

Potencialidades del efecto anti-leishmanial del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* sobre sus compuestos mayoritarios en diferentes modelos biológicos.

Autoría principal

Lianet Monzote¹.

Otros autores

Ramón Scull, Marley García¹, Ana M. Montalvo¹, Lizette Gil¹, Yamilet Gutiérrez², Rosario Gravier¹, Juan Abreu², Migdalia Miranda².

Colaboradores

Lars Gille, Jacinta Pastor, Paul Cos, Katrin Staniek, William Setzer.

Entidad ejecutora principal

¹Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí.

Entidades participantes

²Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana.

Autor para correspondencia

Lianet Monzote.

Departamento de Parasitología, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí.

Apartado Postal 601, Marianao 13, La Habana, Cuba.

Tel.: 53 7 202 5061.

Fax: 53 7 204 6051.

E-mail: monzote@ipk.sld.cu

Aporte científico de cada autor al resultado

- ✓ **Lianet Monzote** (50%): Autora principal que generó la idea, diseñó y ejecutó los experimentos, realizó los análisis de los resultados y la estadística y escribió los artículos científicos.
- ✓ **Ramón Scull** (15%): Autor que contribuyó en la generación de la idea, colección del material vegetal y realizó la extracción del aceite esencial.
- ✓ **Marley García** (10%): Autora que contribuyó en la realización de los experimentos en los diferentes modelos de Leishmania.
- ✓ **Ana M. Montalvo** (8%): Autora que contribuyó en el diseño de algunos experimentos y revisó los artículos científicos.
- ✓ **Lizette Gil** (5%): Realizó los experimentos de balance redox en Leishmania.
- ✓ **Yamilet Gutiérrez** (5%): Colaboró en la colecta del material vegetal y extracción del aceite esencial.
- ✓ **Rosario Gravier** (3%): Colaboró en los experimentos de balance redox en Leishmania.
- ✓ **Juan Abreu** (2%): Colaboró en el diseño y revisión de artículos.
- ✓ **Migdalia Miranda** (2%): Colaboró en la caracterización química del aceite esencial.

Resumen

Descripción del Resultado: *C. ambrosioides* es una planta aromática utilizada para el tratamiento de enfermedades parasitarias por la población de áreas endémicas. El objetivo de este estudio fue estudiar la actividad anti-leishmanial del aceite esencial de *C. ambrosioides* y sus componentes mayoritarios puros (ascaridol, carvacrol y óxido de cariofileno) en diferentes modelos. En un modelo químico se demostró la formación de un radical libre centrado en el carbono por estudios de resonancia paramagnética nuclear, debido a la presencia del ascaridol. Desde el punto de vista molecular, el aceite esencial inhibió de manera específica la actividad del complejo III en subpartículas mitocondriales de *Sacharomyces cerevisiae* y la fracción cruda mitocondrial de *Leishmania tarentolae*. En los modelos in vitro se corroboró que el aceite inhibió la respiración en promastigotes de *L. tarentolae*; mientras fue el de mayor selectividad frente a promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. amazonensis*. En el modelo in vivo de leishmaniasis cutánea experimental también el aceite demostró una actividad potencial al evaluar el desarrollo de la lesión y la carga parasitaria. Frente a otros protozoos parasites (*Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *L. infantum*) el aceite fue el único producto que inhibió el crecimiento. Este trabajo demuestra la superioridad del aceite esencial comparado con sus compuestos mayoritarios y sugiere la inhibición del complejo III de la cadena transportadora de electrones como posible mecanismo de acción de la actividad anti-leishmanial demostrada.

Comunicación Corta

Antecedentes

Leishmania es un género que agrupa a protozoos parásitos que causan un conjunto de enfermedades denominadas leishmaniasis. Aproximadamente, de 1 a 2 millones de personas son infectadas anualmente y alrededor de 350 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad, la cual se considera endémica de 98 países tropicales y subtropicales. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha identificado la leishmaniasis como una de las enfermedades tropicales más importantes y uno de los principales problemas de salud pública en África, Asia y América Latina, la cual ha sido clasificada como una de las enfermedades olvidadas^{1,2}.

