



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Evaluación Genotóxica, Citotóxica y Efecto sobre
el Ciclo Celular de Extractos de tres especies de
Esponjas Marinas del Golfo de Urabá**

**Evaluation of Genotoxic, Cytotoxic and Effect on
Cell Cycle of Extracts Isolated from three species
of Marine Sponges from Urabá's Gulf**

Jairo Andrés Pulgarín Rocha

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Área Curricular Biotecnología

Medellín, Colombia

2012

Evaluación Genotóxica, Citotóxica y Efecto sobre el Ciclo Celular de Extractos de tres especies de Esponjas Marinas del Golfo de Urabá

Jairo Andrés Pulgarín Rocha

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

Magister en Ciencias Biotecnología

Directora:

MSc. María Elena Márquez Márquez.

Asesores:

MSc. Juan Bautista López Ortiz

PhD. Guillermo Correa Londoño

Línea de Investigación:

Bioactividad de productos naturales y sintéticos

Grupo de Investigación:

Biotecnología animal

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Area Curricular Biotecnología

Medellín, Colombia

2012

A mis padres

Agradecimientos

En primera instancia agradezco a mi familia por el apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida y muy especialmente a mis padres por estar presentes de una forma incondicional, por lo que la realización de esta tesis se la debo a ellos.

Mi familia paterna en Medellín por la acogida y apoyo desde el principio de mi estancia allí.

Igualmente quiero agradecer a mi directora y asesores académicos por la guianza constante en el desarrollo de todos los procesos involucrados para la realización de la presente tesis. Gracias por todos los consejos y recomendaciones las cuales han contribuido igualmente a mi desarrollo intelectual como profesional.

A mis compañeros del grupo de investigación en Biotecnología Animal por ser parte activa del proceso investigativo, por su comprensión y por la grata compañía la cual hacia el trabajo de laboratorio muy ameno. Especialmente quiero agradecerle a Valentina Ramírez (la Mona) por su gran contribución en el desarrollo investigativo de mi tesis.

A mis amigos y especialmente a Silvia Elena Naranjo (Riscu) por su colaboración y compañía en la realización especialmente en la parte final de mi tesis.

A mi novia Alejandra Giraldo (Precio) el cual estuvo presente en todo el desarrollo de mi tesis, por su incondicional comprensión, colaboración, apoyo, y compañía. Igualmente a Leonor Giraldo (suegra), por su hospitalidad y cuidado maternal que tuvo conmigo.

A mi bebe (Kyara) por la compañía en el proceso de escritura.

Resumen

Los organismos marinos han sido reportados como una fuente de compuestos biológicamente activos comparados con los aislados de la superficie terrestre. Dentro de los animales marinos las esponjas son una de las más importantes fuentes de nuevos compuestos con diferentes tipos de actividades biológicas. En este estudio, se evaluaron extractos de tres esponjas marinas procedentes del Golfo de Urabá Colombiano con el fin de evaluar sus potenciales genotóxico, citotóxico y antiproliferativo en dos líneas celulares una de hámster (CHO-K1) y otra humana derivada de cáncer (Jurkat). Se analizaron extractos de diferentes polaridades de las esponjas *Amphimedon compressa*, *Iotrochota birotulata* y *Myrmekioderma gyroderma*. Se encontró que el extracto metanólico de la esponja *A. compressa* mostró un efecto promisorio a una IC₅₀ de 12µg/ml. Adicionalmente se demostró que su efecto estaba relacionado con alteraciones en el ADN además de influir en la progresión del ciclo celular.

Palabras clave: Organismos marinos, esponjas, genotoxicidad, citotoxicidad, progresión del ciclo celular, extractos.

Abstract

Marine organisms have been reported as a rich source of biologically active compounds, even more than those living on earth. Among marine animals, sponges are one of the most prominent sources of new compounds with different types of biological activities. In this study, we tested extracts from three Colombian marine sponges from the Uraba Golf aiming to evaluate their cytotoxic, genotoxic and anti-proliferative effects on cultured cells lines (hamster CHO-K1 and human leukemia Jurkat cells). We analyzed extracts of different polarities from *Amphimedon compressa*, *Iotrochota birotulata* and *Myrmekioderma gyroderma* sponges. We found that the methanolic extract from *A. compressa* sponge showed a promissory cytotoxic effect, with an IC₅₀ of 12µg/ml. Additionally, we demonstrate that its cytotoxic effect is related with alterations in DNA and cell cycle progression.

Keywords: Marine organisms, sponges, genotoxicity, cytotoxicity, cell cycle progression, extracts

Contenido

	<u>Pág.</u>
Resumen	IX
Lista de figuras	XII
Lista de tablas	XIV
Lista de Símbolos y abreviaturas	XV
Introducción	1
1. Materiales y Métodos 5	
1.1 Extractos de esponjas	5
1.2 Mantenimiento y cultivo de líneas celulares	5
1.3 Ensayos de Citotoxicidad y Viabilidad celular	6
1.3.1 Ensayo de Viabilidad celular	6
1.3.2 Ensayo de MTT	6
1.3.3 Eficiencia de clonación en Línea celular CHO-K1	7
1.4 Ensayos de Genotoxicidad	8
1.4.1 Evaluación de Aberraciones Cromosómicas	8
1.4.2 Ensayo Cometa	9
1.4.3 Intercambios de Cromátidas Hermanas (ICH)	10
1.5 Ensayos de Ciclo Celular por Función de Acumulación	11
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
2.1 Determinación de la IC ₅₀ de Extractos de las Esponjas <i>Amphimedon compressa</i> , <i>Mimerkioderma gyroderma</i> e <i>Iotrochota birotulata</i> en líneas celulares CHO-K1 y Jurkat.	13
2.2 Efecto Citotóxico del Extracto Metanólico de la esponja <i>Amphimedon compressa</i>	14
2.2.1 Viabilidad celular mediante <i>Azul de Tripano</i>	15
2.2.2 Ensayo de MTT	15
2.2.3 Eficiencia de clonación de la Línea Celular CHO-K1	16
2.3 Evaluación del Potencial Genotóxico	19
2.3.1 Aberraciones cromosómicas	19
2.3.2 Ensayo Cometa	21
2.3.3 Intercambios de Cromátidas Hermanas <i>ICH</i>	24
2.4 Evaluación del Potencial Efecto Antiproliferativo	26
2.4.1 Función de Acumulación	26
3. Conclusiones y recomendaciones	29
Bibliografía	30

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1 Tipos de cometas según el nivel de degradación del ADN.Los tipos 1 hasta 5, representan los distintos grados cuantitativos de daño del ADN desde el nivel sin daño hasta el daño total (<i>Tomado de Paz y Miño et al.,2008</i>) ⁶⁹	9
Figura 2-1 Concentración inhibitoria 50 (IC ₅₀) del extracto metanólico de la esponja <i>Amphimedon compressa</i> en las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat. *Las líneas continuas representan la tendencia lineal de los datos reportados para cada una de las líneas celulares.	14
Figura 2-2 Efecto citotóxico de la esponja <i>Amphimedon compressa</i> medida durante 60 horas en las líneas celulares CHO-K1 (A) y Jurkat (B). (EM) extracto metanólico; CM, células sin tratar, (CS) control del solvente.	15
Figura 2-3 Evaluación de la actividad citotóxica del extracto de la esponja <i>Amphimedon compressa</i> en las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat por medio del ensayo de MTT. (EM) extracto metanólico de la esponja <i>Amphimedon compressa</i> ; (C-) células no tratadas; (CS) control del solvente.	16
Figura 2-4 Eficiencia de clonación obtenida en células CHO-K1. (EM) extracto metanólico de la esponja <i>Amphimedon compressa</i> ; (C-) células no tratadas; (CS) control del solvente.....	17
Figura 2-5 Comparación de las aberraciones cromosómicas en las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat. EM: Extracto metanólico de la esponja <i>Amphimedon compressa</i> ; C-: Células no tratadas CS: Control del solvente, B: Quiebre cromosómico o isocromatídico BB: Cromosomas dicéntricos DC: Cromosomas en anillo y R: Figuras multirradiales (MR). .	20
Figura 2-6 Aberraciones cromosómicas de tipo quiebre cromatídico presentes en la células Jurkat.(A) quiebre sencillo,por cromosoma (B) quiebres multiples por cromosoma.	21
Figura 2-7 Evaluación de la longitud de cola (A) y el momento de cola (B) para cada una de las células evaluadas. (EM) extracto metanólico de la esponja <i>Amphimedon compressa</i> ; (C-) células no tratadas; (CS) control del solvente; (C+) células tratadas con H ₂ O ₂	22
Figura 2-8 Análisis de varianza para la Morfología de los cometas para ambas líneas celulares. (EM) extracto metanólico de la esponja <i>Amphimedon compressa</i> ; (C-) células no tratadas; (CS) control del solvente; (C+) células tratadas con H ₂ O ₂	22
Figura 2-9 Cometas obtenidos de las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat mediante la técnica alcalina del ensayo cometa. A y C líneas celulares Jurkat y CHO-K1 respectivamente sometidas al extracto metanólico de la esponja <i>A. compressa</i> ; B y D controles negativos de células Jurkat y CHO-K1 respectivamente.	23

Figura 2-10 Distribución de las morfologías de los cometas según su nivel de clasificación. (EM) extracto metanólico de la esponja <i>Amphimedon compressa</i> ; (C-) células no tratadas; (CS) control del solvente; (C+) células tratadas con H ₂ O ₂	23
Figura 2-11. Evaluación de la proliferación celular por función de acumulación de células tratadas con el extracto metanólico y bloqueadas con Colcemid, para la línea celular Jurkat (A); para la línea celular CHO (B). (EM): extracto metanólico de la esponja <i>Amphimedon compressa</i> ; (C-) células no tratadas; (CS) control del solvente; (C+) células tratadas con H ₂ O ₂ . *Las líneas continuas representan la tendencia lineal de los datos reportados por cada uno de las líneas.....	27

Lista de tablas

	Pág.
<u>Tabla 0-1:</u> <u>Compuestos aislados de esponjas marinas y su actividad</u>	2
<u>Tabla 2-1</u> <u>IC₅₀ obtenidas para los extractos en diferentes solventes de tres esponjas marinas colombianas en líneas celulares Jurkat y CHO-K1 mediante Azul de Tripano...</u>	13
<u>Tabla 2-2</u> <u>Aberraciones cromosómicas presentes en la línea celular CHO-K1 tratada con el extracto metanólico de la esponja <i>Amphimedon compressa</i></u>	19
<u>Tabla 2-3</u> <u>Aberraciones cromosómicas presentes en la línea celular Jurkat tratada con el extracto metanólico de la esponja <i>Amphimedon compressa</i></u>	20
<u>Tabla 2-4</u> <u>Intercambios de Cromátidas Hermanas en células CHO-K1 o Jurkat tratadas con el extracto metanólico de <i>Amphimedon compressa</i></u>	24

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
ECA	Eficiencia de clonación absoluta
ECR	Eficiencia de clonación relativa
<i>ICH</i>	Intercambios de cromátidashermanas
<i>EM</i>	Extracto metanólico de la esponja <i>Amphimedon compressa</i>
C+	Control positivo
C-	Control negativo
CS	Control de Solvente (DMSO)
<i>MMC</i>	Mitomicina C
<i>dBrdU</i>	5'-2'-bromodeoxiuridina

Introducción

La vida en el mar es mucho más diversa que la que se conoce en tierra, y a pesar de su reciente exploración se ha logrado reportar de sus organismos 22000 nuevos productos comparados con los 131000 existentes de origen terrestre ¹⁻⁷, teniendo en cuenta que la tasa de éxito de encontrar una sustancia química activa nueva es 500 veces mayor comparado con las especies terrestres ^{8; 9}. Posiblemente la explicación se encuentre en el tiempo y presión evolutiva a la que están sometidos los organismos marinos conduciéndolos a sintetizar sustancias potentes como medio de defensa y adaptación ^{1; 2; 9}. Estas sustancias se han venido explotando como fuentes potenciales de promisorios fármacos ¹⁰⁻¹² y que probablemente en el futuro se obtengan cientos de miles nuevos compuestos de origen marino ^{11; 13}.

