



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación del Potencial Bioactivo de las Esponjas Marinas *Myrmekioderma gyroderma* y *Topsentia ophiraphidites*

Lina Marcela Blandón García

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Área curricular de Biotecnología

Medellín, Colombia

2012

Evaluación del Potencial Bioactivo de las Esponjas Marinas *Myrmekioderma gyroderma* y *Topsentia ophiraphidites*

Lina Marcela Blandón García

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Biotecnología

Directora:

María Elena Márquez Fernández. Bióloga.

Magíster en Biología. cDra en Biotecnología

Codirector: Juan Bautista López Ortiz. Biólogo. Magíster en Biología

Línea de Investigación: Bioactividad de Productos Naturales y Sintéticos

Grupo de Investigación: Biotecnología Animal

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Área Curricular Biotecnología

Medellín, Colombia

2012

Felicidad no es hacer lo que uno quiere sino querer lo que uno hace.

Jean Paul Sartre (1905-1980) Filósofo y escritor francés.

El presente trabajo hace parte de un macroproyecto aprobado y financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín

Agradecimientos

A la profesora María Elena Márquez por haberme dado la oportunidad de trabajar en este maravilloso proyecto.

Al profesor Juan Bautista López Ortiz por toda su paciencia y enseñanzas, que no sólo se concentran en la academia sino también en la vida.

Al profesor Guillermo Antonio Correa por sus asesorías en el área de estadística

A las Biotecnólogas del Colegio Mayor de Antioquia Sara Uribe y Sandra Bermudez, por su colaboración en la realización de los experimentos.

A la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad Nacional en Medellín por la financiación de este proyecto.

En general, al grupo de investigación en Biotecnología Animal por sus aportes.

Resumen

A partir de las esponjas marinas se han obtenido gran cantidad de sustancias con potencial antitumoral. En este estudio se realizó la evaluación de la actividad citotóxica, de fracciones de las esponjas marinas *Topsentia ophiraphidites* y *Myrmekioderma gyroderma* en dos líneas celulares (Jurkat y CHO). Sólo la fracción T4 de *Topsentia ophiraphidites* presentó actividad citotóxica, por lo que se le realizaron ensayos posteriores de genotoxicidad y efectos sobre el ciclo celular, resultando crónicamente genotóxica y afectando el ciclo celular de las células CHO.

Palabras clave: Jurkat, CHO, cromátidas, citotoxicidad, genotoxicidad.

Abstract

A great quantity of anticancer potential substances have been obtained from marine sponges. This study began with the evaluation of the cytotoxic activity of fractions from the marine sponges *Topsentia ophiraphidites* and *Myrmekioderma gyroderma* in two cell lines (Jurkat and CHO), finding meaningful activity in the fraction T4 from *Topsentia ophiraphidites*, subsequent genotoxicity and effects on cell cycle trials was made with fraction T4, finding chronic genotoxic damage and effect in the cell cycle of CHO cells.

Keywords: Jurkat, CHO , chromatides, citotoxicity, genotoxicity.

Contenido	Página
Resumen	VI
Lista de Figuras	X
Lista de Tablas	XI
Introducción	1
1. Marco Teórico	2
1.1 Evaluación de una Sustancia con Potencial Bioactivo Previo al Desarrollo de Medicamentos	4
2. Metodología	7
2.1 Fracciones Evaluadas	7
2.2 Mantenimiento y Subcultivo de Líneas Celulares	8
2.2.1 Línea Celular CHO	8
2.2.2 Línea Celular Jurkat	9
2.3 Evaluación de la Citotoxicidad	9
2.3.1 Prueba del MTT	9
2.3.2 Prueba de Exclusión del Colorante con Azul de Tripano	10

Evaluación del Potencial Bioactivo de las Esponjas Marinas *Myrmekioderma gyroderma* y
Topsentia ophiraphidites

2.4	Evaluación del Efecto sobre el Ciclo Celular	11
2.4.1	Eficiencia de Clonación	11
2.4.1.1	Eficiencia de Clonación en Células CHO	11
2.4.1.2	Eficiencia de Clonación en Células Jurkat	12
2.4.2	Función de Acumulación	13
2.4.3	Cinética Proliferativa Mediante ICH	14
2.5	Evaluación de la Genotoxicidad	15
2.5.1	Electroforesis Alcalina en Gel de Células Individuales	15
2.5.2	Intercambio de Cromatidas Hermanas	16
3	Resultados y Discusión	17
3.1	Evaluación de la Citotoxicidad	17
3.1.1	Prueba del MTT	18
3.1.2	Azul de Tripano	20
3.2	Evaluación del Efecto sobre el Ciclo Celular	22
3.2.1	Eficiencia de Clonación	22
3.2.2	Función de Acumulación	23
3.2.3	Cinética Proliferativa Mediante ICH	24
3.3	Evaluación de la Genotoxicidad	26
3.3.1	Electroforesis Alcalina en Gel de Células Individuales	26
3.3.2	Intercambio Cromátidas Hermanas	28
4.	Conclusiones	31

Evaluación del Potencial Bioactivo de las Esponjas Marinas *Myrmekioderma gyroderma* y
Topsentia ophiraphidites

5. Recomendaciones	32
Bibliografía	33

Lista de Figuras	Página
Figura 2 – 1: Colonia células CHO	12
Figura 2 – 2: Colonia células Jurkat	13
Figura 2 – 3: Extendido cromosómico para evaluar ICH en Células CHO	16
Figura 3 – 1: Viabilidad con la Prueba de MTT. Fracciones M3 y M5	18
Figura 3 – 2: Viabilidad con azul de tripano. Fracciones M3 y M5	19
Figura 3 – 3: Viabilidad con la prueba del MTT. Fracciones T2, T3, T4 y T5	20
Figura 3 – 4: Viabilidad con azul de tripano. Fracciones T2, T3, T4 y T5	21
Figura 3 – 5: Eficiencia de clonación absoluta y relativa para la fracción T4 en Células CHO y Jurkat	22
Figura 3 – 6: Curvas de Acumulación	24

Lista de Tablas

Tabla 3 – 1: Resultados pruebas de citotoxicidad para los solventes utilizados	17
Tabla 3 – 2: Resumen de los principales resultados obtenidos con la Prueba del MTT	17
Tabla 3 – 3: Eficiencias de clonación absoluta y relativa para las células CHO y Jurkat	23
Tabla 3 – 4: Tiempos de generación estimados para las células Jurkat	24
Tabla 3 – 5: Tiempos de generación estimados para las células CHO	25
Tabla 3 – 6: Longitudes Promedio de los Cometas para las Células CHO y Jurkat	26
Tabla 3 – 7: ANAVA de una Vía para los Datos del Ensayo Cometa en las Células CHO	27
Tabla 3 – 8: ANAVA de una Vía para los Datos del Ensayo Cometa en las Células Jurkat	27
Tabla 3 – 9: Número de promedio de ICHs encontrados en células CHO	28
Tabla 3 – 10: ANAVA de una vía para los datos del ICH en células CHO	28
Tabla 3 – 11: Prueba de rangos múltiples para los datos del ICH en células CHO	28
Tabla 3 – 12: Número de promedio de ICHs encontrados en células Jurkat	29
Tabla 3 – 13: ANAVA de una vía para los datos del ICH en células Jurkat	29
Tabla 3 – 14: Prueba de rangos múltiples para los datos de ICH en células Jurkat	30

Introducción

En el cáncer una de las principales causas de muerte especialmente en países en desarrollo, las células de una parte del cuerpo comienzan a crecer sin control. La eficacia de algunos medicamentos con los que se trata esta enfermedad no es del 100% y su especificidad es limitada, además ocasionan daños en células y tejidos no cancerosos y causan resistencia a tratamientos como la quimioterapia [Pereira et al. 2012].

En las últimas décadas se ha incrementado la búsqueda de nuevas sustancias de origen natural con potencial antitumoral como alternativas de tratamiento. Debido a su gran diversidad biológica y química, los océanos constituyen una fuente inmensa para el descubrimiento de drogas antitumorales y las esponjas marinas son los principales organismos de estudio ya que debido a su naturaleza sésil y mecanismo de protección a predadores, producen metabolitos secundarios con gran potencial antitumoral [Sepčić et al. 2010].

Estudios recientes realizados por los grupos de investigación en Productos Naturales Marinos de la Universidad de Antioquia y Biotecnología Animal de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín han demostrado que extractos provenientes de esponjas del Caribe colombiano poseen actividad citotóxica. A partir de ellos se han obtenido fracciones de las esponjas marinas *Myrmekioderma gyroderma* y *Topsentia ophiraphidites*.

Por lo anterior, con miras a contribuir en el conocimiento de la actividad biológica en este trabajo se evaluó el potencial citotóxico, genotóxico y antiproliferativo *in vitro* de fracciones obtenidas de extractos provenientes de las esponjas marinas *Myrmekioderma gyroderma* y *Topsentia ophiraphidites* colectadas en el Golfo de Urabá en las líneas celulares establecidas CHO y Jurkat.

1. Marco Teórico

En la última década se ha avanzado en el campo quimio-preventivo y de la medicina terapéutica y se ha incrementado la búsqueda de nuevas sustancias antitumorales, debido a la poca eficacia de algunos medicamentos con los que es tratado el cáncer ó a la especificidad limitada, además estos tratamientos ocasionan daños en células y tejidos normales.

Actualmente más del 60% de las drogas antitumorales comercialmente disponibles, son de origen natural. Ejemplo son la doxorubicina, daunomicina, bleomicina, mitomicina C, vincristina y vinblastina usados en la quimioterapia de una gran cantidad de tumores sólidos y hematológicos; además, los taxanos y camptotecinas usados en oncología son de origen natural [Jimeno et al. 2006].

