

EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO *IN VITRO* DE DIFERENTES EXTRACTOS DE LA PLANTA MEDICINAL *IBERVILLEA SONORAE*

Yolanda García-Huante^{a,b}, A. I. Cabrera Llanos^a, J. L. Castrejón-Flores^a, María Guadalupe Ramírez-Sotelo^a

^aUnidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI-IPN), Ciudad de México, ygarciah@ipn.mx, acabrerall@ipn.mx, jlcastrejon@ipn.mx, mgramirez@ipn.mx

^bUnidad Profesional Interdisciplinaria en Ingeniería y Tecnologías Avanzadas (UPIITA-IPN), Ciudad de México, ygarciah@ipn.mx

RESUMEN

Ibervillea sonora es una planta ampliamente utilizada en la medicina tradicional mexicana para disminuir los niveles de glucosa en sangre. Asimismo, la presencia de actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, y citotóxica ha sido reportada previamente. En este estudio, se evaluó el efecto citotóxico de cuatro diferentes extractos generados a partir de la raíz de *I. sonora* sobre la línea celular THPI de monocitos de leucemia aguda. Los cuatro diferentes extractos, denominados A, B, C y D, mostraron citotoxicidad en diferente grado, y su concentración inhibitoria media (CI₅₀) fue estimada de 50, 87, 105 y 95 µg/mL, respectivamente. Lo cual sugiere que *I. sonora* es una fuente potencial de agentes antitumorales que podrían utilizarse para el diseño de fármacos de uso terapéutico.

Palabras claves: *Ibervillea sonora*, actividad citotóxica, ensayo de MTT

ABSTRACT

Ibervillea sonora is a plant widely used in traditional Mexican medicine to lower blood glucose levels. In addition, antimicrobial, anti-inflammatory, and cytotoxic activity has been previously reported. In this study, the cytotoxic effect of four different extracts generated from the root of *I. sonora* on the THPI cell line of acute leukemia monocytes was evaluated. The four different extracts, named A, B, C, and D, showed cytotoxicity to varying degrees, and their mean inhibitory concentration (IC₅₀) was estimated at 50, 87, 105, and 95 µg/mL, respectively. This suggests that *I. sonora* is a potential source of antitumor agents that could be used for the design of drugs for therapeutic use.

Key words: *Ibervillea sonora*, cytotoxic activity, MTT assay

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, el interés por el uso de plantas medicinales como una alternativa para obtener nuevos fármacos se ha incrementado debido a su gran variedad y a la complejidad de los metabolitos secundarios que producen, y a lo largo de la historia, se han utilizado para el tratamiento de diferentes enfermedades, contribuyendo de manera importante al desarrollo de la medicina moderna, siendo fuente potencial de una amplia variedad de compuestos con

diferentes actividades terapéuticas [1]. En México, existe una gran diversidad de plantas con propiedades medicinales, tal es el caso de *Ibervillea sonora*, cuyo uso principal en la medicina tradicional se debe a su efecto hipoglucemiante [2]. Sin embargo, se ha reportado su capacidad por producir compuestos con actividad antimicrobiana, anti proliferativa, antioxidante, y antiinflamatoria [3]. Es por ello que, el objetivo principal de este trabajo fue evaluar el efecto citotóxico de diferentes extractos de *I. sonora* sobre la línea celular THPI de linfocitos de leucemia aguda, mediante el ensayo de MTT [4], para conocer el posible potencial anticancerígeno que los metabolitos generados por esta planta puedan tener.

2. TEORÍA

A lo largo de la historia, los productos naturales han constituido una fuente importante de recursos utilizados por el ser humano con múltiples fines [5]. En particular, el desarrollo de técnicas científicas durante el último siglo ha permitido el aislamiento de compuestos bioactivos a partir de diversas especies vegetales en su forma pura, lo que ha facilitado su aplicación en el ámbito terapéutico [6]. En este contexto, numerosas fitomoléculas han sido empleadas directamente como agentes farmacológicos o han servido como modelos estructurales para la síntesis de fármacos con alta eficacia terapéutica [7]. Considerando estas propiedades, numerosas investigaciones se han llevado a cabo para evaluar de forma exhaustiva extractos de plantas, con el propósito de descubrir compuestos de origen vegetal con potencial actividad anticancerígena [8].