Se conocen 21 especies de *Leishmania* patógenas al hombre y a los animales que desarrollan principalmente tres formas de la enfermedad: leishmaniasis cutánea, leishmaniasis mucocutánea y leishmaniasis visceral. La cutánea se caracteriza por lesiones dérmicas que pueden llegar hasta úlceras; la mucocutánea por metástasis de las lesiones cutáneas causando deformidades fundamentalmente en la cavidad nasofaríngea; mientras que la visceral puede provocar hepato y esplenomegalia, depresión de la médula ósea, anemia, disminución del peso corporal y muerte en la mayoría de los casos no tratados³.

El control de esta parasitosis mediante la vacunación aún no ha sido posible y el control del vector y del reservorio sólo es posible en ciertas situaciones de transmisión doméstica. Actualmente, en los países endémicos, la quimioterapia es la principal opción para contrarrestar la enfermedad^{3,4}. Los fármacos recomendados para el

tratamiento de la leishmaniasis son los derivados orgánicos de antimonio pentavalente: pentostam y glucantime. La anfotericina B, la pentamidina y la aminosidina son usadas como terapia de segunda línea. Todos estos medicamentos necesitan ser administrados por vía parenteral, los tratamientos requieren largos períodos de tiempo, son tóxicas, costosas y la resistencia parasitaria ha aumentado como un agravante. Desde la pasada década se ha comenzado a usar la miltefosina, la cual ha demostrado una alta eficacia solamente frente a la leishmaniasis visceral y se puede administrar por vía oral. Sin embargo, está contraindicada en embarazada y la resistencia puede aparecer a mediano plazo⁵.

Problema a resolver

Las limitaciones mencionadas de los fármacos disponibles contra esta parasitosis han provocado que se necesite urgentemente la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos de mayor eficacia, seguridad y accesibilidad para los pacientes^{3,4}. Actualmente, el 60 % de las personas que viven en áreas endémicas dependen de la medicina natural y tradicional para el tratamiento de la leishmaniasis, basado fundamentalmente en el uso de plantas medicinales. El Programa de Enfermedades Tropicales de la OMS ha considerado una prioridad la evaluación farmacológica de las plantas con el objetivo de desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento de esta parasitosis⁶. Una de las plantas conocida por sus efectos anti-parasitarios es *C. ambrosioides*, de la cual se han realizado estudios etnobotánicos que revelan que la población endémica de Brasil⁷ y Perú⁸ la utilizan para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea, sin que existan evidencias científicas de su actividad frente a *Leishmania* cuando el presente estudio comenzó a desarrollarse. En nuestro caso, se estudió el aceite esencial de *C. ambrosioides*, el cual presenta mayor concentración de metabolitos que pudieran ser biológicamente activos como son el ascaridol, el carvacrol y el óxido de cariofileno.

Objetivos

- Determinar las potencialidades del aceite esencial extraído de *C. ambrosioides* y sus principios activos como agentes terapéuticos frente a la leishmaniasis en diferentes modelos biológicos.
- Comparar el efecto anti-leishmanial del aceite esencial extraído de *C. ambrosioides* y sus principios activos puros.
- Elucidar el mecanismo de acción farmacológico del aceite esencial extraído de *C. ambrosioides* y sus principios activos puros.

Resultados, originalidad e impacto

Para determinar si el aceite esencial de *C. ambrosioides* y sus componentes mayoritarios puros presentaban actividad anti-leishmanial se realizó la evaluación de estos productos en diferentes modelos (químico, molecular, celular y animal).

- ESTUDIOS EN EL MODELO QUÍMICO:

El espectro formado en estudios de Resonancia Paramagnética Nuclear (RPN) del aceite esencial y sus componentes mayoritarios mostró la formación de un radical centrado en el carbono (R-C●) para el aceite esencial a causa del ascaridol. Sin

embargo, el carvacrol y el óxido de cariofileno no mostraron ninguna señal. Este radical libre es la estructura clave para el desarrollo de la actividad farmacológica. Estudios en paralelo utilizando agentes quelantes como el EDTA (quelante inespecífico de todos los metales pesados) y la desferroxiamina (quelante específico de iones hierro) brindaron evidencias de la pérdida del radical libre y de la pérdida de la actividad biológica en 300 veces.

