

## Efecto citotóxico del extracto metanólico de tres ecotipos de *Lepidium peruvianum* Chacón sobre líneas celulares HeLa y HT-29

### Cytotoxic effect of the methanolic extract of three ecotypes of *Lepidium peruvianum*, Chacón on cellular lines HeLa and HT-29

Libertad Alzamora<sup>1</sup>, Erasmo Colona<sup>1</sup>, Nuria Acero de Mesa<sup>2</sup>, Antonio Galán de Mera<sup>2</sup>, Dolores Muñoz-Mingarro<sup>2</sup>, Francisco Linares<sup>2</sup>, María Teresa Domínguez<sup>2</sup> y Evelyn Alvarez<sup>1</sup>

(1) Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas Antonio Raimondi (ICBAR). e-mail Libertad Alzamora:

lalzamora@unmsm.edu.pe

(2) Universidad San Pablo. Facultad de Farmacia. Madrid. España.

#### Resumen

La búsqueda de compuestos naturales con actividad citotóxica y antitumoral es una de las prioridades actuales de la lucha contra el cáncer; motivo por el cual el objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad citotóxica de los extractos metanólicos (EM) de los ecotipos negro, morado y amarillo de *Lepidium peruvianum*, Chacón (conocida también como *Lepidium meyenii* Walp.) (maca) sobre las líneas celulares HeLa (Human Epithelial Carcinoma) y HT-29 (Human Colon Adenocarcinoma). Se determinó que la concentración inhibitoria del 50% del crecimiento celular (IC50) para la línea celular HT-29, con los ecotipos negro, morado y amarillo fue de 8,32 mg/ml, 9,28 mg/ml y 0,487 mg/ml respectivamente, mientras que para la línea celular HeLa fue de 2,4 mg/ml, 1,93 mg/ml y 0,66 mg/ml respectivamente. Adicionalmente, se evaluó un EM del ecotipo amarillo con dos años de almacenamiento (10 °C) determinándose como IC50 4,29 mg/ml para HT-29 y 4,17 mg/ml para HeLa. Se concluye que el efecto citotóxico del ecotipo amarillo sobre HT-29 y HeLa fue superior al mostrado por los ecotipos negro y morado; que la línea celular más sensible a los ecotipos amarillo, negro y morado es HeLa, y que el EM del ecotipo amarillo conservó sus propiedades citotóxicas pese al tiempo de almacenamiento, aunque éstas disminuyeron.

**Palabras clave:** Extracto metanólico, *Lepidium peruvianum*, *Lepidium meyenii*, citotoxicidad, Maca, Medicina tradicional peruana.

#### Abstract

The search of natural compound with cytotoxic and antitumoural activities is one of the current priorities of the fight against the cancer; being necessary to analyze new extracts of plants. The objective in this paper was to evaluate the cytotoxic activity of the methanolic extract (ME) of the black, purple and yellow ecotypes of *Lepidium peruvianum*, Chacón (at present *Lepidium meyenii* Walp.), Maca, on the cellular lines HeLa (Human Epithelial Carcinoma) and HT-29 (Human Colon Adenocarcinoma). For the cellular line HT-29, the inhibitory concentration of 50% of the cellular growth (IC50) with the black, purple and yellow ecotypes was of 8,32 mg/ml, 9,28 mg/ml and 0,487 mg/ml, respectively; while for the cellular line HeLa was of 2,4 mg/ml, 1,93 mg/ml and 0,66 mg/ml respectively. Additionally, ME of the yellow ecotype was evaluated with two years of storage (10°C) determining an IC50 4,29 mg/ml for HT-29 and 4,17 mg/ml for HeLa. We concludes that the cytotoxic effect of the yellow ecotype on HT-29 and HeLa went high to the showed by the black and purple ecotypes; that the most sensitive cellular line to the yellow, black and purple ecotypes is HeLa, and that the ME of the yellow ecotype conserved its cytotoxic properties in spite of the time of storage.

**Keywords:** Methanolic extract, *Lepidium peruvianum*, *Lepidium meyenii* Walp., cytotoxicity, Maca, Peruvian traditional Medicine.

