

Efectos citotóxicos *in vitro* de extractos y fracciones de *Espeletia killipii* Cuatr. frente a líneas celulares tumorales humanas

Alba N. Téllez Alfonso^{1*}, Clemencia de Castro², Tulia Riveros de Murcia²,
Rubén Torrenegra¹

¹Departamento de Química, Universidad Javeriana, Grupo de Investigación Fitoquímica, Bogotá, Colombia,

²Instituto Nacional de Cancerología E.S.E., Grupo de Investigación Nuevos Fármacos en Oncología, Bogotá, Colombia

RESUMO: “Efeitos citotóxicos *in vitro* de extratos e frações de *Espeletia killipii* Cuatr. frente a linhas celulares tumorais humanas”. O extrato etanólico e as frações de *Espeletia killipii* (espécie endêmica da vegetação dos páramos do altiplano Cundiboyacense); mostraram atividade citotóxica significativa *in vitro* nas linhagens celulares tumorais humanas de câncer de mama MCF-7, CSC-1170, CSC-1595, CSC-3322, CSC-3325 e na linhagem Hep-2 de laringe. A fração CH₂Cl₂ e suas sub-frações foram ativas contra as linhagens celulares cancerígenas de mama na concentração de 50 µg/mL, obtendo-se percentagens de viabilidade entre 13 e 20%. O princípio ativo ainda não identificado foi obtido por ensaios bioguiados sucessivos e apresentou valores de Concentração Citotóxica média (CC₅₀) menores que 1 µg/mL para as linhagens celulares colombianas CSC-1170, CSC-1595, CSC-3322 e CSC-3325; CC₅₀ = 1 µg/mL contra MDA MB 435 e NCI-H23; contra MCF-7 uma CC₅₀ = 2 µg/mL e uma CC₅₀ superior a 16 µg/mL contra PC-3 e U-251.

Unitermos: *Espeletia killipii*, Asteraceae, atividade citotóxica.

ABSTRACT: “*In vitro* cytotoxic effects of extract and fractions of *Espeletia killipii* Cuatr. against human tumor cell lines”. It was found that the ethanol extracts and fractions of *Espeletia killipii* (an endemic species of the páramo vegetation of the Cundiboyacense plateau) exhibited cytotoxic activity against several human tumor cell lines. Thus, the extracts and fractions exhibited significant cytotoxic activity against both the human tumor cell lines of breast cancer MCF-7, CSC-1170, CSC-1595, CSC-3322, CSC-3325 and the Hep-2 cell lines of larynx. The CH₂Cl₂ fraction and its sub-fractions were active against the breast lines at concentration of 50 µg/mL, with a viability percentage between 13 and 20%. The active principle, not identified yet, was obtained by successive bio-directed assays. It showed activity against the Colombian cell lines CSC-1170, CSC-1595, CSC-3322 and CSC-3325 at a half Cytotoxic Concentration (CC₅₀) less than 1 µg/mL, against MDA MB-435 and NCI-H23 at CC₅₀ = 1 µg/mL against MCF-7 at CC₅₀ = 2 µg/mL, and against PC-3 and U-251 at CC₅₀ greater than 16 µg/mL.

Keywords: *Espeletia killipii*, Asteraceae, cytotoxic activity

INTRODUCCION

Como parte del programa de investigación “La Biodiversidad Colombiana como fuente de nuevos fármacos en oncología” se evaluó el efecto citotóxico de los extractos y fracciones obtenidas de especies vegetales, lo cual constituye una etapa primordial en el tamizaje de sustancias promisorias para el tratamiento del cáncer.

Este estudio se dirigió principalmente hacia el establecimiento del potencial de extractos y fracciones obtenidos de la especie *Espeletia killipii*, Subtribu *Espeletiinae* (Asteraceae), como fuente de sustancias con actividad citotóxica. *E. killipii* se caracteriza por su riqueza en metabolitos secundarios, el Grupo de Investigación Fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana ha aislado de *Espeletia killipii* diferentes sustancias entre ellas diterpenos derivados del kaureno,

triterpenos del tipo cicloartano, sesquiterpenlactonas y flavonoides (Torrenegra et al., 1994; 1996). La literatura universal reporta efectos citotóxicos y antitumorales para estos tipos de compuestos, lo cual motivó su inclusión en el programa (Stitcher., 1977, Majekodunmi et al., 1996; Smith-Kielland et al., 1996; Ribeiro et al., 2002).

