

Actividad citotóxica de extractos acuosos de hojas de *Trichilia hirta* sobre células tumorales humanas

Cytotoxic activity of water extracts of *Trichilia hirta* leaves on human tumor cells

Lic. Edgar Hernández Sosa^I, Lic. Néstor Mora González^{II}, Dr.C. Humberto J. Morris Quevedo^I, MSc. Leticia Delgado Cobas^I, Dra.C. Clara Esther Martínez Manrique^I

^I Universidad de Oriente. Santiago de Cuba, Cuba.

^{II} Centro de Inmunología y Productos Biológicos (CENIPBI). Universidad Médica "Carlos J. Finlay". Camaguey, Cuba.

RESUMEN

La planta *Trichilia hirta* L. (Meliaceae) es utilizada tradicionalmente por pacientes con cáncer como recurso antitumoral. Por ello, los objetivos de este estudio fueron evaluar la actividad citotóxica de extractos acuosos de hojas de *Trichilia hirta* sobre células tumorales e identificar mediante un tamizaje fitoquímico las principales familias de fitocomponentes presentes en éstos. La actividad citotóxica de los extractos se evaluó sobre células de melanoma humano (SK-mel-3) y adenocarcinoma humano de mama (T-47D). Las células epiteliales de riñón de mono verde *Cercopithecus aethiops* (Vero) fueron utilizadas como control de células no tumorales. Los resultados mostraron la presencia de triterpenos/esteroides, saponinas, cumarinas, azúcares reductores, fenoles y taninos, flavonoides y carbohidratos/glicósidos en los extractos. Los extractos acuosos de hojas mostraron actividad citotóxica fundamentalmente sobre las células tumorales, lo cual contribuye a explicar la mejoría referida por pacientes con cáncer que consumen estos extractos de forma tradicional.

Palabras clave: *Trichilia hirta*, plantas medicinales, antitumoral, citotoxicidad, fitoquímicos.

ABSTRACT

Trichilia hirta L. (Meliaceae) is traditionally used by patients suffering from cancer as an antitumoral resource. Therefore, the objectives of this study were to evaluate the cytotoxic activity of water extracts of *Trichilia hirta* leaves on tumour cells and identify through a phytochemical screening the principal families of phytocomponents contained in these extracts. The cytotoxic activity of these extracts was also evaluated on human melanoma cells (SK-mel-3) and human breast carcinoma (T-47D). The African green monkey kidney (AGMK) cells *Cercopithecus aethiops* (Vero) were used as a non-tumour cells control. The results showed the presence of triterpenes/steroids, saponins, coumarins, reductor sugars, phenols and tannins, flavonoids and carbohydrates/glycosides in the extracts. The water leaf extracts showed cytotoxic activity mainly on tumour cells, which contributes to explain the referred recovery by patients suffering form cancer that traditionally consume these extracts.

Key words: *Trichilia hirta*, medicinal plants, antitumor, cytotoxicity, phytochemicals.

INTRODUCCIÓN

Numerosas especies de la familia Meliaceae son conocidas como medicinales. En particular, *Trichilia hirta* L, denominada popularmente como "Jubabán", ha sido utilizada tradicionalmente para tratar diferentes patologías asociadas al sistema respiratorio y úlceras externas;¹ además, ha mostrado actividad anti-inflamatoria.² Esta especie ha sido empleada en la medicina popular y tradicional en Venezuela como antitumoral.³ De forma similar, extractos acuosos de raíz de esta planta son popularmente consumidos como recurso antitumoral por pacientes con cáncer bajo tratamiento oncológico en Santiago de Cuba.⁴ Sin embargo, se han realizado pocos estudios científicos relacionados con los posibles efectos medicinales de *Trichilia hirta*, y hasta la fecha no existen referencias acerca de la actividad citotóxica directa de extractos de hojas sobre células tumorales. Tomando en consideración estos antecedentes, el estudio estuvo dirigido a evaluar la actividad citotóxica de extractos acuosos de hojas de *Trichilia hirta* sobre células tumorales y la identificación de las principales familias de fitoquímicos presentes en estos.

MÉTODOS

Material vegetal

Se colectaron hojas frescas de la planta *Trichilia hirta* L. en el poblado de "El Caney" (Santiago de Cuba). La clasificación taxonómica de la planta fue realizada por especialistas del herbario del Centro Oriental de Estudio de Ecosistemas y Biodiversidad (BIOECO), donde se depositaron muestras de la planta (BIOECO No. 1078). El material fue secado a temperatura ambiente (27-34°C) durante 14 días a la sombra, y posteriormente fue almacenado en lugar seco y fresco.

