

Evaluación de las propiedades citotóxicas de un extracto de frutos de guayaba (*Psidium guajava* Var. *Tai-Kuo-Bar*)

Cytotoxic evaluation of properties in guava fruit extract (*Psidium guajava* Var. *Tai-Kuo-Bar*)

Katherine Sánchez-Zúñiga^{1*}, Silvia Castro-Piedra², Ileana Moreira-González³, Elizabeth Arnáez-Serrano⁴, Mirtha Navarro-Hoyos⁵, Felipe Vargas-Huertas⁶

Fecha de recepción: 4 de agosto de 2016

Fecha de aprobación: 16 de diciembre de 2016

Sánchez-Zúñiga, K; Castro-Piedra, S; Moreira-González, I; Arnáez-Serrano, E; Navarro-Hoyos, M; Vargas-Huertas, F. Evaluación de las propiedades citotóxicas de un extracto de frutos de guayaba (*Psidium guajava* Var. *Tai-Kuo-Bar*). *Tecnología en Marcha*. Vol. 30-4. Octubre-Diciembre 2017. Pág 150-157.

DOI: 10.18845/tm.v30i4.3424

1 Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica

2 Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica

3 Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica

4 Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica

5 Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

6 Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

* Correspondencia dirigida a: kasazu021@gmail.com



Palabras clave

Efecto antiproliferativo; potencial anticancerígeno; guayaba; citocromo c; línea celular de cáncer de pulmón y colon.

Resumen

La guayaba taiwanesa fue introducida en Costa Rica en 1978 y desde entonces ha sido ampliamente estudiada por sus propiedades medicinales y nutricionales. Debido a su alto contenido en antioxidantes, ha sido estudiada en diferentes países como potencial agente anticancerígeno. En este trabajo se evaluó la citotoxicidad de extractos de pulpa y cáscara de guayaba en dos líneas celulares cancerígenas de pulmón (H460), y adenocarcinoma colorectal humano (SW480), ATCC. Las células fueron tratadas a concentraciones crecientes desde 250 hasta 450 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con ambos tipos de extracto, durante 24, 48 y 72 horas. Las células utilizadas para las inmunotinciones fueron expuestas durante 48 horas con la concentración establecida como IC50 del extracto de pulpa. Se determinó que el extracto de pulpa produjo la mayor citotoxicidad en las células de cáncer de pulmón y de colon obteniéndose una IC50 de 352,5 y 376 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. Además, parece observarse una fragmentación del núcleo en las células expuestas a los extractos. Los análisis estadísticos demostraron que no se tiene un comportamiento dosis dependiente y que el factor tiempo de exposición al extracto es un factor crítico en la citotoxicidad.

Keywords

Antiproliferative effect; guava; cytochrome c; lung and colon cancer cell line.

Abstract

Taiwanese guava was introduced in Costa Rica in 1978 and then has been extensively studied for its medicinal and nutritional properties. Due to its high content of antioxidants, it has been studied in different countries as a potential anticancer agent. In this work we evaluated the cytotoxicity of extracts of pulp and guava peel in two carcinogenic cell lines: lung (H460), and human colorectal adenocarcinoma (SW480), ATCC. Cells were treated at increasing concentrations of 250 to 450 $\mu\text{g} / \text{mL}$ with both types of extract for 24, 48 and 72 hours. Cells used for immunostaining were exposed for 48 hours at the IC50 concentration of the pulp extract. It was determined that the pulp extract produced the highest cytotoxicity in lung and colon cancer cells, obtaining an IC50 of 352.5 and 376 $\mu\text{g} / \text{mL}$ respectively. In addition, fragmentation of the nucleus appears in the cells exposed to the extracts. Statistical analysis showed that no dose-dependent behavior was observed and that the time factor of exposure to the extract was a critical factor in cytotoxicity.

Introducción

La guayaba taiwanesa *Psidium guajava*, es una especie que fue introducida en Costa Rica en 1978 por la Misión Técnica Agrícola. Inicialmente fue sembrada en una finca del Instituto Nacional de Aprendizaje (INA) en la Uruca, y debido a su éxito se establecieron parcelas en Cañas, de donde se seleccionaron las mejores variedades para ser sembradas en Paquera, en la Península de Nicoya y otras partes del país [1].

