

Evaluación de la actividad antiproliferativa de extractos metanólicos de plantas de la familia *leguminosae*

Evaluation of the antiproliferative activity of methanolic extracts of plants from the *Leguminosae* family

Dionisio Antonio Olmedo Agudo,^I Nadja Shantall Marrone Paredes,^{II} Alex Fernando Espinosa Rivas,^{III} Carlos Patricio Guerra Torres,^I Mahabir Prashad Gupta^I

^I Departamento de Química Medicinal y Farmacognosia, Escuela de Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Panamá. Panamá.

^{II} Centro Educativo Hernando Bárcena, Provincia de Panamá Oeste. Panamá.

^{III} Oficina de F.A.O. Panamá.

RESUMEN

Introducción: la familia *Leguminosae* es rica en isoflavonoides y puede tener efecto anticáncer. Las especies panameñas de esta familia no han sido estudiadas para explorar su potencial en los cánceres de mamas y próstata, dos principales causas de mortalidad en la población adulta panameña.

Objetivo: evaluar el efecto antiproliferativo contra cáncer de mamas estrógeno dependiente (RE+) y cáncer de próstata andrógeno dependiente (RA+) en extractos metanólicos de la familia *Leguminosae*.

Materiales: las 69 especies de plantas de esta familia fueron recolectadas en las provincias de Veraguas y Darién, República de Panamá. Para la preparación de los extractos, el material vegetal desecado y pulverizado de diversas partes de las plantas fue macerado con metanol por 24 h con agitación, luego filtrado y concentrado en un rotavapor a < 40 °C y posteriormente liofilizado. Los extractos crudos así obtenidos fueron evaluados en las líneas celulares de cáncer de mamas: MCF-7(RE+) y MCF-7(RE-), y cáncer de próstata (CaP (RA+)), utilizando el ensayo antiproliferativo con sulforodamida (SRB) y tretazolio (MTT).

Resultados: los extractos más activos contra cáncer de mama estrógeno-dependiente (ER+) fueron *Neptunia pubescens* (fruto), *Zygia latifolia* (tallo) y *Albizia adinocephala* (corteza) con valores de GI₅₀ entre 1,1 a 5,9 µg/ml, mientras que contra cáncer de próstata-andrógeno-dependiente (AR+) corresponden a *Zygia latifolia* (hoja), *Pithecellobium dulce* (hojas) y *Acosmium panamense* (tallo), que mostraron una GI₅₀ entre 1,2 a 5,1 µg/ml. Además, el extracto de *Albizia adinocephala* (corteza) fue activo contra cáncer de mamas que expresa el receptor HER-2, mostrando una IC₅₀ de 4,8 µg/ml.

Conclusiones: los extractos crudos de las especies promisorias podrían ser útiles como fuentes potenciales para la obtención de sustancias con actividad antiproliferativa contra cánceres receptores dependientes (RE+), (RA+) y (HER-2+).

Palabras clave: actividad anticáncer; bioensayo; GI₅₀; Receptores RE+; RA+; HER-2.

ABSTRACT

Introduction: the Leguminosae family is rich in isoflavonoids potentially effective against cancer. No studies have been conducted of Panamanian species from this family to explore their possible use in the treatment of breast and prostate cancer, two main causes of mortality among the adult population in Panama.

Objective: evaluate the antiproliferative effect of methanolic extracts from the Leguminosae family against estrogen-dependent breast cancer (ER+) and androgen-dependent prostate cancer (AR+).

Materials: all 69 species of plants from this family were collected from the provinces of Veraguas and Darién in the Republic of Panama. Dried, pulverized material from various parts of the plants was macerated in methanol for 24 h with stirring. The material obtained was filtered, concentrated in a rotary evaporator at < 40°C, and lyophilized. The crude extracts obtained were evaluated for breast cancer cell lines MCF-7(ER+) and MCF-7(ER-), and prostate cancer cell lines (CaP (AR+)), using the antiproliferative assay with sulphorhodamine (SRB) and tetrazolium (MTT).

Results: the most active extracts against estrogen-dependent breast cancer (ER+) were obtained from *Neptunia pubescens* (fruit), *Zygia latifolia* (stem) and *Albizia adinocephala* (bark) with GI₅₀ values of 1.1 to 5.9 µg/ml, whereas the most active extracts against androgen-dependent prostate cancer (AR+) were obtained from *Zygia latifolia* (leaves), *Pithecellobium dulce* (leaves) and *Acosmium panamense* (stem), with GI₅₀ values of 1.2 to 5.1 µg/ml. Additionally, extract from *Albizia adinocephala* (bark) was active against breast cancer expressing receptor HER-2, with an CI₅₀ of 4.8 µg/ml.