Obtención de extractos acuosos

Para la obtención de los extractos se pesaron 100 g de hojas y se mezclaron con 1000 mL de agua destilada, seguido de una decocción durante 30 minutos. Los extractos acuosos obtenidos fueron filtrados y conservados a 4°C hasta su uso.

Reacciones de identificación fitoquímica

En los extractos obtenidos se determinó la presencia/ausencia de alcaloides, triterpenos/esteroides, saponinas, cumarinas, azúcares reductores, fenoles y taninos, flavonoides y carbohidratos/glicósidos según se describe en la Guía Metodológica de Salud Pública para la Investigación de las Plantas Medicinales.⁵

Actividad citotóxica sobre las líneas celulares SK-mel-3, T-47D y Vero

En estos ensayos los extractos de hojas fueron estandarizados a 30 y 120 microgramos de sólidos totales de extracto por mililitro de medio en los pocillos (µg/mL). Para la evaluación de la actividad citotóxica se utilizaron las líneas celulares SK-mel-3 (melanoma humano, ATCC HTB-69), T-47D (adenocarcinoma humano de mama, ATCC HTB-133) y Vero (células epiteliales de riñón de mono verde *Cercopithecus aethiops*, ATCC CCL-81TM). Las células Vero se utilizaron como control de célula no tumoral para obtener una aproximación del posible efecto selectivo de los extractos sobre células tumorales. Se utilizó el ensayo con bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT, Sigma, USA), el cual está basado en la conversión de la sal de tetrazolio amarilla en cristales púrpuras de formazan por células metabólicamente activas.⁶ Las líneas celulares fueron mantenidas en medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, USA) suplementado con 2 mM de L-glutamina y 10 % de suero fetal bovino (Sigma-Aldrich, USA) a 37 °C y 5 % de CO₂. Las células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos (Sigma-Aldrich, USA) a una densidad de 10⁵ células/mL durante 24 h.

Después de la adherencia celular, el sobrenadante fue eliminado y se aplicaron 100 µL de los extractos previamente resuspendidos en medio de cultivo a concentraciones de 30 y 120 µg de sólidos totales de extracto/mL de medio en los pocillos (µg/mL). Después de 72 h de tratamiento el sobrenadante fue eliminado y añadió en cada pocillo 200 µL de la solución de MTT (1 mg/mL) en RPMI 1640 (Sigma), seguido de cuatro horas de incubación a 37°C.

Los cristales de formazan fueron disueltos en 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Gibco, USA). Los valores de absorbancia fueron estimados en un lector de placas (Lab Systems Multiskan Plus, USA) a 540 nm. Se utilizaron dos controles: control negativo, conteniendo células sin tratamiento y un control de fondo sin células, conteniendo extractos y medio de cultivo, el cual fue utilizado como blanco para evaluar el efecto directo de éstos sobre la reducción del MTT. La viabilidad celular fue determinada mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{(\text{absorbancia del tratamiento} - \text{absorbancia del blanco con extractos})}{(\text{absorbancia del control} - \text{absorbancia del blanco sin extractos})} \times 100.$$

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media del porcentaje de viabilidad correspondiente a tres réplicas ± error estándar de la media (p<0,05). Como los datos no cumplían con la homogeneidad de varianzas, se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para probar la igualdad entre las medianas de los tratamientos

experimentales correspondientes a cada dosis ensayada v.s control. Para los análisis se utilizó el programa SigmaPlot versión 11.0 para Windows, Alemania.

RESULTADOS

Identificación fotoquímica

El extracto acuoso de hoja mostró un color carmelita oscuro de olor característico y sabor amargo. En la tabla 1 se muestran los resultados de los metabolitos secundarios determinados en el extracto.

Tabla 1. Metabolitos secundarios determinados en extractos acuosos de hoja de *Trichilia hirta*.

Fitoquímicos	Hojas	Raíz
Alcaloides	-	-
Triterpenos/esteroides	+++	++
Chumarías	+	+
Saponinas	++	+++
Azúcares reductores	++	+++
Fenoles y taninos	+++	++
Flavonoides	++	+
Carbohidratos/ Glicósidos	+	++

(-) No detectado; (+) Detectado:
(concentración: + baja, ++ moderada, +++ alta).

