

EFFECTO ANTITUMORAL DE LOS ALCALOIDES HIDROSOLUBLES DE *Abuta grandifolia* (MART) *Sandwith*, EN LÍNEA CELULAR HEP-2

YENY ROJAS V.¹, ROCÍO SOTO B.¹, ELIZABETH ANAYA², FERNANDO RETUERTO P.³,
CÉSAR M. FUERTES R.¹

¹INSTITUTO DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS Y RECURSOS NATURALES, FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA, ²ICBAR
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
³INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

RESUMEN

El extracto etanólico de la corteza de *Abuta grandifolia* (MART) *Sandwith* «abuta», contiene dos tipos de alcaloides, uno muy soluble en éter etílico y el segundo soluble en agua. Estos corresponden a los alcaloides del tipo amonio cuaternario. Tienen propiedades citotóxicas frente al modelo de embriones de erizo de mar, confirmado frente a la línea celular VERO.

Para determinar el efecto antitumoral se realizó un ensayo con la línea celular de carcinoma epidermoide laríngeo humano (HEP-2) dando una respuesta citotóxica de 91% y 95% a las concentraciones de 0,24 y 0,06 mg/mL, respectivamente.

Una fracción alcaloidea denominada A, cuyas propiedades espectroscópicas IR muestran bandas de absorción correspondientes a los alcaloides del tipo amonio cuaternario, tiene propiedades antitumorales.

Palabras clave: Abuta, alcaloide, citotóxico, antitumoral, línea celular, espectro I R.

SUMMARY

The ethanolic extract of the stalk of *Abuta grandifolia* (MART) *Sandwith* «abuta», contains two types of alkaloids, one is very soluble in ethylic ether and the other one is water soluble. They correspond to alkaloids of quaternary ammonium type. They have cytotoxic properties against formed system by eggs of sea urchin; and it confirmed against a VERO cell line.

For determining the antitumoral effect, it was carried out an essay with cell line of the (HEP-2) human Laryngeal epidermoidal carcinoma resulting in a cytotoxic response of 91% and 95% at a concentrations of 0.24 and 0.06 mg/dL.

A alkaloid fraction named A, with IR spectroscopical properties show absorption bands corresponding to alkaloids of quaternary ammonium type, it has antitumoral properties.

Key words: Abuta, alkaloid, cytotoxic, antitumoral, cell line, IR specter.

INTRODUCCIÓN

El crecimiento y la maduración celular son eventos normales en el desarrollo de los órganos durante la embriogénesis, crecimiento y reparación tisular, así como en la remodelación después de lesiones. La regulación desordenada de estos procesos produce como resultados pérdida de control

sobre el crecimiento, diferenciación y confinamiento espacial celular.

La neoplasia humana representa un modelo colectivo, un espectro de enfermedades que se caracteriza por el crecimiento anormal e invasión celular.

Durante los últimos años³ se han realizado progresos importantes a la luz de las bases biológicas y bioquímicas del cáncer, y a la investigación basada en la tecnología moderna de la genética molecular así como los conocimientos de la inmunología.

La quimioterapia ha demostrado su utilidad en el tratamiento de ciertas formas de cáncer, donde las especies vegetales constituyen una fuente útil de compuestos antitumorales con importancia clínica^{1,7}.

El bioensayo de citotoxicidad en embriones de erizo de mar^{10,22} muestra ser una prueba muy rápida, que es utilizado como un método de Screening genotóxico-teratogénico para sustancias aisladas o mezclas complejas a partir de los extractos vegetales⁴. En los últimos años la aplicación de los cultivos celulares^{12,13} ha permitido grandes avances en la comprensión de los mecanismos implicados en los procesos intracelulares e intercelulares con el establecimiento de los co-cultivos, donde la investigación del cáncer es un área fuertemente dependiente del cultivo celular^{17,18,19}.