Conclusions: crude extracts from promising species could be useful as potential sources of substances with antiproliferative activity against receptor-dependent cancers (ER+), (AR+) and (HER-2+).

Keywords: anticancer activity; bioassay; GI₅₀; ER+; AR+; HER-2 receptors.

INTRODUCCIÓN

La familia *Leguminosae*, es la tercera más grande de las Angiospermas, con 740 géneros y 19,400 especies,¹ contiene compuestos bioactivos tales como: ácido fítico, compuestos fenólicos, isoflavonas, fitoesteroles, saponinas, taninos, carbohidratos² y alcaloides³ con efectos benéficos por sus propiedades antioxidante, antimutagénica, anticancerígena, antihiper glucémica, prevención de enfermedad coronaria y accidente cerebrovascular.²

La Flora de Panamá es una de las más ricas en el mundo con un total 10,444 especies de plantas de las cuales 9,520 son vasculares.⁴ La familia *Leguminosae* también es una de las más grandes en Panamá con 114 géneros y 489 especies,⁴ la cual no ha sido bien estudiada para explorar su potencial anticancerígeno.

A nivel mundial en 2012, el cáncer de mama fue el cáncer más común y el que ocasionó la mayor mortalidad en la población adulta femenina.⁵ En Panamá, la probabilidad de padecer de cáncer de mama en las mujeres es de 40 por cada 100 mil habitantes; los casos de próstata 67 por igual cantidad de habitantes siendo la sobrevivida en estos casos de 5 años, si no son detectados a tiempo.⁶ Las alteraciones genéticas y moleculares que ocasionan progresión del cáncer de mamas involucran los receptores de estrógeno (RE), receptores de progesterona (RP) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2).^{7,8} El cáncer de próstata (CaP) puede desarrollarse por estimulación o no del receptor androgénico (RA), lo que se denomina cáncer de próstata (RA+) y (RA-).⁹⁻¹² Este tipo de tumor constituye una de las 5 causas de muerte en la República de Panamá⁶ y sigue ocasionando muertes en la población mundial.¹²

El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial antiproliferativo de extractos metanólicos provenientes de la familia *Leguminosae*, en la búsqueda de flavonoides e isoflavonoides con potencial efecto antitumoral contra el cáncer de mamas y próstata receptor hormona dependiente.

MÉTODOS

Selección de las plantas de estudios

La especies fueron seleccionadas con base en la búsqueda a través de las Base de Datos Napralert®, PubMed, AGRICOLA y Chemical Abstracts.

Recolección del material vegetal

Se recolectaron 69 especies de la familia *Leguminosae* distribuidas en diferentes lugares desde el Parque Nacional Chagres, en la provincia de Panamá hasta el Parque Nacional Coiba en la Provincia de Veraguas. Estas fueron recolectadas e identificadas por Alex F. Espinosa y Carlos P. Guerra, taxónomos de CIFLORPAN. Las muestras Voucher fueron depositadas en el Herbario de la Universidad de Panamá (PMA).

Procesamiento del material vegetal

El material vegetal recolectado fue secado al aire, separado en sus diferentes partes y desecados en un horno a temperatura menor de $< 40^{\circ}\text{C}$. Posteriormente el material vegetal fue pulverizado en un molino Wiley, obteniéndose polvo tamizado con una malla de 2 mm. El material vegetal pulverizado fue almacenado en bolsas plásticas Ziplock hasta su utilización para la preparación de los extractos crudos.

Preparación de extractos metanólicos

50 g del material vegetal procesado fue macerado con 600 ml de metanol y macerados con agitación por 24 h. Luego los extractos fueron filtrados, el filtrado concentrado *in vacuo* a una temperatura $<$ de 40°C y posteriormente liofilizados. Cada extracto liofilizado fue debidamente rotulado y almacenado a -20°C .

Ensayos antiproliferativos

Líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares de cáncer de mama: MCF-7: (ATCC-HTB-22 (RE+), MCF-7-Hs 578t (ATCC-HTB-126 (RE-) y de carcinoma de próstata: CaP (RA+) (CRL-2505-ATCC-22Rv1), adquiridas a través de American Type Culture Collection (ATCC) en USA.