Inicialmente, la investigación se centró en plantas y microorganismos terrestres, pero en años recientes se ha enfocado en organismos marinos en los que se encuentran moléculas únicas. Por ejemplo, los primeros medicamentos antitumorales exitosos de origen marino fueron la trabectedina, citarabina y eribulina mesilata [Schumacher et al. 2011]. Los avances en la elucidación de estructuras, síntesis orgánicas y ensayos biológicos han permitido el aislamiento y la evaluación clínica de varios agentes con potencial antitumoral de origen marino, los cuales van desde péptidos simples lineales tales como la dolastatina 10, hasta complejos poliéteres macrocíclicos como halicondrina B [Simmons et al. 2008].

A partir de las esponjas marinas se ha logrado obtener una gran cantidad de sustancias con potencial antitumoral [Sipkema et al. 2005]. El análogo ara – C sintetizado a partir de los nucleósidos espongotimidina y espongouridina extraídos de la esponja *Cryptotethia crypta* es quizás uno de los compuestos más usados en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda y su análogo fluorado Gemcitabina, es una importante herramienta terapéutica en el tratamiento del cáncer pancreático y de pulmón [Jimeno et al. 2006]. Otras sustancias que han mostrado actividad antitumoral se encuentran en etapa preclínica avanzada, como las topsentinas (aislada de *Topsentia genitrix*, *Spongosorites* sp. y *Hexadella* sp.), la debromohymenialdisina (aislada de *Plakellia flabellata*, *Hymeniacion aldís* y *Stylotella aurantia*), la halichondrina B (aislada de *Halichondria okadaí*), la jasplakilonida (aislada de *Jaspis* sp. o *Dorypleres splendens*), el

discodermolido (aislado de *Discodermia dissoluta*) y el mycaperóxido B (aislado de *Mycale* sp.). Otros compuestos también aislados de esponjas marinas, como la isohomohalichondrina B, las espongistatinas y la lamellarina N, así como, un alcaloide citotóxico aislado de *Biemna* sp. y las bastadinas (aisladas de *lanthella* sp.) han mostrado actividad *in vitro* contra líneas de células tumorales. [Mora et al. 2007].

En Colombia, se han registrado compuestos bioactivos en esponjas del Caribe colombiano, como *Ircinia felix* y *Didiscus oxeata*. De *Ircinia* se han extraído furanosesterpenos con actividad citotóxica contra embriones de erizo de mar, actividad analgésica, actividad antitumoral en discos de zanahoria infectados con *Agrobacterium tumefaciens* y en algunas líneas de células tumorales humanas. En *Didiscus* se encontró el compuesto (+)-curcufenol, con actividad contra varias líneas celulares tumorales [Mora et al. 2007]. También se ha reportado la extracción del curcuferol, a partir de la esponja marina *Myrmekioderma gyroderma* [Gul et al. 2007].

Las esponjas marinas *Myrmekioderma gyroderma* (orden Halichondrida, familia Heteroxidae) y *Topsentia ophiraphidites* (Orden Halinchondrida, familia Halichondriidae) pertenecen a la clase Desmospongiae a la cual pertenecen el 90% de las especies de esponjas e incluye las formas más conocidas y de mayor tamaño, además se encuentran distribuidas ampliamente a lo largo del Caribe. De *Myrmekioderma gyroderma* se han aislado una gran cantidad de metabolitos secundarios con potencial citotóxico y antitumoral como los 0- alquil-diglicosilglycocerolos (myrmekiosidos A y B) que han mostrado actividad contra células tumorales [Aoki et al. 1999], los sesquiterpenos styxona A y B y styxlactona con actividad citotóxica [Peng et al. 2002], 27 diterpenos (cyanthiwigins A-AA) 5.6.7 tricarboxílicos, con actividad contra el virus de la hepatitis B (HBV), el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1) y contra células humanas de tumor [Peng et al. 2002], un sesquiterpeno de fenol (s)-(+)-curufenol que también ha sido aislado de las esponjas *Didiscus flavus* y *Epipolasis* sp. con actividad en líneas celulares de cáncer humano [Gul et al. 2007].

Por otro lado extractos de la esponja marina *Topsentia ophiraphidites* han mostrado actividad significativa en ensayos de hemólisis, hemaglutinación, antibacterianos y contra la enzima antiacetilcolinesterasa [Galeano and Martínez 2007; Sepcic et al. 1997]. Adicionalmente, en esponjas del género *Topsentia* se han encontrado gran diversidad de

esteroides como el ophirasterol con actividades biológicas y farmacológicas [Echigo et al. 2006].

1.1 Evaluación de Sustancias con Potencial Bioactivo Previo al Desarrollo de Medicamentos

La primera evaluación *in vitro* para encontrar posibles sustancias antitumorales descrita por el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos (NCI) utiliza un panel de líneas celulares derivadas de diferentes tumores, en las cuales se realizan pruebas de citotoxicidad usando un rango de concentraciones de las sustancias candidatas para determinar el grado relativo de inhibición del crecimiento o citotoxicidad en cada línea celular [Boid. 1995]. Estas líneas celulares son conocidas como las líneas NCI – 60 y están conformadas por células provenientes de ocho melanomas, seis leucemias, ocho cánceres de mama, dos de próstata, nueve de pulmón, siete de colon, seis de ovarios, ocho de riñón y seis de cáncer del sistema nervioso central. Con los resultados de las pruebas de citotoxicidad se halla la concentración inhibitoria media (IC50) como la requerida para inhibir el crecimiento celular. [Chakravarti and Klopman 2008], es así como, un extracto es considerado bioactivo cuando su IC50 hallada es menor o igual que 100µg/ml, una fracción con una IC50 menor o igual que 50µg/ml y una sustancia pura con una IC50 menor o igual que 4µg/ml.

En la búsqueda de sustancias bioactivas con potencial antitumoral, un requisito es que éstas tengan actividad citotóxica. Para medir la viabilidad celular luego de la exposición de las células a una posible sustancia citotóxica el NCI realiza la prueba del MTT [Boyd. 1995] (3-(4,5 – dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide), el cual es un ensayo de tipo metabólico empleado para medir viabilidad celular. En este ensayo, el MTT es reducido por las deshidrogenasas mitocondriales a un producto de color púrpura (Formazán); la medida de la absorbancia del formazán disuelto se correlaciona con el número de células vivas intactas, pero los compuestos citotóxicos son capaces de destruir las células disminuyendo la reducción del MTT a formazán.

Con la prueba del MTT no es posible discriminar si el daño que sufrieron las células fue a nivel de la membrana celular debido a que el MTT es reducido por deshidrogenasas

mitocondriales por lo cual el hecho de que las células estén metabólicamente inactivas, no implica que estén muertas [Ulukaya et al. 2008]. Con el fin de evaluar un posible daño en la membrana celular el NCI realiza pruebas con colorantes como el azul de tripano.

El azul de tripano y el MTT son consideradas pruebas de corto tiempo, sin embargo, algunos agentes citotóxicos causan su efecto días después de la exposición y otros efectos de tipo antiproliferativo, en el que las células pueden seguir viables, pero no son detectadas por estas pruebas. Por esta razón para identificar si una sustancia con potencial citotóxico, puede tener efecto antiproliferativo en líneas celulares se realizan pruebas como la cinética proliferativa mediante intercambio de cromátidas hermanas (ICH), función de acumulación y eficiencia de clonación, entre otras.

Por otro lado, en la radioterapia o quimioterapia del cáncer cuando un tejido es tratado con los actuales tratamientos, estos pueden inducir daños en el DNA [Clarke and Allan 2009] afectando la integridad de la información genética en las dos cadenas, uno de los daños más perjudiciales. Dependiendo del tipo de célula y la fase del ciclo celular, hay dos estrategias de reparación, una de ellas es la unión con un extremo no homólogo (NHEJ) y la otra es la recombinación homóloga (HR). La NHEJ consiste en una reunión de los extremos de DNA quebrados con pérdida de la información genética en el sitio del daño; mientras que la HR necesita de una cadena homóloga para reparar el daño producido, se da durante la fase S y G2 usando como plantilla la cromátida hermana sin generar pérdidas en la información genética [Sjögren and Ström 2010]. La prueba del ICH evalúa las HR que reparan el DNA de quiebres de doble cadena [Kumar et al. 2011].

Adicionalmente, el ensayo cometa, es una prueba que permite detectar daño genotóxico agudo a nivel de células individuales [Speit et al. 2009; Rosenberger et al. 2011], bajo condiciones alcalinas ($\text{pH} > 13$), este ensayo puede ser empleado para medir la magnitud de los quiebres de cadena sencilla y doble en el DNA [Rosenberger et al. 2011]. La prueba de ICH y el ensayo cometa son dos pruebas que pueden considerarse complementarias.

A los extractos de las esponjas *Myrmekioderma gyroderma* y *Topsentia ophiraphidites* evaluados en este estudio, previamente se les realizó un ensayo colorimétrico de la Sulforhodamina B en la Multinacional Biofarmacéutica PharmaMar (Madrid, España), según el método descrito por [Rubinstein et al. 1990], el cual permitió evaluar la medida del crecimiento celular y la viabilidad de la actividad *in vitro* de los extractos y fracciones

Evaluación del Potencial Bioactivo de las Esponjas Marinas *Myrmekioderma gyroderma* y *Topsentia ophiraphidites*

contra tres líneas celulares tumorales: carcinoma de pulmón A 549, carcinoma de colon HT29 y cáncer de mama, MDA-MB-231 [Márquez. 2009].

En el presente trabajo se evaluó el potencial citotóxico y antiproliferativo de fracciones provenientes de las esponjas marinas *Myrmekioderma gyroderma* y *Topsentia ophiraphidites* en las líneas celulares CHO y Jurkat que aun no han sido evaluadas.