Estos resultados están publicados en la *Toxicol Apply Pharmacol* 2009 y *Exp Parasitology* 2013 (Ver acápite 1.5), los cuales se describen por primera vez a nivel internacional.

- ESTUDIOS A NIVEL MOLECULAR DE MODELOS EN LA MITOCONDRIA:

Se evidenció que el aceite esencial inhibió de manera similar ($p > 0,05$) el Complejo II en sub-partículas mitocondriales de *Sacharomyces cerevisiae* como modelo de micro-organismo y *Bos Taurus* como modelo mamífero. En este caso, el ascaridol, el carvacrol y el óxido de cariofileno no mostraron actividad sobre el complejo II en ninguno de los sistemas. Frente al Complejo III, el aceite esencial fue el único que mostró una inhibición específica y superior estadísticamente ($p < 0,05$) en las sub-partículas mitocondriales frente a *S. cerevisiae* comparado con *B. taurus*; mientras que el ascaridol, el carvacrol y el óxido de cariofileno causaron una inhibición inespecífica. Estos resultados fueron comprobados en el complejo III o bc1 purificado de ambos sistemas, donde el aceite esencial fue el único que causó una actividad significativa ($p < 0,05$).

Posteriormente se estudió el efecto de los productos en la fracción cruda mitocondrial de *L. tarentolae*, como modelo de *Leishmania*, y se comparó con los resultados obtenidos para *B. taurus*. Frente a los complejos I y II el aceite esencial y los compuestos puros no mostraron una actividad notoria. Sin embargo, frente al complejo III el aceite esencial causó una inhibición estadísticamente significativa ($p < 0,05$) sobre la fracción mitocondrial de *L. tarentolae*, comparada con la de *B. taurus*. Los compuestos puros presentaron menor actividad que el aceite esencial, la cual fue similar estadísticamente ($p > 0,05$) en ambos modelos.

Al estudiar el efecto del aceite esencial y los compuestos mayoritarios en modelos de respiración en la fracción cruda mitocondrial de *L. amazonensis* entre los complejos I-III y II-III se pudieron observar similares resultados. El aceite esencial mostró actividad específica en ambos modelos. Los compuestos puros presentaron una actividad inespecífica en ambos casos.

Estos experimentos demuestran que la actividad específica anti-leishmanial demostrada por el aceite esencial se debe a la inhibición del complejo III de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria, siendo su efecto superior al de los compuestos puros.

Estos resultados están publicados en la *Toxicol Apply Pharmacol* 2009 y *Exp Parasitology* 2013 (Ver acápite 1.5), los cuales se describen por primera vez en la literatura internacional. A partir de la experiencia evidenciada en esta temática, la

autora ha sido invitada a escribir dos artículos de revisión por invitación, en la Curr Clin Pharmacol⁹ y Pharm Res¹⁰.

- ESTUDIOS EN MODELOS CELULARES DE LEISHMANIA Y MAMÍFEROS:

Teniendo en cuenta la inhibición mitocondrial observada, se estudió la influencia de los productos sobre el consumo de oxígeno en células de *L. tarentolae* en un equipo Clark. Se pudo evidenciar una rápida disminución en el consumo de oxígeno de los promastigotes de *L. tarentolae* a los 10 minutos de ser tratados con el aceite esencial. Los compuestos puros solo causaron una ligera disminución de la respiración.

Posteriormente, promastigotes de *L. amazonensis* fueron tratados con los productos estudiados y se analizó cualitativamente el cambio en el potencial de membrana mitocondrial utilizando el fluoróforo JC-1 y el balance redox mediante la cuantificación del potencial de peroxidación y los grupos sulfidrilos. Los estudios de fluorometría evidenciaron un cambio del potencial de membrana mitocondrial en los parásitos tratados con los productos estudiados, siendo el efecto más notorio en los promastigotes tratados con el aceite esencial, los cuales evidenciaron una fluorescencia verde similar a los promastigotes tratados con valinomicina (control negativo de referencia). En el caso del estudio del balance redox, solo los promastigotes tratados con el aceite esencial causaron un cambio en el potencial de peroxidación y en los grupos sulfidrilos con diferencias estadísticas ($p < 0,05$) respecto al control positivo (parásitos no tratados).

