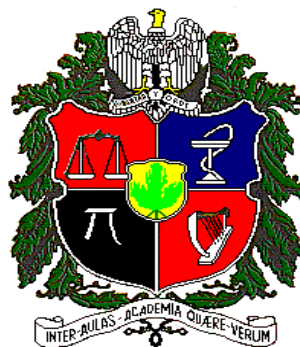


EVALUACIÓN *in vitro* DEL POTENCIAL CITOTÓXICO, GENOTÓXICO Y EFECTO EN EL CICLO CELULAR DE EXTRACTOS DE TRES ESPECIES DE ESPONJAS MARINAS DEL CARIBE COLOMBIANO

HEIDY CATALINA NAVIA MOROCHO



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE MEDELLÍN
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOCIENCIAS
MEDELLÍN
2011**

EVALUACIÓN *in vitro* DEL POTENCIAL CITOTÓXICO, GENOTÓXICO Y EL EFECTO EN EL CICLO CELULAR DE EXTRACTOS DE TRES ESPECIES DE ESPONJAS MARINAS DEL CARIBE COLOMBIANO

HEIDY CATALINA NAVIA MOROCHO

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

DIRECTOR

Juan Bautista López Ortiz. MSc.

ASESOR

Mauricio Camargo Guerrero. PhD.

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE MEDELLÍN
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
MEDELLÍN
2011**

“Para conocer la esencia y el esplendor de la naturaleza, es necesario descifrar sus arreglos más pequeños”

Paula P.N

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por darme la estabilidad emocional, económica, sentimental; para poder llegar hasta este logro, que definitivamente no hubiese podido ser realidad sin ustedes. Madre, serás siempre mi inspiración para alcanzar mis metas, por enseñarme que todo se aprende y que todo esfuerzo es al final recompensa.

A mi tutor, el profesor Juan Bautista López, por su amistad, disponibilidad, la asesoría y confianza para mi libre desempeño tanto intelectual como experimental en el desarrollo de esta tesis.

Al profesor Mauricio Camargo por su enseñanza, confianza, asesoría y sugerencias oportunas en el desarrollo de esta investigación.

A esa personita especial por permitirme comprender y sentir un poco más la vida soñando y creciendo con su imaginación.

A Claudia Delgado y Sandro Hoyos por enseñarme que no hay límites, que lo que me proponga lo puedo lograr y que solo depende de mí.

A Diana, Sandra y Vivi, quienes fueron mi apoyo durante este agradable y difícil periodo académico.

A Lina y María por su ayuda y apoyo en muchos de los procesos que aquí tuvieron lugar.

A todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la realización de esta investigación, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

Finalmente agradezco al laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad Nacional de Colombia y al laboratorio de Genética de Poblaciones y Mutacarcinogénesis de la Sede de Investigaciones Universitarias de la Universidad de Antioquia por proporcionar los espacios necesarios para el desarrollo de esta investigación.

Nota de aceptación:

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

Medellín, 2011

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	11
INTRODUCCION	13
OBJETIVOS	15
1.1. General.....	15
1.2. Específicos	15
2. ESTADO DEL ARTE	16
2.1. SUSTANCIAS BIOACTIVAS DE ORGANISMOS MARINOS	16
2.2. CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS ESPONJAS MARINAS	17
2.3. PRODUCTOS NATURALES MARINOS ANTINEOPLÁSICOS.....	20
2.4. SUSTANCIAS BIOACTIVAS EN LAS ESPONJAS MARINAS: <i>Ircinia</i> , <i>Niphates</i> y <i>Svenzea</i> (Clase: Demospongiae)	24
2.4.1. <i>Ircinia</i> sp.....	24
2.4.2. <i>Niphates</i> sp	24
2.4.3. <i>Svenzea</i> sp.....	25
2.5. BIOPROSPECCIÓN EN COLOMBIA.....	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. Obtención de los extractos	27
3.2. Líneas celulares y condiciones de cultivo:	28
3.2.1. Línea celular Jurkat (ATCC TIB-152).....	28
3.2.2. Línea celular CHO-K1.....	29
3.3. PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD.....	30
3.3.1. Evaluación de la toxicidad media con MTT.....	30
3.3.2. Prueba de proliferación celular con azul de tripano	31
3.3.3. Eficiencia de Clonación	31
3.4. Evaluación del efecto en el ciclo celular por función de acumulación.....	33
3.5. PRUEBAS DE GENOTOXICIDAD	35

3.5.1.	Test de aberraciones cromosómicas (AC)	35
3.5.2.	Test de Intercambio entre Cromátidas Hermanas (ICH)	36
3.5.3.	Análisis estadístico	36
4.	RESULTADOS Y DISCUSION	37
4.1.	Prueba de viabilidad y proliferación de las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat....	37
4.2.	PRUEBA DE PROLIFERACIÓN CELULAR CON AZUL DE TRIPANO	40
4.3.	EFICIENCIA DE CLONACIÓN.....	43
4.4.	EFEECTO EN EL CICLO CELULAR.....	46
4.5.	PRUEBAS DE GENOTOXICIDAD	50
4.5.1.	ABERRACIONES CROMOSOMICAS (AC)	50
4.5.2.	INTERCAMBIO ENTRE CROMÁTIDAS HERMANAS (ICH).....	53
	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	54
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	55

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Sustancia bioactivas anticáncer de organismos marinos.....	19
Tabla 2. Productos de origen marino comercialmente disponibles y en desarrollo farmacológico.....	20
Tabla 3. Compuestos Bioactivos Extraídos de Esponjas Marinas	22
Tabla 4. Protocolo de tratamiento para función de acumulación con los extractos de esponjas marinas en un ciclo (18 horas) de la línea celular Jurkat.....	34
Tabla 5. Protocolo de tratamiento para función de acumulación con los extractos de esponjas marinas en un ciclo (14 horas) de la línea celular CHO-K1.....	34
Tabla 6. Concentración de citotoxicidad media (IC ₅₀) de la línea celular Jurkat por medio del ensayo MTT.....	37
Tabla 7. Eficiencia de clonación obtenida en células CHO-K1 tratadas con los extractos de esponjas marinas a 14 horas de exposición.....	44

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Células Jurkat en cultivo, observadas en microscopio invertido, 10X.....	28
Figura 2. Células CHO-K1 en cultivo, observadas en microscopio invertido, 10X.	29
Figura 3. Colonia individual del extracto diclorometánico de la esponja marina <i>Svenzea zeai</i> , fotografiada con el objetivo 10x, en microscopio invertido.	32
Figura 4. Curvas de viabilidad mediante MTT en la línea celular Jurkat, tratadas con los extractos de <i>I.c</i> metanol (60 µg/mL), <i>I.c</i> n-hexano (62 µg/mL), <i>I.c</i> diclorometano (75 µg/mL) y control solvente (Etanol 0.1%), para determinar la dosis de citotoxicidad media.	38
Figura 5. Curvas de viabilidad mediante MTT en la línea celular Jurkat, tratadas con los extractos de <i>N.e</i> metanol (85 µg/mL), <i>N.e</i> n-hexano (70 µg/mL), <i>N.e</i> diclorometano (98 µg/mL) y control solvente (Etanol 0.1%), para determinar la dosis de citotoxicidad media.	38
Figura 6. Curvas de viabilidad mediante MTT en la línea celular Jurkat, tratadas con los extractos de <i>S.z</i> metanol (55 µg/mL), <i>S.z</i> n-hexano (50 µg/mL), <i>S.z</i> diclorometano (60 µg/mL) y control (Etanol 0.1%), para determinar la dosis de citotoxicidad media.	39
Figura 7. Número total de células viables tratadas con diferentes solventes del extracto de <i>Ircinia campana</i> a 24, 48, 72 y 96 horas (* p< 0.05, ** p< 0.01).....	40
Figura 8. Número total de células viables tratadas con diferentes solventes del extracto de <i>Niphates erecta</i> a 24, 48, 72 y 96 horas (* p< 0.05, ** p< 0.01).	41
Figura 9. Número total de células viables tratadas con diferentes solventes del extracto de <i>Svenzea zeai</i> a 24, 48, 72 y 96 horas (* p< 0.05, ** p< 0.01).....	42
Figura 10. Eficiencia de clonación de células CHO-K1 con los extractos de <i>Ircinia campana</i> . (A: <i>I.c</i> metanol, B: <i>I.c</i> hexano, C: <i>I.c</i> diclorometano).	43
Figura 11. Eficiencia de clonación relativa de la línea celular CHO-K1 con los extractos crudos de las esponjas marinas <i>Ircinia campana</i> , <i>Niphates erecta</i> y <i>Svenzea zeai</i>	44

Figura 12. Eficiencia de clonación de células CHO-K1 con los extractos de <i>Niphates erecta</i> . (A: <i>N.e</i> metanol, B: <i>N.e</i> hexano, C: <i>N.e</i> diclorometano).....	45
Figura 13. Eficiencia de clonación de células CHO-K1 con los extractos de <i>Svenzea zeai</i> . (A: <i>S.z</i> metanol, B: <i>S.z</i> hexano, C: <i>S.z</i> diclorometano).	45
Figura 14. Función de acumulación de la línea celular CHO-K1, con el extracto de la esponja <i>Ircinia campana</i>	47
Figura 15. Función de acumulación de la línea celular Jurkat, con el extracto de la esponja <i>Ircinia campana</i>	47
Figura 16. Función de acumulación de la línea celular CHO-K1, con el extracto de la esponja <i>Niphates erecta</i>	48
Figura 17. Función de acumulación para la línea celular Jurkat, con el extracto de la esponja <i>Niphates erecta</i>	48
Figura 18. Función de acumulación de la línea celular CHO-K1, con el extracto de la esponja <i>Svenzea zeai</i>	48
Figura 19. Función de acumulación de la línea celular Jurkat, con el extracto de la esponja marina <i>Svenzea zeai</i>	49
Figura 20. Test de aberraciones cromosómicas (AC) en células CHO-K1 y Jurkat tratadas con los extractos de esponjas marinas <i>Ircinia campana</i> , <i>Niphates erecta</i> y <i>Svenzea zeai</i>	51
Figura 21. Imágenes representativas de las diferentes aberraciones cromosómicas encontradas en: A y B línea celular CHO-K1 y C: línea celular Jurkat.	52
Figura 22. Índice de cromátidas hermanas (ICH) en células CHO-K1 y Jurkat tratadas con los extractos de esponjas marinas <i>Ircinia campana</i> , <i>Niphates erecta</i> y <i>Svenzea zeai</i>	53

RESUMEN

Evaluación *in vitro* del Potencial Citotóxico, Genotóxico y Efecto en el Ciclo Celular de Extractos de Tres Especies de Esponjas Marinas del Caribe Colombiano

Navia, Heidy Catalina¹; López Ortiz, Juan B².; Camargo, Mauricio³

1,2 Grupo de Investigación en Biotecnología Animal, Escuela de Biociencias, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

3. Grupo Genética de Poblaciones y Mutacarcinogénesis, Sede de Investigación Universitaria (SIU), Universidad de Antioquia

Los organismos marinos han revelado ser una fuente importante de sustancias bioactivas, las cuales en muchos casos producen como mecanismos de defensa. Colombia cuenta con una gran diversidad biológica marina y con posibilidades de explotar alternativas naturales en la búsqueda de nuevos productos terapéuticos. Dada las escasas investigaciones que permitan detectar sustancias bioactivas de esponjas marinas; se consideró de interés realizar esta investigación con el fin de evaluar *in vitro* el potencial citotóxico, genotóxico y efecto en el ciclo celular de extractos de esponjas marinas *Ircinia campana*, *Niphates erecta* y *Svenzea zeai* usando líneas celulares CHO-K1 y Jurkat. Los experimentos de citotoxicidad indicaron que la viabilidad celular disminuye después de 24 horas de tratamiento, mientras que la exposición prolongada (≥ 48 horas) no induce muerte celular. La prueba de eficiencia de clonación de los extractos de *I. campana* y *S. zeai* mostraron un efecto citotóxico respecto al control. De otra parte el índice mitótico y el efecto sobre el ciclo celular de los extractos de *I. campana* y *S. zeai*, evidenciaron retraso en el ciclo de las líneas celulares. En cuanto a pruebas genotóxicas, no se detectó un incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas e intercambio entre cromátidas hermanas.

Agradecimientos a la División de Investigaciones sede Medellín (DIME) de la Universidad Nacional de Colombia, por la financiación de esta investigación.

Palabras clave: Esponjas marinas, extractos, bioensayos, líneas celulares.

ABSTRACT

Evaluation *in vitro* of Cytotoxic and Genotoxic Potential, and the Effect on the Cell Cycle of Extracts from three species of Sea Sponge from the Colombian Caribbean

Navia, Heidy Catalina¹; López Ortiz, Juan B².; Camargo, Mauricio³

1,2 Grupo de Investigación en Biotecnología Animal, Escuela de Biociencias, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

3. Grupo Genética de Poblaciones y Mutacarcinogénesis, Sede de Investigación Universitaria (SIU), Universidad de Antioquia

Marine organisms have revealed to be an important source of bioactive substances, which are produced, in many instances, as a defense mechanism. Colombia counts with a great marine biological diversity and with possibilities to exploit natural alternatives in search of new therapeutic products. Given the few investigations that allow the detection of bioactive substances from sea sponges; this research was considered interesting with the aim of assessing *in vitro*, the cytotoxic and genotoxic potential and the cell effect of extracts of sea sponges *Ircinia campana*, *Niphates erecta* and *Svenzea zeai*, using cell lines CHO-K1 and Jurkat. Experiments on cytotoxicity showed that cell viability decreases after 24 hours of treatment, while long exposition (≥ 48 hours) does not induce cell death. The efficiency trial of cloning of extracts of *I. campana* and *S. zeai* showed a cytotoxic effect respect to control. On the other hand, the mitotic index and the effect over the cell cycle of extracts of *I. campana* and *S. zeai*, showed a delay on the cycle of cell lines. Respect to genotoxic trials, there was no detection of any rise in frequency of chromosome aberrations in the exchange of sister chromatids.

Acknowledgments to the Division of Research Medellin headquarter (DIME) of the Universidad Nacional de Colombia, for financing this research.

Key words: Sea sponges, extracts, cell lines.