2. METODOLOGÍA

2.1 Fracciones Evaluadas

Las muestras de las esponjas marinas *Myrmekioderma gyroderma* y *Topsentia ophiraphidites* fueron colectadas en el Golfo de Urabá a una profundidad de 15-21 m en julio de 2006 e identificadas por el Dr. Sven Zea, taxónomo de la Universidad Nacional de Colombia sede Caribe, experto en taxonomía de esponjas y fueron llevadas al Laboratorio de Productos Naturales Marinos de la Universidad de Antioquia donde se conservaron a una temperatura de 4°C y protegidas de la luz hasta el momento de su utilización.

Para la obtención de los extractos cada muestra de esponja húmeda fue cortada en pequeños pedazos (aproximadamente 3 x 3 cm) y extraída con solventes de diferente polaridad (etanol, diclorometano y n-hexano) de la siguiente manera: La muestra de esponja se extrajo exhaustivamente con el solvente hasta la desaparición del color, el extracto fue filtrado y posteriormente evaporado a sequedad con presión reducida y agitación constante a una temperatura menor a 40°C. Los extractos secos obtenidos se conservaron refrigerados, protegidos de la luz, el aire, el calor y la humedad [Márquez; 2009].

En el presente trabajo se evaluaron las fracciones número 3 (M3) y 5 (M5) pertenecientes a la esponja marina *Myrmekioderma gyroderma* y las fracciones número 2 (T2), 3 (T3), 4 (T4) y 5 (T5) pertenecientes a la esponja marina *Topsentia ophiraphidites*, en las líneas celulares Jurkat y CHO.

Las fracciones M3 y M5 de la esponja marina *Myrmekioderma gyroderma* fueron de nuevo diluidas en etanol absoluto y solución de etanol hexano [7:3] respectivamente., por otro lado, las fracciones T2, T3, T4 y T5 de la esponja marina *Topsentia ophiraphidites* fueron diluidas en dimetilsulfóxido (DMSO). Para cada una de las fracciones diluidas se obtuvo una solución stock inicial de 40 mg/ml

A partir de la solución stock inicial de cada fracción de ambas esponjas, se realizaron diluciones seriadas en medio simple (RPMI 1640), para tratar en las líneas celulares CHO y Jurkat con diferentes concentraciones iniciales (50µg/ml, 70 µg/ml y 100µg/ml), durante 20 horas (Tiempo de exposición al tratamiento equivalente a un ciclo celular).

2.2 Mantenimiento, Subcultivo y Tratamiento de Líneas Celulares

Las dos líneas celulares empleadas son de origen mamífero y fueron usadas para la evaluación de la sensibilidad de las fracciones de las esponja marinas *Myrmekioderma gyroderma* y *Topsentia ophiraphidites* entre un modelo de células normales (CHO) y otro de células leucemoides (Jurkat), disponibles y ampliamente usadas en el laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

2.2.1 Línea Celular CHO

Es un subclon de la línea parental CHO derivada de ovario de hámster chino adulto [Nolan and Lee 2012], es aneuploide con número modal cromosómico entre 20-21 cromosomas, además posee entre 10-13 marcadores cromosómicos bien definidos. Es una línea adherente al sustrato. Su ciclo celular estimado es de 14 horas.

Las células se cultivaron y mantuvieron en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 5% de suero bovino fetal (SBF, G & M) a una temperatura de 37°C. Se subcultivaron una o dos veces por semana de la siguiente manera: El medio fue retirado y las células adheridas fueron lavadas con medio simple y tripsinizadas con 1ml de tripsina (1X Gibco) durante un periodo máximo de un minuto, la acción de la tripsina fue bloqueada con 2ml de medio RPMI1640 suplementado con 5% de SBF (medio completo), luego de la suspensión celular se diluyó 1:100 y se adicionó nuevamente medio completo.

Para la realización de los experimentos las células tripsinizadas fueron centrifugadas a 2400 rpm durante 4 minutos, el pellet de células obtenido fue concentrado en 2ml de medio RPMI 1640, las células fueron contadas y su viabilidad evaluada con azul de tripano al 0,4%. Todos los experimentos se llevaron a cabo con una viabilidad igual o superior al 95% y con los cultivos en fase exponencial de crecimiento.

2.2.2 Línea Celular Jurkat

Es derivada de leucemia linfoide aguda, establecida a partir de células de sangre periférica de un niño de 14 años de edad con leucemia aguda, de linfocitos T [Cai et al. 2010]. El cariotipo es pseudo-diploide, muchas células presentan poliploidía, pero los cromosomas X y Y son normales. Las células en cultivo crecen en suspensión, adoptan una morfología de linfoblastos y se agregan formando racimos Su ciclo celular estimado es de 18 horas.

Esta línea celular fue mantenida en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 5% de SBF (medio completo) a una temperatura de 37°C en presencia de una atmósfera húmeda con CO₂ al 5%. Se realizaron subcultivos cada 2 o tres veces por semana. Para la realización de los subcultivos se procedió de la siguiente manera: Se retiró el volumen de células y se centrifugaron (2400 rpm por minuto) se tomo una muestra diluida 1:100 y se adicionó nuevo medio completo.

Para la realización de los experimentos el medio fue centrifugado a 2400 rpm durante 4 minutos, se diluyó el pellet de células en 2ml de medio RPMI 1640 suplementado con SBF al 5%, las células fueron contadas y su viabilidad evaluada con azul de tripano al 0,4%. Todos los experimentos se llevaron a cabo con una viabilidad igual ó superior al 95% y con los cultivos en fase exponencial de crecimiento.

2.3 Evaluación de la Citotoxicidad

2.3.1 Prueba del MTT

Para realizar la prueba del MTT, se emplearon platos de cultivos de 96 pozos, en cada uno de los cuales se, adicionaron 5000 células Jurkat ó 8000 células CHO obtenidas a partir de un cultivo subconfluyente en medio RPMI 1640 suplementado con SBF 5% y después de 48 horas, se adicionaron las diferentes concentraciones (10µl), 50µg/ml, 70µg/ml, 100µg/ml de las fracciones a evaluar. Se realizó un control negativo (células sin tratamiento) y un control del solvente a una concentración de 0.03% (etanol y etanol : hexano para *Myrmekioderma gyroderma* y DMSO para *Topsentia ophiraphidites* DMSO).

El protocolo de MTT fue basado en el descrito por [Ulukaya et al. 2008] con algunas modificaciones. Después de las horas equivalentes a un ciclo celular (20 horas) se adicionó 20 µl de MTT (Sigma, 5mg/ml) a cada pozo, se incubó por 4 horas en oscuridad y luego se adicionó 100 µl de isopropanol ácido para diluir los cristales de formazán formados, se llevo a agitación y oscuridad durante toda la noche. Finalmente se leyó la absorbancia a 570 nm, en un lector de placas (Lector de placas Multiskan Spectrum, TermoScientific). Todos los experimentos fueron realizados por tres replicas y por duplicado.

El porcentaje de viabilidad para cada una de las concentraciones fue obtenido mediante la ecuación (2.1)

$$\text{Porcentaje de Viabilidad} = \frac{\text{Absorbancia del Tratamiento}}{\text{Absorbancia del Control Negativo}} * 100 \quad (2.1)$$

El análisis estadístico se basó en la comparación de los promedios de los tratamientos con los del control negativo, obteniendo como variable respuesta el porcentaje de viabilidad (Ecuación 2.1). Por otro lado para hallar los valores de concentración inhibitoria media (IC50) se realizó un análisis probit con ayuda del programa Statgraphics Centurion.

2.3.2 Prueba de Exclusión del Colorane con Azul de Tripano

El protocolo realizado es el reportado por [Costa et al. 2008]. Se incubaron alícuotas de las suspensiones celulares tratadas con las diferentes concentraciones de las fracciones (50 µg/ml, 70 µg/ml y 100 µg/ml) durante 20 horas con azul de tripano al 0,4% y se cuantificó la viabilidad celular por conteo del porcentaje de células dañadas, las cuales se diferenciaron de las células sanas por presentar coloración azul como consecuencia del daño en su membrana celular. Se realizó un control negativo (células sin tratamiento) y un control del solvente con una concentración de 0.03% (Etanol y etano: hexano para *Myrmekioderma gyroderma* y DMSO para *Topsentia ophiraphidites*). La viabilidad celular se cuantificó mediante la ecuación (2.2). Todos los experimentos fueron realizados por tres replicas y por duplicado.

$$\%Viabilidad = \frac{\text{No de Células vivas}}{\text{No Células Totales}} * 100 \quad (2.2)$$

El análisis estadístico se basó en la comparación de los promedios de los tratamientos con los del control negativo, obteniendo como variable respuesta el porcentaje de viabilidad (Ecuación 2.2).

2.4 Evaluación del efecto sobre el ciclo celular

Para la realización de las pruebas de eficiencia de clonación y función de acumulación, se tomaron concentraciones iguales o menores que la IC50 encontrada con la prueba de MTT con el fin de obtener una población celular mayor del 50% que fuese posible evaluar.

