

Citotoxicidad de Arbutinas de *Bacopa procumbens* sobre Línea Celular Cancerígena SiHa

M. Flores Cahuantzi^{1*}, V. López Gayou¹, J. Reyes Leyva²

¹ Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Instituto Politécnico Nacional, Tepetitla, Tlaxcala., México

² Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Metepec, Puebla., México

* marihelfcahuantzi@gmail.com

Resumen— *Bacopa procumbens* es una planta nativa de México. En medicina tradicional, se ha empleado como antimalario, antianémico, antiséptico, antipirético, antiviral, cicatrizante y antibacterial, sin embargo, no existen estudios sobre la actividad citotóxica. Tomando en cuenta la relación quimiotáxica con *Bacopa monieri*, se estudió la actividad citotóxica de los compuestos mayoritarios presentes en *B. procumbens* obtenidos de la fracción orgánica del extracto hidroalcohólico, se probaron concentraciones de 10 a 200 µg/ml durante 24 y 48 horas, mediante la tinción de yoduro de propidio se midió muerte celular obteniendo como resultado que la fracción de arbutinas presenta la mayor actividad citotoxicidad sobre la línea celular cancerígena SiHa a partir de 50 µg/ml después de 48 horas. Los resultados sugieren un uso potencial de arbutinas presentes en la planta de estudio, para tratamiento de cáncer cervicouterino.

Palabras clave— Arbutinas, *Bacopa procumbens*, cáncer cervicouterino, citotóxicidad

I. INTRODUCCIÓN

Bacopa procumbens o *Mercadonia procumbens* es una especie originaria de México, distribuida desde el sur de Estados Unidos a Sudamérica [1] pertenece a la familia Scrophurariaceae, misma de *Bacopa monniera*, de la que se ha reportado actividad antitumoral y citotóxica. [2-4]. *B. procumbens* en la medicina tradicional se ha utilizado como antimalárico, en desórdenes biliares, anemia, antifebril, tratamiento de erupciones cutáneas, antiséptico, cicatrizante [5]. Sin embargo, no existen estudios respecto a la actividad citotóxica. Solo existe en la literatura tres estudios relacionados a esta especie, uno es el estudio del extracto etanólico fraccionado con n-hexano, cloroformo, n- butanol y agua; las fracciones fueron analizadas por medio de cromatografía en columna y HPLC, los datos obtenidos mostraron que la planta contiene 16 compuestos, dos de elucidados por primera vez denominados Procumbósidos A y B [6]. El segundo es el estudio del extracto acuotanolico

que estimula la adhesión y promueve la migración de los fibroblastos 3T3 de ratón desde dosis de 1-50 µg/ml, perfilándolo como posible agente cicatrizante [7].

En la tercera referencia, en la cual basamos nuestro trabajo, se realizó un estudio biodirigido del extracto hidroalcohólico y su actividad antimicrobiana, en el que se obtuvo como resultado, la identificación de compuestos mayoritarios de origen fenólico y efecto antimicrobiano sobre bacterias Gram positivas [8].

II. METODOLOGÍA

Preparación del extracto y fracción orgánica

La muestra de *B. procumbens* fue colectada en el estado de Hidalgo en Octubre, El material vegetal seco y tamizado (40 g) se extrajo con agua: metanol usando reflujo durante 4 horas a 75°C, el procedimiento se repitió 4 veces. El extracto se filtró, concentro a presión reducida y liofilizo en un sistema de alto vacío, posteriormente se conservó a -4°C. Se realizó la bipartición agua: acetato de etilo, posteriormente se fraccionó en columna abierta con un gradiente agua:acetonitrilo.

Cultivo celular

La línea celular SiHa fue cultivada en DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS) y 1% antibiótico (100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin). La células se mantuvieron en incubadora con 5% CO₂. Para cada experimento las células fueron tripsinizadas. Se utilizaron placas de 96 pozos, se sembraron 6000 células, después de 24 horas de incubación fueron tratadas con las fracciones de *B. procumbens* en concentraciones de 10, 50, 100, 200 µg/ml, durante 24 y 48 horas, se determinó la citotoxicidad con yoduro de propidio (IP), el experimento se realizó por triplicado los datos son presentados con media y error estándar de la media (SEM).