INTRODUCCION

La naturaleza ha proporcionado muchos agentes anticancerígenos efectivos de uso actual, los cuales incluyen fármacos de origen microbiano y derivados de plantas, algunos de los cuales han sido aceptados por la FDA (Food and Drugs Administration) para su aplicación en clínica. Casi todos los medicamentos antitumorales de origen natural empleados se producen a partir de extractos de plantas, insectos o bacterias recogidos en ecosistemas continentales. La saturación de estos nichos ecológicos ha llevado a la industria farmacéutica a volver su mirada hacia el mar, un campo hasta ahora poco explorado (Dunlap *et al* 2007). En nuestro planeta las extensiones de agua conforman alrededor de 71% de la superficie total, y en ellas tuvieron su origen las primeras formas de vida, siendo este hecho diferencial de nuestro planeta, el que hace que en él puedan sobrevivir una gran variedad de flora y fauna. Sin embargo, hasta ahora conocemos menos del 40% de las especies que viven en medios marinos y cuya adaptabilidad, en muchos casos no tiene ningún precedente en el medio terrestre. Muchos de estos animales coexisten en ecosistemas densamente poblados, careciendo de movilidad y disponiendo de un sistema inmunológico muy primitivo (Bell, 2008). Por todo ello han evolucionado produciendo compuestos derivados de su metabolismo secundario para defenderse de sus predadores, para atraer o inhibir a otros organismos con el fin de que vivan cerca o lejos de ellos. Se cree que los mecanismos por los que se previenen de la predación implica una interacción enzima-receptor muy similar a los procesos biológicos que se producen en enfermedades humanas: por ejemplo se han identificado un gran número de compuestos naturales que son capaces de inhibir la división celular, un proceso primordial cuando se trata de encontrar un compuesto anticancerígeno (Yamada 2010). 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). La explotación de productos marinos aún está en sus inicios, solo se han aislado aproximadamente 10.000 compuestos bioactivos de origen marino, con gran variedad de esqueletos y con estructuras que no se han descrito con anterioridad en organismos terrestres. Aunque muchas de estas estructuras se han encontrado en organismos que viven en grandes latitudes, el foco de mayor atención por parte de los investigadores han sido los trópicos, ya que existe una gran biodiversidad de especies y por lo tanto son lugares en donde se espera un mayor estrés evolutivo que se plasmaría en la producción de toxinas de defensa. Dentro del espectro de especies marinas evaluadas como fuente renovable de productos con valor agregado, las esponjas constituyen el mayor reservorio de compuestos bioactivos promisorios de las cuales se han aislado más de 2000 compuestos con gran variedad de estructuras y con diversas actividades biológicas entre las que se destacan antivirales, antibacterianas, antimicóticas, antiparasitarias, emaglutinantes, hemolizantes, antimicóticas, antiinflamatorias, analgésicas y particularmente antitumorales (Mayer 2009).

En Colombia, los arrecifes coralinos del mar Caribe sostienen una mayor biomasa de esponjas que los del Indo-Pacífico, predominan las de tipo heterotrófico y mixotrófico, esto sugiere que la densidad de esponjas sea superior a causa de grandes volúmenes de material orgánico en suspensión, provenientes de influencias terrestres a través de los ríos, los cuales parecen beneficiar a las poblaciones de organismos de hábitos alimentarios filtradores (Valderrama & Zea, 2003). Dado que en estas regiones son escasas las investigaciones que permitan detectar sustancias bioactivas con potencial farmacológico de esponjas marinas; se consideró interesante realizar esta investigación con la finalidad de evaluar *in vitro* el potencial citotóxico, genotóxico y efecto en el ciclo celular de extractos crudos de esponjas marinas *Ircinia campana*, *Niphates erecta* y *Svenzea zeai* colectadas en el Caribe Colombiano, usando líneas celulares CHO-K1 y Jurkat.

OBJETIVOS

1.1. *General*

Evaluación *in vitro* del potencial citotóxico, genotóxico y efecto en el ciclo celular de extractos de tres especies de esponjas marinas del caribe colombiano: *Ircinia campana*, *Niphates erecta* y *Svensea zeai*,

1.2. *Específicos*

Evaluar el efecto citotóxico de los tres extractos de esponjas marinas en líneas celulares CHO y Jurkat, mediante las pruebas de exclusión de azul de tripano, eficiencia de clonación y MTT.

Evaluar el efecto genotóxico de extractos de las tres especies de esponjas marinas en líneas celulares CHO y Jurkat, mediante las pruebas de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) y aberraciones cromosómicas (AC).

2. ESTADO DEL ARTE

2.1. SUSTANCIAS BIOACTIVAS DE ORGANISMOS MARINOS

Con los avances tecnológicos, la investigación de compuestos bioactivos a partir de plantas y microorganismos terrestres se ha visto equiparada por aquella que encuentra en el mar, una fuente inagotable de sustancias bioactivas con una gran diversidad química sumada a una potente actividad farmacológica (Kijjoa *et al* 2004; Simmons *et al* 2005, Bell 2008). Esto ha llevado a que la investigación en el campo de los productos naturales de origen marino se haya convertido en un área de estudio prioritaria (Sipkema 2005). Las condiciones variables del ambiente marino han generado una serie de adaptaciones fisiológicas en los organismos que ahí habitan, que les permiten sintetizar moléculas que no tienen equivalencia con las terrestres, tales como terpenoides esteroides, isoprenoides, prostaglandinas, quinonas, además de un diverso grupo de toxinas (Blunt *et al* 2006, Coello 2009, Bohlin 2010), las cuales en muchos casos producen como mecanismos de defensa, y cuyas propiedades biológicas van desde la antibacteriana, antineoplásica, antifúngica, antiviral, antiinflamatoria y anticoagulante (Blunt 2006, Bell 2008, Mayer 2008, Mayer 2009) (Tabla 1). Actualmente, se han reportado 768 compuestos químicos secundarios, tales como depsipéptidos, sesquiterpenos, ergosteroles, alcaloides, compuestos halogenados, entre otros, aislados de holoturias, esponjas, algas, octocorales y tunicados (Lloret 2010).

Otros de los compuestos bioactivos con propiedades farmacológicas potenciales son las lectinas. Estas sustancias constituyen un grupo de proteínas y/o glicoproteínas naturales de origen no inmune que comparten la propiedad de enlazarse de forma específica y reversible a carbohidratos, ya sean libres o que

formen parte de estructuras más complejas, con la capacidad de aglutinar células y/o precipitar glicoconjugados. Algunas lectinas se han utilizado como anticancerígenos, en el estudio de membranas celulares para detectar alteraciones relacionadas con malignidad (Koeschek 2007); en estudios citogenéticos para la detección de anormalidades cromosómicas, así como también en ensayos histoquímicos y enzimáticos. Una gran variedad de estas estructuras con actividad biológica se encuentran comercialmente disponibles y otros en desarrollo farmacológico (Tabla 2) (Pedpradab 2010). Las posibles aplicaciones de estas sustancias son amplias.

Dentro del espectro de especies marinas evaluadas como fuente renovable de productos con valor agregado, las esponjas constituyen el mayor reservorio de compuestos bioactivos promisorios de las cuales se han aislado más de 2000 con gran variedad de estructuras y actividad biológica (Bell *et al* 2008).

Los primeros compuestos descubiertos a partir de esponjas fueron spongouridina y spongotimidina derivados de *Cryptotheca (Tethya) crypta* (esponja del Caribe), los cuales sirvieron como base para la síntesis de los fármacos antivirales Ara-A y Ara-C (Dunlap *et al* 2007).

Actualmente, algunos compuestos bioactivos de utilidad potencial en terapias antitumorales se encuentran en desarrollo farmacológico y en ensayos preclínicos fase I como es el caso del compuesto Discodermolide, extraído de la esponja *Discodermia spp* (Kuramoto *et al* 2008). El cual presenta alta toxicidad en líneas celulares cancerígenas, demostrando un gran potencial en el tratamiento del cáncer.

2.2. CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS ESPONJAS MARINAS

Las esponjas marinas son los organismos pluricelulares más sencillos, puesto que no poseen estructura definida. Suelen presentar formas y coloraciones muy diversas tales como verdes, rojas y amarillas. Estas coloraciones se deben a la asociación con algas como zooclorelas y zooxantelas, que le dan color a las

esponjas, puesto que éstas por sí solas no presentan pigmentos que den color (Galeano 2007, Lloret 2010, Rodríguez 2010).

Las esponjas carecen de verdaderos tejidos y órganos, y sus células disfrutan de cierta independencia. No obstante puede observarse un cierto grado de diferenciación, dentro de la misma esponja hay especializaciones en soporte, alimentación y reproducción. Generalmente las esponjas son marinas, aunque existen algunas especies que viven en aguas dulces. Siempre viven unidas al substrato y no se desplazan. El tamaño de la esponja es muy variable y oscila entre 1 cm y varios metros. Hay esponjas que viven aisladas y esponjas coloniales, aunque la mayoría son individuos aislados y masivos. Existen esponjas macizas o incrustantes que revisten piedras o corales; las hay de cuerpo saliente con aspecto ramificado o de cornamenta, o bien de forma de abanico que se eleva varios metros del fondo a partir de un tejido con aspecto de hongo. Son organismos resistentes y córneos que dentro de la cadena trófica sólo sirven de alimento a muy pocos animales (Zea, 1998, Rodríguez 2010). Las esponjas hacen parte de los organismos que presentan un sistema de defensa propio, basado en estímulos externos (competencia, infección o limitación de nutrientes), estas producen metabolitos secundarios como flavonoides, lignanos, terpenos, fenoles, alcaloides, esteroides, además de un diverso grupo de toxinas (Belarbi *et al* 2003, Kijjoa 2004, Mayer 2008, 2009). Las esponjas marinas están catalogadas taxonómicamente en tres clases de acuerdo al tipo de espículas: Hexactinellida, Demospongia, y Calcárea. Se conocen unas 5000 especies de esponjas, de las cuales solamente unas 150 habitan en agua dulce, todas ellas pertenecientes a las esponjas córneas. Entre las esponjas marinas, las calcáreas suelen vivir en fondos poco profundos, mientras que las silíceas habitan preferentemente aguas profundas. Las Demospongias, se encuentran en cualquier profundidad, desde la zona de las mareas hasta más de 7.000 metros (Pedpradab 2010).

Las esponjas marinas son los animales sésiles y pluricelulares más primitivos y se encuentran expuestas con frecuencia a depredadores y/o a microorganismos que infectan su tejido fino (Zabala 2008). Protegidos por un sistema inmune altamente

complejo, han existido durante millones de años; tiempo en el cual, las bacterias asociadas a las esponjas, adquirieron en común un metabolismo complejo, por lo que algunos de los compuestos bioactivos son producidos por enzimas provenientes de la esponja y/o de sus microorganismos asociados (Kijjoa *et al* 2007; Takahashi *et al* 2007). En estos invertebrados se han detectado diversos compuestos químicos con propiedades inhibitorias, citotóxicas y otras, farmacológicamente activas (Munro 1999, Tziveleka *et al* 2002; Rifai *et al* 2005; Meseta *et al* 2007, Bell 2008). Compuestos como alcaloides, lectinas, saponinas, macrólidos y terpenoides con actividad antibacteriana, anticancerígena, antimicótica, antiviral, antiparasitaria, hemaglutinante y hemolizante han sido aislados de las esponjas *Tethya* sp. (Mayer 2009); *Aplysina fistularis* (Aiub *et al* 2006); *Erylus nobilis*; *Plakortis simplex*; *Polymastia janeirensis*; *Jaspis wondoensis* y *Neamphius huxleyi*. Las esponjas del género *Aplysina* contienen altas concentraciones de metabolitos bromados (hasta el 13% del peso seco) con actividad antimicrobiana, actividad citotóxica contra las líneas celulares humanas del cáncer de mama y con características antidepredadoras (Aiub *et al* 2006).

Tabla 1. Sustancia bioactivas anticáncer de organismos marinos

Compuesto	Origen	Blanco molecular
Ecteinascidina 743 (Yondelis)	<i>Ecteinascidia turbinata</i>	Tubulina
Dolostatina 10	<i>Dolabella auricularia/Symploca</i> sp.	Tubulina
Briostatina 1	<i>Bugula neritina</i>	PKC
Sinthadotina	<i>Dolabella auricularia/Symploca</i> sp.	Tubulina
Kahalalide F	<i>Elysia rufescens/Bryopsis</i> sp	Lisozimas/ vía erbB
Squalamina	<i>Squalus acanthias</i>	Bicapa fosfolípido
Dehidrodidemnina B (Aplidin)	<i>Trididemnum solidum</i>	Ornitina Decarboxilasa
Didemnina B	<i>Trididemnum solidum</i>	FK-506 bp
Cemadotina	<i>Dolabella auricularia/Symploca</i> sp	Tubulina
E7389	<i>Halichondria okadai</i>	Tubulina
NVP-LAQ 824	<i>Psammaplysilla</i> sp	HDAC/DNMT
Discodermolida	<i>Discodermia dissolute</i>	Tubulina
HTI-286	<i>Cymbastella</i> sp.	Tubulina
LAF-389	<i>Jaspis digonoxea</i>	Metionina aminopeptidasa
KRN-7000	<i>Agelas mauritanus</i>	Activación celular
Curacina A	<i>Lyngbya majuscula</i>	Tubulina
Salinosporamida A	<i>Salinospora</i> sp.	20S proteasoma
Laulimalida	<i>Cacospongia mycofijiensis</i>	Tubulina
Vitilevuamida	<i>Didemnin cucliferum/Polysyncracion</i> <i>Lithostrotum</i>	Tubulina

Diazonamida	<i>Diazona angulata</i>	Tubulina
Eleutherobina	<i>Eleutherobia sp./Erythropodium Caribaeorum</i>	Tubulina
Sarcodictyina	<i>Sarcodictyon roseum</i>	Tubulina
Pelorusida A	<i>Mycale hentscheli</i>	Tubulina
Salicylhalimidas A y B	<i>Haliclona sp.</i>	Vo-ATPasa
Thiocoralina	<i>Micromonospora marina</i>	DNA polimerasa
Ascididemia	<i>Didemnum sp.</i>	Caspasa-2/mitocondria
Variolinas	<i>Kirkpatrickia variolosa</i>	Cdk
Lamellarina D	<i>Lamellaria sp</i>	Topoisomerasa I
Dictyodendrinas	<i>Dictyodendrilla verongiformis</i>	Telomerasa
ES-285 (Spisulosina)	<i>Mactromeris polynyma</i>	Rho (GTP-bp)
Dolastatina 15	<i>Dolabella auricularia</i>	Tubulina
Halichondrina B	<i>Halichondria okadai</i>	Tubulina

Tabla 2. Productos de origen marino comercialmente disponibles y en desarrollo farmacológico

Producto	Fuente	Aplicación
Ara-A	<i>Cryptoethya crypta</i>	Fármaco antiviral
Ara-C	<i>Cryptoethya crypta</i>	Fármaco anticáncer
Manoalida	<i>Luffariella variabilis</i>	Marcador molecular, inhibidor de la fosfolipasa A2
Discodermolida	<i>Discodermia disoluta</i>	Cáncer
KRN7000	<i>Agelas mauritianus</i>	Cáncer
IPL576092	<i>Petrosia contignata</i>	Inflamación y asma
Cibrostatinas 1 y 2	<i>Cribrochalina sp.</i>	Cáncer
Dibromohimendialdisina	<i>Stylotella aurantium</i>	Osteoartritis
Halichondrina B	<i>Halichondria okadai</i>	Cáncer
Manoalida	<i>Luffariella variabilis</i>	Inflamación y psoriasis

2.3. PRODUCTOS NATURALES MARINOS ANTINEOPLÁSICOS

El cáncer es la segunda causa de muerte en los países desarrollados, en los que una de cada cuatro personas fallece debido a esta enfermedad en los últimos cinco años. Estadísticamente es la segunda enfermedad mortal de América, y es la primera causa de muerte en mujeres mayores de 40 años en Colombia. Los tres cánceres más mortales son el cáncer de pulmón, que es responsable de casi el 20% de todas las muertes por cáncer, el cáncer de estómago (10% de todas las muertes por cáncer) y el cáncer de hígado (9%) (Instituto Nacional de Cancerología). A pesar de los avances que se han realizado en la investigación y

los múltiples intentos de mejorar los tratamientos existentes, la realidad es que aún no disponemos de terapias eficaces contra esta enfermedad.