2.4.1 Eficiencia de Clonación

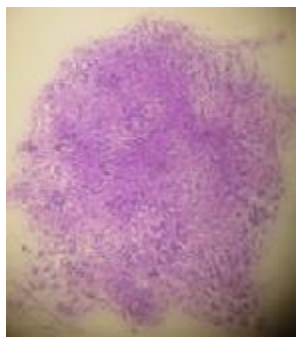
2.4.1.1 Eficiencia de Clonación en Células CHO

El protocolo empleado para la eficiencia de clonación en células CHO fue basado en el reportado por [Fresney. 2005] con modificaciones. Las células CHO en cultivo subconfluente previamente tratado con las diferentes concentraciones (58µg/ml "IC50", 52 µg/ml, 29 µg/ml) de la fracción T4 fueron desprendidas con tripsina (1X marca gibco) contadas y su viabilidad fue evaluada con azul de tripano al 0.4%. Las células fueron nuevamente sembradas en una dilución de 200 células/ pozo en platos de 6 pozos en 2.5 ml de medio RPMI 1640 suplementado con 5% de SBF e incubadas a 37°C durante 15 días. Después de este tiempo las colonias coloreadas (ver figura 2 – 1) con cristal violeta, se contaron y se calculó la Eficiencia de Clonación Absoluta (ECA) y la Eficiencia de Clonación Relativa (ECR), ver ecuaciones (2.3) y (2.4). Adicionalmente se realizó un control del solvente (DMSO [0.03%]) y un control positivo con mitomicina C [Sigma, 10µg/ml]. Todos los experimentos fueron realizados por tres replicas y por duplicados.

$$ECA = \frac{\text{No de Colonias Contadas}}{\text{No de Células Sembradas}} * 100 \quad (2.3)$$

$$ECR = \frac{\text{Eficiencia de Clonación Absoluta del Tratamiento}}{\text{Eficiencia de Clonación Absoluta del Control Negativo}} * 100 \quad (2.4)$$

Figura 2 – 1: Colonia células CHO. 20X

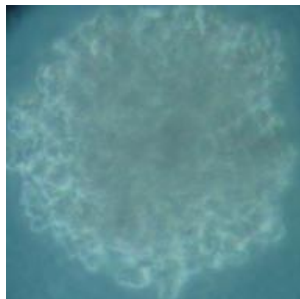


2.4.1.2 Eficiencia de Clonación en Células Jurkat

El protocolo empleado para realizar la eficiencia de clonación en las células Jurkat se basó en el reportado por [Freshney. 2005]. Las células Jurkat de un cultivo subconfluente tratado con las concentraciones (33 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/ml}$ y 17 $\mu\text{g/ml}$), de la fracción T4 fueron contadas y su viabilidad determinada con azul de tripano al 0.4%. Luego las células se sembraron en una dilución de 300 células/ pozo en platos de 6 pozos que contenían una primera capa de medio RPMI1640 suplementado con 10% de SBF y agar – agar al 0.6% (medio semisólido), las células fueron sembradas en una segunda capa de medio de cultivo RPMI1640 suplementado con SBF al 10% y con agar – agar al 0.3% (medio semisólido).

Las células se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% durante 15 días, después de lo cual se contaron las colonias formadas (Figura 2 - 2). Los cálculos de la eficiencia de clonación absoluta y relativa se realizaron de acuerdo a las ecuaciones 2.4 y 2.5 respectivamente. Se realizó un control del solvente (DMSO al [0.03%]), un control positivo con Mitomicina C (Sigma, 10 $\mu\text{g/ml}$) y un control negativo (Células sin tratar). Todos los experimentos fueron realizados por tres réplicas y por duplicados.

Figura 2 – 2: Colonia células Jurkat. 20X



El análisis estadístico se basó en la comparación de los promedios de las colonias contadas de los tratamientos y las contadas del control negativo, obteniendo como variables respuestas la eficiencia de clonación absoluta y relativa (Ecuación 2.4 y 2.5)

2.4.2 Función de Acumulación

Para este ensayo, se sembraron cultivos de células Jurkat y CHO a partir de cultivos subconfluentes, se trataron con concentraciones de 29µg/ml células CHO y 17 µg/ml células Jurkat equivalentes a la mitad de las IC50 encontradas para ambas líneas celulares, luego se adicionó el antimitótico colcemid (0.1%, G&M), se cosecharon y se obtuvieron extendidos cromosómicos por la técnica citogenética convencional [López and Márquez. 2002] cada dos horas durante 14 horas para células CHO y 18 horas para células Jurkat, tiempos equivalentes al ciclo celular de cada línea celular. Se realizó un control negativo (Células sin tratamiento) y un control del solvente (DMSO [0.03%]). En cada tratamiento se determinó el índice mitótico en 1000 células contadas (Ecuación 2.6)

$$IM = \frac{\text{No de Mitosis Encontradas}}{\text{No Células Totales}} * 100 \quad (2.6)$$

Se realizó una regresión lineal para cada uno de los tratamientos y los controles negativos.

2.4.3 Cinética Proliferativa Mediante ICH

El protocolo empleado se basó en el reportado por [Orta et al. 2008] con modificaciones. Para la visualización de las cromátidas, se utilizó en análogo de la timina bromodeoxiuridina (BrdU Sigma) este compuesto posee el halógeno bromo (Br) que incorporado en el DNA y al ser expuesto a la luz se retira quedando en su lugar uracilo, el cual no tiñe en presencia del colorante giemsa. Una vez teñida la muestra pueden diferenciarse los diferentes ciclos celulares en las metafases encontradas, así por ejemplo, las células que han estado durante dos ciclos en presencia de BrdU , poseen cromosomas con una cromatida clara y otra oscura.

Para la obtención de extendidos cromosómicos, las células fueron tratadas con concentraciones de 33 µg/ml , 17 µg/ml, 8 µg/ml (Para las células Jurkat) y 58 µg/ml, 29 µg/ml, 17 µg/ml (Para las células CHO). Seguidamente se adicionó a los cultivos el análogo bromodeoxiuridina (BrdU 1mg/ml, Sigma) 36 horas antes de la obtención de las preparaciones cromosómicas para las células CHO y 60 horas antes para las Jurkat (Estos tiempos son estandarizados basándose en el tiempo que tarda su ciclo celular). Se realizaron los respectivos controles negativo (Células sin tratamiento), control del solvente (DMSO al 0.03%) y un control positivo con Mitomicina C (Sigma 5µg/ml). Después de obtener las preparaciones cromosómicas, se realizó la coloración diferencial según el protocolo descrito por [Wolf and Perry. 1974]. Se estimó el tiempo de generación observando un promedio de 60 metafases y el índice mitótico contando 1000 células por cada tratamiento (Ecuaciones 2.7, 2.8 y 2.9).

$$\text{No de Células Promedio} = \frac{A*0.5+B*1+C*1.5+D*2+E*2.5+F*3}{\text{No Células Totales}} \quad (2.7)$$

$$\text{Tiempo de Generación} = \frac{\text{Tiempo de Exposición a BrdU}}{\text{No Células Promedio}} \quad (2.8)$$

Donde: A: Número de células encontradas en medio ciclo, B: Número de células encontradas en primer ciclo, C: Número de células encontradas en un ciclo y medio, D: Número de células encontradas en segundo ciclo, E: Número de células encontradas en dos ciclos y medio, F: Número de células encontradas en tercer ciclo.

2.5 Evaluación de la Genotoxicidad

2.5.1 Electroforesis Alcalina en Gel de Células Individuales (Ensayo Cometa)

El protocolo empleado fue basado en el reportado por [Sing et al 1988]. Para la realización de este ensayo se tomaron 100.000 células de las líneas celulares Jurkat y CHO en un volumen final de 250 μ l de medio RPMI 1640 y se trataron con las diferentes concentraciones (58 μ g/ml y 29 μ g/ml para las células CHO; 33 μ g/ml y 17 μ g/ml para las células jurkat) de la fracción T4 durante 6 horas con el fin de observar quiebres en el DNA debido a exposiciones agudas. Se realizaron controles negativo, control positivo (Peróxido de hidrógeno 25 μ M) y del solvente (DMSO [0.03%]).

Después del tratamiento, las suspensiones celulares se centrifugaron a 2400 rpm durante 10 minutos se retiró el sobrenadante, se mezclaron las células con agarosa de bajo punto de fusión preparada previamente a una concentración de 0,05%, se depositaron sobre un portaobjetos previamente cubierto con agarosa de punto de fusión normal a una concentración de 1%, se cubrieron con cubreobjetos y se incubaron a 4°C durante 10 minutos para endurecer la agarosa de bajo punto de fusión. Se retiraron los cubreobjetos y las placas se sumergieron en un buffer de lisis durante una noche.

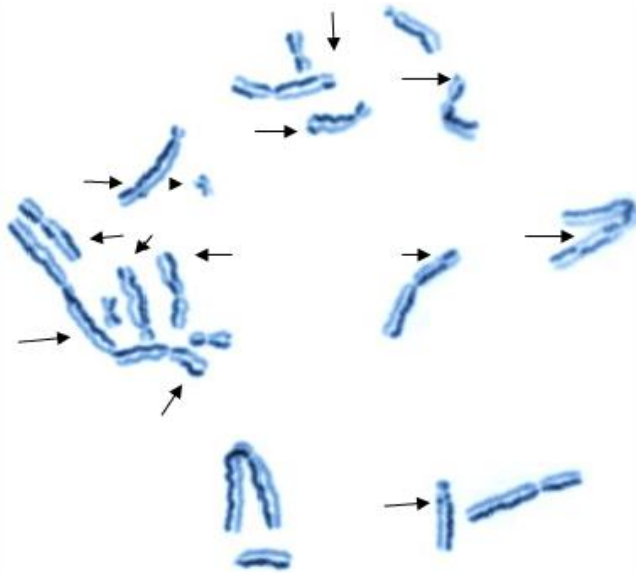
A continuación, las placas se colocaron durante 20 minutos una cámara de electroforesis con buffer de corrido (NaOH 10N, EDTA 200mM) y luego se corrieron a 300 mA durante 30 minutos a pH 13. Posteriormente los portaobjetos se deshidrataron con metanol y se guardaron durante un día y se tiñeron con Bromuro de etidio (0.02 mg/ml, Sigma), se observaron en un microscopio de fluorescencia 40X (Nikon, eclipse 80i). Con ayuda del programa Comet Score se midió el tamaño de la cola de los cometas formados en 60

células por tratamiento. Los datos obtenidos fueron analizados mediante un ANAVA de una vía.