El efecto citotóxico se determinó por medio del ensayo de viabilidad celular con el método MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio).

MATERIAL Y METODOS

Material vegetal

Las hojas de *Espeletia killipii*, se recolectaron en el páramo de Guasca. Un ejemplar se depositó en el Herbario Nacional de Colombia bajo el No. Col. 374925.

Extracción y aislamiento

El extracto etanólico de hojas secas y pulverizadas de *E. killipii* (32 g), se filtró y concentró, resuspendiendo el residuo seco en MeOH agua. El extracto floculado (19 g) se le realizó fraccionamiento líquido-líquido con petrol, CH_2Cl_2 y AcOEt. La fracción activa CH_2Cl_2 (6.5g) se separó por cromatografía en columna con la fase RP-18 en una relación fase estacionaria: muestra (1:30) y fue eluída con mezclas MeOH:H₂O (8:2, 9:1 MeOH); de la cual se obtuvieron 10 subfracciones denominadas K1 - K10, así: con el eluyente MeOH:H₂O (8:2) se obtuvieron K1 (3.2 g), K2 (619.3 mg), K3 (377.7 mg), K4 (549.3 mg); en MeOH:H₂O (9:1) K5 (467.9 mg), K6 (428.6 mg), K7 (303 mg); en MeOH K8 (353.8 mg) y K9 (201.4 mg) y en MeOH:CH₂Cl₂ K10 (81.5 mg). La subfracción activa K1 (3.2 g), se le realizó separación cromatográfica en columna con fase RP-18 en una relación fase estacionaria: muestra (1:60) fue eluída con MeOH:H₂O de la cual se obtuvo 12 subfracciones denominadas K1(1) - K1(12), así: con el eluyente MeOH:H₂O (6:4) se obtuvieron las subfracciones K1(1) a K1(9). Según los resultados de la actividad y la similitud cromatográfica en CCD Si-gel (Petrol:AcOEt 7:3) se mezclaron las fracciones K1(3) a K1(6); obteniéndose 1.1 g de esta nueva subfracción denominada K1(3) se separó por CC con RP-18 en una relación fase estacionaria: muestra (1:200) de la cual se obtuvieron 4 fracciones así: en MeOH:H₂O (1:1) la fracción 1 (386 mg), MeOH: H₂O (6:4) la fracción 2 (264 mg), en MeOH:H₂O (8:2) la fracción 3 (24.1 mg) y en MeOH: H₂O (9:1) la fracción 4 (306 mg). De la fracción 1 y 2 precipitó una sustancia (60 mg), la cual fue purificada por cristalización fraccionada con CHCl_3 - MeOH y que mostró la mayor actividad citotóxica.

Cultivos celulares

Se utilizaron las líneas celulares neoplásicas suministradas por el Instituto Nacional del Cáncer en EEUU: HEP-2 (laringe), CMF-7, MDA MB 435 (seno), NCI H-23 (pulmón), U-251 (sistema nervioso central), PC-3 (próstata) y cuatro líneas de cáncer de seno obtenidas y caracterizadas en el Instituto Nacional de Cáncer de Colombia, denominadas CSC-1170, CSC-1595, CSC-3322 y CSC-3325 las cuales presentan las siguientes características:

CSC 1170. Línea celular colombiana obtenida en el Laboratorio de Biología Experimental INC del tumor de una paciente de 55 años con cáncer de seno (ductal infiltrante) estadio III B, con las siguientes características: aneuploide, 68 cromosomas, hormonodependiente sensible a las antraciclina y 5- fluoracilo.

CSC 1595. Línea celular colombiana obtenida en el Laboratorio de Biología Experimental del INC del tumor una paciente de 77 años con cáncer de seno (ductal infiltrante) avanzado, con las siguientes características:

aneuploide, 70 cromosomas, hormonodependiente, sensible a antraciclina y 5- fluoracilo.

CSC 3322. Obtenido por el laboratorio de Biología Experimental del INC, del tumor de una paciente de 48 años con cáncer de seno bilateral (ductal infiltrante) con las siguientes características: células epiteliales con amplificación del oncogén erbB2 y mutación del gen supresor de tumor P53.

