



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación de la actividad citotóxica, genotóxica  
y efecto sobre el ciclo celular de fracciones  
obtenidas a partir de la esponja marina  
*lotrochota birotulata*

Andrés Mauricio de la Ossa

Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín

Escuela de Biociencias

Maestría en Ciencias - Biotecnología

2012



Evaluación de la actividad citotóxica, genotóxica  
y efecto sobre el ciclo celular de fracciones  
obtenidas a partir de la esponja marina  
*lotrochota birotulata*

Andrés Mauricio de la Ossa

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de **Magíster en**

**Ciencias - Biotecnología**

Director:

Biólogo M. Sc. Juan Bautista López Ortiz

Codirectores:

Bióloga M. Sc. María Elena Márquez

Químico M. Sc., Doctor en Ciencias. Alejandro Martínez Martínez

Línea de Investigación:  
Mutagénesis y Cáncer

Grupo de Investigación:  
Biotecnología Animal

Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín

Escuela de Biociencias

Maestría en Ciencias - Biotecnología

2012



**“EL MUNDO EXIGE RESULTADOS.  
NO LE CUENTES A OTROS  
TUS DOLORES DE PARTO.  
MUÉSTRALES AL NIÑO”  
INDIRA GANDHI**



# Agradecimientos

A mi madre, por su apoyo incondicional. A mi padre, por la motivación que siempre me brinda.

A mi mentor el profesor Antonio Castañeda, por encaminarme en este maravilloso mundo de la citogenética.

A mi tutor Juan Bautista López Ortiz, por su amabilidad, respeto, nobleza y todas esas cualidades que lo hacen un ser maravilloso, por la oportunidad de aprender al lado de uno de los grandes de la citogenética.

A la profesora María Elena Márquez, por su disponibilidad, formalidad y asertividad en apreciaciones y consejos para el buen desarrollo del trabajo en el laboratorio.

Al Dr. Alejandro Martínez, por su profesionalismo, excelencia y la virtud de ser un maestro a todos los que hemos tenido la fortuna de estar a su lado.

A la profesora Diana Márquez, por las fracciones de la esponja marina *I. birotulata*.

A todos mis compañeros de laboratorio, por estar conmigo en estos importantes momentos de aprendizaje.

Al Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad Nacional de Colombia por brindar el espacio para el desarrollo de los experimentos.

Finalmente a todas las personas que hicieron posible la realización de esta investigación.





## Resumen

### Evaluación de la actividad citotóxica, genotóxica y efecto sobre el ciclo celular de fracciones obtenidas a partir de la esponja marina *Iotrochota birotulata*

de la Ossa, Andrés Mauricio<sup>1</sup>; López Ortiz, Juan B.<sup>1</sup>; Márquez, María Elena<sup>1</sup>; Martínez, Alejandro<sup>2</sup>

1 Grupo de Investigación en Biotecnología Animal, Escuela de Biociencias, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

2 Grupo Productos Naturales Marinos, Instituto de Química, Universidad de Antioquia

Los organismos marinos constituyen una fuente importante de sustancias bioactivas con estructuras novedosas y con propiedades biológicas y farmacológicas potenciales. En este trabajo se evaluaron los efectos citotóxicos, genotóxicos y sobre el ciclo celular con las pruebas de azul de Tripano, MTT, ensayos de clonación, intercambio de cromátides hermanas (ICH), ensayo cometa (SCGE) y función de acumulación respectivamente de dos fracciones obtenidas de la esponja marina *Iotrochota birotulata* (clase: Demospongia) colectada en el Caribe Colombiano. Se evaluaron diferentes concentraciones de las fracciones extraídas por métodos fisicoquímicos, para determinar su potencial efecto citotóxico, genotóxico y efecto sobre el ciclo celular en células CHO y Jurkat. Los resultados revelaron que las fracciones 5 y 6 presentaron citotoxicidad, genotoxicidad y efecto sobre el ciclo celular dosis dependiente y efectos diferentes entre la línea celular CHO y Jurkat. Este trabajo amplía el conocimiento de los recursos marinos colombianos y muestra la posibilidad de crecimiento en la bioprospección de sustancias con potencial biotecnológico.

Agradecimientos a Colciencias, por la financiación de esta investigación.

**Palabras clave:** Organismos marinos, actividad biológica, bioensayos, líneas celulares.

## Abstract

### Evaluation of cytotoxic activity, genotoxic and effect on cell cycle of fractions obtained from the marine sponge *iotrochota birotulata*

de la Ossa, Andrés Mauricio<sup>1</sup>; López Ortiz, Juan B.<sup>1</sup>; Márquez, María Elena<sup>1</sup>; Martínez, Alejandro<sup>2</sup>

1 Research Group Animal Biotechnology, School of Biosciences, National University of Colombia at Medellín

2 Marine Natural Products Group, Institute of Chemistry, University of Antioquia

Marine organisms are an important source of bioactive substances with novel structures with potential biological and pharmacological properties. This study evaluated the cytotoxic, genotoxic and cell-cycle test Trypan blue, MTT, assay cloning, sister chromatid exchange (SCE), comet assay (SCGE) and accumulation function of two fractions respectively obtained from the marine sponge *Iotrochota birotulata* (class: Demospongia) collected in the Colombian Caribbean. The effects of different concentrations of the fractions extracted by physicochemical methods to determine their potential cytotoxic, genotoxic and effect on cell cycle in CHO cells and Jurkat. The results revealed that fractions 5 and 6 showed cytotoxicity and effects on cell cycle and dose-dependent different effects between CHO and Jurkat cell line. This work extends the knowledge of Colombian marine resources and shows the possibility of growth in bioprospecting of substances with biotechnological potential.

Thanks to Colciencias, for funding this research.

**Keywords:** Marine organisms, biological activity, bioassay, cell lines.

# Contenido

	Pág.
Resumen.....	IX
Abstract.....	X
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas.....	XV
Abreviaturas .....	XVII
Introducción.....	1
1 Estado del arte.....	IV3
1.1 Potencial farmacológico de los organismos marinos. ....	3
1.1.1 Drogas antineoplásicas de productos naturales marinos. ....	4
1.2 Características generales de las esponjas. ....	4
1.3 Esponjas marinas y sus metabolitos secundarios. ....	4
1.3.1 Metabolitos secundarios en la especie <i>Iotrochota birotulata</i> .....	7
2 Metodología.....	8
2.1 Materiales .....	8
2.1.1 Toma de la muestra .....	8
2.1.2 Obtención de las fracciones .....	8
2.1.3 Líneas celulares y condiciones de cultivo. ....	10
2.2 Ensayos citogenéticos.....	10
2.2.1 Pruebas de citotoxicidad. ....	10
2.2.2 Pruebas de genotoxicidad. ....	12
2.2.3 Evaluación del potencial efecto antiproliferativo.....	13
2.3 Análisis estadístico.....	14
3 Resultados.....	175
3.1 Pruebas de citotoxicidad .....	175
3.1.1 Prueba de viabilidad con azul de Tripano .....	175
3.1.2 Prueba de citotoxicidad por el ensayo del MTT .....	16
3.1.3 Eficiencia de clonación de células CHO-K1 y Jurkat.....	17

**XII | Evaluación de la actividad citotóxica, genotóxica y efecto sobre el ciclo celular de fracciones  
obtenidas a partir de la esponja marina *Iotrochota birotulata***

---

3.2	Ensayos de genotoxicidad .....	19
3.2.1	Intercambio de cromátides hermanas en células CHO-K1 y Jurkat.....	19
3.2.2	Ensayo cometa en células CHO-K1 y Jurkat.....	20
3.3	Efecto sobre el ciclo celular .....	20
3.3.1	Función de acumulación en células CHO-K1 y Jurkat .....	20
4	Discusión .....	223
4.1	Citotoxicidad.....	223
4.2	Genotoxicidad .....	24
4.3	Efecto sobre el ciclo celular .....	24
5	Conclusiones y recomendaciones .....	3225
5.1	Conclusiones.....	3225
5.2	Recomendaciones.....	26
	Bibliografía.....	3627

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 3-1:</b> Curvas de viabilidad mediante azul de Tripano en las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat, (a) tratadas con la fracción 5 y (b) la fracción 6. Viabilidad media de las fracciones 5 (c) y 6 (d).....	15
<b>Figura 3-2:</b> Curvas de viabilidad mediante MTT en las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat, (a) tratadas con la fracción 5 y (b) la fracción 6.....	16
<b>Figura 3-3:</b> Citotoxicidad media ( $CI_{50}$ ) de las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat, (a) tratadas con la fracción 5 y (b) la fracción 6.....	17
<b>Figura 3-4:</b> : Eficiencia de clonación relativa de las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat, (a) tratadas con la fracción 5 y (b) la fracción 6.....	17
<b>Figura 3-5:</b> Eficiencia de clonación relativa de las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat, (a) tratadas con la fracción 5 y (b) la fracción 6.....	18
<b>Figura 3-6:</b> Eficiencia de clonación de células Jurkat. Diferencia entre una colonia del control negativo (a) y un grupo de células que no alcanzaron a formar una colonia al ser tratadas con una de las fracciones de la esponja marina <i>I. birotulata</i> (b).....	18
<b>Figura 3-7:</b> Intercambio de Cromatides hermanas en células CHO-K1.....	19
<b>Figura 3-8:</b> Efecto genotóxico de las fracciones 5 y 6 mediante el ensayo cometa en células CHO-K1 y Jurkat (estadísticamente significativo respecto al control).....	20
<b>Figura 3-9:</b> Función de acumulación de las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat, (a) tratadas con la fracción 5 y (b) la fracción 6.....	21

**XIV | Evaluación de la actividad citotóxica, genotóxica y efecto sobre el ciclo celular de fracciones  
obtenidas a partir de la esponja marina *Iotrochota birotulata***

---

## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 1-1:</b> Productos de origen marino comercialmente disponibles y en desarrollo farmacológico.....	4
<b>Tabla 1-2:</b> Compuestos Bioactivos Extraídos de esponjas marinas.....	5
<b>Tabla 3-3:</b> Intercambio de cromatides hermanas (ICH), tiempo de generación en horas de las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat, (a) tratadas con la fracción 5 y (b) la fracción 6.....	19





## Abreviaturas

Ara-a.....Vidarabina

Ara-c.....Citarabina

CI<sub>50</sub>..... Concentración inhibitoria 50

ECA.....Eficiencia de clonación relativa

ECR.....Eficiencia de clonación absoluta

ICH.....Intercambio de cromatides hermanas

IM.....Índice mitótico

MMC.....Mitomicina C

SCGE.....Electroforesis de celulas individuales (por sus siglas en ingles)

Tg.....Tiempo de generación

UV.....Ultravioleta

µg/ml.....Microgramos sobre mililitros



# Introducción

La búsqueda de nuevos medicamentos contra el cáncer ha encontrado en las esponjas marinas nuevas alternativas farmacológicas debido a la gran variedad de efectos encontrados en los compuestos bioactivos producidos por ellas (Murray et al., 2007). Los medicamentos antitumorales específicos del ciclo celular incluyen drogas como el metotrexato, fluorouracilo y citarabina, los cuales actúan sobre células en proliferación, mientras que, los no específicos como los agentes alquilantes y cisplatino actúan independientemente del estado de proliferación. Los fármacos específicos del ciclo celular pueden ejercer una acción en fases específicas del ciclo celular, por ejemplo, la citarabina actúa en la fase S del ciclo celular, la bleomicina en la fase G2-M (Murray et al., 2007) y otros como la colchicina, vblastina, vincristina y taxol antimitóticos (Nobil et al., 2009).

