

Evaluación de la actividad citotóxica y leishmanicida de extractos y fracciones de *Piper cumanense* y *Piper holtonii*

Jeysson Sánchez-Suárez¹, Diego Albarracín², Maritza Rojas³, Javier Rincón³, Sara Robledo⁴, Diana Lorena Muñoz⁴, Jairo José Oviedo⁵, Martha Nancy Calderón⁶, Nelson Fernández⁷, Gabriela Delgado^{1*}.

¹ Grupo de Investigación en Inmunotoxicología, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, A. A. 14490, Bogotá, D. C., Colombia. *Correo electrónico: lgdelgadam@unal.edu.co.

² Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD), Bogotá, D. C., Colombia.

³ Grupo Principios Bioactivos en Plantas Medicinales, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia.

⁴ Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET), Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

⁵ Clínica Veterinaria y Facultad de Ciencias y Biotecnología, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (UDCA), Bogotá, D. C., Colombia.

⁶ Unidad de Bioquímica, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas Universidad del Rosario, Bogotá, D. C., Colombia.

⁷ Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Pamplona, Pamplona, Colombia.

Recibido para evaluación: 15 de febrero de 2010.

Aceptado para publicación: 4 de abril de 2010.

RESUMEN

Especies del género *Piper* son reportadas como promisorias para el tratamiento de enfermedades tropicales. Este estudio evalúa la actividad citotóxica y leishmanicida de extractos y fracciones de diferente polaridad obtenidas de las especies vegetales *Piper cumanense* (*P. cumanense*) y *Piper holtonii* (*P. holtonii*); se emplearon macrófagos murinos J774 y promastigotes de *Leishmania panamensis* MHOM/CO/87/UA140. La fracción hexánica (PcH) presentó un efecto leishmanicida con una selec-

tividad de 2 en los modelos *in vitro* empleados. Esta selectividad permite sugerir una potencial actividad antileishmanial, que amerita seguir siendo explorada.

Palabras clave: antileishmaniales, *Leishmania panamensis*, ensayos *in vitro*, Piperaceae.

SUMMARY

Evaluation of the cytotoxic and leishmanicidal activity of extracts and fractions of *Piper cumanense* and *Piper holtonii*

Piper genus' species are reported as promissory as tropical diseases treatment. This research showed the cytotoxic and leishmanicidal activity of extracts and fractions of different polarity derived from *Piper cumanense* (*P. cumanense*) and *Piper holtonii* (*P. holtonii*) on murine macrophages J774 and *L. panamensis* promastigotes (MHOM/CO/87/UA140). Hexanic fraction (PcH) exhibited leishmanicidal effect with 2-fold index selectivity in this *in vitro* model used. These results suggest a potential antileishmanial activity which should be more studied.

Key words: antileishmanial, *Leishmania panamensis*, *in vitro* assays, Piperaceae.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis es un grupo de enfermedades parasitarias, endémicas en 88 países (1), que afecta a más de doce millones de personas en el mundo; se considera que 350 millones de personas están en riesgo de contraerla y cada año en el mundo se reportan cerca de dos millones de nuevos casos de infecciones (2). En Colombia se manifiesta de manera endémica: entre 2003 y 2004 se reportaron 10.000 casos/año; en el 2005 estuvo cerca de los 18.000 (3), y durante el 2009 se reportaron 12.727 casos, de los cuales el 98,8% correspondieron a leishmaniosis cutánea (4). Un estudio realizado en Colombia mostró que *Leishmania panamensis* y *L. braziliensis* son los agentes etiológicos asociados con leishmaniosis más ampliamente distribuidos; no obstante, *L. panamensis* predomina y se aisló del 82,4% de los pacientes que participaron en el estudio (5). Además, existe un incremento en el número de reportes donde se ha identificado una reducción en los niveles de eficacia de las sales antimoniales pentavalentes; medicamentos usualmente empleados para el tratamiento de la enfermedad, asociado a fenómenos de resistencia (6), a lo que se suma la carencia de alternativas terapéuticas, ocasionando la necesidad de incrementar las dosis y el tiempo en los esquemas de tratamiento para los pacientes,

aumentando de este modo la incidencia de los efectos adversos conocidos para estas formulaciones (7). Todo esto, sumado a la carencia de una vacuna, hace imperativa la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas.

