

MODELO EXPERIMENTAL EN EL ESTUDIO DE POSIBLES PRINCIPIOS ACTIVOS ANTIPALÚDICOS

Nelly Incio V¹, Pedro Álvarez F^{2,3}

RESUMEN

Objetivo: Contribuir a desarrollar un modelo experimental de bajo costo y con menor riesgo, evitando el empleo de suero humano, para el cultivo continuo de *Plasmodium falciparum* en eritrocitos humanos para estudios iniciales de plantas medicinales con probable acción antipalúdica. **Materiales y métodos:** Se siguió, en lo fundamental, la técnica descrita de Trager y Jensen, con pequeñas modificaciones como no emplear sangre heparinizada ni suero humano. En frascos de cultivo celular el paquete globular fue resuspendido en RPMI 1640 suplementado con Medium hepes y suero fetal bovino inactivado. La muestra de *P. falciparum* en un criotubo fue finalmente sembrada. El cultivo continuo fue enfrentado con el extracto acuoso de *Bixa orellana* (achiote). **Resultados:** Obtenidos los cultivos de eritrocitos sin contaminación, la propagación del *P. falciparum* demoró alrededor de 60 días. El extracto de *B. Orellana* produjo lisis de los eritrocitos parasitados, obteniendo similar resultado con el estándar sulfato de quinina. **Conclusiones:** Se logró desarrollar un modelo experimental simple, de poco riesgo por no emplear suero humano, para cultivo continuo de *P. falciparum*, con posibilidades en la exploración de plantas de empleo antipalúdico tradicional.

Palabras clave: Malaria; *Plasmodium falciparum*; Plantas medicinales; Fitoterapia; *in vitro* (fuente: DeCS BIREME).

ABSTRACT

Objective: Contribute to the development of an experimental model, which is more economic and of lesser risk, avoiding the use of human sera for continuous culture of *Plasmodium falciparum* in human erythrocytes for initial studies of medicinal plants with alleged antimalarial possibilities. **Materials and methods:** The Trager and Jensen technique was followed with minor modifications, such as not using heparinized blood or human sera. The globular package was resuspended in RPMI 1640 in cell culture flasks, supplemented with hepes medium and inactivated bovine fetal serum. The *P. falciparum* samples in a cryotube was finally harvested. The continuous culture was challenged with watery extract of *Bixa orellana* (achiote in Spanish). **Results:** The erythrocyte cultures were achieved without contamination and the spread of *P. falciparum* was delayed for about 60 days. *B. orellana* extract caused lysis in the parasited erythrocytes, thus achieving a similar results with the standard Quinine Sulphate. **Conclusions:** A simple, experimental model was developed for continuous culture of *Plasmodium falciparum*, low risk in the fact that it does not use human sera, which shows some promise in the study of traditional antimalarial use.

Key words: Malaria; *Plasmodium falciparum*; Medicinal plants; Phytotherapy; *in vitro* (fuente: DeCS BIREME).

INTRODUCCIÓN

El proceso de ensayos clínicos de drogas nuevas se inicia en diversas etapas, siendo consideradas una de las primeras los estudios en cultivos celulares. Estas incluyen modelos experimentales *in vitro*, como son los cultivos de eritrocitos humanos.

La Organización Mundial de la Salud ha reiterado que un problema grave de salud pública lo constituye el paludismo, por afectar a miles de personas en países en

desarrollo, conduciendo al gasto de enormes recursos de salud¹. La búsqueda de principios activos antipalúdicos como drogas nuevas obtenidas de los recursos vegetales en esos países es necesaria y pertinente, considerando las posibilidades alcanzadas con dos principios activos en la terapia antipalúdica, la quinina extraída de la *Cinchona officinalis* y la artemisinina de la *Artemisa annua*^{2,3}.

Este reporte preliminar intenta contribuir con un modelo experimental económico y de menor riesgo en manejo

¹ Laboratorio de Vacunas Bacterianas, Centro Nacional de Productos Biológicos. Instituto Nacional de Salud. Lima. Perú.

