

Efecto Citotóxico y Clastogénico en Linfocitos Humanos de la Fracción de 5 α , 8 α - Epidioxiesteros de la Esponja Marina *Ircinia campana* del Caribe Colombiano

Catherine GONZÁLEZ ¹, Andrés PAREJA ², María Elena MÁRQUEZ ^{2*},
Diana M. MÁRQUEZ ³, Alejandro MARTÍNEZ ³ & Elkin HIGUITA ³

¹ Colegio Mayor de Antioquia. Calle 65 N° 77-126, Antioquia, Medellín, Colombia

² Grupo de Biotecnología Animal, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Calle 59 No. 63-20, Medellín, Colombia.

³ Grupo de Productos Naturales Marinos, Facultad de Química Farmacéutica,
Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

RESUMEN. En este trabajo se evaluaron los efectos citotóxico y clastogénico, con colorante vital azul de tripano y mediante el ensayo cometa, respectivamente, de la fracción de 5 α , 8 α -epidioxiesteros obtenida de la esponja marina, *Ircinia campana* (clase Demospongia) colectada en el Caribe Colombiano. Se evaluaron tres concentraciones 422,5, 42,25 y 4,22 mg/mL de la fracción extraída por métodos fisicoquímicos, para determinar su potencial efecto citotóxico y clastogénico sobre los linfocitos de sangre periférica humana. Los resultados revelaron que las concentraciones 422,5 mg/mL y 42,2 mg/mL fueron citotóxicas, mientras que la concentración 4,22 mg/mL no mostró efecto citotóxico sobre los linfocitos. El análisis estadístico de la cuantificación de los cometas obtenidos reveló que las dos concentraciones mayores evaluadas (422,5 mg/mL y 42,25 mg/mL) para la fracción de 5 α , 8 α -epidioxiesteros mostraron efecto genotóxico en linfocitos humanos de sangre periférica, mientras que la concentración menor evaluada (4,22 mg/mL) no mostró el mismo efecto. Esto sugiere que el daño ocasionado por esta fracción es dependiente de la dosis y que además se deben realizar otras pruebas mutagénicas y sobre el ciclo celular con el fin de complementar la batería de pruebas requeridas para una sustancia con potencial farmacéutico, sobre las mismas células comparados con los respectivos controles.

SUMMARY. "Cytotoxic and Clastogenic Effects on Human Lymphocytes of the Fraction 5 α , 8 α -epidioxyterols of the Marine Sponge *Ircinia campana* of Colombian Caribbean". Clastogenic and cytotoxic effects of the fraction of 5 α , 8 α -epidioxyterols of the marine sponge *Ircinia campana* (class Demospongia) collected in the Colombian Caribbean, by comet and exclusion assays with the pigment tripane blue, respectively, was evaluated. Three concentrations: 422.5 mg/mL, 42.25 mg/mL y 4.22 mg / mL of the fraction extracted with physico-chemical methods was evaluated for determine its effect on the lymphocytes of human periferic blood. The results showed that the highest concentrations, 422.5 mg/mL and 42.25 mg/mL were cytotoxic, while what the concentration 4.22 mg/mL did not show genotoxic effect on the lymphocytes. The statistic analysis of the quantification of comets showed that the higher concentrations evaluated (422.5 mg/mL y 42.25 mg/mL) for the fraction of 5 μ , 8 μ -epidioxyterols showed genotoxic effects on human lymphocytes of periferic blood, while the lower concentration evaluated (4.22 mg/mL), did not show the same effect. This result suggests this fraction owe to be evaluated with other mutagenic assays and on the cellular cycle tests for achieve more complete information about its potential pharmaceutical use.

INTRODUCCION

La búsqueda de nuevos productos naturales con potencial farmacológico ha aumentado debido a que se han extendido las investigaciones con el fin de aislar un mayor número de compuestos que puedan combatir una gran variedad de enfermedades y que sirvan como base para la síntesis de nuevos fármacos. Uno de esos productos es la fracción de 5 α , 8 α -epidioxieste-

roles obtenida de diferentes organismos marinos la cual contiene una mezcla de esteroides extraídos de esponjas de los géneros *Axinyssa* e *Ircinia* ¹⁻³, de microalgas como la *Odontella aurita* ⁴, de tunicados como *Cinthisa savignyi* ⁵, del coral blando *Sinularia sp.* ⁶, y de otros invertebrados marinos. En el caso de los compuestos de la esponja *Ircinia campana*, éstos han mostrado tener actividad antiparasitaria contra *Leishmania*

PALABRAS CLAVE: *Ircinia campana*, Citotóxico, Clastogénico
KEY WORDS: *Ircinia campana*, Clastogenic, Cytotoxic.

