



Inducción de apoptosis por el principio activo citotóxico de *Espeletia killipii* Cuatr. sobre líneas celulares humanas

Clemencia de Castro¹, Tulia Riveros de Murcia², Gustavo Jaimes¹, Alba N. Téllez Alfonso^{2*}

¹Fundación Universitaria San Martín, Facultad de Medicina, Bogotá, Colombia,

²Departamento de Química, Pontificia Universidad Javeriana, Grupo de Investigación Fitoquímica, Bogotá, Colombia

RESUMO: “Indução de apoptose pelo princípio ativo citotóxico de *Espeletia killipii* Cuatr. sobre linhagens celulares humanas”. O acetato de longipilina, o princípio ativo citotóxico, isolado de *Espeletia killipii* Cuatr., uma planta endêmica de Colômbia, é uma sesquiterpenlactona que tem a propriedade de induzir apoptose em algumas linhagens celulares de câncer de mama como MCF-7 e CSC-1595 (obtidas do Instituto Nacional de Cancerologia, Bogotá - Colômbia). Reconhecimento morfológico, método de Tunel e citometria de fluxo foram utilizados para avaliar a atividade apoptótica. Os resultados mostraram que a longipilina é um potencial agente antitumoral.

Unitermos: *Espeletia killipii*, Asteraceae, sesquiterpenlactona, atividade apoptótica.

ABSTRACT: “Induction of apoptosis by the cytotoxic active principle of *Espeletia killipii* Cuatr. on human cell lines”. Longipilin acetate is the compound exhibiting cytotoxicity, isolated from endemic plant specie from Colombia, South America, *Espeletia killipii* Cuatr. Longipilin acetate is a sesquiterpenelactone having the ability to induce apoptosis in several breast cancer cell-lines like MCF-7 and CSC-1595 (obtained from National Cancer Institute, Bogotá Colombia), Morphological examination, nuclear DNA fragmentation, tunel and flow cytometry were used to evaluate apoptosis. Therefore longipilin acetate is a compound showing potential as an antitumor agent.

Keywords: *Espeletia killipii*, Asteraceae, sesquiterpenlactone, apoptosis activity.

INTRODUCCIÓN

Estudios previos del compuesto acetato de longipilina han mostrado un potencial citotóxico importante frente a: líneas celulares tumorales CSC-1170, CSC-1595, CSC-3322 y CSC-3325; MDAMB 435, NCI-H23 y MCF-7 con valores de concentración citotóxica media (CC₅₀) comprendidos entre 1,0 y 3,70 µg/mL (Alfonso et al., 2006); células sanguíneas de pacientes con linfoma de Hodking y leucemia y no ocasionar daño en células normales (Jaimes et al., 2006).

La apoptosis, ó muerte celular programada, es un mecanismo esencial en la homeostasis y regulación fisiológica del organismo. Alteraciones en este mecanismo, por agentes mutagénicos o ambientales llevarían a estados proapoptóticos, algunas enfermedades autoinmunes o antiapoptóticos como el cáncer.

Actualmente el inducir apoptosis por un fármaco contra el cáncer se ha convertido en un factor de importancia en el tratamiento de esta enfermedad, por lo tanto, este trabajo analiza el potencial apoptótico del acetato de longipilina EK-7 sobre líneas celulares.

MATERIAL Y MÉTODOS

El principio activo citotóxico aislado de la especie *E. killipii*, fue suministrado por el Grupo de Investigación Fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana (GIFUJ). El método seguido para el aislamiento y purificación de este compuesto fue el mismo reportado previamente (Alfonso et al. 2006). El compuesto es una lactona sesquiterpénica, denominada acetato de longipilina (EK-7), obtenida con una pureza del 99%.

Se utilizaron la línea colombiana CSC 1595 obtenida de una paciente diagnosticada con adenocarcinoma canalicular infiltrante; con crecimiento adherente y morfología epitelial (Vargas, 1993), suministrada por el laboratorio de Biología Experimental del Instituto Nacional de Cancerologia (Bogotá, Colombia) y la línea celular MCF-7 (NCI, EEUU) derivada de adenocarcinoma mamario. Todas las líneas celulares fueron mantenidas en medio L-15 (Sigma, St. Louis, EEUU) suplementado con SFB al 10% (GIBCO, EEUU) y penicilina-estreptomicina al 1% (GIBCO, EEUU). El cultivo de las células se realizó a 37 °C, en

un ambiente con 5% de CO₂ y humedad controlada.

