

EFFECTO ANTIMITÓTICO IN VITRO EN EL EXTRACTO METANÓLICO DE MACROALGAS MARINAS DE LA COSTA CARIBE COLOMBIANA

IN VITRO ANTIMITOTIC EFFECT OF METHANOLIC EXTRACTS OF SEAWEEDS SPECIES FROM THE COLOMBIAN CARIBBEAN COST

Sandra P. OSPINA G.¹, Juan B. LÓPEZ O.^{1*} y María E. MÁRQUEZ F.¹

Recibido: Marzo 27 de 2007 Aceptado: Noviembre 6 de 2007

RESUMEN

En la búsqueda de nuevas posibilidades quimioterapéuticas para el tratamiento del cáncer, se han reportado numerosos hallazgos de actividad antitumoral en extractos derivados de diversas especies de macroalgas marinas. En el presente trabajo se evalúa el efecto antitumoral del extracto metanólico de seis especies de macroalgas marinas colectadas en el Caribe colombiano; específicamente se realiza un ensayo citotóxico, una evaluación sobre el efecto en el ciclo celular en la línea HT29 y un ensayo de selectividad en linfocitos T de sangre periférica de personas normales estimulados con fitohemaglutinina. Los resultados muestran que el extracto metanólico de las seis especies de macroalgas marinas posee un potente efecto antimitótico, de donde se puede inferir su potencial antitumoral. Éste es el primer reporte que demuestra que el efecto citotóxico de estos extractos se da por un bloqueo mitótico, el cual no produce alteraciones en la morfología y disposición cromosómica y se presenta desde prometafase inicial hasta anafase tardía, diferente a lo encontrado en los cultivos tratados con Colcemid[®]. Estos hallazgos convierten los extractos metanólicos de estas macroalgas marinas en especies promisorias para ser usadas como fuente de drogas antineoplásicas y como agentes antimitóticos en prácticas de citogenética convencional.

Palabras clave: actividad biológica, citotoxicidad, ciclo celular, macroalgas marinas, extracto metanólico.

ABSTRACT

Searching for new chemotherapy strategies for cancer treatment, numerous traces of antitumor activity have been reported from different species of seaweeds extracts. This study is carried out an evaluation of the antitumor activity with methanolic extract of six species of seaweeds collected in the colombian Caribbean sea, a cytotoxic test, an evaluation about the effect in the cell cycle line HT29 and a selective test in phytohemaglutinine-stimulated peripheral human blood-derived T-lymphocytes are done. All methanolic extracts showed antimitotic effect in the cell system with a wide spectrum of blockage on the mitotic phase from early prometaphase to late anaphase. None of the extracts tested produced an effect on chromosome morphology. This is the first report that demonstrates that the cytotoxic effect of seaweed methanolic extracts act by mitotic blocking, and suggest that methanolic extracts from colombian seaweeds contains bioactive substances with potential pharmacological use in cancer chemotherapy and cytogenetic assays. Further studies on the usefulness of such substances as cell cycle blocking agents are in process.

Keywords: biological activity, cytotoxicity, cell cycle, seaweeds, methanolic extract.

¹ Grupo de Biotecnología Animal, Laboratorio de Biotecnología Animal, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Calle 59A No 63-20, Bloque 11 oficina 214. Medellín - Colombia. Teléfono 57-4-4309137. Fax 57-4-4309116.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: jblopez@unalmed.edu.co

INTRODUCCIÓN

Numerosos estudios en busca de productos naturales, realizados desde la década de los 80, han mostrado que en los organismos marinos se encuentran con frecuencia compuestos con estructuras y mecanismos de acción biológica originales, que los hacen sumamente interesantes como modelos para la búsqueda de nuevos fármacos de aplicación terapéutica (1). Las macroalgas marinas han sido uno de los grupos estudiados en este campo (2); se trata de especies vegetales macroscópicas que habitan nichos ecológicos muy poblados, en aguas poco profundas en zonas costeras; poseen sistemas inmunitarios basados en la producción de sustancias químicas para interactuar con su entorno, incluyendo compuestos citotóxicos para defenderse de sus predadores y combatir enfermedades (3).

