

# Actividad inhibitoria de la liriodenina en la línea celular de adenocarcinoma de mama MCF-7

María Adelina Schlie-Guzmán<sup>1</sup>

Nelsi Alejandra Burguete A.<sup>1</sup>

Alma Rosa González-Esquinca<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Libramiento Sur Poniente número 1150, colonia Lajas Maciel, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, C.P. 29000. [adelina.schlie@unicach.mx](mailto:adelina.schlie@unicach.mx)

## RESUMEN

El alcaloide oxoaporfínico liriodenina presenta actividad citotóxica en líneas celulares cancerosas y ha sido señalado como un buen candidato para el desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos, sin embargo su efecto en las células normales no ha sido aún reportado. Utilizando ensayos *in vitro* de la proliferación celular, en este estudio se comparó la actividad de la liriodenina aislada de *A. lutescens* Saff. sobre la línea cancerosa de mama MCF-7 y en cultivos primarios de linfocitos de bazo murinos, utilizando la doxorubicina como fármaco antineoplásico de referencia. Los resultados muestran que la liriodenina y la doxorubicina inhiben la proliferación de las células MCF-7 de manera dosis dependiente con una  $DI_{50}$  para ambos compuestos de 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Interesantemente, la menor concentración del alcaloide que produjo una inhibición significativa ( $P \leq 0.05$ ) fue de 0.001  $\mu\text{g}/\text{mL}$  la cual fue 10 veces menor a la encontrada para el fármaco de referencia. Estadísticamente, las concentraciones menores de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de liriodenina muestran un efecto menor en los linfocitos murinos que en las células transformadas. Estos datos permiten conocer en las células MCF-7 los rangos seguros de la posible administración del alcaloide, sin comprometer excesivamente a las células normales.

**Palabras clave:** liriodenina, antiproliferativo, cáncer.

## ABSTRACT

The alkaloid oxoaporfínico liriodenine shows a cytotoxic activity on neoplastic cells lines and is pointed out as a good candidate for the development of new anti cancer drugs. However its effect on normal cells has not yet been reported. In this study the activity of the isolated liriodenine from *A. lutescens* Saff. on breast cancer line MCF-7 and in primary cultures of murine spleen lymphocytes using *in vitro* cell proliferation assays was compared; the doxorubicin as an antineoplastic reference drug was used. Our results show that the liriodenine and the doxorubicin inhibit both the proliferation of MCF-7 cells, with a  $DI_{50}$  of 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Interestingly the lowest alkaloid concentration that produced a significant inhibition ( $P \leq 0.05$ ) was 0.001  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and it is 10 times lower than that found for the reference drug. Concentrations below 1  $\text{mg}/\text{mL}$  of liriodenine statistically have less effect in murine lymphocytes than in the transformed cells. These data allow knowing in MCF-7 cells, the safe ranges of its possible administration, without excessively compromising normal cells.

**Keywords:** liriodenine, antiproliferative, cancer.

## INTRODUCCIÓN

Las propiedades medicinales de las plantas son atribuidas a la producción de moléculas de bajo peso molecular denominadas metabolitos secundarios (fenoles, flavonoides, taninos, cumarinas, esteroides, alcaloides y otros compuestos) cuya función se ha relacionado con la interacción de las plantas con su entorno; sin embargo al ser químicamente activos, pueden actuar en otros sistemas biológicos modificando sus procesos fisiológicos y exhibiendo de manera natural actividades biológicas como la antifúngica, antimicrobiana, insecticida, citotó-

xica etc. (Anaya y Espinosa-García, 2006). Por ello, estos compuestos son una de las fuentes más importantes en la búsqueda de moléculas activas para el desarrollo de nuevos medicamentos.

Se ha documentado que los alcaloides derivados de isoquininas, como los aporfínoides presentan un rango amplio de actividades como antiparasitaria, antimicrobiana, antifúngica, antitumoral y sobre el sistema nervioso central (Muñoz *et al.*, 2006). Dentro de este grupo se encuentra la oxoaporina denominada liriodenina que es una molécula plana, de color amarillo y fluorescente que ha sido aislada de diversas familias de plantas y es

el alcaloide apofinico más abundante en la familia Annonaceae (González-Esquinca, 2005)

Diversos estudios señalan que este alcaloide tiene efectos inhibitorios sobre la proliferación de células cancerosas de pulmón, hígado y mama (Wu *et al.*, 1990; Chang *et al.*, 2004; Hsieh *et al.*, 2005), y su actividad se ha relacionado con la inhibición de la topoisomerasa II (Woo *et al.*, 1979; Li *et al.*, 2009) lo que llevaría al bloqueo del ciclo celular. Por lo anterior se le ha señalado como un buen candidato para el desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos; sin embargo un compuesto para ser considerado como de uso potencial debe presentar una adecuada selectividad sobre las células cancerosas sin afectar de manera excesiva a las normales. Utilizando ensayos de proliferación celular en este estudio se comparó la actividad *in vitro* de la liriodenina aislada de extractos alcaloidales de *Annona lutescens* Saff. (Annonaceae) en la línea de adenocarcinoma humano de mama MCF-7 y en cultivos primarios de linfocitos de bazo de ratones normales, utilizando como fármaco antineoplásico de referencia la doxorubicina.

