

Artículo Original

Actividad antiproliferativa del extracto metanólico de hojas de *Piper aduncum* sobre células de cáncer gástrico

Antiproliferative activity of the methanolic extract of piper aduncum leaves on gastric cancer cells

Víctor Miranda-García ¹, Pablo Bonilla ¹¹ Universidad Científica del Sur, Laboratorio de Química y Bioquímica de Productos Naturales

Resumen

Piper aduncum, también conocido como “matico” en Perú, es una planta usada como cicatrizante, antidiarreico, antiinflamatorio, anticancerígeno y otros usos tradicionales más¹; de estos efectos, algunos han sido demostrados como el antimicrobiano² y citotóxico. Este último usando fraccionamiento bioguiado, observando el efecto de extractos de hojas con diclorometano sobre células KB (carcinoma nasofaríngeo)³ y del aceite esencial sobre carcinoma pulmonar, adenocarcinomas de colon, adenocarcinoma de mama, melanoma amelanótico, carcinoma de cérvix, carcinomas de próstata, leucemia mieloide crónica y fibroblastos normales de ratón; además de la toxicidad oral en ratones, encontrándose efectos antitumoral y tóxico nulos⁴. En el presente estudio se evaluó la actividad antiproliferativa *in vitro* del extracto metanólico de hojas de *Piper aduncum* sobre la línea celular AGS (adenocarcinoma gástrico) adquiridas de la ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures), usando una técnica colorimétrica con el indicador resazurina, evaluando los resultados a las 24 y 48 horas de haber expuesto el extracto metanólico a diferentes concentraciones: 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31, 15, y 7 ppm con las células de cáncer. Para analizar los resultados se usó el porcentaje de diferencia de reducción entre células tratadas y células control y a partir de estos datos se obtuvo el porcentaje de inhibición del crecimiento. Se obtuvo que el IC₅₀ a las 24 horas fue de 131,5 ppm y a las 48 horas el índice de concentración media fue de 103,3 ppm, pudiendo evidenciar que a las 48 horas el efecto se hace más potente teniendo 100 % de inhibición a partir de 250 ppm de extracto metanólico.

Palabras clave: *Piper aduncum*; actividad antiproliferativa; cáncer gástrico; extracto vegetal.

Abstract

The *Piper aduncum*, also known as “Matico” in Peru, is a plant used as a healing, anti-diarrheal, anti-inflammatory, anti-cancer and other traditional uses plus¹; These effects have been demonstrated as the antimicrobial² and cytotoxic effect, the latter using bioguided fractionation, observing the effect on leaf extracts with dichloromethane on KB cells (nasopharyngeal carcinoma)³ and the essential oil on lung carcinoma, colon adenocarcinomas, adenocarcinoma of breast, amelanotic melanoma, cervical carcinoma, prostate carcinomas, chronic myeloid leukemia and normal mouse fibroblasts; in addition to oral toxicity in mice, finding null and toxic antitumor effect⁴. In the present study, the *in vitro* antiproliferative activity of the methanolic extract of *Piper aduncum* leaves on the AGS cell line (gastric adenocarcinoma) acquired from the ECACC (European Authenticated Cell Culture Collection) was evaluated, using a colorimetric technique with the resazurine indicator, evaluating the results within 24 and 48 hours of having exposed the extract to different factors: 1000, 500, 250, 125,

Correspondencia:

Nombre: Víctor Miranda García
Correo: victoremga@hotmail.com

Recibido: 21/08/2019

Aceptado: 07/11/2019

Citar como:

Miranda-García, V. y Bonilla, P. (2019). Actividad antiproliferativa del extracto metanólico de hojas de *Piper aduncum* sobre células de cáncer gástrico. *Ciencia e Investigación* 2019 22(2):29-34.

© Los autores. Este artículo es publicado por la Ciencia e Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución - No Comercia _Compartir Igual 4.0 Internacional. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>) que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada.

62.5, 31, 15, and 7 ppm with cancer cells, to analyze the results the percentage of the difference in reduction between treated cells and control cells and from this data the percentage of growth inhibition was obtained. The IC50 was obtained at 24 hours with 131,5 ppm and at 48 hours with the IC50 it was 103,3 ppm, It can be evidenced that at 48 hours the effect becomes more potent having 100 % inhibition from 250 ppm of methanolic extract.