En la actualidad se encuentran identificados numerosos compuestos químicos provenientes de estas macroalgas marinas, con diversas actividades biológicas, entre las que se destacan: actividad antiviral, antimicótica, antihelmíntica, antiinflamatoria, analgésica y particularmente la antitumoral (2,4). Estudios realizados con numerosas especies de macroalgas marinas colectadas en las costas del Japón encontraron en el extracto metanólico de *Digeniasimplex*, *Gelidiellaacerosa*, *Galaxurafastigiata* y 12 especies del género *Sargassum*, actividad citotóxica, y en algunos casos selectiva, que inhibe el crecimiento de células de la línea L1210 derivadas de leucemia murina, y poca o ninguna citotoxicidad en células de la línea normal murina NIH-3T3 (5); también encontraron dicha actividad en el extracto metanólico de *Amphiroa zonata*, el cual fue evaluado en cinco líneas de leucemia humana (6), y en el extracto metanólico de *Caulerpa sertularioides*, en el cual detectaron inhibición de la enzima telomerasa en células de leucemia humana MOLT-4 (7). Dichas evidencias permiten inferir el potencial antitumoral de estos extractos naturales.

Los anteriores informes y la gran diversidad de macroalgas marinas (8) identificadas en las costas colombianas motivaron, mediante este estudio, la búsqueda de sustancias potencialmente citotóxicas en el extracto metanólico de seis especies de macroalgas marinas (*Amphiroa fragilissima*, *C. sertularioides*, *D. simplex*, *Galaxaura obtusa*, *G. acerosa* y *Sargassum cymosum*), colectadas en el Caribe colombiano. Una vez detectada la actividad citotóxica, se tuvo como objetivo determinar en cuál de las fases del ciclo

celular ejercen su efecto dichos extractos metanólicos y, finalmente, verificar la posible actividad selectiva sobre células cancerosas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colección del material vegetal

En la primera mitad del año se recolectó un kilogramo húmedo de *A. fragilissima*, *C. sertularioides*, *D. simplex*, *G. obtusa*, *G. acerosa* y *S. cymosum*, en el litoral rocoso de Bahía Concha, ubicado en la costa central del Caribe colombiano, cerca de la ciudad de Santa Marta, en el departamento del Magdalena. La identificación taxonómica fue confirmada en el Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras de Colombia. Inicialmente, el material vegetal se sometió a una cuidadosa remoción manual de organismos epífitos, seguida de un lavado con abundante agua destilada para lograr, entre otras cosas, la eliminación de posibles microorganismos asociados o simbioses. Posteriormente este material se sometió a un proceso de secado a temperatura ambiente hasta obtener un peso seco constante.

Obtención de extractos metanólicos

El material vegetal seco se procesó en un molino eléctrico de árbol con cuchillas de golpe (Retsch) hasta obtener partículas de 1 mm, a las cuales se les adicionaron 200 ml de metanol (MERCK) y se dejaron en agitación magnética durante 52 horas en condiciones de oscuridad. Este extracto se filtró con una membrana de 100 μm (MILLIPORE), antes de secar el sobrenadante a presión reducida en un rota-evaporador (Heidolph Laborota 4001), luego se almacenó a 4° C en condiciones de oscuridad hasta la preparación de las concentraciones de trabajo.

Ensayo de actividad citotóxica

Se realizaron cultivos sembrando 2×10^5 células de la línea celular HT29 en cajas T25 (FALCON), en medio RPMI 1640 (SIGMA), con 10 % de suero bovino fetal (GIBCOL), 100 UI de penicilina (GIBCOL) y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomycin (GIBCOL); 37° C de temperatura de incubación y 5% de atmósfera de CO_2 hasta obtener los cultivos en crecimiento exponencial. Bajo esas condiciones se evaluaron durante 12 horas de tratamiento y por triplicado el efecto de siete concentraciones (0.01, 1, 2.5, 10, 25, 50, 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$) del extracto metanólico de *A. fragilissima*, *D. simplex*, *C. sertularioides*. El control del solvente se trató con 25 μl de metanol (MERCK),

correspondiente al volumen final del solvente de los extractos. Transcurridas las 12 horas se lavaron las células con RPMI 1640 (SIGMA), se desprendieron con 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tripsina (GIBCOL) y se cultivaron 400 células de cada tratamiento en las condiciones antes descritas durante 192 horas. Posteriormente se realizó la fijación celular en la caja T25 con una mezcla 3:1 de metanol y ácido acético (MERCK), la tinción celular con Giemsa al 5% y el conteo de las colonias en un microscopio invertido en 4X (Nikon). La citotoxicidad se estimó mediante la eficiencia de clonación relativa (9) y se realizó una comparación entre los tratamientos con un análisis de varianza (ANOVA) en el programa StatGraphics Plus (Ver 3.1).

