

ACTIVIDAD CITOTÓXICA *IN VITRO* EN LÍNEAS CELULARES Y CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA DE LOS ALCALOIDES TOTALES DE CORTEZA DE *GALIPEA LONGIFLORA* (EVANTA)

Grace Ruiz Pinell[✉], Cecilia Ríos Terán, Elvira Navarro Guarachi, Juan Antonio Ávila Illanes

Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés. Av. Saavedra 2224, 2° Piso, Miraflores,
La Paz-Bolivia Telf: 591 2 2229021

Keywords: Total alkaloids, cytotoxicity activity, MDCK cells, Hep-2cells, BHK-21cells, *Galipea longiflora*

ABSTRACT

The *Galipea longiflora* (Envanta) plant species has a variety of medicinal properties, primarily against leishmaniasis. The cytotoxic activity in vitro of Evanta was assessed using the total alkaloids from bark (TAB). The cytotoxic activity was evaluated in continuous cell culture (BHK-21, HEP 2 and MDCK) systems to different concentrations of alkaloids for 24 hours by the colorimetric method with XTT. The cytotoxic effect on lymphocytes and erythrocytes from human peripheral blood was measured at concentrations less than 250 µg/mL by exclusion of the vital dye Tripán Blue method. The cytotoxic effect on BHK-21 cells showed an IC₅₀ of 105.7 µg/mL, for HEP-2 the IC₅₀ was 164.8 µg/mL and on MDCK the IC₅₀ was 173.7 µg/mL. The IC₅₀ for erythrocytes was 154.2 µg/mL in 24 h and 157.6 µg/mL in 48 h and in lymphocytes the IC₅₀ was 67.1 µg/mL. When amphotericin B was used regarding their potentially toxic effect for cells, the BHK 21 showed an IC₅₀ 34.39 µg/mL, for HEP 2 the IC₅₀ was 37.7 µg/mL and for MDCK cells the IC₅₀ was 27.2 µg/mL. The same experiment with amphotericin B showed in erythrocytes an IC₅₀ 12.75 µg/mL in 24 h and 10.4 mg/mL in 48 h and in lymphocytes the CI₅₀ was 15.89 µg/mL. These results confirm a minimum toxic effect at high concentration of Evanta. In addition provide bases to suggest the TAB of *Galipea longiflora* (Evanta) has a high potential for developing drugs against *Leishmania* due to no significant toxic effects. / *Se evaluó la actividad citotóxica in vitro de los alcaloides totales de la corteza (ATC) de la Galipea longiflora (Evanta), especie vegetal a la que se le atribuye una variedad de propiedades medicinales, principalmente contra la leishmaniasis. La actividad citotóxica se evaluó en sistemas de cultivo celular continuo (BHK-21, Hep 2 y MDCK), a diferentes concentraciones de los alcaloides durante 24 horas y fue determinada por el método colorimétrico XTT. La actividad citotóxica de linfocitos y eritrocitos de sangre periférica humana fue medida a concentraciones por debajo de 250 µg/mL por el método de exclusión del colorante vital el azul tripán. Respecto al efecto citotóxico las células BHK-21 mostraron una CI₅₀ 105.7 µg/mL, Hep-2 CI₅₀ 164.8 µg/mL MDCK CI₅₀ 173.7 µg/mL, en eritrocitos la CI₅₀ fue de 154.2 µg/mL a las 24 h. y 157.6 µg/mL a las 48 h. y en linfocitos la CI₅₀ 67.1 µg/mL, con relación a la anfotericina B producto potencialmente tóxico para células BHK 21 (CI₅₀ 34.39 µg/mL), células Hep 2 (CI₅₀ 37.7 µg/mL) y células MDCK (CI₅₀ 27.2 µg/mL), eritrocitos (CI₅₀ 12.75 µg/mL – 24 h. y 10.4 mg/mL – 48 h y en linfocitos 15.89 µg/mL). Evidenciándose un efecto tóxico mínimo a la concentración mas alta. Estos resultados aportan bases para sugerir que los ATC de la Galipea longiflora (Evanta) tiene un alto potencial para el desarrollo de medicamentos contra la Leishmania al presentar efectos toxicos importantes.*

Corresponding author: gracerfm@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Enfermedades protozoarias tales como la leishmaniasis, son la causa de una considerable mortalidad y morbilidad alrededor del mundo, afectando a millones de personas cada año. Según la Organización Mundial de la Salud, hay en todo el mundo 15x10⁶ personas afectadas por las diversas formas de leishmaniasis con una incidencia de 6x10⁵ casos nuevos declarados cada año distribuidos en 88 países. Estas cifras representan evidentemente una importante subestimación del problema debido a diferentes factores: lugares de transmisión muy dispersos, casos no diagnosticados o diagnóstico erróneo¹.