Especies pertenecientes a la familia Piperaceae son importantes como fuente de sustancias con actividad farmacológica; plantas de esta familia se registran como especies usadas en medicina tradicional latinoamericana para el tratamiento de leishmaniosis, malaria y otras enfermedades tropicales (8-10). El género *Piper* reconocido por su diversidad química (11) se distribuye en regiones tropicales y subtropicales del mundo siendo reconocido por su interés comercial, económico y medicinal. Además de su distribución geográfica, sustancias aisladas de diversas especies del género *Piper* como *P. regnellii* var. *pallescens* (12), *P. heterophyllum* (13), *P. aduncum* (13), *P. glabratum* (14), *P. acutifolium* (14), *P. rusbyi* (15) y *P. elongatum* (16) han demostrado actividad leishmanicida en ensayos *in vitro*. Estudios más detallados, reportan que el extracto etanólico de hojas de *P. betle* presenta una actividad leishmanicida, a través de la inducción de apoptosis en promastigotes y amastigotes de *L. donovani* (17).

Basados en lo anterior, se sugiere la posibilidad de encontrar sustancias bioactivas frente a parásitos de *Leishmania spp.*, en extractos de especies colombianas del género *Piper*. En este trabajo se determinó la actividad citotóxica y el efecto leishmanicida *in vitro* de extractos y fracciones de *P. cumanense* y *P. holtonii*, empleando macrófagos murinos y promastigotes de *L. panamensis*, a modo de tamizaje para elucidar su potencial anti-leishmanial.

METODOLOGÍA

Cultivos celulares

La línea celular de macrófagos J774 se cultivó en cajas de 25 cm² (*Techno Plastic Products AG, Suiza*) estériles en medio RPMI-1640 (*Gibco BRL-Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA*), suplementado con 5% de suero fetal bovino SFB (*Microgen, Ltda., Bogotá, Colombia*), en una incubadora de CO₂ (5%) a 37 °C.

Una cepa de promastigotes de *L. panamensis* MHOM/CO/87/UA140 se mantuvo en cajas de cultivo de 25 cm² (*Techno Plastic Products AG, Suiza*) estériles en medio RPMI-1640 (*Gibco BRL-Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA*), suplementado con 5% de suero fetal bovino SFB (*Microgen, Ltda., Bogotá, Colombia*) y 1% de L-glutamina (*Gibco BRL-Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA*) a 26 °C en condiciones de humedad y gasificación ambientales.

Extractos y compuestos derivados de *P. cumanense* y *P. holtonii*

El material vegetal de *P. cumanense* se colectó en el municipio de Zapatoca, Santander- Colombia. La identificación taxonómica la realizó el biólogo Ricardo Callejas y un ejemplar se depositó en el Herbario Nacional Colombiano con el número COL 468660. Por otra parte, el material vegetal de *P. holtonii* se colectó en el municipio de La Mesa, Cundinamarca, Colombia.

El material colectado de *Piper*, una vez seco y molido, se sometió a extracción con etanol por percolación. El extracto etanólico obtenido después de retirar el solvente, se fraccionó por filtración sobre sílica gel con solventes de polaridad creciente en el caso de *P. cumanense* y por partición líquido-líquido para *P. holtonii*. Se obtuvieron para *P. cumanense* las fracciones PcH (hexano - 71 g), PcD (diclorometano - 105 g), PcM (metanol - 69 g), PcB (butanol - 16,2 g) y por la fracción acuosa PcA (agua - 45 g). Para *P. holtonii* se obtuvieron las fracciones PhH (18,4), PhD (12,58), PhM (1,75), PhB (10,45) y PhA (38,29).

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron utilizando concentraciones de 1×10^4 células/pozo y se dispusieron en una caja de 96 pozos de fondo plano (*Techno Plastic Products AG, Suiza*); se incubaron durante toda la noche (12 a 15 h) para permitir una óptima adhesión. Con el fin de evaluar la susceptibilidad de los macrófagos J774, a los extractos y compuestos se utilizaron ocho concentraciones de cada una. Las concentraciones finales resultantes en cada pozo fueron las siguientes: 2.000; 1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 y 15,625 $\mu\text{g/mL}$ de cada sustancia. Los ensayos se incubaron por 72 h, período después del cual el sobrenadante de cultivo de cada pozo se cambió por medio fresco, y posteriormente se ajustó hasta 44 μM de resazurina (18). Luego de 4 h se evaluó la reducción de resazurina a resorufina (compuesto fluorescente), en un equipo *Tecan GENios Microplate Reader (Tecan, Austria)*, bajo una longitud de onda de excitación de 535 nm y emisión de 590 nm, por medio del software *Magellan4 (Tecan, Austria)*.