Las esponjas son los animales multicelulares más primitivos y uno de los más importantes y diversos componentes de la fauna béntica de arrecifes coralinos ¹⁴. Solo las esponjas marinas son la fuente del 38% de todos los productos naturales marinos reportados, con más de 5300 sustancias bioactivas de múltiples acciones y químicamente diferentes, aumentando la lista anualmente ^{1; 6; 15-18}. En las esponjas se han identificado nuevos metabolitos como alcaloides, esteroides, terpenoides, incluyendo lípidos, en particular glicolípidos y fosfolípidos inusuales en otros organismos vivos, estos últimos principalmente localizados en sus membranas y microorganismos simbiotes ¹⁹⁻²⁵. Las actividades biológicas encontradas en las sustancias aisladas de las esponjas marinas son de tipo antimicrobiana, neurotóxica, citotóxica, antimitótica con acción sobre enzimas específicas, entre otras ^{18; 26-31}. Determinados compuestos pueden estar presentes en diferentes esponjas independiente del ambiente ³²⁻³⁴ aunque también hay sustancias propias de esponjas del mismo género ³⁵.

En la tabla 1-1 se mencionan algunos de los diferentes compuestos aislados de esponjas marinas en donde se puede apreciar las diferentes y diversas aplicaciones. ^{6; 20}.

Tabla 3-1 Compuestos aislados de esponjas marinas y su actividad. Tomado de Blunt *et al.*, 2011⁶

COMPUESTO	ESPONJA	ACTIVIDAD	REFERENCIAS
Acyclovir	Derivado sintético del nucleósido Arabinosil de <i>Tethya cripta</i>	Contra el virus del Herpes simple	Elion <i>et al.</i> (1977)
Ara-A/Ara-C (vidarabina/cytarabina)	Derivado sintético del nucleósido Arabinosil de <i>Tethya cripta</i>	Contra el virus del Herpes simple	Privat de 'garilhe y de Rudder (1964)
Leucettamol A	<i>Leucettaaff. microrhaphis</i>	Previene la formación de proteasomas activos	Kong y Faulkner (1993)
Strepsiamides A–C	<i>Strepsichordaia Lendenfeldi</i>	Citotóxico	Ibrahim <i>et al.</i> (2008)
Exiguaquinol	<i>Neopetrosia exigua</i>	Inhibición de <i>Helicobacter pylori</i>	Leone <i>et al.</i> (2008)
Ciliatamide A–C	<i>Aaptosciliata</i>	Citotóxico	Nakao <i>et al.</i> (2008)
Taumycins A Y B	<i>Fascaplysinopsis sp.</i>	Citotóxico para células leucémicas humanas UT-7	Bishara <i>et al.</i> (2008)
Jaspamides H, J Y L	<i>Jaspissplendans</i>	Citotóxico y disrupción de microfilamentos.	Gala <i>et al.</i> (2008)
Callyaerin G	<i>Callyspongiaaerizusa</i>	Péptido rico en prolina. Citotóxico	Ibrahim <i>et al.</i> (2008)
Stylopeptide 2	<i>Stylotellasp.</i>	Péptido. Citotóxico	Brennan <i>et al.</i> (2008)
Homophymine A	<i>Homophymiasp.</i>	Inhibición de infección de HIV-1	Zampella <i>et al.</i> (2008)
Polydiscamides B–D	<i>Irciniasp.</i>	Modulación del dolor	Feng <i>et al.</i> (2008)
Koshikamide B	<i>Theonellasp.</i>	Citotóxico	Araki <i>et al.</i> (2008)
Latrunculin A	<i>Latrunculia magnifica</i>	Inhibición de la invasión tumoral y activación de HIF-1 en cáncer de pecho.	El Sayed <i>et al.</i> (2008)
Spongistatin-1	<i>Spongiasp.</i>	Induce apoptosis en células de leukemia.	Pettit <i>et al.</i> (1993)
Bromophenol	<i>Dysideasp.</i>	Citotóxico y antibacterial	Zhang <i>et al.</i> (2008)
Nakinadines C–D	<i>Amphimedon sp.</i>	Citotóxico	Nishi <i>et al.</i> (2008)
Aaptamine	<i>Aaptosaaptos</i>	Antidepresivo en ratón	Diers <i>et al.</i> (2008)
Renierol	<i>Halicionasp.</i>	Inhibidor de la xantina oxidasa	McKee y M. Ireland (1987)
Nagelamides M	<i>Agelasp.</i>	Antifúngico	Kubota <i>et al.</i> (2008)
Ageladine A	<i>Agelasnakamurai</i>	Colorente indicador del pH intracelular	Bickmeyer <i>et al.</i> (2008)
Dispyrin	<i>Agelas dispar</i>	Antagonista adrenérgico y receptor histaminico	Kennedy <i>et al.</i> (2008)
Aplysamine 6	<i>Pseudoceratinasp.</i>	Inhibidor de la isoprenilcisteinacarboximetiltransferasa	Buchanan <i>et al.</i> (2008)
Clavatadines A Y B	<i>Subereaclavata</i>	Inhibidor de la coagulación sanguínea	Buchanan <i>et al.</i> (2008)
Ianthesine E	<i>Pseudoceratinasp.</i>	Antagonista del receptor de adenosine A1.	Kalaitzis <i>et al.</i> (2008)
Halichonadin E	<i>Halichondriasp.</i>	Citotóxico	Kozawa <i>et al.</i> (2008)
Manoalide	<i>Luffariellavariabilis</i>	Bloquea canales de Calcio.	Skindersoe <i>et al.</i> (2008)
Hyrtiosal	<i>Hyrtioserectus</i>	Inhibidor de la integrasa de HIV-1	Du <i>et al.</i> (2008)
Spheciosterols A–C	<i>Spheciostongiasp.</i>	Inhibidor de la proteína quinasa C	Whitson <i>et al.</i> (2008)

En las esponjas del género *Amphimedon* se han aislado más de 86 nuevos compuestos, y entre las bioactividades encontradas se encuentran: citotóxicas, antiangiogénicas, neurotóxicas, además de actividad inhibitoria de la ADN-topoisomerasa I^{30; 36}, además, pueden tener lípidos inusuales incluyendo ácidos grasos³⁷, dentro de los cuales se

encuentran los ácidos *Amphimicos* A y B ³⁸, y los diferentes tipos de *Nakinadinas* algunos con características citotóxicas³⁹.

De la especie *Amphimedon compressa* se ha aislado la toxina denominada *Halitoxin* el cual se ha encontrado en varias especies del mismo género (Schimitz, F.J. *et al.*;1978) y un potente antibacteriano denominado *Ciclostelletamina*¹², que igualmente ha mostrado cierto efecto inhibitorio sobre la enzima dihidrofolato reductasa⁴⁰.

Del género *Ietrochota* se han aislado varios tipos de esfingolípidos y diferentes tipos de compuestos halogenados, como alcaloides y derivados de tirosina, evidenciando cierto tipo de citotoxicidad, inhibición del crecimiento celular, además, de actuar sobre diferentes enzimas, y el ADN^{41; 42}. Dentro de los metabolitos reportados en las esponjas de este género, se encuentra la *Purpurona* la cual fue considerada inicialmente un artefacto, producto de la extracción hidrolítica⁴³.

Como en especies similares, *Ietrochota birotulata* posee gran cantidad de yodo en la forma de alcaloides yodotirosinados⁴⁴. Se sabe que la función de estos metabolitos halogenados sintetizados por los organismos tienen funciones que van desde hormonas hasta compuestos de defensa ⁴⁵.

Del género *Myrmekioderma*, el compuesto más relevante es el Curcuphenol⁴⁶ reportado con actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Cryptococcus neoformans*⁴⁷, acción antifúngica contra *Candida albicans*, antimalárica contra *Plasmodium falciparum*⁴⁸ y actividad antileishmaniasis⁴⁹. Otros estudios han revelado actividad antitumoral en líneas celulares humanas y de ratón, mostrando citotoxicidad independiente de p53 ⁵⁰⁻⁵².

En la Región Caribe, se ha reportado 12046 especies marinas⁵, representado la mayor concentración de especies dentro del océano Atlántico ⁵³, sin embargo la biota marina permanece desconocida, a pesar del gran interés en las investigaciones taxonómicas llevadas a cabo en el Caribe⁵. En Colombia, la búsqueda de este tipo de compuestos se registran en esponjas del Caribe Colombiano, en donde se han encontrado diferentes tipos de compuestos como fluoroterpenos y diferentes tipos de ácidos grasos con actividades antibacteriales, antifúngicas, citotóxicas, antitumoral y contra diferentes tipos de líneas celulares ^{52; 54-56}.

En el presente estudio, teniendo en cuenta los recursos genéticos potenciales que se pueden encontrar en la gran diversidad biológica marina presente en nuestro país, se plantea la necesidad de realizar exploración de nuevas sustancias que aporten información que contribuya a la generación de tratamientos más eficaces contra diversas patologías. Estas investigaciones además, contribuyen al conocimiento de nuestro entorno llevándonos a un mejor aprovechamiento y óptimo manejo de los recursos naturales renovables, que tienen incidencia en los aspectos social y económico, entre otros.

Nuestra hipótesis de trabajo, consistió en considerar que los extractos de tres esponjas marinas poseían actividades biológicas que determinan su capacidad de generar respuestas citotóxicas, genotóxicas, y causar efecto en la proliferación celular.

Por tal motivo, el objetivo principal del presente estudio es identificar los potenciales efectos biológicos desde el punto de vista citotóxico, genotóxico y antiproliferativo, de extractos provenientes de tres diferentes esponjas marinas colectadas en el Golfo de Urabá colombiano, y así conocer el potencial bioactivo de organismos marinos colombianos y su potencial biotecnológico.

1. Materiales y Métodos 1

1.1 Extractos de esponjas

Las especies de esponjas usadas en este estudio, *Amphimedon compressa*, *Iotrochota birotulata*, y *Myrmekioderma gyroderma* pertenecientes al orden Haplosclerida fueron colectadas en el Golfo de Urabá en el 2001 y fueron congeladas para su preservación y clasificadas taxonómicamente por el Dr. Sven Zea. Cada muestra de esponja húmeda fue cortada en pequeños pedazos (aproximadamente 3 x 3 cm) y posteriormente extraída con solventes de diferente polaridad (metanol, diclorometano y n-hexano) de la siguiente manera: la muestra de esponja se extrajo exhaustivamente con metanol 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 de las esponjas se conservaron refrigerados, protegidos de la luz, el aire, el calor y la humedad. Posteriormente una pequeña cantidad de muestra de cada extracto fue pesada y disuelta en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), y las concentraciones resultantes oscilaron entre 27 y 45 mg/mL. Las muestras fueron preservadas hasta el momento de la realización de las pruebas.

1.2 Mantenimiento y cultivo de líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares Jurkat, línea inmortal transformada con crecimiento en suspensión proveniente de linfocitos T leucémicos humanos que no expresan las proteínas p53 y p16 y la línea celular CHO-K1, línea adherente, establecida e inmortal derivada de fibroblastos de ovario de hámster chino, que produce grandes cantidades de IL-2 al ser estimulados con ésteres de forbol. Ambas líneas celulares fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (GIBCO) suplementado con suero fetal bovino (SBF) (GIBCO) al 5% a 37 °C en una atmósfera húmeda con CO₂ al 5% (condición estándar). Para el

desprendimiento celular en el caso de CHO-K1 se usó Tripsina-EDTA (0,025%) (GIBCO) con inactivación posterior con medio completo (5% de SBF).

Para todos los ensayos, los cultivos se mantuvieron en fase exponencial de 36h a 48h post-siembra.