En Bolivia, aproximadamente 800.000 individuos se encuentra en alto riesgo de enfermarse con leishmaniasis; en muchos casos se trata de grupos humanos muy receptivos, que proviene de zonas no infectadas. Los datos

disponibles aún son considerados parciales y no revelan la magnitud del problema². La leishmaniasis, se encuentra en forma de leishmaniasis cutánea localizada, leishmaniasis cutánea difusa, leishmaniasis mucocutánea y leishmaniasis visceral, constituyendo un problema de Salud Pública en las zonas Tropicales y Subtropicales. Muchos estudios conducen a realizar una mayor cantidad de investigaciones con el fin de explotar las propiedades curativas de las plantas y de esta manera extraer, aislar e identificar nuevas moléculas con propiedades farmacológicas de origen natural que sean más efectivas, permitiendo de esta manera abaratar los costos de muchos medicamentos e incluso encontrar estructuras químicas menos tóxicas y más potentes para que puedan ser utilizadas como alternativa en el tratamiento de diversos males, que sufren estas regiones³.

Sobre la base de información científica y medicinal acumulada hasta la fecha^(4,5,6) sobre la especie Evanta (*Galipea longiflora*) se han realizado estudios en el Instituto de investigaciones Fármaco Bioquímicas de La Paz - Bolivia, realizando la optimización de la forma de extracción de alcaloides, determinándose su actividad antiparasitaria *in vitro* de la corteza planta tradicionalmente empleada por la etnia Tacana con el objetivo de dar un aporte importante para el estudio de la búsqueda de fármacos menos tóxicos y naturales. Estos estudios justifican continuar con los estudios de citotoxicidad en líneas celulares y células de sangre periférica humana de los ACT de la Evanta, fortaleciendo el proceso de investigación para el tratamiento de la leishmaniasis.

RESULTADOS, DISCUSIÓN

Citotoxicidad in vitro en células MDCK, Hep-2 y BHK-21

La concentración inhibitoria del 50 % se determinó incubando monocapas de las tres líneas celulares con diluciones seriadas del compuesto. La viabilidad celular se determinó a través de la observación de la morfología celular al microscopio óptico y a través del ensayo colorimétrico XTT antes descrito. Las concentraciones elegidas fueron diluciones seriadas al medio a partir de 250 $\mu\text{g/mL}$, concentraciones que resultaron tóxicas por encima 173.7 $\mu\text{g/mL}$ en el caso de las células MDCK, 164.8 $\mu\text{g/mL}$ en células Hep-2 y 105.7 $\mu\text{g/mL}$ en células BHK-21 en relación a la anfotericina B producto potencialmente tóxico cuya concentración tóxica en promedio esta por encima de los 33.1 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 1).

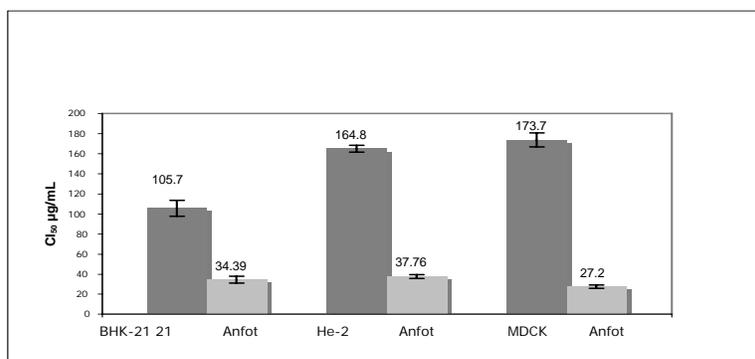


Gráfico 1. Evaluación citotóxica *in vitro* de alcaloides totales de corteza de *Galipea longiflora* (Evanta) Vrs. anfotericina B sobre líneas celulares MDCK, Hep-2 y BHK-21. Los valores representan el promedio \pm la desviación estándar de las experiencias realizadas. La evaluación de la citotoxicidad a cada concentración se realizó por triplicado.

