

UNIVERSIDAD
CIENTÍFICA
DEL SUR

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CARRERA PROFESIONAL DE MEDICINA HUMANA

“Efecto citotóxico de la *Annona muricata* frente a la línea celular de adenocarcinoma gástrico”

Tesis para optar el título profesional de:

MÉDICO CIRUJANO

Presentado por:

Paola Natalia Alvarado Mayor (0000-0001-7340-8347)

Alexandra Bautista Flores (0000-0002-7710-4620)

Asesor:

Amanda Asunción Lovera Arellano (0000-0001-8225-6920)

Lima – Perú

2022

ACTA DE SUSTENTACIÓN

Lima, 26 de setiembre de 2022.

Los integrantes del Jurado de tesis:

Presidente: Mg. Jorge Enrique Osada Lij	<input type="checkbox"/>
Miembro: Méd. Junior Smith Torres Román	
Miembro: Méd. Juan Jesús Huaccho Rojas	

Se reúnen para evaluar la tesis titulada:
EFFECTO CITOTÓXICO DE LA ANNONA MURICATA FRENTE A LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO
 Presentada por
PAOLA NATALIA ALVARADO MAYOR y ALEXANDRA BAUTISTA FLORES
 Para optar por el Título de Médicas Cirujanas

Con la asesoría de: Mg. Amanda Asunción Lovera Arellano

Luego de haber evaluado el informe final de tesis y evaluado su desempeño en la sustentación, concluyen de manera unánime (x) por mayoría simple () calificar a:

Tesis: PAOLA NATALIA ALVARADO MAYOR			Nota (en letras): dieciséis (16)	
Aprobado ()	Aprobado - Muy buena (x)	Aprobado - Sobresaliente ()	Desaprobado ()	
Tesis: ALEXANDRA BAUTISTA FLORES			Nota (en letras): dieciséis (16)	
Aprobado ()	Aprobado - Muy buena (x)	Aprobado - Sobresaliente ()	Desaprobado ()	

Los miembros del jurado firman en señal de conformidad.



Mg. Jorge Enrique Osada Lij
Presidente del Jurado



Méd. Junior Smith Torres Román
Miembro 1



Mg. Amanda Asunción Lovera Arellano
Asesora



Méd. Juan Jesús Huaccho Rojas
Miembro 2

RESUMEN

Antecedente: Los avances terapéuticos frente al cáncer no han tenido el éxito esperado y presentan efectos adversos pocas veces tolerados por el paciente. Un estudio en Perú identificó el efecto anticancerígeno de la *Annona muricata* (AM), planta medicinal conocida como guanábana, en adenocarcinoma gástrico de ratón C-678 con resultados favorables, sin embargo, no se ha encontrado evidencia previa en células humanas.

Objetivo: El objetivo de este estudio fue determinar el efecto citotóxico del extracto de AM frente a la línea celular de adenocarcinoma gástrico humano (AGS). **Materiales y**

métodos: Estudio experimental in vitro tipo analítico con extracto hidroalcohólico de hojas de AM (AMOH) recolectadas en Amazonas. Mediante screening fitoquímico se identificaron los grupos funcionales químicos. Para obtener el efecto citotóxico, se añadieron diferentes diluciones de extracto a las placas que contienen las líneas celulares y mediante una ficha de observación los datos fueron extrapolados a GraphPad. Finalmente se expresó como la concentración inhibitoria media máxima (IC_{50}) y se hizo un análisis de regresión no lineal con la finalidad de encontrar la cantidad de inhibición de crecimiento de células oncológicas. **Resultados:** En el screening fitoquímico se pudo identificar la presencia de carbohidratos reductores, alcaloides, fenoles, taninos, triterpenos y esteroides, saponinas, flavonoides, proteínas, glicósidos cardiotónicos y antocianinas. Para identificar el contenido total de fenoles se utilizó la curva de calibración con ácido gálico el cual nos comprobó la presencia de una buena cantidad de estos metabolitos. Adicionalmente se utilizó quercetina para identificar el contenido de flavonoides, obteniendo resultados favorables ya que se hizo evidente su presencia. La línea celular AGS mostró una actividad citotóxica frente al AMOH con un IC_{50} a las 24 horas de 45.81ug/mL y 19.05ug/mL a las 48 horas. **Conclusión:** Se identifica la presencia

de diversos metabolitos secundarios de la AM, y esta posee un efecto citotóxico contra la línea celular AGS.

Palabras claves: Cáncer; estómago; *Annona muricata*; citotoxicidad

ABSTRACT

Background: Therapeutic advances against cancer have not been as successful as expected and have adverse effects that are rarely tolerated by the patient. A study in Peru identified the anticancer effect of *Annona muricata* (AM), a medicinal plant known as soursop, in C-678 mouse gastric adenocarcinoma. However, to date, no results have been reported in human cells. **Objective:** The objective of this study was to determine the cytotoxic effect of AM extract against a human gastric adenocarcinoma cell line (AGS).

Methodology: Experimental in vitro analytical study using a hydroalcoholic extract of AM (AMOH) leaves collected in Amazonas. Chemical functional groups were identified by phytochemical screening. To obtain the cytotoxic effect, different dilutions of extract were added to the plates containing the cell lines, and the data were extrapolated to GraphPad by means of an observation card. Finally, cytotoxic effect was expressed as the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) and nonlinear regression analysis was performed to determine the amount of growth inhibition of cancer cells. **Results:** Phytochemical screening showed the presence of reducing carbohydrates, alkaloids, phenols, tannins, triterpenes and steroids, saponins, flavonoids, proteins, cardiac glycosides and anthocyanins. A calibration curve with gallic acid was used to determine the total phenol content. Additionally, quercetin was used to identify the flavonoid content. The AGS cell line showed cytotoxic activity with AMOH with a IC_{50} at 24 hours of 45.81 $\mu\text{g/mL}$ and 19.05 $\mu\text{g/mL}$ at 48 hours. **Conclusion:** Several secondary metabolites of AM were identified as having a cytotoxic effect against the AGS cell line.

Key words: Cancer; stomach, *Annona muricata*, cytotoxicity

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, según el National Cancer Institute, el cáncer representa un número importante de muertes en todo el mundo ⁽¹⁾. La incidencia de cáncer gástrico en el Perú es de 15.2 por cien mil habitantes ¹, valor más alto de toda Latinoamérica: Haití (13.5), Chile (13), Colombia (12.8) y Costa Rica (12.8). Sin embargo, es un valor superado por países asiáticos como Mongolia (32.5), Japón (31.6) y Corea del Sur (27.9) ⁽²⁾. El Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) 2020 estimó una tasa de mortalidad de 15.1 por cien mil habitantes en el Perú, datos similares a la tasa de incidencia y esto es debido al diagnóstico tardío y la poca sobrevida de los pacientes ^(2,3). La sobrevida del cáncer gástrico a los 5 años es menor del 27%, estimando que para el año 2030 la mortalidad sea 1.4 millones ⁽⁴⁾. La sierra central es donde se encuentran las mayores tasas, siendo las regiones políticas como Huánuco, Huancavelica y Junín las que presentan una mayor tasa de mortalidad ⁽⁵⁾. Departamentos con un índice de pobreza alto asociado a un acceso limitado a servicios de salud y problemas con el agua potable, generando que la población elimine sus desechos en el río y esta misma agua suele estar en contacto con la población, donde se ha encontrado una baja concentración de cloro, favoreciendo la diseminación de la infección por *Helicobacter Pylori* ^(6,3).

La *Annona Muricata* (AM) pertenece a la clase *Equisetopsida* C. Agardhy y subclase *Magnoliidae* Novák ex Takht ⁽⁷⁾, más conocida como guanábana ⁽⁸⁾. Ha sido estudiada por su potencial terapéutico y por las propiedades medicinales que posee gracias a los metabolitos secundarios que se sintetizan y se sitúan en diferentes partes de la planta ⁽⁹⁾. Entre sus diversos componentes bioactivos, las acetogeninas annonáceas tienen efectos antiproliferativos y, por tanto, potenciales propiedades anticancerígenas ^(10,11).

