

EFECTOS CITOTOXICOS Y GENOTOXICOS INDUCIDOS EN EPITELIO GASTRICO Y COLONICO DE RATON POR ACCION DE ACETATO DE OVATIFOLINA*

Cytotoxic and genotoxic effects induced in gastric and colonic epithelium
in mice by ovatifolin acetate

M. ALARCÓN, M. GARCÍA, G. WEIGERT, M. AMIN, S. DUK y W. VENEGAS**

RESUMEN

El acetato de ovatifolina (AO), lactona sesquiterpénica, aislado desde *Podanthus ovatifolius* Lag. (Compositae), planta chilena, muestra propiedades antineoplásicas en test estandar de células KB, células epidermoides aisladas de un carcinoma nasofaríngeo humano. Siendo los antineoplásicos inductores potenciales de un amplio daño genético, se valora su acción genotóxica considerando que el test clásico del micronúcleo (M.N.) puede expresarse con diferentes sensibilidades de tipo órgano específico, para lo cual se prueba en gastrocitos y colonocitos. Se encuentra que el colon muestra células micronucleadas y una alta frecuencia de núcleos picnóticos y kariorrécticos, lo que revela una acción geno y citotóxica. El epitelio gástrico no muestra células micronucleadas o picnóticas, no siendo significativa la frecuencia de núcleos kariorrécticos.

ABSTRACT

A sesquiterpene lactone, Ovatifolin Acetate (O.A.), has been isolated from *Podanthus ovatifolius*, a Chilean plant. It showed antineoplastic activity in a standard test on KB cells isolated from human epidermoid nasopharyngeal carcinoma. Being antineoplastic drugs potential inductors of broad genetic damage, its genotoxic action is evaluated. Considering that the classic test of micronucleus may present different sensibilities in different types of organs, the chemical has been tested in gastrocytes and colonocytes. It was found that colonocytes showed micronucleated cells and a high frequency of picnotic and kariorectic nuclei. That is a genotoxic and cytotoxic action. The gastric epithelium did not show micronucleated or picnotic cells and the kariorectic nuclei are not significantly present.

KEYWORDS: Cytotoxicity. Genotoxicity. Micronucleus Test. Gastrocytes. Colonocytes. Sesquiterpene lactones. Compositae. *Podanthus*.

INTRODUCCION

En los últimos tiempos se ha utilizado el test del M.N. para evaluar los potenciales genotóxicos de una gran cantidad de agentes anticancerígenos.

Por otra parte, ha aumentado el uso de nuevas drogas en la quimioterapia tumoral en que sigue siendo significativo el efecto secundario geno y/ o citotóxico de estos agentes sobre la célula nor-

* Proyecto DIC: 20.31.23. Universidad de Concepción, Chile.

** Departamento de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales. Universidad de Concepción. P.O. 2407. Ap. 10. Concepción. Chile,

mal. Su empleo se sigue considerando pues en el análisis entre el riesgo tóxico y el beneficio para el paciente prima este último. (Sorsa et al. 1985).

Estas drogas cuyo potencial genotóxico se cuantifica mediante el test del M.N. además de otros ensayos, presentan un gran valor como agentes antitumorales. El test del micronúcleo es de amplio uso y es importante detectar la fiabilidad que merece en valoraciones clastógenas y/o mutágenas en eritrocitos policromatófilos en el clásico test de Schmid, W. 1975. Trabajos de otros autores (Tates et al. 1980, Goldberg et al. 1983 y Proudlock y Allen 1986), han informado que la respuesta órgano específica puede ser distinta frente a una droga en cuanto a la producción de micronúcleos como también a su potencial efecto citotóxico.

En trabajos anteriores se ha demostrado la acción de lactonas sesquiterpénicas como agentes clastomutágenos importantes y también de interesantes propiedades antineoplásicas (Alarcón et al. 1991, Cea et al. 1990, Becerra et al. 1987, Spejut y Perdue 1978).