El éxito adquirido por el cultivo de la guayaba en el país se debe al hecho de que representa una opción agrícola innovadora y económica en regiones dedicadas principalmente a la producción de granos básicos y a trabajos agrícolas [2].

Entre las principales cualidades de esta fruta destaca su alto valor nutricional. Posee diversos compuestos antioxidantes (2,62 – 7,79%), entre los cuales sobresale la vitamina E y C, fenoles y carotenoides. Además posee un alto porcentaje de fibra dietética, lo cual ha conllevado a la realización de diversas investigaciones en donde se ha demostrado que un consumo frecuente de esta fibra, puede contribuir a disminuir los niveles de colesterol. Por otro lado, se le han atribuido propiedades anticancerígenas [3], [4], [5], [6].

Uno de los atributos destacados de la guayaba, es la capacidad de reducir el estrés oxidativo causado por el mismo metabolismo celular e incluso agentes ambientales, esto se debe en gran parte a la alta concentración de sustancias antioxidantes que presenta, lo cual también puede tener un efecto positivo induciendo la muerte de las células cancerígenas. Para corroborar esto, se establecen modelos in vitro para evaluar la citotoxicidad que pueda ejercer extractos de guayaba sobre líneas celulares cancerígenas [6], [7].

El objetivo del presente trabajo consistió en determinar la citotoxicidad de dos extractos de frutos de guayaba sobre dos líneas celulares tumorales de pulmón (H460) y colon (SW480), y una línea celular normal. Con el fin de evaluar si los antioxidantes presentes en la guayaba ayudan disminuyen la proliferación de células cancerígenas específicamente.

Materiales y métodos

Se colectaron 9 kilos de frutos sanos de *Psidium guajava* var. Tai – kuo – bar en enero del 2015, recolectados en Río Grande de Paquera, Puntarenas (coordenadas N 09°51'39", W 084°56'84", 28 m.s.n.m), Costa Rica, en colaboración con la Cooperativa de Productores de Guayaba Taiwanesa (COOPEPROGUATA), los que fueron conservados en la Escuela de Química de la Universidad de Costa Rica, a -50 C hasta su procesamiento. Los frutos se cortaron, separándose la semilla, cáscara, pulpa, y estas dos últimas muestras se liofilizan en un equipo LABCONCO.

Se realizó la extracción de las muestras liofilizadas, utilizando un equipo de Extracción Acelerada de Solvente (ASE por sus siglas en inglés) Dionex 150, Thermo Scientific, con acetona y agua como solventes, en una celda de 34 mL, a 40 °C. Una vez obtenido el extracto, se procedió a eliminar la acetona en un rotavapor Buchi R-200, para luego extraer la fase acuosa con cloroformo y consecutivamente con acetato de etilo. Las fases acuosas se concentran hasta haber eliminado los restos de solventes orgánicos, para luego colocarse en una columna de Amberlite, con lo que se obtiene el extracto de *Psidium guajava* (en adelante EAFG).

Se analizó el efecto citotóxico del EAFG en 2 líneas celulares cancerosas de origen humano: adenocarcinoma colorectal humano SW840 (ATCC) y células de cáncer de pulmón H460 (ATCC) y como control células normales. Se siguió el protocolo sobre el mantenimiento celular de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial ATCC. Las pruebas de citotoxicidad e inmunofluorescencia se realizaron en el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos y Biología Celular del Centro de Investigaciones en Biotecnología, del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago y en el Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales.

La metodología utilizada se basó en la descrita por Freshney [8]. Para esto se cultivaron las células hasta alcanzar una confluencia del 70-80%. Se trataron las células con concentraciones crecientes de EAFG (250 µg/mL hasta 450 µg/mL) a 24, 48 y 72 horas de exposición, se renovó el medio con el extracto cada 24 h, y así hasta las 72 h, en las respectivas concentraciones

establecidas. Cada experimento se realizó por triplicado. Posteriormente se incubaron las células con MTT y se cuantificó la absorbancia a 570 nm. Se aplicó un diseño completamente aleatorio del tipo factorial de dos factores con niveles fijos para las tres líneas celulares.