Esto predomina en hojas y cáscara, es por ello que utilizan su extracto para buscar propiedades anticancerígenas ⁽¹²⁾.

El objetivo del tratamiento para cáncer es inhibir el crecimiento de las células cancerígenas. Sin embargo, este puede dañar células sanas generando efectos adversos que comprometen la vida del paciente o no tienen los resultados esperados ^(13,14). Estos efectos adversos ocasionan mayor susceptibilidad a infecciones, anemia, neuropatías como adormecimiento, hormigueos, disminución de la función mental y daño a nivel cardíaco ⁽¹⁵⁾. Es por ello, existen muchos artículos sobre la ayuda de las plantas medicinales para combatir dicha enfermedad y controlar sus efectos adversos ⁽¹⁶⁾. Según la Organización Mundial de la Salud el uso de la medicina tradicional tiene la posibilidad de reducir gastos y cuenta con mayor acceso para las personas de bajos recursos ⁽¹⁷⁾.

Existe evidencia previa obtenida en un estudio preclínico en ratones que demuestra el efecto protector del extracto hidroalcohólico de AM en la mucosa gástrica reduciendo el proceso de ulceración mediante la activación de prostaglandinas y reducción de factores agresivos ⁽¹⁸⁾. Además, se ha estudiado el efecto citotóxico del extracto etanólico en la línea celular de adenocarcinoma gástrico de ratón C-678 obteniendo resultados favorables ⁽¹⁹⁾. Sin embargo, no se han encontrado estudios previos que demuestren esta actividad en células humanas de adenocarcinoma gástrico.

A pesar de tener una riqueza de 5000 especies diferentes de plantas utilizadas de múltiples formas en el tratamiento de diversas dolencias que son consumidas como terapia incluso antes de acercarse a una institución de salud ^(20,21), hay pocos estudios que demuestran la verdadera utilidad de estas plantas.

En base a los datos mencionados anteriormente, el objetivo principal del presente estudio fue determinar el efecto citotóxico del extracto hidroalcohólico de AM e identificar los

grupos funcionales químicos y la mínima concentración inhibitoria frente a la línea celular humana de adenocarcinoma gástrico (AGS).

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio experimental in-vitro, tipo analítico, prospectivo el cual se encuentra enmarcado dentro del diseño de ensayo pre-clínico que incluye la línea celular AGS.

Preparación del extracto hidroalcohólico de la AM

Las hojas de la AM fueron recolectadas en Alto Amazonas, Bagua e identificadas en el laboratorio de Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales y Productos Naturales del CENSI/ INS. Se pesaron 200 gr de las hojas en polvo, se le añadió un litro y medio de alcohol a 70°C y se dejó macerar 14 días. Fue filtrado y finalmente sometido a presión reducida a 40°C con 20 rpm y 70 mbar en un rotavapor RV10C (IKA®) para obtener la resina. Los datos fueron recolectados en una ficha de observación (**Tabla 1**).

Ensayo de solubilidad

Se colocó 50 mg de la droga seca frente a metanol, etanol, cloroformo, N hexano, acetato de etilo y agua destilada en una proporción de 1 ml a cada tubo de ensayo con la finalidad de determinar la solubilidad de los componentes activos de la muestra ⁽²²⁾.

Screening fitoquímico

A partir de la resina del AMOH se realizó el screening fitoquímico para identificar los grupos funcionales químicos.

Determinación del contenido fenólico total en extracto hidroalcohólico

Los fenoles totales se determinaron mediante el método de Folin-Ciocalteu usando ácido gálico como estándar de referencia ⁽²³⁾. Se pesó 21,4 mg de la resina y para la

resuspensión se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) y agua ultrapura 1:1. Se tomó 100uL de la muestra y se diluyó en 900 uL de agua ultrapura para realizar el sistema de reacción. Se trabajó la muestra por triplicado, a cada una se le añadió 1mL de Folin-Ciocalteu y 0.1 mL del AMOH y se dejó reposar por 5 minutos. Luego se añadió 1 mL de carbonato de sodio al 7.5% y se llevó a baño maría a una temperatura de 45°C y se dejó por quince minutos. Se procedió a leer en un espectrofotómetro UV/VIS Pharo 300 (Spectroquant®) a 725nm.

Determinación de flavonoides en extracto hidroalcohólico

Para la determinación de flavonoides se utilizó la quercetina como referencia ⁽²⁴⁾. Se pesó 51mg de la resina y para la resuspensión se utilizó etanol al 96% en una solución 1:10 para realizar el sistema de reacción. Se preparó tres sets de tubos de ensayos y se leyó a 255 nm en el espectrofotómetro UV/VIS Pharo 300 (Spectroquant®). Para realizar la curva estándar se preparó una solución madre de 0,005 gr de quercetina en 50 ml de etanol al 96%. De esa solución madre se prepararon soluciones con las siguientes concentraciones: 1, 5 y 10 ppm.

Línea celular oncológica

La línea celular AGS de la European Authenticated Cell Culture Collection (ECACC 89090402) fue cultivada en Dulbecco's modified Eagle medium suplementado con suero fetal bovino al 10% y 1% de antibiótico anti fúngico en estufa con CO₂/95% y 5% de humedad a 37°C por 24 h.

Efecto citotóxico

Para poder hallar las diluciones del AMOH se calcularon a partir de una concentración stock de laboratorio de 32 mg/mL de DMSO guardado a -80°C. Las células humanas de adenocarcinoma gástrico fueron contadas mediante la cámara de Neubauer

(5×10^3 células) y colocadas en un pocillo de 96. Todas las células fueron incubadas por 12 horas a las cuales se les administró 20, 40, 80 y 160 $\mu\text{g/mL}$ de AMOH y los cambios morfológicos fueron observados en el microscopio y fotografiados (Nikon Eclipse TI®) después de ser nuevamente incubadas por 24 y 48 horas. Asimismo, se utilizó un grupo control al cual se le agregó DMSO al 0.5% sin contenido del extracto. Para determinar la viabilidad celular se utilizó 20 μL de Resazurina a una concentración de 0.15 mg/mL , el cual fue añadido a los pocillos y nuevamente incubados por 3 horas. Por último, la placa fue leída por un lector de microplacas por espectrofotometría Synergy LX (Biotek®) a longitudes de onda de 570 y 600 nm.

Procesamiento y análisis estadístico

Los datos obtenidos de la absorbancia de la viabilidad celular fueron extrapolados a Microsoft Excel para ser expresados en porcentajes tomando en cuenta al grupo control. Con respecto al efecto citotóxico, la respuesta frente a las distintas dosis y el coeficiente de inhibición (IC_{50}) fueron expresados mediante un análisis de regresión no lineal. Para la identificación de normalidad de la distribución se realizó la prueba de Shapiro-Wilk. La diferencia significativa entre valores se comparó mediante el test unidireccional ANOVA con post hoc de Tukey ($p < 0.05$) a través del software GraphPad Prism.