* Autor a quien dirigir la correspondencia: E-mail: memarque@unalmed.edu.co

*panamensis*² y se ha reportado que otros compuestos con este núcleo esteroidal han presentado actividad antibacteriana contra algunos microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos (*Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*), actividad antimicótica contra algunos patógenos del tomate (*Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Verticillium albo atrum*)⁵, actividad citotóxica contra diferentes líneas celulares del cáncer, tales como células P-388 derivadas de leucemia linfocítica en ratones, KB derivadas de carcinoma nasofaríngeo en humanos, líneas AS49 y HT29⁶. Además poseen un fuerte efecto inhibitorio en líneas celulares humanas derivadas de cáncer de ovario (OVCAR-3, 4, 5 y 8) al igual que en otras 21 líneas¹. Por otro lado, ha mostrado actividad repelente contra *Mytilus edulis galloprovincialis*⁷.

Teniendo en cuenta el gran 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. 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, entre otros, requeridos para la evaluación y aceptación internacional de fármacos⁸. Por esta razón, se seleccionó el ensayo cometa para evaluación del daño clastogénico del ADN ocasionado por agentes físicos o químicos, mediante la detección de los quiebres de cadena sencilla y los sitios lábiles al alcali⁹, que permiten evaluar genotoxicidad en los compuestos que se pretenden utilizar como drogas para uso humano^{8,10}.

Por otro lado, se ha reportado que los compuestos estrogénicos se difunden a través de la membrana celular, se conjugan con proteínas en el citoplasma, pasan a través del poro nuclear y forman complejos estrógenos-ADN, los cuales en concentraciones altas pueden inducir la formación de aductos, fragmentación de ADN y alterar muchos procesos celulares incluyendo la síntesis enzimática¹¹, así como se ha reportado daño a nivel de la cadena sencilla en células de hígado y próstata de roedores, generados por los radicales libres y metabolitos, derivados del estradiol. Además se ha reportado de manera permanente que los catecolestrógenos y las hi-

droquinonas pueden oxidarse a quinonas y semiquinonas, respectivamente, produciendo especies reactivas que causan daño al ADN¹² y la consecuente generación de sitiosapurínicos¹³.

También se ha informado que las variaciones del número de cromosomas (aneuploidías o mutaciones genómicas), pueden ser inducidas por el 17 β -estradiol¹⁴ y otros estrógenos en células en cultivo^{15,16} o en animales de laboratorio¹⁷⁻¹⁹ y se ha mostrado que en altas concentraciones los estrógenos detienen la metafase causando divisiones celulares anormales y aneuploidías, por lo cual se ha planteado que el mecanismo de acción es similar al del colcemid y la colchicina, inductores de aneuploidías²¹⁻²².

El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial citotóxico con colorante vital azul de tripano y el efecto clastogénico mediante el ensayo cometa en linfocitos humanos, de la fracción 5 α , 8 α -epidioxiesteroides obtenida de la esponja *Ircinia campana* colectada en el Caribe Colombiano, la cual en un reporte anterior demostró poseer actividad antiparasitaria².

MATERIALES Y METODOS

Recolección de la Esponja

La esponja *Ircinia campana* fue identificada y recolectada en Punta Betín, Santa Marta, a una profundidad de 6-12 metros, por el Dr. Sven Zea, profesor de la Universidad Nacional de Colombia y miembro de INVEMAR. Una muestra del espécimen se dejó en la colección de esponjas de INVEMAR.

Extracción de la Fracción de Esteroides

La esponja fue cortada en trozos pequeños, liofilizada y después molida (198,5 g). El material seco y molido fue extraído exhaustivamente con metanol. El extracto metanólico se secó a una temperatura no mayor a 45 °C con presión reducida y rotación constante. El residuo seco fue reextraído con acetato de etilo y la fracción de esteroides separada y purificada con cromatografía en capa fina y cromatografía de columna repetidas, utilizando sílica gel como fase estacionaria y n-hexano: acetato de etilo en proporción 2:1 como fase móvil. La fracción de esteroides pesó 58,45 mg.