1.3 Ensayos de Citotoxicidad y Viabilidad celular

1.3.1 Ensayo de Viabilidad celular

El efecto del extracto sobre la viabilidad de las células fue evaluado durante 60 horas, para esto se establecieron cultivos por duplicado e incubados en condiciones estándar de cultivo por aproximadamente 46 h antes de aplicar el tratamiento. Finalmente alícuotas de 50 µl de la suspensión celular fueron teñidas con 50 µl de Azul de Tripano (0,5%) (1:1) a temperatura ambiente por 3 minutos, luego las células fueron contadas en un microscopio óptico⁵⁷. Las células no viables son teñidas de púrpura-violeta debido al daño de la membrana celular el cual permite su difusión a través de ella, mientras que las células viables no permiten la coloración⁵⁷.

La viabilidad celular fue determinada según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{N1}{N1 + N2} \times 100 \quad (1)$$

En donde N1 son células sin colorear y N2 representan células coloreadas.

1.3.2 Ensayo de MTT

El MTT (3-(4,5-dimetihylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) (SIGMA) es un colorante amarillo soluble en agua derivado de sales de tetrazolio, el cual mediante un proceso enzimático de una célula viable es reducido a una sustancia insoluble de color azul (formazán) siendo este proporcional al número de células viables⁵⁷. Brevemente, para el desarrollo del ensayo se usaron platos de 96 pozos y se sembraron 6×10^3 y 8×10^3 células por pozo de Jurkat y CHO-K1 respectivamente, las células en fase exponencial de crecimiento fueron expuestas al extracto de la esponja durante 20 h. El control negativo (C-) fueron células en cultivo sin ningún tipo de modificación, el control del solvente (CS) son células a las que se le adiciona únicamente DMSO (concentración

final de 0,04%). Después del tiempo del tratamiento fue adicionado 10 µl/pozo de la solución de MTT (5mg/ml) e incubados los cultivos a 37°C y a 5% de CO₂ en oscuridad, durante 4 horas se adicionó isopropanol ácido (0,1% HCl fumante, 10% Tritón) para diluir los cristales de formazán formados e inmediatamente se determinó la densidad óptica (DO) a 540nm, con el fin de calcular la citotoxicidad causada por el extracto mediante la siguiente ecuación:

$$\left(\frac{A - B}{A}\right) * 100 = \% \text{ citotoxicidad} \quad (2)$$

En donde A representa la absorbancia de las células no tratadas, y B la absorbancia de las células tratadas.

En el análisis estadístico se hizo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para las comparaciones con los controles.

1.3.3 Eficiencia de clonación en Línea celular CHO-K1

La eficiencia de clonación es un ensayo de proliferación que evalúa la capacidad de una célula individual para formar una colonia después de un tratamiento⁵⁸ y las que hayan perdido esta habilidad son consideradas clonogénicamente muertas⁵⁹.

Brevemente, los ensayos de clonación fueron realizados por triplicado en cultivos de células tratadas durante 18 horas. Luego las células tripsinizadas y contadas fueron sembradas en cajas de Petri en una dilución de 300 células en 5ml de medio, además suplementado con 20% de medio preacondicionado (hecho en el laboratorio). La evaluación de las colonias se realizó a los 9 días posteriores a la siembra determinando la eficiencia de clonación absolutas (ECA) y eficiencia de clonación relativa (ECR), de cada una de las muestras usando las siguientes fórmulas:

$$ECA = \frac{A}{B} \quad (3)$$

A= número de colonias formadas y B = número de células sembradas inicialmente.

$$ECR = \frac{ECA \text{ Células Tratadas}}{ECA \text{ no Tratadas}} \quad (4)$$

Las Eficiencias de Clonación absolutas (ECA) del tratamiento fueron evaluadas con las de los controles, mediante una comparación de proporción binomial con un nivel de significancia de 0,05.

1.4 Ensayos de Genotoxicidad

1.4.1 Evaluación de Aberraciones Cromosómicas

La evaluación de aberraciones cromosómicas es una prueba de clastogenicidad muy importante utilizada como biomarcador en estudios de exposición ocupacional a radiaciones ionizantes y químicas⁶⁰. Consiste en cuantificar los cambios estructurales inducidos en los cromosomas y observados en la primera metafase después del daño inicial⁶¹. Muchos cambios pueden ser letales afectando la división celular y causando la muerte celular, pero algunos cambios pueden no causar problemas en la división celular pudiendo ser transmitidos a generaciones posteriores⁶¹.

Brevemente, se realizaron triplicados del tratamiento con sus respectivos controles de células no tratadas (C-) y del solvente (CS). El extracto de la esponja fue adicionado en fase exponencial de crecimiento celular durante 20 horas y luego los cultivos fueron bloqueados durante las últimas 2 horas con una solución de Colcemid (SIGMA) a una concentración final de 0,2 mg/ml. El índice mitótico fue calculado como la proporción de metafases encontradas en una población de 1000 células contadas. Las células fueron concentradas por centrifugación y resuspendidas en una solución hipotónica precalentada de citrato de sodio (0,7%) por 10 minutos y fijadas con una solución metanol-acido acético (3:1). Las preparaciones se flamearon suavemente y se tiñeron homogéneamente con solución de tinción Giemsa (5%). Como aberraciones cromosómicas estructurales fueron evaluadas los quiebres cromatídicos (B), quiebres cromosómicos o isocromatídicos (BB), cromosomas dicéntricos (DC), cromosomas en anillo (R), y figuras multirradiales (MR) (Savage; 1996).

Para la significancia estadística se realizó una comparación de proporción binomial con un intervalo de confianza del 95%, además, se determinaron los intervalos de confianza para las diferencias de los valores p obtenidos⁶².

1.4.2 Ensayo Cometa

El ensayo cometa ó electroforesis alcalina de células individuales es una técnica simple, sensible y relativamente de bajo costo utilizada para medir el grado de clastogenicidad del ADN en células individuales ⁶³⁻⁶⁶ logrando detectar roturas tanto de cadena sencilla como de cadena doble presentes en el ADN ⁶⁷.

El principio del ensayo se basa la migración de fragmentos de ADN con cualquier tipo de rotura desencadenando efectos desastrosos en la cromatina altamente ordenada ⁶⁶. Los fragmentos liberados de las hebras rotas fácilmente migran hacia un electrodo positivo (ánodo) sometidos a un campo eléctrico, dejando un rastro de ADN que va desde la cabeza (ADN no fragmentado) hasta formar la cola, cuya longitud refleja la diversidad de daños obtenidos después de someterse a un agente clastogénico, Esta imagen en forma de un “cometa” en el que muestra los fragmentos de ADN de tamaño mayor respecto a los fragmentos más alejados menor tamaño ^{66; 68}. Según la forma del cometa, éstos se pueden clasificar en 5 niveles, en donde el nivel 1 representa una célula sin daño y el 5 con el máximo daño (Figura 1-1).

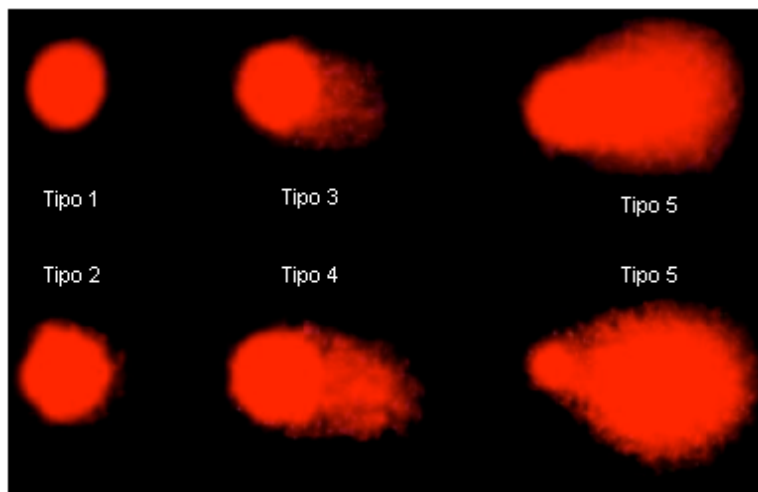


Figura 1-1Tipos de cometas según el nivel de degradación del ADN.Los tipos 1 hasta 5, representan los distintos grados cuantitativos de daño del ADN desde el nivel sin daño hasta el daño total (Tomado de Paz y Miño et al.,2008) ⁶⁹.

Los ensayos se realizaron siguiendo el protocolo alcalino propuesto por Singh y Tice ^{64;} ⁶⁷. Las suspensiones de células de ambas líneas celulares fueron tratadas con el extracto de la esponja; como control positivo se usó peróxido de hidrógeno a una concentración final de 50 μM ⁶⁷, el control negativo fueron células sin tratar (C-) y un control de solvente

que fueron células a las cuales se les agregó el DMSO al 0,04 % equivalente al presente en el tratamiento (CS). Las células expuestas al peróxido de hidrogeno fueron mantenidas a 4 ° C durante 30 minutos.

Brevemente, se mezclaron 1×10^5 células/ml con 90 μ l de agarosa de bajo punto de fusión (LMA 0,5%) (SIGMA) y se colocaron en un portaobjetos pre-tratados con 100 μ l de agarosa NMA (0.5%) (SIGMA). El gel se dejó solidificar a 4° C durante 8 minutos, y luego se sumergieron en la solución de lisis (2.5M NaCl, 0.1 M EDTA, 10 mM Tris-HCL 10% DMSO, 1% de Triton X 100 pH 10) al menos 60 minutos a 4° C. Posteriormente las placas fueron lavadas con PBS frío e incubadas con Buffer de corrido (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13) a 4° C por 30 minutos en una cámara de electroforesis (desnaturalización). El corrido electroforético se realizó a 25V y 300mA durante 30 minutos, después de lo cual los portaobjetos fueron neutralizados por 15 minutos (0.4 M de Tris HCl pH 7.5) y deshidratados con metanol absoluto. Una vez secos los portaobjetos se tiñeron con 40 μ L de Bromuro de Etidio (2 μ g/ml) y se visualizaron en un microscopio de fluorescencia (ZEISS) con el objetivo 20X. Se analizaron al azar 50 nucleoides por placa, midiendo la longitud de cola y el momento de cola con el software TritexComet Score v1,5. Todos los pasos fueron realizados en la oscuridad desde la exposición al buffer de lisis, para prevenir daño adicional al ADN ⁶⁴.

Para ambos parámetros de evaluación se usó la prueba de *Kruskal-Wallis* de comparación de medianas, debido a la presencia de valores extremos que impedían la distribución normal de los errores.

1.4.3 Intercambios de Cromátidas Hermanas (ICH)

Los intercambios de cromátidas hermanas representa un intercambio simétrico de segmentos cromatídicos en un cromosoma individual sin cambiar la estructura general del cromosoma⁷⁰. El punto de intercambio de las dos cromátidas hermanas parece ocurrir citológicamente en el mismo locus aunque su precisión molecular es aún desconocida ⁷⁰. Es posible su observación al microscopio óptico gracias a la incorporación del análogo nucleotídico 2'-deoxi-5'-Bromodeoxiuridina (5''-BrdU) en combinación con fluorocromo Hoechst 33258 ⁷¹.

Brevemente, cada tratamiento fue evaluado por triplicado en platos de 6 pozos, a cada cultivo en fase exponencial de crecimiento se le adicionó 25 μ l/pozo de 5-BrdU (1mg/ml) (SIGMA) y se incubó en oscuridad por aproximadamente 20h. Pasado este tiempo, el tratamiento fue aplicado por 15h. Una hora antes de la cosecha se agregó Colcemid (0,2 mg/ml) al cultivo para inducir bloqueo en metafase. Posteriormente, las muestras fueron procesadas como se describió en la prueba de aberraciones cromosómicas.