I. sonora, la cual pertenece a la familia *Cucurbitaceae* y mejor conocida como “wareke”, ha sido ampliamente utilizada por distintos grupos étnicos del noroeste de México como parte de la medicina tradicional para el tratamiento de diversas afecciones tales como: artritis, infecciones cutáneas leves, reumatismo, diabetes, y cáncer. Así, diversas investigaciones han proporcionado evidencia que respalda las propiedades terapéuticas de su raíz, destacando su actividad hipoglucemiante, antidiabética, anti proliferativa, así como su capacidad para inducir procesos apoptóticos [3]. En este sentido, diferentes extractos de esta planta han sido estudiados, y se ha reportado su actividad citotóxica sobre diferentes líneas celulares [9, 10]. Dicha actividad es atribuida principalmente a compuestos conocidos como cucurbitacinas, los cuales son triterpenos con estructura similar a los esteroides, sin embargo, la cantidad y diversidad de metabolitos que puede producir esta planta, es muy amplia [11].

Desde esta perspectiva, y tomando en cuenta que la actividad biológica de los extractos generados de esta planta medicinal podría variar dependiendo del método de obtención, así como del rendimiento de cada fitopreparado, resulta pertinente continuar profundizando en las investigaciones de las propiedades anticancerígenas de diferentes extractos obtenidos a partir de la raíz de *I. sonora*.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Con el fin de evaluar la actividad citotóxica de la planta medicinal *I. sonora*, cuatro diferentes extractos fueron generados. Así, para cada uno de estos extractos, trozos de la raíz de *I. sonora* se lavaron con agua destilada para eliminar tierra o cualquier otro tipo de suciedad. Posteriormente, se secaron a no más de 40°C durante 24 horas. Después de esto, los trozos de

la raíz ya limpios y secos se molieron hasta obtener un polvo fino. Una vez que se tuvo la raíz molida, esta fue sometida a diferentes procesos descritos a continuación.

3.1 Generación de los Extractos A y B

Para generar el extracto A y evaluar si el tiempo de maceración influye en la actividad citotóxica, se pesaron 700 gramos de la raíz molida, y se dejaron macerar durante quince días, en 4 litros de una disolución etanol-agua 50:50 a temperatura ambiente, protegido de la luz y en agitación constante. Pasado ese tiempo y mediante centrifugación, se retiraron los sólidos, reservando la parte líquida, para continuar con su procesamiento. Al extracto se le concentró por medio de rotavapor, hasta la eliminación completa de la parte etanólica; posteriormente, la parte acuosa y concentrada del extracto se sometió a un proceso de secado por aspersión, para la obtención del extracto en forma de polvo fino.

Para generar el extracto B, se siguió el mismo procedimiento que se acaba de explicar, y la única diferencia consistió en que el tiempo de maceración fue de 20 días.

3.2 Generación del Extracto C

Se pesaron 700 gramos de la raíz molida, y se dejaron macerar durante quince días, en 4 litros de una disolución etanol-agua 80:20 a temperatura ambiente, protegido de la luz y en agitación constante. Pasado ese tiempo y mediante centrifugación, se retiraron los sólidos, reservando la parte líquida, para continuar con su procesamiento. Al extracto se le concentró por medio de rotavapor, hasta la eliminación completa de la parte etanólica; posteriormente la parte acuosa y concentrada del extracto se sometió a un proceso de secado por aspersión, para la obtención del extracto en forma de polvo fino.

3.3 Generación del Extracto D

Se pesaron 350 gramos de la raíz molida de *I. sonorae*, y se adicionaron a 1L de agua desionizada grado miliQ; esta disolución se llevó a ebullición durante 15 min, con agitación constante. Una vez obtenida la infusión, esta fue secada por aspersión para la obtención del extracto en forma de polvo fino para su posterior evaluación.