Oxidación de la Fracción de Esteroides

La fracción de esteroides purificada (58,45 mg) se disolvió en cloroformo grado reactivo y fue sometida a un reflujo con luz directa de una lámpara de 100 watts y agitación constante durante 24 h, durante las cuales se chequeó el

avance de la reacción con cromatografía en capa fina usando las mismas condiciones antes mencionadas y comparando contra una muestra de esteroides sin oxidar. La formación de los 5α , 8α -epidioxiesteroides se determinó por la observación por cromatografía en capa fina (eluyente n-hexano: acetato de etilo 2:1) de una mancha de $R_f = 0,23$, es decir de menor R_f que la correspondiente a la fracción de esteroides de la esponja ($R_f = 0,60$). Además se confirmó que se habían formado los 5α , 8α -epidioxiesteroides mediante la determinación del espectro RMN- 1H (300 MHz, en $CDCl_3$) de la fracción de $R_f = 0,23$, purificada mediante una cromatografía en columna (sílica gel, n-hexano: acetato de etilo 2:1). La fracción de 5α , 8α -epidioxiesteroides pesó 45,46 mg.

Obtención y Aislamiento de Linfocitos

A partir de muestras de sangre humana periférica heparinizada obtenida de donadores saludables, se aislaron los linfocitos utilizando el método de separación por densidades con Hystopaque-1077 (Sigma) como se describe: inicialmente, la sangre se centrifugó a 1500 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y resuspendió en PBS en proporción 1:1. Nuevamente se adicionaron 3 ml de Hystopaque-1077, se centrifugó a 2000 rpm por 30 min y finalmente se realizaron dos lavados con la misma solución salina y las células se resuspendieron en 2 ml de PBS.

Prueba de Citotoxicidad

Se utilizó la prueba de exclusión con el colorante azul de tripano al 0,1% después del tratamiento con la fracción de epidioxiesteroides. Se observaron y contabilizaron al microscopio 100 células y se determinó el porcentaje de viabilidad mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células muertas} \times 100}{\text{Total de células contadas}}$$

Prueba de Clastogenicidad

Las suspensiones celulares de linfocitos purificados fueron tratadas a $37,5^\circ C$ durante 30 min con 3 concentraciones finales (422,5 mg / mL, 42,25 mg / mL y 4,22 mg / mL) de la fracción de epidioxiesteroides de la esponja *Ircinia campana*. Cada una de las concentraciones evaluadas, fueron obtenidas por diluciones de 10 a partir de la concentración inicial de 422,5 mg / mL de la mezcla de epidioxiesteroides. En cada experimento se incluyeron controles negativo (10 μL de metanol) y positivo (peróxido de hidrógeno al 30%).

Para evaluar el potencial clastogénico de la fracción de epidioxiesteroides se utilizaron suspensiones de 2×10^5 células / mL en agarosa de bajo punto de fusión (0,5% PBS libre de Ca^{++} , Mg^{++}) en portaobjetos pretratados con 100 μL de agarosa de punto de fusión normal (0,5% PBS libre de Ca^{++} , Mg^{++}). Después de 6 min a $4^\circ C$, los portaobjetos colocados en solución de lisis (2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 10 mM Tris-HCL 10% DMSO 1% de Triton X 100) pH 10, por 60 min a $4^\circ C$. Luego fueron incubadas en buffer de electroforesis (0,3 M NaOH, 200 mM EDTA 1mM, pH = 13) por 30 min completa oscuridad a $4^\circ C$ y después de lo cual se realizó el corrido electroforético durante 30 min a 25V y 300 mA. Las placas fueron lavadas con buffer neutralizante (0,4 M Tris-HCL; pH = 7,5), coloreadas con bromuro de etidio, y visualizadas en un microscopio Olympus provisto por un sistema de fluorescencia y fotografiadas con una cámara digital Pixera modelo VCS 10132. Finalmente, se cuantificó el daño de ADN ²² con el programa CASP (Commet Assay Software Project) disponible en internet en la dirección <http://www.casp.of.pl> por medio de las variables: longitud del cometa (Comet Length CL = longitud cola + longitud cabeza) y el momento de la cola Olive (Olive Tail Moment, OTM = distancia (centro gravedad cabeza-centro de gravedad cola)/% de DNA cola). El análisis estadístico se realizó con la prueba ANOVA y la de múltiples rangos.