² Centro Nacional de Control de Calidad. Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

³ Laboratorio de Investigación en Plantas Medicinales, Centro Nacional de Salud Intercultural. Instituto Nacional de Salud. Lima. Perú.

de suero humano, para el cultivo continuo de *Plasmodium falciparum* en eritrocitos humanos a fin de motivar estudios iniciales de extractos de plantas medicinales con supuestas posibilidades antipalúdicas, especialmente por su empleo tradicional por curanderos y sectores de la población, para futuros ensayos clínicos o propósitos afines.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se siguió en lo fundamental la técnica descrita en el artículo histórico de Trager y Jensen⁴, adaptando algunos pasos, como el no emplear sangre heparinizada, suero humano, bomba peristáltica ni procedimientos menores, que no afectaron las condiciones para mantener viables los eritrocitos, dándoles la calidad de nutrientes, atmósfera de relativamente alto CO₂, temperatura apropiada y esterilidad de ambiente. Se usaron frascos desechables de cultivo celular (Falcon®) de 25 mL que se incubaron en un horno (Memmert®) calibrado en 37 °C. Tales frascos fueron colocados antes de introducirlos al horno dentro de un envase metálico herméticamente cerrado y sellado con cinta adhesiva, en atmósfera de CO₂ obtenido adrede agotando casi todo el O₂ por combustión.

Los eritrocitos para el cultivo provinieron de un donante con grupo sanguíneo O Rh +, sin antecedentes patológicos significativos, que no provenía de zonas tropicales y con su consentimiento informado. La muestra sanguínea de 1 mL extraída de la vena de la flexura del codo fue diluida en un tubo de fondo cónico estéril (Falcon®) conteniendo solución salina al 0,9% hasta completar 50 mL en total, fue agitada suavemente por unos segundos para homogeneizarla y luego centrifugada (Eba 21 Hettich®) por diez minutos a 1500 rpm.

El sobrenadante fue eliminado y el paquete globular obtenido se diluyó con una nueva solución salina hasta 50 mL, se repitió este procedimiento por tres veces. En la última, el paquete globular fue resuspendido en medio de cultivo celular consistente en RPMI 1640 suplementado con Medium hepes en el mismo frasco (Sigma Aldrich), preparado previamente. La preparación previa consistió en diluir 1,64 gramos del medio en agua destilada hasta alcanzar 90 mL incluyendo gentamicina (10 µg/mL) 0,002 mL, luego se agregó 10 mL de suero fetal bovino inactivado (HyClone®), resultando en total 100 mL que finalmente se esterilizó por filtración al vacío, con membrana de diámetro de poro 0,22 µm. Una vez resuspendido el paquete globular, una parte del volumen se utilizó para el cultivo controlado y se llevó a estufa a 37 °C, en tanto la parte restante era refrigerada a 5 °C para su empleo cuando fuera necesario.

Del Laboratorio de Malaria del Centro Nacional de Salud Pública del Instituto Nacional de Salud de Perú (INS) se obtuvo una muestra, de un donante sin tratamiento alguno, de *P. falciparum* Q-024 29-04-00 en un criotubo (Criovial®) de 1 mL y a -70 °C, el cual fue llevado en pasos sucesivos a refrigeración, hasta alcanzar 5 °C en 48 horas. Luego se controló la identidad con la coloración Giemsa y se inició el control de esterilidad. En las siguientes 24 horas la cepa fue diluida en 10 mL de medio de cultivo celular RPMI 1640 con Medium hepes y sembrada en volumen aproximado de 0,5 mL en los frascos de cultivo que contenían los eritrocitos ya señalados.

Los cultivos continuos *in vitro* de las formas asexuales de *P. falciparum* fueron vigilados diariamente considerando la variación del color del medio, cambiándoles el sobrenadante al inicio y cinco días después de la siembra; luego fueron renovados cada dos días o de acuerdo al color del medio. Se observó la cantidad de eritrocitos parasitados por campo, usando la coloración Giemsa, y se realizó la reposición de los eritrocitos perdidos por la eclosión debida a la reproducción asexual del *P. falciparum*, con nuevos eritrocitos del mismo donante.

Se colectaron hojas de *Bixa orellana* ("achiote") del Jardín Botánico del Centro Nacional de Salud Intercultural del INS, las cuales fueron limpiadas y colocadas entre pliegos de papel blanco tipo periódico y mantenidas a temperatura ambiente (estación de verano) por dos semanas para el secado, finalmente fueron trituradas finamente por molienda. La obtención del extracto acuoso se realizó por reflujo con 10 g de polvo de hojas en 1000 mL de agua destilada. La certificación del género y especie fue realizada por el especialista encargado del Jardín Botánico referido.