Materiales y Reactivos

DMEM (Dubelco's modified Eagle Medium Applichem (4,5 g/l D-glucosa, L-glutamina, piruvato sódico, sin rojo fenol), MEN Lonza (Basic minimum essential aminoacids), EMEM (Modifed Eagle's Medium), (RPMI-1640 Lonza; Estreptomicina/Penicilina 10,000/10 mg Sigma, Sulfato de Gentamicina 50 mg/ml Lonza , Suero Fetal Bovino (FBS) Lonza, L-glutamina 200 mM Lonza; insulina porcina 50 mg/vial Sigma; Sulforodamina B (SRB), Tripsina-EDTA 0,25 % Sigma, PBS Lonza, ácido tricloracético, TRIS-HCl Sigma, Adriamicina (Doxorubicina Hidrocloruro) Sigma, Microplatos de 96 pocillos Nunc, pipetas de 5 ml 10 ml, puntas de micropipetas Eppendorf de 20-200 μL , Frascos Flash de 75, 150 ml, crioviales de 3 ml, viales de Eppendorf 1,5 ml, viales de 1,5, 5, 10 y 25 ml.

Preparaciones de muestras

Se disolvieron 3 mg de los extractos crudos en DMSO (dimetilsulfóxido DMSO y/o etanol 0,1 %) para lograr una concentración de solución madre de 1000 $\mu\text{g/ml}$. La solución madre se diluyó para obtener una concentración inicial de 200 $\mu\text{g/ml}$. El control positivo de inhibición utilizado fue la Adriamicina (Sigma), en concentraciones de $1,2 \times 10^{-6}$ M a $3,4 \times 10^{-8}$ M, variable dependiendo de la línea celular utilizada, mientras que las células sin tratar fueron utilizadas sirvieron como control negativo. Estas células mostraron un porcentaje de crecimiento celular de 95 %, 100 %, 112 %, 127 %, 140 % y 154 % en las tres líneas celulares utilizadas en los ensayos.

Ensayo con SRB

Las células viables de cáncer de mama MCF-7 (RE+), MCF-7 (RE-) y CaP (RA+) fueron cultivadas con 50 ml del medio de cultivo específico (DMEM, MEM, EMEM, RPMI-1640) y suplementado con 10 % de Suero Fetal Bovino, 2 mm de L-glutamina, 100 U de penicilina con 50 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina o 50 $\mu\text{g/ml}$ gentamicina e insulina porcina (1×10 M en frascos de 175 ml o en lo frasco de 150 ml por 48, 72 o 96 h

según la línea celular, en atmosfera inerte de CO₂ y 95 % de humedad relativa, en un incubador a 37°C ± 2°C. Las células fueron subcultivadas semanalmente y fijadas con mezcla de Tripsina 0,05 %-EDTA 0,25 % para almacenar una solución madre de las mismas. La línea celular MCF-7 (RE+) fue subcultivada en DMEM, MCF-7 (RE-) en MEM o EMEM y CaP (RA+) en RPMI-1640, y 10 % de Suero Fetal Bovino (FBS). Las células fueron incubadas por 24 a 48 h y observadas en un microscopio invertido y contadas en un Western blot hasta una cantidad de 10,000 a 15,000 células/ml.

Las células fueron revisadas diariamente y contadas hasta obtener un crecimiento óptimo y exponencial entre 5×10^3 a 5×10^5 (10 % de confluencia), para inocularlas en los microplatos de 96 pocillos para realizar el ensayo de proliferación celular. Transcurrido un período de dos a tres días, 100 µL del medio de cultivo fueron reemplazados por igual cantidad de medio fresco que contenía los extractos crudos o compuestos a evaluar. El ensayo fue detenido después de 2 a 3 días por remoción del medio de los pocillos, las células fijadas utilizando 1 % de ácido tricloroacético a una temperatura de 4°C y luego lavadas varias veces con PBS y secadas y luego solubilizados con 10 mM de TRIS (pH 10,5) en un agitador de microplatos por 20 min y teñido con sulforodamida B. Se midió la densidad óptica (O.D) a 492 nm usando un lector ELISA (Bio-Rad modelo 450).

