

## COMUNICACIÓN BREVE

### Actividad antileishmanial de seis extractos de organismos marinos

MSc. Marley García Parra,<sup>1</sup> Dra. C. Lianet Monzote Fidalgo,<sup>1</sup> Dra. C. Olga Castañeda Pasarón,<sup>II</sup> MSc. Neivys García Delgado,<sup>II</sup> Lic. Aneysi Pérez Hernández<sup>III</sup>

#### RESUMEN

**Introducción:** las infecciones causadas por protozoos del género *Leishmania* constituyen un problema de salud mundial con una alta prevalencia en países subdesarrollados. En la actualidad no existe una vacuna contra esta enfermedad y el tratamiento utilizado es deficiente, por lo que la búsqueda de medicamentos más efectivos y seguros constituye una urgente necesidad. **Objetivo:** evaluar la actividad antileishmanial *in vitro* de 6 extractos acuosos e hidroalcohólicos de organismos marinos. **Métodos:** se determinó la actividad frente a promastigotes y amastigotes de *Leishmania amazonensis*, así como su toxicidad frente a macrófagos peritoneales de ratones BALB/c. **Resultados:** en el ensayo de promastigotes los extractos de *Bryothamnion triquetrum*, *Bunodosoma granulifera*, *Halimeda opuntia*, y *Physalia physalis* mostraron una inhibición del crecimiento a concentraciones menores de 100 µg/mL; mientras que frente a amastigotes, estos 2 últimos extractos fueron los más activos y menos tóxicos con un índice de selectividad de 6 y 8, respectivamente. **Conclusiones:** teniendo en cuenta estos resultados se consideró que los extractos de *H. opuntia* y *P. physalis* mostraron una promisorio actividad, por lo que se sugiere continuar los estudios de su actividad *in vivo*.

**Palabras clave:** *Leishmania amazonensis*, extractos marinos, *Halimeda opuntia*, *Physalia physalis*.

La leishmaniosis es una de las 6 enfermedades tropicales más severas según la Organización Mundial de la Salud, que afecta 12 millones de personas en 88 países alrededor del mundo.<sup>1</sup> Su control se basa principalmente en la quimioterapia, aunque estos fármacos causan numerosos efectos tóxicos y tienen una efectividad variable según la fase de la enfermedad. En los últimos años se ha presentado resistencia a estos medicamentos, por lo que es de vital importancia el descubrimiento y desarrollo de productos antileishmaniales nuevos, seguros y efectivos.<sup>2</sup>

La biodiversidad de los mares se comenzó a valorar a principios del siglo xx y se estima que el número de especies que lo componen oscila entre 1,5 y 4,5 millones, muchas de ellas aún no descritas, lo que sustenta sus grandes potencialidades

como fuente de metabolitos activos.<sup>3,4</sup> En la literatura existen numerosos reportes de compuestos y organismos de origen marino con actividad antiprotozoaria tanto *in vitro* como *in vivo*.<sup>5-7</sup> En este sentido, se evaluaron 6 extractos provenientes de organismos marinos 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, Río de Janeiro, Brasil. Los parásitos se mantuvieron en medio Schneider (SIGMA, St. Louis, MO, EUA), suplementado con antibióticos (penicilina sódica 200 UI, estreptomycin 200 µg/mL) y 10 % de suero fetal bovino (SIGMA, St. Louis, MO, EUA) inactivado con calor (56 °C, 30 min).

<sup>1</sup> Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". La Habana, Cuba.

<sup>II</sup> Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

<sup>III</sup> Acuario Nacional de Cuba. La Habana, Cuba.

**Organismos:** los organismos utilizados se dividieron en 2 grupos, algas e invertebrados marinos, según correspondían. En la tabla 1 se muestran las especies utilizadas, nombre de la familia, tipo de extracto, lugar de colecta y número de espécimen. Los invertebrados *Bunodosoma granulifera* y *Aplysia dactylomela* fueron colectados en playa Baracoa, Bauta, Artemisa.

**Preparación de los extractos:** se utilizó todo el cuerpo del ejemplar. Los extractos se prepararon por maceración con agitación ocasional durante una semana y se usó alcohol 80 %. Estos se secaron, se liofilizaron y se almacenaron a -20 °C. Las algas *Bryothamnion triquetrum*, *Ceramium nitens* y *Halimeda opuntia* se colectaron en los Bajos de Santa Ana, mientras que los ejemplares de *Physalia physalis* procedieron de la Playa Jaimanitas, ambos lugares ubicados en el municipio Playa. Para la preparación de los extractos de *B. triquetrum*, *H. opuntia* y *P. physalis* se utilizó todo el cuerpo de los ejemplares. Con los cuerpos totales se realizó un proceso de autólisis con agua destilada y regímenes intermitentes de homogenización mecánica con Waring-Blender. Posteriormente, los extractos se filtraron con lana de vidrio y el filtrado se centrifugó a 3 200 g y 4 °C durante 1 h. El extracto hidroalcohólico de *C. nitens* se preparó utilizando la metodología descrita para los anteriores, con la diferencia del solvente empleado, que en este caso fue etanol-agua destilada (1:1). Todos los sobrenadantes se liofilizaron y se conservaron a 4 °C hasta su utilización.

