

EFECTOS DE LA LÚCUMA EN LAS CÉLULAS CANCERÍGENAS (MDA)

EFFECTS OF LUCUMA ON MDA CANCER CELLS

Catalina Cifuentes¹ • Marian Lingsch¹ • Aarón Refisch¹ • Vicente Rojas¹

Profesora Guía: Macarena Galdames^{1,2}

Asesora científica: Dra. Lisbell Estrada²

Coasesora: Dra. Soledad Vidaurre²

¹Colegio Alemán de Santiago, Región Metropolitana

²CIBQA, Universidad Bernardo O'Higgins

Resumen

En este informe se analizaron los efectos que tiene la *Pouteria lucuma* sobre células cancerígenas de cáncer de mama, de la línea MDA. Esta investigación se realizó debido a la escasez de estudios que sobre las propiedades curativas de la lúcuma, además de su relevancia para el territorio nacional. Se procedió a realizar dos experimentos. Un ensayo de fluorescencia y un ensayo de absorbancia, los cuales dieron resultados concluyentes de que la lúcuma, a altas diluciones (1:10), induce la apoptosis en células cancerígenas de forma constante. Esto suponemos que se debe a la presencia de β -carotenos en la lúcuma, los cuales tienen propiedades aniquiladoras del cáncer.

Palabras claves: Lúcuma; Células cancerígenas MDA; Ensayo de fluorescencia; Ensayo de absorbancia; Apoptosis.

Abstract

In this report the effects of *Pouteria lucuma* on MDA cancer cells will be analyzed. This research was conducted due to the lack of studies regarding the healing properties of lúcuma, besides its relevance for the national territory. Two experiments were done. One of them was a fluorescence assay and the other an absorbance assay. Both of them showed conclusive results of lúcuma constantly inducing apoptosis on cancer cells at high concentrations (1:10). We assume that this was caused do to β -carotenes contained in the lúcuma, which have cancer annihilating properties.

Keywords: Lucuma; MDA cancer cells; Fluorescence assay; Absorbance assay; Apoptosis.



Introducción

Esta investigación se centra en la búsqueda y aproximación a un tratamiento alternativo, como lo es el aceite de cannabis, para combatir el cáncer de mama, sin embargo, utilizando los medios naturales presentes en el norte del territorio nacional, como la lúcuma (*Pouteria lucuma*). Alrededor del 40% de las personas serán diagnosticadas con cáncer durante su vida (National Cancer Institute, 2019). Específicamente, el cáncer de mama es un crecimiento anormal de las células del tejido mamario, formando un tumor maligno. Esta enfermedad es la principal causante de la mortalidad por cáncer en la mujer (Clínica Las Condes, 2019). Por otra parte, la lúcuma es una fruta nativa del Perú y de enorme trascendencia en Chile.

De aquí surge entonces la pregunta ¿cuáles son los efectos que tiene la lúcuma sobre células cancerígenas? Para responderla se utilizaron células neoplásicas de una línea tumoral tipo MDA y un extracto lipofílico de la lúcuma, entregado por el laboratorio CIBQA de la Universidad Bernardo O'Higgins.

La lúcuma ya ha sido utilizada en diversas investigaciones como compuesto curativo. Entre estas investigaciones cabe destacar la investigación de la lúcuma como remedio con propiedades anti glicémicas y antioxidantes (Fuentealba *et al.*, 2016). Otros experimentos ocupan a la lúcuma como posible tratamiento para la Diabetes tipo II (Pinto *et al.*, 2009) y como posible tratamiento de heridas (Rojo *et al.*, 2010). Debido a todas estas propiedades nosotros nos preguntamos si es que la lúcuma no podría ser un tratamiento alterna-

tivo al cáncer. Al utilizar esta fruta nativa del altiplano como posible tratamiento para el cáncer se espera que esta promueva la apoptosis, es decir, muerte celular programada, en las células cancerígenas.

Cabe destacar que la apoptosis tiene una gran variedad de efectos, los cuales se pueden analizar mediante diversos métodos. Entre ellos, fueron utilizadas el ensayo colorimétrico (MTT) y ensayo de fluorescencia (DAPI).

Hipótesis

El extracto lipofílico de *Pouteria lucuma* promueve la apoptosis en las células cancerígenas tumorales MDA.

Objetivo General

Determinar si el extracto de lúcuma lipofílico promueve la apoptosis en células de cáncer de mama MDA.