La proliferación celular fue analizada por el ensayo de SBR descrito previamente por Skehan¹³, Monk¹⁴ y modificado por Kim.¹⁵

Se realizaron diluciones seriales a diferentes concentraciones de los extractos activos y compuesto patrón para elaborar una curva dosis-respuesta (Log [] M vs valores de O.D y se calculó el valor de GI₅₀ µg/ml. La determinación de la actividad antiproliferativa definida como GI₅₀ µg/ml: la concentración del extracto que inhibe el 50% del crecimiento celular. Todas las determinaciones se realizaron en triplicados y el promedio fue calculado. Los criterios de selección para la actividad antiproliferativa se basaron según lo establecido por el Instituto Nacional del Cáncer¹³ y modificado por Monks¹⁴. Se consideró un extracto activo, si su GI₅₀ fue <10 µg/ml.

Ensayo con MTT

La línea celular SKBR3 que sobreexpresa el receptor HER-2+ fue sembrada en la placa de microtitulación de 24 pocillos a razón de 20,000 células por pocillo. Las células fueron cultivadas durante 24 a 72 hr a 37 °C, 5 % de CO₂ para permitir la unión de las células a la superficie del pozo. Los extractos fueron preparados en DMSO 0,1 %, luego 1 µl de la solución de muestra fue añadido a los pocillos correspondientes. Cada ensayo se realizó en triplicado. Se incubó por un periodo de 24 a 72 h en una incubadora. Transcurrido ese tiempo se adicionaron a cada pocillo 50 µL de MTT en la placa de microtitulación y se incubó por 1 h para permitir la formación de cristales de formazán y después 500 µl de DMSO fueron agregados y la placa almacenada a temperatura ambiente hasta lograr la disolución de los cristales de formazán. Posteriormente se leyó la placa a 570 nm. Este ensayo fue realizado por el Instituto del Cáncer de Salamanca a cargo de Atanasio Pandiella.

La viabilidad celular (expresada en porcentaje) se calculó de la siguiente manera:

% de viabilidad = $OD \times 100 \text{ células} / OD \text{ control de las células tratadas}$.

Los extractos fueron ensayados en los experimentos de dosis-respuesta como si fueran compuestos individuales. El control negativo (disolvente solo), el control positivo (sustancia citotóxica conocida), y células no tratadas fueron incluidas en cada ensayo que se realizó en triplicado.

El método de ensayo de proliferación celular/supervivencia está basado en la reducción metabólica de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT), por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, resultando en un compuesto de color azul llamado formazán. La funcionalidad mitocondrial de las células tratadas se determinó a continuación. Este método ha sido utilizado extensamente para medir la proliferación celular y la capacidad de supervivencia^{16,17}. Las células vivas restantes son proporcionales a la cantidad de formazán producido.

ESTADÍSTICA

Los valores de GI₅₀ µg/ml obtenidos en el ensayo de SRD B a través de las curvas dosis-respuesta (Log [] M vs valores de O.D y los de % de viabilidad = OD x 100 células / OD control de las células tratadas generado por el bioensayo de MTT, fueron analizados con el programa Microsoft Excel 2003. Se reportan los promedios de tres ensayos.

RESULTADOS

Se han evaluado 160 extractos frente a la línea celular de cáncer de mama y cáncer de próstata mostrando en la tabla 1 aquellas especies con GI₅₀ 200 µg/ml.

Tabla 1. Lista de plantas activas recolectadas y con actividad antiproliferativa < 200 µg/mL

Especie	No de florpan	Lugar de colecta
<i>Pithecellobium dulce</i> (Roxb.) Benth.	7907	Puerto Guararé. Provincia de Los Santos. 28 de junio de 2008. Planta entera fresca.
<i>Machaerium</i> sp.	7872	Las Peñitas de San Carlos. Valle de Antón. Provincia de Coclé. 27 de mayo de 2008. Planta entera fresca.
<i>Pterocarpus officinalis</i> Jacq.	2617	Nombre de Dios, Costa Arriba de Colón. Provincia de Colón. 25 de junio de 1996. Planta entera fresca.
<i>Neptunia pubescens</i> Benth.	7915	Bosque Protector de Arraiján. Provincia de Panamá Oeste 12 de julio de 2008. Planta entera fresca.
<i>Macroptilium lathyroides</i> (L.) Urb.	7914	Bosque Protector de Arraiján. Provincia de Panamá Oeste. 12 de julio de 2008. Planta entera fresca.
<i>Diploptropis purpurea</i> (Rich.) Amshoff.	7951	Aguas Claras. Sierra Llorona, Santa Rita. Provincia de Colón 19 de julio de 2008. Planta entera fresca.
<i>Acosmium panamense</i> (Benth.) Yakovlev.	6277	Parque Nacional Chagres. Sección Cerro Jefe. Provincia de Panamá. 22 de agosto de 2003. Planta entera fresca.
<i>Ormosia coccinea</i> (Aubl.)	2203	Parque Nacional Coiba. Campamento Las

