

Efecto citotóxico de *Annona muricata* (guanabana) en cultivo de líneas celulares de adenocarcinoma gástrico y pulmonar.

Annona muricata (guanabana) citotoxic effect in lung and abdominal neoplasms cell lines

Angel Quispe⁽¹⁾, David Zavala⁽¹⁾, Margarita Posso⁽¹⁾, José Rojas⁽¹⁾, Abraham Vaisberg⁽²⁾
Sociedad Científica de San Fernando. Lima, Perú.

RESUMEN

Objetivo: Determinar la actividad antitumoral del extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* "in vitro" en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón y gástrico. **Diseño:** Estudio experimental. **Lugar:** Laboratorio de Investigación del Departamento de Farmacología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. **Materiales:** Líneas celulares tumorales C- 678 y H-460. **Intervenciones:** Se enfrentó el extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* en cultivos "in vitro" de líneas celulares tumorales y se comparó su actividad con el fármaco 5 Fluoruracilo. Se utilizó como control a las células VERO. **Principales medidas de resultados:** Actividad citotóxica de *Annona muricata* en líneas celulares C- 678, H-460 y VERO. **Resultados:** Se halló el porcentaje de crecimiento celular para cada dilución en cada línea celular comparando el número de células antes y después de la aplicación del extracto y del fármaco, obteniéndose la concentración inhibitoria de crecimiento medio (GI50) para cada línea celular encontrándose para H460, C678 y VERO con extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* menos de 0.00022, y con 5 Fluoruracilo 0.003, 0.0013 y 0.0043 mg/ml respectivamente. **Conclusiones:** El extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* mostró tener efecto citotóxico sobre las líneas tumorales C678 y H460. Las concentraciones de extracto etanólico utilizadas parecen ser más citotóxicas que las concentraciones homólogas de 5 Fluoruracilo.

Palabras Clave: *Annona muricata*, citotoxicidad inmunológica, neoplasias pulmonares, neoplasias abdominales.

ABSTRACT

Objective: To determine the antitumoral "in vitro" activity of the ethanolic extract *Annona muricata* leaves in H460 and C678 cellular lines. **Design:** experimental study. **Setting:** Laboratory of the San Marcos University Pharmacology Department and Sciences and Philosophy Faculty of Cayetano Heredia University. **Materials:** Tumor cell lines C-678 and H-460. **Interventions:** The ethanolic extract of *Annona muricata* leaves was faced in "in vitro" cultures of tumor cell lines and their activity was compared with 5 Fluoruracilo (5FU). Culture of VERO cells was used as control. **Main outcome measures:** *Annona muricata* cytotoxic activity in C-678 and H-460 cell lines. **Results:** We found the percentage of cellular growth for every dilution in every cellular line comparing the number of cells before and after the application of the extract and the drug. The inhibiting concentration of average growth for each cellular line from

ethanolic extract of *Annona muricata* leaves was less than 0, 00022. However, the inhibiting concentration with 5 FU was 0,003, 0.0013 and 0, 0043 mg/ml for H460, C678 and VERO cells, respectively. **Conclusions:** The ethanolic extract of *Annona muricata* leaves showed cytotoxic effect in C-678 and H-460 tumoral cell lines. The ethanolic extract concentrations used seem to be more cytotoxic than 5FU.

Keywords: *Annona muricata*, cell cytotoxicity, lung neoplasms, abdominal neoplasms.

INTRODUCCIÓN

La *Annona muricata*, también conocida en nuestro medio como "guanábana" es un pequeño árbol perteneciente a la familia Annonaceae, género *Annona*⁽¹⁾. Varios estudios informan la presencia de acetogeninas citotóxicas en las hojas de *Annona muricata*⁽²⁾.

La investigación en estos compuestos ha tenido una gran expansión debido a sus diversas actividades biológicas, incluida la antitumoral "in vitro" citotóxica⁽³⁻¹³⁾; estas actividades son explicadas por la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial⁽¹⁴⁾.