Citotoxicidad en eritrocitos humanos.

La evaluación de la citotoxicidad mediante el método de exclusión con azul tripano mostró una CI_{50} de 154.2 $\mu\text{g/mL}$ a las 24 horas de exposición, mientras que para la anfotericina B en el mismo periodo de tiempo fue de 10.6 $\mu\text{g/mL}$. A las 48 horas de exposición los ATC mostraron un CI_{50} de 157.6 $\mu\text{g/mL}$ y la anfotericina 11.7 $\mu\text{g/mL}$. Esto revela que la concentración de los alcaloides totales requerida para causar mortalidad del 50% de los eritrocitos fue casi 100 veces mas baja que la anfotericina B. (Gráfico 2)

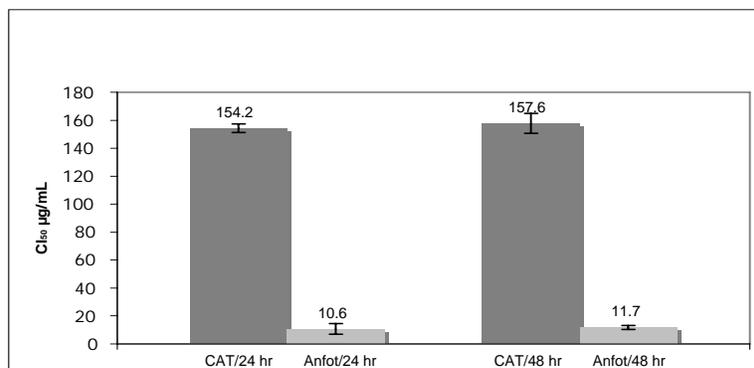


Gráfico 2. Evaluación citotóxica in vitro de los alcaloides totales de corteza de *Galipea longiflora* (Evanta) Vrs. anfotericina B sobre eritrocitos humanos. Los valores representan el promedio \pm la desviación estándar de las experiencias realizadas. La evaluación de la citotoxicidad a cada concentración se realizó por triplicado.

Citotoxicidad en linfocitos humanos.

La evaluación de la citotoxicidad en linfocitos mostró que la CI₅₀ a las 24 horas de exposición fué de 67.1 µg/mL, mientras que para la anfotericina B fue de 15.89 µg/mL. Esto revela que la concentración requerida del ATC para causar mortalidad al 50% de los linfocitos fue casi 40 veces más baja que la anfotericina B.

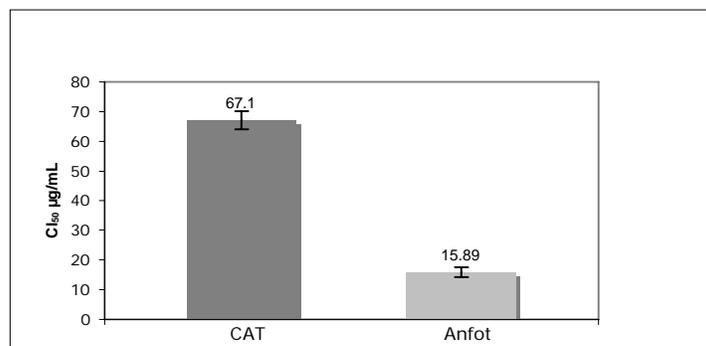


Gráfico 3. Evaluación citotóxica in vitro de los alcaloides totales de corteza de *Galipea longiflora* (Evanta) Vrs. anfotericina B sobre linfocitos humanos. Los valores representan el promedio \pm la desviación estándar de las experiencias realizadas. La evaluación de la citotoxicidad a cada concentración se realizó por triplicado.

Análisis morfológico

Las células MDCK, Hep2 y BHK 21 no tratadas mostraron un crecimiento homogéneo en el cultivo, exhibiendo una forma poligonal con bordes definidos y contenido celular ligeramente granulado. El efecto citotóxico fue observado a las 24 horas de incubación de las líneas celulares con diferentes concentraciones de los alcaloides totales de corteza de *Galipea longiflora* (Evanta) detectándose cambios morfológicos a la concentración mas alta con relación a la anfotericina B droga control que si se observa un efecto citotóxico muy marcado desde la concentración de 250 µg/mL hasta la concentración de 33.1 µg/mL, con una marcada disminución de la viabilidad celular, células dañadas, redondeamiento característico y desprendimiento de células al sobrenadante de los cultivos con el aumento de las concentraciones.