Tinción: Después de haber realizado el esparcido cromosómico, los portaobjetos son madurados. Posteriormente son sumergidos en Hoechst 33258 durante 10 minutos, luego son lavados y llevados a la cámara de fotólisis, donde las placas son cubiertas con una solución de sales citratadas (2XSSC) y sometidos a una lámpara de luz amarilla a 60° C durante 20 minutos. Pasado el tiempo los portaobjetos son lavados y teñidos con Giemsa al 5% durante 3 minutos.

Un mínimo de 50 mitosis fueron contadas por repetición con el fin de realizar el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías.

1.5 Ensayos de Ciclo Celular por Función de Acumulación

Este ensayo permite evaluar el efecto de un determinado agente sobre la cinética proliferativa mediante conteo del índice mitótico (IM) en cultivos tratados continuamente con un antimitótico durante un tiempo equivalente a la duración del ciclo celular de cada línea celular evaluada, con el fin identificar bloqueos en cualquier fase del ciclo celular causados por la sustancia evaluada.

Con el fin de determinar si el extracto evaluado actúa directamente en algunas de las fases del ciclo celular de las dos líneas celulares CHO-K1 y Jurkat, se sometieron cultivos duplicados en fase exponencial de crecimiento a la acción del antimitótico Colcemid (0,2 mg/ml) y del tratamiento con el extracto de la esponja durante 14 horas de tratamiento, con sus respectivos controles. La cosecha de los cultivos se realizó con intervalos de 2 horas entre cada uno de los tiempos iniciando desde t=0. Los resultados de las repeticiones se promediaron y se compararon contra los controles.

Los resultados de los índices mitóticos se graficaron y se estimó el efecto del tratamiento en el ciclo celular por diferencias significativas existentes entre las pendientes

resultantes. Se aplicó la prueba t-Student de dos colas para comparación de pendientes con un $p= 0.05$. En la línea celular CHO-K1 se obtuvo una mejor normalización de los datos cuando se trabajo con el logaritmo de éstos.

2.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1 Determinación de la IC₅₀ de Extractos de las esponjas *Amphimedon compressa*, *Mirmekioderma gyroderma* e *Iotrochota birotulata* en líneas celulares CHO-K1 y Jurkat.

La determinación de la concentración que inhibe aproximadamente la mitad de la población celular (IC₅₀) de los extractos metanólico, hexánico y diclorometano de las esponjas marinas *Amphimedon compressa*, *Mimerkioderma gyroderma* e *Iotrochota birotulata* se realizó basándonos en la prueba de viabilidad celular con el colorante azul de Tripano como se indica en la ecuación (1). Excepto una de las concentraciones de los extractos de las tres esponjas evaluadas, no mostraron efectos citotóxicos a concentraciones menores de 100 µg/ml en las líneas celulares Jurkat y CHO-K1. En efecto, el extracto metanólico de la esponja *Amphimedon compressa* fue el único que mostró citotoxicidad (Tabla 2-1). En la Figura 2-1 se muestra que la concentración de 12 µg/ml redujo a la mitad la viabilidad celular de ambas líneas celulares.

Tabla 2-1. IC₅₀ obtenidas para los extractos en diferentes solventes de tres esponjas marinas colombianas en líneas celulares Jurkat y CHO-K1 mediante azul de Tripano.

ESPONJA	LINEA CELULAR	EXTRACTO (µg/ml)		
		METANÓLICO	HEXANICO	DICLOROMETANO
<i>Mirmekioderma gyroderma</i>	JURKAT	> 100	> 100	> 100
	CHO-K1	>100	> 100	> 100
<i>Amphimedon compressa</i>	JURKAT	12*	Sin actividad	> 100
	CHO-K1	12*	> 100	> 100
<i>Iotrochota birotulata</i>	JURKAT	> 100	> 100	> 100
	CHO-K1	> 100	> 100	> 100

*El extracto metanólico de la esponja *Amphimedon compressa* se identificó como el más activo de la totalidad muestreada.

Para continuar con evaluaciones posteriores, se tuvieron en cuenta los lineamientos planteados por el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos (NCI) en donde se considera que las concentraciones de hasta 100 $\mu\text{g/ml}$ para extractos o fracciones de productos son promisorios, cuando se obtienen en la determinación de la IC_{50} ⁷². Teniendo en cuenta lo anterior, sumado a los resultados obtenidos en este estudio, se continuó con la evaluación del extracto metanólico de la esponja *Amphimedon compressa*, ya que la IC_{50} encontrada es candidata para evaluar su potencial bioactivo con otras pruebas de genotoxicidad y antiproliferación (Figura 2-1). Con el fin de observar el efecto biológico se determinó una concentración cercana a la mitad de la IC_{50} hallada (7 $\mu\text{g/ml}$) del extracto metanólico (EM) de la esponja *A. compressa*.

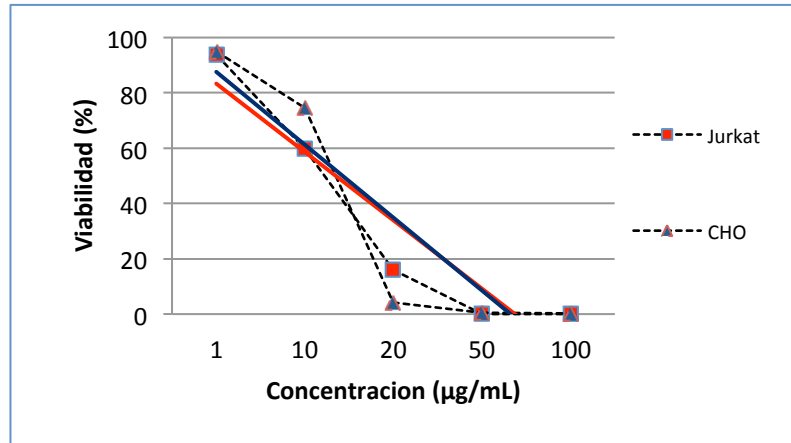


Figura 2-1 Concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) del extracto metanólico de la esponja *Amphimedon compressa* en las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat. *Las líneas continuas representan la tendencia lineal de los datos reportados para cada una de las líneas celulares.

2.2 Efecto citotóxico del extracto metanólico de la esponja *Amphimedon compressa*.

La evaluación de citotoxicidad varía dependiendo del estudio que se quiere llevar a cabo y si las células están muertas o simplemente se ha alterado su metabolismo⁷³. Por esta razón, en el presente estudio, se realizó una batería de pruebas para evaluar diferentes parámetros relacionados con la acción citotóxica de diferentes concentraciones del extracto metanólico de *Amphimedon compressa*.

2.2.1 Viabilidad celular mediante azul de Tripano

El efecto del tratamiento evaluado por la exclusión de las células teñidas con el colorante azul de Tripano, mostró valores de viabilidad en un rango entre 84% a 88% en ambas líneas celulares durante la hora 60 de cultivo (Figura 2-2).

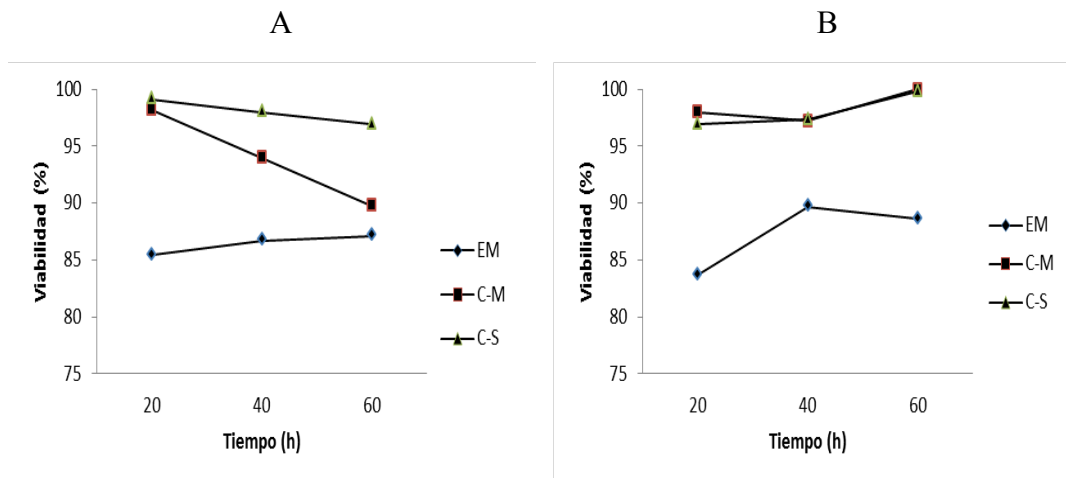


Figura 2-2 Efecto citotóxico de la esponja *Amphimedon compressa* medida durante 60 horas en las líneas celulares CHO-K1 (A) y Jurkat (B). (EM) extracto metanólico; CM, células sin tratar, (CS) control del solvente.

El control del solvente mostró un ligero incremento en la citotoxicidad sin sobrepasar la del extracto. La Figura 2-2 muestra la citotoxicidad del extracto de la esponja *A. compressa* sin llegar a diferenciar en los dos tipos celulares evaluadas.

2.2.2 Ensayo de MTT

El ensayo MTT basado en la actividad enzimática mitocondrial, es útil para la evaluación de la supervivencia y proliferación celular⁷⁴. La absorbancia del formazán producido al exponer los cultivos al extracto metanólico puede ser equivalente al número de células viables, con lo cual se determina el porcentaje de citotoxicidad (ecuación 2) y la viabilidad es expresada como la media \pm desviación estándar de tres réplicas.

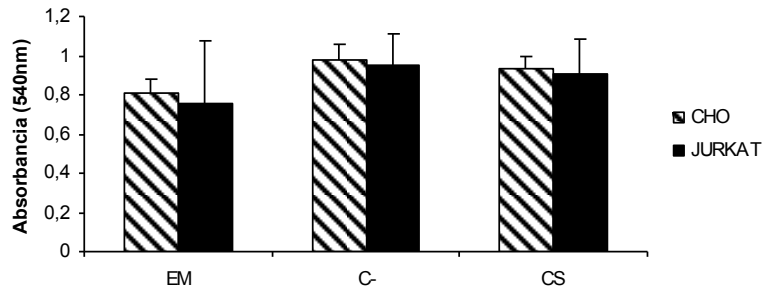


Figura 2-3 Evaluación de la actividad citotóxica del extracto de la esponja *Amphimedon compressa* en las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat por medio del ensayo de MTT. (EM) extracto metanólico de la esponja *Amphimedon compressa*; (C-) células no tratadas; (CS) control del solvente.

Los resultados mostrados en la figura 2-3 revelan que no hubo efecto citotóxico diferencial considerable del extracto metanólico de la esponja *Amphimedon compressa* sobre ambas líneas celulares a la concentración usada. A pesar de que hubo diferencia en el efecto con respecto a los controles ($p < 0,005$), el leve daño citotóxico fue semejante para ambas líneas.

2.2.3 Eficiencia de clonación de la línea celular CHO-K1.

Realizada en la línea celular CHO-K1 sometida al extracto metanólico de la esponja *Amphimedon compressa* en la determinación del efecto citotóxico de EM sobre una línea no derivada de cáncer. Debido a la alta sensibilidad de la técnica, ésta es ampliamente usada en la evaluación de agentes citotóxicos^{58; 75}, determinado el potencial bioactivo a largo plazo mediante la evidencia de muerte celular mediante la evaluación de la proliferación celular.

Los resultados obtenidos para la línea celular CHO-K1 se muestran en la figura 2-4. Inicialmente se sembraron 300 células, se trataron con el extracto de la esponja y se obtuvo en promedio $249 \pm 2,65$ colonias, representado en una ECA del 83%, al compararla con la ECA de los controles (Figura 2-4), mostró un efecto significativo de la acción del tratamiento sobre la línea celular CHO-K1 ($p < 0,05$). De la misma manera la eficiencia de clonación relativa (ECR) fue alrededor de 86% afirmando de esta manera algún efecto en la población tratada con el extracto de la esponja.