No encontramos estudios previos que evalúen la actividad antitumoral de la *Annona muricata* en células de adenocar-

1 Estudiantes de Medicina Humana de la Facultad de Medicina de San Fernando. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

2 Facultad de Ciencias, Unidad de investigación de la Facultad de Ciencias, Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú.

Correspondencia: Ángel Pelayo Quispe Mauricio.

Correo-e: 0110857@unmsm.edu.pe

- Manuscrito recibido el 15 mayo de 2007 y aceptado para publicación el 20 de julio de 2007.

cinoma gástrico (C-678) ni en adenocarcinoma pulmonar (H-460), en consecuencia este ensayo busca encontrar dicha actividad y la concentración ideal a la cual es efectiva contra dichas células neoplásicas, con un margen de protección para células no neoplásicas (VERO).

MATERIAL Y METODO

Es un estudio experimental realizado en el laboratorio de Investigación y Desarrollo de la Facultad de Ciencias y Filosofía, de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y el laboratorio de Investigación del Departamento de Farmacología, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

La unidad de investigación fue cada célula perteneciente al cultivo de células VERO, de la línea celular C-678 (Adenocarcinoma gástrico de ratón), y de la línea celular H 460 (Adenocarcinoma pulmonar de humano). El material biológico utilizado fueron las hojas frescas de *Annona muricata*, las líneas celulares tumorales fueron proporcionadas por el Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la UPCH.

Para la preparación de los extractos, se desecó 500 mg. de hojas de *Annona muricata* "guanábana" a 40°C por 3 días en cámara de desecación y posteriormente pulverizadas con un molino eléctrico, luego se procedió a la extracción con etanol al 95%, obteniéndose así el extracto etanólico para realizar el bioensayo.

La línea celular C-678 fue cultivada en RPMI 1640, suplementado con: 7.5 % suero fetal bovino y 50 ug/ml de gentamicina; conservado a una temperatura de 37 °C, en un ambiente húmedo con 95% aire y 5% CO₂. Por otro lado las líneas celulares H460 y VERO fueron cultivadas y mantenidas en crecimiento logarítmico en el medio de cultivo MEM, en las mismas condiciones.

Se realizó un primer conteo de una muestra de cada línea celular usando un hemocitómetro y luego hacer las diluciones necesarias y obtener una población celular similar en cada pozo (Tabla 1).

Para el ensayo de la actividad antitumoral se utilizó una placa control (placa 0) con 8 pozos para cada línea celular; y además una placa experimental (placa 1) con 24 pozos para cada línea celular de los cuales 8 fueron para 5 fluoruracilo, 8 para extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* y 8 para control.

Ambas placas fueron incubadas por un periodo de 24 horas a 37 °C, en una atmósfera húmeda conteniendo 95% de aire y 5% de CO₂. La placa 0 fue sometida a conteo celular concluido el tiempo de incubación. A la placa 1 se agregaron

las distintas diluciones de extracto (40ul/pozo) y fueron incubadas por 48h horas adicionales. Al término de las 48h, se cuantificó el crecimiento de las células con el método del bioensayo de citotoxicidad con Sulforodamina B (SRB).

Para el extracto etanólico se mezcló 20mg de extracto etanólico más 100uL de etanol al 100%. Una hora después fue centrifugado a 12000 RPM por 10 minutos. El sobrenadante fue el stock de 20mg/100uL. Se diluyó el extracto mezclando 8,5uL de stock (20mg/100uL) con 680uL de medio; asimismo para las siguientes diluciones (1:3) se mezcló 150uL de la anterior con 300uL de medio. Finalmente cada pozo recibió 40uL de la dilución, siendo la concentración inicial en las placas de 0,5mg/mL.

Para el 5 Fluoruracilo la concentración inicial fue de 0,125mg/mL y luego se hicieron diluciones sucesivas de 1:3. Finalmente la placa 1 fue incubada por un periodo de 48 horas, terminado éste, se procedió a la lectura de los resultados.

