

ACTIVIDAD TRIPANOCIDA Y CITOTÓXICA IN VITRO DE *Calendula officinalis*¹

IN VITRO TRYPANOCIDAL AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF *Calendula officinalis*¹

*Miriam Soledad Rolón*²

*María Celeste Vega Gomez*³

*Alfredo Meneces Marcel*³

*Jorge Alfonso*³

*Cathia Coronel*³

¹ Trabajo presentado por la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y financiado por el Rectorado de la Universidad Nacional de Asunción durante el año 2012.

² Investigadora principal. Docente de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

³ Co-investigadores

RESUMEN

La ausencia de nuevos fármacos para tratar la Enfermedad de Chagas hace que la búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos sea una prioridad en la investigación parasitaria. Los extractos de *Calendula officinalis* y en particular los de sus flores muestran un amplio espectro de acciones farmacológicas y en base a esto hemos ensayado la actividad tripanocida *in vitro* de epimatigotes de *T. cruzi* y la citotoxicidad en la línea celular de fibroblastos. La evaluación de la actividad tripanocida se llevó a cabo utilizando la técnica colorimétrica con CPRG y la citotoxicidad en líneas celulares utilizando el sustrato Resazurina. Ambos extractos etanólico y acuoso al 20% de *C. officinalis* presentaron actividad tripanocida a la concentración de 6,25 µg/mL, con una actividad antiepipimastigote mayor o igual a 70% y una baja citotoxicidad del 10%, actividad comparable con el fármaco de referencia benznidazol. El efecto inhibitorio en *T. cruzi* y baja citotoxicidad de los compuestos de estos compuestos los convierten en prometedores agentes tripanocidas.

PALABRAS CLAVE: Tripanocida, citotóxica, *Calendula*

ABSTRACT

The absence of new drugs to treat Chagas Disease makes the search for new chemotherapeutic agents is a priority in parasitic research. *Calendula officinalis* extracts and particularly their flowers exhibit a broad spectrum of pharmacological actions, based on

this we tested its *in vitro* trypanocidal activity on *T. cruzi* epimatigotes and the cytotoxicity on fibroblast cell line. The trypanocidal activity evaluation was carried out using the colorimetric method with CPRG and the cytotoxicity using the substrate resazurin. The 20% ethanolic and aqueous extracts of *C. Officinalis* showed trypanocidal activity at the concentration of 6.25 µg/mL, with a antiepipimastigote activity greater or equal to 70% and low 10% cytotoxicity, tripanocidal activity comparable with the reference drug benznidazole. The inhibitory effect on *T. cruzi* and low cytotoxicity of these compounds make them promising trypanocidal agents.

KEY WORDS: Trypanocidal, cytotoxicity, *Calendula*

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) es una endemia que afecta a millones de personas en Latino América (WHO, 2000b) con lo que causa importantes problemas sanitarios, económicos y sociales para los países afectados. Está considerada como una de las enfermedades “desatendidas parasitarias” tropicales más importantes del mundo, junto con la malaria y la esquistosomiasis.

También podríamos llamar a la enfermedad de Chagas, la “enfermedad silenciosa”, por sus escasas manifestaciones clínicas, que hacen que la infección se propague, tanto por el aumento de inmigrantes procedentes de zonas endémicas como por la exportación de esta enfermedad debido a la

movilidad internacional (inmigración, turismo y cooperación).

Se han propuesto dos alternativas para erradicar la endemia chagásica (WHO, 2000b).

La primera consiste en la prevención de la transmisión por eliminación del insecto vector y por esterilización de sangre portadora, utilizada para transfusiones. La segunda, consiste en la quimioterapia de los pacientes infectados, con fármacos absolutamente eficaces, que además de lograr la curación del paciente eliminan el reservorio humano de *T. cruzi*.