En las últimas décadas, las grandes compañías farmacéuticas han considerado los productos naturales, principalmente a los marinos como alternativa para la búsqueda de nuevos medicamentos (Belarbi et al., 2003; Carballeira y Pagn, 2000). Las investigaciones realizadas han demostrado que en los ecosistemas marinos hay mayor probabilidad de encontrar sustancias bioactivas de interés terapéutico (Wei et al., 2007). Comparativamente con los ecosistemas terrestres. Según estudios preclínicos realizados por el Instituto Nacional de Cáncer de EEUU, cerca del 1,8% de los extractos de origen marino mostraron actividad antitumoral, frente a un porcentaje del 0,4 que se encontró en extractos de microorganismos y plantas de origen terrestre. Dentro de estos los que dieron resultados más prometedores fueron las esponjas, briozoos y tunicados los cuales han generado compuestos que están en estudios preclínicos avanzados (Mayer 2008). Colombia, por su posición geográfica y por el hecho de poseer costa sobre dos mares, goza de un gran potencial para implementar programas de bioprospección y aprovechamiento de recursos marinos, los cuales se encuentran subexplorados (Valle et al., 2009). El golfo de Urabá es uno de los sitios que ha reportado alta diversidad de esponjas (Wulff, 2006) las cuales han mostrado ser fuente de diversos e interesantes compuestos nuevos, con potencial bioactivo como, antiparasitaria, antibacteriana, antifúngica, inmunomoduladora y antitumoral, entre otras (Galeano y Martínez, 2007).

Diversos estudios de la esponja *Itrochota birotulata* han mostrado actividad citotóxica sobre tres líneas tumorales (Galeano y Martínez, 2007; Costantino et al, 1994; Jiang, 2008; Li et al., 2005; Luter et al., 2007) y se ha extraído el compuesto Jaspin B que induce apoptosis en células de melanoma al interferir en el metabolismo de las ceramidas (Salma et al., 2009), sus extractos también han presentado inhibición enzimática (Brown et al., 2001, 2004; Zabala, 2008). Bajo estos precedentes, y con el fin

**2 | Evaluación de la actividad citotóxica, genotóxica y efecto sobre el ciclo celular de fracciones obtenidas a partir de la esponja marina *Iotrochota birotulata***

---

de probar el potencial antitumoral de esta esponja, se realizaron en el presente trabajo bioensayos que permitieron evaluar su actividad citotóxica, genotóxica y su efecto sobre el ciclo celular en dos líneas celulares: una establecida CHO-K1 de comportamiento normal y otra leucemoide Jurkat.

# **1 Estado del arte**

## **1.1 Potencial farmacológico de los organismos marinos.**

En los ecosistemas marinos se encuentra una gran biodiversidad de organismos animales, vegetales y microbianos en comparación a los hallados en los ecosistemas terrestres (Blunt et al., 2007). Diversas investigaciones sobre productos naturales han demostrado que los organismos marinos son una fuente interesante de nuevos compuestos y posibles rutas biosintéticas (Bergquist y Wells., 1983; Hooper et al., 1992). Esto ha llevado a que las investigaciones de productos naturales encuentren en estos organismos una gran variedad de estructuras con actividad biológica, que actualmente se encuentran comercialmente disponibles o en desarrollo farmacológico (Tabla 1-1) (Pedradab 2010). Muchos de los compuestos hallados han demostrado múltiples acciones potencialmente útiles para algunas de las necesidades de la medicina actual, además parecen ser más promisorios que los compuestos obtenidos de otras fuentes por lo que se ha generado un interés muy especial en su estudio por parte de la industria farmacéutica con expectativas prometedoras para el futuro. (Belarbi et al., 2003; Carballeira y Pagn, 2000).

#### 4 | Evaluación de la actividad citotóxica, genotóxica y efecto sobre el ciclo celular de fracciones obtenidas a partir de la esponja marina *Iotrochota birotulata*

Tabla 1-1: Productos de origen marino comercialmente disponibles y en desarrollo farmacológico (Pedradab 2010).

Producto	Fuente	Aplicación
Vidarabina (Ara-A)	<i>Cryptoethya crypta</i>	Fármaco antiviral
Citarabina (Ara-C)	<i>Cryptoethya cripta</i>	Fármaco anticáncer
Cibrostatinas 1 y 2	<i>Cribrochalina sp.</i>	Fármaco anticáncer
Dibromohimendialdisina	<i>Stylotella aurantium</i>	Fármaco para la osteoartritis
Discodermolida	<i>Discodermia dissoluta</i>	Fármaco anticáncer
Halichondrina B	<i>Halichondria okadai</i>	Fármaco anticáncer
IPL576092	<i>Petrosia contignata</i>	Fármaco antiinflamatorio y para el asma
KRN7000	<i>Agelas mauritanus</i>	Fármaco anticáncer
Manoalida	<i>Luffariella variabilis</i>	Marcador molecular, inhibidor de la fosfolipasa A2
Manoalida	<i>Luffariella variabilis</i>	Fármaco antiinflamatorio y para la psoriasis

Dentro de los organismos marinos se ha encontrado que las esponjas producen metabolitos particulares con importantes aplicaciones farmacéuticas dentro de los cuales se destacan compuestos anticancerígenos e inmunomoduladores (Carballeira y Pagn, 2000). Los compuestos bioactivos han sido detectados con mayor frecuencia en las esponjas marinas que en otros organismos marinos posiblemente, por que son los animales multicelulares más primitivos (700-800 millones de años) de existencia y a su gran diversidad, con aproximadamente, 15.000 especies, de las cuales el 99% son marinas (Carballeira y Pagn, 2000 .; Wulff, 2006).

### 1.1.1 Drogas antineoplásicas de productos naturales marinos.

Dado el potencial farmacológico de estos compuestos, se requiere verificar con pruebas *in vitro* e *in vivo* su actividad biológica, lo mismo que su seguridad toxicológica con posibilidades de utilización como medicamento en seres humanos. A este respecto, la Organización Económica de Cooperación y Desarrollo (OECD) y la Conferencia Internacional de Armonización de Requerimientos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos de uso humano (ICH) han establecido pruebas estándares de citotoxicidad, genotoxicidad, efectos sobre el ciclo celular, como; el ensayo del MTT, coloración vital por azul de tripano, eficiencia de clonación, intercambio de cromátides hermanas, el ensayo cometa, función de acumulación, entre otros, requeridos para la evaluación y aceptación internacional de fármacos (Mayer et al., 2011).

## 1.2 Características generales de las esponjas.

Las esponjas son invertebrados acuáticos morfológicamente simples que se encuentran ubicados evolutivamente en escalas inferiores y presentan vida sésil con hábitos alimenticios filtradores, se estima su aparición entre 700-800 millones de años con una gran diversidad cercana a 15.000 especies de las cuales el 99% son marinas . (Wulff JL, 2006). Las esponjas marinas contribuyen de manera importante en la comunidad bentónica debido a su abundancia y diversidad en todas las latitudes desde los polos hasta los trópicos encontrándose en este último una mayor abundancia, distribución y diversidad de especies. Las esponjas marinas presentan un sistema de defensa único, fundamentado en la elaboración de metabolitos secundarios con efectos biológicos de alta especificidad y mayor potencia para equilibrar la disolución a la que tiene que enfrentar del medio acuoso en que habita, esta defensa química las protege de posibles predadores, patógenos y epibiontes o para competir por espacios con otros organismos y para atraer especies determinadas de hongos y/o bacterias que son simbióticos sobre o dentro de su cuerpo. Las esponjas marinas se catalogan taxonómicamente en tres clases de acuerdo al tipo de espículas: Hexactinellida, Desmospongia y calcárea.

## 1.3 Esponjas marinas y sus metabolitos secundarios.

Los organismos marinos más reconocidos en cuanto a producción de metabolitos secundarios son; cnidarios, poríferos y tunicados. Estos metabolitos les sirven como armas químicas sobre potenciales competidores del espacio, los protege de predadores y parásitos, así como también les permite competir de manera efectiva en ecosistemas densamente poblados. Estas pueden ser razones que explican que las esponjas constituyen el mayor reservorio de compuestos bioactivos promisorios, de las cuales se han aislado más de 4000 compuestos con gran variedad de estructuras y actividad biológica (Tabla 1-2) (Dunlap et al., 2007; Kuramoto et al., 2008; Zea, 2008; Rodrigez, 2010).