Actividad citotóxica sobre células tumorales y no tumorales

El extracto acuoso de hojas mostró efecto citotóxico sobre las células de carcinoma de mama humano (T-47D), las cuales exhibieron una viabilidad de 57 % y 52 % al ser tratadas con 30 y 120 µg/mL, respectivamente (Fig. 1). No obstante, en el caso de las células de melanoma humano (SK-mel-3) el incremento de la concentración del extracto no estuvo asociado a un mayor efecto citotóxico sobre éstas (62 % y 70 %). Al ser tratadas con extracto acuoso de hojas (30 y 120 µg/mL) las células no tumorales (Vero) mostraron una viabilidad celular del 70 % y 76 % respectivamente, siendo menos afectadas que las células tumorales T-47D y SK-mel-3, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los efectos sobre las células Vero y las tumorales ($p < 0,05$).

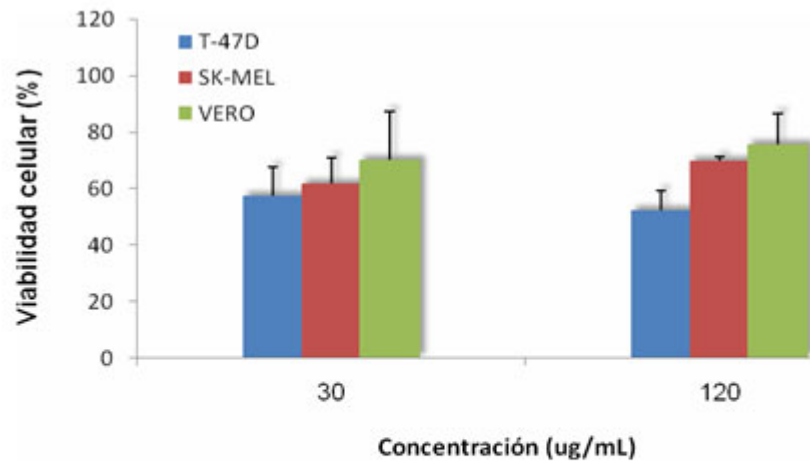


Fig. 1. Efecto del extracto acuoso de hojas de *Trichilia hirta* sobre la viabilidad celular de células tumorales y no tumorales. Las células fueron tratadas con 30 y 120 µg/mL del extracto durante 72 h, y la viabilidad celular determinada mediante el ensayo colorimétrico con el MTT.

Los resultados se expresan como la media del por ciento de viabilidad \pm error estándar de la media. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la prueba U de Mann-Whitney entre las medianas de los tratamientos experimentales correspondientes a cada dosis ensayada en relación con el control.

DISCUSIÓN

La planta *Trichilia hirta* ha sido utilizada tradicionalmente en sistemas de curación populares de Venezuela como antitumoral,³ y en los últimos años se ha incrementado el volumen de referencias populares acerca de su uso entre pacientes con cáncer como forma de tratamiento complementario o alternativo en Santiago de Cuba.⁴ Aunque los pacientes en Santiago de Cuba utilizan fundamentalmente los extractos de raíz, se incluyó en este estudio el extracto de hojas teniendo en cuenta dos criterios: la mayor parte de los estudios de actividad biológica de especies del género *Trichilia* en el mundo, se han desarrollado con extractos de hojas,⁷ y por otra parte, el creciente uso de extractos de hojas de *Trichilia hirta* forma tradicional en Santiago de Cuba.

En el caso del extracto acuoso de hojas de *Trichilia hirta* se detectó la presencia de triterpenos y esteroides, los cuales podrían contribuir a la actividad citotóxica de estos extractos. Esta interpretación se sustenta en que estudios previos realizados con diferentes géneros de Meliaceae han mostrado que de forma general los benzofuranos y terpenoides fueron responsables de la actividad citotóxica.⁸ De particular interés podrían ser los tetranortriterpenoides (conocidos como limonoides) por ser característicos de especies de *Trichilia*.⁹ Estos compuestos han sido descritos como

potenciales agentes quimioprotectores y citotóxicos sobre células tumorales, aunque posiblemente su aporte sea secundario, ya que han mostrado mejores efectos como antineoplásicos cuando se administraron simultáneamente con fármacos antitumorales (vinblastina y taxol), flavonoides o tocotrienoles.¹⁰

En un estudio previo realizado con *Trichilia hirta* no se detectó la presencia de saponinas en hojas o tallo;¹¹ en contraste, otros autores han referido la presencia de estos compuestos en hojas.¹² Los resultados obtenidos en este estudio apoyan la presencia de saponinas en extractos acuosos de hojas de esta especie (tabla 1). Estos metabolitos podrían contribuir también a la actividad citotóxica de esta planta, ya que las saponinas han mostrado importantes efectos citotóxicos sobre células tumorales A549, HeLa, HL-60, KB. No obstante, pueden tener elevada citotoxicidad y no siempre muestran actividad antitumoral,¹³ por lo que algunas compañías farmacéuticas evitan las saponinas en los ensayos clínicos por considerarlas “*moléculas que distraen*” de los intentos de encontrar compuestos con verdadera actividad antitumoral.¹⁴

