

ACTIVIDAD LEISHMANICIDA DE *ANNONA PURPUREA*

LEISHMANICIDA ACTIVITY OF *ANNONA PURPUREA*

Dary Luz Cárdenas¹, Janneth A. Lora¹, Rita Luz Márquez-V.^{1,3}, Pedro J. Blanco²

Resumen

La fracción etanólica del extracto total de *Annona purpurea* se evaluó *in vitro* contra amastigotes de *Leishmania panamensis* y contra la línea celular U937. Esta fracción fue más activa que el Glucantime®.

Palabras clave: *Annona purpurea*, amastigotes, citotoxicidad, *Leishmania panamensis*.

Abstract

The ethanolic fraction of total extract of *Annona purpurea* was evaluated *in vitro* against amastigotes of *Leishmania panamensis* and the cell line U937. This fraction was more active as leishmanicidal than Glucantime®.

Key words: amastigotes, *Annona purpurea*, cytotoxicity, *Leishmania panamensis*.

INTRODUCCIÓN

La *Annona purpurea* (familia Annonaceae) es un árbol de copa abierta y dispersa alcanza de 10 a 20 m de alto y de 10 a 50 cm de diámetro, se encuentra difundida en los departamentos de Sucre y Córdoba en la Costa Atlántica colombiana (García, 1992).

La leishmaniasis es una enfermedad tropical causada por protozoos del género *Leishmania*. (Vélez et al., 2001); presenta diferentes formas clínicas que van desde lesiones cutáneas, mucocutáneas, hasta la forma visceral, que posee una alta tasa de mortalidad. (Gallego, 2004) Su distribución es cosmopolita (África, Asia, Europa, Norteamérica y Sudamérica) y hasta la fecha se considera únicamente ausente en Australia y la Antártica (Gallego, 2004). En Colombia, la enfermedad es endémica y se encuentra en el 91% de todo el territorio ubicado bajo los 1750. Durante 1.995, se registraron casos de la enfermedad en 45% de los municipios del país. (Isaza et al., 1999).

Para el tratamiento de las leishmaniasis se emplean los antimoniales pentavalentes desde 1940 como drogas de primera línea. Sin embargo, este tratamiento presenta desventajas como su aplicación parenteral, alta toxicidad, elevado costo y aparición de resistencia por parte del parásito (Vélez, 1997). La necesidad de tratamientos alternativos ha llevado a la búsqueda de productos naturales con uso potencial en la terapia de la leishmaniasis, sustancias bioactivas han sido aisladas de plantas pertenecientes a la familia Annonaceae; por ejemplo, de *Annona muricata* se han aislado compuestos como las acetogeninas, con importante actividad leishmanicida (Jaramillo et al., 1999).

MATERIALES Y MÉTODOS

Proceso de extracción. Se extrajeron por maceración 500 g de hojas secas trituradas con una solución hidroalcohólica 1:1, durante 4 días obteniéndose un extracto que a los 4 °C precipitó (E₁). El extracto fue fraccionado mediante cromatografía flash uti-

¹ Grupo de Investigaciones Fitoquímicas (GiFUS). Universidad de Sucre. A. A. 406. Sincelejo (Sucre), Colombia.

² Grupo de Investigaciones Biomédicas. Universidad de Sucre. A. A. 406. Sincelejo (Sucre), Colombia.

³ Correo electrónico: <fitorita@yahoo.es>.

lizando como fase estacionaria sílica 60GF₂₅₄ y como fase móvil (éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo, isopropanol y etanol) obteniéndose una fracción (E₂).

Se tomaron 10 ml de este extracto total para el reconocimiento de flavonoides, leucoantocianinas, saponinas, esteroides y terpenos. Finalmente a 20 g de hoja fresca picada se adicionó un volumen de ácido clorhídrico (HCl) al 2% hasta cubrir el material; se calentó por 5 minutos para la identificación de alcaloides

Ensayos biológicos. La actividad citotóxica de la fracción etanólica fue evaluada en células promonocíticas humanas U-937, utilizando el micrométodo enzimático MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sereny y Lemesre, 1997). El ensayo se realizó en platos de 96 pozos. Las células U-937 fueron mantenidas en suspensión a 37 °C con 5% de CO₂ en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado. Las células fueron contadas y ajustadas para obtener una concentración final de 200.000 células/ml. Posteriormente, se adicionaron 50 µl de la fracción etanólica de *A. purpurea* previamente disuelta en PVP (polivinilpirrolidina), a concentraciones que iban desde 1 hasta 0.0078 mg/ml. y 50 µl de células U-937 en medio RPMI 1640, las células fueron incubadas a 37 °C con 5% de CO₂, después de 48 horas de incubación se adicionaron 50 µl fracción (E₂), manteniendo igual rango de concentración y 50 µl de medio, para un volumen final de 200 µl. Luego de otras 48 horas de incubación bajo las mismas condiciones, se adicionaron 10 µl de MTT (10 mg/ml) a cada pozo, incubándose por 3 h., la reacción enzimática se detuvo mediante la adición de 100 µl de solución de isopropanol:SDS 50:10. Los platos fueron incubados nuevamente por 30 min bajo agitación y a temperatura ambiente. Las células U-937 cultivadas en ausencia de tratamiento y mantenidas bajo las mismas condiciones fueron utilizadas como control. La densidad óptica fue medida a 570 nm con un lector de ELISA. El ensayo fue

realizado por triplicado, y los resultados calculados por el análisis de PROBIT y expresados como LD₅₀.

