mg/ml) y se encubaron a 26°C durante 4 horas. El formazan fue solubilizado con 100µl de isopropanol-HCl y medido a 570nm.

### Ensayo colorimétrico para evaluar extracto de plantas medicinales en la viabilidad del *T. cruzi*.

En la microplaca se depositaron 100 µl de parásitos en fase logarítmica (1x10<sup>6</sup>/µl), luego se añadió 10µl de extracto de planta o de la droga a analizar, se incubaron a 26°C durante 5 días. Para evaluar la viabilidad de las células, se añadieron 20µl de MTT (10mg/ml) y se incubaron a 26°C durante 4 horas. Finalmente se añadió isopropanol-HCl y el formazan fue medido a 570 nm (fig. 1)

### Medición de Actividad

El porcentaje de activi-

dad fue calculado con la siguiente formula:

$$\% \text{ actividad} = \frac{(\text{ODp}-\text{ODb})-(\text{ODc}-\text{ODb})}{\text{ODc}-\text{ODb}} \times 100$$

donde:

ODp= OD problema; es medio de cultivo, parásitos y droga de referencia o el extracto de la planta,

ODc= OD control; es medio de cultivo, parásito,

ODb = OD blanco; es medio de cultivo con /sin extracto de planta o droga.

## RESULTADOS

### Estandarización del Ensayo Colorimétrico

Los epimastigotes del *T. cruzi* han mostrado ser capaces de reducir el MTT por acción de algunas de sus enzimas reductoras, por lo que puede ser usado para medir viabilidad o proliferación celular. En la figura 2, se puede observar que a medida se incrementa el número de parásitos, aumenta la señal del formazán. Por lo tanto

la correlación fue de 0.98, que significa una relación directamente proporcional entre el número de parásito y el formazán.

### Evaluación de drogas inhibitoria y estimuladora a *T. cruzi*.

Cuando los parásitos son incubados con agentes alquilante para el ADN, observamos que la ciclofosfamida no tiene ningún efecto sobre los parásitos, pero sí, el mitomicin C, ya que inhibe hasta un 60% de su actividad. Al incubarse los parásitos con bromuro de etidio (agente intercalante del ADN),

observamos una inhibición de 53.2%. Igual efecto inhibitorio obtuvimos al incubar los parásitos con nifurtimox (100%) e higromicina (60%) (inhibidores de síntesis proteica), mientras que con fitohemaglutinina (lectina) los efectos fueron estimulatorios hasta en un 57% (fig.3)

### Efecto de extractos de planta sobre el *T. cruzi*.

El extracto clorofórmico de *T. bogotensis* usado a una concentración de 10mg/ml, mostró un efecto inhibitorio de 90% en la viabilidad de los parásitos, pero cuando disminuimos 10 veces la concentración (1 mg/ml), los parásitos fueron estimulados hasta un 13% (fig.4).

Las extracciones con cloroformo de *C. dentata* estudiadas a una concentración de 10 mg/ml, mostró una inhibición de viabilidad en los parásitos de  $87\% \pm 0.095$ . Cuando reducimos 10 veces la concentración del extracto de planta (1mg/ml) el efecto inhibitorio se mantuvo a un 30.1%. Si reducimos la concentración a 100 veces (0.1mg/ml), los parásitos son estimulados hasta un 20.7%. Si esta