CSC 3325. Obtenido por el Laboratorio de Biología Experimental del INC, del tumor de una paciente de 53 años con cáncer de seno (ductal infiltrante), estadio III B, con las siguientes características: células epiteliales hormonodependientes

Los cultivos se realizan en cajas de 96 pozos, en el medio L-15 (SIGMA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO) y 100 $\mu\text{L}/10\text{ml}$ penicilina estreptomicina y neomicina (SIGMA 5.000U, 5 mg estreptomicina y 10 mg neomicina/ml). Las células de las diferentes líneas y cultivos secundarios se resuspenden en el medio de cultivo de tal forma que haya 40.000 células en 100 μL por pozo. Los cultivos se incuban a 37° C y 5% de CO_2 y 100% de humedad relativa por 24 horas con el objeto de tener un buen crecimiento celular.

Bioensayos

Los ensayos citotóxicos se realizaron en el laboratorio de Biología experimental de Instituto Nacional de Cancerología de Bogotá Colombia. La viabilidad celular fue determinada por la técnica del MTT, ensayo que se encuentra ampliamente referenciado en la literatura (Studzinski, 1999). Se tomó como control negativo el solvente DMSO 0.2% y control positivo doxorubicina a 0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Principio activo

Sólido blanco con Pf: 163-165 °C; Rf: 0.53 en petrol: AcOEt (6:4), sílica gel. Coloración verde azulosa con $\text{CoCl}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$. $[\alpha]_D = -21^\circ$ (C = 1.1, CHCl_3). I.R: (KBr). 1780 cm^{-1} , 1740 y 1240 cm^{-1} y en 1720 cm^{-1} . EM: M⁺: m/z 448 (C₂₃H₂₈O₉); 388; 348; 83, 55 (pico base).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A las fracciones petrol, CH_2Cl_2 y AcOEt obtenidas a partir del extracto total etanólico de hojas de *E. killipii*, se les evaluó el efecto citotóxico a la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, frente a las líneas derivadas de cáncer de seno CMF-7, CSC-1170, CSC-1595, CSC-3322 y CSC-3325; las cuatro últimas obtenidas y caracterizadas por el Laboratorio de biología experimental del Instituto Nacional de Cáncer en Colombia y la línea HEP-2 de laringe. Se consideraron activas las fracciones que presentaron porcentajes de viabilidad inferiores a un 50 %. La fracción CH_2Cl_2 presentó la mayor actividad como se muestra en la Tabla 1; con porcentajes de viabilidad

inferiores a 44% siendo más activo para la línea MCF-7 con un 14% de viabilidad y no activo para la línea Hep-2 de laringe.

La fracción CH_2Cl_2 (6.5 g) se percoló en una columna empacada con RP-18 en una relación fase estacionaria: muestra 1:30 y eluida con mezclas MeOH:

H_2O , obteniéndose 10 subfracciones denominadas K1, K2 - K10, a las cuales se les evaluó su efecto citotóxico en las líneas celulares a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, demostrándose actividad en las subfracciones denominadas K1 y K3, como se demuestra en la tabla 2. Teniendo en cuenta que la subfracción K1 fue más activa

Tabla 1. Porcentaje de viabilidad de las células con relación al control (DMSO 0.2%) para las fracciones Petrol, CH_2Cl_2 y AcOEt frente a las líneas celulares probadas. Concentración aplicada 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para cada una.

	Porcentaje de Viabilidad		
	Fr. Petrol	Fr. CH_2Cl_2	Fr. AcOEt
CSC 1595	40	23	89
HEP 2	73	71	70
MCF 7	79	14	96
CSC 3322	54	21	106
CSC 3325	85	44	77
CSC 1170	37	19	90

que K3 por presentar porcentajes de viabilidad con valores inferiores al 36%, mostrando la mayor actividad sobre la línea MCF-7 (13%). Esta subfracción presentó actividad para con la línea Hep-2 (36%).

La subfracción K1 se separó de nuevo por cromatografía en columna con la fase estacionaria RP 18 y las fases móviles MeOH: H_2O en orden descendente de polaridad, de ella se obtuvieron 12 subfracciones a las

que se les denominó K1(1) - K1(12). La actividad de las mismas a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se presenta en la tabla 3. De acuerdo a los resultados las fracciones más activas fueron K1 (3), K1 (4), K1 (5) y K1 (6).

