

ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS CANCEROSAS CON *ANNONA MURICATA*

Castañeda Romero Abigail¹, Flores Villavicencio Lérida Liss², Castruita Domínguez José Pedro³,
Sabanero López Myrna², Carrillo Landell Felipe Guadalupe¹, Sánchez Ramos Sanjuana¹

¹ [Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | Dirección de correo electrónico: [fecarrillo@itesi.edu.mx; sansanchez@itesi.edu.mx]

² [Licenciatura en biología experimental, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [leri_oo@hotmail.com; myrna.sabanero@gmail.com]

³ [Universidad de Guadalajara] | Dirección de correo electrónico: [casdompe@hotmail.com]

Resumen

Annona muricata es el árbol conocido comúnmente como guanábana, perteneciente a la familia Annonaceae del género *Annona*. Debido a la gran producción de metabolitos que presenta, se le han atribuido propiedades de interés farmacéutico y existen estudios realizados con extractos de hoja, donde se presenta un efecto citotóxico selectivo en células cancerosas. En esta investigación se evaluó la inhibición del crecimiento de células cancerosas humanas (HeLa, CCL-2, adenocarcinoma de cérvix) expuestas a diferentes concentraciones (0.048-25mg/mL) de hoja de *Annona muricata* en suspensión. Se evaluó la actividad metabólica mitocondrial y la viabilidad celular mediante un ensayo de XTT y el método de azul de tripano respectivamente. Además se realizó un patrón de proteínas totales y el análisis estructural del núcleo y citoesqueleto, mediante técnicas de tinción fluorescente. **Los resultados indican una DL₅₀ de 0.17 mg/mL de *A. muricata*, así también, se observó que empleando concentraciones de 25 mg/mL de *A. muricata* se altera el patrón de proteínas totales y estructuralmente el núcleo se condensa y fragmenta, además se observó la despolimerización de los microfilamentos de actina. *Annona muricata* presenta un efecto citotóxico en células cancerosas que es dependiente de la concentración.**

Abstract

Annona muricata is the tree commonly known as soursop, it belonging to the genus *Annona* and Annonaceae family. Due to the large production of metabolites that it presents, it have been attributed properties of pharmaceutical interest. Exist studies of leaf extracts, where a selective cytotoxic effect on cancer cells is presented. In this study the inhibition of growth of human cancer cells (HeLa CCL-2, cervix adenocarcinoma) exposed to different concentrations (0.048-25mg / mL) of sheet *Annona muricata* on suspension was evaluated. Mitochondrial metabolic activity and cell viability was evaluated by XTT assay and trypan blue method respectively. Moreover a pattern of total proteins and a structural analysis of the nucleus and cytoskeleton by fluorescent staining techniques were performed. **The results indicate an LD₅₀ of 0.17 mg / mL of *A. muricata*, well, it was observed that using concentrations of 25 mg / mL of *A. muricata* the total protein pattern is altered. Structurally the core condenses and fragments, further it observed the depolymerization of actin microfilaments. *Annona muricata* has a cytotoxic effect on cancer cells that it is dependent concentration.**

Palabras Clave

Citotoxicidad; Plantas medicinales; Cultivo celular

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad neoplásica generada por una alteración celular seguida por la proliferación de células anormales que se propagan de forma invasiva por los tejidos, siendo susceptible cualquier parte del cuerpo; es por esto que existen más de 100 tipos de cáncer. Uno de los principales problemas de salud a nivel mundial es el cáncer cervicouterino, al ser considerado como la segunda causa de mortalidad por cáncer en mujeres, generando alrededor de 231,000 muertes por año [1] Actualmente existen diversos tratamientos y se han desarrollado fármacos con potencial contra la proliferación de células cancerosas, cuyo principio activo se basa, en su mayoría, en el mayor potencial de replicación de la célula cancerosa en comparación con las células sanas, por lo que también ocasionan la muerte de las células no cancerosas [2] Por esto, el tratamiento ideal en contra del cáncer, sería desde una perspectiva farmacológica, aquel que ataque únicamente a las células cancerosas para disminuir los efectos secundarios provocados por la muerte de células sanas aumentando así la eficacia del mismo [3] Debido a la complejidad de conseguir un tratamiento efectivo contra el cáncer, se tiene la necesidad de seguir buscando alternativas como son las plantas medicinales que puedan presentar actividad citotóxica o antitumoral para la identificación de sustancias activas [4]. Una planta medicinal, de acuerdo a la OMS, es cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos [5] *Annona muricata* es un árbol perteneciente a la familia Annonaceae del género *Annona*, conocido comúnmente como guanábana. Distintas partes de este árbol como son el tallo, hojas y semillas han sido usadas históricamente en medicina tradicional por sus propiedades antitumorales, antiparasitarias, antidiarreicas, bactericidas, entre otras [6]. Existen estudios realizados con extractos obtenidos de la hoja de *A. muricata* que presentan un efecto citotóxico en líneas celulares de hepatoma humano, de adenocarcinoma prostático y carcinoma pancreático así como de cáncer de pulmón y glándula mamaria [7]. Sin embargo, no se ha reportado el efecto de la hoja pulverizada en células cancerosas, y considerando que actualmente ésta