En el Perú⁵, las especies del género *Abuta*, en especial *Abuta grandifolia* (Menispermaceae) se encuentran en los departamentos de Loreto, San Martín, Ucayali, Madre de Dios, Cerro de Pasco, Junín y Amazonas. Los nativos lo usan para curar enfermedades inflamatorias y ciertos tipos de heridas⁵

Para el estudio de plantas con propiedades antitumorales planteamos como estrategia el estudio guiado por bioensayo de citotoxicidad de un grupo de plantas para encontrar en los extractos moléculas con actividad antitumoral; para lo cual fijamos como objetivo el estudio antitumoral en línea celular de la fracción alcaloídica, así como su correspondiente elucidación estructural.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

En la localidad de Nauta, departamento de Loreto, se colectó 23 especies vegetales, según las indicaciones etnofarmacológicas acopiadas de los habitantes de esta localidad. Mediante screening citotóxico por el modelo de embriones de Erizo de mar^{10,22}, se seleccionó la especie *Abuta grandifolia* (MART) *Sandwith* (Menospermaceae) para el estudio antitumoral.

La línea celular Vero, proveniente del riñón de mono verde (*Cercopithecus aethiops*) y la línea celular HEP-2 de carcinoma epidermoide laríngeo humano fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Salud.

Equipos

Los espectros UV e IR fueron determinados en un espectrofotómetro UV visible Perkin Elmer, y un espectrofotómetro IR Nicolet.

Entre las soluciones y medios de cultivos se utilizó el Medio Mínimo Esencial con sales de Earl's (EMEM) y suero bovino fetal.

Preparación de extractos

De cada una de las 23 especies vegetales se preparó por maceración dos tipos de extractos: uno con diclorometano y otro con etanol; utilizando la corteza o las hojas en polvo.

Bioensayo de citotoxicidad

Los extractos etanólicos de las hojas de *Caliandra angustifolia* (bubinsana) y *Himalantus sucumbia* (bellaco caspi); y de la corteza *Abuta grandifolia* (abuta) mostraron propiedades fuertemente citotóxicas utilizando el modelo de huevos fecundados de erizo de mar.

Aislamiento de alcaloides

El extracto seco de la corteza de *Abuta grandifolia*, fue tratado con éter etílico con el propósito de extraer los alcaloides; esta operación se realizó hasta agotamiento.

Se observó en el residuo la presencia de alcaloides y también en el extracto etéreo; esta observación sirvió para inferir que la corteza de *Abuta grandifolia* tiene dos tipos de alcaloides, uno medianamente polar y otra fracción muy polar.

Actividad citotóxica de las fracciones alcaloídicas

El bioensayo de citotoxicidad según el modelo de embriones de erizo de mar presentó actividad positiva con el extracto polar, en cambio, el contenido de la fracción etérea no respondió al bioensayo.

Fraccionamiento del extracto libre de alcaloides solubles en éter

Para separar los compuestos de la fracción libre de alcaloides solubles en éter, se procedió al aislamiento de los «alcaloides polares», en una cromatografía en escala preparativa, usando como fase fija Sílicagel G, como sistema de solvente cloroformo-metanol 1: 1 v/v, y como revelador el reactivo de Dragendorff. Se separó 5 fracciones denominadas A,B,C,D y E. Las fracciones A y B presentaron propiedades citotóxicas y respondieron positivamente al reactivo para alcaloides.

Preparación de los cultivos celulares

El procedimiento de cultivo de células VERO fue similar al de células HEP-2, se crecieron frascos de 75mL el cual contiene de 10^4 células, en el medio de cultivo mínimo esencial con sales de Earl's (EMEN) y suero bovino fetal, L-glutamina y aminoácidos.

Se descartó el medio de crecimiento, luego se lavó las células con 10 mL de PBS al 1% seguido de otro lavado con una solución de tripsina-EDTA, se incubó a 37°C por 48 hrs. La monocapa de células se expuso a 2 mL de tripsina con la finalidad de que se desprendan del frasco. En seguida se trató con 10 mL de medio de cultivo ENEM, resultando una suspensión que contiene aproximadamente 5×10^4 células/mL. De esta suspensión se tomó 2 mL (100.000 células) a cada frasco de cultivo celular de 12 mL, se incubó los frascos de cultivo a 37°C en una atmósfera de anhídrido carbónico al 5%.

Con el fin de revisar la viabilidad y pureza de las células, se observó el frasco con las células en un microscopio invertido al aumento de 40X. Se reemplazó el medio completo por el medio de mantenimiento (medio ENEM más 2% de Suero Bovino Fetal) . se descartó el medio de cultivo en un beaker estéril y se lavó dos veces con solución buffer fosfato salina (PBS 1%).