Efecto sobre el ciclo celular

Se realizaron cultivos celulares de la línea HT29 en las condiciones descritas para el ensayo anterior. Las células en fase exponencial fueron tratadas con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del extracto metanólico de *A. fragilísima*, *D. simplex*, *C. sertularioides* (concentración activa en el ensayo anterior) y 25 μL de metanol (MERCK) por un tiempo de 12 horas, al término del cual se liberó la acción del tratamiento mediante un lavado con medio de cultivo RPMI 1640 (SIGMA). La identificación del sitio en el ciclo celular donde interactuaron los extractos evaluados se realizó mediante muestreos seriados para índice mitótico (10) cada dos horas, desde la hora cero hasta la hora 12. El índice mitótico se evaluó usando un microscopio binocular (Zeiss) con ocular 10X y objetivo de 40X. Las fotografías al microscopio fueron tomadas en un fotomicroscopio (Olympus) usando película de alto contraste (Pantecnic 2415), y pasadas a positivo en papel fotográfico número dos (Kodakbromide). La identificación de la fase del ciclo celular en la que ocurrió el bloqueo parcial, se logró estableciendo la diferencia entre el tiempo de llegada a la fase mitótica de la mayor fracción celular para cada tratamiento y el tiempo de generación de la línea celular HT29, estimado previamente en 28 horas bajo las condiciones del Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, por los métodos de ICH (11) y de función de acumulación en mitosis (12).

Ensayo de actividad selectividad

Para evaluar la actividad selectiva de los extractos se establecieron cultivos en fase exponencial de crecimiento de sangre periférica de pacientes normales estimulados con fitohemaglutinina

(preparada en nuestro laboratorio). Los cultivos se procesaron por triplicado usando el protocolo convencional de citogenética clásica (10), induciendo el bloqueo mitótico dos horas antes de la cosecha con tres concentraciones (50, 75 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) del extracto metanólico de *A. fragilísima*, *C. sertularioides*, *D. simplex*, *S. cymuosum*, *G. obtusa* y *G. acerosa*. Los cultivos controles se trataron con 25 μL de metanol (MERCK), correspondiente al volumen final del solvente de cada extracto, y 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Colcemid® (Irving Scientific), usado como referencia debido a su conocida actividad antimitótica. El índice mitótico obtenido en los cultivos tratados con el extracto de las macroalgas marinas se comparó con el índice mitótico del cultivo tratado con el metanol y el Colcemid® (Irving Scientific) con un análisis de varianza (ANOVA) en el programa StatGraphics Plus Ver 3.1.

RESULTADOS

Ensayo de actividad citotóxica

Como se muestra en la figura 1, los extractos metanólicos de *A. fragilísima* y *D. simplex*, presentaron un potente efecto citotóxico, dosis dependiente, en la línea celular HT29. De igual modo, el extracto de *C. sertularioides* mostró un buen potencial citotóxico, pero a diferencia de los dos extractos anteriores, este efecto sólo se manifestó en concentraciones por encima de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De otra parte, el tratamiento con metanol no mostró efecto citotóxico en la concentración empleada ($p < 0.01$).

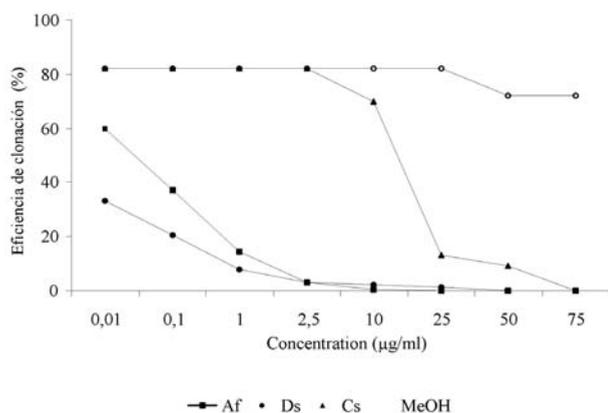


Figura 1. Efecto dosis respuesta el extracto metanólico de tres especies de macroalgas marinas y el control en cultivos in vitro de células de la línea HT29. (Af) *A. fragilísima*, (Cs) *C. sertularioides*, (Ds) *D. simplex* y (MeOH) metanol.