La citotoxicidad del extracto etanólico de las hojas de *Annona muricata* fue evaluada en 3 diferentes líneas celulares (VERO, C678 y H460). Para evaluar dicha actividad se empleó el estudio de citotoxicidad de la Sulforodamina B (SRB). Las líneas celulares fueron inoculadas en dos placas para cultivo de células de 96 pozos. En cada pozo se colocaron 160 ul de medio de cultivo conteniendo las líneas celulares. Las placas fueron incubadas a 37° C en una atmósfera húmeda de 5 % de CO₂ y 95% de aire por 24 h. La primera placa fue tratada a las 24 h con ácido tricloroacético (TCA) con el fin de fijar las células en tiempo cero y poder cuantificar la cantidad de células antes de agregar los extractos. La segunda placa (placa 1) recibió las diluciones del extracto o solvente como se muestra en la tabla 2. Esta placa fue incubada por segunda vez a 37° C en una atmósfera húmeda de 5 % de CO₂ y 95% de aire por 48 horas.

Concluidas las 48 horas a cada pozo se le adicionó TCA frío y luego se incubó a 4° C por 1 hora. Se lavó cinco veces con agua con el objetivo de eliminar el TCA y luego se secó con una cámara de flujo de aire.

Posteriormente se agregó Sulforodamina B (SRB) al 0,4% diluido en 1% de ácido acético y se dejó en tinción por 20 minutos. Concluido el tiempo de tinción fueron lavados 4 veces con ácido acético al 1% y luego secados en cámara de flujo de aire.

Después del secado de las placas, el colorante unido fue solubilizado con 10mM de Tris base (pH 10.5). Finalmente la absorbancia leída sobre un lector de placa automatizada en una longitud de onda de 550nm. El valor de GI50 fue definido como la concentración de muestra de prueba que causó una reducción del 50 % de la absorbancia.

Para hallar el GI50 de cada sustancia citotóxica se utilizó el análisis de correlación lineal. Para todos los análisis se utilizó Excel 2003.

RESULTADOS

Para obtener el número de células de cada pozo se recurrió a diferentes métodos ya señalados, los resultados fueron tomados en densidades ópticas (indicador indirecto del número

Tabla 1. Número de células por cada pozo

PLACA 0*	Control tiempo 0 (al momento de agregar el extracto)
PLACA 1*	VERO: 3,000 cel/pozo (178,125 cell/9,5 ml) H460 : 1,500 cel/ pozo (89,062 cell/9,5 ml) C-678 : 3,500 cel/ pozo (207,812 cell/9,5 ml)
* Se plaquearon 160 ul / pozo	

Tabla 2. Porcentaje de crecimiento celular por cada dilución

Dilución en mg / mL	VERO		H460		C678	
	5FU	Extracto	5FU	Extracto	5FU	Extracto
0.5000	12.4	-10.1	-2.5	-6.7	-12.4	-19.8
0.1670	14.2	-10.5	0.0	-10.3	-9.9	-18.4
0.0560	15.4	38.6	7.3	24.0	-3.4	50.8
0.0190	15.1	36.7	12.7	35.1	-2.6	51.9
0.0060	26.2	34.1	25.8	36.5	6.4	49.6
0.0020	41.5	25.8	33.4	33.9	16.5	49.2
0.0010	97.4	42.9	60.2	38.1	40.2	38.5
0.0002	99.7	40.6	102.1	37.7	71.9	44.9

ro), tanto del “tiempo 0” como al cabo de de las 48 horas; con los cuales se obtuvo un porcentaje de crecimiento para cada línea celular (Tabla 2)

Con los porcentajes de crecimiento celular se determinó la GI50. No existe una correlación lineal entre las diluciones y el porcentaje de crecimiento, debido a esto tomaremos los 2 puntos correspondientes a las diluciones más cercanas al GI50 para la construcción de una nueva recta para determinar una GI50 más aproximado (este artificio es válido solo cuando se trabaja con extractos, debido a que contiene un gamma de compuestos químicos diferentes; además para fines del trabajo basta con obtener un GI50 aproximado para determinar si el extracto es interesante o no para su posterior análisis).