RESULTADOS

En la obtención de la fracción de $5\alpha,8\alpha$ -epidioxiesteroides, se demuestra que los esteroides naturales de la esponja *Ircinia campana* se pueden oxidar fácilmente a los correspondientes $5\alpha,8\alpha$ -epidioxiesteroides. Este cambio se hace evidente, pues los esteroides originales absorben luz UV de 254 nm, debido a que se trata de esteroides con un sistema dieno 5,7 conjugado ²⁻³, y presentan R_f más alto que los $5\alpha,8\alpha$ -epidioxiesteroides. En cambio, los $5\alpha,8\alpha$ -epidioxiesteroides no absorben luz UV porque no poseen enlaces dobles conjugados ni otros grupos cromóforos. La confirmación de que efectivamente son convertidos los esteroides naturales de *Ircinia campana* en $5\alpha,8\alpha$ -epidioxiesteroides, la proporcióna el análisis del espectro de RMN- 1H . El espectro muestra dos señales doblete centradas en 6,21 y 6,48 ppm (J 8,5 Hz), las cuales son características de los protones olefinicos H-6 y H-7 de los $5\alpha,8\alpha$ -epidioxiesteroides ².

Los resultados de la prueba de citotoxicidad para la fracción de los $5\alpha,8\alpha$ -epidioxiesteroides (Fig. 1) mostraron que las concentraciones ma-

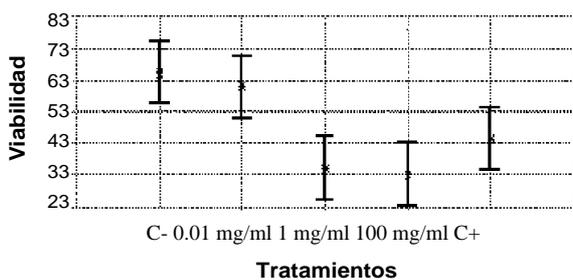


Figura 1. Evaluación citotóxica de tres concentraciones de 5α , 8α -epidioxiesteroles. Se muestran los tratamientos: 1. Control negativo con metanol puro. 2. C1 = 4,22 mg / mL, 3. C2 = 42,25 mg / mL, 4. C3= 422,25 mg / mL, 5. Control positivo (100 μ g / mL de peróxido de hidrógeno).

yor e intermedia (422,5 mg / mL, 42,25 mg / mL) fueron más citotóxicas que su respectivo control positivo, mientras que la concentración menor 4,22 mg / mL evaluada no mostró efecto citotóxico comparado con el respectivo control negativo.

Los resultados obtenidos mediante el ensayo cometa (Fig. 2) mostraron que la concentración más alta evaluada (422,5 mg / mL) equivalente al 100%, presenta mayor espectro clastogénico que su respectivo control positivo, mientras que la concentración menor (4,22 mg / mL) no muestra ese mismo efecto si se compara con el control negativo. Por otro lado, la concentración intermedia (42,25 mg / mL) muestra sólo la mitad del efecto clastogénico de la concentración mayor evaluada (422,5 mg / mL).

DISCUSION

Este trabajo confirma que los 5α , 8α -epidioxiesteroles reportados previamente en varias especies de esponjas marinas, son artefactos de oxidación fotoquímica de los correspondientes esteroides con núcleo androsta-5,7-dién-3-ol, como se observó previamente en un experimento con 7-dehidrocolesterol ²³.

Las concentraciones media y alta (422,5 mg /

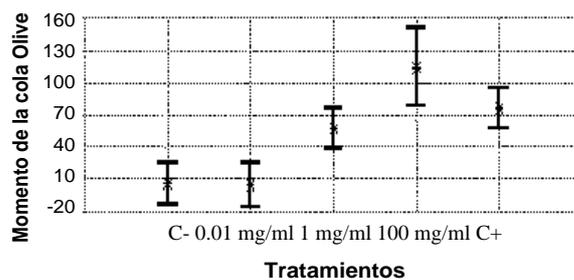


Figura 2. Evaluación clastogénica por ensayo cometa de tres concentraciones de 5α , 8α -epidioxiesteroles. Se muestra el momento de la cola Olive (OTM).