Tabla 1-2: Compuestos Bioactivos extraídos de esponjas marinas (Belarbi 2003, Aiub 2006, Blunt 2006, Bartolotta 2009, Bohlin 2010)

Esponja	Compuesto	Propiedades
<i>Theonella</i> sp.	Koshikamide B	Citotóxico
<i>Dolabella auricularia</i>	Compuesto sin identificar	Citotóxico
<i>Aplysia kurodai</i>	Aplyronines A-H	Altamente citotóxica
<i>Jaspis aff. johnstoni</i>	Chloriolina B	Antitumor
<i>Dysidea</i> sp.	Tetrabromo-difenil éter	Citotóxico, antibacterial
<i>Dysidea avara</i>	2-metiltio-1-4-naptoquinona	Antiangiogénica, Antimicrobial

6 | Evaluación de la actividad citotóxica, genotóxica y efecto sobre el ciclo celular de fracciones obtenidas a partir de la esponja marina *Iotrochota birotulata*

Tabla 1-2: (Continuación)

Esponja	Compuesto	Propiedades
<i>Ircinia fasciculata</i>	Sorbicilactona A	Antileucémica, anti HIV
<i>Spongia</i> sp.	3-hidroxiirridina E	Antileucémica, antitumor
<i>Hyrtios</i> sp.	Asperazine Malformin C	Antileucémica, citotóxico, Antitumor
<i>Fascaplysinopsis reticulate</i>	Bromo-alterochromide A	Citotóxico
<i>Ptilocaulis trachys</i>	Majusculamide C	Antifúngico
<i>Axinella</i> sp.	Efrapeptin E	Citotóxico, antibacterial
<i>Axinella verrucosa</i>	Oxaline	Anti-proliferativo
	Communesin B	Antileucémico
<i>Axinella damicornis</i>	Bicoumanigrin Aspernigrin B	Anticáncer, citotóxico Neuroprotector
<i>Halichondria okadai</i>	Alteramide A Trichodenone A	Anticáncer, Citotóxico Antileucémico, citotóxico
<i>Halichondria panacea</i>	1-O-acil-3-[R- glucopiranosil-(1- 3)-(6-O-acil-R-manno- piranosil)]-glicerol	Antitumoral
<i>Halichondria japonica</i>	Gymnostatin A Gymnostatin B	Antileucémica, citotóxico, anti-cáncer
<i>Acanthella acuta</i>	GG11	Antitumoral
<i>Petrosia</i> sp.	Fellutamide C	Citotóxico
<i>Acanthostrongylophora</i> sp.	Manzamine A	Antitumoral Antimalaria
<i>Homophymia</i> sp.	2-undecen-1'-il-4-quinolona 2-nonil-4-hidroxi-quinoline N- Oxido	Citotóxico
<i>Theonella swinhoei</i>	Swinholide A	Citotóxico
<i>Zyzya</i> sp.	Brocaenol A	Citotóxico
<i>Ectyoplasia ferox</i>	Epoxiphomalin A Trochodermol 8-deoxytrichothecin	Antitumor Anticáncer Anticáncer
<i>Mycale plumose</i>	1,5-Diazacyclohenicosane Metaciclo-prodigiosin Undecil-prodigiosin (S)-2,4-dihidroxi-1-butil(4- hidroxi)-benzoato Fructigenin A Aurantiomide B Aurantiomide C	Citotóxico Anticáncer Anticáncer Antitumor Antitumor Citotóxico Citotóxico
<i>Pseudoceratina purpurea</i>	Destruxin A	Antitumor
<i>Leucetta microraphis</i>	Leucamide A	Antitumor



La inmensa cantidad de metabolitos secundarios presentan toxicidad o inhiben vías metabólicas y pueden unirse de manera específica a blancos proteicos intracelulares y de la membrana de eucariotas incluyendo quinasas, telomerasas, proteasas y bombas iónicas, estos mecanismos de acción pueden actuar sinérgicamente llevando a la célula a la no formación de compuestos de membrana como fosfolípidos, apoptosis o bloqueando la división celular, un proceso fundamental cuando se trata de encontrar un compuesto anticancerígeno (Yamada, 2010). Diferentes especies marinas producen depsipéptidos, sesquiterpenos, ergosteroles, alcaloides, compuestos halogenados, entre otros que son compuestos simples y han mostrado propiedades anticancerígenas, por lo tanto se convierten en agentes promisorios en el establecimiento de nuevos medicamentos con fines quimioterapéuticos (Doyen et al., 2011).

### 1.3.1 Metabolitos secundarios en la especie *Iotrochota birotulata*.

La esponja marina *Iotrochota birotulata* (*I. birotulata*) de la clase Desmospongiae es una especie tropical que crece en expansión o posición vertical con ramificaciones de hasta 50 cm, de consistencia dura, color negro con manchas verdes longitudinales y de vez en cuando completamente de color amarillo verdoso. Su distribución va desde el sur de la Florida hasta Venezuela y el sur de Brasil, cuando se presiona segrega un exudado de color púrpura oscuro. De esta especie se ha caracterizó el compuesto 1,3-dibromo-5-{2-[(p-hydroxyphenyl)-acetamido]ethyl}-2-[3-(3-methyl-2-butenamido)-propoxy] benzene, derivado de la bromotirosina (Márquez et al., 2011), reportado previamente por Constantino et al (1994), pero no existían estudios sobre su actividad biológica. Actualmente se evalúan el posible potencial farmacológica de este compuesto con diferentes líneas celulares (Márquez et al., 2011).

De la esponja marina *I. birotulata* se obtuvieron los extractos diclorometanólico y etanólico; de este último extracto se aislaron siete fracciones. Tanto los extractos como las fracciones fueron evaluados con tres líneas cancerígenas humanas: A-549 (carcinoma de pulmón), HT-29 (adenocarcinoma de colon) y MDA-MB-231 (carcinoma de mama) a tres concentraciones 1, 5 y 25 µg/ml. El extracto etanólico no afectó significativamente el crecimiento de las células tumorales derivados de colon y mama, pero redujo el crecimiento de células tumorales derivadas de pulmón en un 40 % a la concentración 5µg/ml. El extracto diclorometanólico (5 µg/ml) redujo el crecimiento de células tumorales derivadas de mama, colon y pulmón en un 70 %, 60 % y 50 % respectivamente. Estos resultados, muestran una inhibición del crecimiento celular dependiente de la dosis. Las fracciones 3, 4 y 5 obtenidas del extracto etanólico mostraron una gran actividad (Márquez et al., 2011).

Se ha evidenciado que los extractos en solución de etanol y agua (1:1) de la esponja *I. birotulata* afecta la fosforilación de la enzima ERK la cual participa en la cascada de señalización de quinasas reguladas por señales extracelulares MAP/ERK de células SW-13 de carcinoma adrenal humano (Brown et al., 2001). De la misma esponja se ha reportado el aislamiento de compuestos ecdysteroides (Constantino et al., 2000) y compuestos yodados derivados de la bromotirosina (Constantino et al., 1994).

## 8 | Evaluación de la actividad citotóxica, genotóxica y efecto sobre el ciclo celular de fracciones obtenidas a partir de la esponja marina *Iotrochota birotulata*

La esponja *I. birotulata* ha mostrado bioactividad en extractos de diferentes polaridades (Galeano y Martínez, 2007; Costantino et al., 1994; Jiang, 2008; Li et al., 2005) como citotoxicidad (Luter et al., 2007), de ella se ha extraído el compuesto Jaspin B el cual induce apoptosis en células de melanoma al interferir en el metabolismo de las ceramidas (Salma et al., 2009). De otra parte, sus extractos también han presentado actividad de inhibición enzimática (Brown et al., 2001, 2004; Zabala, 2008). Además algunas fracciones de ácidos grasos de esponjas dentro de las que se incluye *I. birotulata* del Golfo de Urabá han presentado actividad antitumoral (Márquez et al., 2011). el presente trabajo se realizaron ensayos biodirigidos de citotoxicidad, genotoxicidad y efecto sobre el ciclo celular en una línea establecida y otra transformada a partir de dos fracciones de ácidos grasos de la esponja marina *I. birotulata*.

## **2 Metodología**

### **2.1 Materiales**

#### **2.1.1 Toma de la muestra**

La esponja marina *I. birotulata* fue colectada por el Biólogo Marino Diego Valderrama en el costado noroccidental del Golfo de Urabá en el sur del Mar Caribe a una profundidad comprendida entre los 15-21 m en Julio de 2006 e identificada por el Dr. Sven Zea. Bajo condiciones adecuadas la muestra fue enviada al Laboratorio de Productos Naturales Marinos de la Universidad de Antioquia donde se llevo a cabo la obtención de las fracciones.

#### **2.1.2 Obtención de las fracciones**

La muestra húmeda fue cortada en trozos de aproximadamente 3 x 3 cm, extraída con solventes de diferente polaridad (etanol y diclorometano) (Márquez et al., 2011) así: exhaustivamente se extrajo la muestra de esponja hasta desaparecer el color, se filtró el extracto y se evaporó con presión reducida y agitación constante a una temperatura inferior a 40 °C. Los extractos se almacenaron a 4 °C en condiciones de oscuridad. Al extracto etanólico se le hizo un fraccionamiento cromatográfico utilizando sílica gel en fase reversa (C<sub>18</sub>). Las fracciones obtenidas se concentraron bajo presión reducida y agitación constante a una temperatura inferior a 30 °C, disueltas con metanol y diclorometano de acuerdo a su solubilidad, posteriormente, se rotularon, se llevaron a deshidratación y fueron almacenadas bajo refrigeración. Luego se les hicieron ensayos de citotoxicidad y la fracción más activa (citotóxica) se sometió a fraccionamiento por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) hasta obtener las fracciones enriquecidas. Las fracciones rotuladas con el código 7-61214-5 y 7-61214-6 fueron enviadas al Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad Nacional sede Medellín, donde se les asignó el código 5 y 6 respectivamente, allí, fueron disueltas en hexano y medio RPMI 1640 para realizar los estudios de citotoxicidad, genotoxicidad y efecto sobre el ciclo celular.

### 2.1.3 Líneas celulares y condiciones de cultivo.

Los experimentos se realizaron a partir de cultivos en estado exponencial de las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat (ATCC TIB-152) propagados de manera rutinaria en medio RPMI 1640 (SIGMA), suplementado con 5% de suero bovino fetal (GIBCO). Los cultivos celulares se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda >95% y 5% CO<sub>2</sub>. Los subcultivos se realizaron sembrando 2x10<sup>5</sup> células en frascos de cultivo T25, bajo las mismas condiciones anteriormente descritas, hasta obtener los cultivos en crecimiento exponencial. Bajo estas condiciones se evaluaron los efectos citotóxicos, genotóxicos y sobre el ciclo celular de los tratamientos de las fracciones 5 y 6 de la esponja marina *I. birotulata* a diferentes concentraciones y que fueron mantenidos durante un periodo de generación en los cultivos celulares.