Jacks.		Agujas. Provincia de Veraguas. 4 de septiembre de 1995. Planta entera fresca.
<i>Sesbania herbacea</i> (Mill.) McVaugh	7913	Parque Natural Metroplitano.. Provincia de Panamá 12 de julio de 2008. Planta entera fresca.
<i>Andira inermis</i> (W. Wright) DC.	7911	Pedasí. Provincia de Los Santos. 28 de junio de 2008. Planta entera fresca.
<i>Entadopsis polystachya</i> (L.) Britton.	7909	Las Tablas. Provincia de Los Santos. 28 de junio de 2008. Planta entera fresca.
<i>Machaerium biovulatum</i> Micheli.	7863	Las Peñitas de San Carlos. Valle de Antón. Provincia de Coclé. 27 de mayo de 2008. Planta entera fresca.
<i>Dioclea guianensis</i> Benth.	7921	Bosque Protector de Arraiján. Provincia de Panamá Oeste 12 de julio de 2008. Planta entera fresca.
<i>Desmodium barbatum</i> (L.) Benth.	G406b	Cerro Azul-Cerro Pelón. Parque Soberanía. Provincia de Panamá. 9 de agosto de 1989. Planta entera fresca.
<i>Zygia latifolia</i> (L.) Fawc. & Rendle	7928	La Pintada/Coclecito. Provincia de Coclé 12 de julio de 2008. Planta entera fresca.
<i>Aeschynomene</i> sp.	7939	Playa Achotines. Los Santos. 13 de julio de 2008. Planta entera fresca.
<i>Platymiscium pinnatum</i> (Jacq.) Dugand	7047	Piedras Blancas de la Pintada. Provincia de Coclé. 28 de mayo de 2007. Planta entera fresca.
<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit	7899	Pedasí. Provincia de Los Santos. 28 de junio de 2008. Planta entera fresca.
<i>Pterocarpus officinalis</i> Jacq.	7957	Piña, Costa Abajo de Colón. Provincia de Colón. 20 de julio de 2008. Planta entera fresca.
<i>Macroptilium lathyroides</i> (L.) Urb.	7914	Parque Natural Metropolitano. Provincia de Panamá. 12 de julio de 2008. Planta entera fresca.
<i>Albizia adinocephala</i> (J.D.Sm.) Britt. & Rose	5118	Parque Nacional Altos de Campana. Provincia de Panamá. 24 de abril de 2001. Planta entera fresca.

En la [tabla 2](#) se presentan los valores de inhibición de crecimiento (GI_{50}) en $\mu\text{g/ml}$ en las tres líneas celulares utilizadas.

En la línea celular de cáncer de mama estrógeno dependiente (MCF-7 (RE+)) resultaron 10 plantas con una $GI_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$. De éstas, 7 mostraron una GI_{50} comprendida entre 10 a 90 $\mu\text{g/ml}$ y 3 resultaron los más activos con una GI_{50} entre 1,1 a 5,9 $\mu\text{g/ml}$. Además, se han evaluado estos mismos extractos contra carcinoma de próstata andrógenos dependientes (CaP (RA+)) en el que 12 extractos mostraron una GI_{50} comprendida entre 10 a 47 $\mu\text{g/ml}$ y 5 una GI_{50} entre 1,2 y 9,1 $\mu\text{g/ml}$, según el protocolo modificado por el Instituto Nacional del Cáncer utilizando Sulforodamida (SRB).

Los extractos más activos contra cáncer de mamas estrógeno dependiente son *Neptunia pubescens* (fruto), *Zygia latifolia* (tallo) y *Albizia adinocephala* (corteza) con valores de GI₅₀ 1,1, 1,4 y 5,9 µg/ml, respectivamente, mientras que contra cáncer de próstata los extractos biactivos corresponden a: *Zygia latifolia* (tallo), *Pithecelobium dulce* (hojas), *Acosmium panamense* (tallo), *Macroptilium lathyroides* (rama), *Albizia adinocephala* (corteza) y *Aeschynomene* sp., (raíz), demostrando una actividad contra el cáncer de próstata con una GI₅₀ de 1,2, 3,7, 5,1, 7,0, 7,8 y 9,1 µg/ml, respectivamente.