Objetivos Específicos

- Realizar análisis de MTT, para confirmar la cantidad de células muertas al ver cuántas de ellas mantienen la capacidad de metabolizar este sustrato bajo la influencia de la lúcuma.
- Realizar análisis de DAPI para cuantificar las células muertas y vivas después de haber sido tratadas con lúcuma.



Metodología

Para poder sustentar nuestra hipótesis se llevaron a cabo dos experimentos distintos cuyos resultados fueron luego analizados para lograr verificar o rechazar la hipótesis.

Absorbancia mediante MTT:

La línea celular utilizada fue proporcionada por el laboratorio CIBQA de la Universidad Bernardo O'Higgins. Primero se desechó el medio DMEM, que se encuentra en la botella T25 con la línea tumoral de MDA.

Se lavaron las células con 5 mL de PBS y se agregó la solución.

A continuación, se incuban las células con Tripsina durante 15 minutos, a 37° C y con 5% de CO₂.

Después de esto, se procedió a centrifugar las células a 1500 rpm durante 4 min. Se obtiene un pellet de células, el cual se rescata y el sobrenadante se descarta.

Al pellet se le agregan 10 mL de DMEM y se homogeniza. Esta solución se reparte en dos placas de 96 pocillos. Se rellenan 20 de cada una y cada pocillo se rellena con 10 μ L de las células en DMEM.

Las 2 placas se dividieron en 4 columnas y 4 filas, donde la primera columna solo tenía las células con medio, lo que constituye el control negativo. A la segunda columna de células, se le agrega el extracto de lúcumo en una dilución de 1:10. El extracto de lúcumo, también fue obtenido del laboratorio CIBQA de la Universidad Bernardo O'Higgins. En la tercera columna se agrega el extracto de lúcumo en una dilución de 1:100. La cuarta columna queda sólo con las células y el medio.

Las placas fueron incubadas por 48 h. A continuación, se agregaron 20 μ L de DMSO a la cuarta columna. Para acelerar la metabolización del DMSO se puso la placa durante 10 minutos en la incubadora. La cuarta columna corresponde a nuestro control positivo, en la cual habrá muchas células muertas.

Se creó una muestra "blanca", la que solo contiene 100 μ L de medio DMEM. Esta servirá como control para la medición de absorbancia más adelante.

Se procede a cambiar el medio DMEM de todos los pocillos, menos del pocillo con la muestra blanca. Luego, se lavaron las células dos veces con PBS, se

agregan 10 μ L del reactivo MTT a cada pocillo y se incubaron en oscuridad por 4 h. Las células que fueron capaces de metabolizar el MTT formaron cristales. Se quitó el sobrenadante con jeringa tuberculina (con cuidado de no extraer los cristales), y suspender los cristales con un volumen igual al medio en que estaban las células, con solución Isopropanol 5% DMSO 0.04 N HCl. Se dejó la placa en agitación suave, mientras se enciende el equipo.

Finalmente, se colocó la placa en un TECAN con el software i-control 1.10.4.0., para analizar la absorbancia a 490 nm de los distintos pocillos.

Ensayo de fluorescencia

Primero que todo cada cover fue incubado con poliglucina. Luego se suspendieron las células de la misma muestra que en experimento anterior, durante 15 minutos en 2 mL de Tripsina en la incubadora. Después de esto, se traspasaron las células con Tripsina a un tubo cónico de 15 mL que contiene medio DMEM. La solución del tubo cónico de 15 mL se reparte en dos placas de 24 pocillos. Se rellenan 8 de cada una con 300 μ L de la solución.

Las 2 placas se dividieron en 4 columnas y 2 filas, donde la primera columna sólo tenía las células con medio, lo que constituye el control negativo. A la segunda columna de células se le agrega el mismo extracto de lúcumo que en el ensayo anterior, en una dilución de 1:10 al medio. A la tercera columna se le agrega lúcumo en una dilución de 1:100. A la cuarta columna se le agrega DMSO. Esta corresponde al control positivo, en la cual habrá muchas células muertas.

Después de esto, se desechó el medio y los covers se lavaron varias veces con PBS.

Se agregaron 400 μ L de paraformaldehído a cada cover. Pasados 20 minutos se extrajo el paraformaldehído y se lavó varias veces con PBS. Luego se traspasaron los covers a un portaobjetos.

Todos los covers traspasados se trataron con DAPI y WGA.

A continuación, se colocaron los portaobjetos con los covers bajo el microscopio de fluorescencia y se tomaron fotografías de los diversos covers en distintos aumentos.