El aceite esencial y los componentes mayoritarios mostraron actividad frente a ambos estadios de *L. amazonensis*. No existieron diferencias estadísticas ($p > 0,05$) entre la CI50 frente a promastigotes y amastigotes en ninguno de los productos evaluados. El aceite esencial mostró una selectividad (IS) superior al resto de los compuestos puros evaluados. En paralelo, al comparar los productos evaluados con la de los fármacos convencionales que actualmente se utilizan en la clínica, el aceite esencial mostró una mayor actividad anti-leishmanial comparado con el glucantime (fármaco de primera línea) y mayor selectividad que la pentamidina.

Similares resultados fueron además obtenidos al evaluar el aceite esencial y sus componentes puros sobre otras especies de *Leishmania*, incluyendo *L. donovani* y *L. infantum*, ambos agentes causales de la leishmaniasis visceral. Los compuestos puros se comportaron de forma inespecífica. Teniendo en cuenta la actividad demostrada por el aceite esencial, se estudió el efecto del mismo y de sus componentes puros sobre otros protozoos parásitos y micro-organismos. El aceite esencial causó inhibición del crecimiento de otros protozoos, entre los que se incluyen los agentes causales de: la malaria *Plasmodium falciparum*, la enfermedad de Chagas *Trypanosoma cruzi*, y la enfermedad del sueño *Trypanosoma brucei*; mientras que los compuestos puros no fueron activos. El aceite esencial y los componentes puros no mostraron actividad frente a bacterias (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*) y hongos (*Trichophyton rubrum* y *Candida albicans*).

Estos resultados demuestran la superioridad del aceite esencial comparado con los compuestos puros y los fármacos de referencia. Están publicados en Nat Prod Commun 2011 y Exp Parasitology 2013 (Ver acápite 1.5), por primera vez en la literatura internacional.

- ESTUDIOS EN MODELOS ANIMALES DE LEISHMANIASIS CUTÁNEA:

Se evidenció la capacidad del aceite esencial en controlar el desarrollo de la leishmaniasis cutánea en animales experimentalmente infectados con *L. amazonensis* al administrarlo a una dosis de 30 mg/kg cada 4 días por vía intralesional. Su efecto fue demostrado al evaluar el tamaño de la lesión y la carga parasitaria en el sitio de infección. En cambio, los animales tratados con los compuestos puros no demostraron efectos positivos ($p > 0,05$) respecto a los animales controles. Por otra parte, el aceite esencial tuvo un efecto superior ($p < 0,05$) comparado con los animales tratados con glucantime, fármaco de referencia.

En paralelo, el aceite esencial también demostró un promisorio efecto anti-leishmanial al ser administrado por vía oral en dosis entre 30 a 150 mg/kg por día durante 15 días por vía oral.

Estos experimentos demuestran de igual forma las potencialidades del aceite esencial comparado con sus principios activos puros y el fármaco de referencia, así como su efectividad por diferentes vías de administración, factibles para los pacientes que padecen esta enfermedad.

Estos resultados están publicados en Res Complementary 2009 y Phytomedicine 2014 (Ver acápite 1.5), por primera vez en la literatura internacional.

La novedad e impacto científico de los resultados

1. Se reporta por primera vez a nivel internacional, desde el punto de vista científico, la actividad anti-leishmanial del aceite esencial íntegro de *C. ambrosioides* y sus componentes mayoritarios en modelos in vitro e in vivo.
2. Se brinda por primera vez a nivel internacional la diana terapéutica exacta del mecanismo de acción directo del aceite esencial y sus componentes para ejercer su efecto en el parásito.
3. Se demuestra la superioridad del efecto anti-leishmanial del aceite esencial de *C. ambrosioides* comparado con los compuestos mayoritarios puros.
4. Se aportan conocimientos científicos de base que propone utilizar el aceite esencial de *C. ambrosioides* para el desarrollo futuro de un fármaco potencial contra Leishmania.
5. Se propone un principio activo de origen natural (aceite esencial de *C. ambrosioides*) de mayor eficacia en modelos in vitro e in vivo comparado con los fármacos de primera (glucantime) y segunda línea (pentamidina) que actualmente se utilizan en la clínica.
6. Avala científicamente el uso del aceite esencial de *C. ambrosioides* para la leishmaniasis en áreas endémicas.