Tomando en cuenta estas salvedades se obtuvo los siguientes GI50 para cada línea celular. (Tabla 3). Se pudo determinar un aproximado de la GI50 para el extracto etanólico de hojas de *Annona muricata*, ya que ésta se encontraba a diluciones menores que las previstas para el presente trabajo (en las 3 líneas la GI50 está por debajo de 0.00022 mg/ml de concentración del extracto). Para el control positivo, el 5Flúoruracilo, se determinó la GI50 con las diluciones previstas en el diseño del presente trabajo.

Tabla 3. Concentración Inhibitoria de Crecimiento Medio para cada línea celular

	5 FU	Extracto
VERO	0.00043	<0.00022
H460	0.00030	<0.00022
C678	0.00013	<0.00022

DISCUSIÓN

Al comparar los resultados para todas las líneas celulares el GI50 del extracto etanólico se encontró a una concentración menor comparada con el GI50 del 5 FU, lo que demuestra que la concentración utilizada de extracto tiene mayor citotoxicidad. Para las líneas celulares H460 y C678 las diluciones mayores del extracto etanólico produjeron muerte celular mientras que sólo la dilución mayor de 5FU mostró el mismo comportamiento (Gráfico 1).

La línea celular C678 mostró un comportamiento diferente frente al extracto porque no se encontró una relación directa entre concentración y citotoxicidad dicho hallazgo podría deberse a características intrínsecas del extracto que le otorgan la misma actividad citotóxica a diluciones diferentes o quizá a la existencia de dos o más poblaciones celulares con diferentes respuestas frente a la exposición al extracto. Sin embargo nuestra comparación con el 5FU indicaría que la posibilidad se acerca más al primer postulado que a la coexistencia de dos o más poblaciones celulares. Existen estudios realizados con acetogeninas (compuestos puros) de *Annona muricata* que demostraron actividad antitumoral, sus resultados muestran una actividad directa sobre el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial inhibiendo de esta manera la proliferación celular tumoral.⁽¹⁵⁾

La posible actividad antitumoral de *Annona muricata* se debe a un compuesto activo que posee ésta, probablemente se trate de una acetogenina aunque no se puede descartar la presencia de un nuevo compuesto, dicho compuesto no fue identificado en éste trabajo; pues la naturaleza del mismo no lo permite, por eso, se recomienda un posterior estudio en el que se realice la purificación e identificación del compuesto activo específico que posee esta actividad.

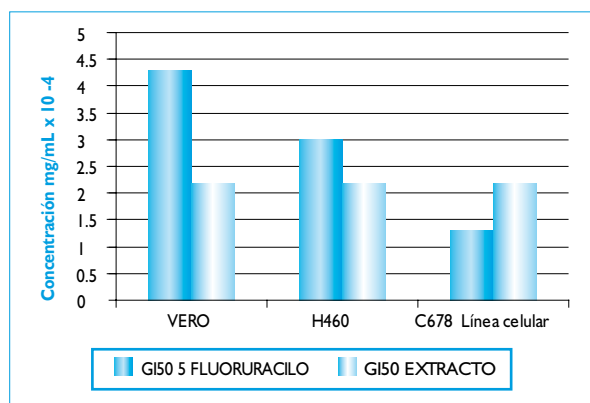
Así también, se recomienda probar la actividad antitumoral de extracto etanólico de *Annona muricata* “in vivo” en animales de de experimentación.