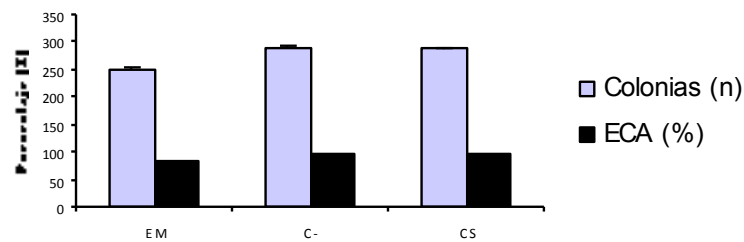


Figura 2-4 Eficiencia de clonación obtenida en células CHO-K1. (EM) extracto metanólico de la esponja *Amphimedon compressa*; (C-) células no tratadas; (CS) control del solvente.

La detección *in vitro* de la citotoxicidad ha demostrado ser muy efectiva en el descubrimiento de nuevos agentes activos, para el desarrollo de agentes anticancerígenos⁷⁶. El interés en desarrollar nuevos modelos de ensayo de citotoxicidad se ha incrementado, por la necesidad de hacer la evaluación de una manera rápida y económica pretendiendo que los resultados sean cuantificables y reproducibles⁷⁷.

El carácter citotóxico del EM de la esponja se observó inicialmente con la determinación de la IC_{50} , que fue del orden de 12 $\mu\text{g/ml}$, siendo esta considerablemente baja si se tiene en cuenta que estamos partiendo de un extracto y no de fracciones ni de compuestos aislados. De esta manera hemos considerado el EM de la esponja *A compressa* según lo planteado por el NCI como un extracto con potencial bioactivo, prediciendo igualmente una potencia más alta en la purificación de los compuestos activos menor a 4 $\mu\text{g/ml}$ ⁷⁸.

La tinción por azul de Tripano permite la visualización de las células viables de las no viables, el colorante teñirá aquellas células con daño en la membrana celular posiblemente precediendo su muerte. De esta forma, este ensayo puede complementar lo encontrado con el ensayo de MTT arrojando información sobre el metabolismo celular así como de la viabilidad⁷⁷.

Los resultados obtenidos con el ensayo de viabilidad celular y con la prueba de MTT, no evidenciaron una acción citotóxica clara del extracto metanólico frente a las dos líneas celulares CHO-K1 y Jurkat. El porcentaje de viabilidad celular no se diferenció por azul de Tripano en las 60 horas de exposición a la concentración de tratamiento del EM. Igualmente los resultados de citotoxicidad del MTT revelaron una correlación con los

datos de viabilidad del azul de Tripano, por lo que se podría descartar de esta manera la presencia de falsos positivos reportados en algunas ocasiones para el MTT ⁷⁹.

Teniendo en cuenta lo anterior, no se puede afirmar que exista una acción citotóxica diferencial entre las líneas celulares Jurkat y CHO-K1 evaluadas. Adicionalmente, se puede considerar que en ciertas circunstancias los compuestos bioactivos pueden perder su actividad cuando permanecen mezclados con otras sustancias que inhiben su acción específica, efecto conocido como antagonista ²⁷. Por tanto, los fraccionamientos biodirigidos del extracto permitirían el aislamiento de un compuesto(s) bioactivo(s) presente, pero con efectos inhibitorios y que posiblemente actúe a concentraciones mucho más bajas que las reportadas ^{27; 80}.

El bajo nivel citotóxico mostrado hasta el momento por el extracto metanólico de la esponja *A. compressa* contrastan con estudios previos de la esponja en donde se han aislado compuestos citotóxicos como el Halitoxin el cual se le ha demostrado actividad citotóxica contra peces y ratones ⁸¹.

Tanto el ensayo MTT como el de azul de Tripano son denominados de tiempo corto, lo que significa que miden la acción citotóxica de una sustancia desde el punto de vista metabólico y de viabilidad, en un periodo de tiempo corto, por lo cual pueden ser reversibles en determinadas circunstancias ⁷³. Por otro lado, la evaluación de la supervivencia celular por medio de la eficiencia de clonación permite la evaluación de la capacidad proliferativa de la población celular ⁷³ después de tratamiento con el extracto de la esponja y de esa manera observar si las pruebas de corto tiempo, realmente causan la muerte celular impidiendo su proliferación o si aquellos daños observados fueron reparados por la misma maquinaria celular ⁷³.

El ensayo de eficiencia de clonación realizado para la línea celular CHO-K1 mostró resultados similares al usar concentraciones menores a la IC₅₀ de extracto metanólico de la esponja *A. compressa* disminuyendo el efecto citotóxico semejante a lo observado en MTT y azul de Tripano.

2.3 Evaluación del potencial genotóxico

2.3.1 Aberraciones cromosómicas

El efecto del extracto metanólico de la esponja *Amphimedon compressa* sobre la de aberraciones cromosómicas en las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat, se clasificaron dependiendo del tipo de acuerdo a lo descrito en metodología. La prueba se considera positiva si el promedio de las alteraciones encontradas en un tratamiento es tres o dos veces mayor que el control (Figura 2-6).

En la tabla 2-2 se observan las frecuencias de aberraciones cromosómicas presentes en la línea celular CHO-K1 tratada con el extracto metanólico de *Amphimedon compressa*. El 8% (24/300) de las mitosis presentó al menos una alteración, observándose efectos significativos en esta línea con relación a sus controles (C-: $p=0.029183$).

Tabla 2-2 Aberraciones cromosómicas presentes en la línea celular CHO-K1 tratada con el extracto metanólico de la esponja *Amphimedon compressa*.

CHO-K1	MITOSIS EVALUADAS (n)	B	BB	DC/R	MR	MITOSIS ABERRANTES* (%)
C-	80	1 (1,3%)	0	2 (2,5%)	1 (1,3%)	5
CS	100	0	0	2 (2%)	0	2
C+	100	67 (67%)	71 (71%)	18 (18%)	55 (55%)	90
EM	300	13 (4,3%)	8 (2,7%)	3 (1%)	0	8

*Porcentaje de mitosis con al menos una aberración.

(EM) Extracto metanólico de la esponja *Amphimedon compressa*; (C-) Células no tratadas y (CS) control del solvente, (C+) Células tratadas con mitomicina C, (B) Quiebre cromosómico o isocromatídico (BB) Cromosomas dicéntricos (DC) Cromosomas en anillo y (R) Figuras multirradiales (MR).

En el caso de la línea celular Jurkat, la frecuencia de aberraciones cromosómicas causadas por la exposición al el extracto metanólico de la esponja *Amphimedon compressa*, se incrementó notablemente mostrando una diferencia altamente significativa al comparar el efecto del extracto de la esponja en cada una de las líneas evaluadas ($p < 0.01$) (Figura 2-5). El 74,2% (23/31) de la población en Jurkat expuesta al extracto

metanólico presentó al menos un tipo de aberración cromosómica, de los cuales el 100% de éstos presentaba al menos un quiebre cromatídico (tabla 2-3). Igualmente se observó que la concentración de extracto de la esponja usada suprimió la actividad mitótica de las células en aproximadamente el 90% de la población (ver tabla 2-2 y 2-3).

Tabla 2-3 Aberraciones cromosómicas presentes en la línea celular Jurkat tratada con el extracto metanólico de la esponja *Amphimedon compressa*.

Jurkat	MITOSIS EVALUADAS (n)	B	BB	DC/R	MR	MITOSIS ABERRANTES* (%)
C-	100	0	0	4 (4%)	1 (1%)	5
CS	100	0	0	3 (3%)	0	3
C+	11	6 (54,5%)	5 (45,5%)	1 (9,1%)	2 (18,2%)	72,7
EM	31	23 (74,2%)	4 (12,9%)	1 (3,2%)	2 (6,5%)	74,2

*Porcentaje de mitosis con al menos una aberración.

(EM) Extracto metanólico de la esponja *Amphimedon compressa*; (C-) Células no tratadas y (CS) control del solvente, (C+) Células tratadas con mitomicina C, (B) Quiebre cromosómico o isocromatídico (BB) Cromosomas dicéntricos (DC) Cromosomas en anillo y (R) Figuras multirradiales (MR).

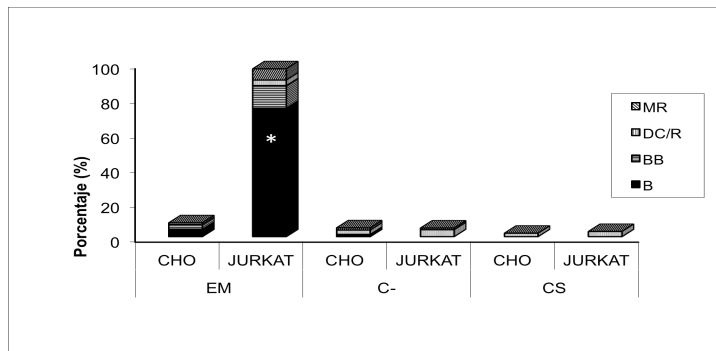


Figura 2-5 Comparación de las aberraciones cromosómicas en las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat. EM: Extracto metanólico de la esponja *Amphimedon compressa*; C-: Células no tratadas CS: Control del solvente, B: Quiebre cromosómico o isocromatídico BB: Cromosomas dicéntricos DC: Cromosomas en anillo y R: Figuras multirradiales (MR).

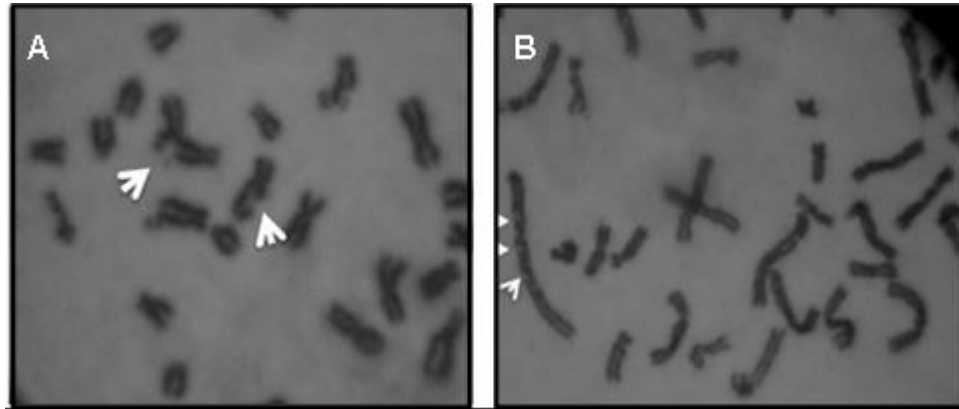


Figura 2-6 Aberraciones cromosómicas de tipo quiebre cromatídico presentes en la células Jurkat. (A) quiebre sencillo, por cromosoma (B) quiebres múltiples por cromosoma.

Es notable que el efecto del extracto sobre las aberraciones cromosómicas en la línea celular Jurkat fue ligeramente más alta que la observada en el control positivo, en tal caso no se encontró diferencia significativa entre el efecto causado por la mitomicina C y el extracto metanólico de la esponja *Amphimedon compressa* ($p=0.53342$) (Tabla 2-3).

Teniendo en cuenta los anteriores resultados, puede afirmarse que el porcentaje de aberraciones cromosómicas en la línea celular Jurkat se incrementa significativamente con respecto al control negativo cuando se usa el extracto de la esponja; un intervalo de confianza del 95% para la diferencia media en el porcentaje de aberraciones está entre 51% y 87%⁶². En contraste, al usar el extracto sobre la línea CHO-K1 no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de aberraciones producidas en relación con el control.