es comercializada por empresas naturistas como tratamiento para personas con cáncer, se considera relevante conocer el efecto que se presenta de esta forma.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material de estudio

Las hoja de *Annona muricata* con la que se trabajó es de procedencia peruana y fue proporcionada por la empresa Natural Health, S.A. de C.V. pulverizada y estéril, a partir de ésta se realizó una suspensión de 100 mg/mL de medio DMEM adicionado con 10% de suero fetal bovino (SFB).

Cultivo celular

En este estudio se usaron células humanas de adenocarcinoma de cérvix de la línea celular HeLa. Fueron cultivadas con medio DMEM suplementado con 10% de SFB y se incubaron con 5% de CO₂ a 37°C.

Evaluación de citotoxicidad

La citotoxicidad se evaluó con dos métodos diferentes, el método de exclusión con azul de tripano y el ensayo con el XTT que se basa en la degradación de la sal sódica [2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil)-2Htetrazolio-5-carboxianilida] (XTT) por deshidrogenasas mitocondriales, lo cual puede ser monitoreado espectrofotométricamente [8] . Se utilizó como control cultivo celular de HeLa con concentración 0 de *A. muricata*.

Ensayo de XTT

Se trabajó con cultivos confluentes de HeLa sembrados en placa de 96 pozos de fondo plano, expuestos a *Annona muricata* en suspensión a concentraciones de .048 a 100 mg/mL que se aplicaron mediante dilución seriada durante 24 horas. Se aplicó la técnica de XTT [8] y la lectura en espectrofotómetro a 490nm. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Método de exclusión con azul de tripano

Se sembraron 2.5×10^4 células/mL en placa de 12 pozos de fondo plano en volumen final de 2 mL y se expusieron a *Annona muricata* en concentraciones de 0.048, 3.125 y 25 mg/mL durante 24 horas. Posterior al tiempo de incubación, se obtuvo una

suspensión celular total de cada pozo en tubos eppendorf, a los cuáles se les aplicó 200µL de azul de tripano. Se realizó un conteo de células viables en cámara de Neubauer.

Tinción nuclear y de microfilamentos

Las células HeLa cultivadas sobre cubreobjetos de 22x22mm se expusieron a *Annona muricata* a concentraciones de 0.048 y 25 mg/mL por 24 horas. Posterior a esto se realizó tinción con DAPI y Faloidina-FITC para observar el núcleo y microfilamentos mediante microscopia de epifluorescencia.

Patrón de proteínas totales

Se sembraron células HeLa en placa de 6 pozos con fondo plano y se expusieron a concentraciones de 0.048 y 25 mg/mL de *Annona muricata* durante 24 horas. Posterior a esto se obtuvo el raspado celular para la determinación de proteínas totales por el método de Lowry [9].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el 2013 fue reportado [10] que los extractos de hoja de *Annona muricata* obtenidos con cloroformo presentaban un efecto citotóxico en células HeLa. Los resultados obtenidos en el ensayo de XTT indican que la hoja de *Annona muricata* presenta un efecto citotóxico en la línea celular empleada. Los resultados mostrados en la figura 1 fueron analizados estadísticamente por la prueba de Tukey Kramer con una $p \leq 0.05$, $n=12$ donde se observa una disminución de la actividad metabólica en función de la concentración aplicada de *A. muricata*. En base a esto y por interpolación se obtuvo una DL₅₀ de 0.17 mg/mL.