Para ello se han puesto en marcha campañas de erradicación del vector que se realizan desde hace varios años, y han tenido éxitos importantes (WHO, 2000a) donde la transmisión se ha reducido substancialmente o incluso erradicado en muchos estados. Aunque esta iniciativa ha disminuido enormemente la incidencia de nuevas infecciones, no consuela a los más de 14 millones de personas infectadas actualmente, sumadas a las 40 millones de personas que viven en zonas endémicas y con riesgos potenciales de contraer la infección (WHO, 2000b).

Por el contrario, la cura parasitológica de los pacientes chagásicos, no ha tenido el mismo éxito. A pesar del tiempo transcurrido desde el descubrimiento de la enfermedad (CHAGAS, 1909), todavía no se dispone de una quimioterapia eficaz para todas sus formas clínicas. Es muy decepcionante que en el momento de iniciar la

revisión de la quimioterapia de esta enfermedad, al día de hoy poco haya cambiado de lo que era 37 años atrás. Las drogas utilizadas clínicamente, siguen siendo las mismas, con sus problemas de toxicidad, con su eficacia cuestionable y el prolongado tratamiento (DE CASTRO, 1993).

Se puede decir que *T. cruzi*, el agente causal, ha desafiado todos los intentos para su eliminación pues los fármacos utilizados actualmente, Nifurtimox (Lampit) y Benznidazol (Radanil), son de relativa eficacia. El tratamiento de las infecciones producidas por *T. cruzi* es considerado como uno de los más insatisfactorios.

En la búsqueda de compuesto activos contra *T. cruzi* se han ensayado varios productos de origen vegetal, entre ellos, el miconidin (un derivado quinólico) y el tingenon (un triterpeno) son activos contra epimastigotes, produciendo una inhibición de la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (GOIJMAN et al., 1984). El taxol (aislado de *Taxus brevifolia*) interfiere en la proliferación de los epimastigotes, evitando la división celular, pero permitiendo la multiplicación de las organelas. Se cree que su mecanismo de acción es la estabilización parcial del citoesqueleto (BAUM et al., 1981).

Entre los alcaloides probados están los indoles de la β -carbolina y las bisbenziltetrahidroisoquinolinas, que tienen un efecto inhibitorio sobre la proliferación de los epimastigotes de distintas cepas de *T. cruzi* (CAVIN et al., 1987; FOUNET et al., 1988). Los derivados de la violaceina (pigmento

aislado de *Chromobacterium violaceum*) inhiben la proliferación en medio axénico de las formas epimastigotes y amastigotes. No son activos en infecciones experimentales (HAUN et al., 1992).

El gosispol, extraído de las semillas de algodón, es un compuesto polifenólico y agente antifertilidad, activo contra epimastigotes y tripomastigotes, que produce alteraciones estructurales en el kinetoplasto y la mitocondria (BLANCO et al., 1983). También reduce la parasitemia y prolonga la supervivencia, sin producir la curación parasitológica (OLCINA y BLANCO, 1990; ROVAI L. E., et al. 1990). El ajojeno es un producto natural aislado del ajo, que inhibe la síntesis de fosfolípidos y la proliferación de *T. cruzi* (URBINA et al., 1993). Los sesquiterpenos de *Lychnophora sp* inhiben la multiplicación de *T. cruzi*, la actividad es igual o superior a la del violeta de genciana (de OLIVEIRA et al., 1996). Tras el cribado frente a epimastigotes de 79 extractos de plantas sudamericanas, se encontraron 9 con actividad anti-epimastigote, pertenecientes a las siguientes plantas: *Mikania cordifolia*, *Mimosa tenuiflora*, *Cecropia pachystachya*, *Manilkara achras*, *Solanum pilcomayense*, *Curcuma longa*, *Philodendron bipinnatifidum*, *Neurolaena lobata* y *Scutia buxifolia* (MUELAS-SERRANO et al., 2000). Los extractos de *Calendula officinalis* y en particular los de sus flores muestran un amplio espectro de acciones farmacológicas, entre las que sobresalen: antibacteriana, antiinflamatoria y cicatrizante (LASTRA y PIQUET, 1999). En base a estas características