RESULTADOS

Tabla 1: Ficha de observación del extracto hidroalcohólico de *Annona Muricata*

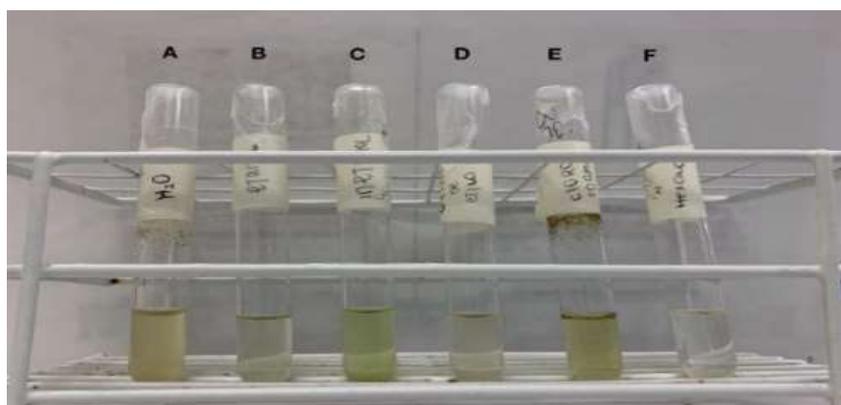
Extracto hidroalcohólico de la <i>Annona Muricata</i>	
Cantidad inicial	1500 mL de alcohol 70° y 200 gramos de AM
Cantidad final	32 gramos de resina
Porcentaje de rendimiento	16%

Tabla 2: Resultados obtenidos del ensayo de solubilidad de la droga seco de la *Annona Muricata*

Solvente	Resultado
Metanol	++++
Cloroformo	+++
Acetato de etilo	-
N hexano	-
Etanol 70%	++
H2O destilada	++

Leyenda: ++++: muy soluble, +++: soluble en mediana proporción, ++: soluble en baja proporción, -: ausente

Figura 1. Ensayo de solubilidad



Leyenda: A: agua destilada, B: etanol, C: metanol, D: acetato de etilo, E: cloroformo, F: n-Hexano.

Screening fitoquímico

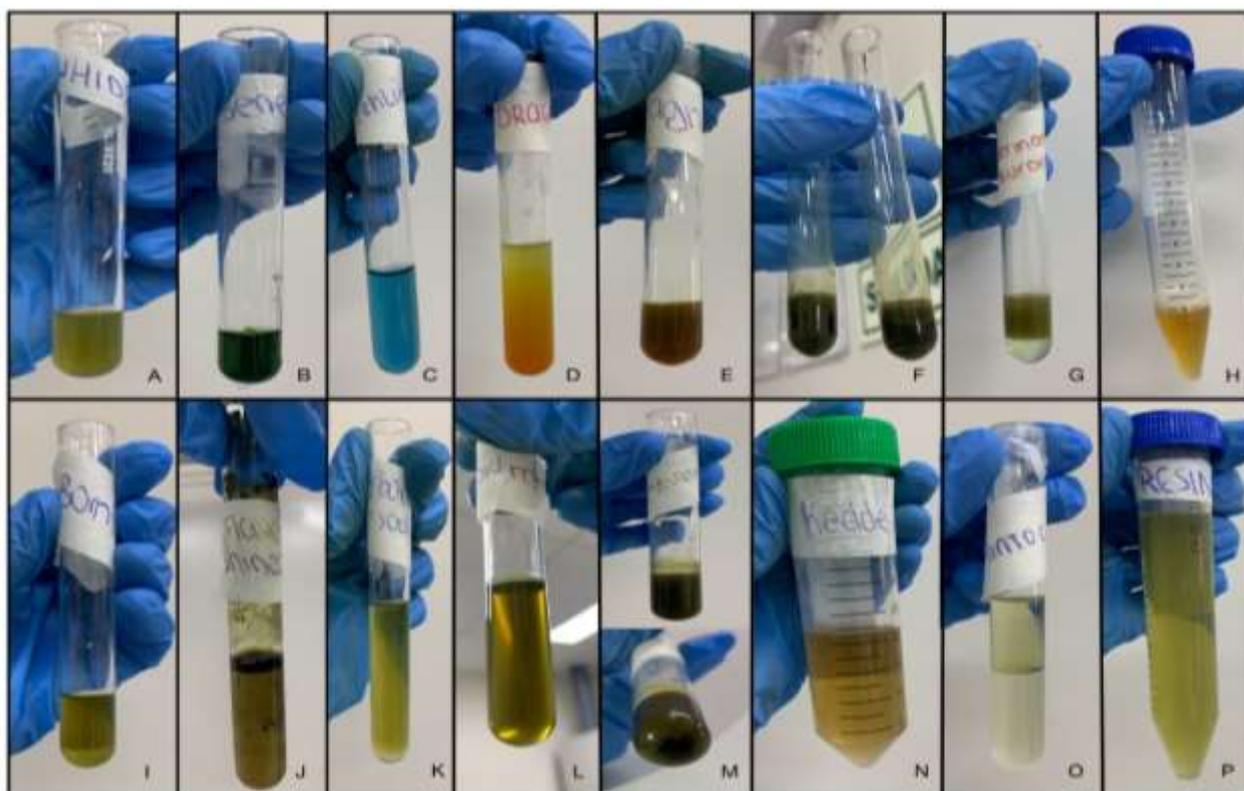
Los resultados fueron agrupados en la **Tabla 3** y **Figura 2** según el grupo de metabolitos a identificar.

Tabla 3. Screening fitoquímico de las hojas frescas de la *Annona Muricata*

Metabolito	Reactivo	Indicador	Resultado
Aminoácidos libres	Ninhidrina	Coloración	(- -)
	Benedict	Coloración	(++)
Carbohidratos reductores	Fehling	Coloración	(++)
	Dragendorff	Coloración	(++)
Alcaloides	Wagner	Precipitación	(++)
Fenoles y Taninos	Tricloruro férrico	Coloración	(++)
Triterpenos y Esteroides	Lieberman-Buchard	Coloración	(++)
Saponinas	Ensayo de espuma	Espuma	(++)
Quinonas	Borntrager	Coloración	(- -)
Flavonoides	Shinoda	Coloración	(++)
Catequinas	Carbonato de sodio	Coloración	(- -)
Proteínas	Biuret	Coloración	(++)
Taninos	Gelatina	Precipitación	(++)
Glicosidos Cardiotónicos	Kedde	Coloración	(++)
Antocianina	Antocianina	Coloración	(++)
Resina	H ₂ O	Precipitación	(- -)

Leyenda: (++) positivo, (- -) negativo

Figura 2. Screening fitoquímico



Leyenda: A: Ninhidrina, B: Benedict, C: Fehling, D: Dragendorff, E: Wagner, F: Tricloruro férrico, G: Liberman-Buchard, H: Ensayo de espuma, I: Borntrager, J: Shinoda, K: Carbonato de sodio, L: Biuret, M: Gelatina, N: Kedde, O: Antocianina, P: Resina.

Contenido total de fenoles y flavonoides

El contenido de compuestos fenólicos en el AMOH se muestra en la **Tabla 4**, estos resultados están expresados como miligramos de ácido gálico.