2.3.2 Ensayo Cometa

La técnica alcalina del ensayo cometa fue empleada con el fin de identificar de forma cuantitativa el efecto clastogénico en el ADN de las líneas CHO-K1 y Jurkat del extracto metanólico de la esponja *A. compressa*. La figura 2-5 muestra los diferentes parámetros cuantitativos evaluados en el análisis de los cometas obtenidos. Tanto en la longitud de cola (Figura 2-7A) de los cometas como en el *momento de cola* (Figura 2-7B) se observaron correlación de datos por lo que ambos resultados pueden ser comparables. En ambos casos se notó claramente el efecto clastogénico ejercido por EM sobre la línea

celular Jurkat ($p < 0,05$), siendo este último ligeramente mayor que el ejercido por el peróxido de hidrogeno ($p > 0,05$), por tanto el nivel genotóxico evidenciado por parte del extracto fue mayor cuando se sometió a Jurkat, comparado con el efecto mostrado en la línea CHO-K1 ($p < 0,05$). Igualmente, el daño sufrido por CHO-K1 fue ligeramente mayor que los controles, mas sin embargo no se encontró significancia estadística para este efecto.

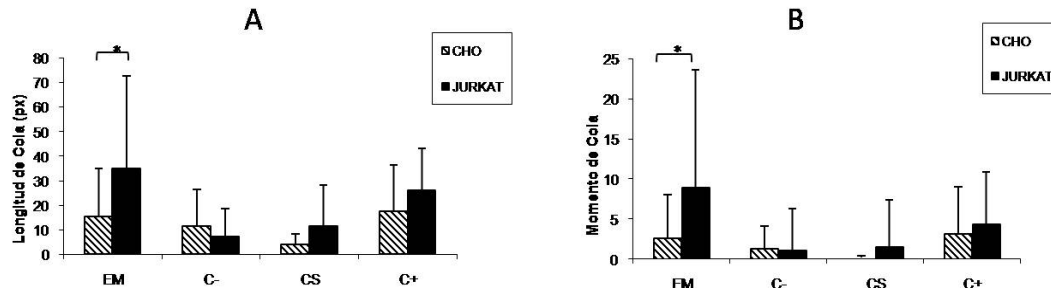


Figura 2-7 Evaluación de la longitud de cola (A) y el momento de cola (B) para cada una de las células evaluadas. (EM) extracto metanólico de la esponja *Amphimedon compressa*; (C-) células no tratadas; (CS) control del solvente; (C+) células tratadas con H_2O_2 .

El análisis estadístico de la morfología del cometa, al igual que la longitud del cometa y el momento de cola, en general se observa la tendencia de la línea Jurkat a formar cometas con un nivel de daño superior cuando es sometida a la acción del EM, comparado con la morfologías de cometas dadas en la línea CHO-K1 ($p < 0,01$) (Figura 2-8).

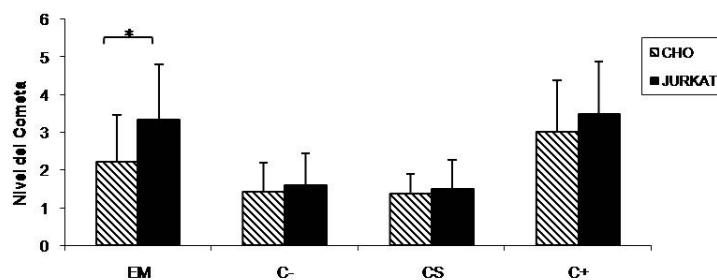


Figura 2-8 Análisis de varianza para la Morfología de los cometas para ambas líneas celulares. (EM) extracto metanólico de la esponja *Amphimedon compressa*; (C-) células no tratadas; (CS) control del solvente; (C+) células tratadas con H_2O_2 .

Las diferencias existentes entre los cometas evaluados de los tratamientos con el extracto metanólico de la esponja *Amphimedon compressa* se muestran en la figura 2-9. La presencia de quiebres en el ADN es más notoria en las células tratadas con el

extracto de la esponja sobre la línea celular Jurkat, mostrando un incremento de cometas de nivel 5 de clasificación morfológica, momentos de cola de $8,95 \pm 14,7$ para Jurkat comparado con $2,51 \pm 5,5$ de la línea celular CHO-K1 respaldan esos resultados (Figura 2-10).

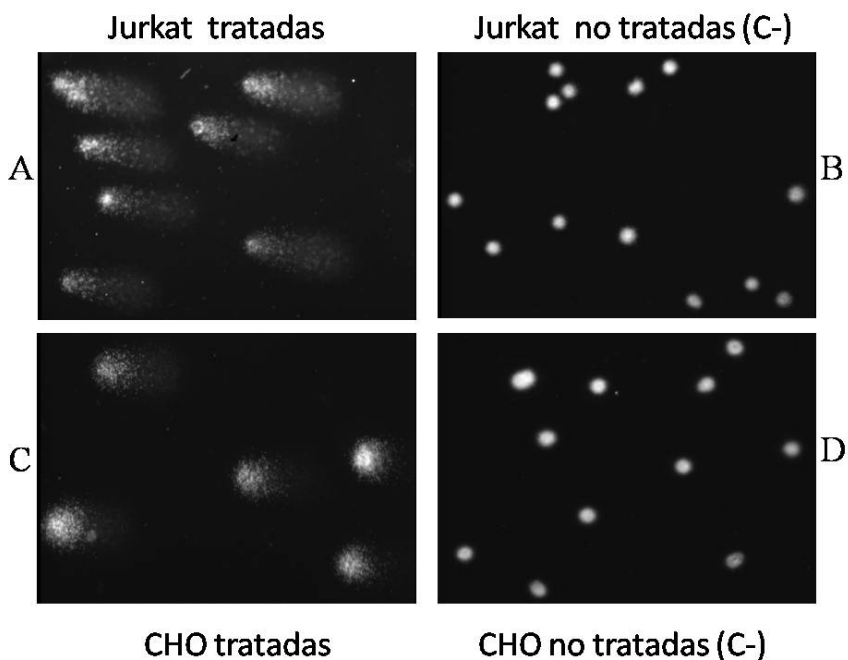


Figura 2-9 Cometas obtenidos de las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat mediante la técnica alcalina del ensayo cometa. A y C líneas celulares Jurkat y CHO-K1 respectivamente sometidas al extracto metanólico de la esponja *A. compressa*; B y D controles negativos de células Jurkat y CHO-K1 respectivamente.

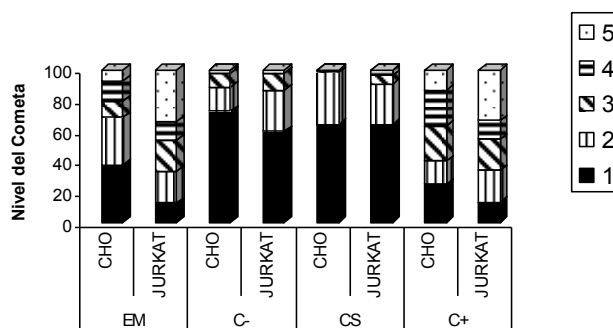


Figura 2-10 Distribución de las morfologías de los cometas según su nivel de clasificación. (EM) extracto metanólico de la esponja *Amphimedon compressa*; (C-) células no tratadas; (CS) control del solvente; (C+) células tratadas con H_2O_2 .

En resumen, en el caso de Jurkat la respuesta genotóxica de las células tratadas con el extracto fué mayor mostrando resultados semejantes que al encontrado con la mitomicina C, comparados con los resultados obtenidos en la línea CHO-K1 en el cual los resultados no se diferenciaron significativamente de sus controles.

2.3.3 Intercambios de Cromátidas Hermanas ICH

En la visualización de intercambios de material genético entre cromátidas hermanas se usó células expuestas al análogo nucleotídico 5'-2'-bromodeoxiuridina durante mínimo dos ciclos celulares para identificar la reparación de roturas de la cadena de ADN cuando estas son expuestas al extracto metanólico de la esponja *Amphimedon compressa*, y así determinar su posible efecto genotóxico debido a la relación que tiene la formación de los ICHs con roturas o por las reparaciones defectuosas de lesiones al ADN ⁸².

Tabla 2-4 Intercambios de Cromátidas Hermanas en células CHO-K1 o Jurkat tratadas con el extracto metanólico de *Amphimedon compressa*.

Tipo	Mitosis (n)	Células Totales	IM (%)	Valor- p
EM -Jurkat	20	2947	0,68	
CS	66	1603	4,12	<0.0001
C+	2	995	0,20	0,0803
C-	28	971	2,88	<0.0001
Tipo	Mitosis (n)	Células Totales	IM (%)	Valor- p
EM-CHO-K1	45	2948	1,50	
CS	22	978	1,71	0,6533
C+	5	993	0,50	0,0140
C-	14	979	1,41	0,8335

(EM) Extracto metanólico de la esponja *Amphimedon compressa*; (C-) Células no tratadas y (CS) Control del solvente

Teniendo en cuenta que el análisis de los ICHs se realizan en aquellas células que se han dividido dos veces en presencia del 5'dBrU, en las poblaciones celulares las cuales habían sido tratado con el extracto metanólico de la esponja *A. compressa*, hubo una reducción generalizada de los índices mitóticos para ambas líneas celulares, 0.68 en el caso de Jurkat menos de la mitad del reportado para CHO-K1 que fue de 1,5 (Tabla 7).

Las características de las tinciones de los cromosomas eran propias de células de un ciclo y medio de división celular, contrastando con las mitosis de claros segundos ciclos de los respectivos controles, por lo que fue imposible determinar la frecuencia de ICHs presentes en las preparaciones.

Teniendo en cuenta la clasificación de los agentes clastogénicos (dependientes o independientes de la fase S del ciclo celular)^{60; 83}, por el grado de aberraciones de tipo quiebre cromatídico observadas, además, por la evidencias (aunque no representativas) de la presencia de otros tipos de aberraciones (figuras multirradiales), es muy posible que la acción realizada por el EM sobre la línea celular Jurkat sea dependiente de la fase S del ciclo celular^{84; 85}.

Con respecto a lo observado en la figura 2-5 es clara la tendencia a la formación de aberraciones cromosómicas en ambas líneas celulares por parte del tratamiento con el extracto de la esponja, siendo más sensible cuando se trata de la línea celular de origen linfoide Jurkat que con la de origen de fibroblastos de hámster CHO-K1. Posiblemente esto sea debido al rol de factores de susceptibilidad individuales⁸⁴ de cada una de las líneas, además, los diferentes cariotipos igualmente juegan un rol importante en la formación de aberraciones cromosómicas⁶⁰ debido a la heterogeneidad existente entre los cromosomas y más aún entre líneas celulares⁸⁶.

En contraste, con los resultados de la acción del extracto en el efecto citotóxico, en el análisis de las aberraciones cromosómicas, se notó que la acción genotóxica ejercida por el extracto fue mayor en la línea celular Jurkat comparado con la línea celular CHO (Figura 2-6), lo cual muestra efecto diferencial en una línea derivada de cáncer y una establecida e inmortal. Sería útil realizar evaluaciones en otras líneas celulares humanas derivadas de cáncer para mirar el espectro del efecto clastogénico del extracto sobre estas, y así determinar la variabilidad de su acción en células de diferentes orígenes y características.

Es importante tener en cuenta que la cantidad de aberraciones cromosómicas en la línea celular Jurkat con EM fue ligeramente mayor comparado con las producidas por la mitomicina C, resultado igualmente observado en la caracterización de los cometas obtenidos al tratar la misma línea con el EM, por lo que queda claro la capacidad clastogénica del extracto metanólico de la esponja *Amphimedon compressa* sobre el

ADN además de que esta actividad se vio influenciada principalmente hacia el material genético de la línea Jurkat. En estudios previos ya se había reportado la relación existente entre los resultados de ambas técnicas, en donde postulan el ensayo cometa como ensayo pronóstico en la formación de aberraciones cromosómicas con el fin de ser usado para propósitos reguladores ⁸⁷.