Finalmente, se realizó un conteo de las células vivas y muertas en las fotos tomadas.



Resultados y discusión

Ensayo de Absorbancia MTT

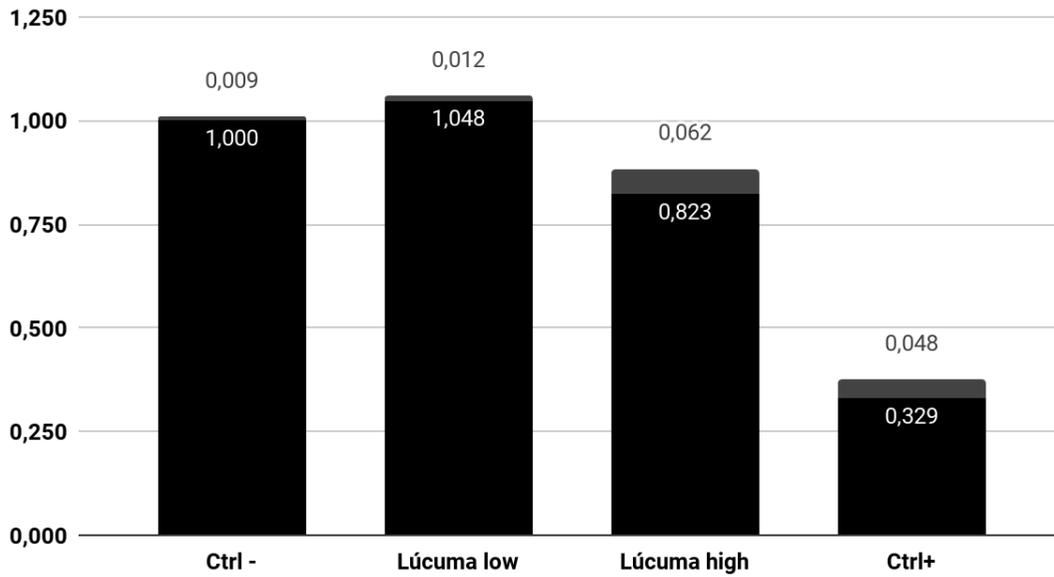


Figura N° 1. Ensayo de absorbancia en células de cáncer MDA, con diluciones de 1:100 y 1:10 del extracto lipofílico de la lúcuma. Mostrando la absorbancia como indicador de proliferación de las células tumorales. El eje Y corresponde a la absorbancia medida en los pocillos según cada condición. En gris está representado el error estándar.

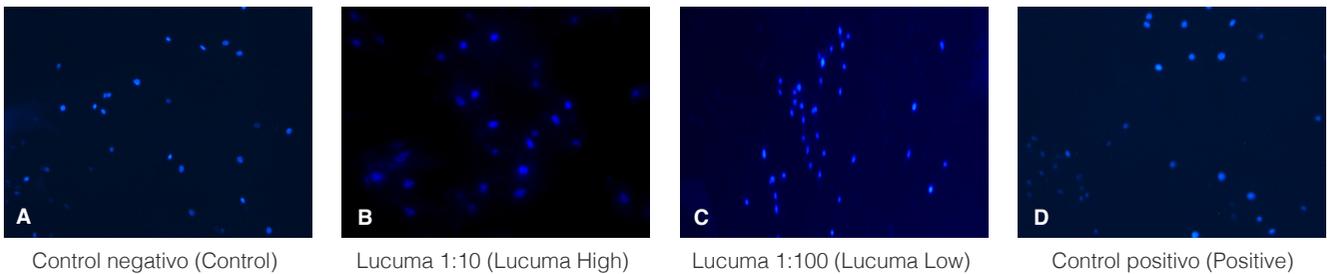


Figura N° 2. Ensayo de fluorescencia en células de cáncer MDA, con diluciones de 1:100 y 1:10 del extracto lipofílico de la lúcuma, mostrando la intensidad de color, como indicador de apoptosis en el núcleo marcado con DAPI.