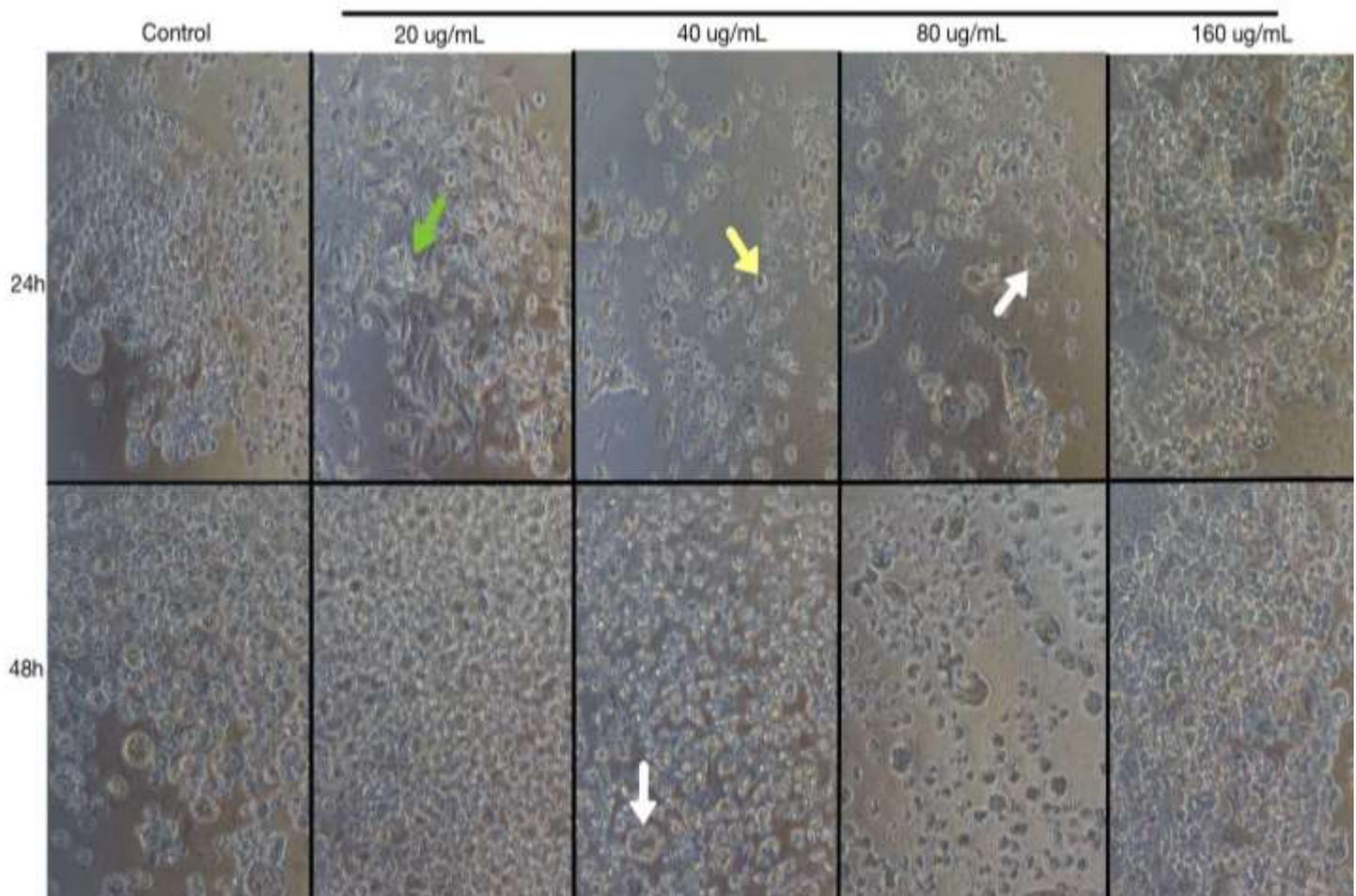
Tabla 4: Contenido total de fenoles y flavonoides

Contenido de flavonoides (mg/ gr de muestra de flavonoides equivalentes a quercetina)	Contenido de polifenoles (mg/gr de muestra de polifenoles equivalentes a ácido gálico)
0.249 mg/gr	1.013 mg/gr

Observación de la morfología celular

El AMOH causó cambios en la morfología celular. A las 24 horas, en una concentración de 20 ug/mL empezaron a estar suspendidas y otras adheridas, el efecto se empezó a notar a una concentración mayor como 40, 80 y 160 ug/mL donde había células amorfas y fragmentadas. A las 48 horas el efecto fue muchísimo mayor, se podía observar células fragmentadas con la concentración mínima (20 ug/mL) (Figura 3)

Figura 3. Efecto del extracto hidroalcohólico de *Annona muricata* a 20, 40, 80 y 160 ug/mL en la morfología de la línea celular AGS a 100X. Se muestra el grupo control de células sin extracto, pero con el vehículo (DMSO 0.5%).

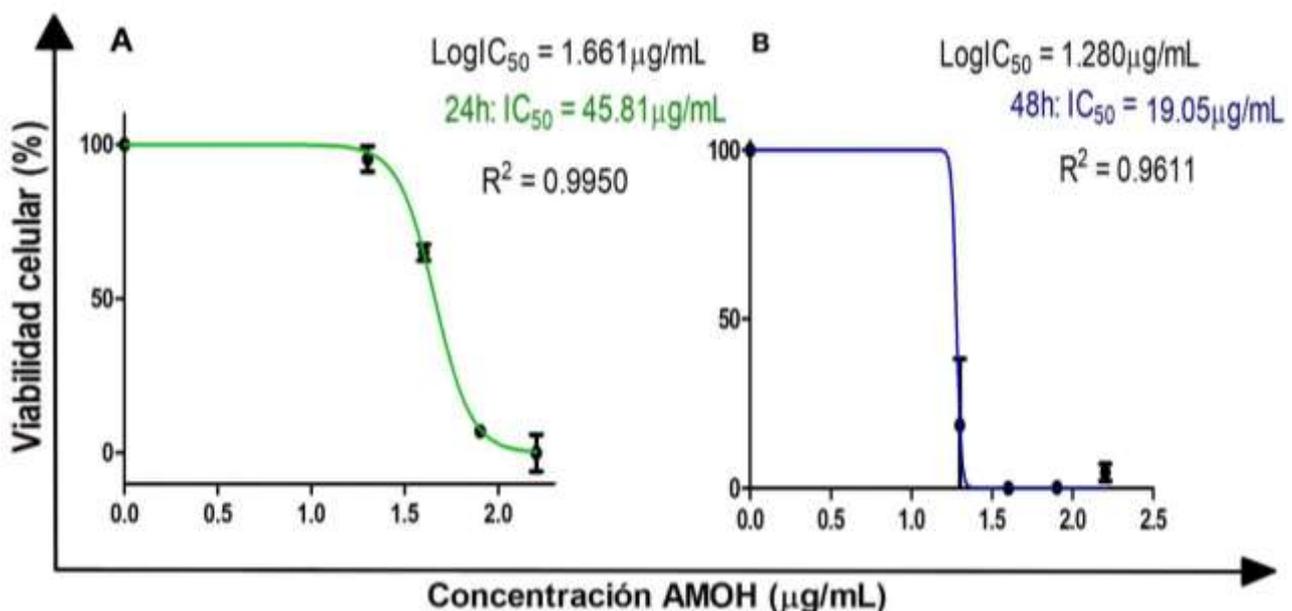


Leyenda: Flecha amarilla: células suspendidas, flecha verde: células adheridas y flecha blanca: células muertas.

Efecto citotóxico

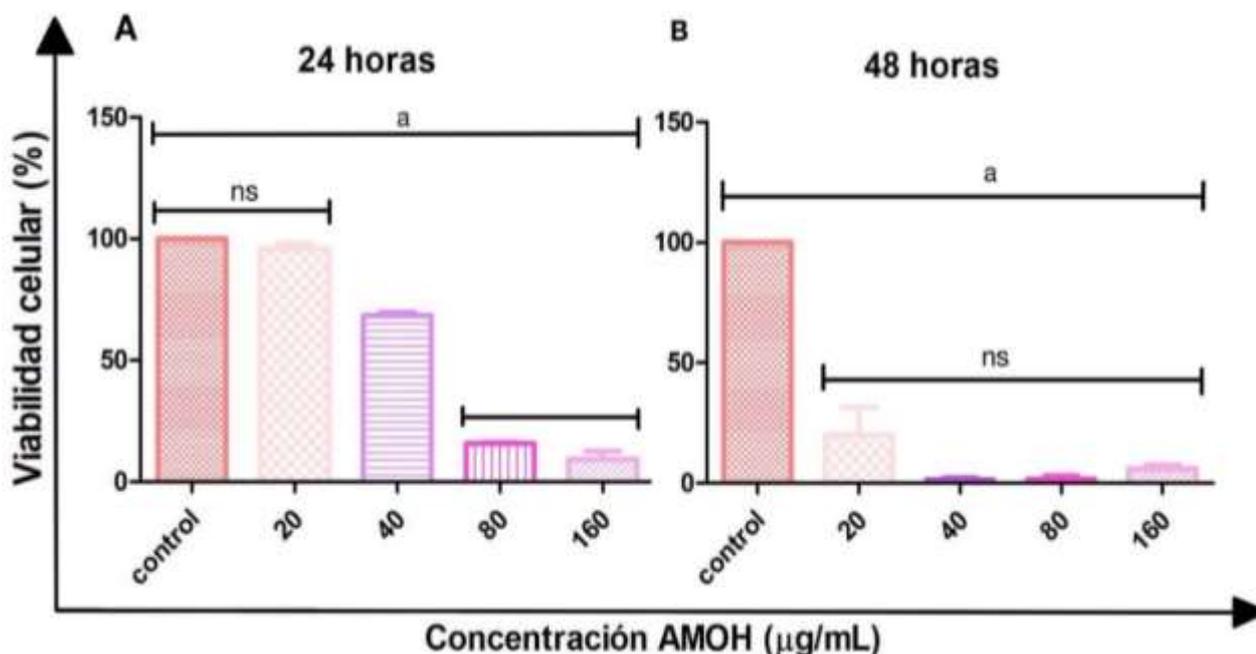
La línea celular AGS mostró una actividad citotóxica del AMOH con un IC_{50} a las 24 horas de 45.81 $\mu\text{g/mL}$ y 19.05 $\mu\text{g/mL}$ a las 48 horas (Figura 4), encontrando a las 48 horas un IC_{50} menor en comparación al obtenido a las 24 horas. No se obtuvo una diferencia significativa entre el control celular y la respuesta a 20 $\mu\text{g/mL}$ del extracto, de igual manera para 80 $\mu\text{g/mL}$ frente a 160 $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo, se encontró una significancia con valores de $p < 0.05$ entre el resto de las concentraciones a las 24 horas. A las 48 horas se obtuvo un valor significativo entre el control celular y las distintas concentraciones: 20; 40; 80 y 160 $\mu\text{g/mL}$, sin encontrar diferencia significativa entre el resto de concentraciones (Figura 5).