farmacológicas de *C. officinalis* se han ensayado la actividad tripanocida en las formas epimastigotes de *T. cruzi* y la citotoxicidad *in vitro* en la línea celular de fibroblastos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracto acuoso y etanólico de las flores de *C. officinalis*. Los extractos vegetales fueron proporcionados por el grupo de investigación colaborador de la Universidad Central “Martha Abreu” de Las Villas, Santa Clara (Cuba).

Actividad anti-epimastigotes. Para la determinación de la actividad tripanocida se utilizaron epimastigotes de *T. cruzi*, cepa CL tranfectada, que lleva inserto el gen de la β -galactosidasa de *Escherichia coli* (BUCKNER et al., 1996; VEGA et al., 2005). El sustrato utilizado para la determinación enzimática es el rojo de clorofenol β -D-galactopiranosido (CPRG). El cultivo de epimastigotes se realizó en medio axénico LIT, suplementado con suero bovino fetal estéril (SBF) 10% inactivado. Para el ensayo colorimétrico se sembraron en placas de 96 pocillos 250.000 epimastigotes/mL conteniendo los extractos a ensayar en un volumen final de 200 μ L. Como control se utilizó el fármaco de referencia benznidazol. Tras la adición de los extractos, las placas se incubaron 72 horas a 28° C. Transcurrido este tiempo, se procedió a la determinación colorimétrica. Para ello se añadió 50 μ L de la solución de CPRG a una concentración final de 200 μ M y se incubó en estufa a 37° C durante 4 horas. Finalmente se leyeron las ab-

sorbancias a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro de placas, y se determinó la actividad de los extractos.

Citotoxicidad en fibroblastos NC-TC929. Se sembraron 3×10^4 fibroblastos por pocillo en placas de 96 pocillos con 100 μ l de medio MEM, y se incubaron durante 24 horas a 37° C, 5% CO₂, para que las células se adhieran a las placas. Transcurrido este tiempo se retiraron los medios y se añadieron 200 μ l de medio fresco con los compuestos a ensayar a las distintas concentraciones y cada una de ellas por triplicado. Las placas se volvieron a incubar otras 48 horas. Además se incluyeron blanco, control de compuestos y control de crecimiento. A las 48 horas de incubación se añadieron 20 μ l de una solución de resazurina 2mM pH 7 y se incubaron por 4 horas a 37° C, 5% CO₂.

Las absorbancias fueron medidas a 495 y 595 nm para calcular el porcentaje de citotoxicidad (%C) de cada concentración de compuesto ensayado (ROLON et al, 2004).

Análisis de Resultados. La actividad tripanocida de los compuestos se determinó comparando las absorbancias de los pocillos control con la de los pocillos con los extractos a ensayar, previa resta a todos ellos, de la absorbancia dada por el control positivo. Porcentaje de actividad anti-epimastigote (% AE) $\% \text{ AE} = [(A \text{ fármaco} - A \text{ blanco fármaco}) / (A \text{ control} - A \text{ blanco})] \times 100$ siendo las absorbancias, la media de las absorbancias para cada concentración de producto. La absorbancia del blanco es la que contiene

solo medio y blanco fármaco es el producto disuelto en medio.

El porcentaje de citotoxicidad se calculó dividiendo el porcentaje de reducción de las células con el compuesto y el porcentaje de reducción de las células control, utilizando la siguiente fórmula:

$$\%C = 1 - [(ALB - (ALA \times RO) \text{ pocillo testado}) / (ALB - (ALA \times RO) \text{ pocillo control de crecimiento})] \times 100$$

donde, ALB es la media de las absorbancias a la longitud de onda más baja (495 nm) y ALA es la media de las absorbancias a la longitud de onda más alta (595 nm) de cada concentración de compuesto testado o control de crecimiento; y, Ro representa el factor de corrección. La fórmula propuesta por GOEGAN et al. en 1995 para calcular el factor de corrección Ro es la siguiente: $Ro = AOLB / AOLA$ donde, AOLB es la media de las absorbancias a la longitud de onda más baja (495 nm) y AOLA es la media de las absorbancias a la longitud de onda más alta (595 nm) de la resazurina.