Los resultados encontrados muestran un efecto no citotóxico respecto a las células MDCK, Hep-2 y BHK- 21 y según este estudio *in vitro* sobre eritrocitos y linfocitos los alcaloides totales mostraron una toxicidad muy baja. Aunque los mecanismos específicos se desconocen, éstos bien pudieran involucrar cambios en la permeabilidad de las membranas lo que puede ocasionar lisis de los eritrocitos o en la actividad de enzimas mitocondriales que conducirían a la muerte celular. Todos estos resultados apoyan la búsqueda de compuestos leishmanicidas derivados

de plantas. Nuestro trabajo aporta resultados en cuanto al efecto de este producto sobre líneas celulares lo que posibilita una potencial aplicación farmacológica para valorar su utilidad en el tratamiento de la leishmaniasis.

SECCION EXPERIMENTAL

Material y Métodos

Material vegetal

Los Alcaloides totales de la corteza de Evanta fueron proporcionados por el Laboratorio de Fitoquímica del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas de la Facultad de Cs. Farmacéuticas y Bioquímicas – UMSA.

Evaluación in vitro de la citotoxicidad

Para probar la citotoxicidad se siguió el método empleado por López et al. (2002). Las células: BHK-21 (Células renales de Hamster sirio), Hep 2 (Células de carcinoma de laringe humano) y MDCK (Células renales de túbulo contorneado distal de perro) fueron mantenidas en medio RPMI 1640 (Sigma – Aldrich) suplementado con 10% de suero bovino fetal, en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C. En las pruebas se utilizaron placas de 96 pozos (Nunc), en donde se sembraron 100.000 células por pozo, en 100 µl de medio, éstas se trataron con los alcaloides a diferentes concentraciones (250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 y 7.8 µg/extracto/100 µl de medio); como testigo se utilizaron células no tratadas por el producto y células tratadas con anfotericina B (Sigma – Aldrich). Los cultivos fueron incubados en las condiciones antes mencionadas por 48 horas. La citotoxicidad se determinó mediante la estimación de la viabilidad celular utilizando la técnica colorimétrica XTT (Sigma – Aldrich), que tienen como base la reducción de la sal de sodio 2,3-bis (2metoxi-4-nitro-5-sulfofenil-2-h-tetrazolium-5-carboxanilide) por las deshidrogenasas mitocondriales hasta cristales de formazán, reacción que se acelera por la adición de un acoplador de electrones como la Fenasina Metosulfato (PMS) (Sigma – Aldrich) el cual permite acelerar la reducción del sustrato, la lectura se realizó en un lector ELISA (Model 2100 series-Plate Reader) a una absorbancia de 492 nm. Las pruebas se realizaron por triplicado en tres repeticiones. Los cambios citológicos se detectó observando los cultivos en un microscopio invertido.⁷

Evaluación de la Citotoxicidad en eritrocitos y linfocitos humanos

Citotoxicidad en linfocitos

Se utilizaron linfocitos aislados de sangre periférica humana heparinizada inmediatamente después de ser aislados de individuos sanos previo consentimiento informado, mediante gradiente de densidad con Ficoll-Hipaque (Hystopaque-1077 SIGMA) por centrifugación a 1500 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente después de dos lavados con RPMI 1640 (Sigma - Aldrich) a 1500 rpm durante 10 min se determinó la viabilidad inicial de las células mediante el método de exclusión con azul tripano (Sigma – Aldrich). Para las pruebas de citotoxicidad se utilizaron 1×10^6 linfocitos por pozo contenidas en un volumen de 100 µL, se sembraron por triplicado en placas de 96 alvéolos mas los controles, linfocitos sin tratar y linfocitos tratados con anfotericina B. Los ensayos de citotoxicidad se realizaron a las 24 y a las 48 horas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ con las diferentes concentraciones de los alcaloides totales de Evanta en medio RPMI 1640 con suplemento de 10% de suero bovino fetal. La citotoxicidad se evaluó mediante el método de exclusión con azul tripano. Al cabo de las 4 horas de incubación se realizó la lectura a 490 nm en un lector de ELISA. Las pruebas se realizaron por triplicado en tres repeticiones.