El tratamiento estadístico fue realizado con el software GraphPad Prism 6.04.

III. RESULTADOS

Se investigó el efecto de las fracciones obtenidas de la fracción orgánica de la bipartición del extracto de *Bacopa procumbens* sobre la línea celular cancerígena. Las células SiHa fue establecida del cultivo primario de carcinoma escamoso grado II, contiene de 1 a 2 copias del VPH-16, expresa los oncogenes p53 y pRb. Después de tratar a las células con el extracto durante 48 horas se evaluó el efecto en la proliferación y citotóxico mediante yoduro de propidio el cual se une a los ácidos nucleicos sólo cuando disminuye la integridad de la membrana plasmática y nuclear [9]. Como primer paso, se evaluó la actividad del extracto hidroalcohólico y la fracción orgánica obtenida de la bipartición sobre la línea celular SiHa, se observó, que ambos disminuían la proliferación celular a las 48 horas de tratamiento (Fig. 1 y 2).

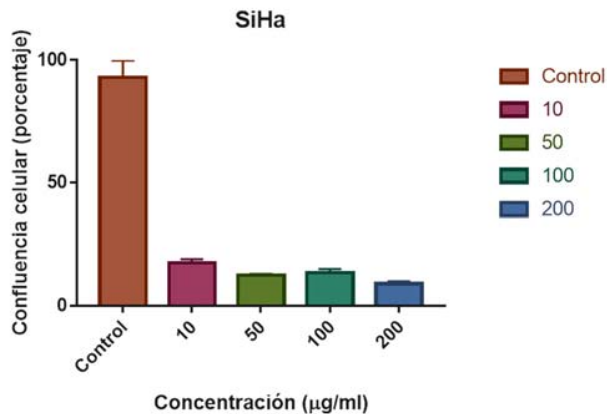


Fig. 1. Efecto del extracto hidroalcohólico en la confluencia celular de células SiHa a las 48 horas.

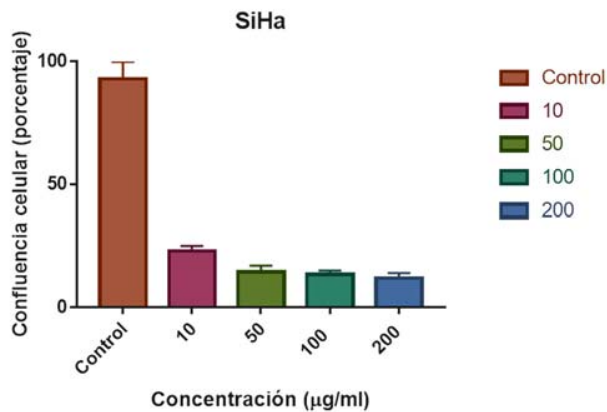


Fig. 2 Efecto de la fracción orgánica en la confluencia celular de células SiHa a las 48 horas.

Confirmando que la fracción orgánica tenía efecto sobre las células tumorales, se procedió a evaluar los compuestos obtenidos de la cromatografía en columna abierta, los cuales fueron en su mayoría compuestos fenólicos (arbutinas, procumgastrodinas A, B y C) y saponinas.

Para cada compuesto y sus mezclas, se evaluó la actividad citotóxica durante 48 horas, se obtuvo como resultado que la confluencia celular disminuía conforme aumentaba la concentración de dicho compuesto (Fig. 3).