Figura 4. Efecto citotóxico del extracto hidroalcohólico de la *Annona Muricata* (AMOH) sobre la viabilidad celular. La línea celular AGS fue tratada a diferentes concentraciones de la AMOH (20, 40, 80 y 160 $\mu\text{g/mL}$) durante 24 y 48 horas. Los gráficos de IC_{50} se muestran con un \log_{10} dependiente de la curva de viabilidad celular de la concentración ($\mu\text{g/mL}$) de AMOH.



Leyenda: AMOH: Extracto hidroalcohólico de la *Annona Muricata*, IC_{50} : 50% inhibición del crecimiento celular, R^2 : Coeficiente de determinación del modelo de regresión no lineal.

Figura 5. Comparación de la viabilidad celular (%) frente a las distintas concentraciones del extracto de *Annona muricata* a las 24 y 48 horas.



Leyenda: ns: no significativo, a: $p < 0.05$

DISCUSION

Uno de los aspectos más importantes y de interés en el presente estudio fue determinar los grupos funcionales químicos de la AM localizados en el citoplasma de la célula vegetal.

En la identificación de flavonoides se utilizó la reacción de Shinoda la cual fue positiva tomando una coloración amarillo tenue. Estos tienen una actividad antioxidante gracias a una combinación de sus propiedades que secuestran hierro libre y quelantes, protegiendo así de inflamaciones. Adicionalmente, se ha descrito su protección contra la formación de tumores malignos y reducen el riesgo de desarrollar enfermedades cardiacas, además se acompaña de un efecto antibacterial y antiviral ⁽²⁴⁻²⁷⁾. Asimismo, la identificación de alcaloides se dio mediante la reacción de Dragendorff observando un precipitado de color pardo-naranja. Las propiedades farmacológicas de los alcaloides es bastante amplia e

incluyen la modificación del sistema nervioso, actividad analgésica, anticancerígena y antimicrobiana ⁽²⁸⁻³⁰⁾. Con respecto a taninos y fenoles, se confirmó utilizando la reacción de tricloruro férrico, donde se observó una coloración verde grisácea, confirmando la presencia de 2-OH adyacentes. Los taninos tienen una característica que los define que es la astringente, comúnmente usado para el tratamiento de un cuadro gripal, bronquitis. Cuentan con aplicaciones farmacológicas como antimicrobianos, anti fúngicos, antidiarreico y es utilizado como antídoto para metales pesados. Así mismo, los fenoles cuentan con una larga lista de propiedades, siendo las principales: antioxidante, anti alérgicas, anti tumorales y antiasmáticas, entre otras ⁽³¹⁾. Al realizar la prueba de Libermann-Burchard se pudo identificar la presencia de triterpenos y esteroides observando un cambio instantáneo de coloración. Estos compuestos tienen actividad antiinflamatoria, antitumoral y antiviral ⁽³²⁾. Adicionalmente, con la prueba de Biuret pudimos identificar la presencia de péptidos y/o proteínas frente a la coloración violeta púrpura. Estos se suelen usar en pacientes con alteraciones estomacales, por ejemplo, lactantes con síndrome de malabsorción-malnutrición ⁽³³⁾. Mediante el ensayo de espuma pudimos identificar la presencia de saponinas tanto del grupo esteroide como triterpénico, de las que se ha descrito una acción expectorante, diurética y hemolítica ^(30,34). Los glicósidos cardiotónicos fueron identificados mediante la reacción de Kedde, y estos tienen una relación con la presencia de actividad citotóxica ⁽³⁵⁾. El último metabolito que identificamos su presencia fue las antocianinas, que son fuertes antioxidantes ⁽³⁶⁾. Por último, se obtuvo resultados negativos para quinonas y resina, Todos los resultados encontrados, tanto su presencia o ausencia, en el presente estudio son apoyados por 6 estudios previos en diversos países como Brasil, Perú, Venezuela y Colombia ⁽³⁷⁻⁴³⁾.

Un hallazgo que causa controversia es no haber encontrado la presencia de aminoácidos libres y catequinas a pesar que en estudios previos sí se han reportado y estos cuentan con

diversas propiedades medicinales ^(44,45). Los aminoácidos poseen funciones reguladoras en la salud como mantenimiento de las funciones inmunes, función protectora gástrica, neuromuscular y cognitivas ⁽⁴⁶⁾. En el caso de las catequinas, estas son excelentes antioxidantes, ayudan a controlar el peso, previenen la aparición de enfermedades cardiovasculares y tienen actividad anticancerígena ⁽⁴⁷⁾.

Asimismo, aún no está clara la presencia de carbohidratos reductores ya que han sido identificados en otros estudios como en otros no. Esto puede ser explicado dependiendo del extracto que está siendo estudiado, ya que el extracto metanólico muestra mayor solubilidad de compuestos químicos a comparación del extracto etanólico, aunque sí fueron encontrados en nuestro estudio, y esto se debe a su alta presencia en la planta ⁽⁴⁸⁾.

En el presente estudio se evidenció que el AMOH tiene una actividad citotóxica potente frente a la línea celular AGS confirmado por nuestro control negativo (DSMO 10%). El IC₅₀ a las 24 horas fue de 45.81 ug/mL y a las 48 horas 19.05 ug/mL, mostrando una actividad citotóxica *in vitro* mayor a las 48h. Anteriormente, la AM ha sido estudiada por su actividad anti tumoral en diversas líneas celulares mostrando su actividad citotóxica frente a las líneas de cáncer de mama, próstata, hígado, endometrio, piel, colorrectal y neoplasias hematológicas ⁽⁴⁹⁾. Sin embargo, su potencial citotóxico frente al adenocarcinoma gástrico humano es puesto en evidencia por primera vez en el presente estudio. Hallazgo importante tomando en consideración que actualmente las regiones con mayor mortalidad por cien mil habitantes en Perú que son Huánuco (21,7), Huancavelica (17,7) y Junín (16,8), donde el índice de pobreza es alto y por ende menor es el acceso a los servicios de salud y el fácil acceso a esta planta sería de gran utilidad para su uso ⁽⁵⁰⁾. Su efecto citotóxico ha sido ampliamente estudiado en diversos tipos de cáncer los cuales han tenido diferentes mecanismos: estímulo de la apoptosis a través del daño mitocondrial, proteínas que detienen el ciclo celular en fase G₀, G₁ y G₂, un aumento en

la escisión de la caspasa-3, atribuido a su efecto de antiproliferación ⁽⁴⁹⁾. Estudios adicionales sobre los mecanismos que inducen el efecto citotóxico contra el cáncer gástrico aún son necesarios.