## MÉTODO

### Aislamiento de la liriodenina

Se molió hasta polvo fino 50 g de raíces de *Annona lutescens* Saff. que se saturaron con una solución concentrada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . El polvo se secó a temperatura ambiente y se extrajo con  $\text{CHCl}_3$ . El extracto se refinó en tres ocasiones mediante una extracción ácido-base con  $\text{CHCl}_3$  siguiendo el método reportado por de la Cruz y González-Esquinca (2012). Se obtuvo 23 g de extracto alcaloidal, del que se precipitó un sólido amarillo que se purificó por medio de recristalizaciones con  $\text{CHCl}_3$ -MeOH hasta obtener 4.3 mg de liriodenina (p.f. 280-282 °C) (figura 1).

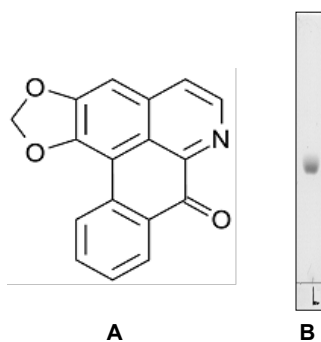


FIGURA 1

Liriodenina, A. Estructura química. B. Cromatografía en placa fina corrida con  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 9:1 y revelado con el reactivo de Dragendorff.

### Líneas celulares

La línea humana de adenocarcinoma mamario MCF-7 (ATCC Manassas, VA. USA) fue mantenida con medio de cultivo D-MEM/F12 (Invitrogen, México) suplementado con 10% de suero fetal bovino (medio completo). Los linfocitos murinos se obtuvieron de ratones Balb/c normales, sacrificados humanitariamente de acuerdo a las normas de la Asociación Mexicana para Animales de Laboratorio (AMCAL). Asépticamente el bazo fue removido y las células disociadas mediante su paso por una malla. Las células se recolectaron en un tubo cónico y los eritrocitos presentes se lisaron con una solución 0.15 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1.0 mM  $\text{KHCO}_3$  y 0.1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ; los linfocitos resultantes fueron lavados por centrifugación con una solución amortiguada de fosfatos pH 7.2 y finalmente resuspendidos en medio completo. Todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad (Kruisbeek, 1994).

### Ensayos en los cultivos celulares

Las células fueron sembradas en 100  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo completo en placas de 96 pozas a una densidad de  $1 \times 10^4$  células MCF-7 o  $4 \times 10^6$  linfocitos murinos por poza y mantenidas a 37°C en atmósfera húmeda con 5 % de  $\text{CO}_2$  durante toda la noche. Al día siguiente se añadió liriodenina o el fármaco de referencia doxorubicina a concentraciones finales de 20, 10, 1, 0.1, 0.001 y 0.0001  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La viabilidad (linfocitos) o la proliferación (células MCF-7) celular fue analizada después de 48 h de exposición, utilizando 10  $\mu\text{L}$  de MTT (5mg/mL) de acuerdo al método reportado por Mosmann (1983) y la absorbancia medida con un lector de microplacas (Biorad, Hércules CA, USA) a 570 nm de longitud de onda. Cada prueba se realizó por triplicado y en cuatro ensayos independientes. El porcentaje de proliferación o viabilidad se calculó considerando como 100 % el valor obtenido en las células control (sin tratamiento). La concentración de liriodenina o doxorubicina que redujo al 50% la proliferación o viabilidad celular en relación a las células control (dosis inhibitoria media o  $\text{DI}_{50}$ ) fue determinada gráficamente mediante curvas de dosis-respuesta.