Se concluye que el extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* mostró tener efecto citotóxico sobre las líneas tumorales C678 y H460; las concentraciones de extracto etanólico utilizadas son más citotóxicas que las concentraciones homólogas de 5FU, y para la línea VERO la actividad citotóxica de extracto etanólico es superior a la actividad del homólogo de 5FU.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Arroyo Acevedo del departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por prestar ambientes y asesoría para la preparación del extracto etanólico de hojas de *Annona muricata*.

Gráfico 1: Concentración Inhibitoria de Crecimiento Medio



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Lock O, Rojas R. Química y Farmacología de *Annona Muricata* Linn. *Revista de Química* 2003; 8(2):23-8.
2. Kim G, Zeng L, Alali F, Rogers L, Wu F et al. Muricoreacin and murihexocin C, mono-tetrahydrofuran acetogenins, from the leaves of *Annona muricata*. *Phytochemistry* 1998; 49(2):565-71.
3. Hopp D, Zeng L, Gu Z, Kozlowski J, McLaughlin J. Novel mono-tetrahydrofuran ring acetogenins, from the bark of *Annona squamosa*, showing cytotoxic selectivities for the human pancreatic carcinoma cell line, PACA-2. *J Nat Prod* 1997, 60(6):581-6.
4. Hopp D, Zeng L, Gu Z, McLaughlin J. Squamotacin: an annonaceous acetogenin with cytotoxic selectivity for the human prostate tumor cell line (PC-3). *J Nat Prod*. 1996, 59(2):97-9.
5. Kim G, Zeng L, Alali F, Rogers L, Wu F et al. Muricoreacin and murihexocin C, mono-tetrahydrofuran acetogenins, from the leaves of *Annona muricata*. *Phytochemistry* 1998, 49(2):565-71.
6. Wu F, Zeng L, Gu Z, Zhao G, Zhang Y et al. New bioactive monotetrahydrofuran Annonaceous acetogenins, annomuricin C and muricatocin C, from the leaves of *Annona muricata*. *J Nat. Prod* 1995, 58(6):909-15.
7. Wu F, Zhao G, Zeng L, Zhang Y, Schwedler J, et al. Additional bioactive acetogenins, annomutacin and (2,4-trans and cis)-10R-annonacin-A-ones, from the leaves of *Annona muricata*. *J Nat Prod* 1995, 58(9):1430-7.
8. Wu F, Zeng L, Gu Z, Zhao G, Zhang Y et al. Muricatocins A and B, two new bioactive monotetrahydrofuran Annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona muricata*. *J Nat Prod* 1995, 58(6): 902-8.
9. Geum-Soog K, Lu Z, Feras A, Lingling L, Feng-E, Wu Z, et al. Two New Mono-Tetrahydrofuran Ring Acetogenins, Annomuricin E and Muricapentocin, from the Leaves of *Annona muricata*. *J Nat Prod* 1998, 61(4):432-6.
10. Saw H, Diego C, Laurens A, Hocquemiller R, Lebuf M, et al. Solamin, a cytotoxic mono-tetrahydrofuranic -lactone acetogenin from *Annona muricata* seeds. *Phytochemistry* 1991, 30(10):3335-8.
11. Fang-Rong Ch, Yang-Chang W. Novel Cytotoxic Annonaceous Acetogenins from *Annona muricata*. *J Nat Prod* 2001, 64 (7):925-31.
12. Fang-Rong Ch., Chih-Chuang L., Chih-Yuan L., Chi-Jung Ch., Hui-Fen Ch. et al. New Adjacent Bis-Tetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from *Annona muricata*. *Plant Med* 2003; 69:241-6.
13. Chih-Chuang L., Fang-Rong Ch., Chih-Yuan Lin, Chi-Jung Ch., Hui-Fen Ch. et al. New Cytotoxic Monotetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from *Annona muricata*. *J. Nat. Prod* 2002, 65(4):470-5.
14. Tormo J, González C, Cortes D, Estornell E. Kinetic Characterization of Mitochondrial Complex I Inhibitors Using Annonaceous Acetogenins *Arch Biochem Biophys* 1999; 369 (1):119-26.