Adicionalmente, la actividad anti tumoral puede estar explicada por el contenido de fenoles totales identificados en el presente estudio. Diversos estudios *in vitro* muestran que los polifenoles poseen efectos antioxidantes y tienen la capacidad de retrasar o inhibir la oxidación de otras moléculas haciendo imposible la iniciación o propagación de las reacciones en cadena de radicales libres, es ahí donde radica su relación con la actividad anti proliferativa de células cancerígenas ⁽⁵¹⁾. De igual forma, se logró identificar la presencia de flavonoides que forman parte del contenido de fenoles totales, usando como referencia la quercetina, que junto a los polifenoles potencian el efecto anticancerígeno del AMOH.

CONCLUSIONES

La AM posee metabolitos secundarios con propiedades medicinales como flavonoides, carbohidratos reductores, alcaloides, fenoles, taninos, triterpenos, esteroides, saponinas, proteínas, glicósidos cardiotónicos y antocianinas. Se demostró el efecto citotóxico del AMOH frente a la línea celular AGS con un IC_{50} de 45.81 $\mu\text{g/mL}$ a las 24 horas obteniendo un efecto mayor a las 48 horas con 19.05 $\mu\text{g/mL}$, hallazgo importante ya que el efecto se mantiene e inclusive es mayor en el tiempo. Dicho efecto se puede explicar por la presencia de metabolitos identificados en el presente estudio que poseen propiedades anticancerígenas, especialmente fenoles y flavonoides. Asimismo, nuestro estudio abre una nueva posibilidad de investigación para determinar el mecanismo por el cual es posible este efecto.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los laboratorios de Química y Bioquímica de los Productos Naturales, y Cultivo Celular e Inmunología de la Universidad Científica del Sur, en especial a la Dra. Ana Mayanga Herrera, Salyoc Tapia Rojas y Roxana Ramos Aramburu quienes nos apoyaron en la elaboración del proyecto.

CONTRIBUCIONES DE AUTORES

Todos los autores discutieron los resultados, contribuyeron al manuscrito final y asumen responsabilidad frente al contenido del manuscrito.

REFERENCIA

1. Cancer Statistics - National Cancer Institute [Internet]. 2015 [citado 25 de septiembre de 2020]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>
2. Cancer today [Internet]. [citado 28 de septiembre de 2020]. Disponible en: <http://gco.iarc.fr/today/home>
3. Ramos W, Venegas D, Medina J, Guerrero P, Cruz A. Análisis de la Situación de Cáncer en el Perú 2013 Epidemiología DGd, editor. Lima: Ministerio de Salud; 2013
4. SEER Cancer Statistics Review 1975-2008 - Previous Version - SEER Cancer Statistics [Internet]. SEER. [citado 18 de septiembre de 2021]. Disponible en: https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2008/index.html
5. Diego Venegas-Ojeda, Ysela Dominga Agüero-Palacios. Tendencia de la tasa de mortalidad por cáncer gástrico en Perú: modelo de regresión segmentada de 1995 a 2013. Rev. Fac. Med. Hum. Enero 2021; 21(1):28-39. DOI 10.25176/RFMH.v21i1.3592
6. Instituto Nacional de Estadística e Informática. Perú: Encuesta Nacional de Hogares Lima: INEI; 2010. + Ramos
7. Tropicos | Name - Annona muricata [Internet]. [citado 28 de septiembre de 2020]. Disponible en: <https://www.tropicos.org/name/1600001>
8. Ortiz-Septién G, Campos-Ortiz S. Propiedades curativas de las hojas de guanábana (Annona muricata) y su impacto potencial fármaco-industrial. [Internet]. [citado 28 de septiembre de 2020]. Disponible en: <https://docplayer.es/107982407-Propiedades-curativas-de-las-hojas-de-guanabana-annona-muricata-y-su-impacto-potencial-farmaco-industrial.html>
9. Gavamukulya Y, Wamunyokoli F, El-Shemy HA. Annona muricata: Is the natural therapy to most disease conditions including cancer growing in our backyard? A systematic review of its research history and future prospects. Asian Pac J Trop Med. septiembre de 2017;10(9):835-48.
10. Yang C, Gundala SR, Mukkavilli R, Vangala S, Reid MD, Aneja R. Synergistic interactions among flavonoids and acetogenins in Graviola (Annona muricata) leaves confer protection against prostate cancer. Carcinogenesis. 1 de junio de 2015;36(6):656-65.
11. Bermúdez Alexis, Oliveira-Miranda María A, Velázquez Dilia. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. Asociación Interciencia. Caracas; 2005. 453 p.

12. Rodríguez Lado DC, Sori Díaz Y, Barceló Tellería JA. Necesidad de un protocolo integrado de Medicina Natural y Tradicional dirigido al paciente oncológico. *Medicentro Electrónica*. marzo de 2019;23(1):75-8.
13. Sanchez Martinez C, Lopez Garcia N. Cáncer de mama. Temas actuales [Internet]. [citado 18 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://ergon.es/producto/cancer-de-mama-temas-actuales/>
14. Loraine S, Alberto M-EJ, Ciencia C de. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México Medicinal plants as potential agents against cancer, relevance for Mexico [Internet]. undefined. 2010 [citado 28 de septiembre de 2020]. Disponible en: </paper/Las-plantas-medicinales-en-la-lucha-contra-el-para-Loraine-Alberto/c17784bd5fa8b7dcdca145343dd76e91c147f61c>
15. Smith RA, Andrews K, Brooks D, DeSantis CE, Fedewa SA, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer screening in the United States, 2016: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2016;66(2):95-114.
16. Llopart Carles N, Llopart Carles N. Las plantas medicinales como fuente de compuestos antineoplásicos [Internet]. 2016 [citado 28 de septiembre de 2020]. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/49804/>
17. Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2013.
18. Bento EB, Júnior FE de B, de Oliveira DR, Fernandes CN, de Araújo Delmondes G, Cesário FRAS, et al. Antiulcerogenic activity of the hydroalcoholic extract of leaves of *Annona muricata* Linnaeus in mice. *Saudi J Biol Sci*. mayo de 2018;25(4):609-21.
19. Quispe A, Zavala D, Posso M, Rojas J, Vaisberg A. Efecto citotóxico de *Annona muricata* (guanabana) en cultivo de líneas celulares de adenocarcinoma gástrico y pulmonar. *CIMEL Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana*. 2007;12(1):19-22.
20. Egg AB. Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo; 1999. 588 p.
21. Mejía Galvez J, Carrasco E, Miguel R JL, Flores SA. Conocimiento, aceptación y uso de medicina tradicional peruana y de medicina alternativa/complementaria en usuarios de consulta externa en Lima Metropolitana. *Revista Peruana de Medicina Integrativa*. 18 de julio de 2017;2(1):47.
22. Lozano N, Solís L, Bonilla P. Sustancias químicas bioactivas de la *Peperomia flavamenta*. *Ciencia e Investigación*. 15 de junio de 1998;1(1):32-4.
23. Marina D, Avella G, Alberto C, García O, Cisneros A. Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal. undefined [Internet]. 2008 [citado 18 de septiembre de 2021]; Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/Medici%C3%B3n-de-Fenoles-y-Actividad-Antioxidante-en-Marina-Avella/f41204d2a19ab71734cff45f1bfdaa11267f043c>