**Fármaco de referencia:** se empleó la pentamidina (Richet, Buenos Aires, Argentina), la cual es un medicamento convencional usado en el tratamiento de la leishmaniosis, preparada a una concentración de 10 mg/mL.

**Actividad frente a promastigotes:** los extractos se adicionaron a una concentración final de 200 µg/mL a cultivos de promastigotes que se encontraban a razón de 10<sup>5</sup> parásitos/mL y se incubaron durante 72 h a 26 °C. Posteriormente, se midió la actividad de la fosfatasa alcalina según la metodología descrita por Bodley y otros;<sup>8</sup> los resultados se expresaron como concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>). A los extractos que mostraron una CI<sub>50</sub> menor que 100 µg/mL se les realizó el ensayo 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, estreptomycin 200 mg/mL) y se trataron con los extractos a concentraciones desde 12,5 a 200 µg/mL durante 48 h. La actividad se determinó por un método colorimétrico usando una solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolio (MTT, SIGMA, St. Louis, MO, EUA),<sup>9</sup> y se determinó la CI<sub>50</sub>. Finalmente, se calculó el índice de selectividad (IS), y los extractos que mostraron un IS mayor que 5 se evaluaron frente a amastigotes de *L. amazonensis*.

**Actividad frente a amastigotes:** se extrajeron macrófagos peritoneales de ratones BALB/c, como se describió previamente. Estas células se

**Tabla 1.** Especies de algas e invertebrados marinos utilizados en este estudio

Clasificación	Especie	Familia	Extracto	Zona de colección	Número de espécimen
Algas	<i>Bryothamnion triquetrum</i> (S.G.Gmelin) M.A.Howe	Rhodomelaceae	Acuoso	Bajo de Santa Ana, La Habana	HANC 056
	<i>Ceramium nitens</i> (J. Agardh)	Ceramiaceae	Hidroalcohólico	Bajo de Santa Ana, Habana	HANC (Ido. 350, La 351)
	<i>Halimeda opuntia</i> (L) Lamouroux	Udoteaceae	Acuoso	Bajo de Santa Ana, La Habana	HANC 200
Invertebrados marinos	<i>Aplysia dactylomela</i> (Rang)	Aplysiidae	Hidroalcohólico	Baracoa, Artemisa	IDO 03.3.2.002
	<i>Bunodosoma granulifera</i> (Lesueur)	Actiniidae	Hidroalcohólico	Baracoa, Artemisa	IDO 06.3.0737
	<i>Physalia physalis</i> (Linnaeus)	Physaliidae	Acuoso	Playa Jaimanitas, oeste de La Habana	ANC 03.1.102

infectaron con promastigotes estacionarios a razón de 4 parásitos por macrófago<sup>10</sup> durante 4 h y se trataron con 10 µL de cada extracto a una concentración inicial de 200 µg/mL. Después de 48 h de incubación a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>, se realizaron conteos directos en cultivos teñidos por Giemsa y se calculó la CI<sub>50</sub>.

**Análisis estadístico:** la CI<sub>50</sub> en todos los ensayos realizados se obtuvo directamente de una curva de regresión lineal y fue el resultado de la media de 3 réplicas realizadas por separado. Los valores fueron comparados por Mann-Whitney utilizando el programa STATISTICA para Windows, Versión 4.5, 1993.

De los extractos evaluados en promastigotes, *B. triquetum*, *H. opuntia*, *B. granulifera* y *P. physalis* mostraron inhibición del crecimiento, con una CI<sub>50</sub> < 100 µg/mL. De ellos, solo los extractos de *H. opuntia* y *P. physalis* tuvieron una baja toxicidad con un IS > 5 y una potente actividad frente a amastigotes (tabla 2).