A todas las absorbancias medidas se les restan las absorbancias del medio solo. Los datos experimentales se expresan como la media (X) \pm desviación estándar (S n-1), y los porcentajes de actividad sobre las distintas formas parasitarias y sobre las células fueron hallados con el programa Microsoft Office Excel 2003.

Los datos experimentales se expresan como la media (X) \pm desviación estándar (S n-1), y los porcentajes de actividad sobre las distintas formas

parasitarias y sobre las células fueron hallados con el programa Microsoft Office Excel 2003.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se determina la actividad tripanocida y citotoxicidad de dos extractos de flores de *C. officinalis*, un extracto etanólico al 20% y otro acuoso al 20%. Los extractos son considerados tripanocidas si la inhibición del crecimiento de los epimastigotes es mayor al 70% (%AE >70), y citotóxicos si las células presentan un porcentaje de inhibición del crecimiento mayor al 25% (%C >25).

Los extractos fueron ensayados en las formas epimastigotes de *T. cruzi* y en fibroblastos NCTC929 a las concen-

traciones de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12 y 1,56 µg/mL.

Se observó una actividad tripanocida del extracto etanólico al 20% mayor o igual al 75% a las concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12,5 y 6,25 µg/mL y luego la actividad decae a 20 y 10% a las concentraciones de 3,12 y 1,56 µg/mL, respectivamente (Tabla I). El extracto acuoso al 20% presentó una actividad tripanocida mayor o igual al 70% a las concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12,5 y 6,25 µg/mL y luego la actividad decae a 30 y 25% a las concentraciones de 3,12 y 1,56 µg/mL, respectivamente (Tabla I).

La actividad citotóxica en líneas celulares de fibroblastos del extracto

TABLA 1. Actividad antiepimastigote y citotoxicidad de los extractos acuoso y etanólico de *C. officinalis*.

Extracto	Conc. (µg/mL)	%AE*	± DE**	%C***	± DE**
<i>C. officinalis</i> Extracto etanólico 20%	200	100	1,23	100	1,45
	100	100	1,37	100	1,32
	50	100	0,98	100	1,53
	25	100	1,84	100	1,93
	12,5	80	1,25	100	1,23
	6,25	75	1,06	10	1,84
	3,12	20	1,85	0	1,72
	1,56	10	1,93	0	1,21
<i>C. officinalis</i> Extracto acuoso 20%	200	100	1,54	100	1,42
	100	100	0,87	100	1,63
	50	100	0,93	100	1,72
	25	100	0,35	100	1,37
	12,5	100	0,74	80	1,43
	6,25	70	0,95	10	1,71
	3,12	30	1,12	0	1,32
	1,56	25	0,23	0	1,02
Benznidazol	100	92	0,22	0	0,74

* %AE: Procentaje Antiepimastigotes **DE: desviación estandar *** Porcentaje Citotoxicidad

etanólico al 20% fue del 100% a las concentraciones de 200, 100, 50, 25 y 12,5 µg/mL, disminuyendo su citotoxicidad a 10% a la concentración de 6,25 µg/mL y luego toxicidad nula a 3,12 y 1,56 µg/mL. El extracto acuoso al 20% presentó una citotoxicidad igual o mayor al 80% a las concentraciones de 200, 100, 50, 25 y 12,5 µg/mL, disminuyendo su citotoxicidad a 10% a la concentración de 6,25 µg/mL y luego toxicidad nula a 3,12 y 1,56 µg/mL al igual que el extracto etanólico (Tabla I).