#### Introducción

La maca, *Lepidium peruvianum*, Chacón (conocida también como *Lepidium meyenii* Walp.), es la única Brassicacea domesticada de los Andes peruanos (3700 - 4500 m). La raíz es usada para el consumo humano por su gran valor nutricional desde tiempos precolombinos. Diferentes estudios reconocen su efecto sobre la función sexual y estimulación de la espermatogénesis, propiedades

nutricionales energizantes, reduce el estrés y mejora el crecimiento y la sobrevivencia (Valentová et al., 2003).

Además contiene metabolitos secundarios como fitosteroles, alcaloides, isotiocianatos, glucosinolatos, flavonoides, saponinas, macaínas y macamidas. Zhao et al. (2005) determinaron la presencia de siete nuevas alcaloides que han sido encontradas únicamente en *L. meyenii*. Cui et al. (2003), demostraron la presencia de alcaloides imidazólicos: lepidilina 1 y lepidilina 2, con efecto citotóxico sobre 8 líneas celulares transformadas A-549, UMUC3, HT-29, PC-3, PACA2, A4982LM, MDA231 y FDIGROV.

La evaluación de la citotoxicidad *in vitro* sigue siendo una herramienta válida y útil en las primeras etapas de selección de compuestos promisorios (León et al., 2006).

**Nota del Editor:** El nombre *Lepidium peruvianum* Chacón debe ser considerado sinónimo de *Lepidium meyenii* Walp. (ver Germplasm Resources Information Network, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, en <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?21767>, acceso 08/02/07) preferencias del autor obligan a mantener *L. peruvianum* Chacón en el texto.

El objetivo fue determinar la actividad citotóxica de los extractos metanólicos (EM) de los ecotipos negro, morado y amarillo de *L. peruvianum* empleando las líneas celulares HeLa (Human Epithelial Carcinoma) y HT-29 (Human Colon Adenocarcinoma).

## Material y métodos

### Líneas celulares

Las líneas celulares HeLa y HT-29 fueron obtenidas del Centro Europeo de Cultivos Celulares. Se cultivaron en el medio apropiado (ver Estudio de citotoxicidad *in vitro* mas abajo) a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>.

### Extracto metanólico

Los extractos metanólicos (EM) se prepararon empleando los ecotipos negro, morado y amarillo de maca procedentes del Valle de Pampas, Provincia de Tayacaja, Departamento de Huancavelica. La maca fue secada, pulverizada y macerada en metanol QP (1:2) durante 10 días, el macerado se filtró y se concentró. Para el ecotipo amarillo también se empleó un EM con dos años de almacenamiento a 10 °C. Todo el procesamiento se realizó en el Laboratorio de Inmunología. Se emplearon concentraciones de los EM de maca desde 25 µg/ml hasta 25 mg/ml. Cada concentración se probó por triplicado.

### Estudio de citotoxicidad *in vitro*

Para este ensayo se emplearon células en fase exponencial de crecimiento que se depositaron en placas de 96 pocillos en una densidad de 4 x 10<sup>3</sup> células/pocillo empleando 150 µL del medio correspondiente (HeLa: EMEM + 2mM Glutamina + 1% aminoácidos no esenciales + 10% Suero fetal bovino; HT-29: McCoy's 5 aminoácidos + 2mM Glutamina + 10% Suero fetal bovino). Después de 24 h de incubación se procedió a añadir las diluciones seriadas de cada ecotipo. Se empleó buffer fosfato salino (PBS) como control negativo y doxorubicina como control positivo.

Los cultivos se mantuvieron por 72 h, al cabo de este tiempo se realizó el ensayo de punto final aplicando bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a cada monocapa.

El ensayo del MTT está basado en la inhibición de la reducción de la sal de tetrazolio (amarilla) a azul de formazán (azul), insoluble. Esta reducción se produce como consecuencia de la actividad de la succinato deshidrogenasa mitocondrial de las células vivas (Borenfreund et al., 1988). Tras el periodo de incubación se elimina el sobrenadante y se añaden 100 µl de DMSO (Dimetilsulfóxido) para solubilizar los cristales de formazán. Finalmente, se determinó la absorbancia del sobrenadante a 570 nm. Cada concentración se probó por triplicado y se calculó la

media aritmética de absorbancia para cada concentración. El porcentaje de crecimiento viene determinado por el cociente entre la absorbancia media para cada tratamiento y la obtenida para el control. A partir de estos datos se obtiene la concentración que inhibe el 50% del crecimiento celular (IC50).