Tabla 2. Extractos metanólicos activos en ensayo antiproliferativo en las líneas celulares MCF-7 (RE+), MCF-7 (RE-) y CaP (RA+)

Especie	Florpan	Parte	MCF-7 (RE+) GI ₅₀ µg/ml	MCF-7 (RE-) GI ₅₀ µg/ml	CaP (RA+) GI ₅₀ µg/ml
<i>Pithecellobium dulce</i>	7907	hoja	> 100	100	3,7
<i>Machaerium</i> sp.	7872	tallo	77,0	100	27,0
<i>Pterocarpus officinalis</i>	2617	peciolo y raquis	> 100	100	31,0
<i>Neptunia pubescens</i>	7915	fruto	1,4	> 100	38,0
<i>Macroptilium lathyroides</i>	7914	raíz	40,0	100	7,0
<i>Diploptropis purpurea</i>	7951	tallo	> 100	> 100	43,0
<i>Acosmium panamense</i>	6277	tallo	> 100	> 100	5,1
<i>Ormosia coccinea</i> (Aubl.)	2203	raquis de infrutescencia	> 100	> 100	40,0
<i>Sesbania herbacea</i>	7913	raíz	> 100	> 100	34,0
<i>Andira inermis</i>	7911	tallo	13,0	> 100	12,0
<i>Entadopsis polystachya</i>	7909	hoja	> 100	> 100	28,0
<i>Machaerium biovulatum</i>	7863	tallo	69,0	> 100	19,0
<i>Dioclea guianensis</i>	7921	tallo	> 100	> 100	47,0
<i>Desmodium barbatum</i>	G406b	entera	22,0	> 100	7,0
<i>Zygia latifolia</i>	7928	hoja	> 100	100	1,2
<i>Aeschynomene</i> sp.	7939	raíz	60,0	> 100	9,1
<i>Zygia latifolia</i>	7928	tallo	1,1	> 100	11,0
<i>Platymiscium pinnatum</i>	7047	tallo	91,0	> 100	25,0
<i>Albizia adinocephala</i>	5118	corteza	5,9	100	7,8
Adriamicina (Control)			6,20x10 ⁻⁷ M	2,06x10 ⁻⁸ M	1,03x10 ⁻⁷ M

El análisis fitoquímico preliminar (Datos no publicados), llevado a cabo mediante cromatografía de capa fina en cromatoplacas de sílica gel 60 F₂₅₄ Merck y sílica gel RP-18 F₂₅₄ Merck, revelado con FeCl₃/0.5 N HCl y Reactivo NP/PEG nos indicó la presencia de compuestos fenólicos tipos flavonoides que podrían ser los responsables de la actividad antiproliferativa contra el cáncer de mamas y próstata. Están en marcha estudios para aislar y caracterizar estos compuestos por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detectores monocromático UV, Diodo y Espectrometría de Masas.

En la línea celular MCF-7 (RE-), nueve extractos metanólicos mostraron actividad a la concentración 100 µg/ml. Estos corresponden a *Pithecelobium dulce* (hojas), *Machaerium sp.* (tallo), *Pterocarpus Officinalis* (peciolo y raquis), *Macroptilium lathyroides* (raíz), *Zygia latifolia* (hoja), *Leucaena leucocephala* (tallo); *Pterocarpus officinalis* (tallo), *Macroptilium lathyroides* (rama) y *Albizia adinocephala* (corteza). De todos los extractos evaluados solo tres extractos metanólicos presentaron actividad contra las tres líneas celulares cancerosas: *Macroptilium lathyroides* (raíz), *Machaerium sp.* (tallo) y *Albizia adinocephala* (corteza).

De estos, *Albizia adinocephala* (corteza), *Leucaena leucocephala* (tallo); *Macroptilium lathyroides* (rama) y *Pterocarpus officinalis* (tallo) fueron evaluados por el Instituto del Cáncer de Salamanca frente a la línea celular que sobreexpresa el receptor HER-2,^{16,17} resultando *Albizia adinocephala* (corteza), el más activo con una IC₅₀ de 4,8 µg/ml. (tabla 3).