Nuevamente se reemplazó el medio de cultivo con 2mL de medio de mantenimiento.

Preparación del medio ENEM para las pruebas con líneas celulares VERO y HEP-2

El medio ENEM se diluyó en un litro de agua bidestilada, se adicionó 0,35 gramos de bicarbonato de sodio y se filtró. A la solución se le agregó Penicilina y estreptomina, Buffer HEPES al 1%, L-glutamina al 1%, aminoácidos no esenciales al 1% y Suero Bovino Fetal al 10%.

Se repartió en frascos estériles y se incubó a 37°C por 24-48 horas.

Inoculación de las fracciones alcaloídicas A y B en el cultivo celular

Cada fracción se diluyó en el medio de mantenimiento y se prepararon diluciones de 7,7 mg / 2mL, 3,85 mg / 2mL, 1,925 mg/ 2mL, 0,933 mg / 2 mL y 0,48 mg/ 2mL.

RESULTADOS

El extracto etanólico de *Abuta grandifolia* presentó a las 24 horas significativa actividad citotóxica en el modelo de embriones de erizo de mar.

La actividad citotóxica del extracto etanólico (en DMSO) sobre la línea celular VERO fue evaluada a las 24, 72 y 96 horas a diferentes concentraciones.(Tabla 1)

Tabla 1. Actividad citotóxica del extracto etanólico de las hojas de *Abuta grandifolia* sobre la línea celular Vero. Las fracciones A y B, obtenidas por cromatografía en escala preparativa y que respon-

Concentración (mg/mL)	Actividad citotóxica (%)
7,7	90
3,85	85
1,925	85
0,963	65
0,48	50

den positivamente al reactivo de Dragendorff mostraron frente a la línea celular VERO una marcada actividad citotóxica.

Tabla 2. Actividad citotóxica de las fracciones alcaloídicas A y B de corteza de *A. grandifolia* sobre línea celular VERO; observadas durante 15 días:

Fracción	Conc. (mg/mL)	Actividad Citotóxica (%)	
		7 ^{mo} día	15 ^{avo} día
A	0,24	75,5	95
A	0,12	75	95
A	0,06	65	97,5
B	0,24	70	95
B	0,12	65	97,5
B	0,06	50	95,5

El extracto etanólico (en DMSO) de la fracción A y B, así como del extracto total (C) mostraron una actividad citotóxica frente la línea celular HEP-2 que se observa en la tabla 3.

Tabla 3. Efecto citotóxico de la fracción A y B y del extracto Total C frente a línea celular HEP-2

Fracción	Conc. (mg/ml)	Efectos citotóxico (%)			Nº de Células
		3º día	6º día	8º día	
C	0,24	89,0	92,0	92,5	4,15 x 10 ⁴
C	0,06	90,0	95,0	99,0	5,50 x 10 ⁴
A	0,24	36,0	37,0	40,0	1,04 x 10 ⁶
A	0,06	0,0	0,0	0,0	1,83 x 10 ⁶

En cuanto al análisis espectroscópico UV, la fracción A presenta absorciones a máxima de 254,79 nm y 260,96 nm, mientras que la fracción B tiene una banda de absorción a 275,26 nm.

El espectro IR exhibe las bandas de absorción de acuerdo a la tabla 4.

Tabla 4. Bandas de absorción de los espectros IR de las fracciones A y B

Fracción	Absorción (cm ⁻¹)	Grupo funcional
A	1460	Amonio cuaternario
	2960	Amonio cuaternario
	2924	Amonio cuaternario
	2847	Amonio cuaternario
	3431	Nitrógeno amínico e hidroxilo
B	1455	Amonio cuaternario
	2858 cm ⁻¹	Amonio cuaternario
	2950 cm ⁻¹	Amonio cuaternario
	3431	Nitrógeno amínico e hidroxilo

DISCUSIÓN

El desarrollo experimental del presente trabajo de investigación se ha llevado a cabo teniendo como base estratégica la separación de los alcaloides, un fraccionamiento cromatográfico y el seguimiento de la actividad citotóxica de las fracciones con el modelo de embriones de erizo de mar y células VERO.