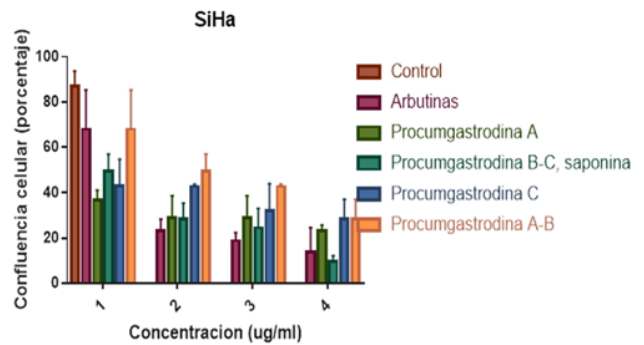


Fig. 3. Confluencia celular de línea celular SiHa a las 48 horas de tratamiento con las fracciones

Para medir muerte celular se utilizó las células positivas a la tinción de yoduro de propidio (IP), obtenidas mediante el cociente del porcentaje de células rojas y el porcentaje de confluencia celular a las 48 horas. Como se observa en la figura 4, la fracción de arbutina producía mayor muerte celular a las 48 horas en comparación con las otras fracciones, en las micrografías se observan las células positivas a IP del tratamiento con arbutinas (fig. 5).

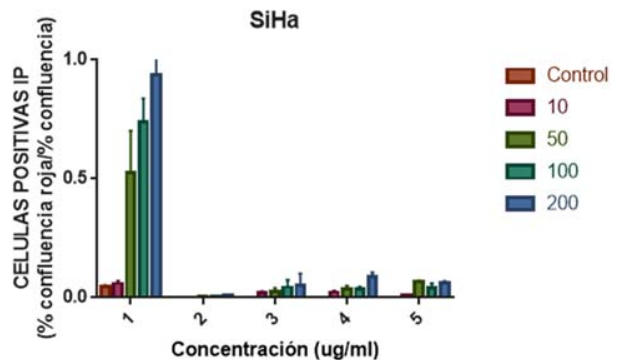


Fig. 4. Células positivas a yoduro de propidio que indican muerte celular.

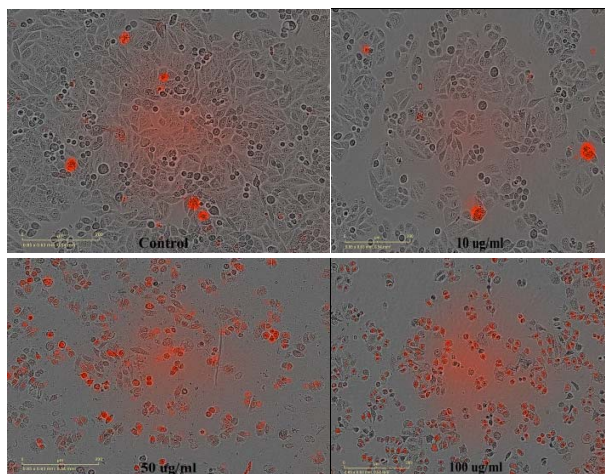


Fig. 5 Micrografías de células rojas positivas a yoduro de propidio 40x Incucyte zoom a diferentes concentraciones de fracción de arbutina.

IV. DISCUSIÓN

La evaluación preliminar del efecto del extracto hidroalcohólico y la fracción orgánica sobre la línea celular SiHa, permitió confirmar la presencia de compuestos con actividad citotóxica, aunque no se midió muerte celular. La fracción acuosa no se evaluó, ya que de acuerdo al estudio hecho por Hernández Beteta en 2017, los compuestos mayoritarios de origen fenólico [10] con probable actividad citotóxica se encuentran en la fracción orgánica. Todas los compuestos de *Bacopa procumbens* conforme aumenta la concentración, provocan una disminución de la confluencia celular siendo más evidente con la fracción de arbutinas a partir de 50 µg/ml. Sin embargo, al hacer la medición de muerte celular, la actividad citotóxica de las fracciones de procumgastrodinas, no ejercen un efecto significativo como las arbutinas, este resultado es comparable a lo reportado por Hailan *et al.* 2011, donde concluye que las arbutinas inhiben la proliferación de las células de carcinoma de vejiga por regulación del gen p21 que bloquea el ciclo celular en la transición G1/S, permitiendo a la célula reparar el ADN dañado antes de replicarse [11].

V. CONCLUSIÓN

En México más del 90% de la población usa las plantas medicinal para el tratamiento de diferentes enfermedades incluyendo el cáncer [12]. Los pacientes con cáncer perciben a las plantas medicinales como eficientes y seguras debido a su origen natural, a pesar de pocos estudios farmacológicos que respaldan su uso.