La naturaleza ha proporcionado muchos agentes anticancerígenos efectivos de uso actual, los cuales incluyen fármacos de origen microbiano y derivados de plantas, algunos de los cuales han sido aceptados por la FDA (Food and Drugs Administration) para su aplicación en clínica. Entre las muchas sustancias analizadas procedentes del mar los investigadores han encontrado potentes antitumorales contra una cepa de células leucémicas de ratón en el alga *Caulerpa prolifera* y en las esponjas *Axinella damicornis*, *Reniera mucosa* y *Reniera fulva*. Otro ejemplo son las esponjas *Axinella verrucosa* y *Clathrina clathrus*, que se encuentran entre los raros organismos bentónicos que presentan actividad antifúngica contra los hongos *Aspergillus niger* y *Candida albicans*. También se pueden encontrar sustancias estimuladoras del sistema inmunológico o depresoras del mismo (de interés para inhibir el rechazo de órganos en transplantes) (Dunlap *et al* 2007, Bohlin 2010).

Las esponjas son capaces de producir más tipos de metabolitos secundarios en comparación con otros organismos marinos: doce veces más que cnidarios y algas, siete más que tunicados y cinco más que moluscos y equinodermos. Se conocen cerca de cuatro mil productos descritos de esponjas, siendo en la actualidad, tal como se ha dicho anteriormente, los arabinonucleósidos Ara-A y Ara-C los únicos medicamentos basados en productos iniciales aislados de la esponja *Cryptotethya cripta*. Sin embargo existen aproximadamente 20 compuestos que están en fases clínicas o preclínicas y que han mostrado muy prometedoras actividades como citotóxicas y genotóxicas (Belarbi 2003, Aiub 2006, Blunt 2006, Bartolotta 2009, Bohlin 2010) (Tabla 3), antivirales (las hemiasterlinas y micaperóxido), anticancerígenos (benglamida B, agelasfina) o antiinflamatorios (constignasterol en fase I). En estado más avanzado se encuentra el discodermólido un macrólido que presenta actividad inmunosupresora, inhibe la polimerización de tubulina mediante un mecanismo de acción similar al taxol, inhibiendo además el crecimiento de células tumorales

resistentes a este último (Kuramoto 2004, Bringman 2005, Rifai 2005, Simmons 2005, Emura 2006, Hickford 2009, Yamada 2010).

Tabla 3. 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	Antiangiogenica, antimicrobial
<i>Ircinia fasciculata</i>	Sorbicilactona A	Antileucemica, anti HIV
<i>Spongia</i> sp.	3-hidroxiroridina E 13'-acetyl-trichoverrin B Roridin A Roridin L Roridin M Isororidin A Epiroridin E Trichoverrin A Trichoverrin B	Antileucemica, antitumor
<i>Hirtios</i> sp.	Asperazine Malformin C	Antileucémica, citotóxico Antitumor
<i>Fascaplysinopsis reticulate</i>	Bromo-alterochromide A	Citotóxico
<i>Suberites domuncula</i>	Compuesto sin identificar	Antiangiogénico, antimicrobial, hemolítico, citotóxico
<i>Ptilocaulis trachys</i>	Majusculamide C	Antifúngico
<i>Axinella</i> sp.	Efrapeptin E Efrapeptin F Efrapeptin E α Efrapeptin G Efrapeptin H	Citotóxico, antibacterial
<i>Axinella verrucosa</i>	Oxaline Communesin B Communesin C Communesin D	Anti-proliferativo Antileucémico
<i>Axinella damicornis</i>	Bicoumanigrin Aspernigrin B	Anticáncer, citotóxico Neuroprotector
<i>Halichondria okadai</i>	Alteramide A Trichodenone A Trchodenone B	Anticáncer, Citotóxico Antileucémico, citotóxico

	Trichodenone C	
<i>Halichondria panacea</i>	1-O-acil-3-[R-glucopiranosil-(1-3)-(6-O-acil-R-manno-piranosil)]-glicerol	Antitumor
<i>Halichondria japonica</i>	Gymnostatin A Gymnostatin B Gymnostatin C Gymnostatin F Gymnostatin G Gymnostatin Q Gymnosterone A Gymnosterone B Gymnosterone C Gymnosterone D Dankastatina A Dankastatina B Dankasterona A	Antileucémica, citotóxico, anti-cáncer
<i>Acanthella acuta</i>	GG11	Antitumor
<i>Petrosia</i> sp	Fellutamide C	Citotóxico
<i>Acanthostrongylophora</i> sp.	Manzamine A	Antitumor 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 Brocaenol B Brocaenol C	Citotóxico
<i>Ectyoplasia ferox</i>	Epoxiphomalina 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 Destruxin B2 Desmethyl B E chlorohydrin E2 chlorohydrin	Antitumor
<i>Leucetta microraphis</i>	Leucamide A	Antitumor

2.4. SUSTANCIAS BIOACTIVAS EN LAS ESPONJAS MARINAS: *Ircinia*, *Niphates* y *Svenzea* (Clase: Demospongiae)

2.4.1. *Ircinia* sp.

Las esponjas marinas del género *Ircinia* son de particular interés no sólo por lo novedoso de las estructuras de los metabolitos secundarios que producen, sino también por las interesantes actividades farmacológicas que éstas poseen. De su estudio, se han aislado metabolitos de naturaleza tanto terpénica como no terpénica procedentes del metabolismo de los ácidos grasos (Fontana *et al* 1999; Erdogan *et al* 2000). Dentro de los compuestos de naturaleza terpénica se destacan fundamentalmente los poliéteres triterpénicos, revelándose como la especie más prolífica en este tipo de sustancias (Duque *et al* 2001). Algunos furanosesterterpenos extraídos de estas esponjas han revelado una potencial actividad antibacteriana, antiviral, citotóxica, antiespasmódica y antiinflamatoria (Rashid *et al* 2001; Shen *et al* 2006). Diferentes estudios de esta especie han revelado un nuevo compuesto taurino conjugado a partir de los ácidos grasos, llamado ácido irciniasulfónico (Kawakami *et al* 2001; Emura *et al* 2006), el cual produce oxidantes y sustancias tóxicas en muchos tejidos, disminuyendo la concentración del colesterol en experimentos con ratas.

2.4.2. *Niphates* sp

Otro de los géneros de esponjas que han demostrado actividad como inhibidor de crecimiento de varias líneas celulares tumorales, por sus compuestos bioactivos como diterpenos, escalaranos y sesquiterpenos, son los generados por la especie *Niphates* (Hernández *et al* 2006). En extractos de la esponja *Niphates erecta intestinalis* (Golfo de California), se han descubierto compuestos sesterterpenos con potencial actividad citotóxica. Los efectos citotóxicos fueron evaluados con cultivos de líneas de células de MDA-MB-231 (carcinoma de seno), A-549 (adenocarcinoma de pulmón) y HT-29 (adenocarcinoma de colon) (Hernández *et*

al 2006). Estos ensayos dirigidos por Pharmar establecieron la actividad citotóxica de estos compuestos, mostrando que los mismos poseen una potente y selectiva actividad frente a las líneas celulares evaluadas.

2.4.3. *Svenzea sp*

Clasificada taxonómicamente por el Biólogo Colombiano Sven Zea Sjoberg, se ha mencionado que inhibe la enzima dihidrofolato reductasa implicada en la producción de la base timidina, componente esencial de la estructura del ADN, siendo potencialmente útil para el tratamiento de varios tipos de cáncer como leucemias linfoblásticas (Zabala, 2008). En otro ensayo se ha estudiado a nivel molecular los fragmentos 28S de rDNA, de varias especies para aclarar la familia de la especie *Sollasella* (Erpenbeck *et al* 2007).

2.5. BIOPROSPECCIÓN EN COLOMBIA

En Colombia se han colectado para evaluación de bioactividad y estudios químicos, alrededor de 60 especies de esponjas, dos de estrellas de mar, dos de estrellas quebradizas, y dos de octocorales. Entre las esponjas marinas, 30 especies han registrado resultados positivos de actividad biológica (especialmente antimicrobiana, citotóxica, ictiotóxica, antitumoral), de las cuales diez tienen estudios químicos detallados de metabolitos secundarios activos. Paralelamente, se han aislado e identificado cerca de 160 compuestos. 25 de estos son nuevos en la naturaleza, entre los cuales se encuentran esteroides, ácidos grasos, terpenos, furanosesterterpenos, y sesquiterpenos nitrogenados. Todos estos trabajos se han desarrollado con la colaboración de INVEMAR, en cuanto a colecta e identificación de material, realización de algunas pruebas de bioactividad *in vitro* e *in-situ* y estudios exploratorios del papel que las sustancias bioactivas cumplen en las esponjas que lo producen. Debido al gran interés generado por estas especies marinas por sus estructuras originales, y potentes efectos citotóxicos (Kazanjian *et al* 2006), se decidió profundizar en el estudio del

potencial anticancerígeno de especies del Caribe colombiano, identificando nuevas sustancias bioactivas y explorando nuevas posibilidades farmacológicas, estableciendo nuevas alternativas en el tratamiento y control del cáncer.

Teniendo en cuenta el gran potencial farmacológico de estas especies, se requiere verificar con pruebas *in vitro* su actividad biológica. 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, entre otros, requeridos para la evaluación y aceptación internacional de fármacos (González *et al* 2005).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo hace parte del macroproyecto: Esponjas Marinas Colombianas: evaluación de su potencial en la Bioprospección de Recursos Marinos, desarrollado por los grupos de Productos Naturales Marinos, Universidad de Antioquia y Biotecnología Animal de la Universidad Nacional sede Medellín, apoyados por INVEMAR. Esta investigación interinstitucional está enfocada en generar información química y biológica de extractos de 10 especies de esponjas marinas del Caribe colombiano.

La evaluación *in vitro* del potencial citotóxico, genotóxico y efecto en el ciclo celular de extractos crudos de las esponjas marinas evaluadas, se realizó en el Laboratorio de Genética de Poblaciones y Mutacarcinogénesis, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia y en el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

3.1. Obtención de los extractos

Los extractos hexánicos, metanólicos y diclorometánicos de las especies de esponjas *Ircinia campana*, *Niphates erecta* y *Svenssea zeai*, fueron suministrados por el laboratorio de Productos Naturales Marinos de la Universidad de Antioquia, encargados de efectuar las pruebas químicas relacionadas con el fraccionamiento y la identificación de los compuestos responsables del efecto biológico de los extractos. Las especies de esponjas se seleccionaron de acuerdo a su gran densidad poblacional en el golfo de Urabá.

Los extractos analizados se conservaron refrigerados a 4°C, protegidos de la luz, calor, aire y humedad. Para cada uno de los ensayos biológicos, cada extracto se disolvió y diluyó en Etanol <1% o DMSO 0.1% (MERCK).

3.2. Líneas celulares y condiciones de cultivo:

Todos los experimentos se realizaron a partir de cultivos exponenciales de una línea estándar de células provenientes de Ovario de Hámster Chino (CHO-HB-K1) y una segunda línea celular de leucemia de células T (Jurkat), que sirve como modelo de línea tumoral. Ambas líneas celulares fueron suministradas por el laboratorio de genética de poblaciones y mutacarcinogénesis de la Universidad de Antioquia. Dichas líneas fueron propagadas de manera rutinaria en medio de cultivo RPMI 1640 (SIGMA), suplementado con 10% de suero bovino fetal (GIBCO), 100 µg/mL de penicilina (GIBCO), 100 µg/mL de estreptomycin y L-Glutamina 200 mM. Los cultivos celulares se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda > 95% y de CO₂. Se realizaron subcultivos sembrando 2 x 10⁵ células de las líneas celulares anteriormente descritas en cajas T25 (FALCON), en 5 mL de medio RPMI 1640 (SIGMA) suplementado, hasta obtener los cultivos en crecimiento exponencial. Bajo estas condiciones se evaluaron durante 12 horas de tratamiento el efecto de las concentraciones de los extractos de *Svenssea zeai*, *Ircinia campana* e *Hyatella intestinales*.

3.2.1. Línea celular Jurkat (ATCC TIB-152)

Línea leucémica linfoide, establecida a partir de células de sangre periférica de un niño de 14 años de edad con leucemia aguda de linfocitos T. El cariotipo es pseudodiploide, muchas células presentan poliploidía, pero los cromosomas X y Y son normales. Las células en cultivo crecen en suspensión, adoptan una morfología de linfoblastos y se agregan formando racimos (Figura 1).

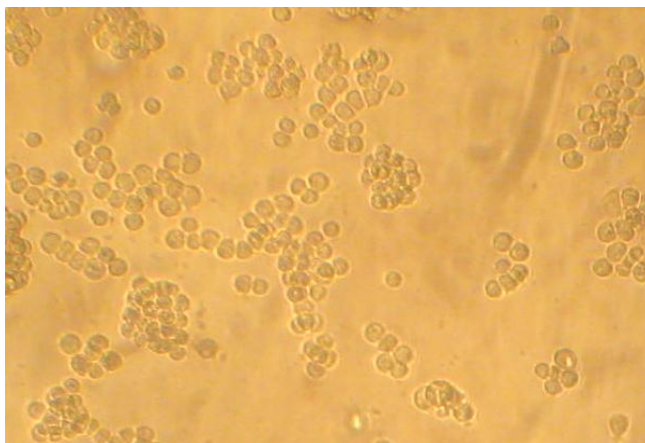


Figura 1. Células Jurkat en cultivo, observadas en microscopio invertido, 10X

3.2.2. Línea celular CHO-K1

La línea CHO-K1, de tipo fibroblasto, es el resultado del aislamiento de un subclón de la línea parental CHO, obtenida a partir de una biopsia de ovario de hámster chino adulto (*Cricetulus griseus*) por T. T. Puck en 1957. Se caracteriza por su morfología fusiforme y por tener un número modal de 19-20 cromosomas, y un tiempo de generación de 13-15 horas, las células crecen en monocapa hasta llegar a confluencia a partir de la cual pierden viabilidad (Figura 2).

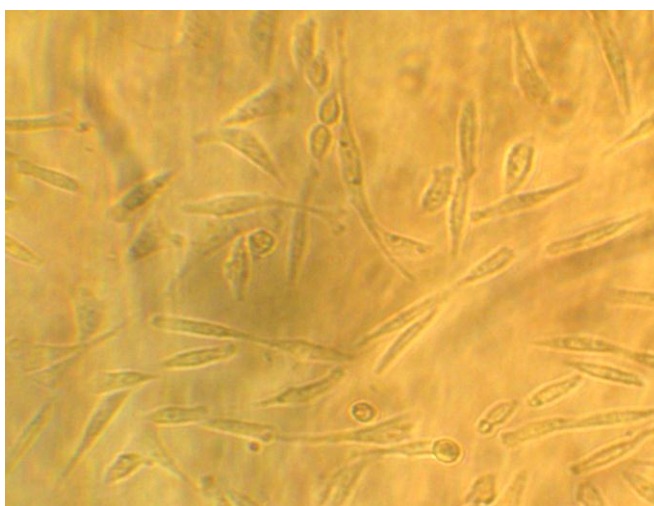


Figura 2. Células CHO-K1 en cultivo, observadas en microscopio invertido, 10X.

3.3. PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD

3.3.1. Evaluación de la toxicidad media con MTT

Se empleó el ensayo MTT, con el fin de determinar el 50% de inhibición de crecimiento (IC_{50}) en las líneas celulares CHO-HB-K1 y Jurkat con los diferentes solventes (metanólico, hexánico y diclorometánico) de los extractos de las esponjas *I. campana*, *N. erecta*, *S. zeai*. Este ensayo, se basa en la reducción enzimática del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a formazán (Coloración celular azul) por medio de la succinato-deshidrogenasa mitocondrial, permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas.