Keywords: *Piper aduncum*; Antiproliferative activity; gastric cancer; plant extract.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es un problema de salud pública a escala mundial, en Latinoamérica el cáncer ocupa el tercer lugar de las causas de muerte y en el Perú, el cáncer gástrico es una de las entidades más agresivas y frecuentes, representando el 14,7 % de las causas de mortalidad por cáncer en varones (sólo detrás del cáncer de próstata) y 13,4 % en mujeres⁵, de tal modo que puede identificarse al cáncer de estómago como el de mayor incidencia para ambos sexos en común⁶.

Es sabido que entre los tratamientos para esta enfermedad se encuentra la quimioterapia, tratamiento que deja efectos adversos muy tóxicos⁷, por ello surge la necesidad de encontrar nuevos quimioterápicos, de preferencia de origen natural, que puedan hacer frente a esta enfermedad.

El Perú con una gran biodiversidad, incrementa la posibilidad de albergar algún recurso vegetal en cuyos metabolitos secundarios se pueda hallar un principio activo útil en el tratamiento del cáncer de estómago⁸; sin embargo, la capacidad de investigación peruana en este campo no es suficiente para dar sustento científico necesario como para ser tomada en cuenta en la medicina convencional⁹, es por ello que se hace necesario seguir buscando en nuestros recursos vegetales teniendo como base el saber tradicional y estudios científicos previos relacionados al tema. De encontrar sustancias bioactivas en las plantas en estudio, con eficacia moderada contra las células de cáncer, se podría dar sustento científico al uso de las mismas según su grado de eficacia: Tratamiento coadyuvante o alternativo de la quimioterapia, además de sentar las bases para posteriores estudios que tengan como objetivo la identificación de la molécula específica o fitocomplejo con el mejor efecto antiproliferativo.

De manera preliminar es posible conocer el efecto anticancerígeno que podría tener un extracto vegetal, realizando pruebas *in vitro*, incubando el extracto vegetal con células de cáncer y observando por medio de diferentes técnicas la acción del extracto sobre la proliferación celular¹⁰.

Por lo expuesto, el presente trabajo busca cuantificar el efecto antiproliferativo del extracto metanólico de las hojas de *Piper aduncum* sobre una línea celular de adenocarcinoma gástrico.

Materiales y métodos:

Se desarrolló un estudio experimental y transversal, empleando los siguientes métodos:

Recolección de la muestra: se colectaron hojas de *Piper aduncum* de la provincia de Chanchamayo, departamento de Junín, en las coordenadas geográficas 11°02'16.5"S 75°18'54.0"W

Elaboración del extracto: las hojas fueron lavadas y secadas a 40 °C, molidas y tamizadas para luego macerarlas por 5 días con metanol considerando macerar la planta molida al 20 % con el solvente y sonicando diariamente por 60 minutos a 30 °C.

Luego se filtró con tocuyo y seguido con papel Whatman N° 1; el filtrado fue concentrado en un rotavapor (35 °C, 24 rpm y 200 mbar) y el solvente recuperado se utilizó para repetir la extracción tres veces más. Los concentrados fueron reunidos y llevados a sequedad en estufa a 30 °C¹¹.

Análisis de la actividad antiproliferativa: Para evaluar esta actividad en los extractos se midió la citotoxicidad en la línea celular de cáncer gástrico AGS (adenocarcinoma gástrico) adquiridas de la ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures) usando una técnica colorimétrica con el indicador rezasurina. Para esto se sembró células AGS en medio de cultivo DMEN-F12 con 10 % de suero fetal bovino y antibiótico-antimicótico incubando a 37 °C y 5 % de CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 70 al 80 %.

Luego se disociaron las células con tripsina 0,025 %, se colectaron las células resuspendidas y se centrifugaron a 1200 rpm por 5 minutos. Se resuspendió el pellet en 1 mL de medio de cultivo y se contaron las células en cámara de Neubauer para preparar una suspensión de 2,5 x 10⁴ células/mL y repartiendo 100 µL en cuatro placas de 96 pocillos, considerando por cada placa repartir las células en las columnas 2-5, 7, 9 y 11 y en las filas B-G.