## 2.2 Ensayos citogenéticos.

### 2.2.1 Pruebas de citotoxicidad.

- Coloración vital de azul de Tripano: este ensayo fue desarrollado según (Vadhana et al., 2011).

Este ensayo permitió evidenciar integridad de membrana haciendo distinción entre células viables y no viables, estas últimas incorporaron el colorante azul de Tripano tomando una coloración diferencial que se visualizó y evaluó por recuento en cámara de Neubauer en microscopio.

Para el recuento, se diluyó una concentración celular proveniente de un cultivo tratado con las fracciones 5 o 6 de la esponja marina *I. birotulata* correspondientemente en proporción 1:1 con azul de Tripano al 0,4% e incubado por 3 minutos a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. Con micropipeta se tomó 20µl de la disolución celular con azul de Tripano y se llevó a la cámara de Neubauer (hemocitometro) para hacer conteo de células viables e inviables en microscopio óptico. Se midió el porcentaje de viabilidad como:

$$\%viabilidad\ celular = \frac{células\ vivas}{células\ totales} \times 100$$

El ensayo esta basado en la capacidad de la mitocondria en convertir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2-5-difeniltetrazol (MTT) de color amarillo en formazán de color púrpura a través de la enzima succinato deshidrogenasa. (Ovadje et al., 2011; Park et al., 2011; Umar-Tsafe et al., 2004).

Para la evaluación de citotoxicidad por este método se emplearon cultivos celulares con viabilidad superior al 95%. En platos de cultivo de 96 pozos se sembraron 6000 y 8000 células para la línea Jurkat y CHO-K1 respectivamente teniendo en cuenta un volumen

final de suspensión de 100  $\mu$ l. El tiempo de establecimiento fue de 48 horas, posterior a ello se adicionó y mantuvo el tratamiento durante 20 horas, ambos periodos se mantuvieron bajo condiciones de cultivo descritas en el numeral 2.1.3. Cuatro horas antes del cumplimiento del tiempo de tratamiento se adicionó MTT (5mg/ml), al finalizar este periodo, se agregó 100 $\mu$ l de isopropanol ácido a cada pozo y los platos de cultivo se dejaron en planchas de agitación orbital por un tiempo superior a 3 horas para la disolución de los cristales de formazan formados. Seguido a esto, se realizó la lectura de los platos usando un espectrofotómetro (Multiskan- Spectrum, Thermo Scientific) a una longitud de onda de 560nm. La evaluación de las fracciones 5 y 6 de *I. birotulata* se realizó usando 10 concentraciones diferentes por triplicado sobre cada una de las líneas celulares.

El porcentaje de Viabilidad se obtuvo con la siguiente formula:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{DO \text{ células tratadas}}{DO \text{ células control}} \times 100$$

DO: Densidad óptica y absorbancia

- Eficiencia de clonación

Para llevar a cabo este ensayo se emplearon cultivos celulares en fase exponencial y con viabilidad superior al 95%. En platos de cultivo de 12 pozos se sembraron 30.000 células de cada una de las líneas celulares Jurkat y CHO-K1 teniendo en cuenta un volumen de suspensión final de 1.5 ml. El tiempo de establecimiento fue de 48 horas, posterior a ello se adicionó y mantuvo el tratamiento durante 20 horas, ambos periodos se mantuvieron bajo condiciones de cultivo descritas en el numeral 2.1.3.

Los cultivos tratados de la línea celular CHO-K1 fueron tripsinizados (tripsina 0.05% GIBCO) y transferidos a tubos cónicos de 15ml; posteriormente, se centrifugaron a 2400rpm durante 5 minutos para retirar el sobrenadante donde está disuelto el tratamiento. A partir de un recuento celular de estos cultivos, se sembró, en placas de cultivos de 6 pozos un estimado de 200 células por pozo en un volumen de suspensión final de 2.5ml de medio suplementado con suero fetal bovino al 5%, los cultivos fueron mantenidos a 37°C en atmósfera húmeda y al 5% de CO<sub>2</sub>. El solvente hexano <1% en medio de cultivo se utilizó como control. Para realizar el conteo de las colonias después de seis días de incubación, fue necesario realizar una fijación con metanol: ácido acético en proporciones 3:1 y una tinción con cristal violeta 0.5% disuelta en agua destilada. En el conteo se consideraron como colonias aquellas que contaban con un número igual o mayor a 50 células. Los resultados se expresaron como porcentaje de eficiencia de clonación absoluta (ECA) y relativa (ECR) para cada tratamiento.

Los cultivos tratados de la línea celular Jurkat fueron transferidos a tubos cónicos de 15ml; posteriormente, se centrifugaron a 2400rpm durante 5 minutos para retirar el sobrenadante donde está disuelto el tratamiento. A partir de un recuento celular de estos cultivos, se sembró, en placas de cultivos de 6 pozos un estimado de 300 células por pozo en un volumen de suspensión final de 2.5 ml de medio RPMI 1640 – semisólido (Agar 0.3%) suplementado con suero fetal bovino al 5%, los cultivos fueron mantenidos

a 37°C en atmósfera húmeda y al 5% de CO<sub>2</sub> durante nueve días. El solvente hexano <1% en medio de cultivo se utilizó como control. Se utilizó una cuadrícula en microscopio invertido para realizar el conteo de las colonias. Se consideraron como colonias aquellas que contaban con un número igual o mayor a 50 células. Los resultados se expresaron como porcentaje de eficiencia de clonación absoluta (ECA) y relativa (ECR) para cada tratamiento.

$$ECA = \frac{\text{Número de colonias}}{\text{número de células sembradas}} \times 100$$

$$ECR = \frac{\text{ECA del tratamiento}}{\text{ECA del control negativo}} \times 100$$

### 2.2.2 Pruebas de genotoxicidad.

- Intercambio de cromátides hermanas (ICH)

Es una técnica citogenética fundamentada en la evidencia del mecanismo de reparación por recombinación homóloga (G2-M). Cada intercambio entre las cromátides hermanas es la evidencia de una lesión sobre el material genético que fue o no correctamente reparada (Figura 3-11). Esta técnica consiste en cambiar la estructura química de un cromosoma incorporando un análogo de la Timidina, durante dos ciclos, denominado 5-bromo-2-deoxiuridina (Federico et al., 2011; Gonzáles et al., 2007; Khabour et al., 2011; Soloneski y Larramendy, 2010). Es la técnica de más alta sensibilidad a nivel de genotoxicidad.

Para la evaluación del efecto genotóxico de las fracciones 5 y 6 de la esponja marina *I. birotulata* se cultivaron en placas de cultivo de 6 pozos y por duplicado 50.000 células de las líneas CHO-K1 respectivamente durante 68 horas bajo las condiciones descritas en el numeral 2.1.3. Durante este periodo, se agregó BrdU (1mg/ml) y se dejó actuar durante 36 horas para CHO-K1 y 48 horas para Jurkat. El tratamiento se adicionó 20 horas antes de la cosecha en cada uno de los dos sistemas celulares. El bloqueo mitótico se realizó agregando Colcemid (0.2µg/ml) 4 horas antes de la cosecha para las células CHO-K1 y 2 horas antes para las células Jurkat.

Finalmente se obtuvieron extendidos cromosómicos mediante la técnica de goteo en placa húmeda tratando las células con solución hipotónica de citrato de sodio al 0,7% y centrifugación a 2400 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se fijaron dos veces con una solución de metanol/ácido acético en proporción 3:1 y se gotearon en portaobjetos pre-lavados y pre-enfriados. La tinción de las células se realizó con Giemsa al 5% durante 10 minutos. Las placas obtenidas se observaron al microscopio con objetivo 100X y se contaron aproximadamente 100 células por tratamiento diferenciando ciclos en las células mitóticas en campos escogidos al azar y sin agregados celulares. El número de intercambios de cromátides hermanas (ICH) fueron contadas en metafases de segundo ciclo. Los resultados fueron expresados como la frecuencia de ICH por metafase.

- Ensayo cometa

El ensayo cometa o electroforesis en gel de células individuales es una técnica altamente sensible, rápida y económica que permitió evaluar el daño de cadena sencilla y doble del ADN a nivel de células individuales.

Para la evaluación del efecto genotóxico de las fracciones 5 y 6 de la esponja marina *I.biotulata* en los 2 sistemas celulares se emplearon cultivos en fase exponencial, los cuales fueron llevados a centrifugación a 2400rpm durante 5 minutos para su concentración, recuento y evaluación de viabilidad; posterior a ello se estimó un número de 10.000 y 100.000 células para Jurkat y CHO-K1 respectivamente que fueron transferidas a un tubo Eppendorf en un volumen final de 250  $\mu$ l incluyendo 50  $\mu$ l del tratamiento a las concentraciones medias halladas por azul de Tripano. El tratamiento se evaluó durante 6 horas manteniendo los cultivos bajo condiciones enunciadas en el numeral 2.1.3. Como control positivo se trataron los cultivos celulares con peróxido de Hidrógeno a una concentración de 50  $\mu$ M y como control solvente con hexano a una concentración < 1 %. Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento los cultivos fueron centrifugados nuevamente a 2400rpm por 5 minutos, el botón celular fue resuspendido en PBS y agarosa de bajo punto de fusión 5% (LMA) y servidas sobre láminas base preparadas previamente con agarosa de punto de fusión normal 1% (NMA). Las células embebidas en agarosa fueron sometidas a lisis entre 14 y 16 horas, a tratamientos con sales y sometidas a electroforesis horizontal en medio básico (pH 13) durante media hora a 25V y 300mA durante 20 minutos. Seguidamente, las placas fueron neutralizadas con una solución de tris al 0,05% en agua destilada y deshidratadas con metanol para su tinción con Bromuro de Etidio 0,02mg/ml. (Azqueta et al., 2011; García et al., 2011; Lee y Steinert, 2004; Singh y McCoy, 1988; Vadhana et al., 2011; Zhang LJ et al., 2011).

Los resultados fueron visualizados en microscopio de Fluorescencia (Carl Zeiss) con un aumento de 40X. Se capturaron imágenes con cámara Sony DSC-S85 para un total de campos al azar y un total de 100 células por tratamiento para su análisis usando el software Comet-Score®.