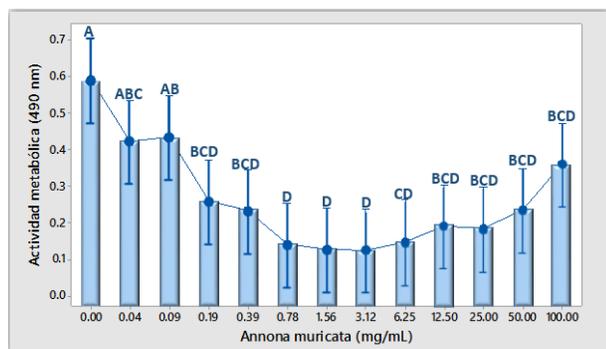


Figura 1: Actividad metabólica de células HeLa en función de la concentración de *A. muricata* a la que se expusieron. A, B, C y D corresponden a la agrupación de las medias asignada a cada tratamiento por la prueba de Tukey Kramer, donde las medias que no comparten letra son significativamente diferentes.

Se ha encontrado que metabolitos presentes en la hoja de *A. muricata* como las acetogeninas, son responsables de la actividad citotóxica en células cancerosas disminuyendo los porcentajes de crecimiento celular [11]. En base a la técnica de exclusión con azul de tripano se obtuvo la relación de células viables de cultivos celulares expuestos a distintas concentraciones de *A. muricata*, donde se observa una significativa disminución del número de células viables dependiente de la concentración de *A. muricata* a la que fueron expuestas, lo cual se muestra en la Figura 2.

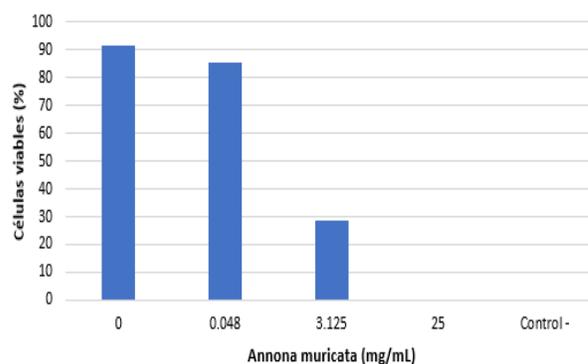


Figura 2: Porcentaje de células viables de cultivos celulares expuestos a distintas concentraciones de *A. muricata*. El control negativo corresponde a cultivo celular tratado con peróxido al 3 %

Se han realizado estudios con extractos de hoja de *Annona muricata* que sugieren que éstos inducen a las células cancerosas a apoptosis, como se presenta en el estudio realizado por Santosh et al. 2014 [12]. De las características físicas de la apoptosis se encuentra la condensación y fragmentación del núcleo, características que se observaron en las células HeLa expuestas a *A. muricata* en concentración de 25mg/mL, como su muestra en la Figura 3.

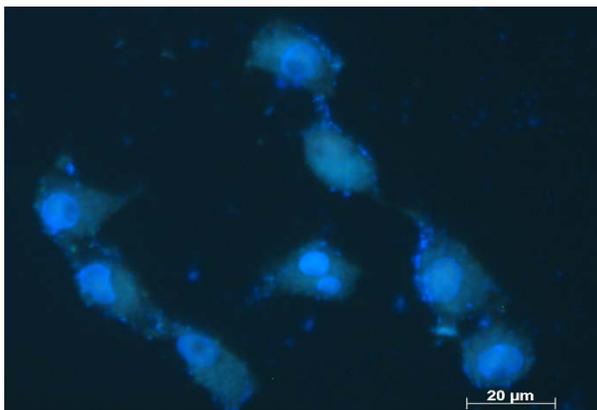


Figura 3: Núcleos de células HeLa expuestas a *A.muricata* en concentración de 25 mg/mL.

Respecto al análisis estructural también se observó la despolimerización de los microfilamentos de actina Figura 3 por lo que se pierde la morfología característica de HeLa, así como la capacidad de las células de adherirse al sustrato.

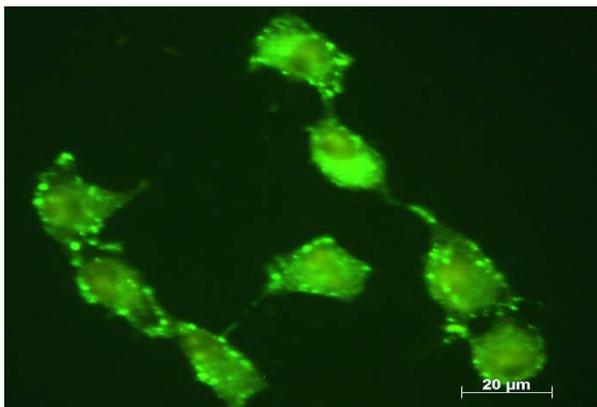


Figura 4: Células HeLa expuestas a *A.muricata* en concentración de 25 mg/mL observadas mediante tinción de epifluorescencia.