Para la prueba, se sembraron por triplicado 10.000 células en microplatos de 96 pozos en medio RPMI al 5% y a las 24 horas de subcultivo las células fueron tratadas con 25, 50, 100, 200, 300 $\mu\text{g/mL}$ de los extractos metanólico (MetOH), hexánico, diclorometánico de cada esponja. Una vez cumplidas las 24 horas de tratamiento, se adicionó a los cultivos 5 mg/ml de MTT [Sigma M2128] (Koeschek, *et al* 2007), se incubaron a 37°C por 4h y posteriormente, se adicionó Isopropanol Ácido (100 μL) para solubilizar los cristales de formazán producidos. Los platos de cultivo fueron incubados por 30 minutos en constante agitación y posteriormente se determinó su absorbancia (densidad óptica) a 570nm en lector de Elisa. Se determinó la media de las tres lecturas de cada tratamiento y se contrastó con la media de la absorbancia del medio simple empleado como control negativo.

El porcentaje de Viabilidad se obtuvo de la siguiente forma:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{*DO células tratadas}}{\text{DO células control}} \times 100$$

*DO: Densidad óptica y absorbancia

3.3.2. Prueba de proliferación celular con azul de tripano

La prueba de proliferación celular se realizó por triplicado con el fin de evaluar el efecto de los extractos sobre el crecimiento y viabilidad de las líneas celulares CHO-HB-K1 y Jurkat en cultivos en fase exponencial de crecimiento. Para realizar el experimento, se sembraron $7,5 \times 10^4$ células por pozo en platos de 24 pozos y 1,5 mL de medio completo de cultivo; al segundo día post-siembra se trataron con las dosis establecidas (50 a 98 $\mu\text{g/mL}$) medianamente citotóxicas (IC_{50}) de cada uno de los extractos y se evaluaron en los periodos de 24, 48, 72 y 96 horas. Como control negativo se utilizó etanol $<0.1\%$, correspondiente a la concentración del disolvente empleada en los extractos. En cada periodo de tiempo evaluado, se tomaron alícuotas de 100 μL , se realizó conteo de las células utilizando cámara de Neubauer (hemocitómetro) y se estimó el número de células viables en relación al número total de células en el cultivo, mediante coloración con azul de tripano al 0.4%. Estos datos se utilizaron para realizar las curvas de proliferación celular.

3.3.3. Eficiencia de Clonación

La prueba de eficiencia de clonación consistió en tratar a las células CHO-HB-K1 con los extractos, durante un tiempo y una concentración deseada y después diluir las células y sembrarlas a una baja densidad (200 a 400 células/caja de petri). Si el extracto es inhibidor de la proliferación (efecto citotóxico) entonces, no se forma una colonia o posiblemente se genera una colonia muy pequeña. Si el extracto no tiene estos efectos, se formará una colonia grande. Se considera una colonia apropiada, aquella que después de 8 días de cultivo tenga 50 o más células y que por lo menos haya tenido 6 ciclos de división celular, en el caso de la línea celular el tiempo de generación es de 14 horas por lo tanto ha experimentado mas de 10 ciclos de división en 8 días de cultivo (Figura 3).

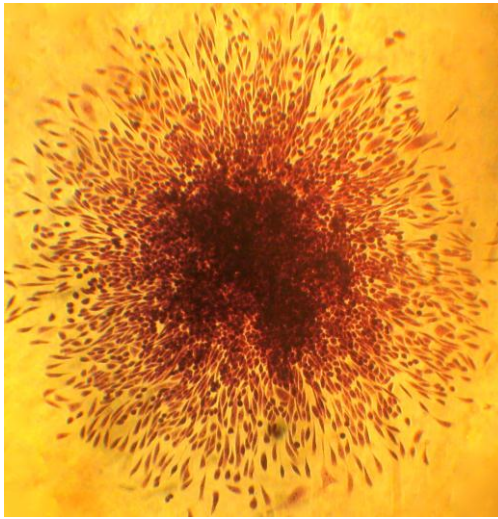


Figura 3. Colonia individual del extracto diclorometánico de la esponja marina *Svenzea zeai*, fotografiada con el objetivo 10x, en microscopio invertido.

En estos experimentos, realizados por triplicado, se determinó el número de células capaces de formar colonias derivadas del número inicial de células cultivadas de CHO-HB-K1, tratadas durante un ciclo (14 horas) con los extractos (50 a 98 $\mu\text{g/mL}$) de las esponjas *I. campana*, *N. erecta* y *S. zeai*. Se realizaron siembras de 2×10^5 células CHO-HB-K1 en 4,5 mL de medio completo en cajas T25 (FALCON). Se evaluaron durante 14 horas de tratamiento el efecto de las concentraciones de los extractos; se detuvo la acción del tratamiento realizando lavados con PBS 1X, seguido de un desprendimiento de las células con Tripsina al 0.05%. Se incubaron 200 células en cajas de petri con 5 mL de medio completo a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO_2 . El solvente etanol <1% en medio de cultivo se utilizó como control. Para realizar el conteo de las colonias después de nueve días de incubación, fue necesario realizar una tinción con cristal violeta 0.5% (en 25% de metanol). Para realizar el conteo de las colonias se dibujó un cuadrante en las cajas y los resultados se expresaron como porcentaje de eficiencia de clonación absoluta y relativa por tipo de tratamiento, de cada una de las esponjas.

3.4. Evaluación del efecto en el ciclo celular por función de acumulación

La función de acumulación se evaluó por duplicado mediante la frecuencia de células en mitosis (IM) vs células totales (mitóticas más interfásicas) en cultivos realizados bajo condiciones de tratamiento anteriormente descritas e induciendo el bloqueo con Colcemid (0.2 ug/ml). Después del tratamiento a cada una de las líneas celulares se les realizó un lavado con medio RPMI 1640 y se muestreó de manera seriada a 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 horas de bloqueo con Colcemid para la línea celular CHO-HB-K1 y 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18 horas a través del ciclo celular de la línea celular Jurkat (tablas 5 y 6). Para la obtención de extendidos cromosómicos, se usó la citogenética convencional mediante la técnica de goteo en placa húmeda (Camargo, 2004), así: las células se trataron con solución hipotónica de citrato de sodio al 0,7% y KCl al 0,56%, se centrifugaron inmediatamente a 4000 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 en agua con hielo. Luego se flameó en el mechero para secar las placas y eliminar el exceso de fijador, se realizó la tinción de las células con Giemsa al 5% durante 10 minutos. Las placas se observaron al microscopio con objetivo 40X, se contaron aproximadamente 2000 células por tratamiento, diferenciando células mitóticas de interfásicas en campos escogidos al azar y sin agregados celulares.

Tabla 4. Protocolo de tratamiento para función de acumulación con los extractos de esponjas marinas en un ciclo (18 horas) de la línea celular Jurkat.

No de Cultivo	Tiempo de adición de Colcemid (h)	Cosecha (h)
1	0	18
2	2	18
3	4	18
4	6	18
5	8	18
6	10	18
7	12	18
8	14	18
9	16	18
10	18	18

Tabla 5. Protocolo de tratamiento para función de acumulación con los extractos de esponjas marinas en un ciclo (14 horas) de la línea celular CHO-K1.

No de Cultivo	Colcemid (h)	Cosecha (h)
1	0	14
2	2	14
3	4	14
4	6	14
5	8	14
6	10	14
7	12	14
8	14	14

Los datos de las tablas 5 y 6, se tomaron en cuenta para elaborar las curvas de función de acumulación por medio de las siguientes fórmulas matemáticas:

$$1. \text{ IM} = \frac{\# \text{ células mitóticas}}{\# \text{ células totales}} \times 100$$

$$2. \text{ Log (1+IM)}$$

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

3.5. PRUEBAS DE GENOTOXICIDAD

Con objeto de evaluar la genotoxicidad de los agentes genotóxicos presentes en los extractos, se sembraron 2×10^5 células en 4,5 mL de medio completo en cajas T25 (FALCON). Bajo estas condiciones se evaluaron durante 14 horas para la línea celular CHO-K1 y 18 horas para Jurkat los extractos de esponjas marinas. Para evaluar el efecto clastogénico se empleó el test de aberraciones cromosómicas (AC) en células mitóticas metafásicas y para determinar la capacidad de reparación y proliferación se realizó el test de intercambio de cromátidas hermanas (ICH). Como control positivo se utilizó $1\mu\text{g/mL}$ de Mitomicina C en medio de cultivo.

3.5.1. Test de aberraciones cromosómicas (AC)

Para realizar el análisis de genotoxicidad, se tomó la totalidad de células de cultivos tratados durante 14 y 18 horas de las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat respectivamente, realizados bajo las mismas condiciones de los ensayos de función de acumulación, pero con la adición de Colcemid (Invitrogen) dos horas antes de la cosecha para garantizar un alto índice mitótico en todos los tratamientos. Luego de obtener placas de cada tratamiento mediante la técnica descrita anteriormente (sección 3.4), las preparaciones se observaron al microscopio con objetivo de 100X se identificaron 100 células mitóticas metafásicas con dotación cromosómica completa y buena distribución. La presencia de daños cromosómicos en cada mitosis analizada se clasificaron como quiebres cromatídicos (B), quiebres cromosómicos y fragmentos acéntricos (BB), cromosomas dicéntricos (DC), cromosomas en anillo (R) y figuras multirradiadas (MR). Los datos obtenidos fueron registrados en el formato estándar diseñado para ese fin (Camargo, 2004) y algunas imágenes representativas fueron capturadas por medio de cámara digital adaptada al microscopio (*Olympus CX41*).

3.5.2. Test de Intercambio entre Cromátidas Hermanas (ICH)

Se cultivaron por duplicado 2×10^5 células de las líneas CHO-HB-K1 y Jurkat hasta crecimiento exponencial. Luego se agregó BrdU (1mg/ml) y se dejó actuar durante dos ciclos (36 horas para CHO-HB-K1 y 48 horas para Jurkat). Antes de cumplir el tiempo requerido para la cosecha, se agregó el extracto de la esponja durante 14 y 18 horas a las células de CHO-HB-K1 y Jurkat, respectivamente. El bloqueo mitótico se realizó dos horas antes de la cosecha. Se obtuvieron extendidos cromosómicos en placa húmeda con la metodología descrita anteriormente (Sección 3.4). El número de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) fueron contadas en 50 metafases de segundo ciclo, los resultados fueron expresados como la frecuencia de ICH por metafase.

3.5.3. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los experimentos de viabilidad, proliferación celular, índice mitótico, eficiencia de clonación, aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas fueron tabulados, procesados y graficados en Excel, y analizados estadísticamente mediante el programa STATISTICA 6.0. Se aplicaron pruebas de no normalidad como la de Shapiro-Wilks (W) y de diferencias entre medias como la de Mann-Whitney.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Prueba de viabilidad y proliferación de las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat

Los resultados obtenidos mediante el ensayo MTT se graficaron como curvas de viabilidad para determinar la dosis media de toxicidad (IC_{50}) y determinar la tendencia del efecto de las concentraciones de los extractos sobre la línea celular evaluada. Finalmente se determinaron las concentraciones por extrapolación en el eje X (figuras 4, 5 y 6) con los cuales se realizaron los análisis de los biomarcadores citotóxicos: Índice Mitótico (IM), Eficiencia de Clonación (EC), proliferación celular, efecto en el ciclo celular) y genotóxicos: Aberraciones Cromosómicas (AC) e Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH) (tabla 6).

Tabla 6. Concentración de citotoxicidad media (IC_{50}) de la línea celular Jurkat por medio del ensayo MTT.

Esponja Marina	Solvente	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Ircinia campana</i>	Metanol	60
	n-Hexano	62
	Diclorometano	75
<i>Niphates erecta</i>	Metanol	85
	n-Hexano	70
	Diclorometano	98
<i>Svenzea zeai</i>	Metanol	55
	n-Hexano	50
	Diclorometano	60

Los extractos mostraron una disminución significativa ($p < 0,05$) en la viabilidad celular de Jurkat a partir de las 24 horas de tratamiento, disminuyendo el 90% con las máximas concentraciones (100 y 200 $\mu\text{g/mL}$). Los resultados muestran que existen diferencias significativas entre la viabilidad celular promedio de los cultivos celulares sometidos a diferentes concentraciones de los extractos (25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$). Aunque, la concentración de los extractos diclorometánicos de *Ircinia campana* y *Niphates erecta* muestran diferencia significativa respecto a las concentraciones de los extractos metanólicos y n-hexánicos de *Ircinia campana* y *Niphates erecta*. Por otro lado, las concentraciones de los extractos metanólicos, n-hexánicos y diclorometánicos de la esponja *Svenzea zeai* (Figura 11), no muestran diferencia significativa, pero se acercan más al comportamiento de las concentraciones de los extractos metanólicos y n-hexánicos de *Ircinia campana*.

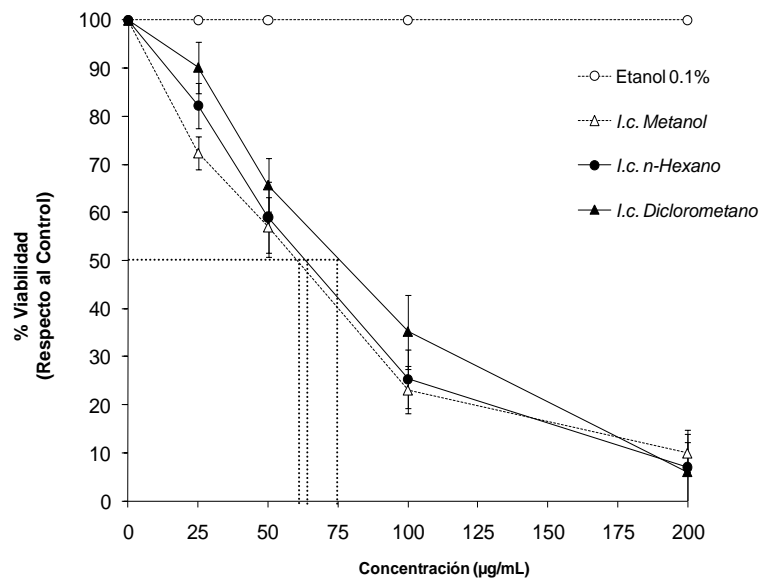


Figura 4. Curvas de viabilidad mediante MTT en la línea celular Jurkat, tratadas con los extractos de *I.c* metanol (60 $\mu\text{g/mL}$), *I.c* n-hexano (62 $\mu\text{g/mL}$), *I.c* diclorometano (75 $\mu\text{g/mL}$) y control solvente (Etanol 0.1%), para determinar la dosis de citotoxicidad media.