Tabla 3. Extractos metanólicos activos en el ensayo antiproliferativo HER-2

Especie	Parte	Florpan	MCF-7(RE-) GI ₅₀ µg/ml	MCF-7(HER-2) IC ₅₀ µg/ml
<i>Pterocarpus officinalis</i>	tallo	7957	100	25,61
<i>Leucaena leucocephala</i>	tallo	7899	100	16,02
<i>Macroptilium lathyroides</i>	ramas	7914	100	21,95
<i>Albizia adinocephala</i>	corteza	5118	100	4,89
Hercetin (Control)			20,6 nM	10 nM

DISCUSIÓN

En este estudio 20 extractos metanólicos mostraron efecto antiproliferativo de un total de 160 pertenecientes a 58 géneros y 69 especies de la familia *Leguminosae*. Esta familia posee flavonas, isoflavonas y alcaloides como los indican los resultados preliminares de los estudios de cromatografía líquida de alta resolución que se están ejecutando.

Estudios similares en la búsqueda de extractos crudos con actividad antitumoral contra cáncer de mamas (RE+ y HER-2+) se han realizado en plantas como *Pimienta dioica*,¹⁸ *Pueraria mirifica*,¹⁹ hierbas utilizadas en la medicina China²⁰ y actividad inhibidora del receptor de andrógeno (RA+) en el extracto de *Wedelia chinensis*.²¹

Los extractos crudos promisorios para continuar con el aislamiento de los compuestos bioactivos contra cáncer de mamas estrógenos dependiente son *Neptunia pubescens*, *Zygia latifolia* y *Albizia adinocephala* mientras que los activos contra cáncer de próstata fueron *Pithecellobium dulce*, *Acosmium panamense* y *Zygia latifolia*.

Investigaciones fitoquímicas realizadas por otros autores indican que de la corteza de *Pithecellobium dulce* se han aislados flavonoides prenilados²² mientras que de *Ascomium panamensis* corteza se han aislado ácido cafeico y varias pironas,²³ y de *Albizia adinocephala* corteza del tallo y hojas nuestro grupo ha aislado alcaloides tipo espermina²⁴ probablemente los responsables del efecto antiproliferativo en cáncer de mamas (RE+ y HER-2). Cabe destacar que *Zygia latifolia* muestra actividad antiproliferativa tanto contra cáncer de mamas de 1,1 µg/ml mientras que contra el

cáncer de próstata 1,2 µg/ml. Mostrando el efecto antiproliferativo frente a cáncer hormona-dependiente, cuyos mecanismo de acción involucra la interacción del receptor de estrógenos (RE+) y el receptor androgénico (RA+), ambos involucrados en la progresión tanto del cáncer de mamas como el de próstata. Además, *Albizia adinocephala* posee actividad contra cáncer hormona dependiente /independiente similar a reportado por Williams *et al* 2014.

Este es el primer estudio donde se reporta la actividad anticáncer de mamas estrógenos dependientes y cáncer de próstata andrógenos dependientes en plantas de la familia *Leguminosae* de la República de Panamá.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por la Secretaria Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT) a través de los proyectos FID07-008, COL06-24, la Organización de Estados Americanos (OEA) SEDI/AIC/036/06 y el Fondo del Sistema Nacional de Investigación Periodo 2009-2011. DAOA y MPG agradecen al SENACYT por el apoyo a través del Sistema Nacional de Investigadores (SNI).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kew Royal Botanic Gardens [Internet]. 2015. [citado 17 mar 2015] Disponible en: <http://kew.org/>.
2. Singh J, Basu PS. Non-nutritive bioactive compounds in pulses and their impact on human health: an overview. *Food and Nutr. Sci.* 2012;3:1664-72. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2012.312218>.
3. Gulewicz P, Martinez-Villaluenga C, Kasprowicz-Potocka M, Frias J. Non-nutritive compounds in Fabaceae family seeds and the improvement of their nutritional quality by traditional processing: a review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2014;64(2):75-89. DOI: 10.2478/v10222-012-0098-9
4. Correa MD, Galdames C, Stapf M. Catálogo de las plantas vasculares de Panamá. Editorial Novoart; 2004.
5. GLOBOCAN. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. World Health Organization. [citado 20 ene 2015] Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
6. Valverde Z, Ruiloba AM. Indicadores básicos de salud del Ministerio de Salud. Dirección Nacional de Planificación. República de Panamá. [citado 10 feb 2015] Disponible en: http://www.minsa.gob.pa/sites/default/files/publicaciongeneral/ind_basicos_pma_2014
7. May, FEB. Novel drugs that target the estrogen-related receptor alpha: their therapeutic potential in breast cancer. *Cancer Management and Research.* 2014;6:225-52.
8. Bombonati A, Sgroi DC. The molecular pathology of breast cancer progression. *J Pathol.* 2011;223(2):307-17.