1. Control negativo con metanol puro. 2. C1= 4,22 mg / mL, 3. C2= 42,25 mg / mL, 4. C3= 422,25 mg / mL, 5. Control positivo (100 μ g / mL de peróxido de hidrógeno).

mL y 42,25 mg / mL) de la fracción de 5α , 8α -epidioxiesteroles ocasionan fuerte daño clastogénico y citotóxico en los linfocitos humanos tratados con esa fracción, lo cual está de acuerdo con los reportes encontrados sobre los efectos genotóxico y citotóxico de los esteroides ¹³. Por el contrario la concentración menor (4,22 mg / mL) no mostró efecto citotóxico ni clastogénico sobre las células tratadas, lo cual convierte a estos resultados en promisorios para futuras aplicaciones farmacéuticas de los 5α , 8α -epidioxiesteroles, si se tiene en cuenta que dosis tan bajas como 0,0039 mg / mL resultaron efectivas en el bioensayo realizado contra *Leishmania panamensis* como se reportó previamente ².

Por último, se debe evaluar la fracción de 5α , 8α -epidioxiesteroles con una batería de pruebas mutagénicas y efectos sobre el ciclo celular en células de mamífero, con el fin de recomendar su uso a nivel humano y animal.

Agradecimientos. Los autores agradecen al Doctor Sven Zea, Biólogo marino Ph. D., Investigador adscrito al Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR, Santa Marta. El Dr. Zea realizó la recolección y clasificación taxonómica de las muestras de esponjas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Iwashima, M., I. Terada, K. Iguchi & T. Yamori (2002) *Chem. Pharm. Bull.* **50**: 1286-9.
- Martínez, A., S. Robledo, D. Muñoz, S. Blair, E. Higueta, E. Echeverri, J. Bedoya, S. Zea & I. Velez (2001) *Rev. Vitae.* **8**: 71-7.
- Petrictcheva, V. C., Duque & Y. Fujimoto (2001) *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* **25**: 569-76.
- Toume, K. & M. Ishibashi (2002) *Phytochemistry.* **61**: 359-60.
- Abourriche, A. M. Charrouf, N. Chaib, A. Benamara & N. Bontemos (2000) *II Fàrmaco.* **55**: 492-4.
- Jyh-Horng, S., C. Kuie-Chi & Chang-Yih (2000) *J. Nat. Prod.* **63**:149-51.
- Yutaka, S., A. Kyoko & S. Yoshikazu (1999) *J. Nat. Prod.* **62**:152-4.
- Mac Gregor, J., D. Casiano & L. Muller (2000) *Mut. Res.* **455**: 3-20.

9. Speit, G. & A. Hartmann (1995) *Mutagenesis* **10**: 555-9.
10. Hartmann, A., U. Plappert, F. Poetter & W. Suter (2003) *Mut. Res.* **536**: 27-38.
11. Ahmed, E., G. Shadab, A. Hoda & M. Afzal (2000) *Mut Res.* **466**: 109-15.
12. Liehr J.G., W.F. Fang, D.A. Sirbasku & Ari-Ulubelen (1986) *J. Steroid Biochem.* **24**: 353-6.
13. Roy, D. & J.G. Liehr. (1999) *Mut. Res.* **424**: 107-15.
14. Tsutsui T. & J.C. Barrett (1997) *Environ. Health Perspect.* **105**: 619-24.
15. Tsutsui T., S. Taguchi, Y. Tanaka & J.C. Barrett (1997) *Int. J. Cancer* **70**: 188-93.
16. Banerjee S.K., S. Banerjee, S.A. Li & J.J. Li (1992) *Cytogenetic changes in renal neoplasms and during estrogen-induced carcinogenesis*. In: Li J.J., S. Nandi & S.A. Li (eds) *Hormonal Carcinogenesis*. Springer -Verlag, NewYork. 247-51.
17. Banerjee S.K., S. Banerjee, S.A. Li & J.J. Li (1994) *Mut. Res.* **311**: 191-7.
18. Li J.J., Z. González, S. Banerjee, S.K. Banerjee & S.A. Li (1993) *Environ. Health Perspect.* **101** [Suppl 5]:259-64.
19. Djelic N. & D. Djelic (2002) *Arch. Med. Res.* **33**: 148-51.
20. Ochi T. (1999) *Mut. Res.* **431**: 105-21.
21. Wheeler. J.W., L.M. Cherry, T. Downs & T.C. Hsu (1986) *Mut. Res.* **171**: 31-41.
22. Konca, K., A. Lankoff, A. Banasik, H. Lisowska, T. KusZewski, S. Gozdz, Z. Koza & A. Wojcik (2003) *Mut. Res.* **534**: 15-20.
23. Martínez, A. (1996) *Estudio Químico y de Actividad Biológica de Esponjas Marinas Colombianas del Género Ircinia*. Tesis de Doctor en Ciencias Químicas. Santa Fe de Bogotá D.C.