Todos los ensayos se hicieron por triplicado y se determinó la concentración de cada ecotipo capaz de inhibir el 50% del crecimiento celular (IC50) mediante la relación entre los porcentajes de absorbancia obtenidos y las concentraciones ensayadas.

## Resultados

Los resultados se presentan en la Tabla 1. Los resultados indican que los dos EM del ecotipo amarillo tienen efecto citotóxico sobre las líneas celulares empleadas, dicho efecto fue superior al mostrado por los ecotipos negro y morado; y en el caso del EM del ecotipo amarillo (no almacenado) sobre la línea celular HeLa fue superior al mostrado por Doxorubicina (control de efecto positivo) (0,660 mg/ml versus 1,64 mg/ml respectivamente); sobre HT-29, el EM amarillo (no almacenado) también mostró mejor efecto que la Doxorubicina (0,467 mg/ml versus 4,050 mg/ml). La línea celular más sensible a los ecotipos amarillo, negro y morado fue HeLa.

El EM del ecotipo amarillo conservó su propiedad citotóxica después de dos años de almacenamiento\*, aunque se evidenció reducción de la misma.

## Discusión

Los resultados demuestran que el EM del ecotipo amarillo posee efecto citotóxico superior a los ecotipos morado y negro sobre las líneas celulares de cáncer de cérvix (HeLa) y cáncer de colon (HT-29). Canales et al. (2000) mediante ensayos de viabilidad empleando colorantes vitales, demostraron que los cultivos RAW 264.7 y HT-29 presentaban muy buena tolerancia al extracto acuoso de *L. meyenii*, sus resultados indicarían que la actividad citotóxica del extracto metanólico empleado en el presente estudio tendría relación con los metabolitos secundarios que se encuentran en el EM: alcaloides, flavonoides y antocianinas.

La actividad citotóxica de los alcaloides imidazólicos ha sido reportada por Cui et al., (2003) quienes los denominaron lepidilina 1 y lepidilina 2. El primero mostró una actividad débil sobre una línea celular de carcinoma de ovario humano y la segunda presentó actividad citotóxica sobre 4 de las 8 líneas celulares probadas. Ambos compuestos fueron inactivos contra las líneas celulares A-549, HT-29, PC-3 y A4982LM. Si se compara la actividad del EM empleado con la de los alcaloides purificados, se deduce que la purificación de los principios activos conlleva a un mejor efecto.

**Tabla 1.** Efecto citotóxico del extracto metanólico (EM) de tres ecotipos de *Lepidium peruvianum*, maca, sobre líneas celulares derivadas de tumores humanos. Se muestran las concentraciones en mg/ml capaces de inhibir el 50% del crecimiento celular (IC50). Se observa que el EM del ecotipo amarillo presenta significativo efecto citotóxico. Se evidencia que el tiempo de almacenamiento (\*) influyó en el efecto del EM del ecotipo amarillo, aunque para el caso de la línea HT-29 es similar a la IC50 de la doxorubicina.

Línea Celular	EM ecotipos de maca (mg/ml)				Controles (mg/ml)	
	Negro	Morado	Amarillo	Amarillo*	Doxorubicina	PBS
HeLa	2,4	1,93	0,66	4,17	1,64	-
HT-29	8,32	9,28	0,487	4,29	4,05	-

Existen evidencias que el consumo de vegetales y frutas, especialmente crucíferas reducen la incidencia de muchos tipos de cáncer (Kristal y Lampe, 2002) y se cree que la actividad quimioprotectiva se debe a su contenido de glucosinolatos que inducen en mamíferos la producción de enzimas de fase II de detoxificación (Fahey et al., 2001) y antocianinas con propiedades antiangiogénica, antioxidante y anticarcinogénica (Bagchi et al., 2004). Nachshon-Kedmi et al., (2003) encontraron ambos compuestos en extractos de crucíferas (brasicáceas) y demostraron su actividad antiproliferativa y proapoptótica en células de cáncer de próstata.