Como solvente se utilizó dimetil sulfóxido (DMSO) al 0,2%, todas las células fueron probadas con el medio de cultivo con y sin DMSO al 0,2%. Los porcentajes de células viables fueron calculadas por conteo utilizando el ensayo de exclusión azul de tripan.

Se prepararon soluciones seriadas en medio L-15 para obtener una concentración final en pozo de 100 µM; 50 µM; 25 µM; 15 µM y 6,7 µM.

Valoración morfológica por tinción con hematoxilina-eosina (H&E)

Se realizó la valoración morfológica de las células CSC 1595 y MCF-7 tratadas con las sustancias EK-7 a 6,7 µM, cultivando las líneas celulares a razón de 6000 células directamente sobre láminas cubreobjetos de microscopia y sumergidas posteriormente en medio L-15 junto con el tratamiento a evaluar. Luego de 24 horas de incubación, se procedió a realizar la fijación de las células en etanol al 70% en PBS a 4 °C por 1 hora y se lavaron con agua por 1 min. Se tiñeron posteriormente las laminillas con una solución etanólica de hematoxilina al 0,1%, se realizó lavados consecutivos con agua por 5 min y 1 min y etanol al 95% por 1 min. Las laminillas fueron finalmente contrateñidas con una solución etanólica de eosina al 0,1% y se examinaron en un microscopio de contraste de fases (Leyca, EEUU) por tres observadores independientes. La evaluación de la morfología nuclear se realizó teniendo en cuenta los siguientes aspectos: condensación de la cromatina, masas granulares delineadas nítidamente a lo largo de la membrana nuclear y contracción de las células.

Fragmentación nucleosomal de ADN

Esta evaluación se realizó en microplacas de cultivo celular de 96 pozos. Las concentraciones utilizadas fueron: 6,7 µM, 25 µM y 50 µM para el compuesto Ek-7. Una vez concluido el tratamiento se extrajo el ADN mediante la adición de 50 µL del reactivo DNAzol® (Invitrogen, Carlsbad, EEUU) por cada 2 x 10⁴ células siguiendo el protocolo del fabricante. El ADN se disolvió en buffer TE 1X (50 mM Tris.HCl pH 8,0; 1mM EDTA). Las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1,0% en buffer TBE 1X a 75 V por 45 min. El gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/mL), se visualizó en un transiluminador con luz UV de 354 nm y se documentó.

Como control de la metodología de extracción se utilizó ADN obtenido a partir de linfocitos de sangre periférica humana (LSP). Cada muestra fue evaluada por triplicado y el experimento fue repetido cuatro veces en semanas diferentes bajo las mismas condiciones experimentales.

Tinción *In situ* de núcleos apoptóticos (TUNEL)

Se sembraron 1 x 10⁴ células/pozo, en láminas de microscopia tratadas con poli-L-lisina (Sigma, St. Louis, EEUU), colocadas en placas de 24 pozos y asegurando el contacto permanente de las células con el medio de cultivo. Después de un periodo de recuperación de 24 h se efectuó el tratamiento indicado. Se realizaron 3 lavados de las laminillas con buffer fosfato salino (PBS, 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄; 8,1 mM Na₂HPO₄) por 5 min c/u, se fijaron las células con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS. Se utilizó el Kit Dead End™ Colorimetric TUNEL System, suministrado por Promega. Se realizó la contracoloración de las células con una solución etanólica hematoxilina al 0,1% y se examinó la tinción de las células con un microscopio de luz.

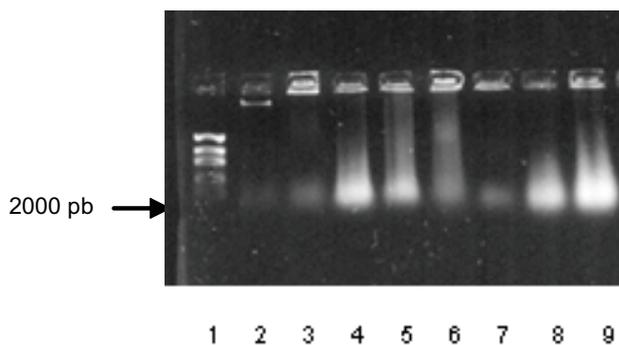
Citometría de flujo

Tras la inducción de fármacos durante 24 horas se determinó mediante citometría de flujo (Becton Dickinson), usando los reactivos: kit de fijación y permeabilización IntraStain Code K2311 (DakoCytomation), el kit de viabilidad 7-AAD Bioscience y el kit APOPTTEST-FITC Code K2350 (DakoCytomation). Como control positivo se utilizó: doxorubicina (0,18 µM) y partenólido (2,5mM) (Sigma) reconstituido en DMSO.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

