

CITOTOXICIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE ALGUNAS PLANTAS COLOMBIANAS

CYTOTOXICITY OF SECONDARY METABOLITES FROM SOME COLOMBIAN PLANTS

Alba N. Téllez¹, Clemencia de Castro², Tulia Riveros de Murcia², Andrea Alvarado¹,
Luz Mary Mendoza¹, Julio Pedrozo¹, Rubén Torrenegra¹

Resumen

En un estudio preliminar para evaluar el potencial citotóxico de los metabolitos de doce plantas colombianas, se analizaron los metabolitos de los géneros *Ageratina*, *Pentacalia*, *Curatela*, *Espeletia*, *Ageratina* y *Stemmadenia*. Los resultados obtenidos muestran que los compuestos jacaranona y acetato de longipilina presentaron el mayor potencial citotóxico a bajas concentraciones, 4 µg/mL.

Palabras clave: actividad citotóxica, líneas celulares cancerosas, alcaloides, terpenos, quinol.

Abstract

In a preliminary screening in order to evaluate the cytotoxicity of some compounds we had analyse metabolites obtained from 12 Colombian plants of genus *Ageratina*, *Pentacalia*, *Curatela*, *Espeletia*, *Ageratina* and *Stemmadenia*. The results showed that jacaranone and longipiline acetate were the most active compounds a low concentration of 4 µg/mL.

Key words: cytotoxicity, cancer cell lines, activity, alkaloids, terpenes, quinol.

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de nuevas sustancias a partir de plantas con actividad terapéutica constituye una meta de la humanidad. Los productos naturales representan el 50% de las drogas de uso clínico en países desarrollados, 25% de los cuales derivan de plantas superiores. El reino vegetal contiene un enorme potencial de moléculas por descubrir; se estima que más del 90% de las especies no han sido estudiadas. Por otra parte, la naturaleza constituye un reservorio de compuestos útiles empleados contra otros organismos y un medio ambiente hostil, ya que son el producto final de 300 millones de años de evolución (Mongelli *et al.*, 2000).

La naturaleza ha demostrado ser una fuente importante de compuestos anticancerígenos efectivos; por ejemplo, drogas derivadas de microorganismos: dactinomicina, bleomicina y doxorubicina; drogas derivadas de plantas: los alcaloides vinblastina y vincristina aisladas de *Catharanthus roseus* y el taxol (paclitaxel), diterpenoide aislado de la corteza de *Taxus brevifolia* Nutt (Mongelli *et al.*, 2000).

En la búsqueda de nuevas sustancias anticancerosas, se ha evaluado el efecto citotóxico de algunos metabolitos secundarios aislados de especies vegetales colombianas pertenecientes a los géneros de la familia *Asteraceae*: *Pentacalia*, *Agerati-*

Recibido: septiembre de 2003; aceptado para publicación: mayo de 2004.

¹ Departamento de Química. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. Correspondencia a: ntellez@javeriana.edu.co, biologia@incancerologia.gov.co. Edificio Carlos Ortiz (52), Oficina 110. Carrera 7 N.º 43-82. Bogotá, Colombia.

² Laboratorio de Biología Experimental. Instituto Nacional de Cancerología, E. S. E. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. Colombia.

na y *Espeletia*, de la familia *Apocynaceae*, el género *Stemmadenia* y de la familia *Dilleniaceae* el género *Curatella*, la evaluación se realizó por el método de coloración in vitro MTT. Esta técnica constituye un modelo biológico sencillo, rápido y reduce la utilización de animales de laboratorio; es relativamente económica y abre la posibilidad de estudios a nivel molecular (Alley *et al.*, 1988).

MATERIALES Y MÉTODOS

Compuestos seleccionados. Los compuestos evaluados se obtuvieron por los métodos reportados previamente en la literatura; sus estructuras se muestran en la figura 1.

Espeletia killipii: los kaurenos, ácido kaur-16-en-19-oico (1) y ácido 15 α -isovaleroxikaur-16-en-19-oico (2); la diterpenlactona, Tetrachirina (3) (Téllez *et al.*, 2001); el cicloartano, 3 β -2-metil-butanoato de cicloartanilo (4) (Téllez *et al.*, 1998); el triterpeno, 3 β -2-metil-butanoato de 12-oleaneno (5) (Téllez, 2001) y la sesquiterpenlactona,

acetato de longipilina (6) (Téllez *et al.*, 2001; Torrenegra *et al.*, 1994, 1996).

