

Citotoxicidad de extractos de plantas medicinales sobre la línea celular de carcinoma de pulmón humano A549

Cytotoxicity of medicinal plant extracts on the human lung carcinoma cell line A549

Alexis Díaz García^I; Hermis Rodríguez Sánchez^{II}; Ramón Scull Lizama^{III}

^ILicenciado en Microbiología. Máster en Farmacología Experimental. Laboratorios de Producciones Biofarmacéuticas y Químicas (LABIOFAM). La Habana, Cuba.

^{II}Licenciada en Bioquímica. Máster en Bacteriología-Micología. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". La Habana, Cuba.

^{III}Máster en Ecología. Investigador Agregado. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

RESUMEN

OBJETIVO: evaluar el efecto de 10 extractos de plantas medicinales sobre el crecimiento de la línea celular humana de carcinoma de pulmón A549.

MÉTODOS: el efecto de los extractos sobre la células tumorales se midió a través de un ensayo colorimétrico mediante el empleo del bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio a concentraciones entre 3,9-250 µg/mL durante 72 h y se calculó la concentración citotóxica media para cada uno.

RESULTADOS: del total de los extractos evaluados solo cuatro (*Parthenium hysterophorus*, *Bixa orellana*, *Momordica charantia* y *Cucurbita maxima*) evidenciaron concentraciones citotóxicas medias inferiores a 100 µg/mL. Excepto *Parthenium hysterophorus*, las restantes se emplean en la medicina tradicional para el tratamiento del cáncer. Los extractos de *Cecropia peltata*, *Melia azedarach*, *Annona glabra*, *Artemisia absintium*, *Lepidium virginicum* y *Bidens pilosa* no mostraron efectos citotóxicos significativos.

CONCLUSIONES: Los extractos de plantas que se emplean en la medicina tradicional para el tratamiento del cáncer, mostraron citotoxicidad sobre las células tumorales. El conocimiento etnobotánico representa una herramienta importante en la selección de plantas medicinales, en la búsqueda de nuevos compuestos para el tratamiento del cáncer.

Palabras clave: extractos de plantas, medicina tradicional, citotoxicidad, células tumorales.

ABSTRACT

OBJECTIVES: to evaluate the effect of 10 Cuban medicinal plant extracts on the human lung tumor cell line A549.

METHODS: the effect of the plant extracts on tumor cells was determined by a colorimetric assay using the 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) at concentrations ranging from 3,9-250 µg/mL for 72 hours and the mean cytotoxic concentration was calculated for each of them.

RESULTS: the ethanolic extracts of *Parthenium hysterophorus*, *Bixa orellana*, *Momordica charantia* and *Cucurbita maxima* showed mean cytotoxic concentrations under 100 µg/mL. Except for *P. hysterophorus*, the others are used in traditional medicine to fight cancer. The remaining extracts from *Cecropia peltata*, *Melia azedarach*, *Annona glabra*, *Artemisia absintium*, *Lepidium virginicum* and *Bidens pilosa* did not show significant cytotoxic effects.

CONCLUSIONS: the plant extracts for cancer treatment in traditional medicine showed cytotoxic effect on the tumor cell lines. Ethnobotanical data represent an important tool for medicinal plants screening in the quest for new compounds to treat cancer.

Key words: plant extracts, traditional medicine, citotoxicity, tumor cells.

INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido una fuente invaluable de compuestos antitumorales relevantes en la terapia anticancerosa.¹ A pesar de esto, solo cerca del 10% de las más de 250 000 especies de plantas superiores han sido investigadas para sus propiedades farmacológicas.²

En Cuba, al igual que en otros países, la población ha empleado las plantas como parte de la medicina tradicional para el tratamiento de diversas dolencias incluido el cáncer.³⁻⁵ A partir de este conocimiento y teniendo en cuenta reportes científicos de la potencialidades de algunos extractos de plantas como antitumorales, se seleccionaron 10 especies: *Parthenium hysterophorus*, *Bixa orellana*, *Cecropia peltata*, *Melia azedarach*, *Annona glabra*, *Cucurbita maxima*, *Artemisia absintium*, *Momordica charantia*, *Lepidium virginicum* y *Bidens pilosa*. A partir de estas plantas se obtuvieron extractos etanólicos para estudiar su capacidad citotóxica sobre la línea celular humana de carcinoma de pulmón de células no pequeñas A549.