### Análisis estadístico

La diferencia estadística entre los tratamientos y las células control fue calculado mediante el análisis de varianza (ANDEVA) de una sola vía y la prueba *a posteriori* de Bonferroni en donde  $P < 0.05$  fue considerado significativo

## RESULTADOS

Los resultados indican que la liriodenina y el fármaco antineoplásico de referencia afectan a los linfocitos normales

murinos únicamente en concentraciones altas aunque la viabilidad celular nunca fue menor a 50% respecto de las células control. Así en las concentraciones más altas (10 y 20 µg/mL), la lirioidenina permitió un 51% de viabilidad celular en tanto que la doxorubicina el 69% (tratadas vs controles); en el rango desde 1.0 hasta 0.0001 µg/mL el efecto de la lirioidenina y la doxorubicina fue desde moderado hasta nulo (desde 90.1 hasta 100% y 87.4 a 99.8%, respectivamente). Estos ensayos permiten conocer el rango de concentración del alcaloide en donde menos se perturba a las células normales así como registrar las concentraciones donde pueden producirse los efectos indeseables.

Por otro lado, en la línea celular de adenocarcinoma mamario MCF-7 se encontró una reducción de la proliferación dependiente de la concentración de los compuestos. Así, en la menor concentración (0.0001

µg/mL), la lirioidenina permitió 91% de proliferación y la doxorubicina el 87% (tratadas vs controles), en tanto que a la mayor concentración (20 µg/mL), la proliferación se redujo hasta el 29.5% en las células expuestas a lirioidenina y 35% con doxorubicina (cuadro 1). Aunque para ambos compuestos la  $DI_{50}$  es aproximadamente de 4 µg/mL, es importante señalar que la concentración mínima que produjo una inhibición significativa de la proliferación ( $P \leq 0.05$ ) fue de 0.001 µg/mL en el caso de la lirioidenina, y de 0.01 µg/mL para la doxorubicina; es decir la lirioidenina fué 10 veces más activa en las células cancerosas que el fármaco control (cuadro 1). Utilizando lirioidenina extraída de *Zanthoxylum nitidum* (Rutaceae) y esta misma línea neoplásica, Yang *et al.* (2009), encontraron una  $DI_{50}$  de 2.19 µg/mL, por lo que ambos estudios son coincidentes.

		0.0001	0.001	0.01	0.1	1	10	20
Viabilidad de linfocitos murinos (%)	Lirioidenina	100.0	96.8	91.4	91.2	90.1	51.2	53.7
	Doxorubicina	99.8	90.3	84.7	94.1	87.4	75.5	69.1
Proliferación de las células MCF-7 (%)	Lirioidenina	91.1	75.7	75.6	68.0	60.5	32.1	29.5
	Doxorubicina	87.0	89.8	80.1	83.2	63.6	42.8	34.9

CUADRO 1 Efecto de las concentraciones de lirioidenina y del doxorubicina (µg/mL) en los cultivos celulares

Diferencias estadísticas respecto a las células control ( $P \leq 0.05$ ).

El efecto comparativo de la lirioidenina entre ambos tipos celulares muestra que existen diferencias importantes y en donde es posible separar dos rangos de afectación a las células. En el primero con concentraciones bajas del alcaloide (0.0001 a 1 µg/mL), la proliferación celular de las células transformadas MCF-7 es abatida a medida que se incrementa la concentración, en tanto que la viabilidad en las células normales se conserva. y la diferencia entre ambas líneas celulares es significativa ( $P \leq 0.05$ ) especialmente de 0.001 a 1 µg/mL. Lo anterior pudiera indicar el rango donde la lirioidenina ejerce su mayor efecto en las células neoplásicas sin afectar excesivamente a las normales. En el segundo rango con concentración alta del compuesto (1 a 20 µg/mL), se compromete la sobrevivencia no solo de las células transformadas sino también de las normales, por lo que podrían descartarse en trabajos futuros, especialmente en ensayos con modelos *in vivo* (figura 2). Una alternativa para buscar una menor toxicidad a las células normales y una mayor solubilidad del compuesto podría ser la modificación estructural del compuesto posiblemente a partir de los átomos N-7 y O-8 carbonilo (Liu *et al.*, 2009).

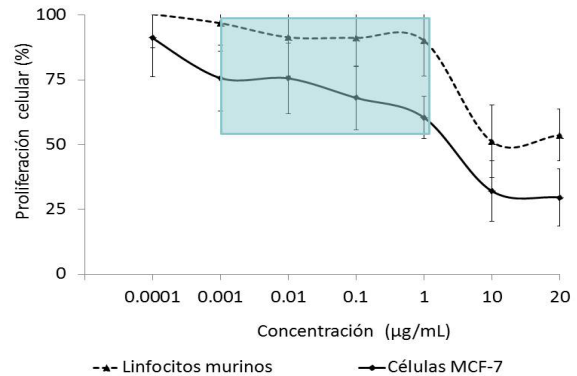


FIGURA 2

Efecto de las concentraciones de la lirioidenina en los linfocitos normales murinos y la línea celular neoplásica MCF-7. Diferencias estadísticas entre ambas líneas celulares.