Existen numerosas algas que han mostrado actividad leishmanicida, como son, *Bostrychia tenella*,<sup>6</sup> *Laurencia microcladia*, *Dictyota caribea*, *Turbinaria turbinata*, *Lobophora variegata*, *Cladophora rupestris*, *Ulva intestinales*, *Ulva lactuca*, *C. nitens* y *B. triquetrum*, estas 2 últimas evaluadas por nosotros, donde sus actividades fueron similares a las encontradas en este estudio.<sup>11,12</sup>

*Halimeda* es un género de algas verdes segmentadas y calcificadas, que habitan en arrecifes y lagunas tropicales. En la actualidad están reconocidas 33 especies de este género.<sup>13</sup>

El extracto de *H. opuntia* mostró inhibición del crecimiento de promastigotes con una CI<sub>50</sub> = 83,5 µg/mL, mientras que en amastigotes su actividad fue estadísticamente mayor (p < 0,05) con

una CI<sub>50</sub> = 70,7 µg/mL. En cuanto a la especificidad de este extracto resultó ser más selectivo para el parásito con un IS = 6.

En la literatura no se encontraron estudios de esta especie contra *Leishmania*, sin embargo, ha sido probada contra bacterias<sup>14</sup> y otros protozoos como *Plasmodium falciparum*.<sup>15</sup> Sobre la composición química de esta alga se ha reportado la presencia de lectinas, confiriéndole un alto poder hemaglutinante.<sup>16</sup>

*P. physalis* es el único miembro de la familia Physaliidae. Es un organismo pelágico colonial comúnmente localizado en océanos abiertos de regiones tropicales y subtropicales, aunque se pueden encontrar en aguas poco profundas y playas. Su cuerpo está formado por una vela gelatinosa de 15 a 30 cm de longitud y un cuerpo central con numerosos tentáculos que pueden llegar a medir 50 m.<sup>17,18</sup>

Este extracto fue el que presentó una mayor actividad antileishmanial, tanto en promastigotes como en amastigotes (CI<sub>50</sub> = 52,2 µg/mL y CI<sub>50</sub> = 40,5 µg/mL respectivamente), y una menor toxicidad con un IS = 8 (tabla 2). En la literatura no se encontraron estudios de esta especie contra *Leishmania*, ni contra ningún microorganismo. Sin embargo, otros invertebrados como esponjas, ascidias, bryozoos y octocorales han sido probados contra diferentes bacterias y hongos, y la actividad mostrada por ellos ha sugerido continuar sus estudios, para obtener sus metabolitos secundarios.<sup>19</sup>

A pesar de que ninguno de estos extractos mostró mayor actividad que la pentamidina (CI<sub>50</sub> = 1,3 µg/mL) hay que tener en cuenta que estos son una mezcla compleja de varios componentes donde el(los) principio(s) activo(s) podría(n) estar en un bajo porcentaje, por lo que sería de

**Tabla 2.** Actividad antileishmanial de extractos marinos

Producto	CI <sub>50</sub> <sup>a</sup> ± DE Promastigotes (µg/mL)	CI <sub>50</sub> <sup>a</sup> ± DE Citotoxicidad (µg/mL)	IS <sup>b</sup>	CI <sub>50</sub> <sup>a</sup> ± DE Amastigotes (µg/mL)
<i>Bryothamnion triquetrum</i>	78,6 ± 1,8	258,1 ± 2,6	3	-
<i>Ceramium nitens</i>	>100	-	-	-
<i>Halimeda opuntia</i>	83,5 ± 2,1	526,4 ± 8,2	6	70,7 ± 0,6
<i>Aplysia dactylomela</i>	>100	-	-	-
<i>Bunodosoma granulifera</i>	82,8 ± 1,09	170,1 ± 10,8	2	-
<i>Physalia physalis</i>	52,2 ± 4,5	406,6 ± 1,1	8	40,5 ± 3,2
Pentamidina	0,37 ± 0,01	11,7 ± 1,7	9	1,3 ± 0,1

<sup>a</sup>: CI<sub>50</sub>: concentración del extracto que provoca 50 % de inhibición; <sup>b</sup>: IS: índice de selectividad= CI<sub>50</sub> macrófagos/CI<sub>50</sub> de promastigotes.

gran importancia su fraccionamiento y la consecuente purificación de sus componentes activos.

Teniendo en cuenta estos resultados consideramos que los extractos de *H. opuntia* y *P. physalis* mostraron una promisorio actividad antileishmanial, por lo que se sugiere continuar los estudios de su actividad *in vivo*.

### Antileishmanial activity of six extracts from marine organisms

#### ABSTRACT

**Introduction:** infections caused by protozoa of the genus *Leishmania* are a global health problem with a high prevalence in underdeveloped countries. There is no vaccine against this disease at present and the treatment used is poor, so the search for more effective and safe medicines is an urgent need.

**Objective:** to assess the *in vitro* antileishmanial activity of six aqueous and hydroalcohol extracts from marine organisms.