Para los enfrentamientos iniciales con los cultivos de eritrocitos parasitados, de entre los frascos de cultivo conteniendo un volumen aproximado de 4,5 mL se eligieron aquellos con un hematocrito de 2% y una densidad de trofozoitos o esquizontes de alrededor de 15 por campo, una muestra de 0,1 mL de extracto de *B. Orellana* se aplicó en cada uno de dos frascos. El mismo volumen se aplicó a cada uno de otros dos frascos de cultivo con las mismas características aunque contenían solamente eritrocitos con el fin de observar algún efecto del extracto sobre ellos. Como droga de referencia se aplicó el estándar sulfato de quinina (USP) 0,1 mL a cada uno de dos frascos de cultivo celular con hematíes parasitados y en otros dos con hematíes no parasitados. Se mantuvo un frasco de cultivo con eritrocitos parasitados y otro con eritrocitos no parasitados para comparar algún cambio en el tiempo. Todos estos frascos se observaron por cinco días.

RESULTADOS

Los cultivos de eritrocitos fueron obtenidos sin presentar contaminación. Después del sembrado, la propagación inicial del *P. falciparum* fue lenta, en alrededor de 60 días (luego de iniciada la siembra a partir de la muestra) se alcanzó la concentración deseada, mostrando en los eritrocitos los diferentes estadios del ciclo asexual. La concentración deseada en los subcultivos a partir de los eritrocitos parasitados, se alcanzó en períodos menores a treinta días. El experimento fue repetido varias veces obteniéndose el mismo resultado en todos los subcultivos, lo cual constituía una validación, alcanzando la reproducibilidad.

Se encontró que el extracto de *B. orellana* no afectaba los cultivos de eritrocitos no parasitados, en cambio en los cultivos de eritrocitos parasitados produjo lisis de tales eritrocitos a partir de las 24 horas aproximadamente. Con sulfato de quinina se observó lisis de los eritrocitos parasitados alrededor de las 30 horas, sin afectar a los no parasitados.

DISCUSIÓN

El uso de la medicina tradicional para resolver problemas de salud como la malaria en países en vías de desarrollo ha sido considerado importante y urgente⁵. Se eligió el cultivo de *P. falciparum* por ser el parásito de malaria humana de mayor importancia⁶ como por ser la única especie de *Plasmodium* en la cual todos los estados en su ciclo de vida han sido establecidos en cultivos⁷.

El cultivo de *P. falciparum* *in vitro* en la fase esquizogónica, en su ciclo asexual, requiere simular las condiciones para el desarrollo del parásito en los eritrocitos. Desde el momento en que Trager y Jensen describieron el método en 1976, se encontró que el cultivo del *P. falciparum* en los eritrocitos era fundamental en la investigación en malaria. En base a dicho método se han reportado diversas técnicas para el cultivo de *P. falciparum*, incluyendo rotación en la incubación⁸, plasma humano en lugar de suero⁹, un medio libre de suero¹⁰, usando un bioreactor¹¹, empleando adhesivos celulares¹² o el empleo de albúmina sérica bovina enriquecida en lugar de suero humano¹³.

En el presente caso, usamos el suero fetal bovino como suplemento del medio en lugar del suero humano, por la posible presencia de factores inhibitorios, el costo, la reproducibilidad y riesgos por otros patógenos del suero humano que en nuestro medio es frecuente particularmente por hepatitis y VIH¹⁴, (cuya inactivación

agregaría un paso adicional) pero se mantuvo el medio de cultivo tisular RPMI. Aunque se han efectuado pequeñas modificaciones en las técnicas de cultivo celular *in vitro*, esencialmente es la misma técnica compleja desarrollada por Trager y Jensen, pretendimos simplificar algunos pasos a fin de conseguir un modelo experimental *in vitro* para empleo en la evaluación de recursos vegetales en un laboratorio común.

Los resultados del desarrollo del *P. falciparum* en los eritrocitos, corresponde a sus diferentes estados *in vitro*, descritos como anillos, trofozoitos y esquizontes¹⁵, con diferentes características morfológicas y metabólicas, exhibiendo una mezcla randomizada de todos los estados del desarrollo⁴, distinto a su evolución *in vivo* en el humano donde los parásitos muestran una sincronía en su patrón de desarrollo. Por ello, el enfrentamiento *in vitro* de posibles antipalúdicos puede resultar complejo en la interpretación. Respecto a la lenta propagación en el presente caso, no fue posible encontrar una causa exacta, pudiendo deberse a la escasez del inóculo entre otros factores no demostrados, aunque puede superar los 30 días, como ha ocurrido con otros autores que han utilizado incluso suero humano¹⁵.