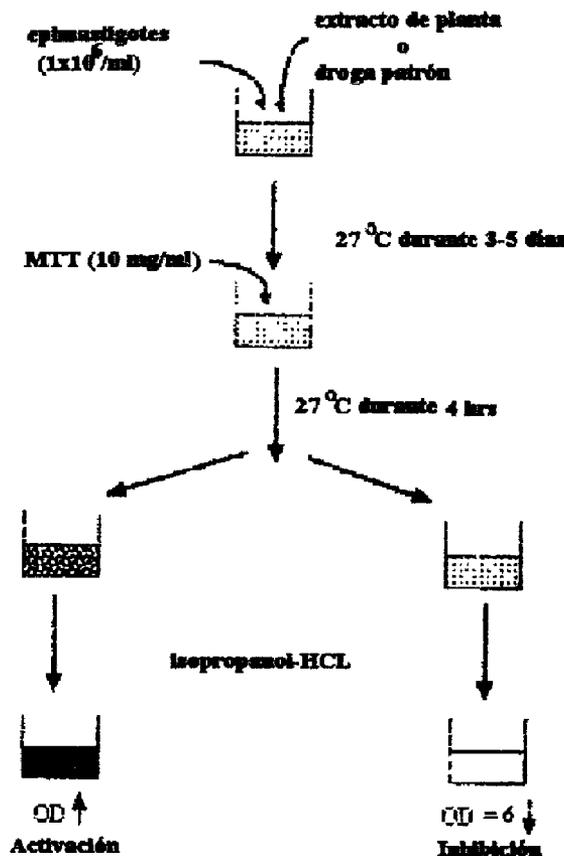
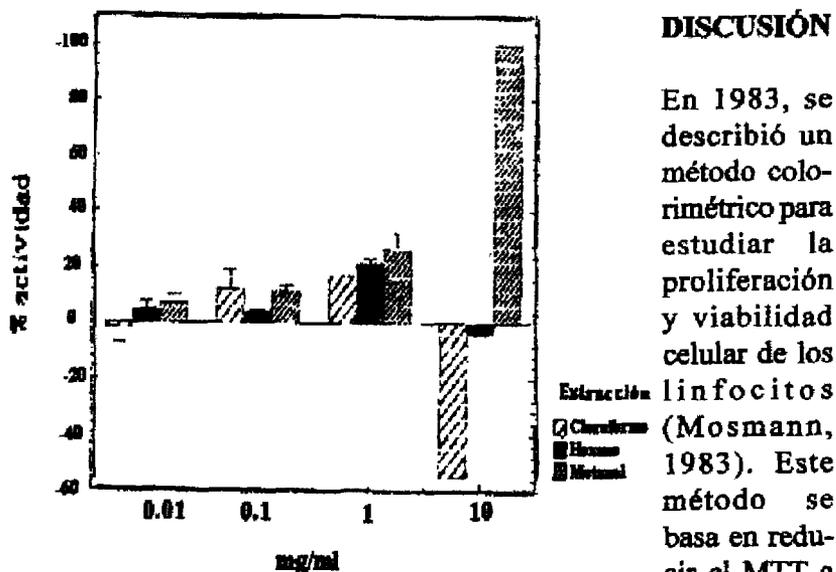


Figura 1. Método colorimétrico para evaluar viabilidad de *T. Cruzi*

misma planta la extraemos con éter y la usamos a 10mg/ml, la viabilidad de los parásitos se inhibe a 12.8%, pero si reducimos la concentración del

10 mg/ml. Cuando disminuimos esta concentración a 10 veces menos (1 mg/ml) la estimulación en la viabilidad disminuye de manera logarítmica.

es que los parásitos poseen enzimas capaces de reducir el MTT. Los primeros ensayos revelaron una alta correlación en proliferación entre el número de parásitos y señal colorimétrica.



extracto 10 veces (1 mg/ml) la viabilidad de los parásitos se restablece a la normalidad (fig.5).

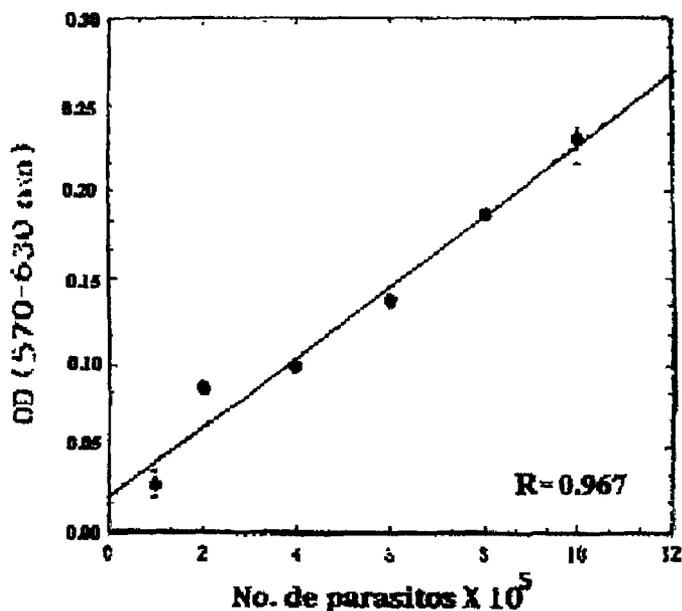
En la fig.6, podemos observar que la extracción clorofórmica de *L. octovalvis* a concentración de 10 mg/ml inhibe la viabilidad de los parásitos a un  $55\% \pm 0.19$ , pero cuando reducimos esta concentración a 1 mg/ml, se restablece esa viabilidad. Esta misma planta al ser extraída con hexano, observamos una inhibición en la viabilidad de  $3.72\% \pm 0.67$  a una concentración de 10mg/ml, pero la viabilidad se restablece cuando disminuimos 10 veces la concentración del extracto. Sin embargo, cuando esta planta se extrae con metanol obtenemos una estimulación en la viabilidad de 100% a la concentración de