3.4 Ensayo de citotoxicidad utilizando MTT

Para evaluar la citotoxicidad se pesó lo necesario para preparar una disolución de cada uno de los extractos a 1000 µg/mL, y a partir de esta, se prepararon diferentes disoluciones a las siguientes concentraciones: 7.81, 15.62, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 700, y 1000 µg/mL, respectivamente, incluyendo el control negativo (0 µg/mL). Por otro lado, se prepararon cultivos con 50 µL de medio RPMI fresco conteniendo 1×10^4 células THP-1 por pocillo, en una placa de cultivo de 96 pozos. Las células fueron incubadas durante 4 horas a 37°C y un 5% de saturación de CO₂; transcurrido ese tiempo, a cada pozo se le adicionaron 50 µL de cada una de las disoluciones mencionadas anteriormente, y las células se incubaron durante 24 y 48 horas. Cabe señalar que, con esta dilución, las concentraciones evaluadas de cada uno de los extractos resultaron estar a la mitad de la disolución de partida (ver Resultados), y el volumen final del cultivo fue de 100 µL por pocillo. El efecto citotóxico de cada uno de los

extractos se evaluó mediante la reducción metabólica de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenada, de acuerdo con lo reportado por Kumar, 2018 [4]. Por lo que, después de 24 y 48 horas de exposición, la actividad enzimática se midió utilizando un espectrofotómetro ThermoScientific a una longitud de onda de 570 nm. El porcentaje de viabilidad fue calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{Viabilidad} = (\text{DO células tratadas} / \text{DO células control}) \times 100$$

Cabe señalar, que estos resultados representan el promedio de los resultados obtenidos por al menos tres ensayos independientes, realizados

3.5 Resultados

De acuerdo con los resultados obtenidos de la citotoxicidad presente en los extractos A y B (**Fig.1a, 1b**), ambos extractos presentaron actividad citotóxica frente a las células THP-1 de leucemia aguda. Asimismo, a partir de estos resultados se determinó la concentración inhibitoria media (CI₅₀), estimándose de 50 µg/mL y de 80 µg/mL, después de 48 horas de incubación para los extractos A y B, respectivamente. Observando que, con un tiempo de maceración de 15 días, el extracto A fue más activo que el B, por lo que a partir de este experimento se decidió trabajar a una condición de 15 días de maceración. Cabe señalar que, a 24 horas de exposición y bajo todas las concentraciones evaluadas de ambos extractos, jamás se alcanzó una CI₅₀. Además, el daño celular ocasionado por los extractos A y B, pudo confirmarse al observarlas bajo el microscopio (**Fig. 1c**), pues se ven rotas y transparentes, como sacos vacíos que han perdido sus componentes celulares internos, sugiriendo así la activación de apoptosis por ambos extractos.