Citotoxicidad en eritrocitos

Se aislaron eritrocitos humanos de sangre periférica humana heparinizada de individuos sanos previo consentimiento informado, mediante gradiente de densidades con Ficoll-Hipaque (Hystopaque-1077 SIGMA) por centrifugación a 1500 rpm por 5 min a temperatura ambiente, se recogieron con sumo cuidado para evitar riesgo de hemólisis los cuales se resuspendieron en PBS glucosado y centrifugados a 1600 rpm por 10 min. Para las pruebas de citotoxicidad se utilizaron 5×10^5 eritrocitos por pozo contenidas en un volumen de 100 µL en medio RPMI 1640, se sembraron por triplicado mas los controles, eritrocitos sin tratar y eritrocitos tratados con anfotericina B en placa de 96 alvéolos de fondo plano e incubados por 24 y 48 horas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂, las diferentes concentraciones de los alcaloides totales en medio RPMI 1640 con suplemento de 10% y suplementado

con SBF al 10%. La citotoxicidad se evaluó mediante el método de exclusión con azul tripano. Las pruebas se realizaron por triplicado en tres repeticiones.

RECONOCIMIENTOS

CIPTA y a la comunidad de Santa Rosa de Maravilla, por la colecta de la especie vegetal.

REFERENCIAS

1. World Health Organization (OMS). *Rapport sur la Santé dans le Monde*. Genève. 2009.
2. Batista Molliner R. Situación de Salud Bolivia 2008. Documento de divulgación científica. Enero-2006. Ministerio de Salud y Deportes; 2008. p.69-71.
3. Mollinedo S. Leishmaniasis, Guía Operativa para el Control en Bolivia. 1 ed. La Paz: Programa Nacional de control de las Leishmaniasis; 2008.
4. Fournet A., Angelo A., Muñoz V. Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants. *Journal of Natural Products*. 1993; 56:1547-1552.
5. Fournet A., Vagneur B., Richomme P., Brutenon J. Aryl-2 et alkyl-2quinolienes nouvelles isolees d' une Rutacee bolivienne *Galipea longiflora*. *Canadian Journal of Chemistry*. 1989; 67: 2116- 2118.
6. Giménez A, Avila J, Ruiz G, Paz M, Udaeta E, Ticona J, Salamanca E, Paredes C, Rodríguez N, Quints K, Feraudy C, Gutierrez I, Chuqui R, Quenevo C, Dalence M, Bascope M. *Revista Boliviana de Química*. 2005; 22:94-107.
7. Yesmit Karina Rioz R. Astrid Carolina Otero J., Diana Lorena Muñoz H., Mónica Echeverry R., Sara Maria Robledo R., Maria Alejandra Yopez C. Actividad citotóxica y leishmanicida in vitro del aceite esencial de manzanilla (Matricaria chamomilla). *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* 2008;37: 200-211.
8. Adriano Martínez, Ismael Reyes, Niradiz Reyes. Citotoxicidad del glifosato en células mononucleares de sangre periférica humana. *Biomédica* 2007; 27: 1-14.
9. Cordero CP, Aristizabal FA. Evaluación preliminary in vitro, citotoxicidad de extractos vegetales, empleando métodos colorimétricos. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2002;4:100-6.
10. Mosmann Y. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63.
11. Omar A Dupuy, Renato Myrillo, Jose A Bonilla V. Actividad supresora del millerenólido sobre células mononucleares de sangre periférica humana. *Revista Méd. Chile*. 2008; 136:64-72
12. Wilmer Soler T., Nelly del Carmen Velásquez E., Luis Francisco Miranda R., Diana Cristina Zuluaga G. Ausencia de genotoxicidad del agua de mar de Coneñas: estudio in vitro en eritrocitos y leucocitos humanos. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*. 2005; 23(2): 1-10
13. Beresford RA, Fastier FN. Effects of some s-alkylthioureniums and related compounds on the osmotic fragility and the membrane expansion of human erythrocytes. *Br J. Pharmacol.* 1980; 7(1):253-258