Ensayos de actividad leishmanicida sobre promastigotes

A partir de un cultivo celular de promastigotes de *L. panamensis* (cepa MHOM/CO/87/UA140), 2×10^5 parásitos se sembraron en cada pozo de una caja de 96 pozos fondo plano, a la cual previamente se le adicionaron las ocho concentraciones de los extractos y compuestos a evaluar. Los ensayos se incubaron por 72 h, pasado este tiempo a cada pozo se agregó 50 μL de RPMI con resazurina a 220 μM , para un volumen final de 250 μL con resazurina a 44 μM . 36 horas después se evaluó la reducción de resazurina a resorufina, e igual que en los ensayos de citotoxicidad la lectura de la emisión espectrofluorométrica se realizó en el equipo *Tecan GENios Microplate Reader* el programa *Magellan4*.

Tanto en los ensayos de citotoxicidad, como en los de actividad leishmanicida, se utilizaron células (macrófagos o parásitos, respectivamente) expuestas únicamente a medio como control negativo y a diferentes concentraciones de isetionato de pentamidina como fármaco leishmanicida de referencia.

El análisis estadístico de los datos se normalizó con respecto a los pozos que contenían células sin tratamiento para determinar el porcentaje de supervivencia. Las concentraciones inhibitorias 50 (concentración letal 50 [CL₅₀] sobre macrófagos y la concentración efectiva 50 [CE₅₀]) se calcularon gráficamente utilizando el software GraphPad Prism v5.0 (*GraphPad Software, USA*) a través de un modelo de pendiente variable de regresión no lineal. $P < 0,05$ se consideró significativo. La CL₅₀ y la CE₅₀ se utilizaron para calcular el índice de selectividad (IS), el cual representa una significancia para definir la especificidad del efecto. En este caso, se esperaba que las concentraciones a las cuales los parásitos se vean afectados, es al menos dos veces menor que la concentración a la cual los macrófagos (como células hospederas) se les cause mortalidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la excepción de PcA, las sustancias evaluadas mostraron una actividad citotóxica frente a los macrófagos J774; sin embargo, en los ensayos de actividad leishmanicida sobre promastigotes, las fracciones PcB, PcD junto con PcA no lograron inhibir el 50% de la población de parásitos en el rango de concentraciones utilizadas para los ensayos (tabla 1).

El extracto etanólico y las fracciones aisladas de *P. holtonii*, en el esquema empleado en este estudio, sugieren una ausencia de selectividad en su efecto inhibitorio y en ocasiones, como en el extracto y la fracción H, los parásitos se mostraron menos susceptibles que las J774. Por otro lado, aunque el extracto etanólico de *P. cumanense* PcEtOH tampoco reflejó una actividad antileishmanial selectiva, interesantemente la fracción PcH presentó un efecto leishmanicida con una selectividad de 2, lo cual permite contemplar la idea que en el extracto haya presencia de compuestos antagonistas o citotóxicos, que luego del fraccionamiento con hexano son separados; lo anterior teniendo en cuenta que para que la fracción PcH requirió de una concentración dos veces mayor para evidenciar el mismo efecto citotóxico que PcEtOH y de una concentración 1,5 veces menor para poder observar el mismo efecto leishmanicida que el extracto de *P. cumanense*.

Tabla 1. CL₅₀ y CE₅₀ de los extractos y fracciones de *P. cumanense* y *P. holtonii* sobre macrófagos J774 y promastigotes de *L. panamensis*.

| Sustancia | J774 | L. panamensis | |
|-------------|--|--|-----|
| | CL ₅₀ (media µg/mL ± DE) | CE ₅₀ (media µg/mL ± DE) | IS |
| PcEtOH | 299,85 ± 78,70 | 382,95 ± 14,21 | 1 |
| PcA | > 2.000 ± 0 | > 500 ± 0 | ~ 4 |
| PcB | 578,50 ± 229,53 | > 500 ± 0 | < 1 |
| PcD | 424 ± 5,09 | > 500 ± 0 | < 1 |
| PcH | 592,75 ± 322,65 | 244,90 ± 43,06 | 2 |
| PcM | 308,65 ± 94,96 | 241,90 ± 38,89 | 1 |
| PhEtOH | 133,97 ± 56,19 | 280,95 ± 152,95 | 0 |
| PhA | 397,80 ± 137,60 | > 500 ± 0 | < 1 |
| PhB | 207,10 ± 2,55 | 225,90 ± 47,66 | 1 |
| PhD | 77,48 ± 14,20 | 55,30 ± 0,01 | 1 |
| PhH | 83,55 ± 2,28 | 418,30 ± 19,09 | 0 |
| PhM | 199,33 ± 27,29 | 311,50 ± 72,55 | 1 |
| Pentamidina | 9,89 ± 1,31 | 1,70 ± 0,53 | 6 |

CL₅₀: concentración letal 50; CE₅₀: concentración efectiva 50; IS: índice de selectividad.