Después de 24 horas se retiró el medio de cultivo y se agregó el extracto metanólico de hojas de *Piper aduncum* (EMHPa) disuelto a las siguientes concentraciones 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.6, y 7.8 ppm en medio de cultivo DMEM-F12

El diseño de la placa fue el siguiente: Ver Placa 1

Para la placa 2 (24 horas y 48 horas), se sigue una distribución similar a la placa 1, pero con la diferencia que en esta placa se han reemplazado E1, E2, E3 y E4 por E5, E6, E7 y E8 respectivamente y donde: E5: 125 ppm de extracto + células, E6: 250 ppm de extracto + células, E6-B: 250 ppm de extracto, E7: 500 ppm de extracto + células E7-B: 500 ppm de extracto, E8: 1000 ppm de extracto + células y E8: 1000 ppm de extracto.

Placa 1 (24 horas y 48 horas)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	CN	CP	VEH	E1	E1-B	E2	E2-B	E3	E3-B	E4	E4-B
B	CN	CP	VEH	E1	E1-B	E2	E2-B	E3	E3-B	E4	E4-B
B	CN	CP	VEH	E1	E1-B	E2	E2-B	E3	E3-B	E4	E4-B
B	CN	CP	VEH	E1	E1-B	E2	E2-B	E3	E3-B	E4	E4-B
B	CN	CP	VEH	E1	E1-B	E2	E2-B	E3	E3-B	E4	E4-B

MC: medio de cultivo, B: MC solo, CN: MC + células, CP: MC + células + DMSO 15% (Citotoxicidad), VEH: MC + células + DMSO 1%, E1: 7.8125 ppm Extracto + células, E1-B: 7.8125 ppm Extracto, E2: 15.625 ppm Extracto + células, E2-B: 15.625 ppm Extracto, E3: 31.25 ppm Extracto + células, E3-B: 31.25 ppm Extracto, E4: 62.5 ppm Extracto + células, E4-B: 62.5 ppm Extracto.

Luego de transcurridas 21 horas, se agregó 20 µL de resazurina 0,15 ppm y se continuó incubando a 37 °C por 3 horas hasta completar las 24 horas, luego se obtuvieron las absorbancias utilizando una lectora de placas a 570 y 600 nm, se repitió el proceso a las 45 horas de exposición a los extractos y se procesó los datos con la siguiente fórmula¹²:

$$\text{Diferencia de porcentaje de reducción} = \frac{(O2 \times A1) - (O1 \times A2) \times 100}{(O2 \times P1) - (O1 \times P2)}$$

entre células tratadas y células control

Donde:

O1: Coeficiente de extinción molar (E) de la resazurina oxidada (azul) a 570 nm, O2: E de resazurina oxidada a 600 nm, A1: Absorbancia de pocillos de prueba a 570 nm, A2: Absorbancia de pocillos de prueba a 600 nm, P1: Absorbancia de pocillos de control de crecimiento positivo (células más resazurina pero ningún agente citotóxico) a 570 nm, P2: Absorbancia de pocillos de control de crecimiento positivo (células más resazurina pero ningún agente citotóxico) a 600 nm .

Luego a estos resultados se les resta a 100 % para obtener el porcentaje de inhibición del crecimiento.

Análisis estadístico: Los datos fueron procesados en el programa estadístico GraphPad Prism 5.0 para calcular el IC₅₀ mediante una gráfica de regresión no lineal y luego

un gráfico de barras para comparar los resultados a las 24 y 48 horas de exposición.

RESULTADOS

En la tabla 1 puede observarse el porcentaje de inhibición del crecimiento en seis repeticiones de cada concentración, a las 24 horas de exposición, pudiendo notarse que desde 500 ppm a más la inhibición es cercana al 100 %, y valores cercanos al 50 % de inhibición se obtienen alrededor de 125 ppm.

Se calculó una concentración inhibitoria media de 131,5 ppm de EMHPa para una exposición de 24 horas a las células de cáncer gástrico, usando un gráfico de regresión no lineal entre el porcentaje de inhibición y el logaritmo de la concentración (Ver figura 1).

En esta tabla 2 pueden apreciarse los porcentajes de inhibición a las 48 horas de exposición, pudiendo observar que valores cercanos al 100 % de inhibición se obtienen ahora alrededor de 125 ppm de extracto.

Se calculó una concentración inhibitoria media de 103,3 ppm de EMHPa para una exposición de 48 horas a las células de cáncer gástrico (Ver figura 2).