Efecto sobre el ciclo celular

Los extractos metanólicos de *D. simplex*, *A. fragilísima* y *C. sertularioides*, mostraron el mayor índice mitótico, $84\% \pm 3.2$, $25\% \pm 3.8$ y $24\% \pm 4.3$ respectivamente, en el tiempo cero de liberación del bloqueo y en ausencia de la acción del Colcemid[®], comparando con lo encontrado después de 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas de liberado el bloqueo, tiempos en los que se observó el comportamiento (asincrónico) clásico de la población celular de la línea HT29 proveniente de los períodos intermedios e iniciales del ciclo, llegando a la fase mitótica en presencia de Colcemid[®]. Este resultado sugiere que la fase

mitótica es el blanco de acción de estos extractos. El extracto metanólico de estas macroalgas marinas no generó alteraciones en la morfología y disposición cromosómica, siendo similar a lo encontrado en cromosomas bloqueados con antimitóticos como el Colcemid[®] (Véanse figuras 2A y 2B). Las mitosis obtenidas con dichos extractos presentaron cromosomas rectilíneos y dispuestos al azar, lo cual fue diferente de las mitosis encontradas en los cultivos tratados con el metanol, en donde, por el contrario, se observaron cromosomas curvos y dispuestos en forma de corona, de manera similar que en las mitosis obtenidas en ausencia de compuestos antimitóticos (Véase figura 2C).

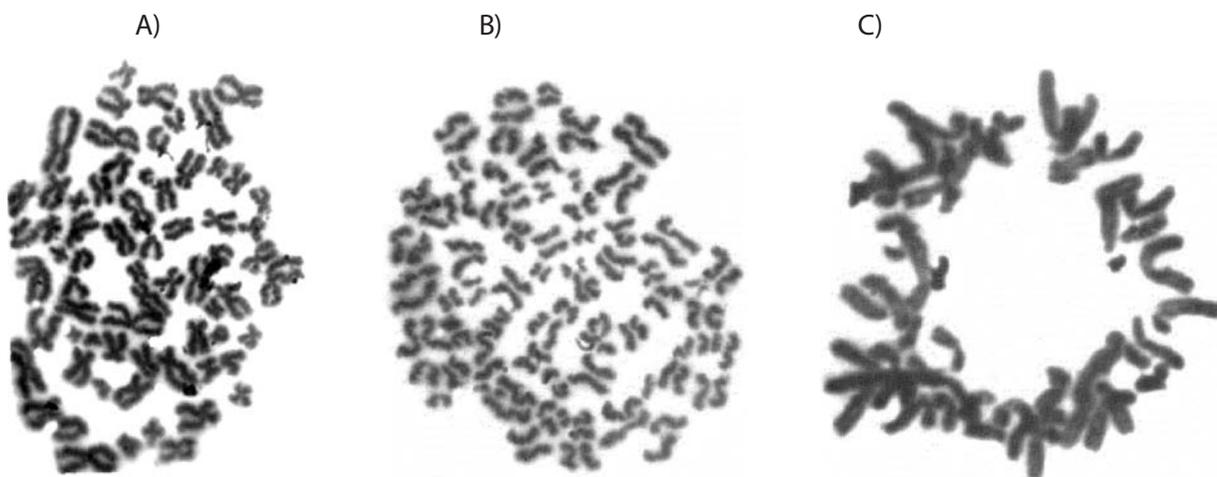


Figura 2. Morfología y disposición cromosómica inducida por: (A) el extracto metanólico de *D. simplex*, las cuales fueron similares a las de otros extractos naturales evaluados; (B) el Colcemid[®] y (C) el metanol.

Ensayo de actividad selectividad

Al igual que en las células de la línea HT29, todos los extractos presentaron actividad antimitótica en el sistema celular de linfocitos T normales de sangre periférica humana estimulados con fitohemaglutinina. Dos extractos metanólicos que mostraron la mayor actividad antimitótica fueron el de *G. obtusa* y *D. simplex* a $50 \mu\text{g/mL}$, los cuales presentaron un índice mitótico de $53\% \pm 2.4$ y $32\% \pm 3.5$ respectivamente. La acción de los extractos metanólicos de las otras especies, aunque con menor actividad, fue en todos los casos superior a la acción del Colcemid[®], el cual presentó un índice mitótico de $3\% \pm 2.8$ ($p < 0.01$). La potente actividad registrada por estos extractos naturales puede deberse a que el bloqueo mitótico ocurre desde los inicios de la prometáfase hasta

la anafase tardía (Véanse figuras 3A, 3B y 3C), mientras que el Colcemid[®] (Véase figura 3D) sólo detiene la proliferación celular en las etapas previas a la metafase.