**Methods:** the activity of six extracts against *Leishmania amazonensis* promastigots and amastigots as well as their toxicity against peritoneal macrophages in BALB/c mice. **Results:** in the promastigot assay, the extracts from *Bryothamnion triquetrum*, *Bunodosoma granulifera*, *Halimeda opuntia* and *Physalia physalis* showed growth inhibition at concentrations lower than 100 µg/mL whereas in amastigots, these last two extracts were the most active and least toxic with a selectivity index of 6 and 8 respectively. **Conclusions:** taking these results into account, it was considered that the *H. opuntia* and *P. physalis* extracts showed a promising activity, so it is suggested that further studies on its *in vivo* activity be conducted.

**Key words:** *Leishmania amazonensis*, marine extracts, *Halimeda opuntia*, *Physalia physalis*.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. Neglected Tropical Diseases-Innovative and Intensified Disease Management. Geneva: World Health Organization; 2007.
2. Orhan I, Sener B, Kaiser M, Brun R, Tasdemir D. Inhibitory activity of marine sponge-derived natural products against parasitic protozoa. *Mar Drugs*. 2010;8(1):47-58.
3. Faulkner D. *Mar Pharmacol*. Antonie Van Leeuwenhoek. 2000;77(2):135-45.
4. Proksch P, Edrada RA, Ebel R. Drugs from the seas-Current status and microbiological implications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002;59(2-3):125-34.
5. Mayer AM, Rodriguez AD, Berlinck RG, Hamann MT. Marine pharmacology in 2005-6: Marine compounds with antihelminic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis and antiviral activities, affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Biochem Biophys Acta*. 2009;1790(5):283-308.
6. De Felício R, de Albuquerque S, Marx MC, Yokoya NS, Debonsi HM. Trypanocidal, leishmanicidal and antifungal potential from marine red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales). *J Pharm Biomed Anal*. 2010;52(5):763-9.
7. Genovese G, Tedone L, Hamann MT, Morabito M. The mediterranean red alga *Asparagopsis*: A source of compounds against *Leishmania*. *Mar Drugs*. 2009;7(3):361-6.
8. Bodley AL, McGarry MW, Shapiro TA. Drug cytotoxicity assay for African Trypanosomes and *Leishmania* Species. *J Infect Dis*. 1995;172(4):1157-9.
9. Sładowski D, Steer SJ, Clothier RH, Balls M. An improve MTT assay. *J Immunol Methods*. 1993;157(1-2):203-7.
10. Caio E, Lima D, Kaplan MAC, Nazareth M, Rossi-Bergmann B. Selective effect of 2,6-dihydroxy-4methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agent Chemother*. 1999;43(5):1234-41.
11. Freile-Pelegri Y, Robledo D, Chan-Bacab MJ, Ortega-Morales BO. Antileishmanial properties of tropical marine algae extracts. *Fitoter*. 2008;79(5):374-7.
12. Spavieri J, Kaiser M, Casey R, Hingley-Wilson S, Lalvani A, Blunden G, et al. Antiprotozoal, antimycobacterial and cytotoxic potential of some British green algae. *Phytother Res*. 2010;24(7):1095-8.
13. Drew EA. Diversity of the green algal genus *Halimeda* in the Chagos Archipiélago, Central Indian Ocean. *Aquat Bot*. 1995;52(3):143-50.
14. Gupta MP, Gámez NE, Santana AI, Solis PN, Palacios G. Antimicrobial activity of various algae of the Panamanian Atlantic coast. *Rev Med Panama*. 1991;16(1):64-8.
15. Ravikumar S, Jacob Inbaneson S, Suganthi P. Seaweeds as a source of lead compounds for the development of new antiplasmodial drugs from South East coast of India. *Parasitol Res*. 2011;109(1):47-52.
16. Perez-Lorenzo S, Levy-Benshimol A, Gomez-Acevedo S. Presence of lectins, tannins and protease inhibitors in venezuelan marine algae. *Acta Cient Venez*. 1998;49(3):144-51.
17. Sterrer W. Bermuda's Marine Life. Island Press: Bermuda; 1992.
18. Kurlansky M. *Physalia physalis* (on-line), Animal Diversity Web. [cited Feb 25 2004]; 2004. Available at: [http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Physalia\\_physalis.html](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Physalia_physalis.html)
19. Selegim 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.

Recibido: 10 de agosto de 2011. Aprobado: 21 de septiembre de 2011.

Marley García Parra. Departamento de Parasitología. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Autopista Novia del Mediodía. Km 6 1/2 AP 601. Lisa. La Habana, Cuba. Fax: 53-7-2046051 y 53-7-2020633. Correo electrónico: marley@ipk.sld.cu