2.5.2 Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH)

Este ensayo sirve como biomarcador para el efecto de exposiciones de las células a agentes genotóxicos [Ben Salah et al. 2011]. El protocolo empleado es el mencionado previamente en la evaluación de efecto sobre el ciclo celular. Para evaluar el efecto genotóxico se contabilizaron los intercambios entre cromátidas hermanas observados en un promedio de 30 metafases de segundo ciclo (Ver figura 2 – 3). Los datos obtenidos se analizaron mediante un ANAVA de una vía.

Figura 2 – 3: Intercambio de Cromátidas Hermanas en células. Tratadas con Fracciones de Esponjas Marinas. Fotomicroscopía 100X. Las flechas indican algunos de los ICHs analizados



3. Resultados y Discusión

3.1 Evaluación de la Citotoxicidad

En la tabla 3 – 1 se resumen los resultados de viabilidad mediante la prueba del MTT y azul de tripano para los solventes empleados en las diluciones de las fracciones.

Tabla 3 – 1: Resultados Pruebas de Citotoxicidad para los Solventes Utilizados

Solventes [0.03%]	%Viabilidad (MTT)		%Viabilidad (Azul de Tripano)	
	CHO	Jurkat	CHO	Jurkat
Etanol	99.98%	100%	93.30%	94.13%
Etanol : Hexano	98.97%	100%	83.70%	95.90%
DMSO	97.77%	100%	98.00%	99.53%

En la tabla 3 – 2 se resumen los resultados de citotoxicidad obtenidos para las seis fracciones evaluadas.

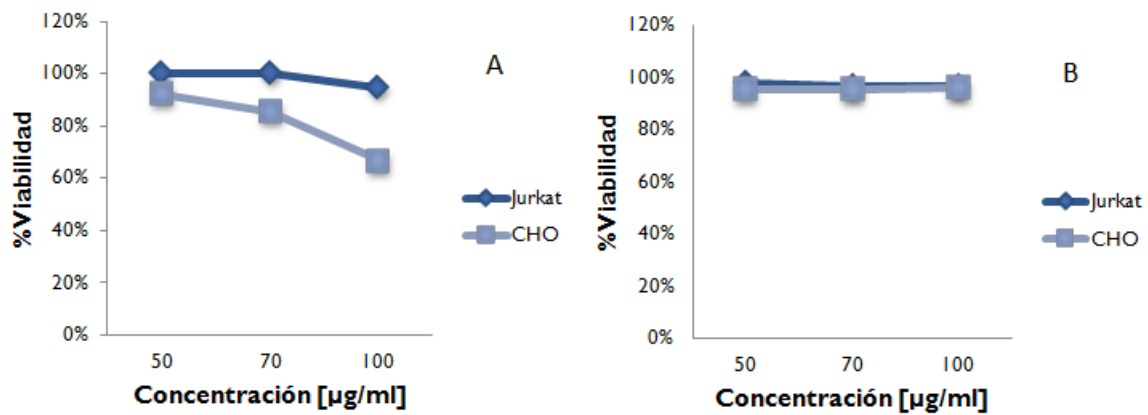
Tabla 3 – 2.Resumen de los Principales Resultados Obtenidos con la Prueba del MTT

Esponja Marina	Fracción	IC50 [µg/ml]	
		Jurkat	CHO
<i>Myrmekioderma gyroderma</i>	M3	<100*	<100*
<i>Myrmekioderma gyroderma</i>	M5	<100*	<100*
<i>Topsentia ophiraphidites</i>	T2	<100*	<100*
<i>Topsentia ophiraphidites</i>	T3	<100*	<100*
<i>Topsentia ophiraphidites</i>	T4	33 (33.62 – 33.10)**	58 (58.10 – 58.42)**
<i>Topsentia ophiraphidites</i>	T5	<100*	<100*

* Se asume una IC50 mayor que 100µg/ml por su baja citotoxicidad, dato no hallado ** Intervalo de confianza

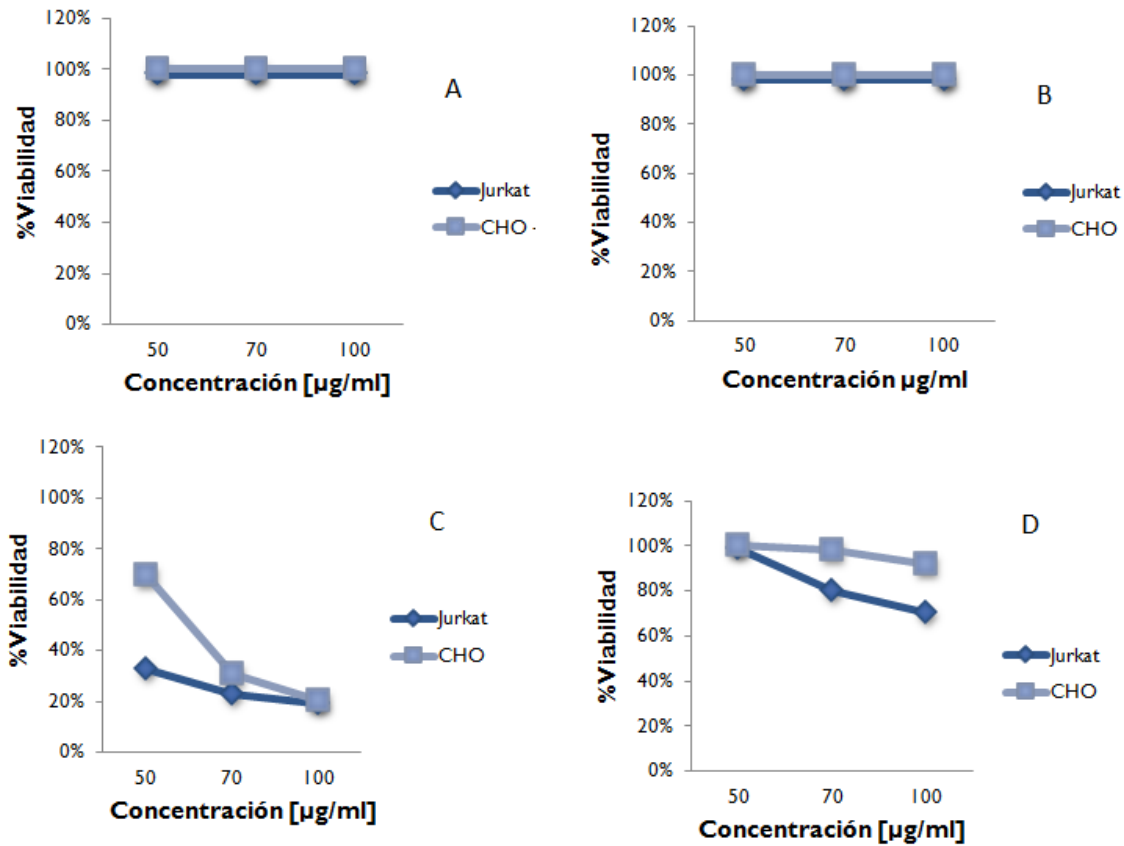
3.1.1 Prueba del MTT

Figura 3 – 1: Viabilidad con la Prueba del MTT. Fracciones M3 (A) y M5 (B) de la Esponja *Myrmekioderma gyroderma*



Con la prueba del MTT para las fracciones M3 y M5 se obtuvo una viabilidad cercana al 100% en ambas líneas celulares con las concentraciones evaluadas (Figura 3 – 1)

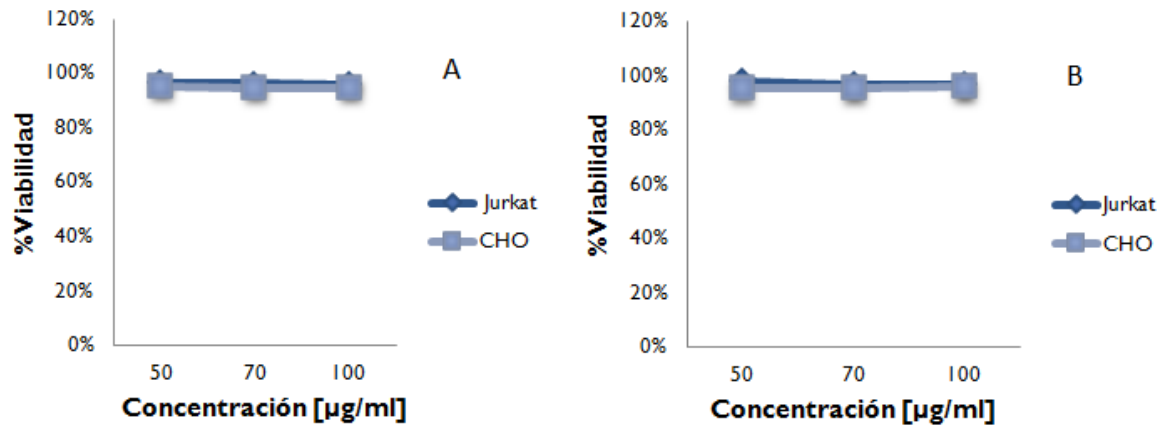
Figura 3 – 2: Viabilidad con la Prueba del MTT. Fracciones T2 (A), T3 (B), T4 (C), T5 (D) de la Esponja *Topsentia ophiraphidites*



Los resultados de la prueba de MTT para las fracciones T2, T3 y T5 mostraron alta viabilidad (cercana al 100%) en las dos líneas celulares. Por otro lado, la fracción T4 mostró menor viabilidad (valores entre el 20% y 70%) de una manera dependiente de la dosis (Figura 3 – 3).