Stemmadenia grandiflora: los alcaloides, Tabersonina (7) y Voacangina (8) (Torrenegra *et al.*, 1988).

Ageratina vacciniaefolia: el glicósido de diterpeno, (-)- β -D-18-Glucopiranosyl-9, 15-dihydroxy Kaurenoate (9) (Torrenegra *et al.*, 1999a) y el diglicósido de diterpeno, β -D-glucopyranosil ester of (-)-17-(β -glucopiranosyloxy)-16-hydroxykauran-19-oic acid (10) (Torrenegra *et al.*, 1999b).

Pentacalia corymbosa: el quinol, Jacaranona (11) (Torrenegra *et al.*, 2000).

Curatella Americana: el triterpeno, acetato de lupeol (12).

Líneas celulares. Se utilizaron las líneas celulares neoplásicas suministradas por el Instituto Nacional del Cáncer: HEP-2 (laringe), MCF-7 (seno) 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.

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 (Studzinski, 1999). Se tomó como control negativo el solvente DMSO 0,2% y como control positivo Doxorubicina a 0,8 μ g/mL, que corresponde a la CC_{50} sobre la línea celular CSC-1170.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tamizaje comienza con el estudio de la actividad citotóxica in vitro frente a las líneas celulares tumorales humanas de cáncer de seno (CMF-7, CSC-1170, CSC-1595, CSC-3322, CSC-3325) y la línea Hep-2 de laringe. Las sustancias se clasifican en dos grupos de acuerdo con el valor de la dosis que reduce el crecimiento del cultivo al 50% (CC_{50}), es decir que el 50% de las células del cultivo permanecen viables. Concentraciones de com-

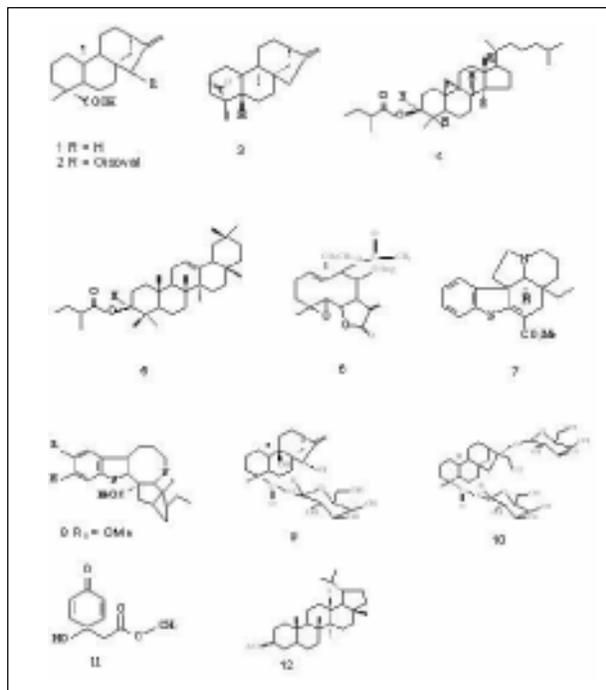


Figura 1. Compuestos seleccionados para el estudio

puestos de 20 µg/mL, son promisorias si el porcentaje de viabilidad es menor de 50%. Los dos grupos son: muy citotóxicos con CC₅₀ menor de 5 µg/mL y moderadamente citotóxicos con CC₅₀ mayor de 20 µg/mL. Ninguna sustancia se descarta en esta etapa para continuar con ensayos de antitumorales.

Los compuestos (1 a 6) aislados de *E. killipii* se ensayaron frente al panel de células provenientes de tejido tumoral, a la concentración de 20 µg/mL (figura 2). Los compuestos (1 a 5) no presentan actividad citotóxica significativa por presentar porcentajes de viabilidad superiores a 63%. El compuesto (6) acetato de longipilina presentó la mayor citotóxicidad con viabilidades inferiores a 42%.