Si bien, la determinación del valor de significancia de los índices de selectividad es arbitrario, y muchos grupos de investigación lo consideran como promisorio cuando es superior a 10, otros grupos sostienen que índices de selectividad significativos están representados por cualquier valor, equivalente a, por lo menos, dos veces menor a la concentración letal 50 (19). Además, es importante tener en cuenta que por tratarse de extractos y fracciones, variables como la proporción de los compuestos que sean responsables de la actividad leishmanicida y la presencia de antagonistas, pueden ser trascendentales para vislumbrar su verdadero potencial antileishmanial; por ejemplo, la fracción PcH (la cual tuvo mejor actividad) está constituida principalmente por terpenos y esteroides, a los cuales ya previamente se les han atribuido actividades antileishmaniales (20-23) y podrían ser los responsables de la actividad observada en esta fracción; no obstante, sus acciones pueden estar limitadas por la presencia de antagonistas. Por otro lado, en la fracción PcM (en la cual se observó una actividad leishmanicida a una concentración similar a la fracción PcH) también se lograron identificar (por resonancia magnética nuclear) esteroides y terpenos glicosilados, junto con un

derivado del ácido benzoico prenilado. Diversos derivados del ácido benzoico prenilado se han asociado con actividades leishmanicidas importantes (13), razón por la cual sería necesario realizar este mismo tipo de ensayos con el compuesto aislado.

P. holtonii y *P. cumanense* previamente habían sido evaluadas contra *Plasmodium falciparum* y *P. berghei* (24); no obstante, es el primer reporte de actividad leishmanicida para estas dos especies de Piperaceas, a esto se suma que es el primer estudio donde la evaluación antileishmanial de plantas del género *Piper* se realiza sobre parásitos de *L. panamensis*, principal agente etiológico de leishmaniosis cutánea en Colombia.

Con base en los resultados obtenidos, se sugiere continuar con estudios de actividad a partir de compuestos aislados de la fracción hexánica del extracto etanólico de *P. cumanense* y continuar con la evaluación de la eficacia del compuesto sobre amastigotes intracelulares y en modelos *in vivo*.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro agradecimiento a todos los integrantes del Grupo de Investigación en Inmunotoxicología. Este proyecto pudo ser realizado con recursos de la Dirección de Investigación sede Bogotá (DIB), Universidad Nacional de Colombia (proyecto aprobado No. 202010013640) y del Instituto Colombiano por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias (proyecto aprobado 110149326078).

BIBLIOGRAFÍA

1. P.J. Myler, N. Fasel, *Leishmania: "After the genome"*, Caister Academic, Wymondham, 2008.
2. World Health Organization, *Leishmaniasis: The global trend*. URL: http://www.who.int/neglected_diseases/integrated_media_leishmaniasis/en/index.html. 10-03-2010.
3. S.M. Robledo, J.A. Puerta, D.L. Muñoz, M. Guardo, I.D. Vélez, Efficacy and tolerance of pentamidine for treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *L. (V) panamensis* in Colombia, *Biomédica*, 26, Suppl. 1 (2006).
4. Instituto Nacional de Salud, "Sistema de vigilancia en salud pública - SIVIGILA Semana Epidemiológica 51", Bogotá, 2009, pp. 1-9.