Otros metabolitos identificados en extractos de *Trichilia hirta* y que han sido previamente estudiados por sus efectos antitumorales son los flavonoides (tabla 1). Se ha observado que estos metabolitos secundarios poseen actividad antitumoral sobre diferentes líneas celulares tumorales, además de actividad antioxidante y adyuvante.¹⁵ Esto sugiere que los flavonoides son importantes candidatos con actividad antitumoral y antioxidante, lo cual podría tener implicaciones en los extractos acuosos de hojas de *Trichilia hirta*, favoreciendo así la citotoxicidad sobre células tumorales.

Los carbohidratos también han sido estudiados por su potencial antitumoral. En este sentido, se ha informado que los polisacáridos de *Actinidia eriantha* ejercen un efecto antitumoral e inmunomodulador.¹⁶ La presencia de estos compuestos en extractos de *Trichilia hirta* pudiera ser otro elemento que contribuya a explicar la actividad citotóxica sobre las células tumorales.

Los resultados mostraron que las células tumorales T-47D y SK-mel-3 tratadas con los extractos acuosos de hojas de *Trichilia hirta* exhibieron menor viabilidad celular en comparación con las células no tumorales Vero (Fig. 1), y aunque no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre estos efectos, los datos sugieren que los extractos acuosos de esta planta pudieran mostrar cierta selectividad sobre células tumorales, lo cual ha sido previamente observado con extractos acuosos de raíz de esta especie.¹⁷ Los datos obtenidos indican la necesidad de determinar la concentración citotóxica media (CC₅₀) y el índice de selectividad de estos extractos sobre células tumorales, como aspectos a considerar en posteriores estudios sobre la actividad antitumoral de extractos de *Trichilia hirta*.

En uno de los estudios más extensos realizados sobre actividad antitumoral de recursos naturales se incluyeron aproximadamente 90.000 extractos de plantas marinas y terrestres. Entre ellos se evaluaron 346 especies de la familia Meliaceae, de las que resultaron 35 activas, con un porcentaje de éxito relativamente alto (10,1%). Entre los géneros con al menos una especie activa estuvieron *Cedrelopsis*, *Ekebergia*, *Entandrophragma*, *Gaurea*, *Malleastrum*, *Sandoricum*, *Trichilia*, *Turraea*, *VaVaea*, *Xylocarpus*.⁸ Esto señala que la familia Meliaceae podría tener potencial para la identificación de especies con actividad antitumoral.

Otros estudios han corroborado que especies del género *Trichilia* pueden ser citotóxicas para células tumorales. Se observó que *Trichilia cf. pleeana* inhibió en un

16,2 % la viabilidad de la línea celular de adenocarcinoma de colon KM-12,¹⁸ además compuestos aislados de *Trichilia emetica* inhibieron la proliferación de las líneas celulares tumorales MCF7 y S180.¹⁹ Estos estudios sugieren que la actividad citotóxica observada con extractos acuosos de *Trichilia hirta* no es un fenómeno dependiente de las condiciones ambientales específicas de un lugar en particular, sino que podría estar asociado a los compuestos que estas plantas producen como parte de su metabolismo secundario, entre ellos triterpenos/esteroides, saponinas, flavonoides y polisacáridos.

La aplicación de extractos de hojas o raíz de plantas medicinales con un enfoque de terapia multicomponente, en lugar de un solo fitoquímico, podría aportar mejores resultados que la mono-terapia, ya que los componentes del extracto poseen diferentes mecanismos de acción. Ello aportaría una eficacia sinérgica, así como reduciría la dosis requerida de un componente individual en comparación con la mono-terapia y los efectos secundarios.²⁰ Es por ello, que la presencia de múltiples familias de fitoquímicos en los extractos acuosos de hojas de *Trichilia hirta* podría considerarse como un factor positivo que explica la actividad citotóxica de estos extractos e incrementa además las potencialidades de obtener efectos antitumorales significativos. Estas observaciones contribuyen a explicar la mejoría referida por pacientes con cáncer que consumen estos extractos de forma tradicional.