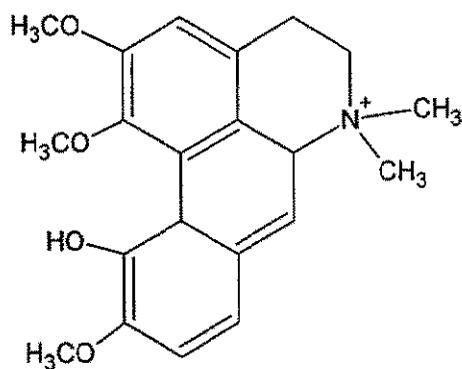
En el extracto etanólico de la corteza de *Abuta grandifolia* se encontró dos tipos de alcaloides, unos muy solubles en éter etílico sin efecto citotóxico y otros muy polares que de acuerdo a

los estudios espectroscópicos IR responden a las estructuras de alcaloides de tipo amonio cuaternario²⁰. Estos poseen actividad citotóxica significativa.

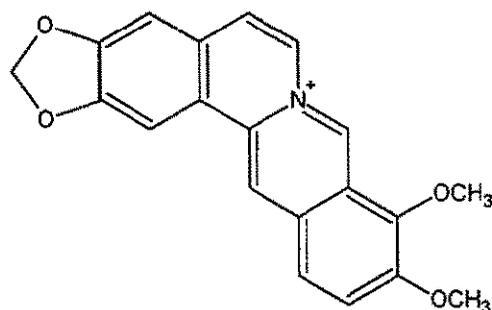
Algunos autores han reportado que muchas especies de la familia Menispermaceae contienen alcaloides del tipo amonio cuaternario¹⁴, estas referencias permitió deducir que *Abuta grandifolia*, quimiotaxonómicamente es una fuente de estos alcaloides.

La solubilidad de las fracciones alcaloidicas A y B, apoyada por los resultados epectroscópicos IR que mostró bandas características al grupo amonio cuaternario (1,400 cm⁻¹) evidenciaron que en la corteza de *Abuta grandifolia* se encuentran dos tipos de alcaloides de los cuales uno de ellos tiene estructura de tipo amonio cuaternario.

La citotoxicidad de los alcaloides berberina y lincagenina han sido evaluadas en líneas celulares HELA (carcinoma de útero) SVKO₃ (carcinoma de ovario) y HEP-2 (carcinoma laríngeo), los resultados justifican los objetivos de nuestro estudio.



MENISPERINA



BERBERINA

Fig. 1 - Principales alcaloides con estructura tipo amonio cuaternario encontrados en la familia Menispermaceae y Berberidaceae.

Diversos estudios relacionan la actividad citotóxica de un compuesto con las potenciales propiedades antitumorales¹⁷. Nosotros reforzamos la actividad citotóxica frente a las células de mono verde (células VERO), confirmando la importancia de las fracciones alcaloídicas A y B ; a la concentración de 0,48 mg/mL el porcentaje de la citotoxicidad se mantuvo entre 50 y 70 % tomándose esta concentración como la CC50 (concentración citotóxica media).

La microscopía electrónica nos permitió observar que la fracción A tenía mayor citotoxicidad que la fracción B.

Después de utilizar los dos modelos de citotoxicidad, el uso de la línea celular HEP-2, proveniente del carcinoma epidermoide laríngeo humano, sirvió para determinar el efecto antitumoral.

CONCLUSIONES

El extracto etanólico de la corteza de *Abuta grandifolia* (MART) *Sandwith* contiene dos tipos de alcaloides, un grupo muy soluble en éter etílico y otro insoluble, que responde a la estructura de alcaloides de amonio cuaternario, demostrado mediante espectroscopia IR.

La fracción alcaloidea A y B, obtenidas por cromatografía en escala preparativa, poseen citotoxicidad significativa frente a los embriones de erizo de mar y células VERO.