Por similitud cromatografica (CCD, Si gel Petrol: AcOEt 7:3), se mezclaron las fracciones K1(3) a K1(5) para continuar con el fraccionamiento de las mismas por

Tabla 2. Porcentaje de viabilidad de las células con relación al control (DMSO 0.2%) para la fracción CH_2Cl_2 frente a las líneas celulares probadas. Concentración aplicada 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para cada una.

	% de Viabilidad Celular									
	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10
CSC 1595	19	79	23	101	92	96	96	97	96	94
CSC 3322	20	131	20	88	58	66	63	63	75	91
CSC 3325	36	80	57	96	98	81	76	77	66	90
CSC 1170	21	96	26	90	26	70	63	78	106	97
HEP 2	36	84	90	87	89	76	101	72	98	99
MCF 7	13	65	17	61	22	106	106	96	102	97

Tabla 3. Porcentaje de viabilidad de las células con relación al control (DMSO 0.2%) para la subfracción K1 de la fracción CH_2Cl_2 frente a las líneas celulares probadas. Concentración aplicada 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para cada una.

	PORCENTAJE DE VIABILIDAD											
	K1(1)	K1(2)	K1(3)	K1(4)	K1(5)	K1(6)	K1(7)	K1(8)	K1(9)	K1(10)	K1(11)	K1(12)
CSC 1595	40	57	28	25	22	27	60	37	59	26	50	72
CSC 3322	39	59	21	16	15	21	51	32	48	33	42	66
CSC 3325	58	59	46	38	40	45	58	40	40	97	111	97
CSC 1170	101	46	38	17	18	74	99	112	111	32	42	101
HEP 2	75	37	48	32	18	72	102	79	90	23	29	94

cromatografía en columna con fase RP-18 y la mezcla MeOH:H₂O (6:4) de esta separación se obtuvieron 4 fracciones a las cuales se les determinó su efecto citotóxico a 50 µg/mL, obteniéndose mayor actividad en las fracciones 1 y 2 como se demuestra en la tabla 4. El porcentaje de viabilidad de estas dos fracciones está por debajo del 30 % para todas las líneas celulares de cáncer de seno evaluadas; incrementándose la actividad para la línea CSC-3325 (13%).

Figuras 1). En el estudio se mostró cierta especificidad citotóxica frente a las líneas celulares de cáncer de seno, con mayor evidencia en las líneas celulares colombianas CSC- 1170, CSC-1595, CSC-3322 y CSC-3325, en las cuales se encontraron valores de CC₅₀ menores de 1 µg/mL; sobre las líneas MDA MB 435 (seno) y NCI H23 (pulmón) se encontró actividad con una CC₅₀ = 1 µg/mL; la línea MCF-7 (seno) con CC₅₀ = 2 µg/mL; mientras que no se encontró actividad importante para las líneas

Tabla 4. Porcentaje de viabilidad de las células con relación al control (DMSO 0.2%) para la subfracción K1(3) frente a las líneas celulares probadas. Concentración aplicada 50 µg/mL para cada una.

	PORCENTAJE DE VIABILIDAD			
	Fracción 1	Fracción 2	Fracción 3	Fracción 4
MCF 7	19	19	42	99
CSC 1170	28	26	35	98
CSC 3322	19	15	40	90
CSC 3325	13	12	41	97
CSC 1595	30	31	39	103

De las fracciones 1 y 2 se aisló un compuesto considerado como el principio citotóxico; el cual fue purificado por cristalización fraccionada con CHCl₃; MeOH.

La actividad citotóxica del compuesto activo se evaluó sobre un mayor número de líneas celulares tumorales humanas, NCI-H23 de pulmón, U-251 del sistema nervioso central, PC-3 de próstata y 6 líneas derivadas de cáncer de seno MCF-7, MDA MB 435 CSC-1170, CSC-1595, CSC-3322 y CSC-3325, a las concentraciones de 16, 8, 4, 2 y 1 µg/mL (Tabla 5,

U-251 (SNC) y PC-3 (Próstata) puesto que la actividad presentada fue a una CC₅₀ superior a 16 µg/mL.

En el análisis estadístico se mostró un valor de P entre 1.037 E -12 a 3.06 E-19, lo que indica que los datos de actividad, obtenidos para la sustancia activa, fueron significativamente menores con respecto al control, indicando que el efecto generado por la sustancia es concluyente.