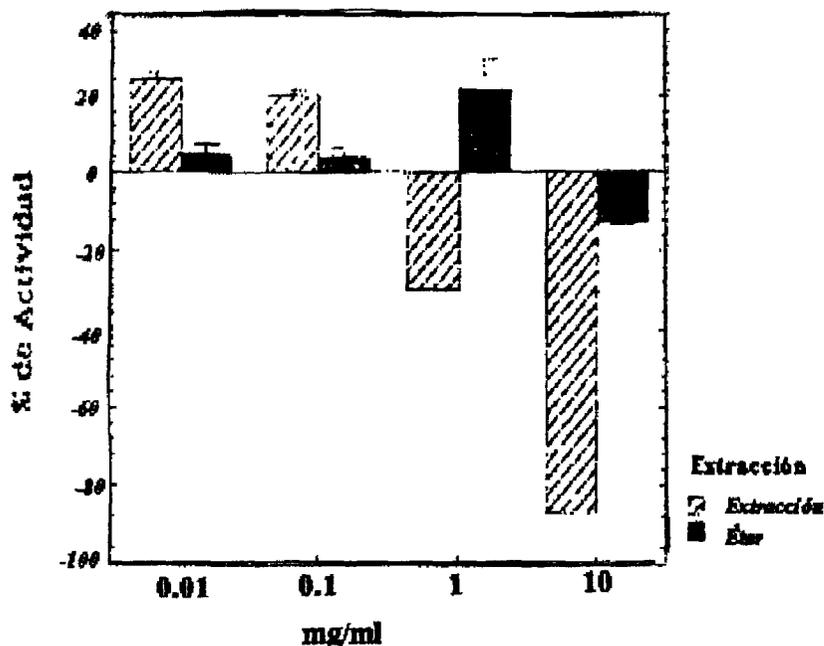
formazán por el succinato-tetrazolium reductasa (Slater, 1963) localizado a nivel del mitocondrion o en el citoplasma por nucleotidos de pirimidina cofactor NADH y NADPH (Berridge, 1993). En este caso nosotros acoplamos este método para estudiar viabilidad y proliferación de epimastigote de *T. cruzi*. Lo que podemos observar en este ensayo

## DISCUSIÓN

En 1983, se describió un método colorimétrico para estudiar la proliferación y viabilidad celular de los linfocitos (Mosmann, 1983). Este método se basa en reducir el MTT a

Para determinar la viabilidad de los parásitos fue necesario evaluarlo con drogas conocidas. Cuando los parásitos fueron expuestos a drogas alquilantes, observamos una resistencia a ciclofosfamida y una susceptibilidad a mitomicin C. Esta resistencia puede ser debido a sistemas de escape que posee intrínsecamente el parásito, como ser: incremento de péptidos tiólicos, alta capacidad de reparación del ADN y baja permeabilidad a la droga. Cuando los parásitos son expuestos a drogas intercalante del ADN (Bromuro de etidio) muestran el mismo efecto inhibitorio que el mitomicin C, en este caso ambos están inhibiendo la replicación del ADN o están





mostró ser mas activo en *T. bogotensis*. Las plantas medicinales (*C. dentata*, *L. octovalvis*) extraídas con hexano y éter mostraron poco efecto inhibitorio sobre los parásitos por baja o ausencia actividad del metabolito tóxico. Mientras que *L. octovalvis* extraída con metanol mostró ausencia del metabolito tóxico y presencia de una estimulador para la proliferación del parásito.