### 2.2.3 Evaluación del potencial efecto antiproliferativo

La función de acumulación permitió realizar una curva de índice mitótico durante un ciclo celular usando un bloqueo con antimitótico. El comportamiento de la pendiente de la curva permitió para detectar el alargamiento o acortamiento del tiempo de generación. (Punk y Steffen, 1963).

La función de acumulación se evaluó por duplicado usando cultivos en fase exponencial y que fueron tratados durante 20 horas con las fracciones 5 y 6 para las 2 líneas celulares CHO-K1 y Jurkat bajo las condiciones descritas en el numeral 2.1.3. una vez finalizado este periodo, los cultivos fueron lavados con medio RPMI 1640 (SIGMA) y renovados con medio suplementado con suero fetal bovino 5%. El índice mitótico fue evaluado induciendo un bloqueo con Colcemid 0,2 $\mu$ g/ml cada 2 horas durante un tiempo de generación correspondiente a 16 y 18 horas para CHO-K1 y Jurkat respectivamente y obteniendo extendidos cromosómicos usando la técnica de goteo en placa húmeda en la metodología de ICH.

La evaluación del índice mitótico se realizó en microscopio con objetivo de 40X contando 2000 células para cada tratamiento y tiempo de exposición al antimitótico en campos al azar y sin agregados celulares, diferenciando células en mitosis (M) de células

interfásicas. El índice mitótico (IM) se estimó como la relación porcentual entre las células mitóticas y células totales (mitóticas más interfásicas)

$$IM = \frac{\text{Células mitóticas}}{\text{Células Totales}} \times 100$$

Finalmente se graficó la función  $\text{Log}(1+IM)$  vs. Tiempo de exposición a Colcemid, para determinar la función de acumulación y efecto en el ciclo celular.

## 2.3 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los experimentos de viabilidad, proliferación celular, eficiencia de clonación, índice mitótico, Intercambio de Cromatides Hermanas y el ensayo cometa fueron tabulados, procesados y graficados en Excel, y analizados estadísticamente mediante el programa Statgraphics. Se aplicaron pruebas de regresión lineal, ANOVA de una vía y se midió el contraste entre los grupos evaluados con el test de Bonferroni para el ensayo cometa. El nivel de decisión de las pruebas de significancia fue 0.05.



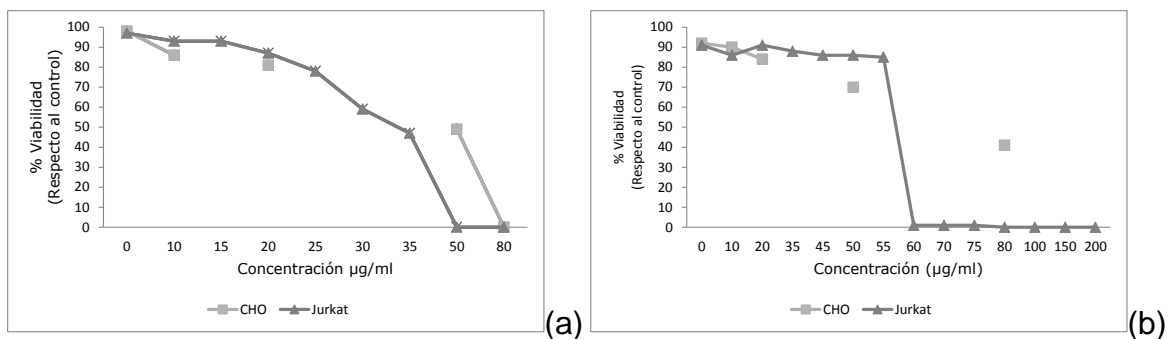
### 3 Resultados

#### 3.1 Pruebas de citotoxicidad

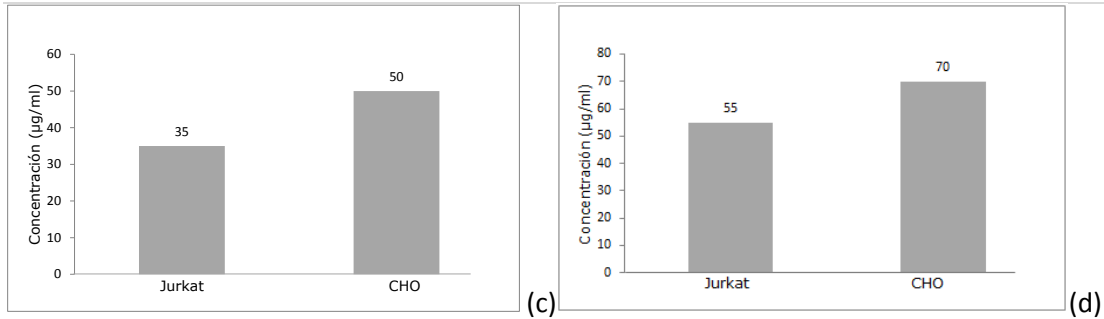
##### 3.1.1 Prueba de viabilidad con azul de Tripano

Los resultados mostraron que las fracciones 5 y 6 de la esponja marina *I. birotulata* con las células CHO-K1 disminuyeron la viabilidad a una dosis media de 50 µg/ml y 70 µg/ml respectivamente mientras que las células Jurkat tratadas con las mismas fracciones disminuyeron su viabilidad media con una dosis de 35 µg/ml y 55 µg/ml respectivamente (Figura 3-1).

Figura 3-1: Curvas de viabilidad mediante azul de Tripano en las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat, (a) tratadas con la fracción 5 y (b) la fracción 6. Viabilidad media de las fracciones 5 (c) y 6 (d).



16 | Evaluación de la actividad citotóxica, genotóxica y efecto sobre el ciclo celular de fracciones obtenidas a partir de la esponja marina *Iotrochota birotulata*



### 3.1.2 Prueba de citotoxicidad por el ensayo del MTT

Los resultados del MTT se graficaron como curvas de viabilidad para determinar la tendencia del efecto de las concentraciones de las fracciones 5 y 6 de la esponja marina *I. birotulata* sobre la línea celular CHO-K1 y Jurkat (Figura 3-2). Finalmente se determinaron las  $CI_{50}$  por la prueba estadística de regresión lineal con un nivel de significancia del 95% (Figura 3-3).

Figura 3-2: Curvas de viabilidad mediante MTT en las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat, (a) tratadas con la fracción 5 y (b) la fracción 6.

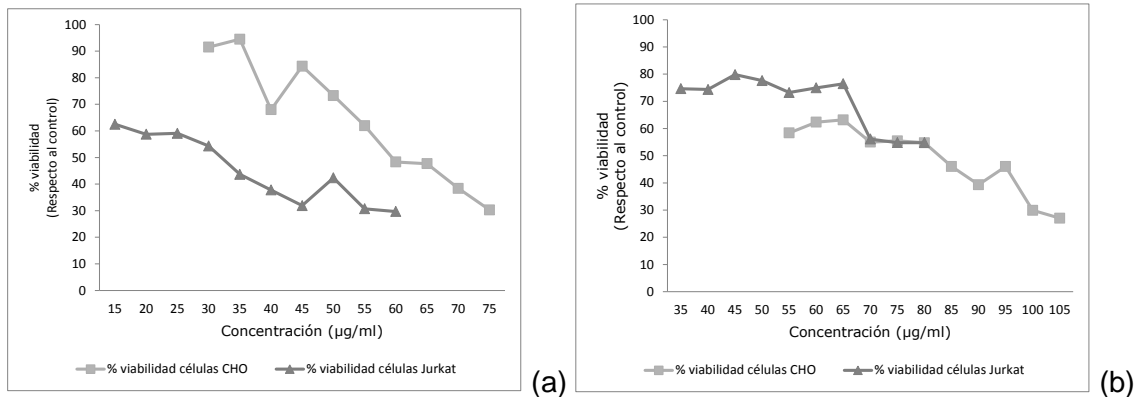
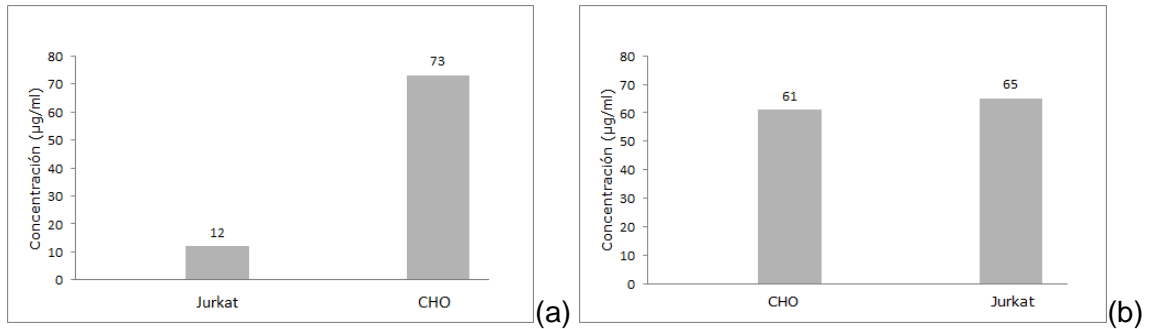


Figura 3-3: Citotoxicidad media ( $CI_{50}$ ) de las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat, (a) tratadas con la fracción 5 y (b) la fracción 6.



### 3.1.3 Eficiencia de clonación de células CHO-K1 y Jurkat

La figura 3-4 resume los resultados de la prueba de eficiencia de clonación relativa (ECR) obtenidas en células CHO-K1 tratadas durante 16 horas (Figura 3-5) y las Jurkat 18 horas (Figura 3-6) con las diferentes concentraciones de las fracciones 5 y 6 de la esponja marina *I. birotulata*.

Figura 3-4: Eficiencia de clonación relativa de las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat, (a) tratadas con la fracción 5 y (b) la fracción 6.

