

**EVALUACIÓN CITOTÓXICA DE FRACCIONES DE ESPONJAS
MARINAS DEL CARIBE COLOMBIANO *Amphimedon compressa*,
Cinachyrella kuekenthali, *Svenzea zeai* e *Ircinia campana***

**CYTOTOXIC EVALUATION OF FRACTIONS OBTAINED FROM
MARINE SPONGES FROM THE COLOMBIAN CARIBBEAN *Amphimedon*
compressa, *Cinachyrella kuekenthali*, *Svenzea zeai* e *Ircinia campana***

NATALIA ESTRADA ^a, JUAN LÓPEZ ^a, DIANA MÁRQUEZ ^b,
ALEJANDRO MARTÍNEZ ^b, MARÍA MÁRQUEZ ^{a*}

Recibido 01-11-12, aceptado 01-04-13, versión final 15-04-13

Artículo Investigación

RESUMEN: En la búsqueda de actividad antitumoral en el desarrollo de fármacos, se requiere evaluar la actividad citotóxica de manera preliminar, con el fin de realizar otras potenciales actividades como antiproliferación y efecto genotóxico. En la evaluación de diferentes fracciones obtenidas de esponjas marinas del Caribe Colombiano se ha encontrado actividad antiproliferativa en algunas de ellas. Por lo anterior, en este trabajo se evaluó la actividad citotóxica de trece fracciones obtenidas de las esponjas marinas *Amphimedon compressa*, *Cinachyrella kuekenthali*, *Svenzea zeai* e *Ircinia campana* para determinar su potencial citotóxico, en las líneas celulares Jurkat clon E6-1 y CHO-K1. Se emplearon las técnicas de MTT y coloración vital de Azul de Tripano para evaluar su citotoxicidad y viabilidad para determinar su concentración inhibitoria media. En conclusión, los resultados muestran que ninguna fracción, presenta actividad citotóxica significativa.

PALABRAS CLAVE: *Amphimedon compressa*, Azul de tripano, *Cinachyrella kuekenthali*, *Ircinia campana*, MTT, *Svenzea zeai*, Viabilidad.

ABSTRACT: In the search for antitumor activity in drug development is necessary to evaluate preliminary the cytotoxic activity, in order to search for other activities as antiproliferative and genotoxic potential effect. The evaluation of different fractions obtained from marine sponges from Colombian Caribbean has been found antiproliferative activity in some of them. Therefore, in this study we evaluated the cytotoxic activity of thirteen fractions obtained from marine sponges *Amphimedon compressa*, *Cinachyrella kuekenthali*, *Svenzea zeai* and *Ircinia campana* were evaluated to determine their cytotoxic potential in Jurkat clone E6-1 cells, and cell line CHO-K1. The techniques used were MTT test and trypan blue assay to assess cytotoxicity and viability in order to determine their half inhibitory concentration. Results show that no single fraction has significant cytotoxic activity.

^aGrupo Biotecnología Animal. Línea Bioactividad de Productos Naturales y Sintéticos. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia.

^bGrupo de Productos Naturales Marinos. Departamento de Farmacia. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Calle 70 N°52-21, Medellín, Colombia.

*María Elena Márquez Fernández: memarque@unal.edu.co

KEYWORDS: *Amphimedon compressa*, *Cinachyrella kuekenthali*, *Ircinia campana*, MTT, *Svenzea zeai*, Trypan blue, Viability.

1. INTRODUCCIÓN

El medio marino constituye una importante fuente de productos con potencial valor agregado, algunos, han sido usados como nuevas materias primas en la industria alimenticia, farmacéutica, cosmética, biología molecular, enzimas, agroquímicos y en el desarrollo farmacológico de nuevos compuestos, algunos de ellos se encuentran en fases preclínica y clínica y otros, en proceso de síntesis (Amador *et al.*, 2003; Cragg *et al.*, 2006; Haefner, 2003; Newman & Cragg, 2003, 2004a, 2004b, 2007). Las esponjas son importantes fuentes de compuestos bioactivos promisorios, de las cuales se han aislado más de 2000 compuestos con diferentes estructuras y actividad biológica (Faulkner, 2000, 2001, 2002). Se han reportado algunos compuestos citotóxicos con potencial antitumoral de diferentes especies de esponjas incluidas las del Mar Caribe (Mora-Cristancho *et al.*, 2007).

La gran complejidad estructural de muchos de los compuestos de origen marino, hacen poco viable su síntesis química, por sus altos costos y tiempo de elaboración. Por otro lado, estos compuestos se encuentran en trazas, lo que dificulta su estudio químico. Lo anterior, estimula la búsqueda de productos potenciales con valor agregado y da luces sobre la posibilidad de realizar cultivos celulares para producir *in vitro* el compuesto deseado (De Rosa *et al.*, 2003; Osinga *et al.*, 1998; Sipkema *et al.*, 2003a, 2005b).

En Colombia, existen pocos estudios enfocados a la valoración citotóxica, genotóxica y antiproliferativa de las sustancias de origen marino. Estudios recientes han reportado la evaluación de diferentes fracciones obtenidas de esponjas marinas del Caribe Colombiano y se ha encontrado actividad antiproliferativa en algunas de ellas (Márquez, 2010), lo cual las hace promisorias para evaluaciones citotóxicas y genotóxicas, y como potenciales candidatas en el desarrollo de medicamentos antitumorales.

Los lineamientos para evaluar sustancias antitumorales descritos por el NCI sugieren utilizar líneas celulares de un panel de 60 diferentes (NCI-60), que incluye líneas de ocho melanomas, seis leucemias, ocho cánceres de mama, dos de próstata, nueve de pulmón, siete de colon, seis de ovario, ocho de riñón y seis de cáncer del sistema nervioso central. Para las evaluaciones citotóxicas en cada línea celular se utilizan diferentes concentraciones dependiendo de la naturaleza de la muestra y se determina el IC₅₀ (Boyd & Paull, 1995; Chakravarti & Klopman, 2008), el cual es el valor de referencia utilizado en evaluaciones posteriores, entre las que se encuentran las pruebas de genotoxicidad y de ciclo celular. Si este valor es superior a 100 µg/mL, la fracción no se considera promisoriosa, por lo cual no se realizan evaluaciones adicionales de genotoxicidad y efecto sobre ciclo celular.