9. Dehm SM, Tindall DJ. 2007. Androgen receptor structural and functional elements: role and regulation in prostate cancer. *Mol. Endocrinol.* 2007;21:2855-63.
10. Gelmann EP. Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol.* 2002;20:3001-35.
11. Zhu ML, Kyprianou N. Androgen receptor and growth factor signaling crosstalk in prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer.* 2008;15:841-49.
12. Hara T, Miyazaki H, Lee A, Tran CP, Reiter RE. Androgen receptor and invasion in prostate cancer. *Cancer Res.* 2008;68:1128-35.
13. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl.Cancer Inst.* 1990;4:1107-12.
14. Monks A, Scudiero A, Johnson GS, Pauli KD, Sausville EA. The NCI anti-cancer drug screen: a smart screen to identify effectors of novel targets. *Anticancer Drug Des.* 1997;12:533-41.
15. Kim HS, Han SY, Yoo SD, Lee BM, Park KL. Potential estrogenic effects of bisphenol-A estimated by *in vitro* and *in vivo* combination assay. *J Toxicol Sci.* 2001;26(3):111-18.
16. Esparís-Ogando A, Díaz-Rodríguez E, Montero JC, Yuste L, Crespo P, Pandiella A. Erk5 participates in neuregulin signal transduction and is constitutively active in breast cancer cells overexpressing ErbB2. *Mol. Cell. Biol.* 2002;22:270-85.
17. Yuste L, Montero JC, Esparís-Ogando A, Pandiella A. Activation of ErbB2 by Overexpression or by transmembrane neuregulin results in differential signaling and sensitivity to herceptin. *Cancer Res.* 2005;65:6801-10.
18. Williams R, Patel U, Doyle BJ, Locklear TD, Perez AL, Mahady GB. Antiestrogenic and anti-HER2 activities of allspice (*Pimenta dioica* L., Myrtaceae) extracts in MCF-7 and SK-BR3 breast cancer cells. DOI: 10.1055/s-0034-1382723. American Society of Pharmacognosy. Annual Meeting - Held in conjunction with the 14th Annual Oxford International Conference on the Science of Botanicals. April, 2014.
19. Chiu J-H, Chang C-J, Wu J-C, Liu H-J, Wen C-S, Hsu C-H, et al. Screening to identify commonly used Chinese herbs that affect ERBB2 and ESR1 gene expression using the human breast cancer MCF-7 cell line. Evidence-based complementary and alternative medicine. 2014; Article ID 965486, 11 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/965486>.
20. Cherdshewasart W, Traisup V, Picha P. Determination of the estrogenic activity of wild phytoestrogen-rich *Pueraria mirifica* by MCF-7 proliferation assay. *J Reprod Dev* 2008;54(1):63-67.
21. Tsai C-H, Lin F-M, Yang Y-C, Lee M-T, Cha T-L, Wu G-J, et al. Herbal extract of *Wedelia chinensis* attenuates androgen receptor activity and orthotopic growth of prostate cancer in nude mice. *Clin. Cancer Res.* 2009;15(17):5435-44.

22. Shankar K D, S. Kirti L. Prenylated flavonoids from bark of *Pithecellobium dulce*. J. Nat. Products. 2014;4(1):43-6.
23. Wiedenfeld H, Andrade-Cetto A. Pyrone glycosides from *Acosmium panamense* (Benth.) Yacolev. Z. Naturforsch. 2003;58c:637-39.
24. Ovenden SPB, Cao S, Leong C, Flotow H, Gupta MP, Buss AD, Butler MS. Spermine alkaloids from *Albizia adinocephala* with activity against *Plasmodium falciparum* plasmepsin II. Phytochemistry 2002;60:175-77.

Recibido: 19 de mayo de 2015.

Aprobado: 17 de febrero de 2016.

Mahabir Prashad Gupta: Centro de Investigaciones Farmacognósticas de la Flora Panameña, Facultad de Farmacia, Universidad de Panamá. Ciudad de Panamá. Correo electrónico: mahabirpgupta@gmail.com.