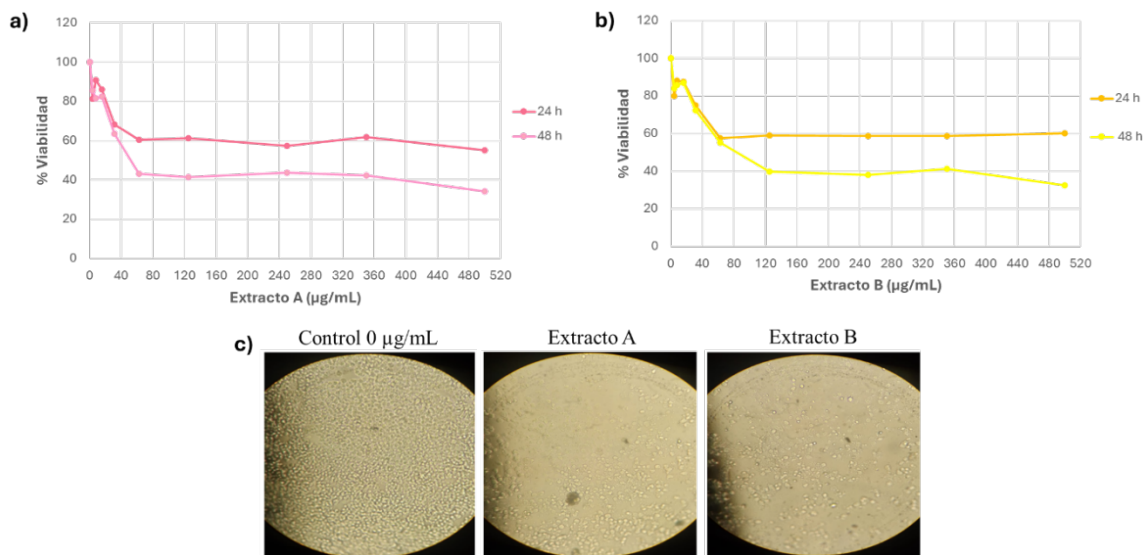


Figura 1. Porcentaje de viabilidad *in vitro* de células THP1 cultivadas con diferentes concentraciones de extracto de la raíz de *I. sonorae* a las 24 y 48 horas de incubación. a) Extracto A, extracto hidroetanólico 50:50 con un tiempo de maceración de 15 días. b) Extracto B: extracto hidroetanólico 50:50 con un tiempo de maceración de 20 días. c) Células THP1 vistas al microscopio (40X) después de 48 horas de incubación sin ningún tipo de extracto (Control), con el extracto A, y con el extracto B, respectivamente, ambos a 125 µg/mL

Al igual que con los extractos A y B, los resultados obtenidos en los ensayos de MTT con los extractos C y D (**Fig. 2a y 2b**) indicaron que, a las 24 horas de exposición, no se alcanzó una CI_{50} ; observándose el mayor efecto de los extractos C y D a las 48 horas, y estimando a este tiempo una CI_{50} de 100 y de 190 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Asimismo, el daño celular observado (**Fig. 2c**) sugiere que tanto el extracto C, como el extracto D inducen el proceso de apoptosis, al igual que lo observado con los extractos A y B.

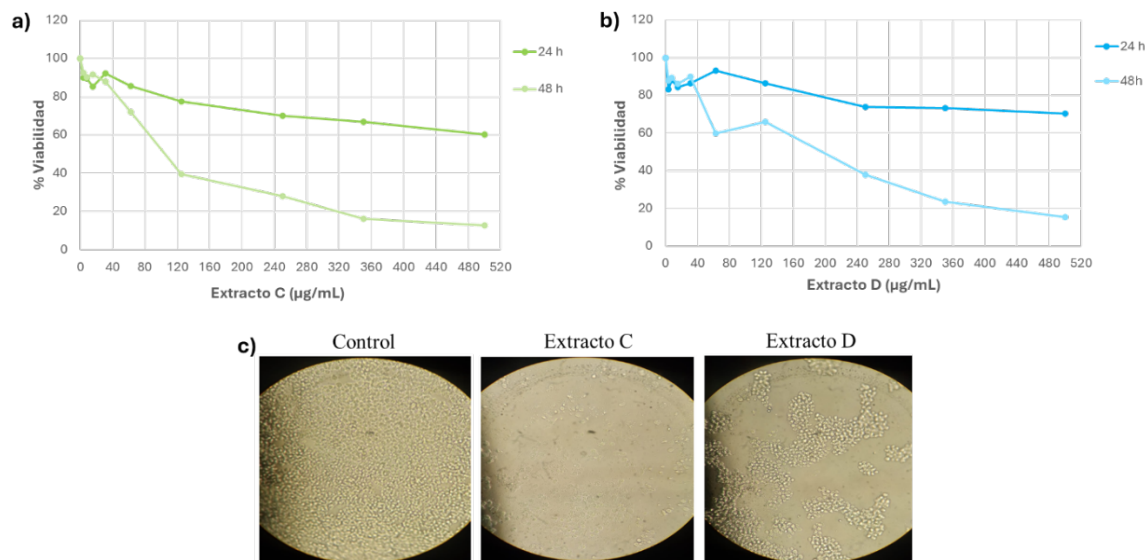


Figura 2. Porcentaje de viabilidad *in vitro* de células THP1 cultivadas con diferentes concentraciones de extracto de la raíz de *I. sonorae* a las 24 y 48 horas de incubación. a) Extracto C, extracto etanol:agua 80:20 con un tiempo de maceración de 15 días. b) Extracto D: extracto acuoso c) Células THP1 vistas al microscopio (40X) después de 48 horas de incubación, sin ningún tipo de extracto (Control), con el extracto C, y con el extracto D, respectivamente, ambos a 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$