Por los resultados obtenidos en el presente estudio tanto de las aberraciones cromosómicas como del ensayo cometa, los cuales sugieren una respuesta genotóxica dosis-efecto dependiente y de forma diferencial en la acción del extracto metanólico de la esponja sobre las líneas celulares CHO-K1 y Jurkat.

Además del claro efecto genotóxico evidenciado en las pruebas de Aberraciones cromosómicas y el ensayo cometa, es muy posible que el extracto de la esponja *A. compressa* igualmente esté influyendo en la cinética proliferativa de las líneas celulares debido a las observaciones de los productos mitóticos observados en la prueba de aberraciones cromosómicas y más evidentemente en la de Intercambios de cromátidas hermanas.

2.4 Evaluación del potencial efecto antiproliferativo

2.4.1 Función de acumulación

En el análisis de la cinética proliferativa se determinó que la proliferación de las células Jurkat tratadas con extracto metanólico disminuyó desde las primeras horas de exposición a las células (Figura 2-11,A), en donde se observó que éstas proliferaban de una manera más lenta que sus controles debido a una disminución de la población mitótica, por lo que las pendientes resultantes mostraron diferencias estadísticas ($p < 0.01$). Hecho contrario fue observado en la línea celular CHO-K1, en donde su tasa de división celular no se diferenció estadísticamente de lo reportado por los controles, aunque se observó una disminución de la proliferación igualmente desde los primeros tiempos, nunca alcanzó significancia estadística (Figura 2-11,B).

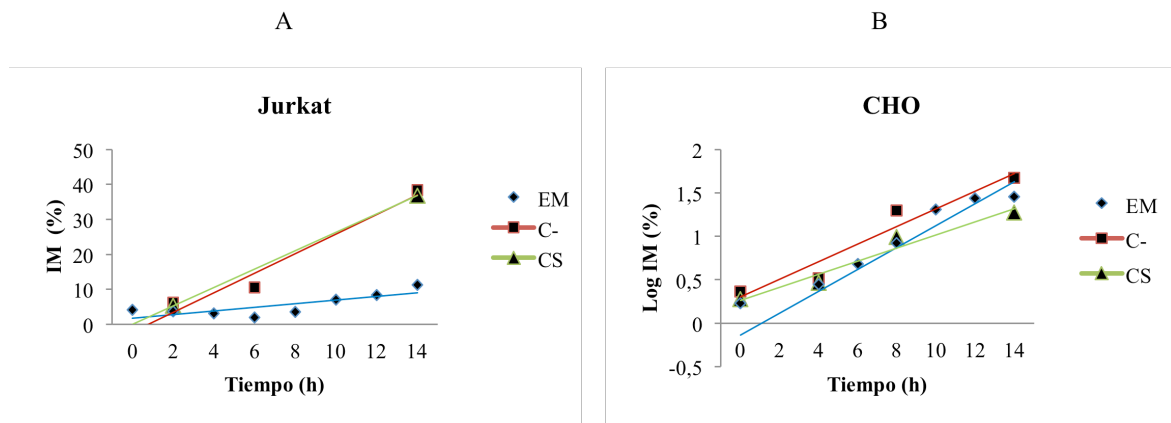


Figura 2-11. Evaluación de la proliferación celular por función de acumulación de células tratadas con el extracto metanólico y bloqueadas con Colcemid, para la línea celular Jurkat (A); para la línea celular CHO (B). (EM): extracto metanólico de la esponja *Amphimedon compressa*; (C-) células no tratadas; (CS) control del solvente; (C+) células tratadas con H₂O₂. *Las líneas continuas representan la tendencia lineal de los datos reportados por cada uno de las líneas.

La disminución en la proliferación reflejada en este ensayo, puede ser explicado por sustancias anti-alimentarias presentes en el extracto las cuales pueden inhibir la conducta normal de alimentación de las células, efecto demostrado en estudios previos de extractos crudos de la esponja *Amphimedon compressa*, dichas sustancias suponen un rol en la defensa química de esta esponja ⁸¹.

Unas de las razones por la cuales se considera el efecto citotóxico del extracto metanólico de la esponja *A. compressa* independiente del tiempo es debido a que el efecto producido al tratar ambas líneas fue muy semejante en pruebas de corta duración (azul de Tripano y MTT) y en la de larga duración (Eficiencia de Clonación), además de ser dosis dependiente debido al usar una concentración inferior a la IC₅₀ la citotoxicidad del extracto disminuyó lógicamente.

Con respecto al efecto genotóxico del extracto EM se observa la existencia de una respuesta dosis-efecto diferencial entre las líneas celulares debido a la magnitud de daño producido en la línea celular Jurkat comparado con el bajo efecto en CHO-K1 usando la misma concentración.

Estudios previos plantean que el efecto citotóxico de una sustancia no influye en los resultados de los cometas ⁸⁷, por tanto se descarta que la formación de los cometas ante

la exposición con EM sea debido a un posible efecto citotóxico ejercido del extracto sobre el material genético y por ende en la formación de los cometas.

Los resultados anormales en el índice mitótico evidenciados en los ensayos de genotoxicidad, sumado a que el MTT no es capaz de distinguir entre sustancias citostáticas y citotóxicas, y que el ensayo de Eficiencia de Clonación solo mide muerte celular ⁵⁸, se realizó la evaluación de la cinética del ciclo celular de ambas líneas celulares en presencia del EM. Los resultados mostraron que además de agente genotóxico, el EM influye de alguna manera en el ciclo celular, posiblemente, explicado por la potencial respuesta celular al daño causado en el ADN, la cual abarca múltiples mecanismos de reparación y respuestas de control que pueden retrasar la progresión del ciclo celular o modular la replicación del ADN ⁸⁸.

En resumen, el extracto metanólico de la esponja *Amphimedon compressa* mostró una actividad biológica promisoriosa con una IC₅₀ de 12 µg/ml y al disminuir la concentración a 7 µg/ml se observó poco efecto citotóxico, de manera opuesta al evidente efecto genotóxico, además se observó cierta acción citostática, lo cual fue corroborado en los resultados de las aberraciones cromosómicas y de ICH.

3. Conclusiones y recomendaciones

- Los resultados obtenidos en las líneas celulares CHO y Jurkat tratadas con el extracto EM, permitió determinar el potencial bioactivo del extracto metanólico de *Amphimedon compressa* con una IC₅₀ para ambas líneas celulares de 12 µg/ml.
- El análisis de genotoxicidad reveló un mayor efecto diferencial del extracto metanólico de la esponja *A. compressa* sobre la línea celular de origen linfocítico Jurkat respecto a la línea de origen de fibroblastos CHO-K1.
- El extracto metanólico de la esponja *A. compressa* retardó el ciclo celular de la línea celular Jurkat comparado con la línea celular CHO-K1, lo cual está de acuerdo con el efecto genotóxico encontrado en la línea Jurkat.
- Se recomienda el fraccionamiento, aislamiento y purificación de sustancias candidatas presentes en el extracto metanólico de la esponja *A. compressa* responsables de su alta actividad biológica, lo cual podría causar el mismo efecto a concentraciones menores a las reportadas en el presente estudio.
- Se recomienda realizar otros estudios de mutagénesis o de ciclo celular por citometría de flujo para discriminar en qué fase del ciclo puede ser afectada cada línea celular.
- Se recomienda realizar estos estudios en otras líneas celulares derivadas de tumor para obtener más información del comportamiento biológico y diferencial del extracto.

Bibliografía

1. Sima P & Vetvicka V. Bioactive substances with anti-neoplastic efficacy from marine invertebrates Porifera and Coelenterata. *World J Clin Oncol* 2011; **2**(11): 355-361.
2. Schumacher M, Kelkel M, Dicato M & Diederich M. Gold from the sea: marine compounds as inhibitors of the hallmarks of cancer. *Biotechnol Adv* 2011; **29**(5): 531-547.
3. Butler AJ, Rees T, Beesley P & Bax NJ. Marine biodiversity in the Australian region. *PLoS One* 2010; **5**(8): e11831.
4. Fautin D, Dalton P, Incze LS, Leong JA, Pautzke C, Rosenberg A *et al.* An overview of marine biodiversity in United States waters. *PLoS One* 2010; **5**(8): e11914.
5. Miloslavich P, Diaz JM, Klein E, Alvarado JJ, Diaz C, Gobin J *et al.* Marine biodiversity in the Caribbean: regional estimates and distribution patterns. *PLoS One* 2010; **5**(8): e11916.
6. Blunt JW, Copp BR, Munro MH, Northcote PT & Prinsep MR. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 2011; **28**(2): 196-268.
7. Ausubel J, Crist D & Waggoner P (2010). First Census of Marine Life. Highlights of a Decade of Discovery. Census of Marine Life. In. Census of Marine Life. p 64.
8. Venugopal V. Marine Products for Healthcare: Functional and Bioactive Nutraceutical Compounds from the Ocean. *CRC Boca Raton FL* 2008; **1st Ed.**
9. Jimenez J, Cuevas C & Albericio F. Productos naturales de origen marino. *Investigacion y Ciencia* 2007; **365**: 75-83.
10. Scheuer PJ. Some marine ecological phenomena: chemical basis and biomedical potential. *Science* 1990; **248**(4952): 173-177.
11. Hill RT & Fenical W. Pharmaceuticals from marine natural products: surge or ebb? *Curr Opin Biotechnol* 2010; **21**(6): 777-779.
12. Xu N, Sun X & Yan X. A new cyclostelletamine from sponge Amphimedon compressa. *Chin Chem Lett* 2007; **18**: 947-950.

13. Erwin P, López S & Schuhmann P. The pharmaceutical value of marine biodiversity for anti-cancer drug discovery. *Ecological Economics* 2010; **70**(2): 445–451.
14. Wulff JL. Asexual fragmentation, genotype success, and population dynamics of erect branching sponges. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* (1991; **149**(2): 227-247.
15. Arrieta JM, Arnaud-Haond S & Duarte CM. What lies underneath: conserving the oceans' genetic resources. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**(43): 18318-18324.
16. Nagle DG & Zhou YD. Marine Natural Products as Inhibitors of Hypoxic Signaling in Tumors. *Phytochem Rev* 2009; **8**(2): 415-429.
17. Faulkner DJ. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 2000; **17**(1): 7-55.
18. Mayer AM & Hamann MT. Marine pharmacology in 1999: compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anthelmintic, anti-inflammatory, antiplatelet, antiprotozoal and antiviral activities affecting the cardiovascular, endocrine, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2002; **132**(3): 315-339.
19. Barnathan G & Kornprobst J. Isoprenoid fatty acids in marine sponge phospholipids. *Recent Res Devel Lipids* 1998; **2**: 235-248.
20. Blunt JW, Copp BR, Munro MH, Northcote PT & Prinsep MR. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 2010; **27**(2): 165-237.
21. Tan G, Gyllenhaal C & Soejarto DD. Biodiversity as a source of anticancer drugs. *Curr Drug Targets* 2006; **7**(3): 265-277.
22. Joseph JD. Lipid composition of marine and estuarine invertebrates: porifera and cnidaria. *Prog Lipid Res* 1979; **18**(1): 1-30.
23. Rodkina S. Fatty acids and other lipids of marine sponges. *Russ J Mar Biol* 2005; **31**: S49-60.
24. Rezanka T. Very-long-chain fatty acids from the animal and plant kingdoms. *Prog Lipid Res* 1989; **28**(3): 147-187.
25. Djerassi C & Lam W. Phospholipid studies of marine organisms. Part 25. Sponge phospholipids. *Acc Chem Res* 1991; **24**: 69–75.