Se observa que entre la concentración de 7 a 31 ppm el efecto a las 48 horas disminuye; sin embargo, el efecto antiproliferativo empieza a aumentar a partir de 62 ppm

Tabla 1. Porcentaje de inhibición del crecimiento a las 24 horas

Concentración de EMHPa (ppm)	Porcentaje de inhibición del crecimiento a las 24 horas					
	% dif1	% dif2	% dif3	% dif4	% dif5	% dif6
7	24,672	61,617	22,143	4,848	35,153	9,442
15	-0,273	9,745	-19,074	-1,470	25,148	20,400
31	4,639	8,307	1,087	-8,216	3,925	22,455
62,5	19,431	36,668	9,317	1,808	13,833	20,802
125	51,366	52,223	41,571	43,441	32,030	47,628
250	79,738	83,205	81,140	81,452	80,673	88,813
500	99,299	98,929	99,669	97,780	98,559	99,669
1000	100,610	96,385	98,118	96,638	98,507	99,130

hasta 250 ppm en las 48 horas de exposición, para luego mantenerse cerca al 100 % de actividad a partir de 500 ppm, tanto a las 24 y 48 horas (Ver figura 3).

DISCUSIÓN

Entre los métodos colorimétricos usados se eligió la resazurina, por ser uno de los más económicos, sencillos y reproducibles, además de evitar la destrucción celular, pudiendo usarse para pruebas posteriores, en comparación con la técnica XTT o MTT por ejemplo, sin embargo es necesario mencionar que es necesario evaluar la técnica de resazurina para cada línea celular que se vaya a probar, puesto que la sensibilidad es distinta¹³.

En los resultados se puede apreciar un descenso inicial en el efecto con relación a la concentración entre 7 y 31 ppm, esto puede ser debido al efecto denominado hórmesis, en el cual a una determinada concentración, que puede ser muy baja o alta, el efecto que se manifiesta es contrario al que pueda ocurrir en otra concentración distinta¹⁴.

En relación a las diferencias entre los resultados obtenidos en el rango de 7 a 31 ppm con respecto a las 24 y 48 horas de exposición, se observa una disminución de la eficacia respecto a un mayor tiempo de exposición. Este efecto evidencia una recuperación de las células

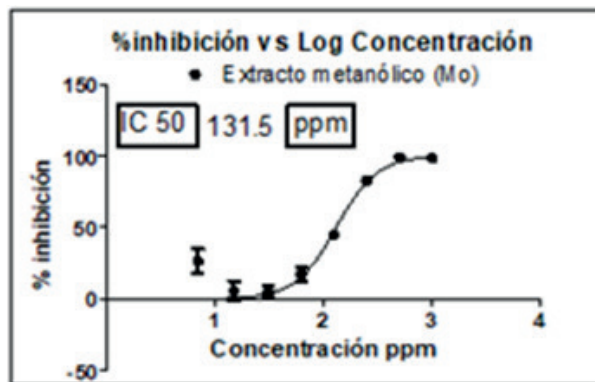


Figura 1. IC₅₀ del EMHPa a 24 horas

Tabla 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento a las 48 horas

Concentración de EMHPa (ppm)	Porcentaje de inhibición del crecimiento a las 48 horas					
	% dif1	% dif2	% dif3	% dif4	% dif5	% dif6
7	-17,596	-10,750	0,667	-11,407	8,346	-1,833
15	-11,815	-3,985	-17,941	-20,202	-2,090	-16,804
31	17,476	21,151	-18,520	-5,536	-11,636	-8,113
62,5	34,179	21,839	21,675	-8,574	42,527	21,966
125	86,798	71,142	16,186	29,851	52,655	57,650
250	99,640	99,620	98,960	98,826	98,262	98,931
500	100,155	100,155	100,155	100,155	100,155	100,155
1000	101,112	100,126	100,834	100,576	100,557	101,839