Actividad leishmanicida in vitro. La actividad leishmanicida se determinó mediante células de linfoma histiocítico humano U-937 e infectadas con amastigotes de *Leishmania panamensis* (M/HOM//87/UA140), donados por la Universidad de Antioquia (PECET), Medellín (Antioquia), estas células promonocíticas U-937 fueron inducidas mediante la adición de PMA (4-b-forbol-12-miristato-13-acetato) e incubadas por 48 horas. Se adicionaron 100.000 células/ml en medio RPMI 1640 a los pozos que contenían cubreobjetos de vidrio redondos de 12 mm de diámetro, el medio con las células libres fue removido y se adicionó 1,0 ml de medio RPMI 1640 que contenía 2.500.000 promastigotes/ml en fase de crecimiento estacionario, se incubaron por 2 horas a 34 °C con 5% de CO₂. El medio que contenía los parásitos libres fue removido y se adicionó 1,0 ml de RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino y se incubó por 24 horas bajo las mismas condiciones. Transcurrido este tiempo el medio fue remplazado con RPMI 1640 completo que contenía las correspondientes concentraciones de la fracción (E₂). El rango de concentración iba desde 0,78125 µg/ml, hasta 50 µg/ml, renovando el medio cada 2 días, después de 96 horas de incubación en presencia de la fracción, las células fueron lavadas, fijadas con metanol por 20 min, teñidas con Giemsa. Se examinaron 100 células por pozo, teniendo en cuenta células infectadas y no infectadas. Se utilizó como control de infección las células infectadas mantenidas bajo las mismas condiciones, pero en ausencia de la fracción, usando Glucantime® como control positivo bajo las mismas condiciones y concentraciones.

RESULTADOS

La actividad leishmanicida de extractos de plantas ha sido atribuida a compuestos pertenecientes a diversos grupos químicos, como alcaloides

isoquinilínicos, alcaloides indólicos, quinonas, monoterpenos, flavonoides, acetogeninas entre otros. (Chan, 2001).

La citotoxicidad y la actividad de la fracción (E_2) se muestra en la tabla 1. Los resultados muestran una diferencia significativa entre la actividad de la fracción E_2 y la droga control (Glucantime®), indicando que la fracción muestra ser mucho más efectiva y menos tóxica que el control positivo, la efectividad se midió en amastigotes de *L. panamensis* y

citotoxicidad en células promonocíticas U-937. Los resultados sugieren una menor citotoxicidad y una mayor actividad leishmanicida de la fracción, cuando es comparada con los resultados obtenidos con Glucantime® (droga control). La fracción E_2 mostró un índice de selectividad (IS = 129,05) mucho más alto en comparación al obtenido por el Glucantime® (IS = 17,16); generalmente se considera que la eficacia biológica no es debido a la citotoxicidad cuando este índice es mayor o igual a 10 (Weniger *et al.*, 2001).

Tabla 1. Citotoxicidad y actividad leishmanicida de la fracción E_2

Tratamiento	U-937 LD ₅₀ (µg/ml)	<i>L. panamensis</i> ED ₅₀ (µg/ml)	IS
Fracción E_2	124,02	0,961	129,05
Glucantime®	41,67	2,428	17,16

Índice de selectividad (IS) = LD₅₀/ED₅₀

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sucre (Sincelejo), Colombia, grupo de investigación fitoquímica de la Universi-

dad de Sucre (GIFUS), Dr. Iván Darío Vélez, director del PECET, Dras. Sara Robledo y Lina Carrillo de la Universidad de Antioquia (Medellín), Colombia.

REFERENCIAS

- Chan MJ, Peña LM. 2001. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Natural Product Reports*, 18:674-688.
- Finney DJ. 1964. *Probability Analysis: Statistical treatment of the sigmoid response curve*. Cambridge University Press. Londres, Inglaterra.
- Gallego M. 2004. Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: las leishmaniasis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 23:661-678.
- García H. 1992. *Flora medicinal de Colombia*. Segunda edición. Tercer Mundo Editores. Bogotá, Colombia.
- Isaza DM, Restrepo BN, Arboleda M, Casas E, Hinostroza H, Yurgaqui T. 1999. La leishmaniasis. Conocimientos y prácticas en poblaciones de la costa Pacífica de Colombia. *Revista Panameña Salud Pública*, 6:177-183.
- Jaramillo MC, Arango GJ, Gonzáles MC, Robledo SM, Vélez ID. 1999. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. *Fitoterapia*, 71:183-186.
- Sereno D, Lemesre JL. 1997. Use an enzymatic micromethod to quantify amastigotes stages of *Leishmania amazonensis* in vitro. *Prasitology Research*, 83:401-403.
- Vélez ID. 1997. *Tratamiento de la leishmaniasis*. Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, PECET. Corporación de Patologías Tropicales, Universidad de Antioquia.
- Vélez ID, Hendrickx E, Robledo SM, Agudelo SP. 2001. Leishmaniasis cutánea en Colombia y género. *Cad. Saúde Pública*, 17:171-180.
- Weniger B, Robledo S, Arango GJ, Deharo E, Aragon R, Muñoz V, Callapa J, Lobstein A, Antón R. 2001. Antiprotozoal activities of colombian plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 78:193-200.