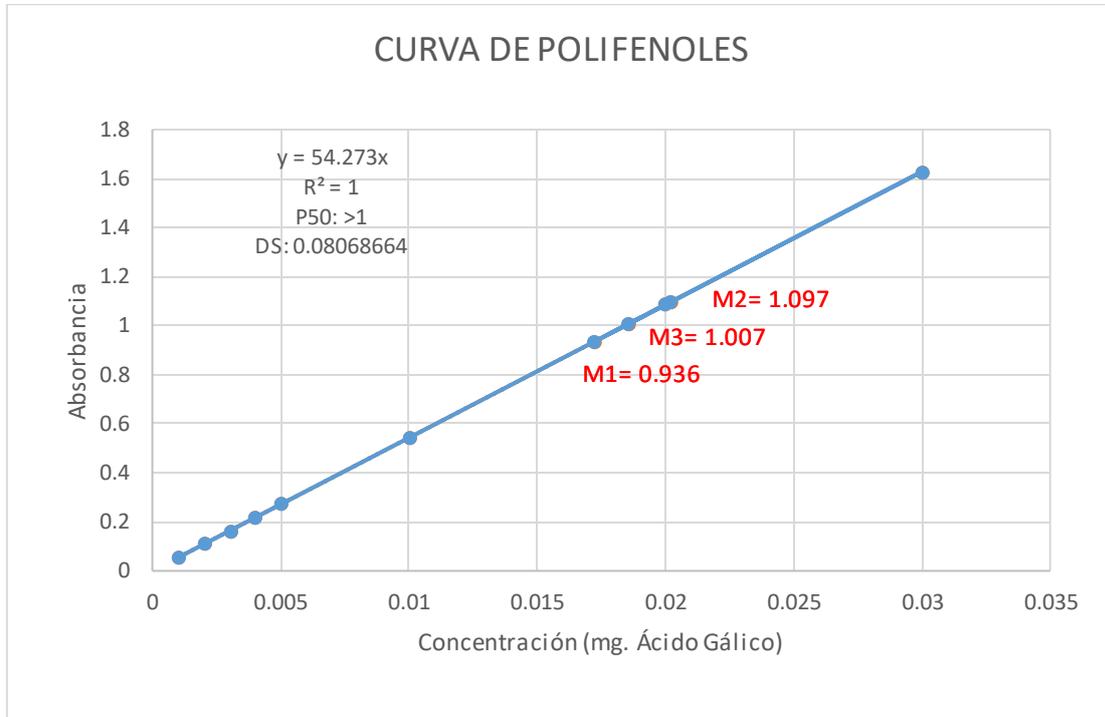
24. Colina Ramos AC. Análisis fitoquímico, determinación cualitativa y cuantitativa de flavonoides y taninos, actividad antioxidante, antimicrobiana de las hojas de «*Muehlenbeckia hastulata* (J. E. Sm) I. M. Johnst» de la zona de Yuca (Cusco). 2016;87-87.
25. Jiménez CIE, Martínez EYC, Fonseca JG. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM*. 2009;52(2):73-5.
26. Guiance SH, Marino L, Isern DM, Coria ID, Irurzun I. Flavonoides: aplicaciones medicinales e industriales. *Invenio: Revista de investigación académica*. 2019;(40):11-27.
27. Calle EE, Rodríguez C, Jacobs EJ, Almon ML, Chao A, McCullough ML, et al. The American Cancer Society Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort: rationale, study design, and baseline characteristics. *Cancer*. 15 de enero de 2002;94(2):500-11.
28. González-Chavarro CF, Gutiérrez MC, Blanco VCP, Ruiz XMC. Amaryllidaceae: fuente potencial de alcaloides. *Actividades biológicas y farmacológicas. Ciencia y Agricultura [Internet]*. 2020 [citado 18 de septiembre de 2021];17(3). Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/5600/560064435003/html/>
29. Rivero N, Gomez M, Medina J. Search for Bioactive Alkaloids in *Hymenocallis* Species: *Pharmaceutical Biology: Vol 42, No 4-5*. [citado 18 de septiembre de 2021]; Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13880200490511774>
30. Waller GR. *Saponins: Chemistry and Pharmacology of Natural Products* By K. Hostettman and A. Marston (Lausanne University, Switzerland). Cambridge University Press: Cambridge, U.K. 1995. xii + 548 pp. \$120.00. ISBN 0-521-32970-1. *J Am Chem Soc*. 1 de enero de 1996;118(35):8509-8509.
31. Ojeda CM, Ramos DA, Núñez IC. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en un extracto blando de flores de *Calendula officinalis* Linn. *Orange Journal*. 2020;2(3):20-31.
32. López-Carreras N, Miguel M, Aleixandre A. Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. Beneficial health properties of iridoids terpenes [Internet]. 2012 [citado 18 de septiembre de 2021]; Disponible en: <https://digital.csic.es/handle/10261/101431>
33. Benítez R, Ibarz Ribas A, Pagan i Gilabert J. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. 2008 [citado 18 de septiembre de 2021]; Disponible en: <https://repositori.udl.cat/handle/10459.1/49268>
34. Identificación de Saponinas Marcha | PDF | Bioquímica | Química [Internet]. Scribd. [citado 18 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/373329382/Identificacion-de-Saponinas-Marcha>
35. Contribución al estudio fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *Kalanchoe daigremontiana* Raym. -Hamet & H. Perrier | REVISTA DE LA ASOCIACION COLOMBIANA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS. 1 de enero de 2019 [citado 18 de septiembre de 2021]; Disponible en: <https://www.revistaaccb.org/r/index.php/accb/article/view/159>

36. Reyes NM. Análisis de características diferenciales entre antocianinas y betacianinas en extractos de plantas mediante pruebas de color. *Ambiociencias*. 25 de diciembre de 2018;(16):38-48.
37. Poma EM, Requis ER, Gordillo GC, Fuertes CM. Estudio fitoquímico y actividad antiinflamatoria de la *Annona muricata* L. (guanábana) de Cuzco. *Ciencia e Investigación*. 30 de diciembre de 2011;14(2):29-33.
38. Vit P, Santiago B, Pérez-Pérez EM. Composición química y actividad antioxidante de pulpa, hoja y semilla de guanábana *Annona muricata* L. *Interciencia*. 2014;39(5):350-3.
39. Cunha HR, Cantuária P de C, Costa EVM da, Farias ALF, Miranda Júnior JP, Mota LJT, et al. SCREENING FITOQUÍMICO, ANÁLISE CITOTÓXICA E ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DAS FOLHAS DE ANNONA MURICATA L. (1753) (ANNONACEAE). En 2021 [citado 18 de septiembre de 2021]. p. 208-19. Disponible en: <http://www.editoracientifica.org/articles/code/210303480>
40. Hoyos Roldán AF, Mora Páez GA, Gómez Barrera M. Análisis fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad biológica del extracto etanólico de las semillas de la guanábana (*annona muricata* L.). 2018 [citado 18 de septiembre de 2021]; Disponible en: <https://repositorio.sena.edu.co/handle/11404/6759>
41. Bravo A, Rivera C, Ale D, Huamán M, Muñoz H, Delmás R, et al. OBTENCIÓN DE PLAGUICIDAS NATURALES A PARTIR DE SEMILLAS DE CHIRIMOYA (*Annona cherimolia* Mill.) Y GUANÁBANA (*Annona muricata* L.). *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*. 31 de diciembre de 2010;13(2):96-103.
42. Dueñas Cely DP. Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad citotóxica de un extracto de hojas de *Annona muricata* (Guanábana) frente a las líneas celulares MCF-7, 4T1, B16 y 3T3. Pontificia Universidad Javeriana; 2019.
43. Alegre A, Iannacone J, Carhuapoma M, Alegre A, Iannacone J, Carhuapoma M. TOXICIDAD DEL EXTRACTO ACUOSO, ETANÓLICO Y HEXÁNICO de *Annona muricata*, *Minthostachys mollis*, *Lupinus mutabilis*, Y *Chenopodium quinoa* SOBRE *Tetranychus urticae* Y *Chrysoperla externa*. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*. 2017;33(3):273-84.
44. Matos Alejo MM. Evaluación del efecto pediculicida del extracto etanólico de las semillas de *Annona muricata* L. “guanábana” sobre *Pediculus humanus capitis* (piojo humano). Repositorio de Tesis - UNMSM [Internet]. 2013 [citado 18 de septiembre de 2021]; Disponible en: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/14146>
45. Acosta Vásquez RC, Díaz Peña BJI. Evaluación composicional, capacidad antioxidantes de pulpa y cáscara de la *Annona muricata* L. (Guanábana). Universidad Nacional de la Amazonía Peruana [Internet]. 2016 [citado 18 de septiembre de 2021]; Disponible en: <https://repositorio.unapiquitos.edu.pe/handle/20.500.12737/4086>
46. Cardona Serrate F. Proteínas y aminoácidos. Propiedades físico-químicas y funcionales. 30 de junio de 2020 [citado 18 de septiembre de 2021]; Disponible en: <https://riunet.upv.es/handle/10251/147138>