La fracción A tiene un potencial efecto antitumoral a las concentraciones de 0,24 y 0,06 mg/mL, evaluada en la línea celular HEP-2 (carcinoma epidermoide laríngeo humano).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Solidoro S. A. 2001. Cáncer en el Perú del 2000: hechos, cifras, realidades, Revista Médica de la Fundación Instituto Hipólito Unanue. Diagnóstico Nov.; 40(6):306-317.
- Farnsworth N. R., Bingel A. S. 1977. Problems and prospects of discovering new drugs from higher plants. Pharmacological screening in : Wagner H., Wolff P., editors.
- Dennis R.A. Mans, da Rocha A. B., Schawrtsmann G. 2000. Anticancer drug discovery and development in Brazil. The Oncologist; 5(3):185-198.
- Casually L. Douros. 1980. Anticancer agents based on natural products models. New York: Academic Press .
- Bernal H.Y., Correa S.E., Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andrés Bello 1989-1992; 2,4,6.
- Corredon B., et al. 1992. Medicina Tradicional-farmacognosia. Plantas medicinales amazónicas. Memorias del I Simposio sobre plantas medicinales. Bogotá; 193-197.
- Barriga N.O. 2000. Cincuenta años de lucha contra Cáncer. Investigación Oncológica, Set-Dic; (3-4).
- Hooker J. D. 1985. Index kewensis and supplements. Oxford: Clarendon Press; 1.
- Winston J. Craig. 2000. Health-Promoting properties of common herbs. Oncology; 5(3): 90-93.
- Hose J.E. 1985. Potential uses of sea urchin embryos for identifying toxic chemicals: description of a bioassay incorporating cytologic, cytogenetic and embryologic endpoints. Journal of Applied Toxicology; 5(4):245-254.
- Epel David at Stanford University's Hopkins Marine Station, Development of sea urchins. <http://www.google.com/search>
- Simizu B., Terasima T., eds. 1998. Vero cells: origin, properties and biomedical applications. Tokyo:Chiba Univ.; 26-29.
- Moore A. E., et. al. 1995. Culture characteristic of four permanent lines of human cancer cells. Cancer Res.; 15:598-602.
- Iwasa K., Moriyasu M., Yamori T., Turuo T., Lee D.U., Wiegrebe W. 2001. In intro Cytotoxicity of the protoberberine-type alkaloids. J. Nat. Prod. Jul.; 64 (7) : 896-898.
- Youssef D. T., Khalifa A.A. 2001. Cytotoxic quaternary alkaloids from the flowers of *Narcissus tazetta*. Pharmzie. Oct.; 56 (10) : 818-822.
- Betancur-Galvis L. A., Saenz J., Granados H., Salazar A., Ossa J. E. 1999. Antitumor and antiviral activity of Colombian medicinal plant

- extracts. *Men Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro*. Jul. ; (4) : 531-535.
17. Kupchan S. M., Patel A. C. and Fujita E. 1995. Tumor inhibitors VI. Cissampareine, new cytotoxic alkaloid from *Cissampelos pareira*. Cytotoxicity of bisbenzylisoquinoline alkaloids. *Journal of Pharmaceutical science*; 54 (4): 580-583.
18. Kondo Y., Takamo F., Hojo H. 1993. Bisbenzyliso-quinoline alkaloids. *Biochem Pharmacol*; 46: 1887-1892.
19. Iwasa K., Moriyasu M., Tachibana Y., Kim H. S. Wataya Y., Wiegrebe W., Bastow K. F., et al. 2001. Simple isoquinole alkaloids as potential antimicrobial, antimalarial, cytotoxic, and anti-HIV agents. *Bioorg Med Chem*, Nov.; 9(11): 2871-2884.
20. Orfila L. Rodriguez M., Colman T., Hasegawa M., Merentes E., Arvelo F. 2000. Structural modification of berberine alkaloids in relation to activity in vitro. *J. Ethnopharmacol*, Aug.; 71(3): 449-456.
21. Sanders M. M., Liu A. A., Li T. K., Wu H. Y., Desai S. D., Mao Y., Rubin E. H., La Voie E. J., et al. 1989. Selective cytotoxicity of topoisomerase-directed protoberberines against glioblastoma cells. *Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi*, Jul.; 5(7): 409-411.
22. Costa-Lotufo L. V., Ferreira M. A. D., Lemos T. L. G., Pessoa O. D. L., Viana G. S. B, Cunha G. M. A. 2002. Toxicity to sea urchin egg development of the quinone fraction obtained from *Auxemma oncocalyx*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Aug. 35(8): 927-930
23. Dzhambazov B., Daskalova S., Monteva A., Popov N. 2002. In vitro screening for antitumor activity of *Clionopodium vulgare* L. (Lamiaceae). Pub. Med-indexed for MEDLINE. PMID: 2810448.