26. Mayer AM, Rodriguez AD, Berlinck RG & Hamann MT. 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. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1790**(5): 283-308.
27. Xue S, Zhang HT, Wu PC, Zhang W & Yuan. Q. Study on bioactivity of extracts from marine sponges in the Chinese sea. . *J Exp Mar Bio Ecol* 2004. : 298:271-278.
28. Rangel M, Sanctis Bd, Freitas Jd, Polatto J, Granato A, Berlinck R *et al.* Cytotoxic and neurotoxic activities in extracts of marine sponges (Porifera) from the southeastern Brazilian coast. *J Exp Mar Biol Ecol* 2001: 262:231-240.
29. Troll W, Sueoka N, Sueoka E, Laskin JD & Heck DE. Inhibitors of protein phosphatases (okadaic acid and tautomycin) block sea urchin development. *Biol Bull* 1995; **189**(2): 201.
30. Nemoto T, Ojika M & Sakagami Y. Amphimic acids, novel unsaturated c28 fatty acids as DNA Topoisomerase I inhibitors from an Australian sponge *Amphimedon* sp. . *Tetrahedron Lett* 1997; **38**(32): 5667-5670.
31. Dembitsky VM. [Bromo- and iodo-containing alkaloids from marine microorganisms and sponges]. *Bioorg Khim* 2002; **28**(3): 196-208.
32. Dembitsky VM, Rezanka T & Srebniak M. Lipid compounds of freshwater sponges: family Spongillidae, class Demospongiae. *Chem Phys Lipids* 2003; **123**(2): 117-155.
33. Molinski TF, Dalisay DS, Lievens SL & Saludes JP. Drug development from marine natural products. *Nat Rev Drug Discov* 2009; **8**(1): 69-85.
34. Wattanadilok R, Sawangwong P, Rodrigues C, Cidade H, Pinto M, Pinto E *et al.* Antifungal activity evaluation of the constituents of *Haliclona baeri* and *Haliclona cymaeformis*, collected from the Gulf of Thailand. *Mar Drugs* 2007; **5**(2): 40-51.
35. Freitas J, Malpezzi E, Costa L, Berlinck R, Almeida A, Ogawa C *et al.* Cytotoxic and neurotoxic effects induced by halitoxin isolated from *Amphimedon viridis* (Porifera). *Toxicon* 1996; **34**(3): 335-335(331).

36. Matsunaga S, Miyata Y, van Soest RW & Fusetani N. Tetradehydrohalicyclamine A and 22-hydroxyhalicyclamine A, new cytotoxic bis-piperidine alkaloids from a marine sponge *Amphimedon* sp. *J Nat Prod* 2004; **67**(10): 1758-1760.
37. Rezanka T & Sigler K. Odd-numbered very-long-chain fatty acids from the microbial, animal and plant kingdoms. *Prog Lipid Res* 2009; **48**(3-4): 206-238.
38. Jun Xu N, Sun X & Jun Yan X. A new cyclostelletamine from sponge *Amphimedon compressa*. *Chinese Chemical Letters* 2007; **18**: 947–950.
39. Nishi T, Kubota T, Fromont J, T. S & Kobayashi J. Nakinadines BeF: new pyridine alkaloids with a b-amino acid moiety from sponge *Amphimedon* sp. *Tetrahedron* 64 2008: 3127-3132.
40. Zabala D, Echavarría B & Martínez ZA. Inhibitory activity of some marine sponge extracts from Urabá gulf on dihydrofolate reductase enzyme. *Vitae* 2008; **15**(2): 285-289.
41. Kolattukudy P. editor. Chemistry and biochemistry of natural waxes. . *Amsterdam: Elsevier* 1976.
42. Muralidhar P, Krishna N, Kumar MM, Rao CB & Rao DV. New sphingolipids from marine sponge *Iotrochota baculifera*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2003; **51**(10): 1193-1195.
43. Liu Y, Ji H, Dong J, Zhang S, Lee KJ & Matthew S. Antioxidant alkaloid from the South China Sea marine sponge *Iotrochota* sp. *Z Naturforsch C* 2008; **63**(9-10): 636-638.
44. Hertiani T, Edrada-Ebel R, Ortlepp S, van Soest RW, de Voogd NJ, Wray V *et al.* From anti-fouling to biofilm inhibition: new cytotoxic secondary metabolites from two Indonesian *Agelas* sponges. *Bioorg Med Chem* 2010; **18**(3): 1297-1311.
45. Gribble GW. Naturally Occurring Organohalogen Compounds. *Acc Chem Res* 1998; **31**: 141–152.
46. Peng J, Franzblau S, Zhang F & Hamann M. Novel sesquiterpenes and a lactone from the Jamaican sponge *Myrmekioderma styx*. *Tetrahedron Lett* 2002; **43**: 9699–9702.

47. El Sayed KA, Yousaf M, Hamann MT, Avery MA, Kelly M & Wipf P. Microbial and chemical transformation studies of the bioactive marine sesquiterpenes (S)-(+)-curcuphenol and -curcudiol isolated from a deep reef collection of the Jamaican sponge *Didiscus oxeata*. *J Nat Prod* 2002; **65**(11): 1547-1553.
48. Fusetani N, Sugano M, Matsunaga S & Hashimoto K. (+)-Curcuphenol and dehydrocurcuphenol, novel sesquiterpenes which inhibit H,K-ATPase, from a marine sponge *Epipolasis* sp. *Experientia* 1987; **43**(11-12): 1234-1235.
49. Gul W, Hammond NL, Yousaf M, Peng J, Holley A & Hamann MT. Chemical transformation and biological studies of marine sesquiterpene (S)-(+)-curcuphenol and its analogs. *Biochim Biophys Acta* 2007; **1770**(11): 1513-1519.
50. AE W, SA P, OJ M, S K & PJ. M. (+)- Curcuphenol and (+)-curcudiol, sesquiterpene phenols from shallow and deep water collections of the marine sponge *Didiscus flavus*. *J Nat Prod* 1987; **50**: 976–978.
51. Rodrigo G, Almanza GR, Cheng Y, Peng J, Hamann M, Duan RD *et al.* Antiproliferative effects of curcuphenol, a sesquiterpene phenol. *Fitoterapia* 2010; **81**(7): 762-766.
52. Mora J, Zea S, Santos M & Newmark F. Capacidad antimicrobiana de extractos de esponjas marinas del Caribe colombiano. *Bol Invest Mar Cost* 2007; **36**: 167-179.
53. Roberts CM, McClean CJ, Veron JE, Hawkins JP, Allen GR, McAllister DE *et al.* Marine biodiversity hotspots and conservation priorities for tropical reefs. *Science* 2002; **295**(5558): 1280-1284.
54. Duque C. Búsqueda de compuestos bioactivos a partir de organismos marinos del Caribe colombiano. *Rev Acad Colomb Cienc*, XXII 1998.; **85**: 527-537.
55. Galeano E & Martinez A. Antimicrobial activity of marine sponges from Urabá Gulf, Colombian Caribbean region. *Journal de Mycologie Medicale* 2007; **17**: 21-24.
56. Mora J, Newmark F, Santos M & Sánchez J. Evaluación de extractos de esponjas marinas como nuevas fuentes de sustancias antimicrobianas. *Rev Esp Quimioter* 2008; **21**(3): 174-179.

57. Kato F, Tanaka M & Nakamura K. Rapid fluorometric assay for cell viability and cell growth using nucleic acid staining and cell lysis agents. *Toxicol In Vitro* 1999; **13**(6): 923-929.
58. Koulman A, Proksch P, Ebel R, Beekman AC, van Uden W, Konings AW *et al.* Cytotoxicity and mode of action of aeropylsinin-1 and a related dienone from the sponge *Aplysina aerophoba*. *J Nat Prod* 1996; **59**(6): 591-594.
59. Jorritsma JB & Konings AW. Inhibition of repair of radiation-induced strand breaks by hyperthermia, and its relationship to cell survival after hyperthermia alone. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1983; **43**(5): 505-516.
60. Natarajan AT. Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutat Res* 2002; **504**(1-2): 3-16.
61. Savage JR. Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *J Med Genet* 1976; **13**(2): 103-122.
62. Hauck W & Anderson S. A Comparison of Large-Sample Confidence Interval Methods for the Difference of two Binomial Probabilities. *American Statistical* 1986; **40**(4).
63. Collins AR, Dobson VL, Dusinska M, Kennedy G & Stetina R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res* 1997; **375**(2): 183-193.
64. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000; **35**(3): 206-221.
65. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 2004; **26**(3): 249-261.
66. Fairbairn DW, Olive PL & O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 1995; **339**(1): 37-59.
67. Singh NP, McCoy MT, Tice RR & Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; **175**(1): 184-191.
68. Liao W, McNutt MA & Zhu WG. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods* 2009; **48**(1): 46-53.

69. Paz-y-Mino C, Lopez-Cortes A, Arevalo M & Sanchez ME. Monitoring of DNA damage in individuals exposed to petroleum hydrocarbons in Ecuador. *Ann N Y Acad Sci* 2008; **1140**: 121-128.
70. Silva MJ, Carothers A, Castelo Branco NA, Dias A & Boavida MG. Sister chromatid exchange analysis in workers exposed to noise and vibration. *Aviat Space Environ Med* 1999; **70**(3 Pt 2): A40-45.
71. Latt SA. Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973; **70**(12): 3395-3399.
72. Boyd MR. *The NCI in vitro anticancer drug discovery screen: concept, implementation, and operation 1985-1995*, Teicher Humana Press Inc., Totowa, N edn. B. Teicher (ed.), 1997.
73. Freshney IR. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, Fifth Edition edn. John Wiley & Sons, Inc, 2005.
74. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; **65**(1-2): 55-63.
75. Vallis KA & Wolf CR. Relationship between the adaptive response to oxidants and stable menadione-resistance in Chinese hamster ovary cell lines. *Carcinogenesis* 1996; **17**(4): 649-654.
76. Cragg GM & Newman DJ. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. *Expert Opin Investig Drugs* 2000; **9**(12): 2783-2797.
77. Fornelli F, Minervini F & Logrieco A. Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9). *J Invertebr Pathol* 2004; **85**(2): 74-79.
78. Suffness M & Pezzuto JM. Assays related to cancer drug discovery. Methods in Plant Biochemistry. . *Biological Techniques, Academic Press, London*, 1991; **Vol. 6.**: 71-131.
79. Rollino C, Borsa S, Bellone G, Piccoli G & Emanuelli G. False positive results with MTT assay. *J Immunol Methods* 1995; **185**(1): 141-143.
80. Jimenez PC, Wilke DV, Takeara R, Lotufo TM, Pessoa C, de Moraes MO *et al.* Cytotoxic activity of a dichloromethane extract and fractions obtained

- from *Eudistoma vancouveri* (Tunicata: Ascidiacea). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2008; **151**(3): 391-398.
81. Albrizio S, Ciminiello P, Fattorusso E, Magno S & Pawlik JR. Amphitoxin, a new high molecular weight antifeedant pyridinium salt from the Caribbean sponge *Amphimedon compressa*. *J Nat Prod* 1995; **58**(5): 647-652.
 82. Obe G, Schunck C & Johannes C. Induction of sister-chromatid exchanges by AluI, DNase I, benzon nuclease and bleomycin in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Mutat Res* 1994; **307**(1): 315-321.
 83. Kihlman BA. *Caffeine and Chromosomes*. Elsevier scientific publishing, 1977, 504pp.
 84. Norppa H, Bonassi S, Hansteen IL, Hagmar L, Stromberg U, Rossner P *et al.* Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res* 2006; **600**(1-2): 37-45.
 85. McFee AF. Chromosomal effects of theophylline measured in mouse marrow cells in vivo. *Mutat Res* 1991; **264**(4): 219-224.
 86. Slijepcevic P & Natarajan AT. Distribution of X-ray-induced G2 chromatid damage among Chinese hamster chromosomes: influence of chromatin conformation. *Mutat Res* 1994; **323**(3): 113-119.
 87. Hartmann A, Plappert U, Poetter F & Suter W. Comparative study with the alkaline Comet assay and the chromosome aberration test. *Mutat Res* 2003; **536**(1-2): 27-38.
 88. Smith J, Tho LM, Xu N & Gillespie DA. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res* 2010; **108**: 73-112.