MÉTODOS

Preparación de los extractos

Para la obtención de los extractos crudos, el material vegetal se secó a temperatura ambiente, se pulverizó y la extracción se realizó mediante maceración durante 7 días en 80 % de etanol según la Norma Ramal de Salud Pública (NRSP) 311.⁶ El líquido obtenido, se extrajo por decantación, se filtró por papel de filtro y se envasó en recipientes de vidrio. El solvente se eliminó por evaporación a presión reducida por 24 h. El residuo se sometió a congelación a -70 °C y se secó mediante liofilización. Los recipientes que contenían el extracto crudo se sellaron herméticamente y se almacenaron a -20 °C. Al momento de su uso los extractos secos se pesaron y se diluyeron en dimetilsulfóxido 100 % (DMSO) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO), para obtener soluciones concentradas de 100 mg/mL. A partir de estas soluciones se prepararon soluciones de trabajo por dilución 1:100 extracto/medio de cultivo celular, para quedar a 1 mg/mL. Los órganos de las plantas empleados en el estudio y sus usos etnobotánicos aparecen referidos en el cuadro 1.

Cuadro 1. Relación de las especies de plantas medicinales, órganos empleados y sus usos etnomédicos

Nombre botánico de la planta (familia)	Nombre vulgar	No. de registro	Usos etnomédicos	Órgano de la planta utilizada	Referencias de actividad antitumoral
<i>Parthenium hysterophorus</i> (Asteraceae)	Escoba amarga	9700175	Antiparasitaria, antipirética, hipoglicemiante, antiulcerativa	Follaje	10
<i>Bixa orellana</i> (Bixaceae)	Bija	9600288	Antiinflamatoria, cicatrizante, antitumoral	Semillas	11
<i>Cecropia peltata</i> (Cecropiaceae)	Yagruma	8603239	Analgésica, cicatrizante	Follaje	17
<i>Melia azedarach</i> (Meliaceae)	Paraíso	8402273	Antihelmíntico Antiprotozoaria	Follaje	23
<i>Annona glabra</i> (Annonaceae)	Bagá	8300098	Anticatarral	Follaje	17
<i>Cucurbita maxima</i> (Cucurbitaceae)	Calabaza	Sin registro	Antihelmíntica, antineoplásica	Semillas	17
<i>Artemisia absintium</i> (Asteraceae)	Incienso	9700183	Antiparasitaria, antipirética, analgésica	Follaje	23
<i>Momordica charantia</i> (Cucurbitaceae)	Cundeamor	9700180	Anticatarral Antitumoral	fruto	13,14

<i>Lepidium virginicum</i> (Brassicaceae)	Mastuerzo	8700259	Afecciones renales	Follaje	17
<i>Bidens pilosa</i> (Asteraceae)	Romerillo	9700169	Antiulcerosa, antitumoral, antibacteriana	Follaje	19

Líneas celulares

En el estudio se empleó la línea celular tumoral humana de pulmón A549. Las células se crecieron en el medio de cultivo Dulbecco Modified Eagle (DMEM, SIGMA) suplementado con 2 mM de glutamina, aminoácidos no esenciales y 10 % de suero fetal bovino (SFB, SIGMA), en atmósfera húmeda a 37 °C y 5 % de CO₂. Para los ensayos, las células se desprendieron por tratamiento con 0,25 % tripsina-EDTA y se resuspendieron hasta una concentración de 5 x 10⁴ células/mL.

Tratamientos

A partir de las soluciones de trabajo de cada extracto, se realizaron 7 diluciones seriadas en DMEM, en relación 1:1 y se adicionó 100 µL/pozo de cada dilución para quedar a concentración final de 3.9, 7.81, 15.6, 31.25, 62.5 125, 250 µg/mL en cada pozo. Los tratamientos se aplicaron por triplicado y el experimento se realizó 3 veces. El DMSO, el cual se empleó como solvente de los extractos de plantas, quedó disuelto en concentraciones entre 0,0039 y 1 % en cada pozo, por lo que se evaluó individualmente para citotoxicidad de forma similar a los extractos.