Las pruebas de citotoxicidad *in vitro* más frecuentemente utilizadas, incluyen el uso de colorantes vitales como azul de tripano y pruebas de la actividad metabólica basado en el uso de la sal de tetrazolio conocida como MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetildiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) (Slater, 2001). La prueba de MTT de tipo metabólico muestra la reducción por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa lo cual se observa por el cambio de color de un compuesto amarillo a otro de color azul, insoluble en soluciones acuosas (formazán), determinando la funcionalidad de las mitocondrias tratadas. La cantidad de formazán generado es directamente proporcional al número de células viables.

En este estudio, se evaluó el efecto citotóxico con potencial farmacológico antitumoral de fracciones de las esponjas marinas *Amphimedon compressa*, *Cinachyrella kuekenthali*, *Svenzea zeai* e *Ircinia campana* en las líneas celulares de mamífero, Jurkat y CHO-K1 mediante ensayos MTT y coloración vital de azul de tripano.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Mantenimiento y condiciones de cultivo de la líneas celulares utilizadas

Todos los experimentos se realizaron con cultivos en fase exponencial de las líneas celulares Jurkat clon E6-1 (leucemoide humana ATCC TIB-152) y CHO-K1 (ovario de hámster chino, ATCC N° CCL-61) y propagadas en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, Estados Unidos), suplementado con 5% de suero fetal bovino (Lonza, Estados Unidos). Los cultivos celulares fueron incubados a una temperatura de 37°C y en el caso de la línea celular Jurkat en una atmósfera húmeda con CO₂ al 5%.

La línea celular Jurkat, fue obtenida de sangre periférica de un niño de 14 años con leucemia linfoblástica aguda (Schneider, 1977). El cariotipo de las células es pseudodiploide, el número de cromosomas es 46, XY, en el 74% de los casos y contiene poliploidías en el 5,3% con alteraciones tales como 2-18 del (2) (p21p23), del (18) (p11.2), con cromosomas X y Y normales. Esta línea celular crece en suspensión formando racimos, su ciclo celular estimado es de 18 horas.

La línea celular CHO es una línea celular establecida obtenida a partir de un explante de tejido de ovario de hámster chino (*Cricetulus griseus*) (Kao & Puck, 1968). En esta evaluación, se usó el clon CHO-K1 subclon derivado de la línea parental CHO. La línea original se caracteriza por ser euploide con un número modal cromosómico de 20-21, posee 10-13 marcadores cromosómicos bien definidos, cariotipo heteromórfico. Este tipo de células crecen en monocapa adheridas al sustrato y su ciclo celular estimado es de 14 horas. Es ampliamente utilizada en estudios para evaluar genotoxicidad por su pequeño número de cromosomas y su fácil manejo (Sánchez-Lamar, 1999).

2.2. Fracciones evaluadas

Cada muestra de esponja húmeda fue cortada en pequeños pedazos (aproximadamente 3 x 3 cm) y posteriormente extraída con solventes de diferente polaridad (etanol, diclorometano y n-hexano) de la siguiente manera: la muestra de esponja se extrajo exhaustivamente con etanol hasta 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. El mismo procedimiento se repitió con los solventes diclorometano y hexano. Los extractos secos obtenidos se conservaron refrigerados, protegidos de la luz, el aire, el calor y la humedad.

Los extractos etanólicos de las esponjas *Cinachyrella kuekenthali*, *Ircinia campana*, *Amphimedon compressa* y *Svenzea zeai* se sometieron a fraccionamiento por cromatografía instantánea, usando sílica gel en fase reversa (C₁₈) como fase estacionaria y como fase móvil de usaron 500mL de los siguientes solventes: agua (100%), agua/metanol (50:50 y 25:75), metanol (100%), metanol/diclorometano (75:25 y 50:50) y diclorometano (100%). Las fracciones obtenidas se concentraron bajo presión reducida y agitación constante a una temperatura menor a 30°C, se disolvieron con metanol y diclorometano de acuerdo a su solubilidad para ser transferidas a un recipiente adecuado, se rotularon, se llevaron a sequedad con argón a un flujo de 5 mL/min y luego se guardaron bajo refrigeración.

Estas fracciones fueron disueltas en solventes como DMSO, etanol o PBS dependiendo de un gradiente de polaridad con el fin de tener representatividad de distintos ácidos grasos (Tabla 1). Una vez evaluados para actividad biológica, si las fracciones dan promisorias para actividad antitumoral, se procede a estudiar químicamente los componentes de la misma.

Tabla 1: Fracciones de ácidos grasos obtenidas de esponjas marinas.

Esponja	Nomenclatura	Característica	Solvente
<i>Amphimedon compressa</i> (AC)	AC-F1	Fracción no polar	DMSO
	AC-F2		
	AC-F3		
	AC-F4	Fracción polar	Etanol
	AC-F5		
	AC-F6		
<i>Cinachyrella kuekenth</i> (CK)	CK-F1	Fracción no polar	DMSO
	CK-F2		
	CK-F3		
	CK-F4		
<i>Svenzea zeai</i> (SZ)	SZ-F1	Fracción polar	PBS
	SZ-F2		
<i>Ircinia campana</i> (IC)	IC-F1	Fracción polar	PBS

2.3. Condiciones de tratamiento

Se utilizó una suspensión celular a una concentración de 6000 células/mL de la línea celular Jurkat y 8000 células/mL de CHO-K1, las cuales se sembraron en platos de cultivo de 96 pozos (Falcon, Estados Unidos), en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (Lonza, Estados Unidos) al 5%, incubados a 37°C en una atmósfera húmeda de CO₂ al 5% por un período de 48 horas. Posteriormente, se adicionaron diferentes concentraciones de la fracción a evaluar y se incubaron mínimo por 20 horas, equivalentes a un ciclo celular.

Se evaluaron las concentraciones de 25, 50, 100 y 200 µg/mL de las esponjas marinas *Amphimedon compressa*, *Cinachyrella kuekenthali*, *Svenzea zeai* e *Ircinia campana*, según se muestra en las Tablas 4, 5, 6 y 7 de los Resultados. Las fracciones fueron disueltas en DMSO, etanol ó PBS dependiendo de la polaridad de la muestra, se usó como control en cada uno de los experimentos, la mayor concentración de solvente usada en los tratamientos. Los controles negativos fueron las células sin tratar y el control sin células. Como control positivo se utilizó H₂O₂, 25 µM. Se realizaron tres experimentos independientes y cada uno por duplicado.