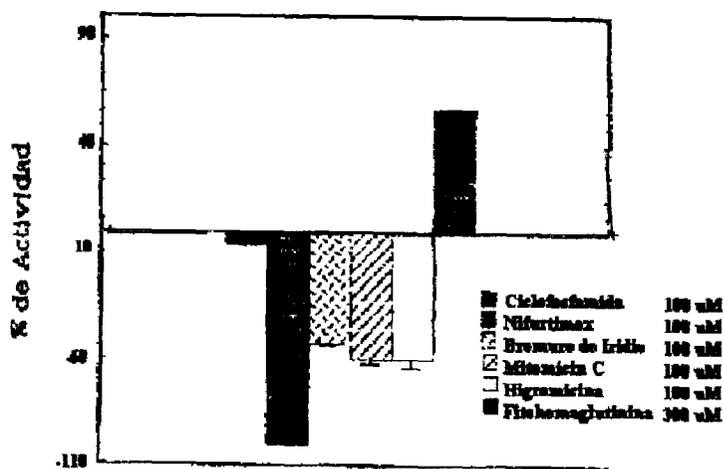
interfiriendo la transcripción. Los parásitos expuestos a inhibidores de síntesis proteica a nivel de traducción [despolirribosomando (nifurtimox) o bloqueando a la traslocación del aminoácido (higromicina)] observamos no viabilidad del parásito.

En el intento de identificar nuevas drogas antichagásica se evaluaron 3 extractos de plantas medicinales contra epimastigotos de *T. cruzi* mediante una aproximación etnobotánica. Se ha reportado que los pobladores de las áreas rurales de los departamentos de Francisco Morazán y de Choluteca usan: la corteza de *T. bogotensis* para el tratamiento de problemas intestinales, renales y hepáticos, las hojas o flores de *C. dentata* en el tratamiento de fiebre, enfermedades de vía respiratoria superior y sarampión, y las hojas o el fruto de *L.*

*ocotvalvis* como anti-inflamatorio, antimicótico y antibacteriano.

Cuando las plantas medicinales (*T. bogotensis*, *C. dentata*, *L. octovalvis*) son extraídas con cloroformo, los análisis químicos muestran presencia de taninos con actividad tóxica para el parásito. De las tres plantas medicinales extraídas con ese orgánico, el metabolito tóxico

Es interesante notar que otros autores han descrito que las extracciones con cloroformo de la Amazona muestran ausencia de metabolito tóxico contra malaria, pero cuando son extraídos con hexano el metabolito tóxico está presente (Carvalho, 1991). Estos resultados contradictorios de los métodos de extracción en plantas, puede ser debido a la especie de planta que se está estudiando, o algunas variantes en el método de extracción. Es importante hacer notar que las plantas descritas en este trabajo fueron extraídas con cloroformo

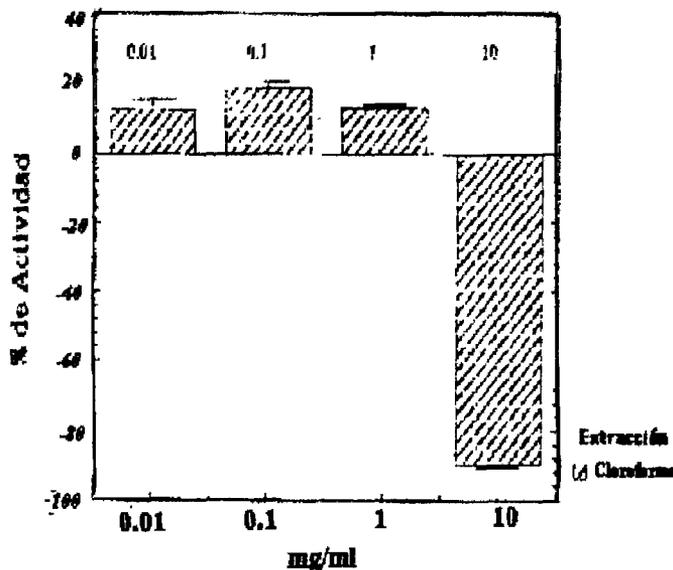


aislándose los metabolitos tóxicos para el parásito pero no cuando se extrae con hexano. Sin embargo, cuando se extrae con metanol, se aislan metabolitos estimuladores (probables lectinas).

Con estos resultados se puede concluir: Que el método colorimétrico es fácil, rápido y barato para implementar en el laboratorio, que el mejor solvente orgánico para extraer metabolitos tóxicos de las plantas fue el cloroformo y la planta de mayor actividad tóxica para *T. cruzi* fue *T. bogotensis*. Es necesario hacer más estudios para demostrar su eficacia como droga antichagásica.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Berridge, M. AND a. Tan. 1993. Archive Biochemistry Biophysical, 303, 474.
2. Carrasco, J. 1990. Biological and Immunological characterization of Trypanosoma cruzi strains from Honduras Thesis M.Sc. Karolinska. Institute Stockholm-Sweden.
3. Carvalho, L., M. Brandao, D. Santos-Filho, J. López and A. Kretti. 1991. Antimalarial activity of crude extract Brazilian plantas studied In vivo in Plasmodium berghei infected mice and in vitro against Plasmodium falciparum in culture.



4. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 24 1113-1123.
5. Cámbar P. 1996. Efectos broncopulmonares de los extractos hidroalcoholicos de Cissus verticillata en conejos. III Semana Científica de Ciencias Biológicas y de la Salud. Facultad de Medicina, UNAH. Tegucigalpa, Honduras.
6. Cámbar P. 1997. Efectos respiratorios de los extractos acuosos de plantas caribeñas en animales de experimentación. Ciencia y Tecnología, No. 1. Dirección de Investigación Científica, UNAH. Tegucigalpa, Honduras. 5-12.
7. Fourquet A., Angelo A. and M. V. 1994. Leishmanicidal and tripanicidal activities of Bolivian medicinal plantas. Journal Ethnopharmacological. 41, 19-47.
8. González J, Sagua H, Araya, Loyola A, Morales G, Pereira J. and Estrada M. 1990. In vitro activity of natural

products against the tripomastigote from *Trypanosoma cruzi*. Phytotherapy Res. 4. 1-4.

7. Huang, L. 1984. Drug research based upon the leads of the Chinese traditional medicine. 94-106.

8. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Application to proliferation and cytotoxicity assay. Journal of Immunological Methods. 65. 55-63.

9. Slater, T. and e. al. 1963. Biochemistry Biophysical Acta. 77. 383.

10. Solózano M, Cámbar P and Girón N. 1990. Efecto del extracto acuoso de Parthenium hyssterophorous sobre el aparato cardiovascular de ratas Wister. VIII Semana Científica. Ciudad Universitaria, UNAH. Tegucigalpa, Honduras. 19-23.

## LEYENDA DE LAS FIGURAS

Figura 1. Método colorimétrico para evaluar viabilidad de *Trypanosoma cruzi*.

Fig. 2. Correlación entre la señal colorimétrica del formazán y el número de epimastigotes en 4 hrs de incubación a 27°C.

Fig. 3 Efecto en el % de actividad del epimastigote en presencia de drogas inhibitorias de síntesis proteica y de replicación celular. Parásitos crecidos en medio de LIT con 10% SBF y en fase logarítmica fueron incubados con las drogas durante 5 días a *Ciencia y Tecnología, Volumen #2*

27°C. Después se añadió MTT y se incubó durante 4 hrs. El formazán producido fue medido a 570 nm.

Fig. 4. Efecto en el % de actividad del epimastigote en presencia del extracto clorofórmico de *T. bogotensis*. Parásitos crecidos en medio de LIT con 10% SBF y en fases logarítmica fueron incubados con el extracto durante 5 días a 27°C. después se añadió MTT y

se incubó durante 4 hrs. El formazán producido fue medido a 570 nm.

Fig. 5. Efecto en el % actividad del epimastigote en presencia del extracto clorofórmico y etero de *C. dentata*. Parásitos crecidos en medio de LIT con 10% SBF y en fase logarítmica fueron incubados con el extracto durante 5 días a 27°C. Después se añadió MTT y se incubó durante 4 hrs, el formazán producido fue

medido a 570 nm.

Fig. 6. Efecto en el % de actividad del epimastigote en presencia de extracto clorofórmico, hexánico y metanólico de *L. octovolvovis*. Parásitos crecidos en medio de LIT con 10% SBF y en fase logarítmica fueron incubados con el extracto durante 5 días a 27°C. Después se añadió MTT y se incubó durante 4 hrs, el formazán producido fue medido a 570 nm.



**«La ciencia médica ha logrado progresos admirables. Hemos superado la medicina preventiva y los métodos curativos. Casi todas las enfermedades infecciosas se combaten eficazmente. Sin embargo, son incontables las vidas que perecen por falta de higiene, de médico y de medicinas.»**

Alfonso Guillén Zelaya

**«Hemos construido escuelas y universidades, acrecentado el personal que difunde la enseñanza y perfeccionado los métodos educativos; pero una gran masa de la población del globo vive en la ignorancia y es arrastrada a las guerras, sirviendo a intereses inconfesables, bajo banderas de fanatismo, de arrogancia y de codicia.»**

Alfonso Guillén Zelaya