Apoptosis

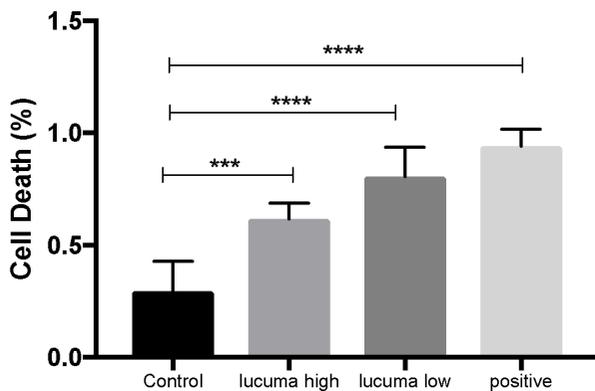


Figura N° 3: Apoptosis (representada en %) observada en el ensayo de fluorescencia con DAPI, con diluciones de 1:100 y 1:10 del extracto lipofílico de la lúcuma. Se graficaron los resultados a partir del conteo de células vivas y en apoptosis según cada condición a partir de las imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia, como aquellas en la Figura N° 2.



Absorbancia mediante MTT

Con el objetivo de evaluar la proliferación de las células MDA, se cultivaron en las condiciones que describimos en métodos. Una vez establecido el cultivo, a las células se les administró el extracto de lúcuma en diluciones de 1:10 y 1:100. Una vez finalizado el tratamiento, las células proliferaron y, a través de la absorbancia, se evaluó el efecto de los extractos sobre la proliferación celular. Ctrl- representa el control negativo y se le adjudica el valor de un 100% de las células, realizando metabolismo regular. Lúcuma en diluciones de 1:100, muestran a 104% de las células realizando metabolismo regular. La dilución 1:10 tuvo a un 82.3% de las células metabolizando de forma regular. Ctrl+ representa el control positivo con un 32.9% de las células realizando metabolismo regular. De esto podemos afirmar que la lúcuma, en altas concentraciones, disminuye la proliferación, pero que cuando son bajas las concentraciones, la proliferación aumenta.

Ensayo de fluorescencia

Con el objetivo de evaluar la inducción de apoptosis, se cultivaron las células cancerígenas MDA en las condiciones que describimos en metodología. Una vez establecido el cultivo, a las células se les administró el extracto de lúcuma en diluciones de 1:10 y 1:100. Una vez finalizado el tratamiento, las células se redujeron los núcleos y se evaluó el efecto de los extractos sobre la expresión de la apoptosis. En las Figuras N° 2A y 2D se observan los controles positivos y negativos; en el primero se observa una proporción de núcleos azules brillantes que corresponden al 26,77%, mientras que el control positivo este se incrementa llegando a ser 93,67%. Por otra parte, el tratamiento de 1:10 y 1:100 corresponden a un 62,21 y 83,21%, respectivamente, de núcleos azules brillantes. En conclusión, los extractos indujeron la apoptosis en las células MDA.

Del ensayo de absorbancia MTT se pudo inferir que la lúcuma disminuye la proliferación a altas concentraciones

(1:10) pero la estimula a bajas concentraciones (1:100). Mediante el ensayo de fluorescencia DAPI se pudo confirmar que la disminución de la proliferación de las células MDA ocurrió debido a la apoptosis, al ver los núcleos condensados y más intensos en color.

Explicamos este fenómeno con la presencia de β -Carotenos en la lúcuma (Palozza *et al.*, 2002). Estos representan aproximadamente un 2,3% del peso total del fruto (Universidad de Piura, 2019).

Este compuesto promueve la apoptosis celular (Upadhya *et al.*, 2007), debido a que incrementa la presencia de la proteína p53. Cuando los niveles de p53 son bajos, la célula se transforma en un tumor y disminuye la cantidad de la proteína Bcl-2, que inhibe la apoptosis. Bcl-2 impide la presencia de citocromo-b, el cual promueve la apoptosis celular. Además, se usan los beta-carotenos para reducir la toxicidad asociada con quimioterapia, tratamiento común contra el cáncer (MedlinePlus, 2019). Otro estudio habla sobre el β -Caroteno como una sustancia que disminuye la probabilidad de presencia de cáncer (Breastcancer.org, 2019), esto tiene que ver con su efecto antioxidante que protege a las células de radicales libres que pueden promover el cáncer (Urango *et al.*, 2009).

En el caso de la concentración baja de lúcuma, en el ensayo de fluorescencia se presenta una gran cantidad de muerte celular. En cambio, en el ensayo de absorbancia se presenta un aumento de 4% de las células realizando metabolismo regular. Nuevamente, justificamos esto con la presencia de β -Carotenos, que poseen propiedades anticancerígenas (Jang *et al.*, 2009), pero también propiedades promovedoras del cáncer (The Alpha-Tocopherol Beta Carotene Cancer Prevention Study Group, 1994; Albanes *et al.*, 2017). A bajas concentraciones los β -carotenos tienen un efecto que promueve la proliferación de las células MDA, que fue lo que observamos en el ensayo de absorbancia. En el ensayo de fluorescencia DAPI observamos el efecto de los β -Carotenos que fomenta la apoptosis.