2.4. Pruebas de citotoxicidad

2.4.1. MTT

En esta prueba, se siguió la metodología descrita por Mosmann en 1983 con algunas modificaciones. Luego de las 20 horas de tratamiento, a cada pozo se le adicionó 10µL de MTT (5 mg/mL) (Sigma, Estados Unidos), se incubó en la oscuridad a 37°C y 5% de CO₂ por 4 horas. Se adicionó 100 µL de isopropanol ácido en cada pozo para disolver los cristales dejando en agitación alrededor de 24 horas. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 570nm utilizando un espectrofotómetro (Multiskan Spectrum, ThermoScientific). La viabilidad se calculó usando la ecuación 2.1, y la significancia estadística se calculó usando la prueba Probit con el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV para determinar el valor del IC₅₀ aproximado.

$$\%Viabilidad\ celular = \frac{\text{Absorbancia de células tratadas}}{\text{Absorbancia de células no tratadas}} \times 100 \quad (2.1)$$

2.4.2. Azul de Tripano

Se colorearon las suspensiones celulares con azul de tripano al 0,4% previamente tratadas con las fracciones en las condiciones descritas para los tratamientos. Se cuantificó el porcentaje de viabilidad celular por conteo del número de células muertas (coloración azul) y el de células vivas (no coloreadas) (Ecuación 2.2).

$$\%Viabilidad\ celular = \frac{\text{Células vivas}}{\text{Células totales}} \times 100 \quad (2.2)$$

3. RESULTADOS

3.1. Pruebas de MTT y Azul de Tripano de Fracciones no polares de *Amphimedon compressa*

La Tabla 2 muestra los resultados de los ensayos de viabilidad mediante las pruebas MTT y azul de tripano sobre células Jurkat y CHO-K1 tratadas con las fracciones no polares de la esponja *Amphimedon compressa*. Únicamente la máxima concentración de la fracción AC-F1 fue disuelta en DMSO al 10%, mientras que las otras fracciones AC-F2 y AC-F3 fueron disueltas a una concentración del 3,3 y 5%, respectivamente. En este experimento, el control de solvente utilizado fue DMSO al 10%.

Tabla 2: Porcentaje de viabilidad en células Jurkat y CHO-K1 tratadas con las fracciones no polares de *A. compressa* AC-F1, AC-F2, AC-F3. El control de solvente: DMSO al 10%.

Fracción	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MTT		Azul de tripano	
		Jurkat	CHO-K1	Jurkat	CHO-K1
AC-F1	25	81,7	91	91,3	97
	50	73,1	85	99,6	99,9
	100	75,1	45,2	95,9	91,1
	200	27,2	10,8	52,1	69,6
AC-F2	25	98,7	97,1	99,3	100
	50	76,6	74,2	99,4	100
	100	87,4	72,1	99,2	92,2
	200	70,7	37,5	93,3	91,4
AC-F3	25	87,1	89,6	99,8	98,2
	50	81,9	73,1	99,3	96,2
	100	74,7	71,3	88,4	91,1
	200	30,3	29,1	4,6	63,7
DMSO	10%	25,3	10,1	22,7	10,0

La Figura 1 muestra los resultados de los ensayos de viabilidad mediante la prueba MTT sobre células Jurkat y CHO-K1 tratadas con las fracciones no polares de la esponja *A. compressa*.

La Figura 2 muestra los resultados de los ensayos de viabilidad mediante la prueba azul de tripano sobre células Jurkat y CHO-K1 tratadas con las fracciones no polares de la esponja *A. compressa*.

En ambas figuras se puede observar una disminución de la viabilidad con respecto a la concentración de las fracciones evaluadas, siendo más evidente en la concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diluida con DMSO al 10%. No obstante, la máxima concentración de DMSO que no causa efecto citotóxico comparada con el control es de 2.5%, lo cual se puede observar en la Tabla 4.

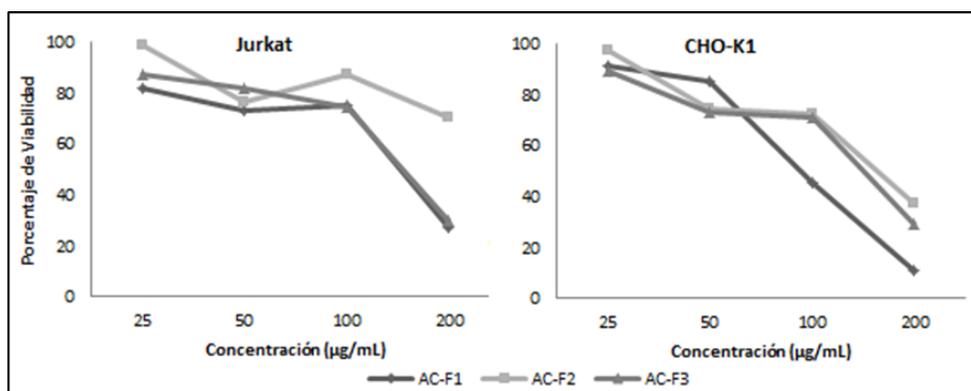


Figura 1: Porcentaje de viabilidad con MTT en células Jurkat y CHO-K1 tratadas con las fracciones AC-F1, AC-F2 y AC-F3 de *A. compressa*. El control de solvente: DMSO al 10%.

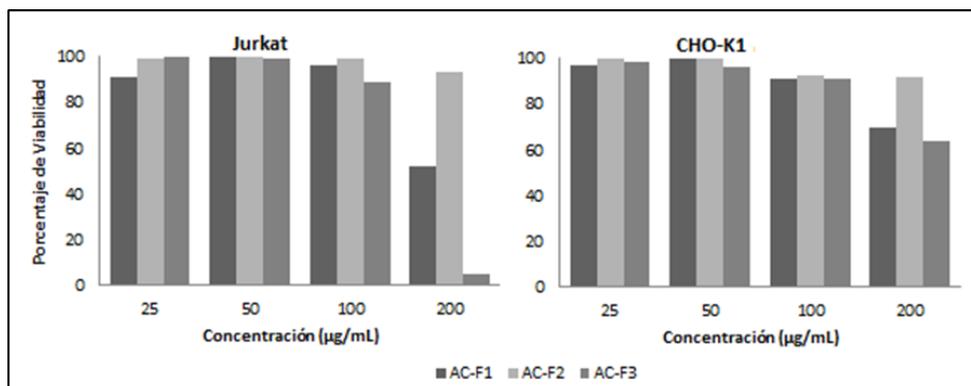


Figura 2: Porcentaje de viabilidad con Azul de tripano en células Jurkat y CHO-K1 tratadas con las fracciones polares AC-F1, AC-F2 y AC-F3 de *A. compressa*. El control de solvente: DMSO al 10%.