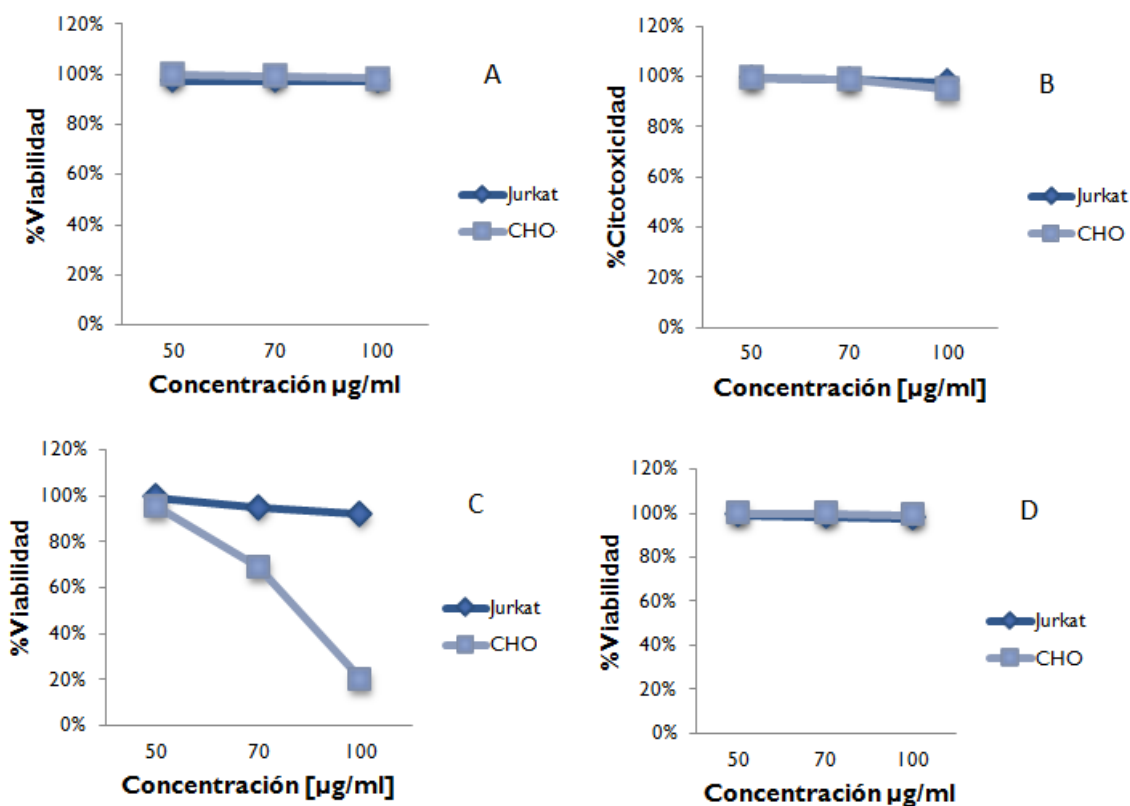
3.1.2. Azul de Tripano

Figura 3 – 3: Viabilidad con Azul de Tripano. Fracción M3 (A) y M5 (B) de la esponja *Myrmekioderma gyroderma*



Los valores de viabilidad obtenidos con azul de tripano (Figura 3 – 3) para las fracciones M3 y M5 fueron concordantes con la prueba del MTT (Ver Figura 3 – 1), ya que en ambos casos la viabilidad fue cercana al 100%. Por lo anterior las fracciones M3 y M5 no mostraron efecto citotóxico sobre las líneas celulares evaluadas.

Figura 3 – 4: Viabilidad Obtenida con Azul de Tripano. Fracción T2(A), T3 (B), T4 (C) y T5 (D) de la esponja *Topsentia ophiraphidites*



La viabilidad obtenida con azul de tripano para las fracciones T2, T3, y T5 fue concordante con lo encontrado con la prueba de MTT (Figura 3 – 4), así que las fracciones T2, T3 y T5 tampoco mostraron efecto citotóxico sobre las líneas celulares evaluadas. Para la fracción T4, esta prueba demostró que la membrana de las células CHO fue más afectada y el efecto fue dependiente de la dosis; mientras que la membrana de las células Jurkat fue poco afectada lo cual se refleja en una viabilidad mayor del 90% bajo las tres concentraciones evaluadas (Figura 3 – 4), sin embargo la mitocondria si resultó afectada de acuerdo a lo observado con MTT [Ulukaya et al. 2008].

Dado que la fracción T4 mostró actividad citotóxica significativa con la prueba del MTT, se concluyó que era una fracción con potencial bioactivo y se halló su concentración

inhibitoria media (IC50), con el fin de evaluar su efecto genotóxico y sobre el ciclo celular. La IC50 es la concentración a la cual el 50% de las células en cultivo sobreviven al tratamiento con una fracción evaluada [Freshney. 2005]; esta concentración se obtuvo a partir de la evaluación de 16 concentraciones que iban desde 10µg/ml hasta 80 µg/ml con la prueba del MTT mediante un análisis probit. Del análisis probit realizado con ayuda del programa Statgraphics Centurion, se obtuvo una IC50 de 33µg/ml (Valor $p < 0.05$) para las Células Jurkat y 58µg/ml para las Células CHO (Valor $p < 0.05$).

3.2 Evaluación del Efecto sobre el Ciclo Celular

3.2.1 Eficiencia de Clonación

Esta prueba además de evaluar viabilidad celular permite evaluar el potencial efecto antiproliferativo. En este estudio se evaluaron tres concentraciones (29µg/ml, 52µg/ml y 58µg/ml para las células CHO; y para las células Jurkat (17µg/ml, 30µg/ml y 33µg/ml). En la Figura 3 – 5 y en la tabla 3 – 4, se muestran los resultados de eficiencia de clonación obtenidos para la fracción T4 en las células CHO y Jurkat.

Figura 3 – 5: Eficiencia de Clonación Absoluta y Relativa fracción T4. Células CHO (A), células Jurkat (B).

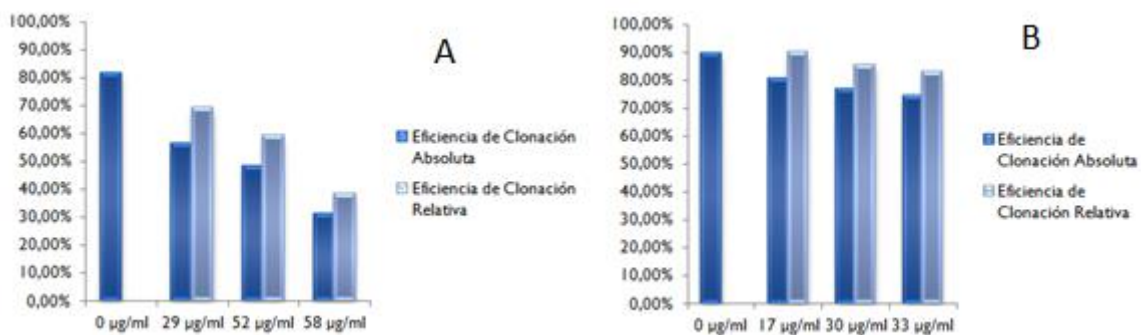


Tabla 3 – 3: Eficiencia de Clonación Absoluta y Relativa para la Fracción T4 en Células Jurkat y CHO

Línea Celular	Tratamiento	Jurkat	
		ECA	ECR
Jurkat	Mitomicina C [10µg/ml]	0.00%	0.00%
	DMSO[0.03%]	87.25%	97.49%
	Control Negativo [0µg/ml]	89.50%	NA
	9µg/ml	80.24%	89.65%
	17µg/ml	76.23%	85.17%
	33µg/ml	80.24%	89.65%
CHO – HB4 – K1	Mitomicina C [10µg/ml]	0.00%	0.00%
	DMSO [0.03%]	80.50%	99.08%
	Control Negativo [0µg/ml]	81.25%	NA
	17 µg/ml	66.00%	68.92%
	29 µg/ml	47.75%	58.77%
	58 µg/ml	31.00%	38.15%

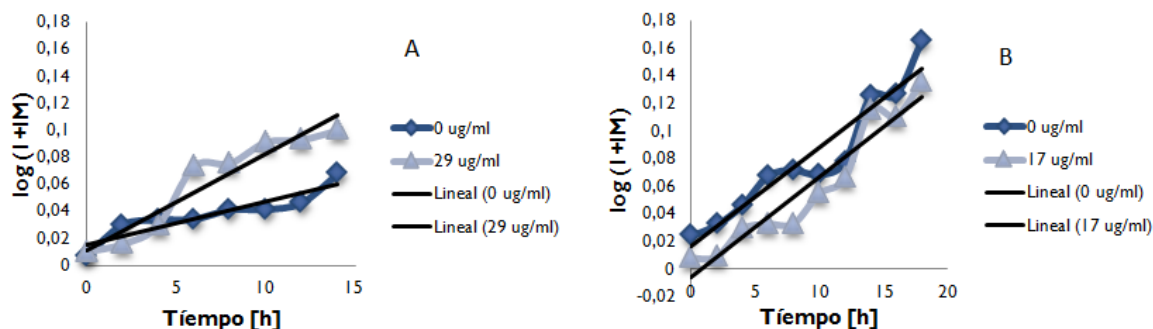
NA: No aplica para este caso

Las células CHO muestran un efecto antiproliferativo dependiente de la dosis, de manera que a una concentración de 17µg/ml se obtuvo una ECR de 68.92% mientras que a una concentración de 58µg/ml se obtuvo una ECR de 38.15%. Por otro lado, las células Jurkat mostraron ECA y ECR alrededor del 80% con las concentraciones evaluadas, por lo tanto no hay un efecto antiproliferativo sobre estas células (Figura 3 – 6, tabla 3 – 3).