4. CONCLUSIONES

- De acuerdo con los resultados, todos los extractos de la planta mostraron un efecto citotóxico sobre la línea celular THP-1, observando el mayor efecto a las 48 horas de exposición.
- La concentración inhibitoria media (CI_{50}) de los extractos A, B, C y D, fueron de 50, 87, 105, y de 195 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.
- El daño celular observado sugiere que los extractos indujeron apoptosis a las células THP-1.
- Estos resultados sugieren a *I. sonorae* como fuente potencial de compuestos con actividad antitumoral que podrían utilizarse para el diseño de fármacos con uso quimioterapéutico.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la SECIHTI por el apoyo brindado para el financiamiento y realización de este proyecto, a través del programa de Estancias Postdoctorales por México 2022.

6. REFERENCIAS

- [1] Vidal-Gutiérrez, M., Torres-Moreno, H., Hernández-Gutiérrez, S., Velazquez, C., Robles-Zepeda, RE., Vilegas, W. "Antiproliferative activity of standardized

- phytopreparations from *Ibervillea sonora* (S. Watson) Greene”. *Steroids* May (169):108824, (2021).
- [2] Alarcon-Aguilar, F.J., Calzada-Bermejo, R., Hernandez-Galicia, E., Ruiz-Angeles, C., Roman-Ramos, R. “Acute and chronic hypoglycemic effect of *Ibervillea sonora* root extracts-II.” *J. Ethnopharmacol.* 97 (3), 447 – 452 (2005).
- [3] Torres-Moreno, H., Lopez-Romero, J.C., Vazquez-Solorio, J.Y., Velazquez-Contreras, C.A., Garibay-Escobar, A., Diaz-Lopez, R., Robles-Zepeda, R.E. “Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of *Ibervillea sonora*.” *S. Afr. J. Bot* (125), 207 – 213 (2019).
- [4] Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P.D. “Analysis of cell viability by the MTT assay.” *Cold spring harbor protocols*, 2018(6), pdb-prot095505, (2018).
- [5] Schmidt, B.M., Ribnicky, D.M., Lipsky, P.E., Raskin, I. “Revisiting the ancient concept of botanical therapeutics.” *Nat.Chem. Biol.* 3(7), 360 – 366, (2007).
- [6] Harvey, A.L. “Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery?” *Trends Pharmacol. Sci.* (20), 196 – 198, (1999).
- [7] Yuan, H., Ma, Q., Ye, L., Piao, G. “The traditional medicine and modern medicine from natural products.” *Molecules.* 21 (5), 559, (2016).
- [8] Khan, M., Khan, M., Adil, S.F., Alkhathlan, H.Z. “Screening of potential cytotoxic activities of some medicinal plants of Saudi Arabia”. *Saudi J. Biol. Sci.* 29(3): 1801-1807, (2022).
- [9] Vega-Avila, E., Espejo-Serna, A., Alarcon-Aguilar, F., Velasco-Lezama, R. “Cytotoxic activity of four Mexican medicinal plants”. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* (52): 78 – 92, (2009).
- [10] Quintanilla-Licea, R., Gomez-Flores, R., Samaniego-Escamilla, M.A., Hernández-Martínez, H.C., Tamez-Guerra, P., Morado-Castillo, R. “Cytotoxic effect of methanolextracts and partitions of twomexican desert plants against the murine lymphoma L5178Y-R”. *Am. J. Pl. Sci.* (7): 15 – 21, (2016).
- [11] Torres Moreno, H., Ianni, F., Robles-Zepeda, R.E., López-Romero, J.C., Vidal-Gutiérrez, M., Jacobi Durán, M.D., Galarini, R., Camaioni E., Sardella, R., Marcotullio, C.M. “Quantitative analysis of cucurbitane-type triterpenes in *Ibervillea sonora* extracts: relationship study with their antiproliferative activity”. *Steroids.* (161), 108676, (2020).