3.2. Pruebas de MTT y Azul de Tripano de Fracciones polares de *A. compressa*

La Tabla 3 muestra los resultados de los ensayos de viabilidad mediante las pruebas MTT y azul de tripano sobre células Jurkat y CHO-K1 tratadas con las fracciones polares de la esponja *A. compressa*.

La Figura 3 muestra los resultados de los ensayos de viabilidad mediante la prueba MTT sobre células Jurkat y CHO-K1 tratadas con las fracciones polares de la esponja *A. compressa*.

La Figura 4 muestra los resultados de los ensayos de viabilidad mediante la prueba azul de tripano sobre células Jurkat y CHO-K1 tratadas con las fracciones polares de la esponja *A. compressa*.

Las Figuras 3 y 4 muestran que no hay relación aparente entre la viabilidad celular y la concentración de las fracciones utilizadas. En la prueba del MTT se observan viabilidades superiores al control negativo (mayores al 100%).

Tabla 3: Porcentaje de viabilidad en células Jurkat y CHO-K1 tratadas con las fracciones polares AC-F4, ACF5 y AC-F6 de *A. compressa*. El control de solvente: etanol 4,5 %.

Fracción	Concentración (µg/mL)	MTT		Azul de tripano	
		Jurkat	CHO-K1	Jurkat	CHO-K1
AC-F4	25	116,4	93,2	98,5	97,6
	50	115,4	95,3	96,7	98,3
	100	101,3	90,3	98	97,1
	200	98,5	70,3	94,5	97,6
AC-F5	25	105,4	105,5	96,7	ND
	50	98,4	100,9	93,5	ND
	100	105,5	104,3	94,5	ND
	200	106,5	ND	92,5	ND
AC-F6	25	113,9	104,9	93,9	98,5
	50	130,4	89,9	93,8	98,1
	100	102	93,2	94	96,8
	200	111,8	80,8	92,6	96,4
Etanol	4,50 %	100,7	95,7	98,5	98,6

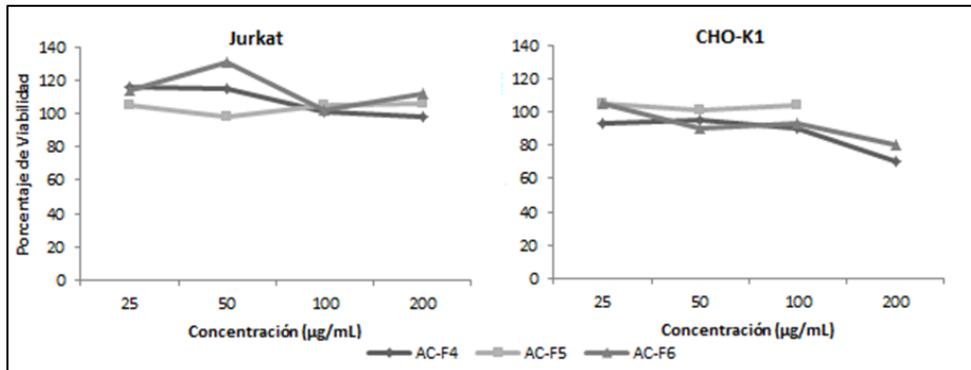


Figura 3: Porcentaje de viabilidad con MTT en células Jurkat y CHO-K1 tratadas con las fracciones polares AC-F4, AC-F5 y AC-F6 de *A. compressa*. El control de solvente: etanol 4,5 %.

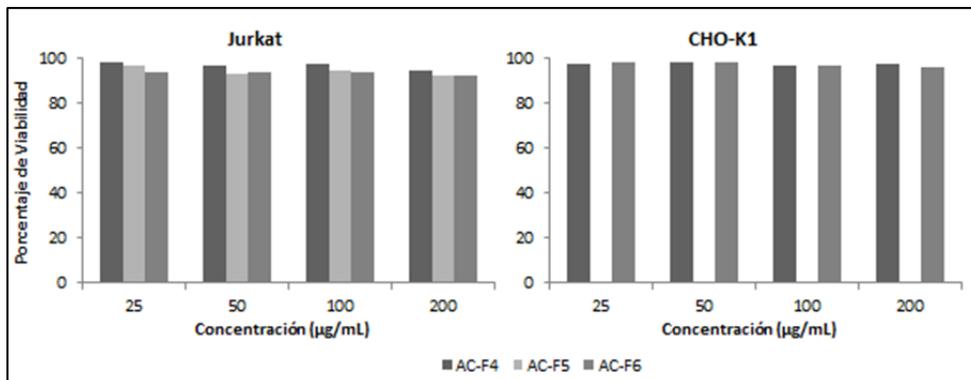


Figura 4: Porcentaje de viabilidad con Azul de tripano en células Jurkat y CHO-K1 tratadas con las fracciones polares de *A. compressa* AC-F4, AC-F5 y AC-F6. El control de solvente: etanol 4,5 %.

3.3. Pruebas MTT y Azul de Tripano de Fracciones no polares de *Cinachyrella kuekenthali*

La Tabla 4 muestra los resultados de los ensayos de viabilidad mediante las pruebas MTT y azul de tripano sobre células Jurkat y CHO-K1 tratadas con las fracciones no polares de la esponja *Cinachyrella kuekenthali*.

Tabla 4: Porcentaje de viabilidad con MTT y azul de tripano en células Jurkat y CHO-K1 tratadas con las fracciones no polares CK-F1, CK-F2, CK-F3 y CK-F de *C. kuekenthali*. El control de solvente: DMSO al 2,5 %.