Para considerar la validez rigurosa del test del M.N. y siendo claro el efecto del A.O. sobre médula ósea, (Alarcón et al. 1992) hemos considerado de interés examinar las posibilidades de inducción de M.N. en epitelio gástrico y colónico de ratón mediante el A.O. lactona sesquiterpénica aislada de *Podanthus ovatifolius*, una compuesta chilena, que muestra propiedades antineoplásicas en los test estándar de células KB, células epidermoides aisladas de un carcinoma nasofaríngeo humano. Estos agentes fueron detectados en un programa de monitoreo de plantas chilenas que presentan principios activos antitumorales (Gnecco et al. 1973., Bhakuni et al. 1976).

MATERIALES Y METODOS

El A.O. fue proporcionada por el laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Botánica de la Universidad de Concepción, Chile. Los estudios de inhibición de crecimiento de células KB fueron efectuados en el Instituto del Cáncer en EE.UU.

Ratones machos *Mus musculus*, cepas Balb/c,

provenientes del bioterio de nuestros laboratorios, de aproximadamente 20 g. fueron inyectados intraperitonealmente con una única dosis de A.O. diluida en 0.2 ml. de una mezcla Dioxano/agua (1:10). Se seleccionaron 4 dosis de A.O. sobre la base de DL50 para células KB (2.5 ug/ml. de medio cultivo). Se usó como control positivo Doxorubicina (Adrimicina: Farmitalia), 10ug/g de peso corporal. Como control negativo se usó una mezcla de Dioxano/agua (1:10) (1.4 Dioxano p.a. Merck). Se sacrificaron 4 ratones por dosis a las 30 horas después de la inyección y se obtuvo el estómago y el colon. Estos órganos fueron cortados longitudinalmente, estirados en la misma dirección y enrollados compactamente desde la región anterior a la posterior. Los rollos fueron prendidos con alfileres y fijados en formalina (100%), luego fueron infiltrados con parafina y cortados en secciones transversales de 5µm. de grosor. A continuación se tiñeron mediante el método de Feulgen-Fastgreen, según Humanson, 1972.

El análisis microscópico se realizó por marcado de frotis para análisis a ciegas. El análisis del epitelio del colon y del estómago fue restringido a aquellas criptas en las cuales se observó una capa de células única y continua desde la base de la cripta adyacente de la mucosa muscularis hasta la parte superior en la superficie luminal. Fueron analizados cerca de 2.000 colonocitos a lo largo del colon y se registraron aquellos con micronúcleos (MCC), núcleos cariorréticos (KCC) y núcleos picnóticos (PCC). Igual análisis se realizó en 2.500 gastrocitos (GC).

Se usó en análisis estadísticos la prueba de "U" no paramétrica de Mann-Whitney con el nivel de significancia de 0.05.

RESULTADOS

Los datos cuantitativos promedio del estudio de los efectos de A.O. sobre gastrocitos y colonocitos se presentan en la tabla I. En la tabla II se presentan los resultados estadísticos al comparar entre sí las distintas frecuencias mediante la prueba de "U" de Mann-Whitney.

La respuesta de los colonocitos a la acción del

TABLA I : Frecuencia de núcleos micronucleados cariorréticos y picnóticos en colonocitos y gastrocitos de ratones tratados con acetato de ovatifolina.

DOSIS g/g p.c.	Nº Colonocitos Recuento	MCC	MCC/1000C	PCC	PCC/1000C	KCC	KCC/1000C	Nº Gastrocitos Recuento	KGC	KGC/1000G
DOXO 10.00	2025.55	6.75	3.33±0.27	1.25	0.61±0.25	1.25	0.61±0.25	2478.50	45.25	18.22±2.61
D-W 1 : 10	2028.00	2.50	1.36±0.62	—	—	—	—	2542.75	24.75	9.72±2.38
O A 1.25	2050.50	7.00	3.40±0.65	—	—	1.25	0.61±0.24	2531.00	23.25	9.19±2.18
O A 2.50	2051.75	5.25	2.55±0.83	5.00	2.22±0.9	22.50	0.97±0.39	2508.50	22.25	9.67±1.84
O A 5.00	2029.75	8.00	3.93±0.38	3.75	1.84±0.0	12.00	0.98±0.04	2514.75	22.75	9.10±1.61
OA 10.00	2040.00	7.75	3.79±0.62	7.50	3.67±0.8	16.00	2.93±0.57	2512.00	24.00	9.55±1.62