Conclusión

Con todo lo realizado, podemos concluir que el extracto lipofílico de la lúcuma mata células cancerígenas en algunas concentraciones, pero más estudios tendrán que ser realizados para comprobar específicamente a qué concentraciones se produce la mayor tasa de apoptosis y en cuáles aumenta la proliferación.

Proyecciones:

- Realizar un Western Blot o inmunofluorescencia, para confirmar la presencia de proteínas inductoras de apoptosis.
- Investigar la composición química del extracto lipofílico de lúcuma para así conocer los principios activos que promueven la apoptosis.
- Llevar a cabo una investigación para conocer el método de acción de dicho principio activo.
- Relacionar el método de acción y los principios activos con la especificidad del extracto de lúcuma y así confirmar que únicamente afecte a las células neoplásicas.
- Poder llevar a cabo el experimento a diferentes concentraciones para lograr observar a qué concentraciones se produce de forma más constante y mayor la muerte de células cancerígenas.

Bibliografía

Albanes D, Heinonen OP, Huttunen JK, Taylor PR, Virtamo J, Edwards BK, Haapakoski J, Rautalahti M, Hartman AM, Palmgren J. 1995. Effects of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on cancer incidence in the Alpha-Tocopherol Beta-Carotene Cancer Prevention Study. *Am J Clin Nut* 62: 1427S-1430S.

Breastcancer.org. 2019. Betacarotenos. <https://www.breastcancer.org/es/consejos/nutricion/suplementos/conocidos/betacaroteno>

Clínica las Condes. 2019. Cáncer de mama. <https://www.clinicalascondes.cl/CENTROS-Y-ESPECIALIDADES/Centros/Centro-Clinico-del-Cancer/Prevencion/Previcancer/Prevencion-Cancer-de-mama>

Fuentealba C, Gálvez L, Cobos A, Olaeta JA, Defilippi BG, Chirinos R, Campos D, Pedreschi R. 2016. Characterization of main primary and secondary metabolites and in vitro antioxidant and antihyperglycemic properties in the mesocarp of three biotypes of *Pouteria lucuma*. *Food Chemistry* 190: 403-411.

Jang SH, Lim JW, Kim H. 2009. Mechanism of β -carotene-induced apoptosis of gastric cancer cells: involvement of ataxia-telangiectasia-mutated. *Ann New York Acad Sci* 1171: 156-162.

MedlinePlus. 2019. Beta-carotenos. <https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/natural/999.html>

National Cancer Institute. 2019. Cancer Statistics. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>



Palozza P, Serini S, Maggiano N, Angelini M, Boninsegne A, Di Nicuolo F, Ranelletti FO, Calviello G. 2002. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human colon adenocarcinoma cell lines by beta-carotene through down-regulation of cyclin A and Bcl-2 family proteins. *Carcinogenesis* 23: 11-18.

Pinto MD, Ranilla LG, Apostolidis E, Lajolo FM, Genovese MI, Shetty K. 2009. Evaluation of antihyperglycemia and antihypertension potential of native peruvian fruits using in vitro models. *J Med Food* 12: 278-291.

Rojo LE, Villano CM, Joseph G, Schmidt B, Shulaev V, Shuman JL, Lila MA, Raskin I. 2010. Original contribution: wound-healing properties of nut oil from *Pouteria lucuma*. *J Cosmetic Dermatol* 9: 185-195.

The Alpha-Tocopherol Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. 1994. The effect of vitamin E and beta-carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *New Eng J Med* 330: 1029-1035.

Universidad de Piura. 2017. CAPÍTULO I: LA LÚCUMA. http://www.biblioteca.udep.edu.pe/bibvirudep/tesis/pdf/1_161_186_112_1548.pdf

Upadhy R, Radha KS, Madhyastha H. 2007. Cell cycle regulation and induction of apoptosis by β -carotene in U937 and HL-60 leukemia cells. *J Biochem Mol Biol* 40: 1009-1015.

Urango LA, Montoya GA, Cuadros MA, Henao DC, Zapata PA, López L, Castaño E, Serna AM, Vanegas CV, Loaiza MC, Gómez BD. 2009. Efecto de los compuestos bioactivos de algunos alimentos en la salud. *Perspect Nutr Humana* 11: 27-38.