Al comparar la actividad antiepipimastigotes y la citotoxicidad observamos que las concentraciones con actividad tripanocida para ambos extractos es la de 6,25 µg/mL, ya que la actividad antiepipimastigote es mayor o igual a 70% y una baja citotoxicidad del 10%, actividad comparable con el fármaco de referencia benznidazol (Tabla I).

Ambos extractos de *C. officinalis* ensayados presentaron una selectividad parasitaria en la forma extracelular de *T. cruzi* por lo que el siguiente paso sería el ensayo en la forma parasitaria intracelular a la concentración que fueron activas y no citotóxicas de 6,25 µg/mL. También es de interés del grupo de investigación realizar y ensayar extractos de flores de *C. officinalis* locales y comparar con las obtenidas de los extractos ensayados que corresponden a cultivos de la isla de la República de Cuba.

La *C. officinalis* es una planta anual que se cultiva en todo el mundo y sus flores son utilizadas tanto desde el punto de vista ornamental como para

la preparación de productos terminados en las industrias farmacéutica y cosmética.

En los estudios farmacológicos realizados con extractos o fracciones a partir de las flores de *C. officinalis* se han detectado las mismas propiedades que se informan en la medicina tradicional, entre ellos mostraron actividad antibacteriana especialmente contra *Staphylococcus aureus* y *S. fecalis* (DUMENIL G., 1980), antiinflamatoria (FLEISHNER AM., 1985), antimicótica (AGUILA GIL et al, 2000), cicatrizante (MICHEL F., 1977), colagogo (UBEEVA I. 1987), antitumorales y citotóxicas (UKIYA M, et al., 2006.). En aplicación interna se emplea como estimulante de la actividad hepática, la secreción biliar y en el tratamiento de úlceras gástricas (AGUILA GIL et al, 2000). Externamente la decocción, tintura o pomada se emplea en escaras, úlceras varicosas, erupciones cutáneas y otras afecciones de la piel (SCHMIDIDIGER O. 1987).

Este trabajo reporta por primera vez la actividad tripanocida y citotoxicidad inespecífica en líneas celulares de fibroblastos de extractos de flores etanólico y acuoso de *C. officinalis*.

CONCLUSIONES

Los dos extractos, etanólico y acuoso, de las flores de *C. officinalis* presentaron actividad tripanocida a las concentraciones de 6,25 µg/mL y citotoxicidad nula. A la vista de los resultados obtenidos ambos extractos ensayados son muy prometedores, ya

que presentan una elevada actividad en epimastigotes de *T. cruzi* y baja o nula toxicidad en la línea celular de fibroblastos NCTC929.

Posteriormente los extractos pasarán a la siguiente fase del screening farmacológico, para evaluar su potencial actividad sobre amastigotes intracelulares *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

ÁGUILA GIL B.; MENÉNDEZ CASTILLO R.; GONZÁLEZ C. et al. 2000. Extracto acuoso de *Calendula officinalis*. Estudio preliminar de sus propiedades. Revista Cubana de Plantas Medicinales 5: 1-3

BAUM S. G.; WITTNER M.; MADLER J. P. et al. 1981. Taxol a microtubule stabilizing agent- blocks the replication of *Trypanosoma cruzi*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 4571-4575.

BLANCO A.; AOKI A.; MONTAMAT E. E. et al. 1983. Effect of gossypol upon motility and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. J. Protozool. 30: 648-651.

BUCKNER, F.S.; VERLINDE, C.L.; LA FLAMME, A.C. et al. 1996. Efficient technique for screening drugs activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing β -galactosidase. Antimicrob. Agents. Chemother. 40(11): 2592-2597.

CAVIN J. C.; KRASSNER S. M.; RODRIGUEZ E. 1987. Plant-derived alkaloids active against *Trypanosoma cruzi*. J. Ethnopharmacol. 19: 89-94.