C = colonocito

G = gastrocitos

MCC = colonocitos micronucleados

PCE = colonocitos con núcleo picnótico

KCC = colonocitos con núcleo cariorréticos

KGC = gastrocitos con núcleo cariorréticos

D-W = dioxano-agua

DOXO = doxorubicina

p.c. = peso corporal

A.O. manifiesta una frecuencia MCC mayor que la inducida por los controles negativos y permanecen altas con excepción de la observada a la dosis de 2.5 ug/g de p.c. No se observaron colonocitos con núcleos picnóticos en los controles negativos ni en los ratones tratados con 1.25 ug de p.c. de A.O. No obstante, a las dosis restantes de A.O. se observó un notable efecto sobre la incidencia de núcleos picnóticos. La frecuencia de PCC es más alta que aquella observada en ratones tratados con 10.00 ug de p.c. de doxorubicina. No se presentan colonocitos cariorréticos en los controles negativos; pero a la dosis de 1.25 µg/de p.c. de A.O. los ratones mostraron igual frecuencia promedio de KCC que los tratados con doxorubicina. El epitelio gástrico no muestra células picnóticas o micronucleadas. Las frecuencias de KGC inducidas por todas las dosis de A.O. empleadas no fueron significativamente diferentes de aquéllas observadas en los controles negativos; pero cerca de un 50% inferiores a las observadas en los ratones tratados con doxorubicina.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La cantidad de células micronucleadas en una población celular proporciona una medida sensible de las rupturas cromosómicas inducidas por un agente químico, aunque no todos los tipos de aberraciones cromosómicas llegan a ser micronúcleos. (Wild, 1978 y Jossen y Ramel, 1980).

Los ensayos *in vivo* a corto plazo, tal como el test del micronúcleo, tiene la ventaja de reflejar la farmacodinamia involucrada en la incorporación, metabolización y distribución de un agente genotóxico. Sin embargo, una estimación más próxima del riesgo genético real para el organismo frente a un agente genotóxico debe considerar el análisis no sólo de la inducción de micronúcleos en un tejido que presente ventajas técnicas para el estudio, sino que también evaluar el daño nuclear desde un punto de vista más amplio y en las poblaciones celulares más expuestas, dado que las respuestas de los diferentes tejidos puede ser específica para ese agente y, más aún, el efecto genotóxico así determinado puede enmascarar un claro efecto citotóxico.

TABLA II: Test Mann-Whitney U: Resultado de análisis de epitelio gástrico y colónico de ratones tratados con acetato de ovatfolina ($\alpha=0.05$). El > indica que el efecto de la dosis de la columna izquierda es mayor que la correspondiente a la dosis de la columna de abajo. El ^ indica que el efecto de la dosis de la columna de abajo es mayor que el efecto correspondiente a la dosis de la columna izquierda.

	MCC / 10000	KCC/1000C	PCC/1000C	KGC/1000G
D-W 1:10	U=0 p=0.014 ^	— U=4 p=0.171	—	U=0 p=0.014 ^
1.25	U=7 p=0.443 >	U=6 p=0.343	—	U=0 p=0.014 ^
2.50	U=1 p=0.029 ^	U=5 p=0.243	U=0 p=0.014 >	U=8 p=0.557 ^
5.00	U=2 p=0.057 ^	U=3 p=0.100	U=0 p=0.014 >	U=7 p=0.443 ^
10.00	U=0 p=0.100 ^	U=0 p=0.014 ^	U=0 p=0.014 ^	U=0 p=0.014 ^
DOSIS	DOXO 10.00	DOXO 10.00	DOXO 10.00	DOXO 10.00
	D-W 1:10	D-W 1:10	D-W 1:10	D-W 1:10
	1.25	1.25	1.25	1.25
	2.50	2.50	2.50	2.50
	5.00	5.00	5.00	5.00
	10.00	10.00	10.00	10.00