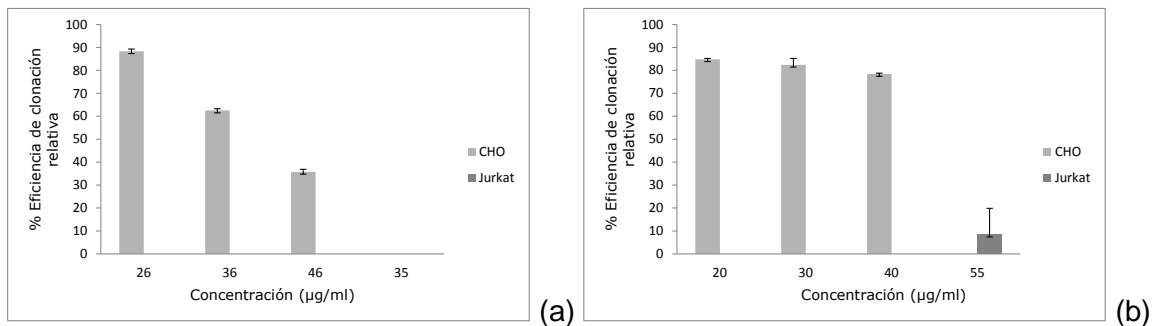
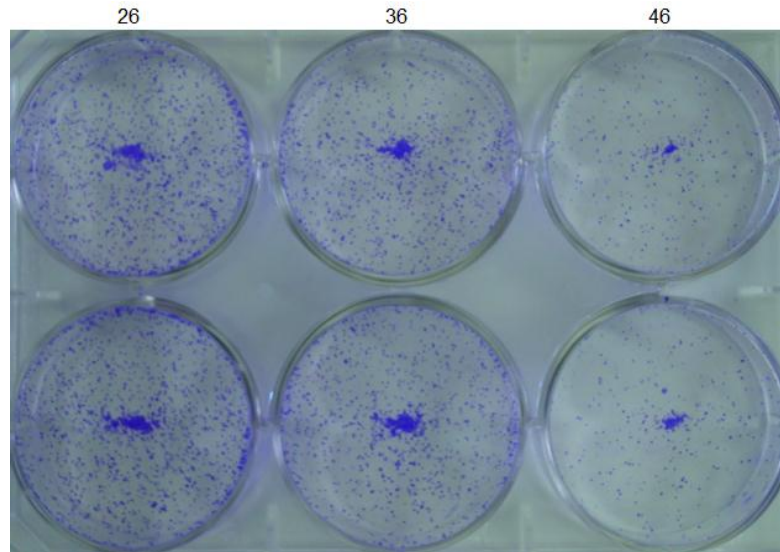
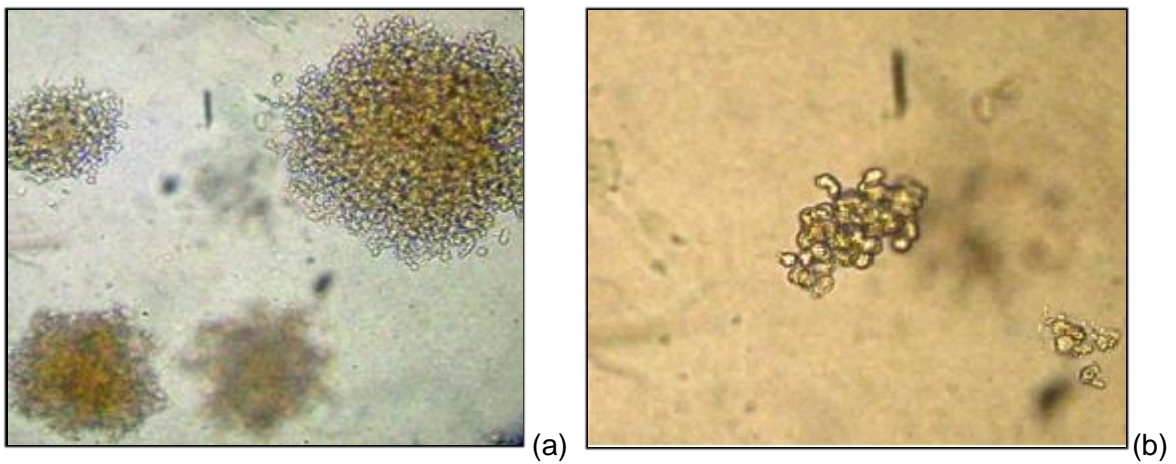


Figura 3-5: Eficiencia de clonación relativa de las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat, (a) tratadas con la fracción 5 y (b) la fracción 6



**Figura 3-6:** Eficiencia de clonación de células Jurkat. Diferencia entre una colonia del control negativo (a) y un grupo de células que no alcanzaron a formar una colonia al ser tratadas con una de las fracciones de la esponja marina *I. birotulata* (b)



## 3.2 Ensayos de genotoxicidad

### 3.2.1 Intercambio de cromátides hermanas en células CHO-K1 y Jurkat

La (Tabla 3-3) muestra en negrita el índice de intercambio entre cromátides hermanas como medida indirecta para evaluar el efecto genotóxico de las fracciones y el tiempo de generación en horas.

Tabla 3-3: Intercambio de cromátides hermanas (ICH), tiempo de generación en horas de las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat, (a) tratadas con la fracción 5 y (b) la fracción 6.

Tratamientos	Número de células mitóticas por ciclo												ICH 2do Ciclo		Tg (hrs)	
	0,5		1		1 <sup>1/2</sup>		2		2 <sup>1/2</sup>		≥ 3		CHO	Jurkat	CHO	Jurkat
	CHO	Jurkat	CHO	Jurkat	CHO	Jurkat	CHO	Jurkat	CHO	Jurkat	CHO	Jurkat	CHO	Jurkat	CHO	Jurkat
Control medio	0	0	4	0	3	33	89	27	2	0	2	23	<b>5.5</b>	<b>8.1</b>	18.2	35.7
Control hexano	0	0	4	0	4	20	87	20	3	0	2	14	<b>5.4</b>	<b>9.2</b>	18.2	35.7
Control MMC	0	0	0	15	0	9	35	23	0	0	8	1	<b>13.5</b>	<b>14.2</b>	16.4	37.2
5 (*36 y †6 µg/ml)	0	0	0	10	0	43	0	14	0	0	0	15	<b>0</b>	<b>12.9</b>	0	53.6
6 (*40 y †32 µg/ml)	0	24	1	0	1	66	39	22	1	0	2	0	<b>9.3</b>	<b>18.3</b>	17.2	75

\*Tratamiento línea celular CHO

† Tratamiento línea celular Jurkat

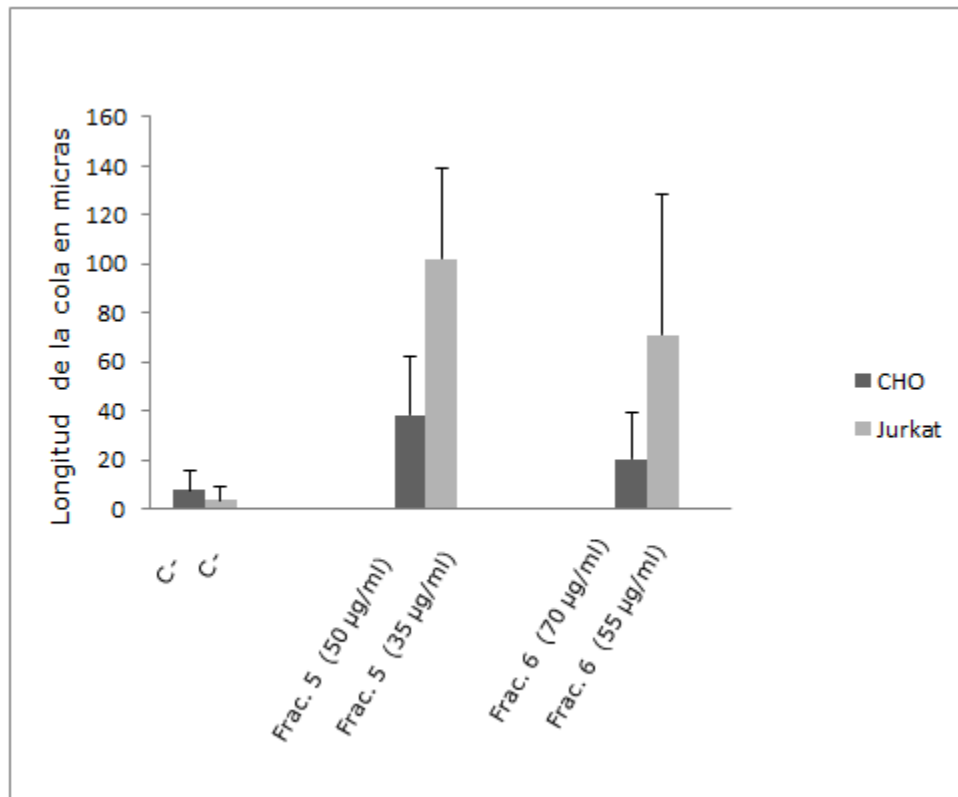
Figura 3-7: Intercambio de Cromátides hermanas en células CHO-K1



### 3.2.2 Ensayo cometa en células CHO-K1 y Jurkat

Mediante el programa Statgraphics® se midió la variabilidad entre grupos de tratamientos y su control negativo mediante una ANOVA de una vía con una confiabilidad del 99% ( $p < 0.01$ ) y el test de Bonferroni fue utilizado para medir el contraste entre los grupos evaluados dando como resultado una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos y el control negativo como se puede observar en la figura 3-8.

Figura 3-8: Efecto genotóxico de las fracciones 5 y 6 mediante el ensayo cometa en células CHO-K1 y Jurkat (estadísticamente significativo respecto al control)



### 3.3 Efecto sobre el ciclo celular

#### 3.3.1 Función de acumulación en células CHO-K1 y Jurkat

La figura 5 muestra los resultados para determinar el efecto en el ciclo celular de las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat tratadas 16 y 18 horas respectivamente, la figura 4 (a) y (b) muestra que no hay diferencia significativa en el índice mitótico (IM) del control solvente respecto al control negativo, mientras las fracciones 5 y 6 de la esponja marina *I. birotulata* demuestran en la línea celular CHO-K1 y Jurkat una disminución del (IM)

presentándose un alargamiento en el ciclo celular, afectando citostáticamente a las células CHO-K1 en el inicio de la fase de síntesis, mientras que, a las células Jurkat la fracción 5 y 6 afectaron citostáticamente en la fase de síntesis, presentándose una diferencia así; la fracción 5 mostró un efecto marcado en la mitad de la fase mientras que la fracción 6 mostró su efecto al inicio de la fase.