Ensayo de citotoxicidad

El efecto de los extractos de plantas, sobre las células A549, se detectó mediante un ensayo colorimétrico el cual emplea la sal de tetrasolio (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio, MTT). Este ensayo mide la proliferación celular debido a la reducción metabólica de esta sal, de color amarillo, por la acción de enzimas deshidrogenasas mitocondriales. El compuesto resultante (azul de formazán) puede ser solubilizado y cuantificado espectrofotométricamente.⁷ Las células se crecieron en placas de poliestireno de 96 pozos y fondo plano, para cultivos celulares (Corning Inc. Costar^R). Se adicionó 100 µL (5 x 10³ células) por pozo y se expusieron a diferentes concentraciones de cada extracto en un volumen final de 200 µL, en atmósfera de 5 % CO₂ a 37 °C. Luego de 72 h de tratamiento se adicionaron 20 µL de MTT y al cabo de 4 h en atmósfera de 5 % CO₂ a 37 °C, se decantó el medio, se adicionaron 200 µL/pozo de DMSO y la densidad óptica (DO) se leyó en un lector de microplacas de ELISA MRX Revelation Dynex Technologies a 560 nm empleando 630 nm como referencia. Los valores de CC₅₀ de cada extracto se determinaron a partir de las curvas de concentración-efecto (% proliferación celular) mediante el análisis de regresión lineal, con el empleo del paquete estadístico GraphPad Prism versión 4.03 (GraphPad Software, Inc.).

RESULTADOS

La evaluación del efecto de los extractos etanólicos de las 10 plantas, se realizó sobre la línea celular tumoral humana A549, la cual fue incubada durante 72 h con diferentes concentraciones de cada extracto. Solo 4 extractos presentaron valores de $CC_{50} \leq 100$ $\mu\text{g/mL}$. Entre estos *P. hysterophorus* mostró la mayor citotoxicidad con una $CC_{50} = 50,45$ $\mu\text{g/mL}$, seguido por *B. orellana* con $CC_{50} = 74,71$ $\mu\text{g/mL}$, *M. charantia* con $CC_{50} = 88,06$ $\mu\text{g/mL}$ y *C. maxima* $CC_{50} = 100$ $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (cuadro 2). El resto de los extractos presentaron niveles de citotoxicidad similares a los encontrados para el caso del DMSO y superiores a 100 $\mu\text{g/mL}$.

Cuadro 2. Concentración citotóxica media (CC_{50}) de los extractos de planta empleados en el estudio

Plantas empleadas en el estudio	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Parthenium hysterophorus</i>	50,45
<i>Bixa orellana</i>	74,71
<i>Cecropia peltata</i>	>100
<i>Melia azederach</i>	>100
<i>Annona glabra</i>	>100
<i>Cucurbita maxima</i>	100
<i>Artemisia absinthium</i>	>100
<i>Momordica charantia</i>	88,06
<i>Lepidium virginicum</i>	>100
<i>Bidens pilosa</i>	>100

DISCUSIÓN

Los estudios de evaluación de citotoxicidad de extractos de plantas sobre células tumorales, representan evidencias experimentales en la búsqueda de nuevos compuestos antitumorales. Estos ensayos han sido empleados de forma rutinaria como métodos de tamizaje de extractos naturales y compuestos puros con potencialidades en la terapia contra el cáncer.⁸

El extracto etanólico de *P. hysterophorus* evidenció la mayor toxicidad, esta planta ha sido poco evaluada en estudios de citotoxicidad con células tumorales. De hecho, *P. hysterophorus* causa muchos problemas relacionados con su rápida propagación en cultivos y por la alergia que es capaz de causar en las personas sensibles.⁹ La principal aplicación de esta planta está relacionada con la presencia de compuestos, que poseen marcados efectos fitotóxicos.⁹ A pesar de esto

recientemente se ha descrito que la partenina, un compuesto proveniente de *P. hysterophorus*, presenta actividad citotóxica sobre células tumorales.¹⁰ Posteriores estudios de separación e identificación de fitoquímicos podrían esclarecer sus posibilidades en el tratamiento del cáncer.