7. Presenta valor metodológico para la evaluación de compuestos naturales ya que traza una estrategia de trabajo para la evaluación de productos naturales frente a Leishmania a través de diferentes biomodelos y ensayos.
8. La información que aporta puede ser utilizada en cursos de pre-grado y post-grado de Medicina Natural y Tradicional.

Problema que se ha resuelto de acuerdo con los objetivos del trabajo.

El objetivo de este estudio fue estudiar la actividad anti-leishmanial del aceite esencial de *C. ambrosioides* y sus componentes mayoritarios puros (ascaridol, carvacrol y óxido de cariofileno) en diferentes modelos. Los resultados demostraron las potencialidades del aceite esencial de *C. ambrosioides* en modelos moleculares, celulares y animales, así como su superioridad al compararlo con sus compuestos mayoritarios puros por separado y se demostró su mecanismo de acción.

Publicaciones

- ✓ Monzote L, et al. Antileishmanial activity of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and its main components against experimental cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *Phytomed* 2014;21(8-9):1048-52.
- ✓ Monzote L, et al. Essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and main components: Activity against *Leishmania*, their mitochondria and other microorganisms. *Exp Parasitol*. 2013;136C:20-26.
- ✓ Monzote L, et al. Comparative chemical, cytotoxicity and antileishmanial properties of essential oils from *Chenopodium ambrosioides*. *Nat Prod Commun* 2011;6(2):281-6.
- ✓ Monzote L, et al. Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondria. *Toxicol Applied Pharmacol* 2009;240(3):337-47.
- ✓ Monzote L, et al. Effect of oral treatment with the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice, caused by *Leishmania amazonensis*. *Res Complementary* 2009;16(5):334-8.

Referencias Bibliográficas

- [1] Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M. WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS. ONE* 2012;7:e3571.
- [2] Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005;366:1561–77.
- [3] Singh S, Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Chemother* 2004;10:307-15.
- [4] Mishra J, Saxena A, Singh S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Curr Med Chem* 2007;14:1153-69.
- [5] Berman JD. Development of miltefosine for the leishmaniasis. *Mini-Rev Med Chem* 2006;6:145-51.
- [6] Chan MJ, Peña LM. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat Prod Rep* 2001;18:674-88.

- [7] Franca F, Lago EL, Marsden PD. Plant used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Vianna) braziliensis* in an endemic area of Bahia, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1996;29:229-32.
- [8] Kvist LP, Christensen SB, Rasmussen HB, Mejia K, Gonzalez A. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. *J Ethnopharmacol* 2006;106:390-402.
- [9] Monzote L, Gille L. Mitochondria as a Promising Antiparasitic Target. *Curr Clin Pharmacol* 2010;5:55-66.
- [10] Monzote L, Gille L. Mitochondria and Trypanosomatids: Targets and Drugs. *Pharm Res* 2011;28:2758–70.
- [11] García M, Monzote L, Scull R, Herrera P. Activity of Cuban plants extracts against *Leishmania amazonensis*. *ISRN Pharmacology* 2012;2012:1-7.
- [12] Monzote L, Almannoni S, Montalvo AM, Scull R, Miranda M, Abreu J. Activity of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* grown in Cuba against *Leishmania amazonensis*. *Chemotherapy* 2006;52(3):130-6.
- [13] Staniek K, Rosenau T, Gregor W, Nohl H, Gille L. The protection of bioenergetic functions in mitochondria by new synthetic chromanols. *Biochem Pharmacol* 2005;70:1361-70.
- [14] Witting PK, Travascio P, Sen D, Mauk AG. A DNA oligonucleotide-hemin complex cleaves t-butyl hydroperoxide through a homolytic mechanism. *Inorg Chem* 2001;40:5017-23.
- [15] O'Neil PM, Posner GH. A medicinal chemistry perspective on artemisinin and related endoperoxides. *J Med Chem* 2004;47:2945–64.
- [16] Gottlieb RA. Mitochondrial signaling in apoptosis: mitochondrial daggers to the breaking heart. *Basic Res Cardiol* 2003;98:242–9.
- [17] Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004;142:231–55.
- [18] Hotez PJ, Bottazzi ME, Franco-Paredes C, Ault SK, Periago MR. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Negl Trop Dis* 2008;2:e300.