C = colonocitos
G = gastrocitos
MCC = colonocitos micronucleados

KCC = colonocitos carinotécnicos
PCC = colonocitos plañóticos
KGC = gastrocitos carinotécnicos

Este punto de vista ha sido tomado en cuenta en análisis de los efectos genotóxicos in vivo del A.O. El A.O. presenta una DL50 para el crecimiento de células KB de 2.5 ug/ml. de medio de cultivo. Considerando esta dosis como referencia se seleccionaron dosis empíricas de A.O. en relación al peso corporal de los ratones.

La picnosis nuclear y cariorrexis son los primeros estados del proceso de muerte celular denominado apoptosis. Núcleos picnóticos y cariorréticos fueron observados principalmente en el primer tercio basal de las criptas del epitelio colónico. La condensación nuclear se observa inicialmente a la dosis de 2.50 ug/g de p.c. de A.O. y aumenta fuertemente a la dosis de 10 ug/g de p.c. De nuevo este efecto coincide con la citotoxicidad observada en células KB a la DL50 equivalente (2.50 ug/ml. de medio de cultivo). Núcleos cariorréticos fueron observados tanto en el primer tercio basal como en el segundo tercio de la cripta con una frecuencia que aumenta proporcionalmente en relación al incremento de la dosis de A.O. La acumulación de células criptales con núcleos cariorréticos y las diferencias en el tiempo de renovación de las poblaciones celulares de la cripta pueden explicar este hecho. En forma similar las frecuencias de MCC inducidas por el A.O. podrían reflejar este fenómeno porque disminuyen a 2.50 ug/g de p.c. y luego vuelven a valores altos cuando se aplican las dosis más altas de A.O. No obstante, la formación de micronúcleos es un fenómeno independiente de la apoptosis dado que a la dosis de 1.25 ug/g de p.c. no se encontraron células con núcleos picnóticos en el colon; pero con este mismo tratamiento se observa una frecuencia de MCC tan alta como la inducida por la doxorubicina.

La clastogenicidad contribuye a la muerte celular; pero no necesariamente todas las células micronucleadas mueren. Los efectos de A.O. sobre el colon indican que el daño apoptótico es un fenómeno citotóxico importante. Así las drogas citotóxicas pueden producir muerte celular masiva en poblaciones de recambio proliferativo rápido y en contraste el efecto letal puede ser menor en poblaciones de menor tasa de recambio o quiescentes.

La no inducción por la A.O. de frecuencias de

células gástricas cariorréticas significativamente diferentes a la exhibidas por el control negativo, puede ser explicada por la ocurrencia de fenómenos farmacodinámicos específicos de la mucosa gástrica, ya que la frecuencia de gastrocitos cariorréticos inducidos por el A.O. y encontradas en el control negativo son significativamente menores a la inducida por la doxorubicina. No obstante, todas las frecuencias de células gástricas cariorréticas inducidas por el A.O. son mayores que las inducidas en las células del epitelio del colon.

La no inducción de células gástricas micronucleadas puede ser explicada también por fenómenos farmacodinámicos, aunque es más probable que el alto grado de cariorrexis enmascare la presencia de células micronucleadas dado que en los ratones tratados con doxorubicina tampoco se observó la presencia de células gástricas micronucleadas.

Estos resultados permiten señalar que el A.O. in vivo es un agente citotóxico capaz de alterar el epitelio colónico por daño apoptótico. Por otro lado, es un agente clastogénico que induce células micronucleadas en el colon de ratón. Aparentemente el epitelio gástrico en las condiciones experimentales del ensayo y por razones que requieren un mayor estudio, no es afectado por el A.O.