B. orellana igualmente demostró efecto citotóxico sobre A549. A partir de esta planta se han aislado componentes como el bixin con marcado efecto citotóxico sobre células tumorales de variados tipos histológicos incluidos tumores de mama, colon estómago y pulmón.¹¹ Sin embargo, en recientes estudios con este extracto, en pacientes con hiperplasia prostática benigna no se observó efecto beneficioso sobre este tipo de cáncer.¹²

M. charantia es empleada con mucha popularidad en la medicina tradicional de muchos países, incluida Cuba. Los usos más comunes se relacionan con sus propiedades antidiabéticas, antiparasitarias, antivirales y antitumorales. Estudios experimentales con el extracto de esta planta han demostrado actividad anticancerígena sobre un variado grupo histológico de tumores entre los que resaltan linfomas y carcinomas.^{13,14} Actualmente se considera que el mecanismo de acción de este extracto está relacionado con la inhibición de ciclinas dependientes de quinasas, que son proteínas encargadas de regular el ciclo celular¹⁵ así como de proteínas inhibitoras de la apoptosis.¹⁶

C. maxima ha sido otra planta poco estudiada en relación con su efecto sobre células tumorales. Sin embargo, existen algunas evidencias experimentales *in vitro* que observan una elevada actividad citotóxica de extractos de esta planta, sobre estas células,¹⁷ lo cual fue confirmado en este trabajo.

Los extractos de *P. hysterophorus*, *B. orellana* y *M. charantia* mostraron $CC_{50} < 100$ $\mu\text{g/mL}$. El Instituto Nacional del Cáncer de EUA. considera potencialmente activos aquellos extractos alcohólicos con CC_{50} inferiores a este valor.¹⁸ Aunque *C. maxima* mostró una $CC_{50} = 100$ $\mu\text{g/mL}$, los antecedentes de actividad citotóxica sobre células tumorales de sus extractos y principios activos¹⁷ permiten considerarla, junto a los extractos anteriores, para futuros estudios en un panel de líneas celulares para determinar el espectro de acción e identificar los principios activos.

Los extractos restantes presentaron $CC_{50} > 100$ $\mu\text{g/mL}$, sin embargo, no se puede descartar completamente sus potencialidades en la terapia anticancerosa debido a que solo se evaluaron en células de adenocarcinoma de pulmón. Adicionalmente, extractos como el de *B. pilosa* son empleados en la medicina tradicional como anticancerígeno y existen evidencias científicas de sus propiedades antitumorales evaluadas en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*.^{19,20}

Los extractos de *A. glabra*, *A. absintium*, *M. azedarach*, *C. peltata* y *L. virginicum* han sido poco estudiados en relación con sus efectos citotóxicos y antitumorales. Las evidencias de toxicidad sobre células tumorales, fueron obtenidas a partir de órganos de las plantas y solventes, diferentes a los empleados en el presente estudio y estas podrían representar causas importantes en la ausencia de toxicidad de estos extractos.