Mediante análisis de varianza utilizando suma de cuadrados se determinaron los efectos de los factores principales y su interacción mediante un Modelo Lineal General (GLM) y Pruebas F de Fisher.

Se realizó la prueba de Mann - Whitney según la distribución de los datos, sea $p < 0,05$, para establecer las diferencias significativas entre cada tratamiento. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con un $\alpha = 0,05$. Se utilizó el software Minitab 17.

Se realizó una inmunotinción de citocromo C en células que fueron expuestas a la IC50 de ambos extractos. Para ello, las células se incubaron en el anticuerpo primario (anti-Citocromo c, Marca Santa Cruz) en una dilución 1:50. Seguidamente, se colocó el anticuerpo conjugado en una dilución de 1:100. (Anti-IgG, Marca Santa Cruz) y se dejó incubando durante 15 minutos. Después se colocó una gota Prolong Antifade con Dapi (Thermo Fischer) y se dejó polimerizar por 15 minutos y se observó al microscopio de fluorescencia. Todas las fotografías fueron tomadas a través de un microscopio Nikon, utilizando el software Imaging Software NIS-Elements, del Centro de Investigaciones de Enfermedades Tropicales (CIET), de la Facultad de Microbiología, de la UCR.

Resultados y discusión

Citotoxicidad

Se evaluó el efecto citotóxico de los extractos de *P. guajava* sobre las líneas tumorales SW480 y H460 y la línea normal como control.

Con base en los resultados obtenidos en pruebas preliminares realizadas se decidió trabajar con concentraciones de 250 $\mu\text{g/mL}$; 300 $\mu\text{g/mL}$; 350 $\mu\text{g/mL}$; 400 $\mu\text{g/mL}$ y 450 $\mu\text{g/mL}$ para las 3 líneas celulares durante 24, 48 y 72 horas.

Con la línea celular de cáncer colon (SW480), se obtuvo una IC50 con el extracto de pulpa de 376 $\mu\text{g/mL}$ a las 48 horas. Se observó que a esta concentración, se produce una disminución de la viabilidad muy significativo, y que con una dosis de 397 $\mu\text{g/mL}$ a las 72 h ya no se presentaba ningún efecto en la disminución de la viabilidad celular. En el caso del extracto de cáscara a las 48 horas se mantiene una viabilidad celular del 70% y a las 72 horas la proliferación celular aumenta, lo cual es un indicador de que el extracto después de determinado tiempo pierde efecto citotóxico.

Por otro lado, en la línea celular de cáncer de pulmón (H460) expuestas al extracto de pulpa, se obtuvo que concentraciones de 352,5 $\mu\text{g/mL}$ reducen en un 70% la población celular a las 48 horas, y que dosis de 575,9 $\mu\text{g/mL}$ causan una disminución en la viabilidad celular del 90%; mientras que en el caso del extracto de cáscara, los resultados obtenidos mostraron una disminución de la viabilidad a las 48 horas en un 25%, y no se logró alcanzar la mortalidad del 50% de las células.

Para verificar que el extracto no fuera tóxico en las células normales, se utilizaron las mismas dosis planteadas anteriormente sobre células normales, y se obtuvo en el caso del extracto de pulpa, que concentraciones de 460 $\mu\text{g/mL}$ durante 48 horas, 560 $\mu\text{g/mL}$ a las 72 h causan una disminución en la viabilidad celular del 50%; mientras que en el caso del extracto de cáscara, estos valores de IC50 son de 401 $\mu\text{g/mL}$ a las 48 h y 450 $\mu\text{g/mL}$ a las 72 h.

