

Actividad anti-leishmanial y citotoxicidad de *Jatropha gossypifolia* L.

Antileishmanial activity and cytotoxicity of *Jatropha gossypifolia* L.

Yoan Verao Esquibel¹, Arellys López Sacerio¹, Mirtha M. González Bedia¹, Niurka Mollineda Diogo², Sergio Sifontes-Rodríguez²

¹ Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Facultad de Química y Farmacia, Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Santa Clara, Cuba.

² Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Centro de Bioactivos Químicos, Santa Clara, Cuba.

<http://dx.doi.org/10.30827/ars.v6i1i4.11800>

Artículo original Original Article

Correspondencia Correspondence

Yoan Verao Esquibel
yverao@nauta.cu

Financiación Fundings

Sin financiación

Conflicto de interés Competing interest

No existe conflicto de interés

Agradecimientos Acknowledgements

Los autores agradecen a la ayuda brindada por los especialistas y técnicos del Centro de Bioactivos Químicos de Santa Clara, Cuba, para la realización de esta investigación.

Received: 10.01.2020
Accepted: 18.06.2020

RESUMEN

Introducción: Los extractos acuosos de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. son utilizados de forma tradicional en el tratamiento de la leishmaniasis. No existen informes concluyentes sobre su efectividad y su citotoxicidad aunque en estudios recientes ha quedado avalada la utilidad de la planta en el tratamiento de la leishmaniasis utilizando otros solventes.

Método: Se determinó la actividad leishmanicida y la citotoxicidad de los extractos acuosos e hidroalcohólicos de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. utilizando el método de fluorescencia de la resazurina en promastigotes de *Leishmania amazonensis* y macrófagos peritoneales de ratón Balb/c respectivamente.

Resultados: Se obtuvieron unas concentraciones inhibitorias 50 de $0,28 \mu\text{g}/\text{mL} \pm 0,15 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($n=3$) y $0,59 \mu\text{g}/\text{mL} \pm 0,26 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($n=3$) para el extracto acuoso e hidroalcohólico respectivamente, aunque no se presentó actividad parasiticida a ninguna de las concentraciones evaluadas. De igual manera las concentraciones citotóxicas 50 obtenidas fueron de $0,91 \mu\text{g}/\text{mL} \pm 0,11 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($n=3$) y $0,57 \mu\text{g}/\text{mL} \pm 0,12 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($n=3$).

Conclusiones: El extracto acuoso resulta ser más eficaz y menos citotóxico frente a los promastigotes de *Leishmania amazonensis*. Dichos resultados avalan la utilización tópica de los extractos en su formulación tradicional para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea.

Palabras clave: Citotoxicidad; *Jatropha gossypifolia* L.; Leishmania; Leishmaniasis.

ABSTRACT

Introduction: Aqueous extracts of the leaves of *Jatropha gossypifolia* L. are traditionally used in the treatment of leishmaniasis. These extracts do not have conclusive reports related to their effectiveness and their cytotoxicity although in recent studies the utility of the plant in the treatment of leishmaniasis using other solvents has been supported.

Method: The antileishmanial activity and the cytotoxicity of the aqueous and hydroalcoholic extracts of the leaves of *Jatropha gossypifolia* L. were determined using the resazurine fluorescence method. Both, promastigotes of *Leishmania amazonensis* and peritoneal macrophages of Balb/c mouse were studied.

Results: The half-maximal inhibitory concentration for the aqueous and hydroalcoholic extract was $0.28 \mu\text{g}/\text{mL} \pm 0.15 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($n=3$) and $0.59 \mu\text{g}/\text{mL} \pm 0.26 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($n=3$) respectively, although they did not show parasiticide activity at any of the evaluated concentrations. Similarly, the mean cytotoxic concentrations obtained were $0.91 \mu\text{g}/\text{mL} \pm 0.11 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($n=3$) and $0.57 \mu\text{g}/\text{mL} \pm 0.12 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($n=3$).