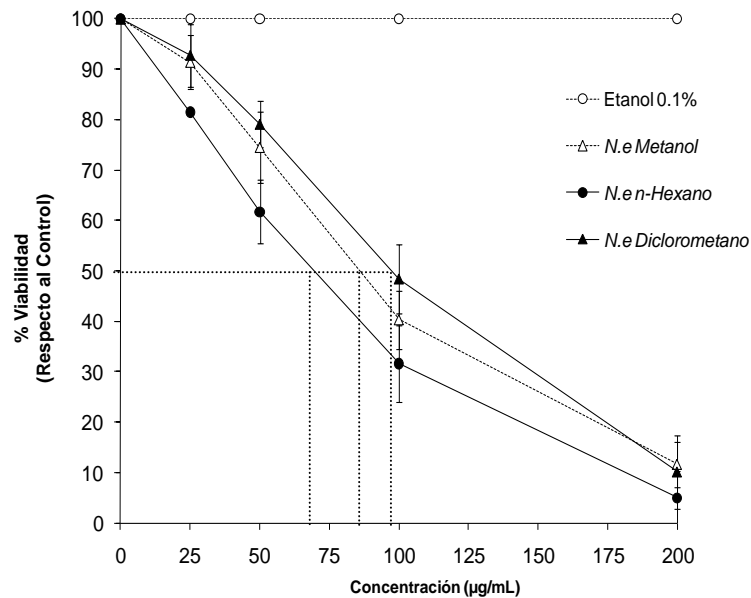


Figura 5. Curvas de viabilidad mediante MTT en la línea celular Jurkat, tratadas con los extractos de *N.e* metanol (85 µg/mL), *N.e* n-hexano (70 µg/mL), *N.e* diclorometano (98 µg/mL) y control solvente (Etanol 0.1%), para determinar la dosis de citotoxicidad media.

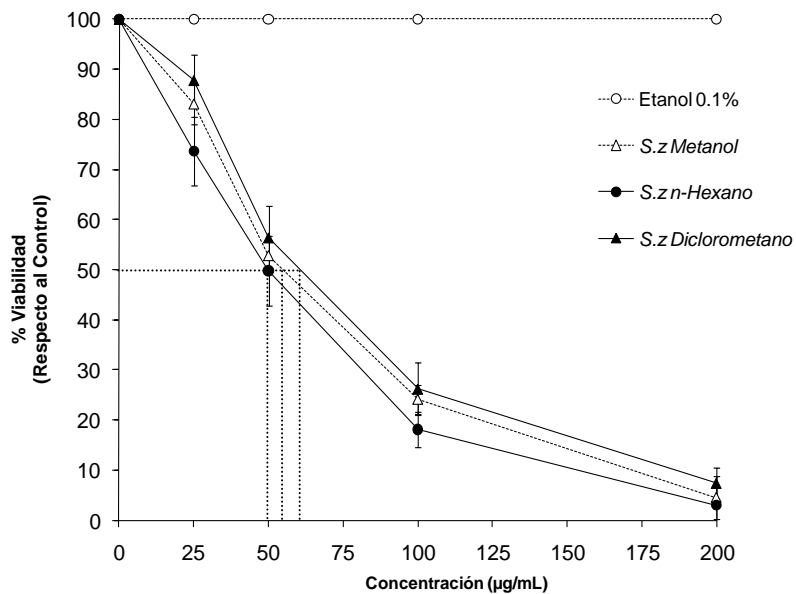


Figura 6. Curvas de viabilidad mediante MTT en la línea celular Jurkat, tratadas con los extractos de *S.z* metanol (55 µg/mL), *S.z* n-hexano (50 µg/mL), *S.z* diclorometano (60 µg/mL) y control (Etanol 0.1%), para determinar la dosis de citotoxicidad media.

4.2. PRUEBA DE PROLIFERACIÓN CELULAR CON AZUL DE TRIPANO

Las células Jurkat tratadas con los extractos metanólicos, hexánicos y diclorometánicos de *Ircinia campana* mostraron efecto antiproliferativo de 60-70% \pm 0.15-0.06 a las 24 horas de tratamiento. A las 48 horas se observó una recuperación celular superior al 80%, seguido de un leve aumento a las 72 horas, el cual se mantiene hasta las 96 horas. Los resultados indican un posible efecto citostático respecto al tiempo. El extracto diclorometánico después de las 24 horas de tratamiento mostró un descenso significativo ($p < 0,05$) comparado con el control (sin solvente) sugiriendo la presencia de metabolitos activos en dicho solvente que pueden actuar a nivel de división celular impidiendo la proliferación celular (Figura 7) y dependiendo del tiempo de exposición a dichos compuestos.

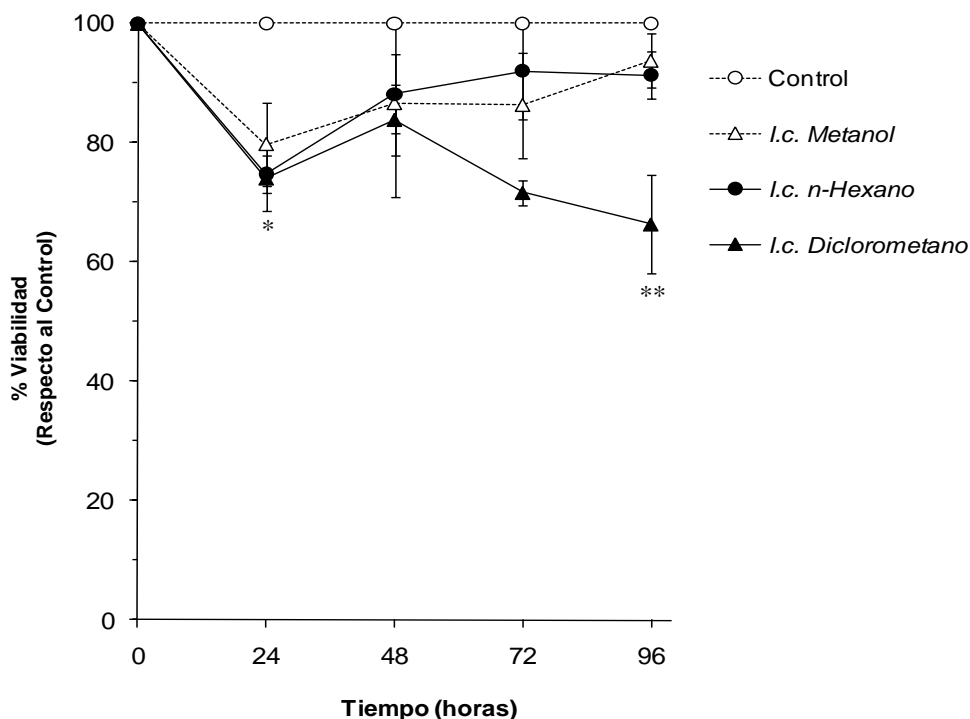


Figura 7. Número total de células viables tratadas con diferentes solventes del extracto de *Ircinia campana* a 24, 48, 72 y 96 horas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Los extractos hexánico, metanólico y diclorometánico de la esponja *Niphates erecta*, mostraron inhibición de crecimiento de la línea celular Jurkat a las 24 horas, con la misma tendencia de *Ircinia campana* sin obtener diferencias significativas entre las muestras, pero sí con respecto al control. Después de 48, 72 y 96 horas de recuperación, las células muestran una viabilidad del 90%. (Figura 8), por tanto no hay un efecto dependiente del tiempo de dichos extractos, debido posiblemente a que las células recuperan su maquinaria celular después de las 24 horas, continuando con sus procesos de división celular.

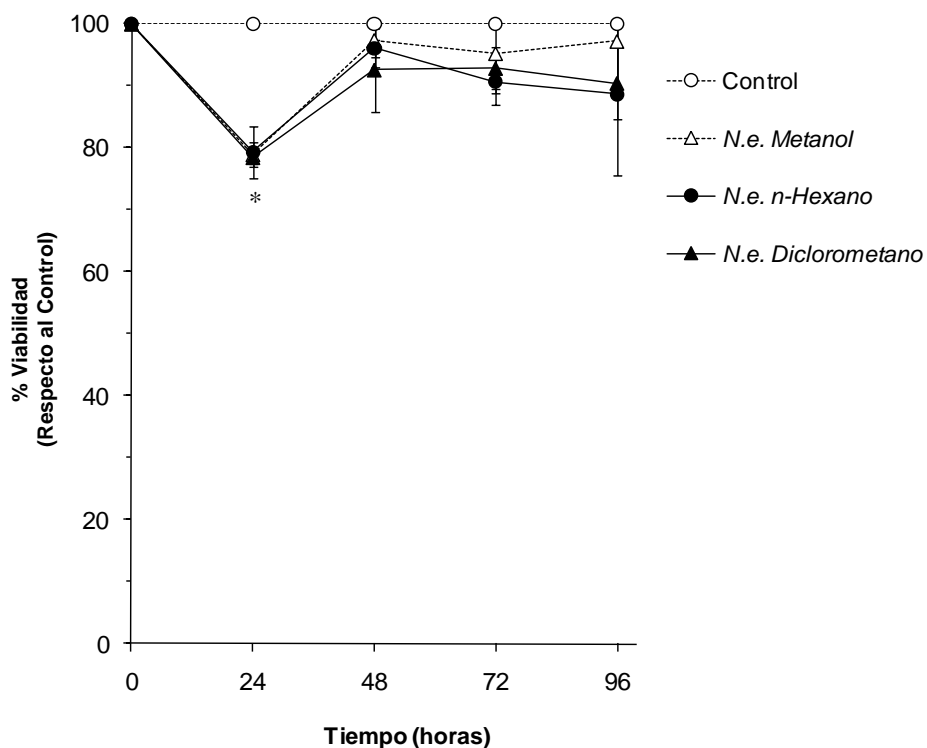


Figura 8. Número total de células viables tratadas con diferentes solventes del extracto de *Niphates erecta* a 24, 48, 72 y 96 horas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Al igual que lo obtenido con los extractos de *Ircinia campana*, la concentraciones evaluadas para la línea celular Jurkat con los extractos de *Svenzea zeai* afectan significativamente la viabilidad durante las primeras 24 horas de tratamiento. Sin embargo se observa un leve aumento de viabilidad después de las 48 horas y

vuelve a una disminución después de las 72 horas hasta las 96 horas. El extracto metanólico presentó mayor diferencia entre las muestras y respecto al control (Figura 9). Este hallazgo, puede mostrar que el efecto en el ciclo celular, sea dependiente del tiempo e inhiba la proliferación celular de dicho tratamiento. Finalmente, los resultados de esta prueba demuestran que los tratamientos no afectan notablemente la viabilidad celular, ya que en todos los casos evaluados, ésta no disminuyó más del 60%, indicando recuperación celular con respecto al tiempo.

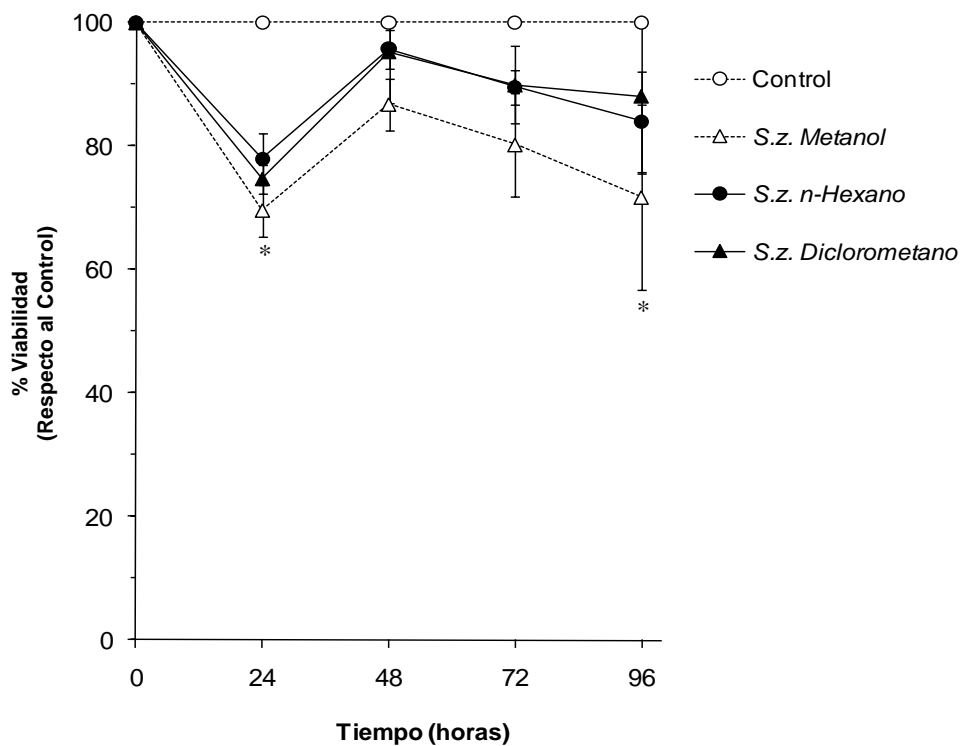


Figura 9. Número total de células viables tratadas con diferentes solventes del extracto de *Svenzea zeai* a 24, 48, 72 y 96 horas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.3. EFICIENCIA DE CLONACIÓN

La tabla 8, resume los resultados de las pruebas de eficiencia de clonación absoluta y relativa (ECA, ECR) obtenidas en células CHO-K1 tratadas durante 14 horas con las concentraciones de los diferentes extractos. La eficiencia de clonación absoluta del grupo control fue de 77%, la cual está dentro del rango de 50-80% aceptado internacionalmente (Li *et al*, 1987).

El extracto hexánico de *Ircinia campana* generó una clonabilidad mayor del 50% (figura 10), esto demuestra la baja citotoxicidad de este extracto, mientras que para los extractos metanólico (ECR: 17%) y diclorometánico (ECR: 6,5%) se observó baja clonabilidad, siendo la más baja respecto al control el extracto diclorometánico, es decir, que de cada 100 células tratadas, 83 y 93.5 tienen la capacidad potencial de mostrar un eventual daño causado por el extracto durante el tratamiento (figura 11).

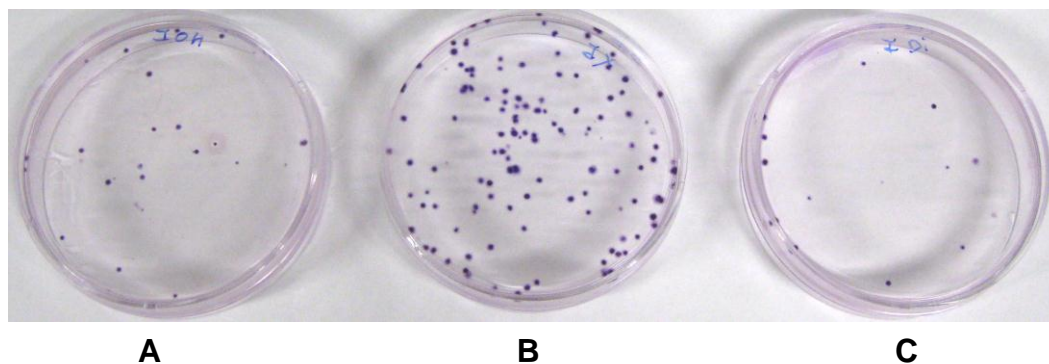


Figura 10. Eficiencia de clonación de células CHO-K1 con los extractos de *Ircinia campana*. (A: *I.c* metanol, B: *I.c* hexano, C: *I.c* diclorometano).

Tabla 7. Eficiencia de clonación obtenida en células CHO-K1 tratadas con los extractos de esponjas marinas a 14 horas de exposición.