5. N.G. Saravia, K. Weigle, C. Navas, I. Segura, L. Valderrama, A.Z. Valencia, B. Escorcía, D. McMahon-Pratt, Heterogeneity, geographic distribution, and pathogenicity of serodemes of *Leishmania viannia* in Colombia, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **66**, 738 (2002).
6. R. Rojas, L. Valderrama, M. Valderrama, M.X. Varona, M. Ouellette, N.G. Saravia, Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania* (*Viannia*) infection, *J. Infect. Dis.*, **193**, 1375 (2006).
7. M.L. Rodrigues, R.S. Costa, C.S. Souza, N.T. Foss, A.M. Roselino, Nephrotoxicity attributed to meglumine antimoniate (Glucantime) in the treatment of generalized cutaneous leishmaniasis, *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **41**, 33 (1999).
8. H. García-Barriga, "Flora medicinal de Colombia - Botánica médica", Bogotá, Mundo Editores, 1992, pp. 222-225.
9. S. Blair, B. Madrigal, "Plantas antimaláricas de Tumaco, Costa Pacífica colombiana", Medellín, Universidad de Antioquia, 2005.
10. S. Blair, A. Correa, B. Madrigal, C. Zuluaga, H. Franco, "Plantas antimaláricas", Medellín, Universidad de Antioquia, 1991, p. 55.
11. V.S. Parmar, S.C. Jain, K.S. Bisht, R. Jain, P. Taneja, A. Jha, O.D. Tyagi, A.K. Prasad, J. Wengel, C.E. Olsen, P.M. Boll, Phytochemistry of the genus *Piper*, *Phytochemistry*, **46**, 597 (1997).
12. M.C. Vendrametto, A.O. Santos, C.V. Nakamura, B.P. Dias Filho, D.A. Cortez, T. Ueda-Nakamura, Evaluation of antileishmanial activity of eupomatenoïd-5, a compound isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallescens*, *Parasitol. Int.*, **59**, 154.
13. N. Flores, I.A. Jiménez, A. Giménez, G. Ruiz, D. Gutiérrez, G. Bourdy, I.L. Bazzocchi, Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from *Piper* species, *Phytochemistry*, **70**, 621 (2009).
14. N. Flores, I.A. Jiménez, A. Giménez, G. Ruiz, D. Gutiérrez, G. Bourdy, I.L. Bazzocchi, Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their antiparasitic activity, *J. Nat. Prod.*, **71**, 1538 (2008).
15. N. Flores, G. Cabrera, I.A. Jiménez, J. Pinero, A. Giménez, G. Bourdy, F. Cortés-Selva, I.L. Bazzocchi, Leishmanicidal constituents from the leaves of *Piper rusbyi*, *Planta Med.*, **73**, 206 (2007).

16. A. Hermoso, I.A. Jiménez, Z.A. Mamani, I.L. Bazzocchi, J.E. Pinero, A.G. Ravelo, B. Valladares, Antileishmanial activities of dihydrochalcones from piper elongatum and synthetic related compounds. Structural requirements for activity, *Bioorg. Med. Chem.*, **11**, 3975 (2003).
17. A. Sarkar, R. Sen, P. Saha, S. Ganguly, G. Mandal, M. Chatterjee, An ethanolic extract of leaves of *Piper betle* (Paan). Linn mediates its antileishmanial activity via apoptosis, *Parasitol. Res.*, **102**, 1249 (2008).
18. S. Anoopkumar-Dukie, J.B. Carey, T. Conere, E. O'Sullivan, F.N. van Pelt, A. Allshire, Resazurin assay of radiation response in cultured cells, *Br. J. Radiol.*, **78**, 945 (2005).
19. D.I. Muñoz, D.P. Cardona, C. Álvaro, L.M. Carrillo, W. Quiñones, F. Echeverri, I.D. Vélez, S.M. Robledo, Effect of hydrazones against intracellular amastigotes of *Leishmania panamensis* and a parasitic cystein protease, *Vitae*, **13**, 5 (2006).
20. M. Morales-Yuste, F. Morillas-Márquez, J. Martín-Sánchez, A. Valero-López, M.C. Navarro-Moll, Activity of (-)-alpha-bisabolol against *Leishmania infantum* promastigotes, *Phytomedicine*, **17**, 279 (2010).
21. D.C. Arruda, D.C. Miguel, J.K. Yokoyama-Yasunaka, A.M. Katzin, S.R. Uliana, Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites *in vitro* and *in vivo*, *Biomed. Pharmacother*, **63**, 643 (2009).
22. H.A. Oketch-Rabah, S.F. Dossaji, S.B. Christensen, K. Frydenvang, E. Lemmich, C. Cornett, C.E. Olsen, M. Chen, A. Kharazmi, T. Theander, Antiprotozoal compounds from *Asparagus africanus*, *J. Nat. Prod.*, **60**, 1017 (1997).
23. A. Dutta, A. Ghoshal, D. Mandal, N.B. Mondal, S. Banerjee, N.P. Sahu, C. Mandal, Racemoside A, an anti-leishmanial, water-soluble, natural steroidal saponin, induces programmed cell death in *Leishmania donovani*, *J. Med. Microbiol.*, **56**, 1196 (2007).
24. G. Garavito, J. Rincón, L. Arteaga, Y. Hata, G. Bourdy, A. Giménez, R. Pinzón, E. Deharo, Antimalarial activity of some Colombian medicinal plants, *J. Ethnopharmacol.*, **107**, 460 (2006).