DE CASTRO S. L. 1993. The challenge of Chagas' disease chemotherapy: An update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. Act. Trop. 53: 83-98.

De OLIVERIRA A. B.; SAUDE D. A.; PERRY K. S. P. et al. 1996. Trypanocidal sesquiterpenes from *Lychonophora* species. Phytother. Res. 10: 292-295.

DUMENIL G. 1980. Evaluation of antibacterial properties of *Calendula officinalis* flowers and mother homeopathic tinctures of *C. officinalis*. Ann Pharm Fr ;38(6):493-9.

FOURNET A.; MANJON A.M.; MUÑOZ V. et al. 1988. Active trypanocidal alkaloids, bisbenzylisoquinones active *in vitro* against *Trypanosoma cruzi* the agent responsible for trypanosomiasis in South America. J. Ethnopharmacol. 24: 337-343.

FLEISHNER A.M. 1985. Plants extract to accelerate healing and reduce inflammation. Cosmet Toilet;100:45-6, 48-51, 54-8.

GOIJMAN S. G.; TURRENS J. F.; MARIN G. P. et al. 1984. Inhibición del crecimiento y la biosíntesis de macromoléculas en *Trypanosoma cruzi* por productos naturales. Efectos de la miconidina y tingenona. Medicina. 44: 361-370.

HAUN M.; PEREIRA M. F.; HOFFMAN P. et al. 1992. Bacterial chemistry IV: Biological activities and cytotoxicity of 1,3-dihydro-2H-indol-2-one derivatives. Biol. Res. 25(1): 21-25.

- MICHEL F. 1977.** *Apis Mellifica* and *Calendula officinalis* combination active against sunburn. Ger Offen 2.720.420 (01 Dec 1977).
- MUELAS-SERRANO S.; NOGAL J. J.; MARTINEZ-DIAZ R. et al. 2000.** *In vitro* screening of american plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. J. Ethnopharmacol. 71: 101-107.
- OLCINA M. A.; BLANCO A. 1990.** Effects of gossypol on mice infected with *T. cruzi*. Acta Physiol. Pharmacol Latinoam. 40: 219-226.
- ROLON M.; Seco E.M.; Vega C. et al. 2006.** Selective activity of polyene macrolides produced by genetically modified *Streptomyces* on *Trypanosoma cruzi*. Int. J. Antimicrob. Agents. 28: 104-109.
- ROVAI L. E.; AOKI A.; GEREZ DE BURGOS N. M. et al. 1990.** Effect of gossypol on trypomastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. J. Protozool. 37(4): 280-286.
- SCHMIDIDIGER O. 1987.** Plants extracts Phytocosmetics and phytopharmac. When new research is leading. Drug and Cosmetics Ind. Oct. 1987, 28, 30, 32, 90 y 100.
- UBEEVA I. 1987.** Effect of Calcephlones on the course of experimental hepatitis. Farmacol Toksikol (Moscow);50(1):66-71.
- UKIYA M.; AKIHISA T.; YASUKAWA K. et al. 2006.** Anti-inflammatory, anti-tumor-promoting, and cytotoxic activities of constituents of marigold (*Calendula officinalis*) flowers. J Nat Prod.; 69(12):1692-6.
- URBINA, J.A., 2003.** New chemotherapeutic approaches for the treatment of Chagas disease (American Trypanosomiasis). Parasitol. Today 15: 94-99
- VEGA C.; ROLÓN M.; MARTINEZ-FERNANDEZ A.R. et al. 2005.** A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing beta-galactosidase. Parasitol. Res. 95: 296-298.
- WHO 2000a.** Chagas disease, interruption of transmission in Brazil. Weekly Epidemiol. Rec. 19: 153-155.
- WHO 2000b.** Special Programme for Research and Training in Tropical Disease (TDR). Natural products for parasitic diseases. TDR News 62: 4.