Conclusions: The aqueous extract was more effective and less cytotoxic against *Leishmania amazonensis* promastigotes. The results obtained support the traditional use of the extracts by topical application in the treatment of cutaneous leishmaniasis.

Keywords: Cytotoxicity; *Jatropha gossypifolia* L.; Leishmania; Leishmaniasis.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una de las enfermedades de transmisión vectorial más importantes que afecta tanto al ser humano como a diferentes mamíferos. Es una enfermedad tropical y subtropical causada por diferentes especies de *Leishmania*; parásito intracelular transmitido al humano por la picadura del insecto *Lutzomyia* (desde Estados Unidos hasta el norte de Argentina) o *Phlebotomus* (Europa, norte de África, Oriente Medio, Asia y parte de Sudamérica) teniendo como reservorios a canes, roedores, entre otros⁽¹⁾. La enfermedad tiene tres formas clínicas reportadas: Leishmaniasis visceral o Kala-Azar, Leishmaniasis cutánea y Leishmaniasis mucocutánea⁽²⁾.

En la actualidad, la primera línea de tratamiento contra la leishmaniasis en la mayoría de los países se basa en los antimoniales pentavalentes en la forma de estibogluconato sódico o antimoniato de meglumina⁽²⁾. Pero recientemente en el estado de Bihar, en la India, se han reportado tasas de curación del 35%. Debido a intolerancia a los antimoniales o a la falta de recursos para sostener los tratamientos, se ha sugerido el potencial desarrollo de resistencia a la miltefosina y a la anfotericina liposomal por parte de los parásitos en este lugar. Asimismo, se ha reportado falla al tratamiento con antimoniales pentavalentes en Nepal, por lo que en la actualidad el tratamiento de primera línea en este país es la anfotericina B liposomal, de manera especial contra la forma visceral^(3,4).

Una alternativa al uso de estos fármacos consiste en el uso de las plantas medicinales. De ellas *Jatropha gossypifolia* L. (*J. gossypifolia* L.) tiene demostrada entre sus acciones farmacológicas la actividad anti-leishmanial y le han sido aislados metabolitos con dicha actividad^(5,6). Los usos tradicionales de esta planta para el tratamiento de la leishmaniasis involucran los extractos acuosos de las hojas, sin que por el momento existan estudios profundos⁽⁷⁾. Por lo que este estudio se propone determinar la eficacia de los extractos acuosos e hidroalcohólicos de las hojas de *J. gossypifolia* L. frente a los promastigotes de *Leishmania amazonensis* y su seguridad sobre los macrófagos peritoneales de ratones BALB/c.

MÉTODOS

Preparación de la muestra vegetal

Las hojas de *J. gossypifolia* L. se recolectaron en horas de la tarde del 29 de enero del 2019 en las cercanías de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas (UCLV), Santa Clara, Cuba.

El material recolectado se trasladó en bolsas de nylon negro al Laboratorio de Química Farmacéutica de la mencionada institución. Previo a su procesamiento se realizó la comprobación botánica del mismo en el Centro de Estudios del Jardín Botánico de la UCLV.

Preparación de los extractos

Fueron preparados dos extractos: extracto crudo acuoso y extracto crudo hidroalcohólico. El extracto crudo acuoso fue preparado por reflujo de 30 g de materia vegetal seca y molida en agua destilada; relación 1 g de material vegetal por cada 10 mL de solvente durante 2 h. El extracto crudo hidroalcohólico se obtuvo por el mismo método: reflujo de 40 g de materia vegetal seca y molida en solución hidroalcohólica al 70 %, en igual relación que el extracto acuoso y durante mismo tiempo. Tanto el extracto acuoso como el hidroalcohólico fueron filtrados y rotoevaporados hasta agotamiento de los solventes.

Actividad in vitro frente a promastigotes de *Leishmania amazonensis*.