Tratamiento	Extracto	Número de colonias	ECR (%)	ECA (%)
Control		154	100	77
<i>Ircinia campana</i>	Metanol	25,5	17	13
	n-Hexano	101	66	51
	Diclorometano	10	6.5	5
<i>Niphates erecta</i>	Metanol	57	37	29
	n-Hexano	54	35	27
	Diclorometano	75	49	38
<i>Svenzea zeai</i>	Metanol	90,5	59	45
	n-Hexano	51,5	33	26
	Diclorometano	138	90	69

*: Cada % es el promedio de un experimento por triplicado.

ECR: eficiencia de clonación relativa, expresando número de colonias en cada tratamiento relativo a un control no tratado.

ECA: Eficiencia de clonación absoluta dada en % de colonias detectadas por caja a partir de 200 células sembradas.

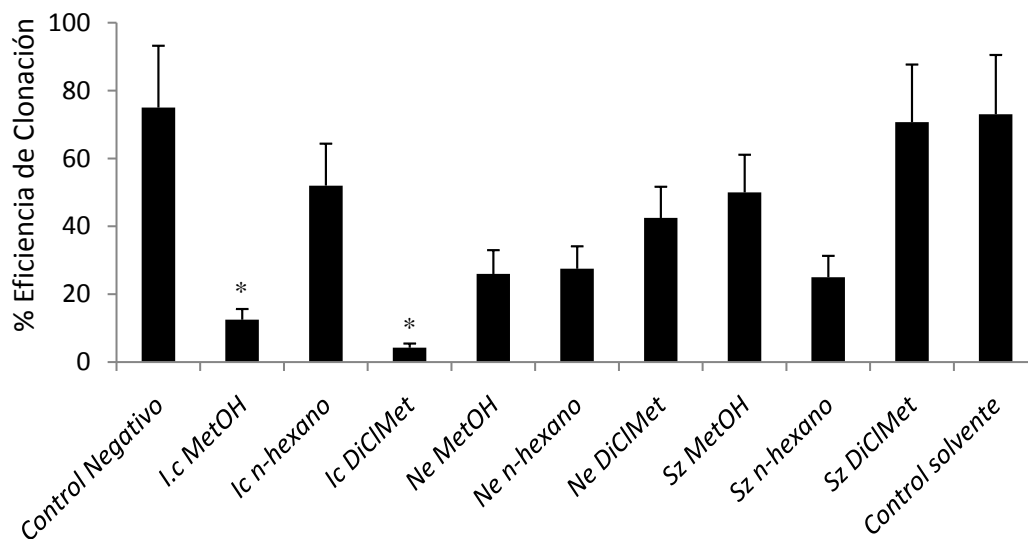


Figura 11. Eficiencia de clonación relativa de la línea celular CHO-K1 con los extractos crudos de las esponjas marinas *Ircinia campana*, *Niphates erecta* y *Svenzea zeai*.

Las figuras 11 y 12 muestran claramente que los extractos metanólico (37%), hexánico (35%) y diclorometánico (49%) de la esponja *Niphates erecta*, disminuyen la clonabilidad de las células menos del 50%. Los extractos metanólico y hexánico muestran efecto citotóxico alto mientras que el extracto diclorometánico muestra un efecto moderado sobre la línea celular. Finalmente, el extracto de *Svenzea zeai*, mostró un efecto citotóxico significativo (33%) (Figura 11). Los extractos metanólico y diclorometánico no mostraron efecto citotóxico ya que la eficiencia de clonación relativa fue considerablemente mayor al 50%. Las colonias observadas en dichos extractos fueron grandes y bien formadas, ya que después de 8 días de cultivo, tiene más de 50 células, por lo que ha experimentado más de 6 ciclos de división celular (figura 13).

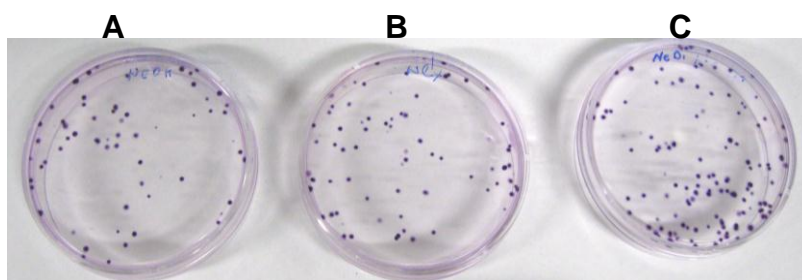


Figura 12. Eficiencia de clonación de células CHO-K1 con los extractos de *Niphates erecta*. (A: *N.e* metanol, B: *N.e* hexano, C: *N.e* diclorometano).

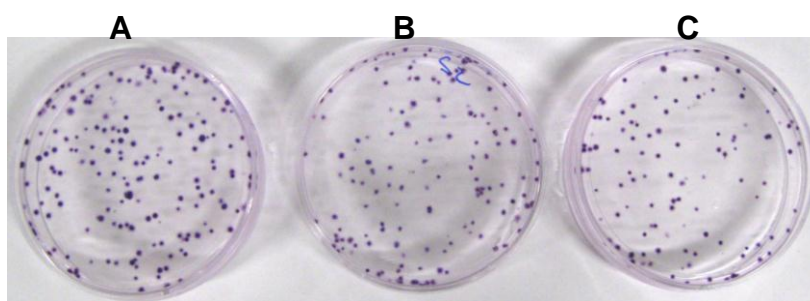


Figura 13. Eficiencia de clonación de células CHO-K1 con los extractos de *Svenzea zeai*. (A: *S.z* metanol, B: *S.z* hexano, C: *S.z* diclorometano).

4.4. EFECTO EN EL CICLO CELULAR

En los resultados obtenidos para determinar el efecto en el ciclo celular de las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat tratados 14 y 18 horas respectivamente, se observa en las figura 14 que no hay diferencia significativa en el índice mitótico (IM) del extracto hexánico respecto al control, lo cual significa que este extracto no afecta la distribución de fases del ciclo en estas células, mientras que los extractos metanólico y diclorometánico de la esponja marina *Ircinia campana*, demuestran un leve retraso en el ciclo celular, siendo más significativo en las primeras 8 horas, mientras que, los experimentos con Jurkat presentan una ligera disminución en los índices mitóticos de las células tratadas con los extractos metanólicos, hexánicos y diclorometánicos de *Ircinia campana*, respecto al control no tratado (Figura 14). Por otro lado, el análisis de los extractos de la esponja marina *Niphates erecta* e *Ircinia campana*, no muestran efectos sobre el ciclo celular de ninguna de las dos líneas celulares. Sin embargo los extractos de *Niphates erecta* evidencia un comportamiento similar del extracto diclorometánico respecto al control y de una disminución leve de los extractos metanólico y hexánico, siendo más evidente a partir de las primeras 10 horas en la línea celular CHO-K1 y 6 horas en Jurkat (Figuras 16 y 17). Por su parte, el extracto hexánico de la esponja marina *Svenzea zeai*, si demuestra tener efectos sobre el ciclo celular, ya que se observó un disminución significativa respecto a los controles y los demás extractos, siendo evidente en las primeras 6 horas para CHO-K1 y 4 horas para Jurkat (Figuras 18 y 19) . Estos resultados sugieren una estrecha relación entre el efecto citotóxico de este extracto presentando en la prueba de eficiencia de clonación y su acción inhibitoria del índice mitótico en las dos líneas celulares, ya que los extractos que tienen efecto letal para las células, también disminuyen o inhiben el flujo de células hacia la etapa de mitosis.

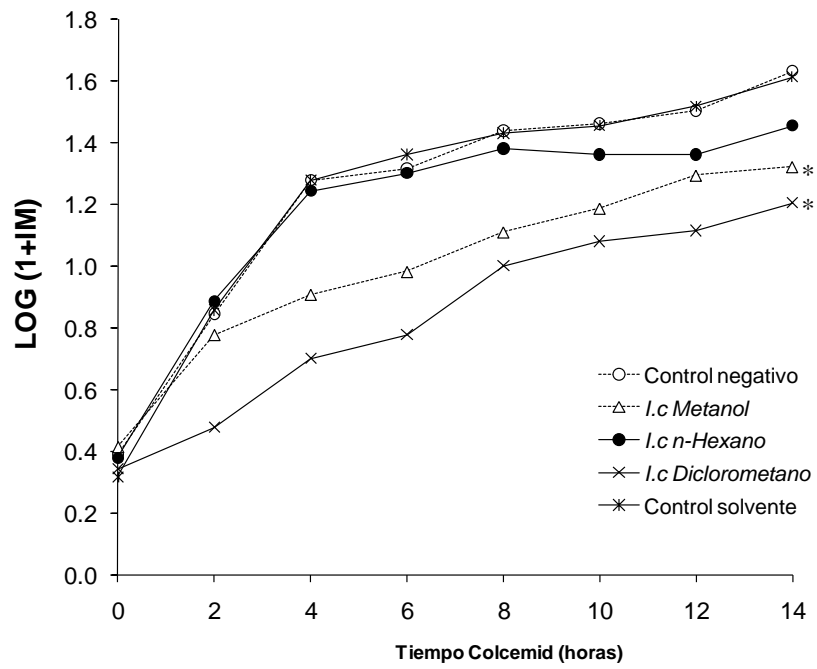


Figura 14. Función de acumulación de la línea celular CHO-K1, con el extracto de la esponja *Ircinia campana*.

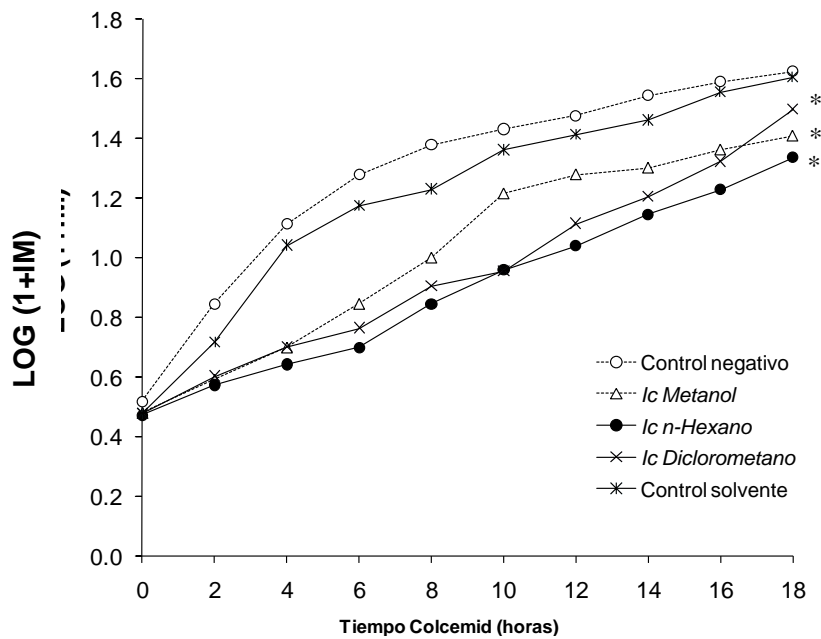


Figura 15. Función de acumulación de la línea celular Jurkat, con el extracto de la esponja *Ircinia campana*.

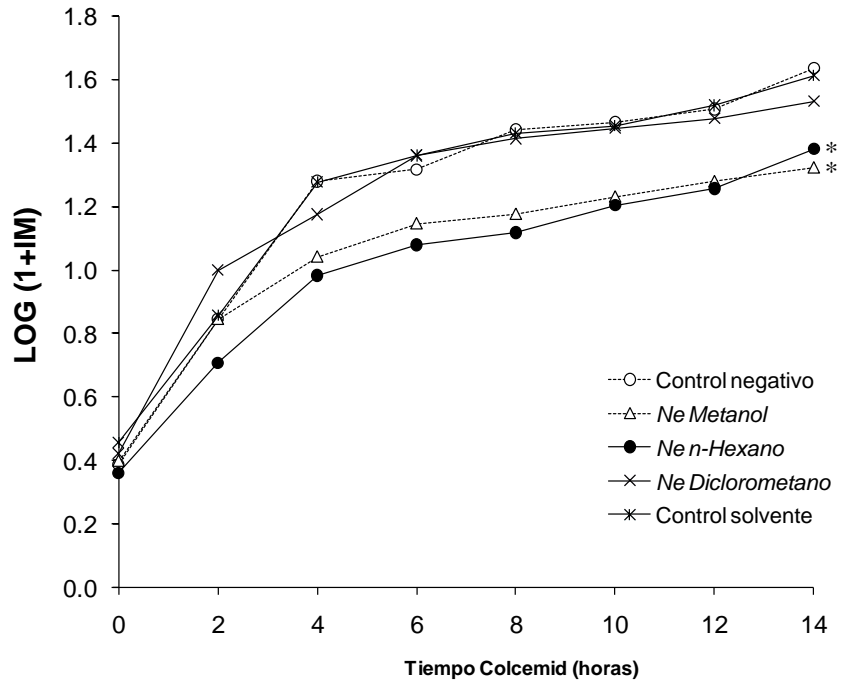


Figura 16. Función de acumulación de la línea celular CHO-K1, con el extracto de la esponja *Niphates erecta*.

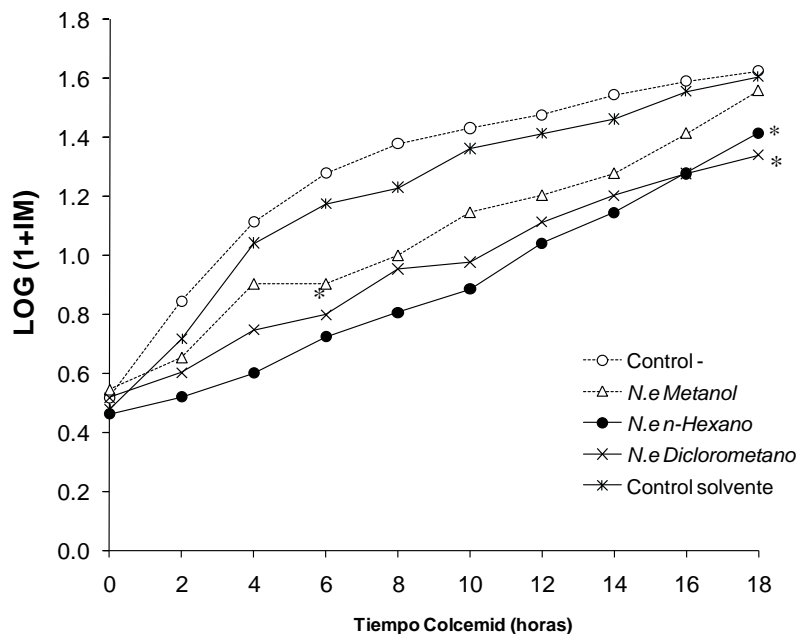


Figura 17. Función de acumulación para la línea celular Jurkat, con el extracto de la esponja *Niphates erecta*.