Los triterpenos: 3β-2-metilbutanoato de cicloartanilo (4) y 3β-2 metilbutanoato 12-oleaneno (5) no presentaron efecto citotóxico; por el contrario, el compuesto, 3β-2-metilbutanoato de cicloartanilo a una concentración de 8,0 µg/mL originó proliferación en la línea celular CSC-1595, lo que permite suponer un posible efecto mitogénico. El porcentaje de viabilidad celular en este ensayo fue del 121%. Smith *et al.* (1996) identificaron dos compuestos citotóxicos, estructuralmente relacionados al cicloartano (4), el 9,19-cycloart-23.ene-3β,25-diol y el 9,19.cycloartan-25.ene-3β-24-diol, los cuales mostraron actividad citotóxica ante a las células tumorales de ascites Ehrlich. En este estudio el compuesto cicloartenol no mostró actividad citotóxica, la cual parece que depende del grupo hidroxilo sustituyente de la cadena lateral.

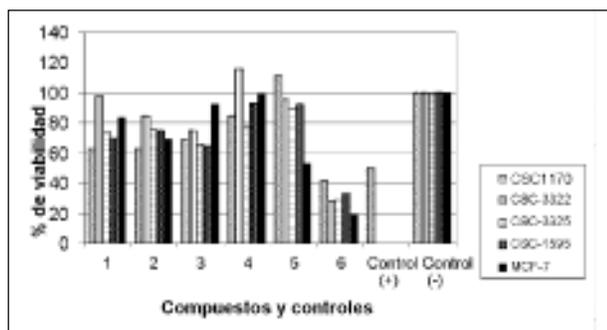


Figura 2. Efecto citotóxico de los compuestos aislados de *E. killipii* sobre las líneas celulares probadas. Concentración aplicada: 20 µg/mL

Puesto que el efecto citotóxico para la sesquiterpenlactona, acetato de longipilina, fue promisorio, se realizaron ensayos a concentraciones menores (figura 3). Los resultados mostraron actividad con CC₅₀ menores de 4,0 µg/mL, frente a la línea celular MCF-7 (seno) y a las líneas de cáncer de seno: CSC-1170, CSC-1595, CSC-3322 y CSC-3325, lo cual indica un efecto muy citotóxico.

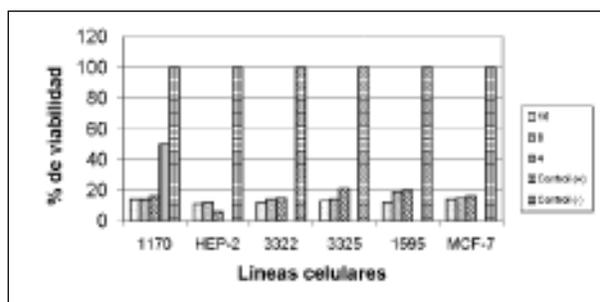


Figura 3. Efecto citotóxico del acetato de longipilina frente a las líneas celulares probadas. Concentración aplicada: 16, 8, 4 µg/mL

Las sesquiterpenlactonas se han destacado por sus propiedades químicas y biológicas entre ellas las de ser inhibitoras de tumores cancerosos. Según Bruneton (1991) la actividad citotóxica presentada por las sesquiterpenlactonas se debe a la presencia de grupos funcionales reactivos los cuales actúan por alquilación de los centros nucleofílicos de las moléculas biológicas. Además, bloquean enzimas necesarias para las funciones metabólicas totales.

El alcaloide tabersonina (7) aislado de *S. grandiflora*, tiene efecto citotóxico moderado sobre las líneas celulares MCF-7 (viabilidad 49,97% a 20,0 µg/mL) y CSC-3325 (viabilidad 51, 64% a 40,0 µg/mL). La voacangina (8) tiene un efecto citotóxico poco promisorio, con viabilidades mayores del 50%: MCF-7 = viabilidad 60,0%; SIHA = viabilidad 83,0%; CSC-1170 = viabilidad 78,0% y CSC-3325 = viabilidad 69,0%.

Los glicósidos diterpénicos (-)-β-D-18-glucopiranosil-1-9,15-dihidroxi kaurenoate (9) y β-D-glucopiranosil ester of (-)-17-(β-glucopiranosiloxil) -16-hidroxi-kauran-19-oic acid (10) aislados de *A. vacciniaefoli*, no tienen activi-

dad citotóxica promisorio, pero el diglicósido fue promisorio en la línea CSC-1595 con viabilidad 57%.