Las concentraciones de producto que inhibieron el crecimiento de los promastigotes al 50% con respecto al control no tratado (Concentración inhibitoria 50 o CI_{50}) y la concentración mínima de producto que causó total inhibición del crecimiento de los promastigotes (Concentración parasitocida mínima, CPM) fueron usadas como índices de la actividad *in vitro* frente a los promastigotes. Se siguió el procedimiento descrito por Bodley y Shapiro⁽⁸⁾.

Para este estudio se utilizaron placas de 96 pocillos. Columna 1: 200 μ L de medio de cultivo Schneider (Sigma S9895-1L). Columna 2: 2 μ L de furvina (Centro de Bioactivos Químicos, Santa Clara, Cuba)⁽⁹⁾ + 198 μ L de medio, se homogenizó y desechó 80 μ L. Columna 3: 2 μ L del extracto disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU) + 198 μ L de medio, se homogenizó. Columna 4-10: 120 μ L de medio. Se realizaron diluciones seriadas desde 3-10 a razón 1/2,5 (80 μ L) y se desechó los 80 μ L finales. Evaluándose los productos a 120; 48; 19,2; 7,68; 3,07; 1,23; 0,49 y 0,19 μ g/mL respectivamente. Columna 11: 1 μ L de DMSO y 199 μ L de medio, se homogenizó y desechó 80 μ L. Columna 12: 120 μ L de medio. Finalmente se añadió 80 μ L de cultivo de promastigotes de *Leishmania amazonensis* (*L. amazonensis*) a una concentración de 5×10^5 parásitos/mL desde la columna 2 a la 12. Las placas se sellaron con Parafilm® (American National Can, Greenwich, Inglaterra) y se incubaron a 26 °C durante 72 h. Luego se examinaron los cultivos con ayuda de un microscopio invertido para evaluar la presencia de promastigotes móviles en las distintas concentraciones y así estimar la CPM. Posteriormente, se agregó a cada pocillo 20 μ L de resazurina 3 mM (Resazurina

zurin sodium, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) y se incubaron durante otras 8 h en iguales condiciones. Pasado este tiempo, se leyeron las placas en un lector de placas de 96 pocillos (SUMA®, Cuba) a una longitud de onda de 490 nm. Los valores de concentración contra absorbancia media fueron ajustados al modelo de E_{max} sigmoidea y se calculó la CI_{50} ⁽⁹⁾. Los valores de CI_{50} para cada extracto fueron expresados como la media de tres experimentos independientes.

Determinación de la citotoxicidad frente a macrófagos peritoneales de ratón BALB/c

El indicador de citotoxicidad utilizado es la concentración citotóxica 50 (CC_{50}), que es aquella concentración estimada de extracto que reduce a la mitad el número de células viables en comparación con los cultivos controles no tratados. La viabilidad celular fue medida por el ensayo fluorimétrico con rezasurina⁽¹⁰⁾.

Para el ensayo se extrajeron los macrófagos residentes en el peritoneo de ratones BALB/c mediante lavado con medio RPMI 1640 (SIGMA, St. Louis, MO, USA) a 4 °C suplementado con antibióticos (penicilina sódica 200 UI, estreptomina 200 µg/mL). La concentración de la suspensión celular fue determinada por conteo en cámara de Neubauer (se ajustó a 1×10^5 macrófagos/mL). En placas de 96 pocillos se distribuyó de la columna 2-12, 100 µL de la suspensión celular, se incubó durante 2 h a 33 °C en una atmósfera de CO_2 al 5 %. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se añadió: Columna 1: 200 µL de medio RPMI suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y los antibióticos correspondientes. Columna 2: 198 µL de medio y 2 µL de furvina⁽⁹⁾. Columna 3: 198 µL de medio y 2 µL de producto. Columna 4-10: 120 µL de medio. Se realizaron diluciones seriadas desde 3-10 1/2,5 (80 µL) y se desechó los 80 µL finales. Evaluándose los productos a 300; 120; 48; 19,2; 7,68; 3,07; 1,23 y 0,49 µg/mL respectivamente. Columna 11: 1 µL de DMSO y 199 µL de medio. Columna 12: 200 µL de medio. Finalmente se repuso 80 µL de medio desde la columna 3-10. Se incubaron 72 h a 33 °C en una atmósfera de CO_2 al 5 %. Posteriormente, se añadió a cada pocillo 20 µL de rezasurina a 3 µM. La lectura se realizó de 16-18 h de incubación en un lector de placas de 96 pocillos a una longitud de onda de 490 nm. Se calcularon las absorbancias netas para cada concentración y se graficaron las absorbancias resultantes frente a las concentraciones evaluadas. Estas curvas dosis-respuestas se ajustaron a un modelo de E_{max} sigmoidea y se determinó la CC_{50} .