Los análisis estadísticos muestran diferencias significativas entre los tratamientos a la 48 y 72 horas con los dos tipos de extracto para las tres líneas. Por otro lado, mediante la prueba no paramétrica de Mann - Whitney se encontró que las dos variables dosis y tiempo influyen en los resultados, y datos no siguen un comportamiento dependiente de la dosis, ya que entre mayor tiempo de exposición, el efecto citotóxico disminuye incluso a altas concentraciones, probablemente debido a la estabilidad del extracto, y por tanto la aplicación de un tratamiento a las 48 y 72 horas tiene una influencia significativa.

Algunos estudios de la literatura reportan mayor cantidad de metabolitos activos en la cáscara con respecto a la pulpa de guayaba [9], [10], y reportan asimismo una mejor capacidad antioxidante in vitro con DPPH (di(phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl)iminoazanium) y FRAP (Ferric ion reducing antioxidant power) en extractos de cáscara [9]. Por el contrario, Bontempo et al [11] han reportado estudios realizados en células de leucemia y cáncer de mama que demuestran que la pulpa de la guayaba es la que tiene mayor capacidad de inducir citotoxicidad. Por lo tanto, es importante hacer notar que los resultados obtenidos este estudio indican que existe un efecto selectivo sobre la citotoxicidad según sea el tipo de extracto sobre las diferentes tipos de líneas celulares, efecto observado también en otros estudios como el de Bontempo et al [11], en el cual al utilizar líneas celulares de cáncer de hueso, el extracto de pulpa no produjo ningún efecto anti proliferativo ni apoptótico.

Inmunotinciones

Se realizaron inmunotinciones con línea celular de adenocarcinoma colorectal (SW480) con los dos tipos de extractos: cáscara y pulpa, con concentraciones de los IC50 obtenidos, estableciéndose como control células no tratadas para observar la morfología de células normales.

Las tinciones realizadas mostraron un aparente fraccionamiento del núcleo en células tratadas y una mayor dispersión de citocromo c, en comparación con las células no tratadas cuyo núcleo se ve más definido y de mayor tamaño. En el caso del citocromo C éste se observa más concentrado en ciertas zonas (figura 1).

En las células tratadas con extracto de pulpa (figura 1. A y B), parece observarse el núcleo fragmentado, además el citocromo C en ambas imágenes parece estar más disperso en la célula en comparación con las células control (no tratadas).

En los controles (figura 1. C y D) se observan las células sin tratamiento, en donde se aprecia una mejor integridad del núcleo y en el caso de la figura 1.C, el citocromo c se observa concentrado en ciertos puntos de la célula.

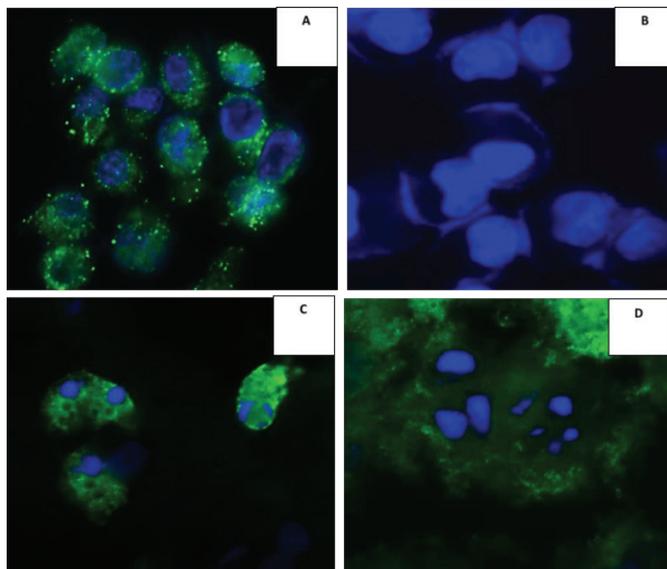


Figura 1. Inmunotinciones a las 72 horas de la línea celular de adenocarcinoma colorectal (SW480). A y B: controles no tratados, tinciones de citocromo C (verde) y núcleos con DAPI (azul). B: tinción solo de núcleos con DAPI. C: células tratadas con extracto de cáscara (407µg/mL). D: células tratadas con extracto de pulpa (397µg/mL). C y D: tinciones de citocromo C (verde) y núcleos con DAPI (azul).