Los datos etnomédicos sobre el empleo de *B. orellana*, *C. máxima* y *M. charantia*, en el tratamiento del cáncer, fueron corroborados en el presente trabajo. El conocimiento etnobotánico representa una herramienta importante en la selección de plantas medicinales, para la búsqueda de nuevos compuestos antitumorales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod.* 2007; 70(3):461-77.
2. Jinwoong K, Eun JP. Cytotoxic Anticancer Candidates from Natural Resources Current Medicinal Chemistry. *Anti-Cancer Agents.* 2002; 2(4):485-537.
3. Roig JT. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. La Habana: Editorial INRA; 1988.
4. Fuentes V, Expósito A. Las encuestas etnobotánicas sobre plantas medicinales en Cuba. *Rev Jardín Botánico Nacional.* 1995; 16:77-144.
5. Beyna A, León MC, Iglesias E, Ferrádiz D, Herrera R, Volpato G, et al. Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camagüey (Cuba). *Anal Jardín Botánico Madrid.* 2004; 61(2):185-204.
6. Ministerio de Salud Pública (MINSAP). Medicamentos de origen vegetal: extractos y tinturas: proceso tecnológico. Norma Ramal de Salud Pública (NRSP); 311. La Habana: MINSAP; 1991.
7. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular grow and survival: application to proliferation and citotoxicity assays. *J Immunol Meth.* 1983; 65:55-63.
8. Cordell GA, Kinghorn AD, Pezzuto JM. Separation, structure elucidation and bioassay of cytotoxic natural products, In: Colegate SM, Molyneux R. J. eds. *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and Structure Determination.* Boca Raton: CRC Press; 1993, 99-200.
9. Das B, Das R. Chemical investigation in *Parthenium hysterophorus L.* an allelopathic plant. *Allelopathy J.* 1995; 2:99-104.
10. Belz RG. Stimulation Versus Inhibition-Bioactivity of Parthenin, A Phytochemical From *Parthenium hysterophorus L.* Dose Response. 2007; 6(1):80-96.
11. Reddy MK, Alexander-Lindo RL, Nair MG. Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors. *J Agric Food Chem.* 2005; 53(23):9268-73.
12. Zegarra L, Vaisberg A, Loza C, Aguirre RL, Campos M, Fernandez I, et al. Double-blind randomized placebo-controlled study of *Bixa orellana* in patients with lower urinary tract symptoms associated to benign prostatic hyperplasia. *Int Braz J Urol.* 2007; 33(4):493-500.
13. Akihisa T, Higo N, Tokuda H, Ukiya M, Akazawa H, Tochigi Y, et al. Cucurbitane-type triterpenoids from the fruits of *Momordica charantia* and their cancer chemopreventive effects. *J Nat Prod.* 2007; 70:1233-9.
14. Ray R, Raychoudhuri A, Steele R, Nerurkar P. Bitter melon (*Momordica charantia*) extract inhibits breast cancer cell proliferation by modulating cell cycle regulatory genes and promotes apoptosis. *Cancer Res.* 2010; 70:1925-31.

15. Grossmann ME, Mizuno NK, Dammen ML, Schuster T, Ray A, Cleary MP. Eleostearic acid inhibits breast cancer proliferation by means of an oxidation-dependent mechanism. *Cancer Prev Res.* 2009; 2: 879-86.
16. Nerurkar P, Ray RB. Bitter Melon: Antagonist to Cancer. *Pharm Res.* 2010; 27: 1049-53.
17. López AM, Rojas N, Jiménez CA. Actividad antineoplásica potencial de extractos de plantas que crecen en Cuba. Parte IV. *Rev Cubana Farm.* 1981; 15(1): 71-7.
18. Jabit ML, Wahyuni FS, Khalid R, Israf DA, Haari K, Lajis NH, Stanslas J. Cytotoxic and nitric oxide inhibitory activities of methanol extracts of *Garcinia* species. *Pharmaceutical Biol.* 2009; 47(11): 1019-26
19. Kwiecinski MR, Felipe KB, Schoenfelder T, Wiese LP de Lemos, Rossi MH, Gonçalves E, Felicio JD'arc *et al.* Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. *J Ethnopharmacol.* 2008; 117(1): 69-75
20. Valdés HAL, Rego HPL. *Bidens pilosa* Linné. *Rev Cubana Plant Med* [revista en la Internet]. 2001 Abr [citado 2010 Nov 28]; 6(1): 28-33. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962001000100007&lng=es&nrm=iso&tlng=es
21. Cochrane CB, Nair PK, Melnick SJ, Resek AP, Ramachandran C. Anticancer Effects of. *Annona glabra* Plant Extracts in Human. Leukemia Cell Lines. *Anticancer Res.* 2008; 28: 965-71.
22. Nibret E, Wink M. Volatile components of four Ethiopian Artemisia species extracts and their *in vitro* antitrypanosomal and cytotoxic activities. *Phytomedicine.* 2010; 17: 369-74.
23. He L, Yin N, Cheng J, Wu X, Jiang J, Song X. Structural features of a new heteropolysaccharide from the fruit bodies of *Melia azedarach* and its effect on cytotoxic activity. *Fitoterapia.* 2009; 80: 399-403.

Recibido: 5 de octubre de 2010.

Aprobado: 13 de noviembre de 2010.

Lic. *Alexis Díaz García*. Laboratorios de Producciones Biofarmacéuticas y Químicas (LABIOFAM) Ave. Boyeros Km 16½, Rpto Mulgoba, Boyeros, La Habana, Cuba.
Correo electrónico: alexisdg@infomed.sld.cu