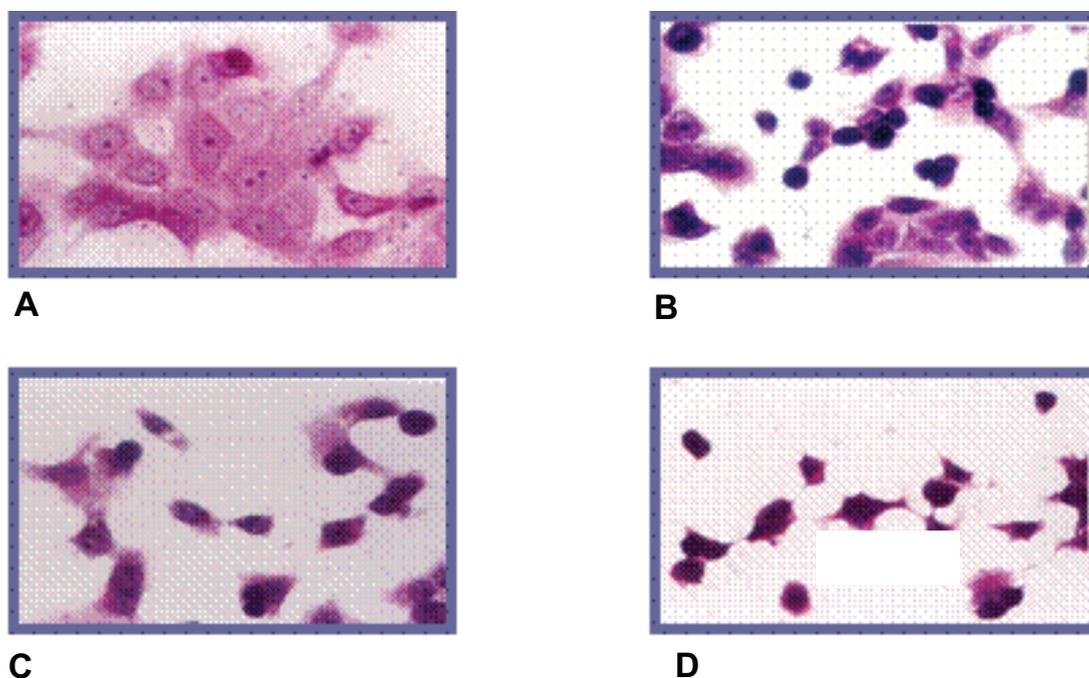
El tratamiento con el compuesto Ek-7 durante 24 h sobre las células CSC 1595 y MCF-7 indujo la degradación del ADN en una manera dependiente de la concentración (Figura 1). Este efecto es similar al obtenido por tratamiento con doxorubicina, compuesto previamente identificado como inductor de apoptosis en células tumorales (Minotti et al., 2004).

Los cambios morfológicos en las células CSC 1595 y MCF-7, asociados con el efecto del compuesto Ek-7 a una concentración de 6,7 µM durante 12 h; con el procedimiento H&E de tinción celular, dieron como resultado reducción de los volúmenes citoplasmáticos, núcleos fuertemente teñidos y picnóticos, pérdida aparente de contacto intercelular con la formación de pseudo-halos en células individuales, consideraciones compatibles con células que han sufrido apoptosis y que son comparables con los cambios morfológicos observados sobre las células sometidas a tratamiento con doxorubicina, un conocido agente inductor de apoptosis sobre células de carcinoma mamario (Figura 2). Es importante destacar la ausencia de restos celulares, así como el mantenimiento de la integridad de las membranas citoplasmáticas; tampoco se observa el hinchamiento de las células asociado frecuentemente con eventos de necrosis celular. Estos cambios morfológicos están relacionados con la inducción de apoptosis (Soini



Carril 1, marcador de peso molecular; Carril 2, ADN obtenido de LSP, Línea CSC 1595; Carril 3, células no tratadas; Carril 4, doxorubicina, 0,5 μ M; Carril 5, Ek-7 a 25 μ M; Carril 6, Ek-7 a 6,7 μ M, línea MCF-7; Carril 7, EK-7 a 6,7 μ M; Carril 8, EK-7 a 25 μ M; Carril 9, EK-7 a 50 Mm.

Figura 1. Valoración de la actividad de EK-7 sobre el ADN nucleosomal en líneas celulares de cáncer de seno CSC 1595 y MCF-7.



A. Células CSC 1595 no tratadas; B. Células CSC 1595 tratadas con doxorubicina 0,5 μ M; C. Células CSC 1595 tratadas con 6,7 μ M de EK-7; D. Células MCF-7 tratadas con 6,7 μ M de EK-7.