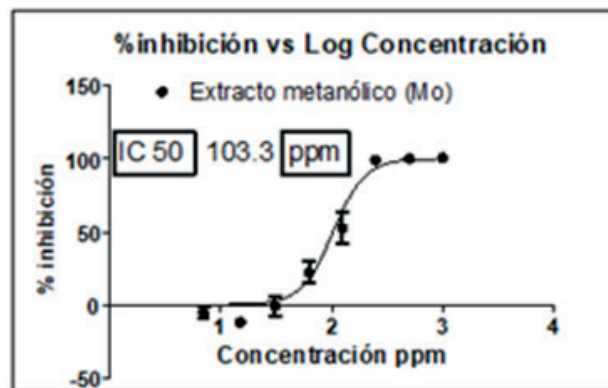


Figura 2. IC₅₀ del EMHPa a 48 horas

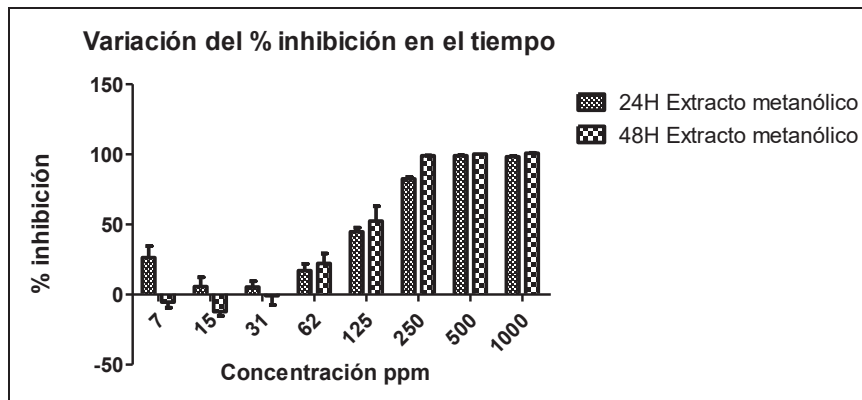


Figura 3. Variación de la actividad antiproliferativa del EMHPa entre 24 y 48 horas

cancerosas después de haber sido expuestas al extracto, las diferencias también pueden deberse al momento de sembrar las células en una cantidad determinada por cada pocillo, que existiera una diferencia mínima en las cantidades colocadas, pero sin embargo a las 48 horas de incubación, debido a la proliferación celular, estas diferencias se pueden ver incrementadas¹³. Referente a la concentración se pudo observar que: a concentraciones aproximadas de 125 ppm de EMHPa se obtienen porcentajes de inhibición cercanos al 100 %, resultados que concuerdan con otro estudio realizado en Colombia, donde un 100 % de inhibición se obtiene con 100 ppm de extracto etanólico en este caso¹⁵, mientras que en otro estudio realizado en Perú con extracto etanólico de *Piper aduncum* sobre líneas celulares humanas MCF-7, H-460, HT-29, M-14, K-562, y DU-145, se obtuvieron valores de inhibición media mayores a 20 ppm, en comparación con este trabajo donde se obtuvo 103.3 ppm, pudiéndose deber estas diferencias a los tipos de líneas celulares o al tipo de extracto usado¹⁶.

En cuanto a las posibles sustancias bioactivas responsables pueden citarse a los alcaloides amínicos, los cuales han sido identificados por su gran efecto citotóxico en plantas del género *Piper*¹⁷; se puede mencionar también la flavokawina B, piperlongumina y el alcaloide piperina, este último usado en concentraciones de 100 μ M para inhibir el crecimiento de líneas celulares de cáncer de mama y adenocarcinoma rectal; además, se pudo comprobar que la apoptosis es responsable de la muerte celular, mecanismo de acción comprobado por la prueba de Anexina V¹⁸. También han sido identificados flavonoides, en especial algunas dihidrochalconas con gran potencial citotóxico, como las piperaduncinas A, B y C¹⁹.

El EMHPa a su vez puede arrastrar pequeñas cantidades de aceites esenciales; sin embargo, como han sido demostrados en otros estudios, éstos poseen poco efecto citotóxico sobre líneas celulares de cáncer²⁰.

Finalmente, cabe mencionar que se puede observar también una mejora en el efecto antiproliferativo en el rango de 62 a 250 ppm a las 48 horas de exposición, frente a las 24 horas. Esta información es importante pues, si el extracto resultara tóxico para células normales a una

determinada concentración, en la cual se logra el efecto deseado, este extracto podría usarse también a una concentración menor y aún así lograr el efecto deseado, simplemente con más tiempo de contacto.

CONCLUSIÓN

El extracto metanólico de hojas de *Piper aduncum*, recolectadas en el distrito La Merced, provincia Chanchamayo, departamento Junín - Perú, muestra actividad antiproliferativa sobre células de la línea AGS, adenocarcinoma gástrico humano, esta actividad es del 100 % a partir de una concentración de 250 ppm a más y con una concentración inhibitoria media de 103.3 ppm (al 1 % con DMSO), medidos con el método colorimétrico de resazurina.