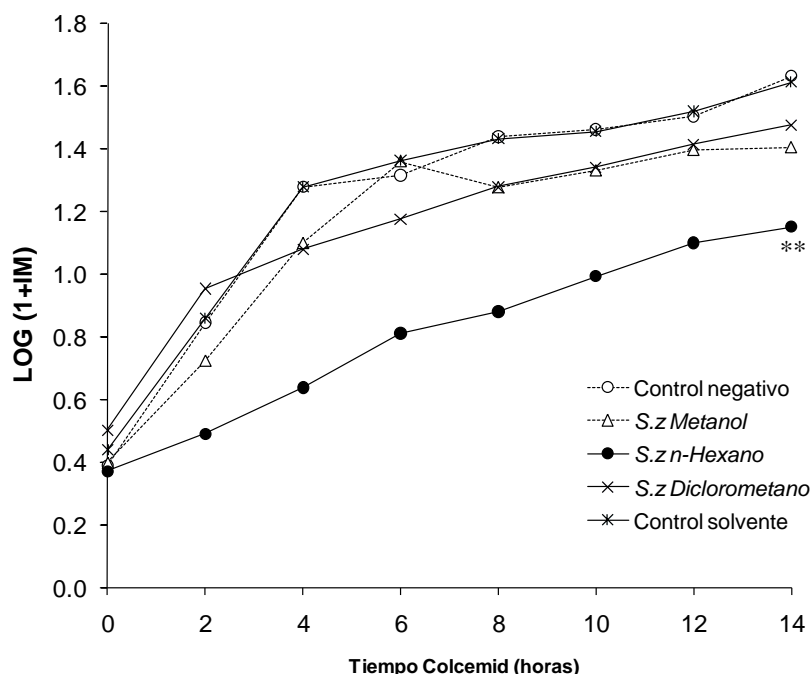


Figura 18. Función de acumulación de la línea celular CHO-K1, con el extracto de la esponja *Svenzea zeai*.

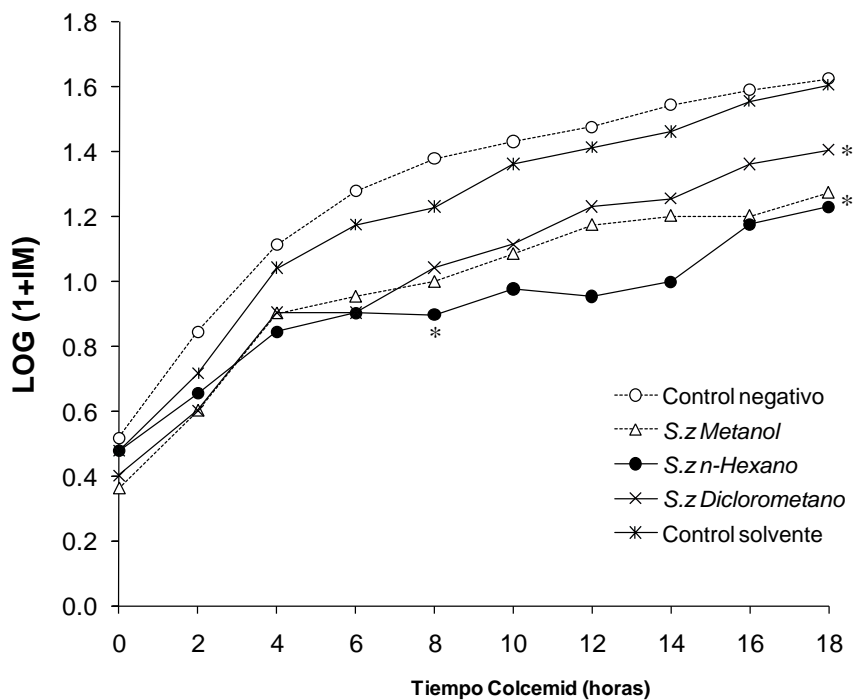


Figura 19. Función de acumulación de la línea celular Jurkat, con el extracto de la esponja marina *Svenzea zeai*.

A partir de las evidencias y resultados obtenidos hasta este punto, se puede inferir que el efecto inhibitorio de todos los extractos no es inmediato (Figura 24), sino que se manifiesta como mínimo 3 horas después de iniciado el tratamiento como le demostró el extracto diclorometánico de la esponja *Ircinia campana* en las dos líneas celulares. Entonces, existe la posibilidad de que el efecto de los extractos se realice en una etapa del ciclo celular situada al menos 3 horas antes de la mitosis. Por lo tanto, y teniendo en cuenta la duración de las etapas del ciclo celular en estas líneas celulares, estos datos abren la posibilidad de que el efecto puede ser en la etapa G1/S del ciclo celular. En ese caso, sólo las células CHO-HB-K1 y Jurkat que en el momento de suministrar el extracto ya han pasado por la etapa en donde se efectúa el bloqueo, alcanzarían la etapa de mitosis.

Algunas sustancias conocidas como antimitóticas, realizan su efecto inhibitorio, no en mitosis, sino en la etapa de síntesis de ADN, etapa en la cual también se sintetizan algunas de las proteínas del huso acromático. La acumulación de células mitóticas, en este caso, sería una consecuencia posterior de ese efecto inhibitorio.

4.5. PRUEBAS DE GENOTOXICIDAD

4.5.1. ABERRACIONES CROMOSOMICAS (AC)

Se realizó el test de aberraciones cromosómicas en las dos líneas celulares CHO-K1 y Jurkat tratadas con los extractos metanólicos, hexánicos y diclorometánicos de las esponjas marinas *Ircinia campana*, *Niphates erecta* y *Svenzea zeai* durante los tiempos establecidos para cada línea celular. Esta estrategia experimental permite evaluar el potencial clastogénico de los extractos en las líneas celulares. El porcentaje de aberraciones cromosómicas (% AC) alcanzado con los extractos no superó significativamente el obtenido con el control negativo en las dos líneas celulares (figura 20), mientras que el control positivo con MMC (0.1µg/mL)

presentó niveles altos de genotoxicidad en mitosis, representados en diferentes estructuras aberrantes tales como quiebres cromatídicos, quiebres cromosómicos, fragmentos acéntricos, cromosomas dicéntricos, cromosomas en anillo y figuras multiraridas (figura 21).

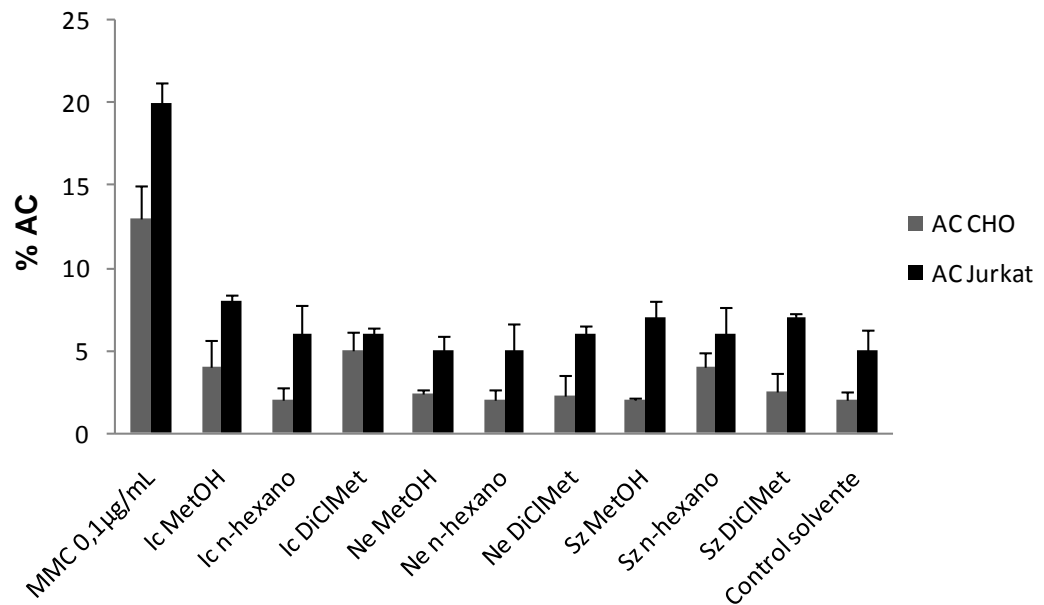


Figura 20. Test de aberraciones cromosómicas (AC) en células CHO-K1 y Jurkat tratadas con los extractos de esponjas marinas *Ircinia campana*, *Niphates erecta* y *Svenzea zeai*.

De estos resultados se puede concluir que, acorde con lo reportado en otros trabajos de investigación (Aiub 2006, Coelho 2008, Bartolotta 2009) sobre el efecto genotóxico de esponjas marinas, éstos no presentan eventual daño en el ADN.

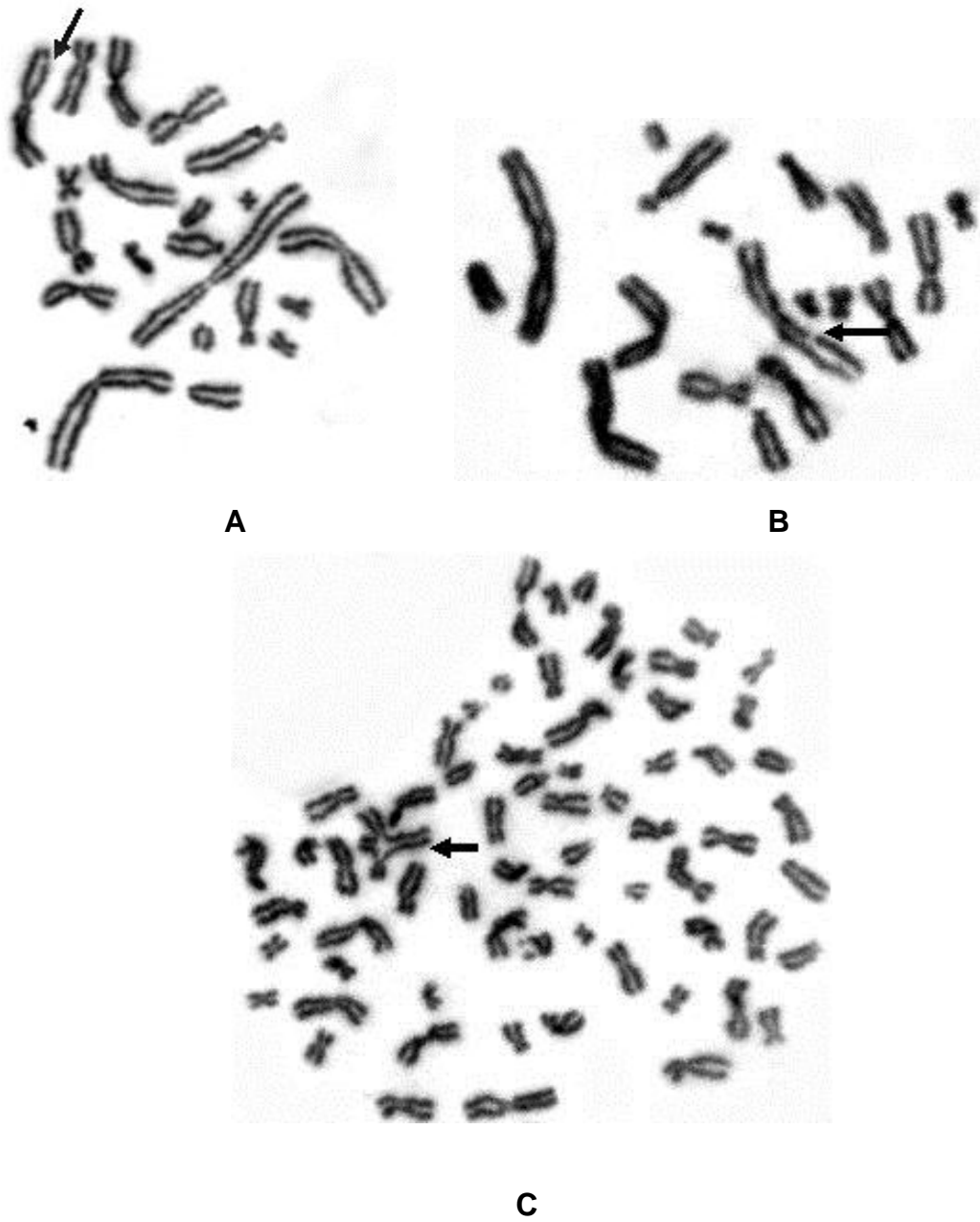


Figura 21. Imágenes representativas de las diferentes aberraciones cromosómicas encontradas en: A y B línea celular CHO-K1 y C: línea celular Jurkat.

4.5.2. INTERCAMBIO ENTRE CROMÁTIDAS HERMANAS (ICH)

En esta prueba, se utilizó el índice de intercambio entre cromátidas hermanas como medida indirecta para evaluar el efecto genotóxico de los extractos. Estos datos complementan la conclusión obtenida en los estudios de aberraciones cromosómicas, indicando que los extractos no ejercen un efecto inhibitorio en la etapa G1/S del ciclo celular, mediante el bloqueo de síntesis de ADN (figura 27).

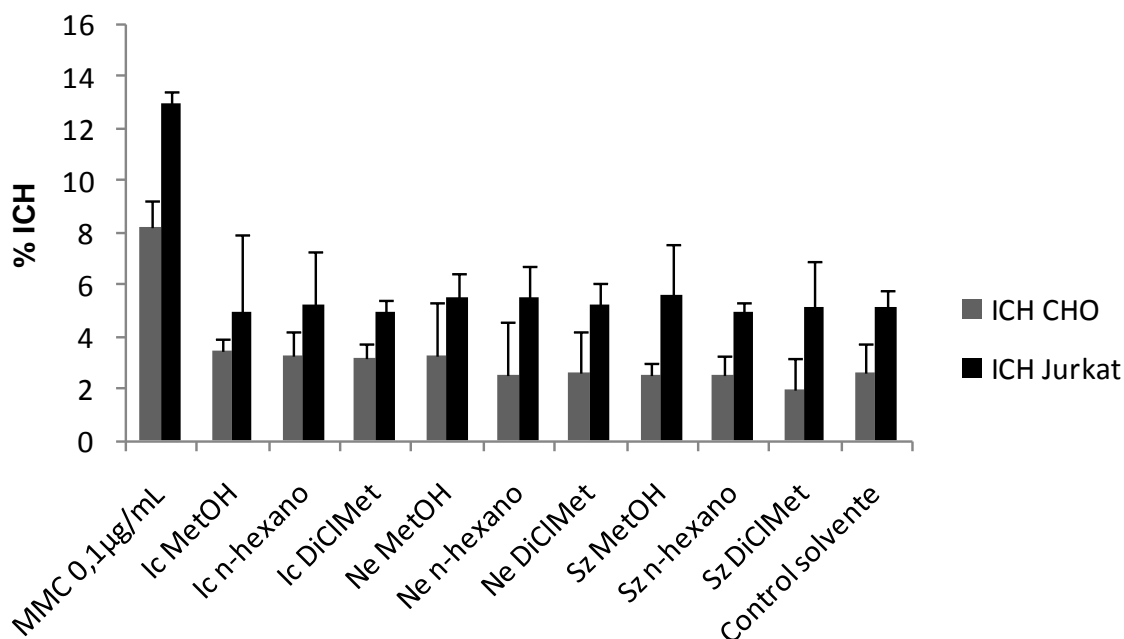


Figura 22. Índice de cromátidas hermanas (ICH) en células CHO-K1 y Jurkat tratadas con los extractos de esponjas marinas *Ircinia campana*, *Niphates erecta* y *Svenzea zeai*.