3.2.2 Función de Acumulación

Las pruebas de MTT y eficiencia de clonación mostraron un efecto dependiente de la dosis. De estos resultados, se evaluó la concentración equivalente a la mitad de la IC50 hallada en cada una de las líneas celulares evaluadas. En la Figura 3 – 6, se observan las curvas de acumulación obtenidas mediante el ensayo de función de acumulación.

Figura 3 – 6: Curvas de Acumulación. Células CHO (A), Células Jurkat (B)



Las curvas de acumulación obtenidas para el control negativo y la curva correspondiente a una concentración de 29 μ g/ml para las células CHO (Figura 3 – 6 A) muestran que el ciclo celular es retrasado lo cual es concordante con los resultados de la eficiencia de clonación. Por otro lado, las curvas de acumulación obtenidas para el control negativo y la concentración de 17 μ g/ml de las células Jurkat (Figura 3 – 6 B) poseen pendientes similares, lo cual indica que el ciclo celular no fue afectado resultado concordante con el hallado en la eficiencia de clonación.

3.2.3 Cinética Proliferativa Mediante ICH

En las Tablas 3 – 4 y 3 – 5 se muestran los tiempos de generación obtenidos para cada una de las líneas celulares, mediante la prueba de ICH.

Tabla 3 – 4: Tiempos de Generación Estimados para las células Jurkat

Tratamiento	No de Células Medio Ciclo	No de Células Primer Ciclo	No de Células Ciclo y medio	No de Células Segundo ciclo	No de Células Tercer Ciclo	Tiempo de Generación Estimado [h]	Índice Mitótico
Mitomicina c [5 μ g/ml]	0	15	9	28	1	36.63	3.84%
DMSO [0,03%]	0	13	18	25	1	36.77	5.56%
Control Negativo [0 μ g/ml]	0	15	10	25	1	36.68	3.92%
9 μ g/ml	1	1	30	29	4	33.48	4,58%
17 μ g/ml	1	1	35	29	0	35.36	6.12%

Tabla 3 – 5. Tiempos de generación Estimados para las células CHO

Tratamiento	No de Células Medio Ciclo	No de Células Primer Ciclo	No de Células Ciclo y medio	No de Células Segundo ciclo	No de Células dos Ciclos y Medio	No de Células Tercer Ciclo	Tiempo de Generación Estimado [h]	Índice Mitótico (IM)
Mitomycin c [5µg/ml]	0	18	17	25	16	0	20.49	4.04%
DMSO [0,03%]	0	8	0	25	0	5	18.63	3.14%
Control Negativo [0µg/ml]	0	9	1	36	4	6	18.24	7.65%
17µg/ml	30	0	0	0	0	0	72	2.67%
29µg/ml	0	10	5	10	4	0	21.98	4.15%

En las células CHO, el tiempo de generación estimado en ICH para una concentración de 29µg/ml es de 21.98 horas (Comparado con el del control negativo que es de 18.63 horas). Por otro lado, el tiempo de generación hallado a una concentración de 17 µg/ml, muestra un retraso en el ciclo celular de aproximadamente 54 horas. Estos resultados, indican que hay un efecto inverso (a mayor concentración hay un menor efecto antiproliferativo y viceversa) una posible explicación es que cuando la sustancia a evaluar está más concentrada sus moléculas pueden neutralizarse unas a otras evitando la acción de estas sobre las células; es así como a una menor concentración la molécula de interés puede afectarlas más fácilmente. El tiempo de generación estimado para las células Jurkat con las dos concentraciones evaluadas (9µg/ml y 17µg/ml) es de aproximadamente 33 horas, lo que indica que el ciclo celular no está siendo afectado. En las células Jurkat el gen que codifica para la proteína p53 está mutado por lo que aquellas células con daño en su DNA no pueden ser reclutadas en G2 continuando así su trayectoria por el ciclo celular [Siddiqui et al. 2001], al contrario de las células normales (CHO), las cuáles si son reclutadas en G2, como consecuencia de un p53 normal.

En resumen los resultados obtenidos con las pruebas de eficiencia de clonación e ICH indican que la fracción T4 no afecta el ciclo celular en las células Jurkat pero si lo afecta en las células CHO, lo que implica un efecto antiproliferativo diferencial sobre células normales, sin embargo, se hace necesario explorar que parte del ciclo celular de las células CHO está siendo afectado, ya que las células Jurkat al ser derivadas de tumor tienen alteraciones y mutaciones no halladas en las células CHO .

3.3 Evaluación de la Genotoxicidad

Entre las pruebas más frecuentemente usadas en sistemas eucarióticos en el tamizaje de compuestos citotóxicos para asegurar la seguridad de la fracción, se encuentran el Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH) la cual permite evaluar daños genotóxicos de tipo crónico y el ensayo cometa, que permite evaluar daños genotóxicos agudos los cuales constituyen indicadores sensibles y relativamente rápidos de daño genético en las cadenas de DNA.

3.3.1 Electroforesis Alcalina en Gel de Células Individuales (Ensayo Cometa Alcalino)

En la tabla 3 – 6 se muestran los resultados obtenidos mediante ensayo cometa de la fracción T4

Tabla 3 – 6: Longitudes promedio del cometa para las células CHO y Jurkat

Línea Celular	Tratamiento	Longitud del Cometa Promedio [µm]
CHO – HB4 – K1	Control Positivo	55.11±24.83
	DMSO [0.03%]	12.55±3.50
	Control Negativo [0µg/ml]	12.50±2.17
	17 µg/ml	12.29±1.62
	29 µg/ml	12.50±2.56
Jurkat	Control Positivo	87.43±27.80
	DMSO [0.03%]	17.35±9.47
	Control Negativo [0µg/ml]	17.32±3.75
	9µg/ml	18.37±9.27
	17µg/ml	17.06±6.37

En las Tablas 3 – 7 y 3 – 8 se muestra el análisis estadístico para los datos encontrados mediante la prueba de test cometa para la fracción T4 en células CHO y Jurkat respectivamente.

Tabla 3 – 7: ANAVA de una vía para los datos del ensayo cometa en las células CHO

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	Valor P
Entre los Grupos	1.5726	2	0.786301	0.17	0.8451
Dentro de los Grupos	751.546	161	4.66799		
Total	753.119	163			

Tabla 3 – 8: ANAVA de una vía para los datos del ensayo cometa en las células Jurkat

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	Valor P
Entre los Grupos	76.3024	2	38.1512	0.82	0.4413
Dentro de los Grupos	10874.2	234	46.471		
Total	10950.5	236			

El análisis estadístico de los resultados obtenidos con el ensayo cometa en las células CHO y Jurkat muestra que las concentraciones evaluadas de la fracción T4 no generan quiebres en el DNA en comparación con el control negativo. En ambos casos el ANAVA de una vía ($p > 0.05\%$, se acepta la hipótesis nula) demostró que todas las medias de los diferentes tratamientos (incluido el control negativo $0\mu\text{g/ml}$) no variaban entre sí, esto implica que la fracción T4 no generó daño genotóxico agudo sobre las líneas celulares evaluadas.

3.3.2 Intercambio Cromátidas Hermanas

En la Tabla 3 – 9 se observan los resultados obtenidos mediante la prueba de ICH para la fracción T4 en las células CHO.

Tabla 3 – 9: Número promedio de ICHs Promedio encontrados en las células CHO

Tratamiento	No ICHs Promedio
Mitomicina C [0.5µg/ml]	13.64±5.67
DMSO [0.03%]	6.44±1.83
Control Negativo [0µg/ml]	3.79±2.19
17µg/ml	ND*
29 µg/ml	5.55±3.54

*No determinado

En las Tablas 3 – 10, 3- 11 se observa el análisis estadístico realizado para los resultados de ICH en las células CHO.

Tabla 3 – 10: ANAVA de una vía para los datos del ICH en células CHO

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	Valor P
Entre los Grupos	14.4194	2	4.80647	21.73	0.0000
Dentro de los Grupos	13.4907	61	0.22116		
Total	2.79102	64			

Tabla 3 – 11: Prueba de rangos múltiples para los datos de ICH en células CHO

Tratamiento	Homogeneidad de Grupos
Control Negativo [0µg/ml]	3.79 (A)
17µg/ml	ND* (B)
29 µg/ml	5.55 (C)

*No determinado

Evaluación del Potencial Bioactivo de las Esponjas Marinas *Myrmekioderma gyroderma* y *Topsentia ophiraphidites*

La prueba de rangos múltiples (ANAVA, valor $p < 0.05\%$, tablas 3 - 11) para los resultados de ICH en las células CHO demostró que las medias de todos los tratamientos incluida la del control negativo diferían entre sí.

En la Tabla 3 – 12 se observan los resultados obtenidos mediante la prueba de ICH para la fracción T4 en las células CHO

Tabla 3 – 12: Número promedio de ICHs promedios encontrados en las células Jurkat

Tratamiento	No ICHs Promedio
Mitomicina C [0.5µg/ml]	36.00±10.95
DMSO [0.03%]	15.05±6.44
Control Negativo [0µg/ml]	14.59±5.85
9µg/ml	33.72±12.62
17 µg/ml	19.94±4.52

En las Tablas 3 – 13 y 3- 14 se observa el análisis estadístico realizado para los resultados de ICH obtenidos en las células Jurkat.