Los diterpenos de la serie ent-kaureno (1), (2), (9) y (10) mostraron CC_{50} mayores de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; resultados que permiten clasificarlos entre los moderadamente citotóxicos. Para este tipo de compuestos se ha descrito una amplia gama de actividades farmacológicas, entre las que se destacan los efectos tripanocida, antitermita, antiviral y citotóxico. Fatope *et al.* (1996) descubrió que el ácido ent-kaur-16-en-19-oico (ácido kaurenico) aislado de la corteza de *Annona senegalensi*, tiene un efecto citotóxico específico para la línea tumoral MCF-7 con una ED_{50} : 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; resultado que difiere con los presentados por otros autores con LC_{50} 2,03 y 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Ghisalberti, 1997).

El quinol jacaranona (11) aislado de *P. corymbosa* tiene actividad citotóxica sobre las líneas celulares a una concentración aplicada de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para cada una, con porcentajes de viabilidad de las células con relación al control (DMSO 0,2%) en el rango de 10,0-24,4%. Puesto que el efecto citotóxico para el quinol jacaranona fue promisorio, se realizaron ensayos a concentraciones menores (figura 4). Los resultados mostraron actividad con CC_{50} menores de 4,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ frente a las líneas celulares Hep-2 (larínge) y las líneas celulares de cáncer de seno: CSC-1170, CSC-1595, CSC-3322 y CSC-3325, con valores de CC_{50} menores a 4,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Además, el quinol jacaranona mostró una actividad menor en la línea MCF-7 $CC_{50} = 8,0 \mu\text{g}/\text{mL}$; lo cual indica un efecto muy citotóxico. Estudios anteriores demostraron acción citotóxica (con DL_{50} de 2,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y antitumoral (activo a 2 mg/kg sobre el sistema leucemia linfocítica P338) de la jacaranona (Ogura *et al.*, 1976). Este metabolito fue obtenido en primera instancia de *Jacaranda caucan*, pero las especies colombianas de *Pentacalia* se constituyen en una nueva fuente natural para esta sustancia.

El triterpeno acetato de lupeol (12) aislado de *C. americana* no presentó actividad citotóxica importante sobre las líneas celulares a 20,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; para la línea celular MCF-7 (viabilidad 76%), lí-

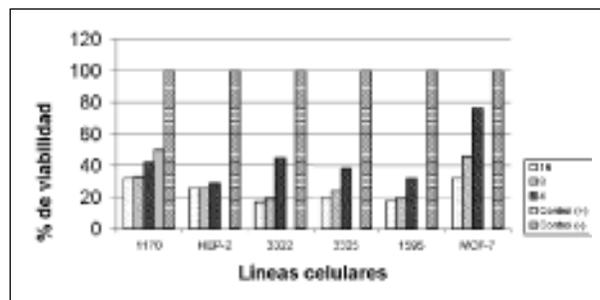


Figura 4. Efecto citotóxico del compuesto jacaranona, frente a las líneas celulares probadas. Concentración aplicada: 16, 8, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$

nea SIHA (viabilidad 114%) y las líneas celulares colombianas CSC-1170 (viabilidad 91%), CSC-3325 (viabilidad 73%).

En conclusión: la sesquiterpenlactona, acetato de longipilina aislado de la especie *E. killipii* y el quinol jacaranona aislado de *P. corymbosa* se encuentran entre el grupo de sustancias consideradas muy citotóxicas por presentar CC_{50} menores de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

El acetato de longipilina y el quinol jacaranona presentaron mayor citotoxicidad frente a las líneas celulares tumorales CSC-1170, CSC-1595, CSC-3322, CSC-3325; resultados importantes por ser activos en las líneas colombianas obtenidas de pacientes con cáncer de seno del Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá. Estas líneas se consideran jóvenes y por tanto conservan un buen grado de similitud entre el tejido tumoral y la línea celular, contrario a lo que sucede con las líneas comerciales.

Los compuestos evaluados de la *E. killipii*: ácido kaur-16-en-19-oico (1), ácido 15 α -isovaleroxikaur-16-en-19-oico (2) y tetrachirina (3); de la especie *S. grandiflora*: alcaloides tabersonina (7) y voacangina (8); de *A. vacciniaefolia*: los glicósidos de diterpeno: (-)- β -D-18-Glucopiranosyl-9, 15-dihydroxy Kaurenate (9) y β -D-glucopyranosil ester of (-)-17-(β -glucopiranosyloxy)-16-hydroxy-kauran-19-oic acid (10); de *C. americana*: el triterpeno acetato de lupeol (12) presentaron una actividad citotóxica moderada por presentar una CC_{50} mayor de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Sin embargo ninguna de estas sustancias se descartó en esta etapa para estudios posteriores.