Este procedimiento se repitió para cada producto tres veces y los resultados son expresados como la media y su desviación estándar (DE).

El índice de selectividad (IS) de cada compuesto fue calculado dividiendo la CC_{50} en la línea celular de mamífero entre el promedio de las CI_{50} frente a los promastigotes de *L. amazonensis*. Tal como aparece en la siguiente fórmula:

RESULTADOS

Ambos extractos mostraron actividad inhibitoria del crecimiento de los promastigotes de *L. amazonensis*, aunque no presentaron actividad parasitocida a ninguna de las concentraciones evaluadas (120; 48; 19,2; 7,68; 3,07; 1,22; 0,49 y 0,19 µg/mL).

El extracto acuoso mostró una mejor eficacia contra los promastigotes al alcanzar una CI_{50} de $0,28 \pm 0,15$ µg/mL (n=3) comparada con la del extracto hidroalcohólico: $0,59 \pm 0,26$ µg/mL (n=3).

Como puede apreciarse en la Tabla 1 ambos extractos mostraron citotoxicidad frente a macrófagos peritoneales de ratón BALB/c. En el extracto acuoso se obtuvo menor citotoxicidad que en el hidroalcohólico al presentar una mayor CC_{50} : $0,91 \pm 0,11$ µg/ml (n=3) con IS = 3,26. El extracto hidroalcohólico obtuvo $0,57 \pm 0,12$ (n=3) con IS = 0,97.

Tabla 1. Actividad inhibitoria frente a promastigotes de *L. amazonensis* y citotoxicidad de *J. gossypifolia* L.

Extracto	CI_{50} µg/mL ± DE; n = 3	CC_{50} µg/mL ± DE; n = 3	IS
Acuoso	0,28 ± 0,15	0,91 ± 0,11	3,26
Hidroalcohólico	0,59 ± 0,26	0,57 ± 0,12	0,97

CI_{50} : Concentración Inhibitoria 50; CC_{50} : Concentración Citotóxica 50; DE: Desviación Estándar; IS: Índice de Selectividad.

DISCUSIÓN

La mayor actividad anti-leishmanial en el extracto acuoso tiene como causa más probable que los metabolitos con acción leishmanicida en las hojas de *J. gossypifolia* L. sean de alta polaridad.

Medina⁽¹¹⁾ analizó la potencialidad leishmanicida de tres fracciones obtenidas de un extracto hidroalcohólico de hojas de la especie *J. gossypifolia* L.; preparado por reflujo hasta agotamiento, concentrado y rotoevaporado hasta sequedad. Las fracciones que obtuvo: benceno-cloroformo (BC) y metanol-agua (MA) presentaron una CI_{50} de 0,45 µg/mL y la fracción metanólica (MET) 0,70 µg/mL. Las tres fracciones mostraron una CPM de 0,98 a 2,5 µg/mL. La acción parasitocida ocurre en este caso por la alta concentración de metabolitos en las fracciones analizadas. Puede notarse que la fracción MA, de polaridad mayor, tiene menor CI_{50} que la

fracción MET. Esto es indicativo de que los metabolitos, o combinación sinérgica de metabolitos, con mayor actividad leishmanicida se encuentran en las fracciones más polares del extracto preparado.