AGRADECIMIENTOS

A Concytec, por el financiamiento del presente trabajo, a la Universidad Científica del Sur, por ceder el Laboratorio de Química de Productos Naturales y el Laboratorio de Cultivo Celular para realizar los experimentos, al Dr. José Amiel, al Msc Alejandro Fukusaki y la Mg. Ana Mayanga, por su apoyo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Mejía K, Rengifo E. Plantas medicinales de uso popular en la Amazonía Peruana. 2°. Perú: AECI y IIAIP; 2000. 286 p.
- Lentz D, Clark A, Hufford C. Propiedades antimicrobianas de plantas medicinales hondureñas. *Journal of Ethnopharmacology*. 1998;63(3):253-63.
- Orjala J, Wright A, Behrends H. Dihidrochalconas citotóxicas y antibacterianas de *Piper aduncum*. 1994;57(1):18-26.
- Arroyo J, Herrera-Calderón O, Chávez R. Efecto antitumoral *in vitro* del aceite esencial de *Piper aduncum* L. (matico) y su toxicidad oral en ratones. *An Fac Med*. 2014;75(1).
- INEM. Datos epidemiológicos [Internet]. Perú: Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas; 2017. Disponible en: <https://portal.inem.sld.pe/indicadores-anuales-de-gestion-produccion-hospitalaria/>
- Torres-Román J, Grados-Sánchez O. Cáncer gástrico en el Perú: una realidad susceptible de cambio. *Rev gastroenterol*. 2015; 35(3).

7. Ferreiro J, García J, Rubio L. Quimioterapia: efectos secundarios. *Gac Med Bilbao*. 2003; 100:69-74.
8. SINIA. Perú: País Megadiverso [Internet]. Ministerio del Ambiente; 2008. Disponible en: <https://sinia.minam.gob.pe/documentos/peru-pais-megadiverso>
9. Balarezo G. Plantas medicinales: Una farmacia natural para la salud pública. 2018; 6(7):159-170. *Paideia XXI* Disponible en: <file:///C:/Users/vmirandag/Downloads/1606-Texto%20del%20art%C3%ADculo-3514-1-10-20180823.pdf>
10. Arencibia D, Rosario L, Curveco D. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Retel*. 2003.
11. Lock O. Investigación fitoquímica, métodos en el estudio de productos naturales. 2°. Perú: Univ Católica del Perú; 1994. 300 p.
12. Escobar L. Valoración de dos métodos de tinción en ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares tumorales. *Rev Colomb Biotecnol*. 2009;11(2):49-56.
13. Escobar L. Estudio comparativo de los métodos de Resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *VITAE*. 2010;17(1):67-74.
14. Kinoshita A. Hormesis in Carcinogenicity of Non-genotoxic Carcinogens. *Toxicol Pathol*. 2006;19(3):111-22.
15. Gómez M. Bioactividad del extracto crudo de *Piper aduncum* [Internet] [pregrado]. [Medellín-Colombia]: CES; 2017. Disponible en: http://bdigital.ces.edu.co:8080/repositorio/bitstream/10946/4645/1/Bioactividad_del_extracto_crudo.pdf
16. Herrera-Calderon O, Alvarado-Puray C, Arroyo-Acevedo J. Phytochemical screening, total phenolic content, antioxidant, and cytotoxic activity of five peruvian plants on human tumor cell lines. *Pharmacognosy REsearch*. 2018;10(2):161-5.
17. Yue W, Morris S, Jung Y. Anticancer Principles from Medicinal Piper Plants. *Journal of traditional and complementary medicine*. 2014;4(1):8-16.
18. Bahare S, Zainul A, Rabin G. Especies de Piper: Una revisión exhaustiva sobre su fitoquímica, actividades biológicas y aplicaciones. *MDPI*. 2019;24(7):1364.
19. Alonso-Castro A, Villarreal M, Salazar L. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011;133(3):945-72.
20. Gutiérrez Y, Montes R, Scull R. La quimioversidad asociada con citotoxicidad y actividad antimicrobiana de *Piper aduncum* var. *ossanum*. *Chemistry and Biodiversity*. 2016;13(12):1715-9.

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Fuente de financiamiento: Financiado por Fondecyt –Concytec en contrato 134-2017 con la Universidad Científica del Sur.