CONCLUSIONES

Se identificaron varias familias de fitoquímicos en los extractos acuosos de hojas de *Trichilia hirta*, como: triterpenos/esteroides, saponinas, flavonoides y polisacáridos, todos con actividad antitumoral referida en la literatura. Los extractos evaluados mostraron actividad citotóxica con alguna selectividad sobre células tumorales, fundamentalmente sobre células de carcinoma de mama humano T-47D. De este modo, los resultados obtenidos contribuyen a validar el uso tradicional y popular de estos extractos como un recurso con posibles aplicaciones como antitumoral.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Roig J T. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. 2 ed.; Editorial Científico-Técnica: La Habana, 1974.
2. Obukowicz MG, Hummert S L. Selective COX-2 inhibition from plant extract. Patent number US 20040197429, October 7, 2004.
3. Pettit G R, Barton D H R, Herald C L, Polonsky J, Schmidt J M, Connolly J D. Evaluation of limonoids against the murine P388 lymphocytic leukemia cell line. *J Nat Prod.* 1983;46(3):379-390.
4. Hernández S E, Hung B G, Audivert Y H, Delgado R. Usos del extracto acuoso de *Trichilia hirta* en Santiago de Cuba y el Caribe. Tradición y perspectivas. Disponible: <http://www.biologia-en-internet.com/biologia/revista/usuarios-del-extracto-acuoso-de-trichilia-hirta-en-santiago-de-cuba-y-el-caribe-tradicion-y-perspectivas/> (28 October, 2011).

5. Ministerio de Salud Pública (MINSAP). Guía metodológica para la investigación en plantas medicinales. Editorial Pueblo y Educación: La Habana, 1997.
6. Shriram V, Kumar V, Kishor P B K, Suryawanshi S B, Upadhyay A K, Bhat M K. Cytotoxic activity of 9,10-dihydro-2,5-dimethoxyphenanthrene-1,7-diol from *Eulophia nuda* against human cancer cells. J Ethnopharmacol. 2010;128:251-253.
7. Benencia F, Courrèges M C, Coulombié F C. *In vivo* and *in vitro* immunomodulatory activities of *Trichilia glabra* aqueous leaf extracts. J Ethnopharmacol. 2000;69(3):199-205.
8. Cragg G M, Newman D J, Yang S S. Natural Product Extracts of Plant and Marine Origin Having Antileukemia Potential. The NCI Experience. J. Nat. Prod. 2006;69(3):488-498.
9. Komane B M, Olivier E I, Viljoen A M. *Trichilia emetica* (Meliaceae) - A review of traditional uses, biological activities and phytochemistry. Phytochem Lett. 2011;4(1):1-9.
10. Roy A, Saraf S. Limonoids: Overview of Significant Bioactive Triterpenes Distributed in Plants Kingdom. Biol Pharm Bull. 2006;29(2):191-201.
11. Dominicis M E, Oquendo M, Batista M, Herrera P. Tamizaje de alcaloides y saponinas de plantas que crecen en Cuba. II: Península de Guanahacabibes. Rev Cubana Enfermer 1995;11(3):21-22.
12. Pereira S C, Vega D T, Almeida M S, Morales G T. Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de las hojas de la *Trichilia hirta* L. Rev Química Viva. 2009;(3):192-199.
13. Sparg S G, Light M E, Staden J. Biological activities and distribution of plant saponins. J Ethnopharmacol. 2004;94:219-243.
14. Mann J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. Nat Rev Cancer. 2002;2:143-148.
15. Yoshida T, Konishi M, Horinaka M, Yasuda T, Goda A E, Taniguchi H, et al. Kaempferol sensitizes colon cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. Biochem Biophys Res Commun. 2008;375(1):129-133.
16. Xu H.-S, Wu Y.-W, Xu S.-F, Sun H.-X, Chen F.-Y, Yao, L. Antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from the roots of *Actinidia eriantha*. J Ethnopharmacol. 2009;125(2):310-317.
17. Hernández S E, Batista Duharte A, Portuondo D, Tamayo O V, González M N, Morris Q H J, et al. Immunorestorative in immunosuppressed Balb/c mice and cytotoxic activity of water extract from *Trichilia hirta* root. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat. 2010;9(6):457-464.
18. Suffredini I B, Paciencia M L B, Varella A D, Younes R N. *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia. Fitoterapia. 2007;78(3):223-226.

19. Traore M, Zhai L, Chen M, Olsen C E, Odile N, Pierre GI, et al. Cytotoxic kurubasch aldehyde from *Trichilia emetica* Nat Prod Res. 2007;21(1):13-17.
20. Sharma A T, Mitkare SS, Moon R S. Multicomponent herbal therapy: a review. IJPSRR. 2011;6(2):185-187.

Recibido: 2/02/2012

Aprobado: 19/02/09

Lic. Edgar Hernández Sosa

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente.
Avenida Patricio Lumumba s/n. Santiago de Cuba 5, Cuba. CP 90500. Correo electrónico: ehsosa@cnt.uo.edu.cu