AGRADECIMIENTOS

Tabla 5. Porcentaje de viabilidad de las células con relación al control (DMSO 0.2%) para el principio activo frente a las líneas celulares probadas. Concentraciones aplicadas 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL y 1 µg/mL para cada una.

Líneas celulares	Principio activo <i>Espeletia killipii</i>				
	Porcentaje de Viabilidad				
	16 µg/ml	8 µ/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml
CSC 1170 (Seno)	14	14	16	28	29
HEP 2 (Laringe)	11	12	15	39	
CSC 3322 (Seno)	12	14	15	19	41
CSC 3325 (Seno)	13	14	21	24	28
CSC 1595 (Seno)	12	19	20	27	33
MCF 7 (Seno)	14	15	16	29	83
MDAMB435 (Seno)	11	11	22	36	48
NCI H23 (Pulmón)	38	42	47	48	50
U- 251 (S.N.C)	54	56	58	59	63
PC-3 (Próstata)	55	58	76	78	86

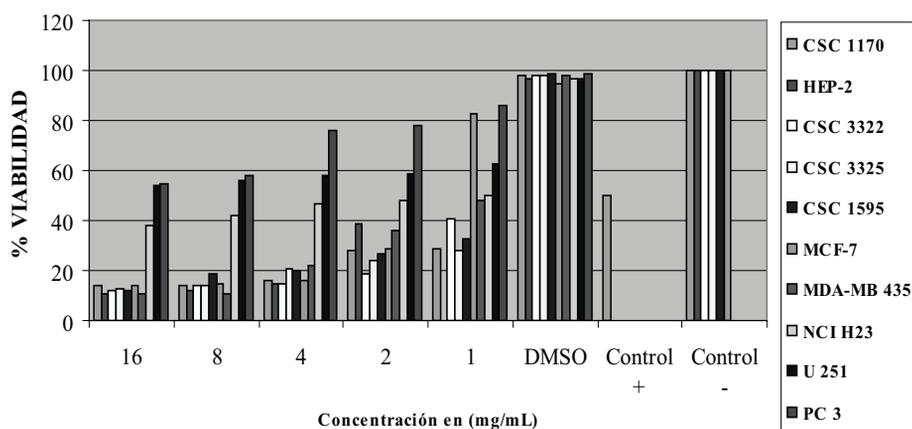


Figura 1. Efecto citotóxico del principio activo

Los autores agradecen a COLCIENCIAS, La Pontificia Universidad Javeriana y el Instituto Nacional de Cancerología por el apoyo financiero. Proyecto “Identificación y efecto de posibles sustancias citotóxicas aisladas de especies vegetales colombianas”: Col 1203-05-11460.

REFERENCIAS

- Majekodunmi O, Fatope M, Oladimeji T, Audu O 1996. Bioactive ent-kaurene diterpenoids from *Ammonia senegalensis*. *J Nat Prod* 59: 301-303.
- Ribeiro IM, Silva MTG, Soares RDA, Stutz CM, Bozza M, Tomassini TCB 2002. *Physalis angulata* L. antineoplastic activity, *in vitro*, evaluation from its stems and fruit capsules. *Rev Bras Farmacogn* 12(Suppl): 21-23.
- Smith-Kielland I, Dornish JM, Malterud K, Hvistendahl G, Romming C, Bockman O, Kolsaker P, Stenstrom Y, Nordal A 1996. Cytotoxic triterpenoids from leaves of *Euphorbia pulcherrima*. *Planta Med* 62: 322-325.
- Stitcher O 1977. In: *New Natural Products and Plant Drugs with pharmacological, Biological or therapeutic Activity* (Wagner, H. And Wolff, P., eds). Springer, Berlin.
- Studzinski GP 1999. Cell growth, differentiation and senescence. *The practical approach*. Series editor: B. D. Hames 46-48.
- Torrenegra RD, Téllez AN 1994. Química de especies del género *Espeletia*. *E. killipii*, *E. tunjana*. *Rev Col Química* 23: 29-35.
- Torrenegra RD, Téllez AN 1996. Phytochemistry of *Espeletia killipii* Cuatr. and gibberelic activity of some of the isolated compounds. *Rev Latinoamer Quím* 24: 2-6.