Los compuestos 3 β -2-metil-butanoato de cicloartanilo (4), 3 β -2-metil-butanoato de 12-oleaneno (5) aislados de *E. killipii*, no tienen efecto citotóxico. Por el contrario el 3 β -2-metil-butanoato de cicloartanilo (4), frente a la línea celular CSC-1595, tiene un efecto de multiplicación celular, hecho que permite suponer un posible efecto mitogénico.

Según los resultados de las pruebas estadísticas, la muerte celular fue generada por las diferentes concentraciones de las sustancias aisladas y no por agentes extrínsecos.

Es importante resaltar la citotoxicidad que presenta el acetato de longipilina, como nuevo com-

puesto natural que estimula la muerte celular de células tumorales. Los resultados obtenidos en todos los ensayos muestran este compuesto como posible molécula fármaco líder y promisoría en oncología. Es necesario estudiar el efecto de este compuesto en células normales provenientes de diversos tejidos sanos y sangre periférica y la inducción de apoptosis como posible mecanismo de muerte en células tumorales.

AGRADECIMIENTOS

A Colciencias, a la Pontificia Universidad Javeriana y a el Instituto Nacional de Cancerología por el apoyo financiero al proyecto "Identificación y efecto de posibles sustancias citotóxicas aisladas de especies vegetales colombianas" (código Colciencias 1203-05-11460).

REFERENCIAS

- Alley M, Scudiro D, Monks A, Hursey M, Czerwinski M, Fine D, Abbot B, Mayo J, Shoemaker R, Byod M. 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 48:589-601.
- Bruneton J. 1991. *Elementos de fitoquímica y farmacognosia*. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- Fatope M, Audu O, Takeda Y, Zeng L, Shi G, Shimada H, McLaughlin. 1996. Bioactive ent-kaurene Diterpenoids from *Annona senegalensis*. *J Nat Prod* 59:301-303.
- Ghisalberti E. 1997. The biological activity of naturally occurring kaurane diterpenes. *Fitoterapia LXVIII* 4:303-323.
- Mongelli E, Coussio J, Ciccía G. 2000. *Cátedra de Farmacognosia*. Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA. www.plantasmedicinales.org/etno/etno_ull.htm.
- Ogura M, Cordell G, Farnsworth N. 1976. Potential Anticancer agents, III. Jacaranone, a Novel Phytoquinoid from *Jacaranda caucana*. *Lloydia* 39:255-257.
- Smith Kielland I, Dornish JM, Malterud KE, Hvistendahl G, Romming C, Bockman OC, Kolsaker P, Stenstrom Y, Nordal A. 1996. Cytotoxic triterpenoids from the leaves of *Euphorbia pulcherrima*. *Planta Med* 62:322-325.
- Studzinski GP. 1999. Cell growth, differentiation and senescence. The practical approach series. Oxford University press. New York.
- Téllez AN. 2001. Compuestos químicos aislados del género *Espeletia*, bioactividad e implicaciones quimiotaxonómicas. Tesis de Doctorado. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia.
- Téllez AN, Torrenegra R, Pedrozo J, Gray A. 1998. Cycloartan-3 β -(2-methyl butanoate) isolated from Genus *Espeletia* (Asteraceae). *Molecules* 3:M49.
- Torrenegra R, Pedrozo J, Achenbach H, and Baureib P. 1988. Alkaloids for *Stemmadennia grandiflora*. *Phytochem* 27:1843-1848.
- 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.
- Torrenegra R, Téllez AN, García G. 1994. Química de especies del género *Espeletia*, *Espeletia killipii* – *E. tunjana*. *Rev Col Quím*. 23:29-34.
- Torrenegra R, Robles J, Pedrozo J, Pescador B. 1999a. A New Diglycoside of Diterpene from *Ageratina vacciniaefolia*. *Molecules* 4:M94.
- Torrenegra R, Robles J, Pedrozo J, and Pescador B. 1999b. (-)- β -D-18-Glucopiranosyl-9, 15-dihydroxy Kaurenoate, a new Diterpene Glycoside from *Ageratina vacciniaefolia*. *Molecules* 4:M92.
- Torrenegra RD, Pedrozo JA, Téllez AN, Cabezas G, Granados A, Méndez D. 2000. Química y actividad antifúngica de *Pentacalia corymbosa*. *Rev Latinoamer Quím*. 28:31-34.