Al comparar los resultados obtenidos en este estudio con los de Medina⁽¹¹⁾, vemos que el extracto más polar de los analizados (extracto acuoso) tiene menores CI_{50} que las tres fracciones de este autor. Esto podría ser indicativo de que la preparación de un extracto acuoso más concentrado debería dar como resultado concentraciones parasiticidas menores que las declaradas por Medina⁽¹¹⁾.

Martins y colaboradores⁽⁵⁾ identificaron un metabolito tipo glicósido (*Jatropham*) con actividad leishmanicida en las hojas de *J. gossypifolia* L. con CI_{50} de $0,47 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{mL}$, usando un extracto etanólico al cual también se le determinó la CI_{50} de $4,76 \pm 0,79 \mu\text{g}/\text{mL}$. Ogbonna y colaboradores⁽⁶⁾ aislaron un metabolito diferente (*Jatrophone*) de las raíces de *J. gossypifolia* L. y determinaron su actividad leishmanicida, obteniendo un valor inferior a $0,4 \mu\text{g}/\text{mL}$. Nótese que el extracto acuoso resulta tener mayor efectividad que ambos metabolitos aislados, lo que podría ser indicativo de la presencia en el extracto analizado de más de un compuesto con actividad semejante, de uno más potente o de un efecto sinérgico entre diferentes metabolitos.

Los valores de citotoxicidad obtenidos coinciden con los obtenidos por Apu y colaboradores⁽¹²⁾ quienes analizaron la citotoxicidad de un extracto crudo metanólico y fracciones de diversa polaridad obtenidas a partir de este, en el modelo de *Artemia salina*. Apu y colaboradores⁽¹²⁾ concluyen que la toxicidad de los extractos y fracciones de *J. gossypifolia* L. disminuye con el incremento de la polaridad de los mismos.

El *jatrophone* aislado y caracterizado por Ogbonna y colaboradores⁽⁶⁾ presentó una CC_{50} de $0.43 \mu\text{g}/\text{mL}$ en un ensayo *in vitro* en la línea celular VERO, con un IS de 0.8 lo que, semejante a los extractos obtenidos, indica un mismo nivel de toxicidad contra la célula diana (el protozoo en este caso) que contra las líneas celulares sanas de mamíferos. El *jatropham* aislado por Martins y colaboradores⁽⁵⁾ no tiene ningún reporte de toxicidad, lo que no quiere decir que su índice de selectividad sea alto, sino que queda por determinar.

Es común que muchos productos naturales sean tóxicos ya que las plantas son organismos que sintetizan muchos de estos metabolitos con finalidad defensiva. La citotoxicidad de ambos extractos puede atribuirse por el momento, tanto a los posibles metabolitos leishmanicidas como a los identificados por Almeida⁽¹³⁾. Lo que queda claro, es que futuras investigaciones deben ir encaminadas a separar y aislar el conjunto de compuestos que tiene capacidad leishmanicida

en el extracto acuoso que presenta el mejor índice de selectividad.

Este alto nivel de citotoxicidad no debe resultar limitante para futuras investigaciones sobre esta planta, ya que en un estudio realizado por Xavier-Santos y colaboradores⁽¹⁴⁾ se determinó su nula toxicidad dérmica. Esto abre puertas para la posible aplicación en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea.

Son necesarios otros estudios con este material vegetal en orden de elucidar el mecanismo de acción de sus compuestos bioactivos, mientras se reduce la toxicidad manteniendo la acción terapéutica.