Evaluando inicialmente las posibilidades de enfrentamientos de extractos de plantas, usando metodologías alternativas a las convencionales, el extracto de *B. orellana* recibió atención por su posible actividad contra *P. falciparum* hallada justamente en técnicas alternativas como es la inhibición de la polimerización del hem, en que demostró 70% de inhibición¹⁷, aunque no se le encontró efecto en cultivo celular. La hemólisis en los hematíes parasitados no deja de ser sorprendente aunque no sea una metodología convencional, lo que sería atribuido a los compuestos que podría contener el extracto o sus posibles altas concentraciones, lo cual requiere una mayor exploración. Una respuesta similar la encontramos con el sulfato de quinina, un esquizonticida eritrocitario, aunque en un período mayor, por lo cual siendo una respuesta básica similar al extracto, no puede descartarse totalmente un posible efecto antipalúdico del recurso vegetal, lo que debe ser dilucidado en estudios adicionales, así como la búsqueda de metodologías pertinentes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Organización Mundial de la Salud.** Informe sobre el paludismo en el mundo 2005. Ginebra: OMS/UNICEF; 2005.
2. **Basso LA, da Silva LH, Fett-Neto AG, de Azevedo WF Jr, Moreira IdeS, Palma MS, et al.** The use of biodiversity as source of new entities against defined molecu-

- lar targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases- a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100(6): 475-506.
3. **Wright CW.** Traditional antimalarials and the development of novel antimalarial drugs. *J Ethnopharmacol* 2005; 100(1-2): 67-71.
 4. **Trager W, Jensen JB.** Human malaria parasites continuous culture. *Science* 1976; 193(4254): 673-75.
 5. **Ueno HM, Doyama JT, Padovani CR, Salata E.** Effect of *Momordica charantia* L. in mice infected with *Plasmodium berghei*. *Rev Soc Bras Med Trop* 1996; 29(5): 455-60.
 6. **Hurd H, Al-Olayan E, Butcher GA.** In vitro methods for culturing vertebrate and mosquito stages of *Plasmodium*. *Microbes Infect* 2003; 5(4): 321-27.
 7. **Schuster FL.** Cultivation of *Plasmodium spp.* *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(3): 355-64.
 8. **Puthia MK, Tan KS.** *Plasmodium falciparum*: a simplified technique for obtaining singly infected erythrocytes. *Parasitol Res* 2005; 95(3): 176-78.
 9. **Petmitr P, Pongvilairat G, Wilairat P.** Large scale culture technique for pure *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1997; 28(1): 18-21.
 10. **Furuta T, Kimura M, Tsunoda T, Kikuchi T, Kojima S.** Improvement of growth of *Plasmodium falciparum* fresh clinical isolates by using an established serum-free medium, GIT. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2000; 31(3): 606-8.
 11. **Li T, Glushakova S, Zimmerberg J.** A new method for culturing *Plasmodium falciparum* shows replication at the highest erythrocyte densities. *J Infect Dis* 2003; 187(1): 159-62.
 12. **Williams JL.** Stimulation of *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis by conditioned medium from parasite cultures. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60(1): 7-13.
 13. **Ringwald P, Meche FS, Bickii J, Basco LK.** In vitro culture and drug sensitivity assay of *Plasmodium falciparum* with nonserum substitute and acute-phase sera. *J Clin Microbiol* 1999; 37(3): 700-5.
 14. **Rivera-Salcedo JR, Roca-Valencia O.** La experiencia de Perú con un programa nacional de bancos de sangre. *Rev Panam Salud Publica* 2003; 13(2-3): 165-71.
 15. **Kumar VP, Datta S.** Use of variability in the stage-specific transcription levels of *Plasmodium falciparum* in the selection of target genes. *Parasitol Int* 2001; 50(3): 165-73.
 16. **Pardave B, Arce C, Cabezas C.** Aislamiento y mantenimiento in vitro de *Plasmodium falciparum*. *Rev Med Exp* 1997; 14(2): 54-56.
 17. **Baelmans R, Deharo E, Bourdy G, Muñoz V, Quenevo C, Sauvain M, et al.** A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part IV. Is a new haem polymerization inhibition test pertinent for the detection of antimalarial natural products? *J Ethnopharmacol* 2000; 73(1-2): 271-5.

Correspondencia: Q.F. Nelly Incio.

Dirección: Diez Canseco 107, San Martín de Porres. Lima, Perú.

Teléfono: (511) 481-7114 (511) 9927-2764

Correo electrónico: neyincio@yahoo.es, catecol@hotmail.com