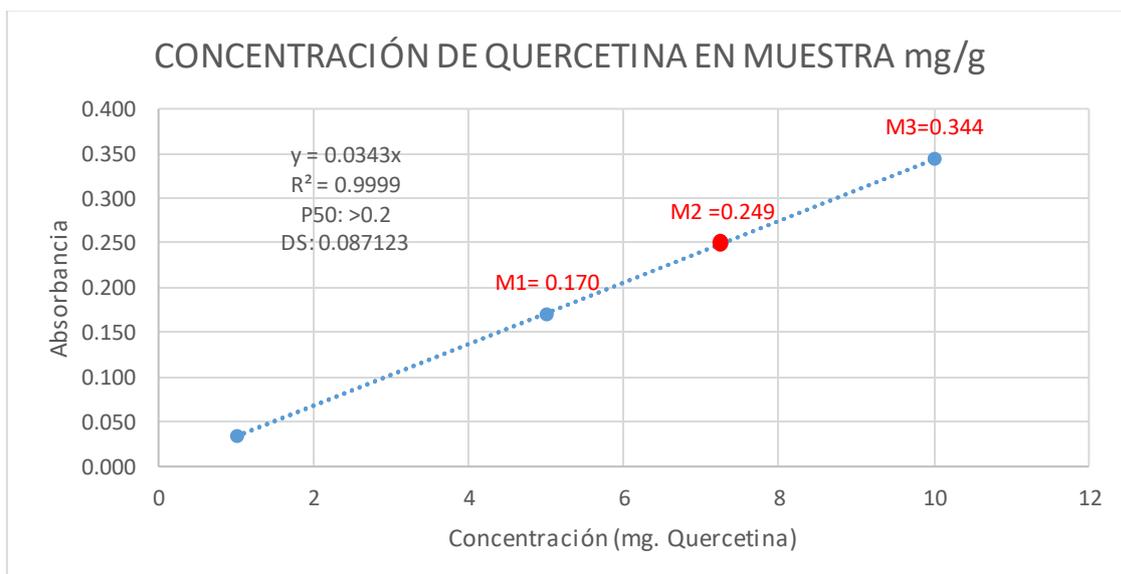
47. Salinero C, Barreiro R, Regueira N, Vela P. TÉ, CATEQUINAS Y SALUD. 2018;99.
48. Mío Roque VM, Cunyarache Pangalima D. Formulación y Caracterización de un Filtrante a Partir de las Hojas de Guanábana (*Annona Muricata* L.). 7 de marzo de 2018 [citado 18 de septiembre de 2021]; Disponible en: <https://repositorio.unprg.edu.pe/handle/20.500.12893/1803>
49. Alvarado Mayor PN, Bautista Flores A. Propiedades medicinales de la *annona muricata*: una revisión de la literatura. Repositorio Institucional – UCS [Internet]. 2021 [citado 18 de septiembre de 2021]; Disponible en: <https://repositorio.cientifica.edu.pe/handle/20.500.12805/1916>
50. Venegas Ojeda D, Alvarado Tolentino C. Sobrevida de pacientes con cáncer gástrico en el Perú, 2009-2010. Survival rate of patients with stomach cancer in Peru, 2009–2010 [Internet]. 2015 [citado 18 de septiembre de 2021]; Disponible en: <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/5425>
51. Rivas-Morales C, Oranday-Cárdenas MA, Verde-Star MJ. Investigación en plantas de importancia médica | OmniaScience Monographs [Internet]. 2019 [citado 18 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.omniascience.com/books/index.php/monographs/catalog/book/97>

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Curva de Polifenoles



Curva de Quercetina



COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN



Constancia

Luego de la revisión de la solicitud, el presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad Científica del Sur (CIEI-CIENTÍFICA) hace constar que el CIE-CIENTÍFICA ha aprobado de forma expedita la **enmienda/modificación** del proyecto de investigación que se detalla continuación:

Código de registro: **798-2020-PRE15**

Título: **Efecto citotóxico de la *Annona muricata* frente a líneas celulares oncológicas de adenocarcinoma de glándula mamaria y de útero**

Investigador(es): **Paola Natalia Alvarado Mayor;
Alexandra Bautista Flores**

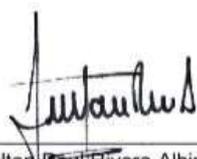
Constancia de aprobación: **22-CIEI-CIENTÍFICA-2021**

Periodo de vigencia: **Del 29/01/2021 al 28/07/2022**

La **enmienda/modificación** corresponde a los siguientes documentos:

1. **Proyecto de investigación**, versión recibida en fecha 17 de julio del 2021. Por problemas logísticos debido al periodo de pandemia por COVID-19, se hizo necesario realizar cambios, los cuales se detallan a continuación:
 - a. **Cambios en la locación donde se realizará el estudio.** Originalmente se indicaba que se realizaría en laboratorios del Instituto Nacional de Salud; se ha actualizado a laboratorios de la Universidad Científica del Sur.
 - b. **Cambios en la muestra a estudiar en el estudio.** Originalmente se usaría muestras de adenocarcinoma provenientes de glándula mamaria y útero; se ha actualizado a muestras de adenocarcinoma gástrico.
 - c. **Cambio en el título, objetivos e hipótesis.** En concordancia con los dos numerales anteriores, se ha hecho cambios en el proyecto. El título se modifica a: **"Efecto citotóxico de la *Annona muricata* frente a la línea celular de adenocarcinoma gástrico"**. Se hacen cambios similares en objetivos e hipótesis.

Lima, 22 de octubre del 2021.




Mg. Fulton Paul Rivera Albinagorta
Presidente

Comité Institucional de Ética en Investigación



RESOLUCIÓN DIRECTORAL ACADÉMICA DE CARRERA No. 659 - DACMH-DAFCS-U. CIENTIFICA-2021

Lima, 22 de octubre del 2021

VISTO:

El informe de revisión independiente académica y la aprobación de un Comité de Ética del proyecto de tesis titulado: **"EFECTO CITOTÓXICO DE LA ANNONA MURICATA FRENTE A LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO "**.

CONSIDERANDO:

Que, de acuerdo al Reglamento General de la Universidad Científica del Sur y el reglamento y Procedimientos de trabajos de Investigación para obtener el **Título Profesional de Médico Cirujano**.

Que, de acuerdo a la normativa vigente de la Universidad Científica del Sur, en uso de las atribuciones conferidas al Director Académico de la Carrera.

SE RESUELVE:

ART. 1° Aprobar, en vías de regularización e inscribir el proyecto de tesis titulado: **"EFECTO CITOTÓXICO DE LA ANNONA MURICATA FRENTE A LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO"**, presentado por las alumnas **PAOLA NATALIA ALVARADO MAYOR** y **ALEXANDRA BAUTISTA FLORES** con N° de registro: **798-2020-PRE15**.

ART. 2° Nombrar a la Docente Amanda Asunción Lovera Arellano, como asesor para el desarrollo de la tesis en cuestión.

Regístrese, comuníquese y archívese.



Mg. JORDI GRAU MONGE
Director Académico
Carrera de Medicina Humana



c.c. Archivo