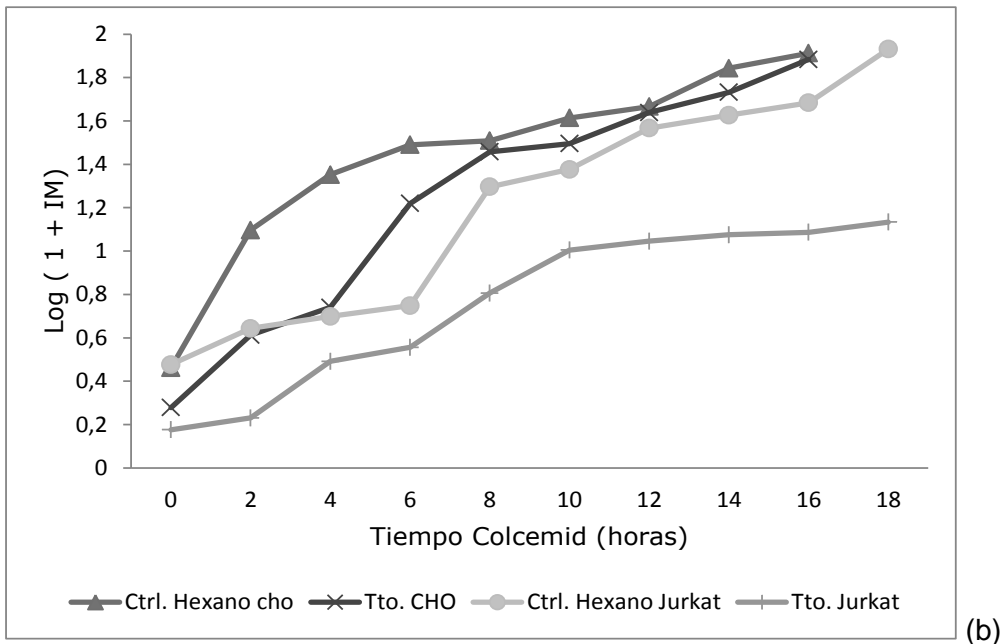
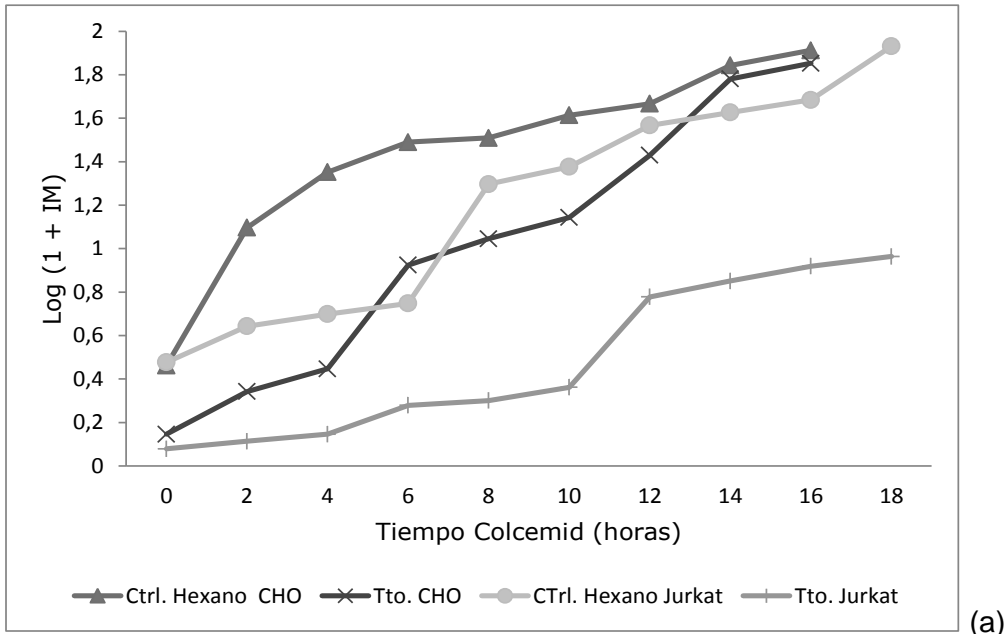


Figura 3-9: Función de acumulación de las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat, (a) tratadas con la fracción 5 y (b) la fracción 6.

Nota: todos los experimentos realizados fueron hechos sin activación metabólica.





## 4 Discusión

### 4.1 Citotoxicidad

Mediante la exclusión vital del colorante azul de Tripano se encontró que la fracción 5 tiene una disminución de la viabilidad media de 50  $\mu\text{g/ml}$  y 35  $\mu\text{g/ml}$  sobre las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat respectivamente y la fracción 6 posee una disminución de la viabilidad media a concentraciones de 70  $\mu\text{g/ml}$  y 55  $\mu\text{g/ml}$  sobre las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat. Se encontró un mayor efecto citotóxico sobre la línea celular Jurkat y una mayor actividad de la fracción 5, y que corresponden a los resultados encontrados por (Márquez et al., 2011) donde se evidencia una mayor actividad citotóxica de la fracción 5 en comparación con la fracción 6.

El ensayo del MTT evidenció que la fracción 5 tiene una citotoxicidad media ( $IC_{50}$ ) de 73  $\mu\text{g/ml}$  y 12  $\mu\text{g/ml}$  sobre las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat y la fracción 6 posee una  $CI_{50}$  de 61  $\mu\text{g/ml}$  y 65  $\mu\text{g/ml}$  sobre las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat correspondientemente, estos resultados confirman el efecto citotóxica encontrada mediante la exclusión vital del azul de tripano.

Los resultados obtenidos mediante eficiencia de clonación demuestran una reducción en la formación de colonias sobre la línea celular CHO-K1 con una ECA del 77, 54.4 y 29.4% y una ECR del 88.3, 62.4 y 33.7% al ser tratadas con la fracción 5 en concentraciones del 26, 36 y 46  $\mu\text{g/ml}$  y en la fracción 6 una ECA del 74, 71.8, 68.4% y una ECR del 84.9, 82.3 y 78.4 % en concentraciones de 20, 30 y 40  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente demostrándose una citotoxicidad dosis dependiente y confirmándose lo encontrado por (Márquez et al., 2011) superior en la fracción 5. Sobre la línea celular Jurkat al ser tratada con la fracción 5 se evidenció una reducción en la ECA de 0% y la ECR de 0% en la concentración de 35 $\mu\text{g/ml}$ . Para la fracción 6 redujo la ECA al 7.7% y la ECR a 8.4% en la concentración de 55 $\mu\text{g/ml}$ . Estos resultados confirman los encontrados por la exclusión de colorante vital azul de tripano y los hallados por (Márquez et al., 2011) donde la fracción 5 tiene una mayor actividad biológica que la fracción 6. Al correlacionar esta batería de pruebas para la actividad citotóxica los resultados demuestran una mayor actividad de la fracción 5 que la 6 y un mayor efecto sobre la línea celular Jurkat con relación a la línea celular CHO-K1.

## 4.2 Genotoxicidad

Mediante el ensayo de ICH sobre la línea celular CHO-K1 a una concentración de 40 µg/ml de la fracción 6 se observó una disminución del tiempo de generación que no es significativo, de igual manera se encontró un aumento en el número de ICH que no es estadísticamente significativo con respecto al control negativo. Para las células Jurkat las fracciones 5 y 6 a concentraciones de 6 µg/ml y 32 µg/ml respectivamente se encontró un aumento en el tiempo de generación siendo mayor el causado por la fracción 6 de igual manera se observó un aumento no significativo en el número de ICH.

El ensayo cometa reveló el efecto genotóxico agudo de la fracción 5 y 6 en las concentraciones de viabilidad media para la línea celular CHO-K1 y Jurkat; para ambas líneas se encontró mediante el análisis de varianza a una vía una y el test de Bonferroni una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo y entre la fracción 5 y 6 siendo la fracción 5 más genotóxica.

## 4.3 Efecto sobre el ciclo celular

Los resultados obtenidos mediante la función de acumulación muestran que la mitad de la  $CI_{50}$  de las fracciones 5 y 6 de la esponja marina *I. birotulata* disminuyen la pendiente de la línea recta lo cual significa un alargamiento en el ciclo celular con respecto al control negativo y el control solvente sobre la línea celular CHO-K1.

De acuerdo al comportamiento de la curva de función de acumulación se puede inferir que la fracción 5 y 6 afectaron citostáticamente la línea celular CHO-K1 en el inicio de la fase de síntesis.

Las células Jurkat presentaron una disminución en el índice mitótico al ser tratadas con las fracciones 5 y 6 demostrando un alargamiento del ciclo celular con respecto al control negativo y el control solvente. La fracción 5 y 6 afectaron citostáticamente la línea celular Jurkat en la fase de síntesis, la fracción 5 mostró un efecto marcado en la mitad de la fase mientras que la fracción 6 mostró su efecto al inicio de la fase.

Los resultados obtenidos de esta investigación nos llevan a sospechar que en las fracciones 5 y 6 de la esponja marina *I. birotulata* se encuentran moléculas que retrasan o detienen el crecimiento y la supervivencia celular.

# 5 Conclusiones y recomendaciones

## 5.1 Conclusiones

El presente estudio contribuye al conocimiento de la citotoxicidad, genotoxicidad y efecto sobre el ciclo celular de las fracciones 5 y 6 de la esponja marina *I. birotulata* sobre las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat.

Se encontró una mayor actividad biológica sobre la línea celular Jurkat en los ensayos de citotoxicidad, genotoxicidad y efecto sobre el ciclo celular mostrando un efecto diferente sobre el tipo de línea celular; resultado que amplía la posibilidad para postular los compuestos presentes en las fracciones como bases para el desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos.

La fracción 5 fue más activa que la 6 para los ensayos de citotoxicidad, genotoxicidad y efecto sobre el ciclo celular mostrando una actividad dosis dependiente quizás al método de obtención y los compuestos presentes en esta.

Las técnicas usadas permitieron llevar a cabalidad el cumplimiento de los objetivos planteados dadas su sensibilidad. El uso de estas técnicas contribuyó al establecimiento de protocolos de investigación y experiencia necesaria para la realización de futuras investigaciones que pretendan evaluar productos naturales con posible uso farmacéutico y/o terapéutico.

Este trabajo amplía el conocimiento de los recursos marinos colombianos y muestra la posibilidad de crecimiento en la bioprospección de sustancias con potencial biotecnológico y económico; a la vez que contribuye a la caracterización biológica de las especies dándoles un valor agregado.