Figura 2. Valoración de la actividad de EK-7 por microscopía a 40X, en líneas celulares de cáncer de seno.

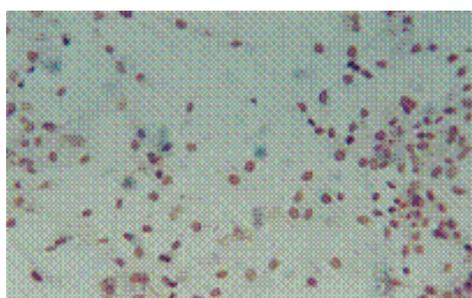


Figura 3. Detección *in situ* (núcleos marrones) de apoptosis en células CSC 1595 sometidas a tratamiento con 6,7 μ M de Ek-7; (40X-contraste de fases).

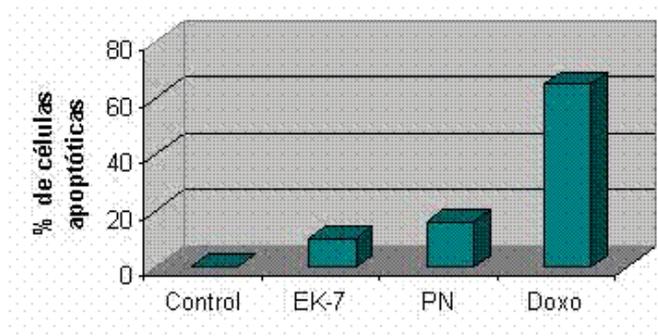


Figura 4. Cuantificación de células apoptóticas medidas por anexina V, en la línea celular MCF-7.

et al., 1998).

En el ensayo de detección de apoptosis *in situ* conocido como TUNEL (Marcación de Cortes Terminales con dNTP-biotinilados mediada por TdT) se observó en las células de las líneas CSC 1595 y MCF-7 sometidas a tratamiento con 6,7 μ M de Ek-7 por 12 h, una alta proporción de células apoptóticas (Figura 3). Algunas células mostraron también condensación de la cromatina y segregación de los núcleos y de la misma manera que en el ensayo de detección de apoptosis por cambios morfológicos (H&E); en estas preparaciones no hay evidencia de un evento de necrosis celular concurrente bajo las condiciones del ensayo.

Para la citometría de flujo se dispusieron de 500.000 células en todos los tratamientos, como se puede observar en la Figura 4, las células MCF-7 sin tratar mostraron unos índices prácticamente nulos de apoptosis, del mismo modo observamos un alto porcentaje (65%) en el fármaco doxorubicina (0,18 μ M) para el compuesto EK-7 a (6,7 μ M) un porcentaje del 10% y 16% en menor proporción el compuesto natural parthenolido (PN) considerando que se probó a 2500 μ M.

El compuesto EK-7, acetato de longipilina, por su alto potencial citotóxico frente a líneas celulares tumorales humanas, sobre células de pacientes con linfoma de Hodking y leucemia (Jaimes et al., 2006); y no tener efecto alguno sobre células normales (Alfonso et al. 2006); además de presentar un efecto apoptótico importante sobre las células tumorales tratadas, estimula el interés por profundizar sobre sus mecanismos de acción e interacción con fármacos antitumorales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a La Pontificia Universidad Javeriana y a la Fundación Terry Fox, por el apoyo financiero. Proyecto "Estudio de la inhibición del factor NF-kB como blanco molecular en la quimioterapia del cáncer" 01-03-2005.

REFERENCIAS

- Alfonso ANT, Castro C, Murcia TR, Torrenegra R 2006 Efectos citotóxicos *in vitro* de extractos y fracciones de *Espeletia killipii* Cuatr. frente a líneas celulares tumorales humanas. *Rev Bras Farmacogn* 16: 12-16.
- Jaimes G, Castro C, Aristizaba FA, Murcia TR, Torrenegra R, Alfonso ANT 2006. Principio activo citotóxico de *Espeletia killipii* Cuatr. sobre células tumorales y su toxicidad frente a células normales humanas. *Rev Bras Farmacogn* 16: 140-145.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L 2004. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56: 185-229.
- Soini Y, Paakko P, Lehto V-P 1998. Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. *Am J Pathol* 153: 1041-1053.
- Vargas MC 1993. *Caracterización de cuatro líneas celulares provenientes de tumores de seno*. Tesis de Maestría en Microbiología. Facultad de Ciencias Básicas, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C. 67pp.