Fracción	Concentración (µg/mL)	MTT		Azul de tripano	
		Jurkat	CHO-K1	Jurkat	CHO-K1
CK-F1	25	119,3	103,8	100	100
	50	122,1	100,5	99,9	99,9
	100	114,1	100,2	99,6	97,7
	200	102	100,1	99,3	97
CK-F2	25	115,4	94,6	100	100
	50	121,4	99,5	100	100
	100	81,5	100,2	99	95,7
	200	93,8	100,2	99,2	95
CK-F3	25	103,4	108,23	100	100
	50	146,5	100,29	99,2	99,2
	100	125,7	100,01	99,3	97,4
	200	124,1	100,18	90,2	98,5
CK-F4	25	148,7	96,2	100	100
	50	111,4	94,3	98,5	98,5
	100	121,3	100,1	99,5	96,7
	200	91,9	100,3	98,9	97
DMSO	2,50 %	99,7	93,7	96,9	89,5

La Figura 5 muestra los resultados de los ensayos de viabilidad mediante la prueba MTT sobre células Jurkat y CHO-K1 tratadas con las fracciones no polares de la esponja *C. kuekenthali*.

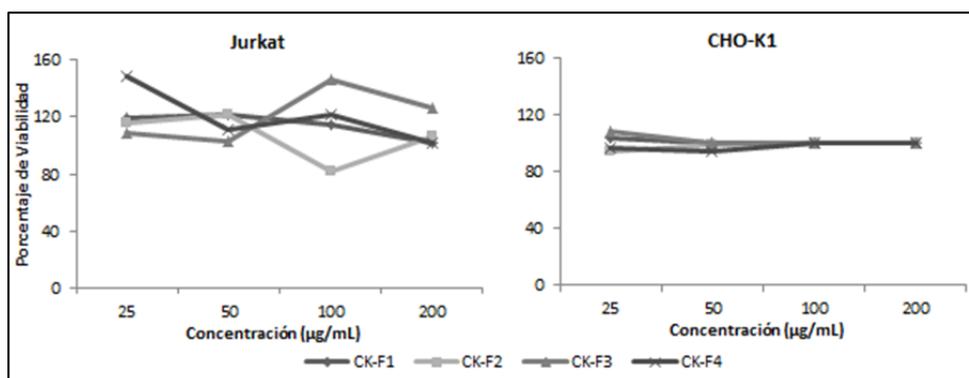


Figura 5: Porcentaje de viabilidad con MTT en células Jurkat y CHO-K1 tratadas con las fracciones no polares CK-F1, CK-F2, CK-F3 y CK-F4 de *C. kuekenthali*. El control de solvente: DMSO al 2,5 %.

La Figura 6 muestra los resultados de los ensayos de viabilidad mediante la prueba azul de tripano sobre células Jurkat y CHO-K1 tratadas con las fracciones no polares de la esponja *C. kuekenthali*.

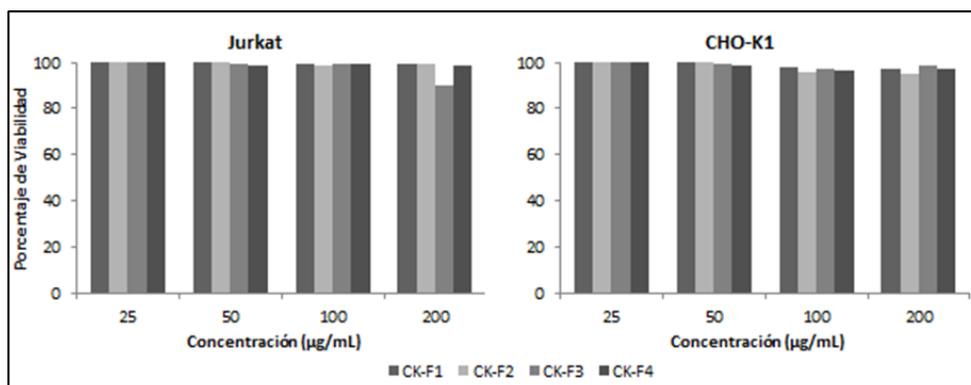


Figura 6: Porcentaje de viabilidad con Azul de tripano en células Jurkat y CHO-K1 tratadas con las fracciones no polares CK-F1, CK-F2, CK-F3 y CK-F4 de *C. kuekenthali*. El control de solvente: DMSO al 2,5%.

Las Figuras 5 y 6 muestran que no hay relación aparente entre la viabilidad celular y la concentración de las fracciones utilizadas. En la prueba del MTT se observan viabilidades superiores al control negativo (mayores al 100%).

3.4. Pruebas de MTT y Azul de Tripano de Fracciones polares de *Svenzea zeai*

La Tabla 5 muestra los resultados de los ensayos de viabilidad mediante las pruebas MTT y azul de tripano sobre células Jurkat y CHO-K1 tratadas con las fracciones polares de la esponja *Svenzea zeai*.

Tabla 5: Porcentaje de viabilidad en células Jurkat y CHO-K1 tratadas con las fracciones polares SZ-F1 y SZ-F2 de *S. zeai*. El control de solvente: PBS al 2,5%.

Fracción	Concentración (µg/mL)	MTT		Azul de tripano	
		Jurkat	CHO-K1	Jurkat	CHO-K1
SZ-F1	25	82,64	92,55	93,86	96,94
	50	78,83	79,96	95,2	96,47
	100	81,48	98,56	92,43	94,02
	200	81,89	94,98	92,58	94,39
SZ-F2	25	84,61	94,16	92,1	96,74
	50	82,5	95,25	95,44	96,96
	100	84,72	83,08	94,38	95,55
	200	78,89	80,53	95,12	92,1
PBS	2,5	89,83	89,83	96,3	96,46

La Figura 7 muestra los resultados graficados de los ensayos de viabilidad mediante la prueba MTT sobre células Jurkat y CHO-K1 tratadas con las fracciones polares de la esponja *Svenzea zeai*.