## 5.2 Recomendaciones

Se recomienda para mayor asertividad del efecto biológico de las fracciones evaluadas llevar a cabo más técnicas que contemplen el empleo de otros biomarcadores tales como la citometría de flujo, indicadores de necrosis y apoptosis y el uso de otros sistemas tanto *in vitro* como *in vivo*, de modo tal que se evalúen sistemas como linfocitos de sangre periférica entre otros

Dado que los organismos marinos constituyen una fuente importante de sustancias bioactivas con estructuras novedosas y con propiedades biológicas y farmacológicas potenciales se recomienda caracterizar sus compuestos puros y sus análogos para plantear posibles procesos de biosíntesis y/o cultivos celulares de estos organismos de forma tal que se proteja la biodiversidad y que la búsqueda de moléculas con actividad biológica y de uso terapéutico se haga sustentable para obtener su máximo beneficio.

## Bibliografía

AIUB C, FERREIRA F, MAZZEI J, STANKEVICINS L, LOBO-HADJU G, GUIMARAES P et al. Genotoxic evaluation of extracts from *Aplysina fulva*, a Brazilian marine sponge. *Mutation Research*. 2006; 34-41

AZQUETA A, GUTZKOW KB, BRUNBORG G, COLLINS AR. Towards a more reliable comet assay: Optimising Agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. *Mutation Research*. 2011; 724: 41–45

BARLOTTA S, SCUTRI M, HICK A, PALERMO J, RODRIGUZ M, HAJDU E et al. Evaluation of genotoxic biomarkers in extracts of marine sponges from Argentinean South Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 2009; 144-147

BELARBI EH, CONTRERAS A, CHIST YI, GARCÍA F, MOLINA E. Producing drugs from marine sponges. *Biotechnology Advances*. 2003; 21: 585–598

BERGQUIST PR, and WELLS RJ. *Marine Natural Products*. Academic Press. 1983; 5: 1-50

BOHLIN L, GÖRANSSON U, ALSMARK C, WEDÉN C, BACKLUND A. Natural products in modern life science. *Phytochemistry Reviews*. 2010; 9; 2: 279-301

BLUNT J, COPP B, MUNRO M, NORTICOTE P, PRINSEP M. *Marine natural products*. *Natural Products Reports*. 2008; 23-78

BROWN JW, CAPPELL S, PEREZ-STABLE C, FISHMAN L. Extracts from two marine sponges lower cyclin B1 levels, cause a G2/M cell cycle block and trigger apoptosis in SW-13 human adrenal carcinoma cells. *Toxicol*. 2004; 43: 841–846

BROWN JW, KESLER CT, NEARY JT, FISHMAN LM. Effects of marine sponge extracts on mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK<sub>1,2</sub>) activity in SW-13 human adrenal carcinoma cells. *Toxicol* 2001; 39: 1835-1839

BLUNT JW, COPP BR, WAN-PING HU, MUNRO HG, PETER T., NORTHCOTE PT et al. *Marine natural products*. *Nat. Prod. Rep.* 2007; 24- 31

CARBALLEIRA NM, PAGN M. Identification and total synthesis of a novel dimethylated fatty acid from the caribbean sponge *Calyx podatypa*. *Jurnal natural products*. 2000; 63 (5): 666-669

COSTANTINO V, FATTORUSSO E, MANGONI A. Three new brominated and iodinated tyrosine derivatives from *Iotrochota birotulata*, a non-verongida sponge. *Journal of Natural Products*. 1994; 57: 1552-1556

CONSTANTINO V, DELL'AVERSANO C, FATTORUSSO E, MANGONI A. Ecdysteroids from the Caribbean sponge *Iotrochota birotulata*. *Steroids* 2000; 56: 5953-5957

DOYEN A, BEAULIEU L, SAUCIER L, POULIOT Y, BAZINET L. Demonstration of in vitro anticancer properties of peptide fractions from a snowcrab by-products hydrolysate after separation by electro dialysis with ultrafiltration membranes. *Separation and Purification Technology*. 2011; 1-9

FEDERICO C, MOTTA S, PALMIERI C, PAPPALARDO M, LIBRANDO V, SACCONI S. Phenylurea herbicides induce cytogenetic effects in Chinese hamster cell lines. *Mutation Research*. 2011; 721: 89-94

GALEANO E, MARTÍNEZ A. Antimicrobial activity of marine sponges from Urabá Gulf, Colombian Caribbean región. *Journal de Mycologie Médicale*. 2007; 17: 21-24

GARCÍA O, ROMERO I, GONZÁLEZ JE, MORENO DL, CUÉTARA E, RIVERO Y. Visual estimation of the percentage of DNA in the tail in the comet assay: Evaluation of different approaches in an intercomparison exercise. *Mutation Research*. 2011; 720: 14-21

GONZÁLES NV, SOLONESKI S, LARRAMENDY ML. The clorophenoxy herbicide dicamba and its comercial formulation banvel induce genotoxicity and cytotoxicity in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Mutation Reserch*. 2007; 634: 60-68

HOOPER JNA. Et al. Chemotaxonomy of Marine Sponges: Microcionidae, Raspailidae and Axinellidae, and their relationships with other families in the orders Poecilosclerida and Axinellida (Porifera: Demospongiae). *Invertebr. Taxon*. 1992; 6: 261-301

JIANG S, LI X, ZHANG L, SUN W, DAI S, XIE L, LIU Y, LEE KJ. Culturable actinobacteria isolated from marine sponge *Iotrochota* sp. *Mar Biol*. 2008; 153: 945-952

KHABOUR OF, ALSATARI ES, AZAB M, ALZOUBI KH, SADIQ MF. Assessment of Genotoxicity of Waterpipe and Cigarette Smoking in Lynphocytes Using the Sister-Chromatid Exchange Assay: A Comparative Study. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2011; 52: 224-228

LEE RF, STEINERT S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detection DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation research*. 2004; 544: 43-64

LI LY, DENG ZW, FU HZ, LI J, LIN WH, PROKSCH P. 6-Hydroxy-4-en-3-one sterols from the marine sponge *Iotrochota birotulata*. *Journal of Asian Natural Products Research*. 2005; 72: 115-120

LUTER HM, DUCKWORTH AR, SYMS C. Cytotoxic and anti-microbial activity of the sponge *Iotrochota* sp. as a function of size and spatial competitors. *Marine Biology Research*. 2007; 3: 312-318

MÁRQUEZ DM, MÁRQUEZ ME, MARTÍNEZ A, THOMAS OP. Isolation of a Bromotyrosine Derivative Compound of a Bioactive Fraction from the Marine Sponge *Iotrochota birotulata* from the Urabá Gulf (Colombia). *Latin American Journal of Pharmacy*. 2011; 30 (2): 392-396

MAYER AM, RODRÍGUEZ AD, BERLINCK RG, FUSETANI N. Marine pharmacology in 2007–8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2011; 153: 191–222

OVADJE P, CHATTERJEE S, GRIFFIN C, TRAN C, HAMM C, PANDEY S. Selective induction of apoptosis through activation of caspase-8 in human leukemia cells (Jurkat) by dandelion root extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011; 133: 86–91

PARK HS, JUN DY, HAN CR, WOO HJ, KIM YH. Proteasome inhibitor MG132-induced apoptosis via ER stress-mediated apoptotic pathway and its potentiation by protein tyrosine kinase p56<sup>lck</sup> in human Jurkat t cells. *Biochemical Pharmacology*. 2011; 82: 1110–1125

PEDPRADAB P, MOLEX W, NUKOOLKARN V, DARUMAS U. Biological activities of the extracts from the Andaman Sea sponges, Thailand. *EurAsia J BioSci*. 2010; 4 (8): 63-69

PUNK TT, STEFFEN J. Life cycle analysis of mammalian cells I. A method for localizing metabolic events within the life cycle, and its application to the action of colcemid and sublethal doses of x-irradiation. *Biophysical Journal*. 1963; 3: 379-397.

RODRIGUEZ W, OSORNO O, RAMOS F, DUQUE C, ZEA S. New Fatty Acids from Colombian Caribbean Sea Sponges. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2010: 1-10

SALMA Y, LAFONT E, THERVILLE N, CARPENTIER S, BONNAFE MJ, LEVADE T, et al. The natural marine anhydrophytosphingosine, Jaspine B, induces apoptosis in melanoma cells by interfering with ceramide metabolism. *Biochemical Pharmacology* 2009; 78: 477–485

SINGH NP, MCCOY MT. A simple technique for quantization of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res*. 1988; 175: 184–189

SOLONESKI S, LARRAMENDY ML. Sister chromatid exchanges and Chromosomal aberrations in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells treated with the insecticide pirimicarb. *Journal of Hazardous Materials*. 2010; 174: 410-415

VADHANA MSD, CARLONI M, NASUTI C, FEDELI D, GABBIANELLI R. Early life permethrin insecticide treatment leads to heart damage in adult rats. *Experimental Gerontology*. 2011; 46: 731-738

UMAR-TSAFE N, MOHAMED-SAID MS, ROSLI R, DIN LB, LAI LC. Genotoxicity of goniiothalamine in CHO cell line. *Mutation Research*. 2004; 562: 91–102

VALLE H, OSPINA S, GALEANO E, MARTÍNEZ A, MÁRQUEZ M Y LÓPEZ J. Obtención de una fracción antimetabólica del extracto etanólico de la macroalga *Digenia simplex*. *Bol. Invest. Mar. Cost* 2009; 38 (2): ISSN 0122-9761.

WEI X, RODRIGUEZ AD, WANG Y, FRANZBLAU SG. Novel ring B abeoosterols as growth inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from a Caribbean Sea sponge, *Svenzea zeai*. *Tetrahedron Letters*. 2007; 48: 8851–8854

WULFF JL. Rapid diversity and abundance decline in a Caribbean coral reef sponge community. *Biological conservation*. 2006; 127: 167–176

ZABALA DA, ECHAVARRÍA B, MARTÍNEZ A. Actividad inhibitoria sobre la enzima dihidrofolato reductasa de extractos de esponjas marinas del Golfo de Urabá. *Vitae, Revista de la facultad de química farmacéutica*. 2008; 15 (2): 285-289

ZHANG LJ, JIA JF, HAO JG, CEN JR, LI TK. A modified protocol for the comet assay allowing the processing of multiple samples. *Mutation Research*. 2011; 721: 153–156