En la línea de células de cáncer de pulmón A549 y mediante análisis de citometría de flujo Chang *et al.* (2004) reportaron que la lirioidenina bloqueó la progresión del ciclo celular durante la transición de G2/ M y condujo a

la activación de las proteínas caspasas mediadoras de la inducción de la apoptosis o muerte celular programada. Estas características deseables en un fármaco antineoplásico además del conocimiento de las dosis terapéuticas lejanas de las nocivas, abre la posibilidad de iniciar los trabajos *in vivo* con modelos animales, a fin de conocer su efecto e interacción en los múltiples sistemas que integran al organismo.

## CONCLUSIONES

*Annona lutescens* (anona amarilla) es un recurso natural de México y Centroamérica con abundante produc-

ción de liriodenina y otros compuestos activos, que pudieran servir para el desarrollo de nuevos fármacos. La liriodenina posee actividad antiproliferativa a diferentes concentraciones sobre la línea celular cancerosa MCF-7 y es más activa que el fármaco de referencia doxorubicina; de manera importante las concentraciones menores de 1 µg/mL del alcaloide presentan una adecuada especificidad hacia las células transformadas sin comprometer excesivamente a las normales, lo que permite visualizar a la liriodenina como un candidato importante para el desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos.

## LITERATURA CITADA

- ANAYA, A.L. Y F.J. ESPINOSA-GARCÍA, 2006. La química que entreteje a los seres vivos. *Ciencias* 83: 4-13.
- CHANG, H.C., F.R. CHANG., WU, Y.C., LAI & Y.C, 2004. Anti-Cancer Effect of Liriodenine on Human Lung Cancer Cells. *Kaohsiung J Med Sci.* 20:365-71.
- DE-LA-CRUZ-CHACÓN, I. & A.R. GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2012. Liriodenine Alkaloid in *Annona diversifolia* During Early Development. *Nat Prod Res.* 26 (1): 42-49.
- GONZÁLEZ-ESQUINCA A.R, 2005. Familia Annonaceae en Chiapas y sus metabolitos. *Ciencia y Tecnología de la Frontera.* 3: 41-51.
- HSIEH, T.J., T.Z. LIU., C.L. CHERN., D.A. TSAO., F.J. LU., Y.H. SYU., P.Y. HSIEH., H.S. HU., T.T. CHANG. & C.H. CHEN, 2005. Liriodenine Inhibits the Proliferation of Human Hepatoma Cell Lines by Blocking Cell Cycle Progression and Nitric Oxide-Mediated Activation of p53 Expression. *Food Chem Toxicol.* 43 (7): 1117-1126.
- KRUISBEEK, A.M., 1994. Isolation of Mouse Mononuclear Cells. En: Coligan JE *et al.* (eds) *Current Protocols in Immunology.* 3.1.1-3.1.5 p.
- LIU, Y.C., Z.F. CHEN., L.M. LIU., Y. PENG., X. HONG., B. YANG., H.G. LIU., H. LIANG. & C. ORVIG, 2009. Divalent Later Transition Metal Complexes of the Traditional Chinese Medicine (TCM) Liriodenine: Coordination Chemistry, Cytotoxicity and DNA Binding Studies. *Dalton Trans.* 48: 10813-10823.
- MOSMANN, T., 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Methods* 65 (1-2): 55-63.
- MUÑOZ, V., M. SAUVAIN., A. FOURMET., B. WENIGER., A. VALENTIN., M. MALLIÉ., J. CALLAPA., E. DEHARO Y P. DURET, 2006. Actividad antipalúdica y potenciación de la cloroquina con alcaloides aporfínicos *in vitro*. *Cuadernos del hospital de clínicas* 47 (1): 87-91.
- WOO, S.H., M.C. REYNOLDS., N.J. SUN., J.M. CASSADY & R.M. SNAPKA, 1997. Inhibition of Topoisomerase II by Liriodenine. *Biochem Pharmacol.* 54: 467-473.
- WU, Y.C., C.Y. DUH., S.K. WANG., K.S. CHEN & T.H. YANG, 1990. Two New Natural Azafluorene Alkaloids and a Cytotoxic Aporphine Alkaloid from *Polyalthia longifolia*. *J. Nat Prod.* 53: 1327-1331.
- YANG, C.H., M.J. CHENG., S.J. LEE., C.W. YANG, H.S. CHANG & I.S. CHEN, 2009. Secondary Metabolites and Cytotoxic Activities from the Stem Bark of *Zanthoxylum nitidum*. *Chem Biodivers.* 6 (6): 846-857.