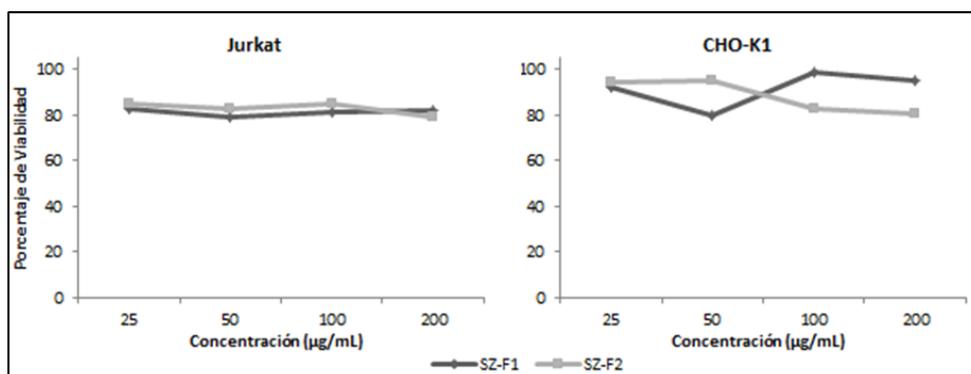


Figura 7: Porcentaje de viabilidad con MTT en células Jurkat y CHO-K1 tratadas con las fracciones polares SZ-F1 y SZ-F2 de *S. zeai*. El control de solvente: PBS al 2,5%.

La Figura 8 muestra los resultados de los ensayos de viabilidad mediante la prueba azul de tripano sobre células Jurkat y CHO-K1 tratadas con las fracciones polares de la esponja *Svenzea zeai*. A la fracción SZ-F3 no se le realizó la prueba de azul de tripano debido a que la cantidad de muestra disponible fue insuficiente para realizar las demás pruebas.

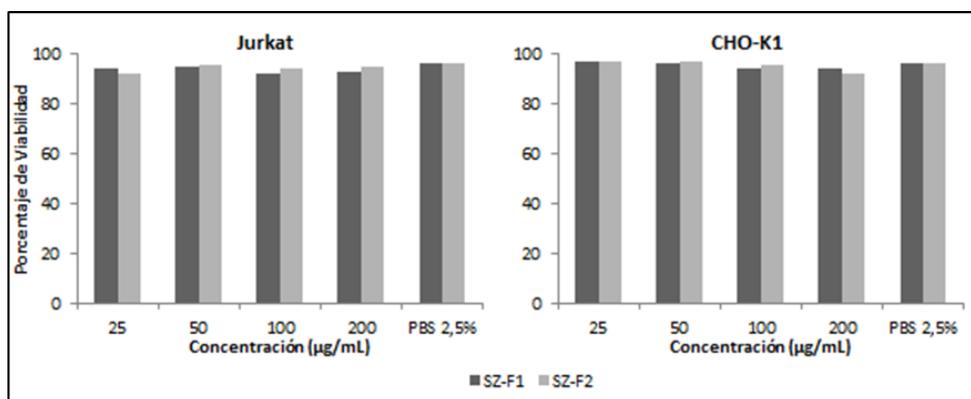


Figura 8: Porcentaje de viabilidad con Azul de tripano en células Jurkat y CHO-K1 tratadas con las fracciones polares SZ-F1 y SZ-F2 de *S. zeai*. El control de solvente: PBS al 2,5%.

Las Figuras 7 y 8 muestran que no hay relación aparente entre la viabilidad celular y la concentración de las fracciones utilizadas.

3.5. Pruebas de MTT y Azul de Tripano de la Fracción polar de *Ircinia campana*

La Tabla 6 muestra los resultados de los ensayos de viabilidad mediante las pruebas MTT y azul de tripano sobre células Jurkat y CHO-K1 tratadas con la fracción polar de la esponja *Ircinia campana*.

Tabla 6: Porcentaje de viabilidad en células Jurkat y CHO-K1 tratadas con la fracción polar IC-F1 de *I. campana*. El control de solvente: PBS al 2,5 %.

IC-F1	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MTT	Azul de tripano
Jurkat	25	108,94	98,02
	50	114,94	98,63
	100	115,97	99,11
	200	118,85	98,26
	PBS 2,5 %	99,08	98,46
CHO-K1	25	103,46	97,07
	50	83,02	94,89
	100	119,21	95,12
	200	101,12	97,42
	PBS 2,5 %	93,01	96,4

La Figura 9 muestra los resultados de los ensayos de viabilidad mediante las pruebas MTT y azul de tripano sobre células Jurkat y CHO-K1 tratadas con la fracción polar de la esponja *Ircinia campana*.

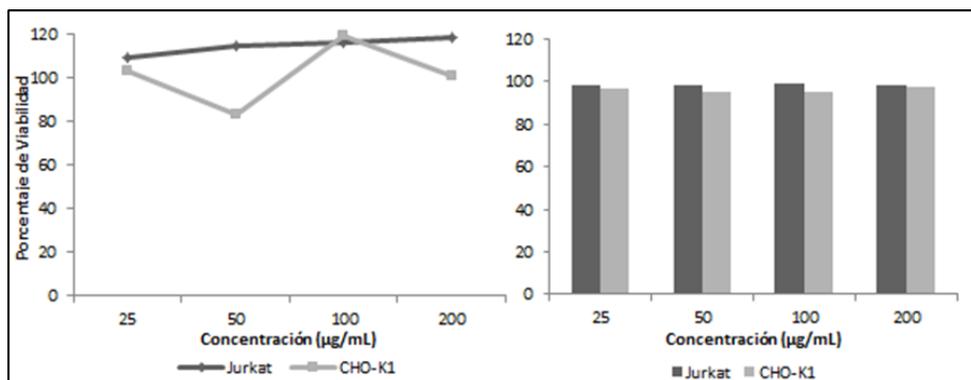


Figura 9: Porcentaje de viabilidad con a) MTT y b) azul de tripano en células Jurkat y CHO-K1 tratadas con la fracción polar IC-F1 de *I. campana*. El control de solvente: PBS al 2,5 %.

La Figura 9 muestran que no hay relación aparente entre la viabilidad celular y la concentración de las fracciones utilizadas. En la prueba del MTT se observan viabilidades superiores al control negativo (mayores al 100 %).

3.6. IC₅₀ estimados con la prueba Probit

Los IC₅₀ obtenidos mediante la prueba Probit muestran que esos valores estimados no están incluidos en los rangos de evaluación usados en las pruebas de antiproliferación y genotoxicidad, teniendo en cuenta los criterios del NCI para la evaluación de fracciones con potencial actividad biológica en el desarrollo de fármacos (Boyd & Paull, 1995; Chakravarti & Klopman, 2008).