Smith et al., (2004) determinaron que los allyl-isotiocianatos producen bloqueo mitótico, pérdida de la adhesión celular y desorganización del citoesqueleto en células HT-29.

González et al., (2005) realizaron una espectroscopia infrarroja de los ecotipos de maca y encontraron un pico intermedio de absorbancia para el ecotipo amarillo correspondiente a los benzilglucosinolatos.

Algunos autores consideran que los constituyentes citotóxicos son isotiocianatos aromáticos originados en las plantas a partir de la hidrólisis de los glucosinolatos por mirosinasa, como por ejemplo benzilisotiocianato y metoxibenzilisotiocianato; por otro lado, las prostaglandinas y los esteroides también son considerados como principios activos capaces de reducir el riesgo de cáncer de mama, estómago e hígado (Valentová y Ulrichová, 2003).

El alcaloide (1R,3S)-1-metiltetrahydro- $\beta$ -carboline-3-ácido carboxílico ha sido reportado como constituyente de la maca con acción antioxidante (Hou et al., 2004).

Por lo tanto, debe realizarse la purificación de los principios activos de los distintos ecotipos de maca a fin de realizar ensayos que permitan demostrar la actividad citotóxica de cada uno de ellos.

### Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por el Consejo Superior de Investigaciones-UNMSM (Proyecto N° 051001061).

### Literatura citada

- Bagchi D., C.K. Sen, M. Bagchi & M. Atalay. 2004. Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. *Biochemistry (Moscow)* 69:75-80.
- Borenfreund, E., H. Babich & N. Martin-Alguacil. 1998. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays — the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicology in Vitro* 2, 1–6.
- Canales M., J. Aguilar, A. Prada, A. Marcelo, C. Huamán & L. Carvajal. 2000. Evaluación nutricional de *Lepidium meyenii* (MACA) en ratones albinos y su descendencia. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. Jun. 50(2).
- Cui B., B.L. Zheng, K. He & Q.Y. Zheng. 2003. Imidazole alkaloids from *Lepidium meyenii*. *J. Nat. Prod.* 66: 1101-1103.
- Fahey J.W., A.T. Zalcman, & P. Talalay. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56: 5-51.
- Hou X.R., Q. Chen, R.H. Cao, W.L. Peng, & A.L. Xu. 2004. A comparative molecular field analysis of cytotoxic beta-carboline analogs. *Acta Pharmacol.* 25:959-965.
- Kristal A.R. & Lampe J.W. 2002. Brassica vegetables and prostate cancer risk: a review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer*. 42: 1-9.
- León C.J., S.M. Gómez, S.J. Morantes, C.P. Cordero & F. Ancizar. 2006. Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares para la valoración de la citotoxicidad in vitro. *Biomédica* 26:161-168.
- Nachshon-Kedmi M., S. Yannai, A. Haj & F.A. Fares. 2003. Indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethane induce apoptosis in human prostate cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* 41: 745-752.
- Smith T.K., E.K. Lund, M.L. Parker, R.G. Clarke R.G. & I.T. Johnson. 2004. Allyl-isothiocyanate causes mitotic block, loss of cell adhesion and disrupted cytoskeletal structure in HT29 cells. *Carcinogenesis* 25 (8):1409-1415.
- Valentová K. & J. Ulrichová. 2003. *Smallanthus sonchifolius* and *Lepidium meyenii* – Prospective andean crops for the prevention of chronic Diseases. *Biomed. Papers* 147 (2):119-130.
- Valentová K., D. Buckiová, V. Kren, J. Peknicova, J. Ulrichová & V. Simánek V. 2006. The in vitro biological activity of *Lepidium meyenii* extracts. *Cell Biol Toxicol.* 22:91-99.
- Zhao J., I. Muhammad, D. Chuck Dunbar, J. Mustafa & I.A. Khan. 2005. New Alkamides from Maca (*Lepidium meyenii*) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:690-693.