CONCLUSIÓN

Los extractos de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. presentan actividad anti-leishmanial cuyo incremento es directamente proporcional a la polaridad del solvente empleado y elevada citotoxicidad que disminuye inversamente a dicha polaridad. Dichos resultados avalan la utilización tópica de los extractos en su formulación tradicional para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kumar A. Leishmania and Leishmaniasis. SpringerBriefs in Immunology 3. New York: Springer Science+Business Media; 2013. p. 1-12. doi: 10.1007/978-1-4614-8869-9
2. Torres-Guerrero E, Arenas R. Leishmaniasis. Alternativas terapéuticas actuales. Dermatol Rev Mex 2018;62(5):400-409.
3. Sundar S, Chakravarty J. Mechanism of Drug Resistance in Visceral Leishmaniasis. In: Adak S, Datta R, editors. Leishmania: Current Biology and Control. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2015. p. 215-230.
4. Ponte-Sucre A, Díaz E, Padrón-Nieves M. Drug Resistance in Leishmania Parasites. Consequences, Molecular Mechanisms and Possible Treatments. New York: Springer-Verlag; 2013. doi: 10.1007/978-3-7091-1125-3
5. Martins GV, Alves DR, Viera-Araújo FM, Rondon F, Braz-Filho R, Morais SM. Estudo Químico e Avaliação das Atividades Antioxidante, Antiacetilcolinesterase e Antileishmanial de Extratos de *Jatropha gossypifolia* L. (Pião Roxo). Rev Virtual Quim. 2018;10(1):21-36. doi: 10.21577/1984-6835.20180004
6. Ogbonna JC, Igbe I, Erharuyi O, Imieje VO, Falodun A. Biological Activities of a Macrocyclic Diterpenoid Isolated from the Roots of *Jatropha gossypifolia* J Afr Ass Physiol Sci. 2017;5(2):111-120.
7. Félix-Silva J, Brandt RG, da Silva-Jr AA, Zucolotto SM, de Freitas F-PM. *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae): a review of traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxico-

- logy of this medicinal plant. Evid Based Compliment Altern Med 2014;2014:1-32.doi: 10.1155/2014/369204
8. Bodley AL, McGarry MW, Shapiro TA. Drug cytotoxicity assay for African trypanosomes and Leishmania species. Journal of Infectious Diseases. 1995;172(4):1157-1159.
 9. Sifontes-Rodríguez S, Monzote-Fidalgo L, Castañedo-Cancio N, Montalvo-Álvarez AM, López-Hernández Y, Diogo NM, et al. The efficacy of 2-nitrovinylfuran derivatives against Leishmania in vitro and in vivo. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2015;110(2):166-173.
 10. Rolón M, Vega C, Escario JA, Gómez-Barrio A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of Trypanosoma cruzi epimastigotes. Parasitology Res. 2006;99(2):103-107.
 11. Medina Albert JE. Potencial antileishmaniásico y antimicrobiano de las hojas de la especie *Jatropha gossypifolia* L. [Licenciatura]. Santa Clara, Cuba: Universidad Central Martha Abreu de Las Villas; 2018.
 12. Apu AS, Bhuyan SH, Khatun F, Liza MS, Matin M, Hossain MF. Assessment of cytotoxic activity of two medicinal plants using brine shrimp (*Artemia salina*) as an experimental tool. Int J Pharm Sci Res. 2013;4(3):1125-1130.
 13. Almeida PM, Araújo SS, Santos IRMR, Marin-Morales MA, Benko-Iseppon AM, Santos AV, et al. Genotoxic potential of leaf extracts of *Jatropha gossypifolia* L. . Genet Mol Res. 2016;15(1).doi: 10.4238/gmr.15017415
 14. Xavier-Santos JB, Félix-Silva J, Passos JGR, Gomes JAS, Fernandes JM, Barreto Garcia V, et al. Development of an effective and safe topical anti-inflammatory gel containing *Jatropha gossypifolia* leaf extract: results from a pre-clinical trial in mice. Journal of Ethnopharmacology. 2018;227:268-278. doi: 10.1016/j.jep.2018.09.007