Las imágenes de inmunotinción de las células que fueron expuestas a los extractos (figura 1. A y B) se asemejan un poco con lo descrito por Huerta et [12] y Taylor et al [13], los cuales indican que, uno de los signos de una células en apoptosis es la fragmentación del núcleo, además otros como: formación de vesículas apoptóticas, disrupción de la membrana mitocondrial que produce la liberación de proteínas inductoras de apoptosis como el citocromo C, entre otros, que podrían indicar muerte celular por apoptosis [8], [12], [13].

Sin embargo, es importante indicar que, en este estudio no se puede analizar la ruta de muerte celular, ya que para poder afirmar la vía activada por el extracto, es necesario el estudio de múltiples marcadores más, así como el análisis de activación de caspasas correspondientes a cada una de las vías, además de ensayos de inhibición de factores claves implicados en las rutas mencionadas.

Conclusiones

Se observó que el extracto de pulpa si fue citotóxico en ambas líneas celulares con una IC50 de 352,5 µg/mL en la línea de cáncer de pulmón H460, y una IC50 de 376 µg/mL en las células de cáncer de colón SW480 a las 48 h. En cambio, el extracto de cascara, aunque inhibió levemente la viabilidad celular, no se alcanzó la IC50 en ambas líneas celulares. Además, el tiempo de exposición a los extractos fue el factor que más influyó sobre la viabilidad.

Referencias

- [1] MAG, «Agrocadena de Guayaba: una nueva alternativa,» Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2008. [En línea]. Available: www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/pdf. [Último acceso: 30 noviembre 2014].
- [2] L. Guzmán, «Infocoop,» agosto 2014. [En línea]. Available: www.infocoop.go.cr/enterese/noticias/agosto. [Último acceso: 13 diciembre 2014].



- [3] M. Alves, A. Pascoal y M. Salvador, «Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties,» *Chemistry and Biodiversity*, vol. 8, pp. 73-94, 2011.
- [4] H. Castro-Vargas, L. Rodríguez, S. Ferreira y F. Parada, «Extraction of phenolic fraction from guava seeds (*Psidium guajava*) using supercritical carbon dioxide and co-solvents,» *Journal of supercritical fluids*, vol. 51, pp. 319 - 324, 2010.
- [5] Y. Lim y T. T. J. Lim, «Antioxidant properties of guava fruit: comparison with some local fruits,» *Sunway academic Journal*, vol. 3, pp. 9 - 20, 2006.
- [6] M. Martínez, B. Ortiz, C. Pérez y C. Anzola, «Efecto de la pectina extraída de guayaba sobre el perfil lipídico en adultos con diferente condición cardiovascular,» *Revista de la facultad de medicina*, vol. 59, n° 2, 2011.
- [7] R. Alvis, *Detección del efecto antimutagénico del extracto acuoso del fruto de Myrciaria dubia H.B.K. Mc Vaugh "camu camu", utilizando la prueba in vivo de micronucleos.*, Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2010.
- [8] R. Freshney, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, New Jersey: John Wiley & Sons, 2010.
- [9] A. Jiménez, M. Rincón y R. S. F. Pulido, «Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber,» *Journal of Agricultural food chemistry*, vol. 49, n° 11, pp. 5489 - 5493, 2001.
- [10] M. Núñez, «Guava (*Psidium guajava* L.) fruit phytochemicals, antioxidant properties and overall quality as influenced by postharvest treatments,» *University of Florida*, Florida, 2005.
- [11] P. Bontempo, A. Doto y M. Miceli, «*Psidium guajava* L. anti-neplastic effects: induction of apoptosis and cell differentiation,» *Cell proliferation*, vol. 45, pp. 22-31, 2012.
- [12] S. Huerta, E. Goulet y E. Livingston, «Screening and detection for apoptosis,» *Journal of Surgical research*, vol. 139, pp. 143 - 156, 2007.
- [13] R. Taylor, S. Cullen y S. Martin, «Apoptosis: controlled demolition at the cellular level,» *Nature*, vol. 9, pp. 231-241, 2008.