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para las evaluaciones citotóxicas en cada línea celular se utilizan diferentes concentraciones dependiendo de la naturaleza de la muestra y se determina el IC₅₀ (Boyd & Paull, 1995; Chakravarti & Klopman, 2008), el cual es el valor de referencia utilizado en evaluaciones posteriores, entre las que se encuentran las pruebas de genotoxicidad y de ciclo celular. Si este valor es superior a 100 µg/mL, la fracción no se considera promisorias, por lo cual no se realizan evaluaciones adicionales de genotoxicidad y efecto sobre ciclo celular.

Las fracciones de ácidos grasos AC1-3, de la esponja marina *Amphimedon compressa*, revelan un incremento de la citotoxicidad de las fracciones a medida que incrementa la concentración en ambos tipos celulares. Las gráficas del porcentaje de viabilidad con MTT y azul de tripano (Figuras 1 y 2) permiten inferir que las fracciones aumentan su actividad en la misma proporción que aumenta la concentración. Esto podría explicarse porque en estos casos el DMSO utilizado en concentraciones superiores a las recomendadas introdujo un factor de confusión, ya que la concentración de DMSO al 10% muestra mayor efecto citotóxico que el de las fracciones evaluadas, en ambos tipos celulares. La citotoxicidad observada parece más un efecto del solvente que el verdadero efecto de las fracciones, por tanto, no se justifica continuar con la evaluación genotóxica y de ciclo celular de estas fracciones.

Las fracciones de *Cinachyrella kuekenthali* e *Ircinia campana* evaluadas por MTT (Tabla 4 y 6) mostraron porcentajes de viabilidad superiores al control negativo, lo cual implica que no hay efecto citotóxico. Sin embargo, podría considerarse como acelerador del ciclo celular, no obstante lo anterior, se requieren pruebas de ciclo celular como citometría de flujo, intercambio de cromátides hermanas, función de acumulación, entre otras para determinar dicho efecto. A pesar de lo anterior, la regresión lineal simple para determinar el valor del IC₅₀ reveló valores superiores a 500 µg/mL con nivel de significancia $p > 0.05$, demostrando que no existe relación entre la concentración de la fracción y la viabilidad (Tabla 7), por lo cual no se justificaría realizar evaluaciones de clastogénesis aguda o crónica con el ensayo cometa y la prueba de alteraciones cromosómicas, respectivamente.

La fracción polar SZF2 *Svenzea zeai* y las polares de *Amphimedon compressa* AC-F4-6 evaluadas por MTT, y analizadas mediante regresión Probit mostraron valores muy altos de IC₅₀ (Tabla 7). Por otro lado, la fracción SZ-F1 mostró valores negativos, muy pequeños con $p > 0.05$, mostrando que no hay relación estadísticamente significativa entre la concentración de la fracción y la viabilidad celular. Estos valores IC₅₀ obtenidos no se ajustan a los criterios de selección de fracciones promisorias establecidas por NCI (Boyd & Paull, 1995; Chakravarti & Klopman, 2008), por tal razón, no justifica continuar con la evaluación de genotoxicidad y ciclo celular.

Tabla 7: IC_{50} de la prueba del MTT de las fracciones de esponjas usando análisis Probit. Las fracciones CK de *Cinachyrella kuekenthali* e IC-F1 de *Ircinia campana* fueron evaluadas con regresión lineal simple ya que los valores de absorbancia fueron mayores a 1.

Fracción	$IC_{50}(\mu\text{g/mL})$	
	Jurkat	CHO-K1
AC-F1	141,85	106,66
AC-F2	357,68	141,85
AC-F3	149,21	149,57
AC-F4	628,88	288,82
AC-F5	6489,25	13749,96
AC-F6	1223,35	477,02
CK-F1	667,18	3491,60
CK-F2	526,50	1960,34
CK-F3	1233,48	1744,68
CK-F4	356,23	4560,74
SZ-F1	-5245,59	-315,17
SZ-F2	959,39	384,06
IC-F1	-1300,59	-1154,96

Los resultados mostrados por los controles de los solventes etanol (4,5 %) y PBS (2.5 %) están de acuerdo con lo esperado. En el caso del DMSO al 10 %, se usó como control porque a esa concentración se pudieron disolver los ácidos grasos de las fracciones a evaluar, que son poco solubles en solventes no polares, no obstante su gran toxicidad a esa concentración. Sin embargo, como se observa en los resultados para *Amphimedon compressa*, no hubo efecto citotóxico relevante en las fracciones evaluadas, así, los IC_{50} obtenidos fueron superiores a 100 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 1 y 2) a pesar de haber usado DMSO al 10 %. Esta concentración de DMSO al 10 % es más usada en protocolos de criopreservación de células vivas (Baust, 2002; Day & Pennington, 1995) que en protocolos de evaluación de citotoxicidad, en los cuales se prefieren concentraciones menores a 1 o 2 % que de acuerdo a los reportes dan valores de viabilidad cercanas al control negativo (células no tratadas) (Boyd & Paull, 1995; Cristancho *et al.*, 2008; Monks *et al.*, 1991), lo cual se puede corroborar en este estudio en el cual se usó DMSO al 2.5 % en la evaluación de fracciones de *C. kuekenthali*.

En resumen, las trece fracciones evaluadas no muestran citotoxicidad relevante en células Jurkat y CHO a concentraciones menores de 100 $\mu\text{g/mL}$, lo cual no descarta que estas mismas fracciones puedan ser evaluadas en otras líneas celulares derivadas de cáncer o para otras actividades potenciales en otros modelos celulares tales como antimicrobiana, antifúngica, antiplasmódica, antileishmania, entre otras, ya que el hecho de no causar citotoxicidad en líneas de mamífero, no implica que no posean otras actividades potenciales, como se ha reportado para diversos compuestos o fracciones obtenidas a partir de esponjas marinas (Galeano & Martínez, 2007; Haefner, 2003; Kijjoa & Sawangwong, 2004; Mayer *et al.*, 2011). Sin embargo, se recomienda evaluar desde el punto de vista químico las tres fracciones no polares de *Amphimedon compressa* que muestran un

efecto citotóxico en concentraciones mayores de 100 ug/mL y realizar las respectivas pruebas de citotoxicidad, genotoxicidad y de ciclo celular a los compuestos puros obtenidos de ellas.