Se observó alteración del patrón de proteínas totales. Figura 4 empleando *A.muricata* en concentraciones de 0.48, 3.1 y 25 mg/mL, lo que indica la degradación de proteínas presentes en células HeLa al emplear dichas concentraciones del tratamiento.

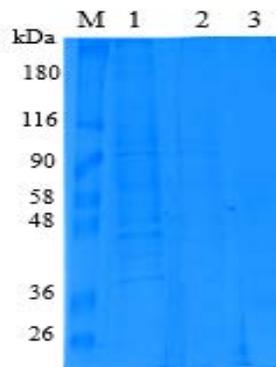


Figura 5: Perfil de proteínas totales de células HeLa expuestas 24h a *Annona muricata* en concentraciones de (1) 0.048, (2) 3.1 y (3) 25 mg/mL.

CONCLUSIONES

En base a los resultados descritos en este estudio, las hojas de *Annona muricata* presentan un efecto citotóxico en células cancerosas que es dependiente de la concentración, para las que se determinó una DL_{50} de 0.17 mg/mL.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece laboratorio de biología celular de la Universidad de Guanajuato por facilitarnos sus instalaciones y equipo para la realización de este proyecto así como a los doctores Myrna Sabanero, Lérica Liss Flores, José Pedro Castruita y Felipe Carrillo por su colaboración en el presente estudio.

REFERENCIAS

- [1] Tovar-Guzmán, V. J., Ortiz-Contreras, F., Jiménez-Gauna, F. R., & Valencia Vázquez, G. (2008). Panorama epidemiológico de la mortalidad por cáncer cervicouterino en México (1980-2004). *Rev Fac Med UNAM*, 51(2), 47-51
- [2] Alberto, J., Loraine, S., & Alberto, M. J. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41, 18-27.
- [3] Arroyo, J., Prashad, M., Vásquez, Y., Li, E., & Tomás, G. (2005). Actividad citotóxica in vitro de la mezcla de *Annona muricata* y *Krameria lappacea* sobre células cancerosas de glándula mamaria, pulmón y sistema nervioso central. *Med Exp Salud Publica*, 22(4), 247-253.

- [4] Loaces, D. L., Rodr, I., & Sardi, G. (2003). Artículo de Revisión. *Medicinal Chemistry*, 8(3).
- [5] Bermúdez, A., Oliveira-Miranda, M. A., & Velázquez, D. (2005). La Investigación Etnobotánica Sobre Plantas Medicinales: Una Revisión De Sus Objetivos Y Enfoques Actuales. *Interciencia*, 30(8), 453-459.
- [6] Solís Fuentes, J. A., Amador Hernández, C., Hernández Medel, M. R., & Durán de Bazúa, C. (2010). Caracterización fisicoquímica y comportamiento térmico del aceite de "almendra" de guanábana (*Annona muricata*, L). *Grasas Y Aceites*, 61(1), 58-66.
- [7] Rodríguez, F. J. M., Pinedo, D. M., & Rodríguez, M. N. (2010). Valoración de la evidencia científica para recomendar *Annona muricata* L. (guanábana) como tratamiento o prevención del cáncer. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 15(3), 169-181.
- [8] Martínez, A., Reyes, I., & Reyes, N. (2007). Citotoxicidad del glifosato en células mononucleares de sangre periférica humana, 50, 594-604.
- [9] Randall, R. J., & Lewis, A. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *The journal of Biological Chemistry*, 265-279.
- [10] Astirin, O. P., Artanti, A. N., Fitriá, M. S., Perwitasari, E. A., & Prayitno, A. (2013). *Annona muricata* Linn Leaf Induce Apoptosis in Cancer Cause Virus, 2013(September), 1244-1250.
- [11] Quispe, A., Zavala, D., Posso, M., & Vaisberg, A. (2006). EFECTO CITOTÓXICO SELECTIVO IN VITRO DE MURICIN H (ACETOGENINA DE *Annona muricata*) EN CULTIVOS CELULARES DE CÁNCER DE PULMÓN. *Medicina Experimentalis*, 23(4), 265-269.
- [12] Anatole, P., Guru Kumar, S., Sylviane Dongmo , M., Moukette Moukette, B., & Fekam Boyoum, F. (2014). Antiproliferative activity and induction od apoptosis by *Annona muricata* (Annonaceae) extract on human cancer cells. *The official journal of the international society for complementary medicine research* , 14-27.