En tono rimbombante, aproximadamente el 60% de los medicamentos actualmente utilizados para el tratamiento del cáncer han sido aislados de productos naturales, subrayando el potencial terapéutico de los extractos de plantas en el cáncer. Nuestros estudios indican que las arbutinas de *B. procumbens* tienen potencial uso como tratamiento para cáncer cervicouterino, debido a la gran cantidad de compuestos fenólicos presentes en el extracto.

Agradecimientos

Al Instituto Politécnico Nacional. Centro de investigación Biomédica de Oriente, IMSS y al Conacyt por apoyo de becas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Rzedowski, G. C. de, J. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a. ed., la reimp., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán), 2005, pag. 1406.
- [2] Ling Peng, Yun Zhou, De Yun Kong, Wei Dong Zhang. Antitumor Activities of Dammarane Triterpene Saponins from *Bacopa monniera*. *Phytotherapy Research*. 24(1): 864–868, 2010. DOI: 10.1002/ptr.3034
- [3] Rohini C. S. Shyamala Devi. *Bacopa monniera* Extract Induces Apoptosis in Murine Sarcoma Cells (S-180). *Phytoterapy Research* 22(1), 595–1598, 2008. DOI: 10.1002/ptr.251
- [4] Md. Nasar Mallick, Md. Salman Akhtar, Mohd. Zeeshan Najm E.T. Tamboli, Sayeed Ahmad, Syed Akhtar Husain. Evaluation of anticancer potential of *Bacopa monnieri* L. against MCF-7 and MDA-MB-231 cell line. *Journal of Pharmacy Bioallied Sciences* 7(4): 325–328, 2015. DOI: 10.4103/0975-7406.168038
- [5] Heike, ED. Vibrans. Malezas de México 2006. Disponible en: www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/scrphulariaceae/bacopa-procumbens/ficha
- [6] Anunendra Pathak, D.K. Kulshreshtha, Rakesh Maurya. Chemical constituents of *Bacopa Procumbens*. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 19(2), 131-136, 2006. DOI: 10.1080/14786410410001704732
- [7] Hidalgo Alegría O. Determinación del efecto cicatrizante del extracto acuotánico de la planta *Bacopa procumbens* en la línea celular 3t3 de fibroblastos de ratón. Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México. 2010
- [8] Hernández Beteta E.E. Estudio biotecnológico del extracto hidroalcohólico de *Bacopa procumbens* en la biosíntesis de nanoestructuras metálicas y su actividad antimicrobiana. Instituto Politécnico Nacional. Maestría Biotecnología Aplicada. Tlaxcala, 2017
- [9] Domínguez Fabiola, Paola Maycotte, Adilene Acosta-Casique, Sofia Rodríguez-Rodríguez, Diego A. Moreno, Federico Ferreres, *et al.* *Bursera copallifera* Extracts Have Cytotoxic and Migration Inhibitory Effects in Breast



- Cancer Cell Lines. Interactive Cancer Therapies I-II, 2018. DOI:10.1177/15347354187664
- [10] Gioti K, Tenta R. Bioactive natural products against prostate cancer mechanism of action and autophagic/apoptotic molecular pathways.;81 (7):543-562,2015. DOI: 10.1055/s-0035-1545845
- [11] Hailan Li, Yun-Mi Jeong, Su Yeon Kim, Myo-Kyoung Kim, Dong-Seok Kim. Arbutin inhibits TCCSUP human bladder cancer cell proliferation via up-regulation of p2. Pharmazie 66: 306–309, 2011. DOI: 10.1691/ph.2011.0785
- [12] Alonso-Castro AJ, Villarreal ML, Salazar-Olivo LA, Gomez-Sanchez M, Dominguez F, Garcia-Carranca A. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, Phytochemical and ethnobotanical studies. *J Ethnopharmacol.* 133(3):945-972, 2011 DOI: 10.1016/j.jep.2010.11.055.