5. CONCLUSIÓN

Las trece fracciones evaluadas no mostraron efecto citotóxico, por tanto, los resultados obtenidos sugieren que las trece fracciones evaluadas de las cuatro esponjas de interés, no son promisorias para realizar otras pruebas biológicas de genotoxicidad o ciclo celular en las células de mamífero usadas en este estudio. Sin embargo, estos resultados no descartan que las fracciones evaluadas puedan mostrar otras actividades citotóxicas potenciales en otros modelos eucarióticos o procarióticos y aún en otras líneas celulares humanas derivadas de tumor.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Colciencias por la financiación del proyecto 11150520268 y por el Programa Jóvenes Investigadores e Innovadores “Virginia Gutiérrez de Pineda”. Este trabajo se enmarca en lo establecido en el contrato de acceso a producto derivado de investigación científica sin interés comercial N° 28 entre el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial y Alejandro Martínez M., profesor de la Universidad de Antioquia, con el cual se recolectaron las esponjas *A. compressa*, *S. zeai*, e *Ircinia campana*, en las coordenadas geográficas aproximadas de 8°28´N; 77° 14´O, el 28 y 29 de marzo de 2010 mediante buceo autónomo. Este trabajo también fue apoyado con la Estrategia de Sostenibilidad Universidad de Antioquia 2009/2010 y por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín con la financiación del proyecto .Actividad Biológica, Caracterización Química y Estimación de la Factibilidad de Producción *in vitro* de Compuestos Bioactivos de Esponjas Marinas del Caribe Colombiano”.

Referencias

- Amador, M. L., Jimeno, J., Paz-Ares, L., Cortes-Funes, H., Hidalgo, M. (2003), Progress in the development and acquisition of anticancer agents from marine sources. *Ann Oncol*, **14**(11), 1607-15.
- Baust, J. M. (2002), Molecular mechanisms of cellular demise associated with cryopreservation failure. *Cell Preserv Technol*, **1**(1), 17-31.
- Boyd, M. R., & Paull, K. D. (1995), Some practical considerations and applications of the national cancer institute in vitro anticancer drug discovery screen. *Drug Dev Res*, **34**(2), 91-109.

- Chakravarti, S. K., & Klopman, G. (2008), A structural analysis of the differential cytotoxicity of chemicals in the NCI-60 cancer cell lines. *Bioorg Med Chem*, **16**(7), 4052-4063.
- Cragg, G. M., Newman, D. J., Yang, S. S. (2006), Natural product extracts of plant and marine origin having antileukemia potential. The NCI experience. *J Nat Prod*, **69**(3), 488-498.
- Cristancho, J. A. M., Umbreit, F. N., Santos-Acevedo, M., & Nieves, J. S. (2008), Evaluación de extractos de esponjas marinas como nueva fuente de sustancias antimicrobianas. *Rev Esp Quimioter*, **21**(3), 174-179.
- Day, J. G., & Pennington, M. W. (1995), Cryopreservation and Freeze-drying Protocols. Segunda edición. Springer. 227-236.
- De Rosa, S., De Caro, S., Iodice, C., Tommonaro, G., Stefanov, K., Popov, S. (2003), Development in primary cell culture of demosponges. *J. Biotechnolog*, **100**(2), 119-125.
- Faulkner, D. J. (2000), Marine natural products. *Nat Prod Rep*, **17**(1), 7-55.
- Faulkner, D. J. (2001), Marine natural products. *Nat Prod Rep*, **18**(1), 1-49.
- Faulkner, D. J. (2002), Marine natural products. *Nat Prod Rep*, **19**(1), 1-49.
- Galeano, E., & Martínez, M. (2007), Antimicrobial activity of marine sponges from Urabá Gulf, Colombian Caribbean region. *J Mycol Med*, **17**(1), 21-24.
- Haefner, B. (2003), Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discov Today*, **8**(12), 536-544.
- Kao, F. T., & Puck, T. T. (1968), Genetics of somatic mammalian cells, VII. Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells. *Proc Nat Acad Sci USA*, **60**(4), 1275-1281.
- Kijjoo, A., & Sawangwong, P. (2004), Drugs and cosmetics from the sea. *Mar Drugs*, **2**, 73-82.
- Márquez, F. D. M. (2010), *Estudio químico y evaluación biológica de extractos y fracciones obtenidas de esponjas marinas colombianas*. Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Medellín.
- Mayer, A. M. S., Rodríguez, A. D., Berlinck, R. G. S., & Fusetani, N. (2011), Marine pharmacology in 2007-8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **53**(2):191-222.

- Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Boyd, M. (1991), Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst.*, **83**(11), 757-766.
- Mora-Cristancho, J., Zea, S., Santos-Acevedo, M., Newmark-Umbreit, F. (2007), Capacidad Antimitótica de Extractos de Esponjas Marinas del Caribe Colombiano. *Bol Invest Mar Cost*, **36**, 167-179.
- Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth*, **65**(1-2), 55-63.
- Newman, D. J., Cragg, G. M. (2004 a), Advanced preclinical and clinical trials of natural products and related compounds from marine sources. *Curr Med Chem*, **11**(13), 1693-713.
- Newman, D J., Cragg, G. M. (2004 b), Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *J Nat Prod*, **67**(8), 1216-1238.
- Newman, D. J., Cragg, G. M. (2007), Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod*, **70**(3), 461-477.
- Newman, D. J., Cragg, G. M., Snader, K. M., & (first). (2003), Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod*, **66**(7), 1022-1037.
- Osinga, R., Tramper, J., Wijffels, R. H. (1998), Cultivation of marine sponges for metabolite production: Applications for biotechnology? *Trends Biotechnol*, **16**(3), 130-134.
- Sánchez-Lamar, Á. (1999), Utilización de la línea celular CHO en los ensayos de genotoxicidad. *Rev Cub Invest Biomed*, **18**(1), 19-21.
- Schneider, U., Schwenk, H. U., & Bornkamm, G. (1977), Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer*, **19**(5), 621-626.
- Sipkema, D., Osinga, R., Schatton, W., Mendola, D., Tramper, J., & Wijffels, R. H. (2005a), Large-scale production of pharmaceuticals by marine sponges: sea, cell, or synthesis? *Biotechnol Bioeng*, **90**(2), 201-22.
- Sipkema, D., van Wielink, R., van Lammeren, A. A. M., Tramper, J., Osinga, R., Wijffels, R. H. (2003b), Primmorphs from seven marine sponges: formation and structure. *J Biotechnol*, **100**(2), 127-139.
- Slater, K. (2001), Cytotoxicity tests for high-throughput drug discovery. *Curr Opin Biotechnol*, **12**(1), 70-74.