Hay sustancias que incrementan e inducen los ICH por inhibidores de síntesis de ADN dependiendo de la concentración de los tratamientos (Bartolotta *et al*, 2009). No obstante, debido a que se desconoce el proceso molecular implicado en la formación de ICH y a la presencia ocasional de “falsos positivos y negativos”, la inducción de ICH por parte de los extractos de las esponjas como prueba inequívoca de reparación de clastogénesis y proliferación no es definitiva o concluyente (Coelho 2008).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

A partir de los resultados, se pudo inferir que los extractos hexánico, metanólico y diclorometánico de las esponjas marinas *Ircinia campana*, *Niphates erecta* y *Svenzea zeai* presentaron recuperación celular y efecto citostático después de las 24 horas de tratamiento, debido posiblemente a que las células recuperan su maquinaria celular después de las 24 horas, continuando con sus procesos de división celular. Sin embargo los extractos de *Ircinia campana* y *Svenzea zeai* mostraron efecto en la etapa G1/S del ciclo celular, indicando que estos extractos poseen compuestos bioactivos de interés farmacológico. Estos resultados sugieren una estrecha relación entre el efecto citotóxico de los extractos diclorometánico y hexánico de *Ircinia campana* y *Svenzea zeai*, presentado en la prueba de eficiencia de clonación y su acción inhibitoria del índice mitótico en las dos líneas celulares, ya que los extractos que tienen efecto letal para las células, también disminuyen o inhiben el flujo de células hacia la etapa de mitosis. En las pruebas genotóxicas los extractos evaluados no generaron efecto en las líneas celulares evaluadas.

Finalmente, este es el primer reporte de actividad citotóxica y efecto en el ciclo celular ejercida por los extractos crudos de las esponjas marinas *Ircinia campana* y *Svenzea zeai* sobre dos líneas celulares (CHO-HB-K1 y Jurkat).

Con el fin de tener mayor certeza acerca del efecto de los extractos evaluados se considera pertinente llevar a cabo más experimentos, determinando las fracciones, así como el empleo de otros biomarcadores y el uso de otros sistemas de pruebas tanto *in vitro* como *in vivo*, como linfocitos de sangre periférica y las pruebas en animales de laboratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Aiub, C., Ferreira, F., Mazzei, j., Stankevics, L., Lobo-Hadju, G., Guimaraes, P., y otros. Genotoxic evaluation of extracts from *Aplysina fulva*, a Brazilian marine sponge. *Mutation Research* , 34-41 (2006).

Aneiros, A., & Garateix, A. Biotactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures. *Journal of Chromatography B*, 41-53.(2004).

Arnó, M., Betancur, L., Gonzáles, M., Sierra, J., & Zaragoza, J. Synthesis and cytotoxic activity of novel C7-functionalized spongiane dipertenes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* , 3171-3177 (2003).

Azevedo L.G, Mucillo-Baisch A.L, Filgueira D, Boyle R, Ramos D, Soares A, Lerner C, Silva P, Trindade G. Comparative citotoxic and anti-tuberculosis activity of *Aplysina caissara* marine sponge crude extracts. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C 147, 36-42 (2008).

Bartolotta, S., Scuteri, M., Hick, A., Palermo, J., Rodriguez, M., Hajdu, E., y otros. Evaluation of genotoxic biomarkers in extracts of marine sponges from Argentinean South Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* , 144-147 (2009).

Belarbi, E., Contreras, A., Chisti, Y., Garcia, F., & Molina, E. Producing drugs from marine sponges. *Biotechnology Advances* , 585-598 (2003).

Bell J.J. The Functional Roles of Marine Sponges, Review. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 79, 341-353 (2008).

Blunt, J., Copp, B., Munro, M., Norticote, P., & Prinsep, M. Marine natural products. *Natural Product Reports* , 23-78 (2006).

Bohlin L, Göransson U, Alsmark C, Wedén C and Backlund A. Natural products in modern life science. *Phytochemistry Reviews*, Volume 9, Number 2, Pages 279-301(2010).

Bringman, G., Lang, G., Gulder, T., Tsuruta, H., Muhlbacher, J., Maksimenka, K., y otros. The first sorbillinoid alkaloids, the anileukemic sorbillactones A and B, from a sponge-derived *Penicillium chrysogenum* strain. *Tetrahedron* , 7252-7265 (2005).

Camargo, M. *Manual de laboratorio: Citogenética General*. Medellín: Universidad de Antioquia (2004).

Cardozo, K., Guaratini, T., Barros, M., Falcao, V., Tonon, A., Lopes, N., y otros. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and physiology, Part C* , 60-78 (2007).

Coelho B, Lima C, Oliveira J, Souza Berlinck, Moraes M & Pessoa C. Cytotoxicity and genotoxicity of ingenamine G isolated from the Brazilian marine sponge *Pachychalina alcaloidifera*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* , 409-415 (2008).

Coello L, Martín M.J and Reyes F. 1,5-Diazacyclohenicosane, a New Cytotoxic Metabolite from the Marine Sponge *Mycale* sp. *Mar. Drugs*, 7, 445-450 (2009).

Dunlap, W., Battershill, C., Liptror, C., Cobb, R., Bourne, D., Jaspars, M., y otros. Biomedicinals from the phytosymbionts of marine invertebrates: A molecular approach. *Methods* , 358-376 (2007).

Ely, R., Surpiya, T., & Naik, C. Antimicrobial activity of marine organisms collected of the coast of South East India. *Journal of experimetal marine biology and ecology*, 121-127 (2004).

Emura, C., Higuchi, R., & Miyamoto, T. Ircniasulfonic acid B, a novel taurine conjugated fatty acid derivative from a Japanese marine sponge, *Ircinia* sp. *Tetrahedron* , 5682-5685 (2006).

Erdogan, I., Sener, B., & Higa, T. Tryptophol, a plant auxin isolated from the marine sponge *Ircinia spinulosa*. *Biochemical systematics and ecology* , 793-794 (2000).

Erpenbeck, D., Hooper, J., List-Armitage, S., Degnan, B., Worheide, G., & Soest, R. Affinities of the family *Sollasellidae* (Porifera, Demospongiae). II Molecula evidence. *Contributions to Zoology* , 95-102 (2007).

Freshney, R. *Culture of Animal Cells: A manual of basic technique, Fifth edition*. John Wiley and Sons Inc. (2005).

Galeano, E., & Martínez, A. Antimicrobial activity of marine sponges from Urabá Gulf, Colombian Caribbean region. *Journal de Mycologie Medicale* , 17-24 (2007).

Galeano, E., Higueta, E., & Martínez, A. Triacetato de halistanol, un derivado del metabolito bioactivo de la esponja marina colombiana *Topsentia ophiraphidites*. *VITAE, revista de la facultad de química farmacéutica, Universidad de Antioquia* , 83-87 (2006).

González, C., Pareja, A., Márquez, M., Márquez, D., Martínez, A., & Higueta, E. Efecto citotóxico y clastogénico en linfocitos humanos de la fracción de 5 α , 8 α - Epidioxiesteroides de la esponja marina *Ircinia campana* del Caribe Colombiano. *Acta Farm. Bonaerense* , 75-91 (2005).

Hagger J, Fisher A, Hill S, Depledge M, Jha A. Genotoxic, cytotoxic and ontogenetic effects of tri-*n*-butyltin on the marine worm, *Platynereis dumerilii* (Polychaeta:Nereidae). *Aquatic Toxicology* 57, 243-255 (2002).

Hernández, C., Zubía, E., Ortega, M., & Carballo, J. Sesterpene metabolites from the sponge *Hyatella intestinalis*. *Tetrahedron* , 5392-5400 (2006).

Hickford S, Blunt J, Munro M. Antitumour polyether macrolides: Four new halichondrins from the New Zealand deep-water marine sponge *Lissodendoryx* sp. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17, 2199-2203 (2009).

Iwamoto M, Shimizu H, Muramatsu I, Oiki S. A cytotoxic peptide from a marine sponge exhibits ion channel activity through vectorial-insertion into the membrane. *FEBS Letters* 584, 3995-3999 (2010).

Jimeno, J., Faircloth, G., Fernández, J., Scheuer, P., & Rinehart, K. New marine derived anticancer therapeutics a journey from the sea to clinical trials. *Mar. Drugs*, 14-29 (2004).

Kawakami, A., Miyamoto, T., Higuchi, R., Uchiumi, T., Kuwano, M., & Van, R. Structure of a novel multidrug resistance modulator, irciniasulfonic acid, isolated from a marine sponge, *Ircinia* sp. *Tetrahedron Letters* , 3335-3337 (2001).

Kazanjian, A., & Fariñas, M. Actividades biológicas del extracto acuoso de la esponja *Aplysina lacunosa* (Dorífera: Aplysinidae). *Rev. Biol. Trop* , 189-200 (2006).

Kijjoo, A., & Sawangwong, G. Drugs and cosmetics from the sea. *Mar. Drugs* , 73-82 (2004).

Kijjoo, A., Wattanadilok, R., Campos, N., Nascimento, M., Pinto, M., & Herz, W. Anticancer activity evaluation of Kuanoniamines A and C isolated from the marine sponge *Oceanapia sagittaria*, collected from the Gulf of Thailand. *Mar. Drugs* , 6-22 (2007).

Koeschek, P., Alviano, D., Alviano, C., & Gatas, E. The husk fiber of *Cocus nucifera* L. (palmae) is a source of anti-neoplastic activity. *Braz J. Med. Biol. Res.* 40 , 1339-1343 (2007).

Kuramoto, M., Arimoto, H., & Uemura, D. Bioactive alkaloids from the sea: a review. *Mar. Drugs* , 39-54 (2008).

Lloret J. Human health benefits supplied by Mediterranean marine biodiversity. *Marine Pollution Bulletin* (2010).

Louden, D., Whalan, S., Evanz-Illidge, E., Wolff, C., & Nys, R. An assessment of the aquaculture potential of the tropical sponges *Rhopaloeides odorabile* and *Coscinoderma* sp. *Aquaculture* , 57-67 (2007).

Martínez, M., Díaz, M., Ramos, A., Salvador, N., López, O., Larriba, E. Cytotoxicity of the Ascidian *Cystodytes dellechiaiei* against tumor cells and study of the involvement of associated microbiota in the production of cytotoxic compounds. *Mar. Drugs*, 52-70 (2007).

Mayer A, Gustafson K. Marine Pharmacology in 2005-2006: Antitumour and Cytotoxic Compounds. *European Journal of Cancer* 44, 2357-2387 (2008).

Mayer A, Rodriguez A, Berlinck R, Hamann M. Marine pharmacology in 2005–6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta* 1790, 283-308 (2009).

Meseta, M., & Weinreb, S. A convergent total synthesis of the marine sponge alkaloid ageladine A via a strategic 6π -2-azatriene electrocyclization. *Tetrahedron*, 9112-9119 (2007).

Munro M, Blunt j, Dumdei E, Hickford S, Lill R, Li S, Battershill C, Duckworth A. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *Journal of Biotechnology* 70, 15-25 (1999)

Parra, F., & Zea, S. Comparación de la abundancia y distribución de algunas características de las esponjas del género *Ircinia* (Porífera:Demospongiae) en dos localidades contrastantes del área de Santa Marta, Caribe Colombiano . *Biol. Invest. Mar. Cost* , 75-91 (2003).

Pedpradab P, Molex W, Nukoolkarn V, Darumas U. Biological activities of the extracts from the Andaman Sea sponges, Thailand. *EurAsia J BioSci* 4, 8, 63-69 (2010).

Prado M.P, Torres Y.R, Berlinck R.G.S, Dedoderá C, Sanchez M, Craveiro M, Hajdu E, Rocha R, Machado-Santelli G. Effects of marine organisms extracts on microtubule integrity and cell cycle progression in cultured cells. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 313, 125-137 (2004).

Rifai, S., Fassouane, A., El-Abbouyi, A., Wardani, A., Kijjoa, A., & Van, R. Screening of antimicrobial activity of marine sponge extracts. *Journal Mycologie Medicale* , 33-38 (2005).

Rifai, S., Fassouane, A., Pinho, P., Kijjoa, A., Nazareth, N., Nacimiento, M., y otros. Cytotoxicity and inhibition of lymphocyte proliferation of fasciculatin, a linear Furanosesterterpene isolated from *Ircinia variabilis* collected from the Atlantic Coast of Morocco. *Mar. Drugs* , 15-21 (2005).

Rodriguez W, Osorno O, Ramos F, Duque C, Zea S. New Fatty Acids from Colombian Caribbean Sea Sponges. *Biochemical Systematics and Ecology*. 1-10 (2010).

Sánchez, A. Utilización de la línea celular CHO en los ensayos de genotoxicidad. *Rev. Cubana Invest. Biomed* , 19-21 (1999).

Shen, Y., Lo, K., Taha, T., Kuo, Y., & Shih, P. Novel linear C_{22} -sesterterpenoids from sponge *Ircinia formosana*. *Tetrahedron Letters* , 4007-4010 (2006).

Simmons, T., Andrianasolo, E., Mcphail, K., Flatt, P., & Gerwick, W. Marine natural products as anticancer drugs. *Molecular Cancer Therapeutics* , 333-342 (2005).

Singh A. J, Xu C, Xu X, West L.M., Wilmes A, Chan A, Hamel E, Miller J. H., Northcote P.T. and Ghosh A.K. Koshikamide B, a Cytotoxic Peptide Lactone from a Marine Sponge *Theonella* sp. *The Journal of Organic Chemistry* 75 (1), pp 2–10 (2010).

Sipkema, D., Franssen, M., Osinga, R., Tramper, J., & Wijffels, R. Marine sponges as pharmacy. *Marine Biotechnology*, 142-162 (2005).

Sorek H, Rudi A, Benayahu Y and Kashman Y. Njaoamines G and H, two new cytotoxic polycyclic alkaloids and a tetrahydroquinolone from the marine sponge *Neopetrosia* sp. *Tetrahedron Letters* 48, 7691-7694 (2007).

Stankevicius L, Aiub C.A.F, Mazzei J.L, Lobo-Hajdu G and Felzenszwalb I. Cytotoxic, mutagenic and antimutagenic screening of *Arenosclera brasiliensis* acetone and ethanol extracts. *Genetics and Molecular Research* 7 (2):542-548 (2008).

Takahashi, Y., Kubota, T., Fromont, J., & Kobayashi, J. Metachromins L-Q, new sesquiterpenoid quinones with an amino acid residue from sponge *Spongia* sp. *Tetrahedron* , 8770-8773 (2007).

Tziveleka, L., Kourounakis, A., Kourounakis, P., Roussis, V., & Vagias, C. Antioxidant potential of natural and synthesised polyprenylated hydroquinones. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* , 935-939 (2002).

Ueoka R, Ito A, Izumikawa M, Maeda S, Takagi M, Shin-ya K, Yoshida M, Soest R and Matsunaga S. Isolation of azaspiracid-2 from a marine sponge *Echinoclathria* sp. As a potent cytotoxin. *Toxicon* 53, 680-684 (2009).

Valderrama, D., & Zea, S. Esquemas de distribución de esponjas arrecifales (porífera) del Noroccidente del Golfo de Urabá, Caribe Sur, Colombia. *Biol. Invest. Mar. Cost* , 37-56 (2003).

Yamada K, Ojika M, Kigoshi H and Suenaga K. Cytotoxic substances from two species of Japanese sea hares: Chemistry and bioactivity. *Proc. Jpn. Acad.*, Ser. B, Vol. 86, 176-189 (2010)

Zabala D, Echavarria B, Martinez A. Actividad Inhibitoria sobre la Enzima Dihidrolato Reductasa de Extractos de Eponjas Marinas del Golfo de Urabá.

VITAE: volumen 15 número 2. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. págs. 285-289 (2008).

Singh N. P, McCoy M. T, Tice R. R, Schneider E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175 184-191 (1988).