Tabla 3 – 13: ANAVA de una vía para los datos del ICH en células Jurkat

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	Valor P
Entre los Grupos	14.8753	2	4.95844	24.46	0.0000
Dentro de los Grupos	13.1775	35	0.202731		
Total	28.0528	68			

Tabla 3 – 14: Prueba de Rangos Múltiples para los Datos de ICH en Células Jurkat

Tratamiento	Homogeneidad de Grupos
Control Negativo [0µg/ml]	14.59 (A)
9µg/ml	33.72 (B)
17 µg/ml	19.94 (C)

La prueba de rangos múltiples (ANAVA, valor $p < 0.05\%$, tablas 3 – 14 y 3 - 15) para los resultados de ICH en las células jurkat demostraron que las medias de todos los tratamientos incluida la del control negativo también diferían entre sí.

Tomando en conjunto, los resultados de las dos líneas celulares (CHO y Jurkat) se puede concluir que la fracción T4 es genotóxica en las líneas evaluadas.

CONCLUSIONES

- De seis fracciones evaluadas de las esponjas marinas *Myrmekioderma gyroderma* y *Topsentia ophiraphidites* sólo la fracción T4 mostró efecto citotóxico en las líneas celulares CHO y Jurkat.
- La fracción T4 mostró efecto genotóxico crónico en ambas líneas celulares.
- El ciclo celular de CHO fue afectado por la fracción T4, mientras que las Jurkat no.

RECOMENDACIONES

- Falta explorar en que parte del ciclo celular son afectadas las células CHO
- Se recomienda la evaluación de la fracción T4 en otras líneas celulares derivadas de tumor, con el fin de observar un posible efecto diferencial.
- Se recomienda evaluar otras fracciones de las esponjas marinas *Myrmekioderma gyroderma* y *Topsentia ophiraphidites* que no hayan sido evaluadas en las líneas celulares CHO y Jurkat.
- Se recomienda realizar otras pruebas para observar potenciales de tipo antimicrobiano, antifúngico, entre otras, para las fracciones evaluadas.

BIBLIOGRAFÍA

- AOKI, S., HIGUCHI, K., KATO, A., MURAKAMI, N., AND KOBAYASHI, M. 1999. Myrmekiosides a and b, novel mono-o-alkyl-diglycosylglycerols reversing tumor cell morphology of ras-transformed cells from a marine sponge of myrmekioderma sp. *Tetrahedron* 55, 52, 14865–14870.
- BOYD, M.R. The NCI in vitro anticancer drug discovery screen: concept, implementation, and operation 1985-1995, Teicher Humana Press Inc., Totowa, N edn. B. Teicher (ed.), 1997.
- BOYD, M.R. Some Practical Considerations and Applications of the National Cancer Institute In Vitro Anticancer Drug Discovery Screen. 1995. Teicher Humana Press Inc., Totowa, N edn. B. Teicher (ed.)
- BEN SALAH, G., KAMOUN, H., REBAI, A., ET AL. 2011. Sister chromatid exchange (SCE) and high-frequency cells (HFC) in peripheral blood lymphocytes of healthy Tunisian smokers. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 719, 1–2, 1–6.
- CAI, X., XING, X., CAI, J., CHEN, Q., WU, S., AND HUANG, F. 2010. Connection between biomechanics and cytoskeleton structure of lymphocyte and Jurkat cells: An AFM study. *Micron* 41, 3, 257–262.
- CHAKRAVARTI, S.K. AND KLOPMAN, G. 2008. A structural analysis of the differential cytotoxicity of chemicals in the NCI-60 cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16, 7, 4052–4063.
- CLARKE, P.R. AND ALLAN, L.A. 2009. Cell-cycle control in the face of damage – a matter of life or death. *Trends in Cell Biology* 19, 3, 89–98.
- COSTA, P.M. DA, FERREIRA, P.M.P., BOLZANI, V. DA S., ET AL. 2008. Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. *Toxicology in Vitro* 22, 4, 854–863.
- ECHIGO, S., HARA, N., CARDERON, G.J., DUQUE, C., AND FUJIMOTO, Y. 2006. C-24 Stereochemistry of Marine Sterols: (22E)-24-(Isopropenyl)-22-dehydrocholesterol and 24-Isopropenylcholesterol. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* 54, 10, 1473–1477.
- FRESHNEY, I.R. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, Fifth. Edition edn. John Wiley & Sons, Inc, 2005.
- GALEANO, E. AND MARTÍNEZ, A. 2007. Antimicrobial activity of marine sponges from Urabá Gulf, Colombian Caribbean region. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology* 17, 1, 21–24.

- GUL, W., HAMMOND, N.L., YOUSAF, M., PENG, J., HOLLEY, A., AND HAMANN, M.T. 2007. Chemical transformation and biological studies of marine sesquiterpene (S)-(+)-curcuphenol and its analogs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1770, 11, 1513–1519.
- IMHOFF, J.F., LABES, A., AND WIESE, J. 2011. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products. *Biotechnology Advances* 29, 5, 468–482.
- JIMENO, J., ARACIL, M., AND TERCERO, J.C. 2006. Adding pharmacogenomics to the development of new marine-derived anticancer agents. *Journal of Translational Medicine* 4, 1, 3.
- KUMAR, A., YADAV, A., GIRI, S.K., ET AL. 2011. Influence of GSTM1 and GSTT1 genotypes and confounding factors on the frequency of sister chromatid exchange and micronucleus among road construction workers. *Chemosphere* 84, 5, 564–570.
- LÓPEZ, J.B; MÁRQUEZ, M.E. Modelo Experimental para el estudio cromosómico en células de mamífero. 2002.
- MÁRQUEZ, D. 2009. Estudio Químico y Evaluación Biológica de Esponjas Marinas del Caribe Colombiano. Tesis Doctoral. Universidad de Antioquia
- MORA, J; ZEA, S; SANTOS, M; NEWMARK – UMBREIT, F. 2007. Capacidad Antimitótica de Extractos de Esponjas del Caribe Colombiano. *Bol. Invest. Mar. Cost.* 36, 167 – 169.
- NOLAN, R.P. AND LEE, K. 2012. Dynamic model for CHO cell engineering. *Journal of Biotechnology* 158, 1–2, 24–33.
- ORTA, M.L., MATEOS, S., CANTERO, G., WOLFF, L.J., AND CORTÉS, F. 2008. Protection of halogenated DNA from strand breakage and sister-chromatid exchange induced by the topoisomerase I inhibitor camptothecin. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 637, 1–2, 40–48.
- PENG, J., FRANZBLAU, S.G., ZHANG, F., AND HAMANN, M.T. 2002. Novel sesquiterpenes and a lactone from the Jamaican sponge *Myrmekioderma styx*. *Tetrahedron Letters* 43, 52, 9699–9702.
- PEREIRA, J.R.C.S., HILÁRIO, F.F., LIMA, A.B., ET AL. 2012. Cytotoxicity evaluation of marine alkaloid analogues of viscosaline and theonelladin C. *Biomedicine & Preventive Nutrition* 0.
- ROSENBERGER, A., RÖSSLER, U., HORNHARDT, S., ET AL. 2011. Validation of a fully automated COMET assay: 1.75 million single cells measured over a 5 year period. *DNA Repair* 10, 3, 322–337.
- RUBINSTEIN, L; SHOEMAKER, R; PAULL, K; SIMON, R; TOSINI, S; SKEHAN, P; SCUDIERO, D; MONKS, A; BOYD, M. 1990. Comparison of In Vitro Anticancer-Drug-Screening Data Generated With a Tetrazolium Assay Versus a Protein Assay

Evaluación del Potencial Bioactivo de las Esponjas Marinas *Myrmekioderma gyroderma* y
Topsentia ophiraphidites

Against a Diverse Panel of Human Tumor Cell Lines. J Natl Cancer Inst 1990; 82: 1113-1118.

SCHUMACHER, M., KELKEL, M., DICATO, M., AND DIEDERICH, M. Gold from the sea: Marine compounds as inhibitors of the hallmarks of cancer. Biotechnology Advances In Press, Corrected Proof.

SEPCIC, K., BATISTA, U., VACELET, J., MACEK, P., AND TURK, T. 1997. Biological activities of aqueous extracts from marine sponges and cytotoxic effects of 3-alkylpyridinium polymers from *Reniera sarai*. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol 117, 1, 47–53.

SEPČIĆ, K., KAUFERSTEIN, S., MEBS, D., AND TURK, T. 2010. Biological Activities of Aqueous and Organic Extracts from Tropical Marine Sponges. Marine Drugs 8, 5, 1550–1566.

SIMMONS, T.L., COATES, R.C., CLARK, B.R., ET AL. 2008. Biosynthetic origin of natural products isolated from marine microorganism-invertebrate assemblages. Proc Natl Acad Sci U S A 105, 12, 4587–94.

SING, N; MCCOY, M; TICE, R; SCHNEIDER, E. A Simple Technique for Quantification of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. Exp. Cell. Res. 175(1988) 184 – 191.

SIPKEMA, D., FRANSSEN, M.C., OSINGA, R., TRAMPER, J., AND WIJFFELS, R.H. 2005. Marine sponges as pharmacy. Mar Biotechnol (NY) 7, 3, 142–62.

SJÖGREN, C. AND STRÖM, L. 2010. S-phase and DNA damage activated establishment of Sister chromatid cohesion—importance for DNA repair. Experimental Cell Research 316, 9, 1445–1453.

SPEIT, G., VASQUEZ, M., AND HARTMANN, A. 2009. The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. Mutation Research/Reviews in Mutation Research 681, 1, 3–12.

ULUKAYA, E., OZDIKICIOGLU, F., ORAL, A.Y., AND DEMIRCI, M. 2008. The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. Toxicology in Vitro 22, 1, 232–239.

WOLFF, S., PERRY, P. 1974. Chromosoma. 48: 341-353