Sin embargo, la estandarización de la técnica de Schmid (1975) empleada en médula ósea para eritrocitos policromatófilos establece un tiempo de 30 horas después de inyectada la sustancia de prueba para la obtención de los tejidos. Este tiempo se mantiene pues las experiencias de otros autores establecen que la dinámica replicativa de gastrocitos y colonocitos permiten una valoración comparativa con lo que sucede en médula ósea. (Goldberg et al. 1982 y Proudlock y Allen 1986).

BIBLIOGRAFIA

- Alarcón, J., Becerra, J., Jakupovic, Silva, M.,J. and Tschritzis, F. 1991. Agarofurane sesquiterpene ester *Maytenus disticha*. Rev. Latino Amer. Quim. 22(3):65-66.
- Alarcón, M., Weigert, G., García, M., and Duk, S. 1992. Genotoxic Effects of Ovatifolin Aceate (OA) sesquiterpene Lactone Isolated from *Pondathus*

- ovatifolius*. Lag. (Compositae). Rev. Int. Contam. Ambient. (en prensa). 1992.
- Bhakuni, D.S., Bittner, M. Marticorena, C., Silva, M., Weldt, E. and Honeisen, M. 1976. Screening of Chilean plants for Anticancer activity. I. *Lloidia* 39: 225-243.
- Becerra, J., Gaete, L., Silva, M., Bohlmann, F. and Jakupovic, J. 1987. New Sesquiterpene from seeds of *Maytenus boaria* Mol. Phytochemistry. 26: 30-73.
- Cea, G., Alarcón, M., Weigert, G. and Sepúlveda, R. 1990. Genotoxic Effects of Erioflorin Acetate and Erioflorin Methacrilate: Sesquiterpene Lactones isolated from *Podanthus ovatifolius* Lag. (Compositae). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 44: 19-28.
- Gnecco, S., Poyser, J.P., Silva, M., Sammes, S.P. and Tyler, W.T. 1973. Sesquiterpene Lactones from *Podanthus ovatifolius*. Phytochemistry 12: 2469-2477.
- Goldberg, M.T., Blakey, D.H. and Bruce, W.R. 1982. Comparison of the effects of 1,2-dimethylhydrazine and cyclophosphamide on micronucleus incidence in bone marrow and colon. Mutation Res. 109: 91-98.
- Humanson, G.L. 1972. Animal Tissue Techniques. W.H. Freeman & Company. San Francisco. p:332.
- Jenssen, D. and Ramel, C. 1980. The micronucleus test as part of a short-term mutagenicity test program for the prediction of carcinogenicity evaluated by 143 agents tested. Mutation Res. 75: 191-202.
- Proudlock, R.J. and Allen, J.A. 1986. Micronuclei and other nuclear anomalies induced in various organs by diethylnitrosamine and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. Mutation Res. 174: 141-143.
- Schmid, M., 1975. The Micronucleus Test. Mutation Res. 31: 9-15.
- Sorsa, M., Hemminki, K. and Vainio, H. 1985. Occupational exposure to anticancer drugs. Potential and real hazards. Mutation Res. 154: 135-149.
- Spjut, R.W. and Perdue, Jr. R.E. 1976. cit. in Maytensine et Maytensinoids. Plantes Medicinales et Phytoterapie. XII(1): 53-70.
- Tates, A.D., Neuteboom, I., Hofker, M and Den Engelsens, L. 1980. A micronucleus technique for detecting clastogenic effects of mutagens, carcinogens (DEN, DMN) in hepatocytes of rat liver in vivo. Mutation Res. 74: 11-20.
- Wild, D. 1978. Cytogenetic effects in the mouse of 17 chemical mutagens and carcinogens evaluated by the micronucleus test. Mutation Res. 56: 319-327.