DISCUSIÓN

Ensayo de actividad citotóxica

Los extractos metanólicos de *A. fragilísima*, *D. simplex* y *C. sertularioides*, colectadas en el Caribe colombiano, presentaron efecto citotóxico en la línea celular derivada de cáncer de colon HT29, y aportan nueva evidencia del potencial antitumoral de estas especies en otros ambientes marinos y en otras líneas celulares muy diferentes a las derivadas de leucemia, previamente reportadas (5-7), en las que, por el contrario, el efecto citotóxico no fue tan

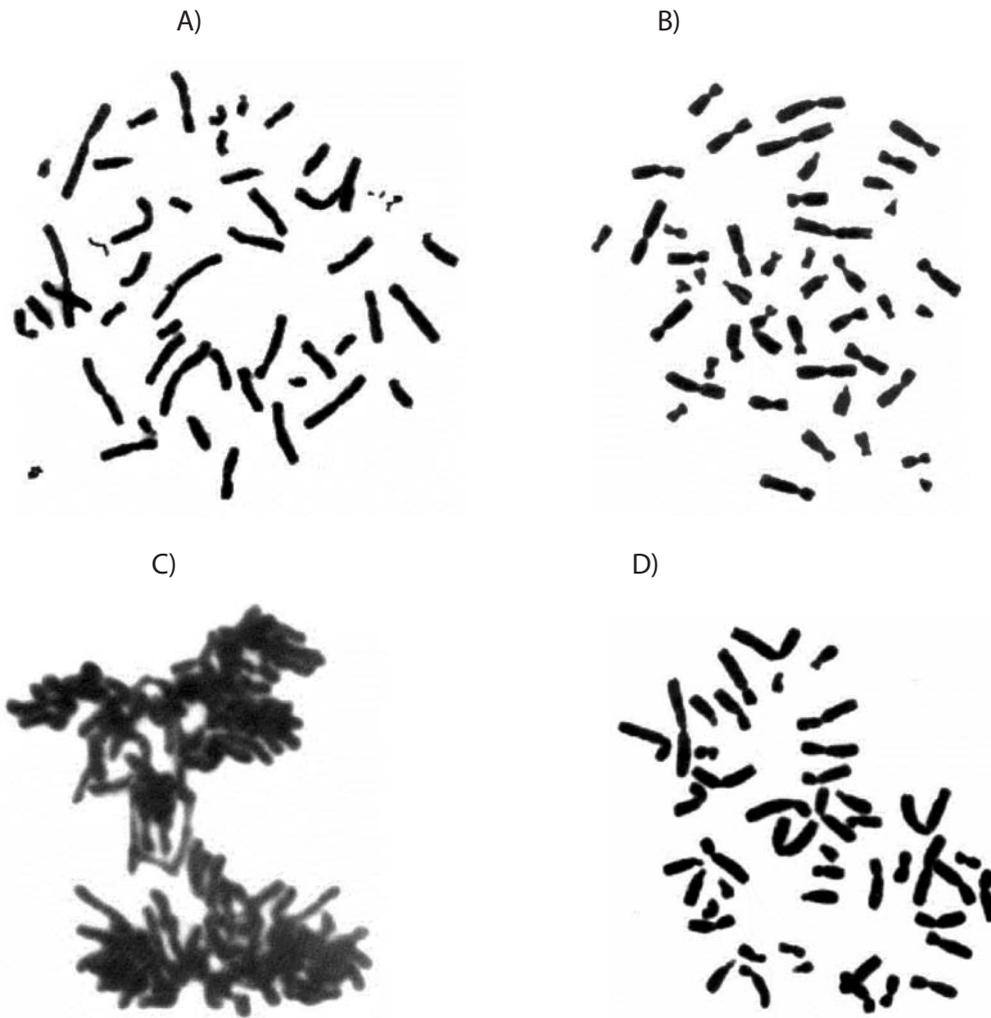


Figura 3. Espectro de bloqueo mitótico con el extracto metanólico de *D. simplex*, el cual fue similar al de los otros extractos naturales evaluados en el sistema linfocitos T normales de sangre periférica humana estimulados con fitohemaglutinina. A) prometafase, B) metafase, C) anafase y D) metafase clásica inducida por el Colcemid®.

importante como en la línea HT29. Es de anotar que todo agente antitumoral debe mostrar, como principio, ser un agente citotóxico, porque la finalidad de su aplicación es la de detener el ciclo celular, preferiblemente de la célula cancerosa, en algunas de las fases del ciclo, con la posterior consecuencia de que la célula tratada sea conducida hacia la muerte. En este caso específico, donde el blanco de acción del extracto metanólico es la fase mitótica, se puede inferir que la causa de la citotoxicidad la genera el caos mitótico, consecuencia del prolongado bloqueo en mitosis. De otra parte, el hecho de que el extracto crudo de dos de las macroalgas marinas evaluadas, como son *A. fragilísima* y *D. simplex*, muestren efecto citotóxico en bajas concentraciones, predice las concentraciones a las cuales podrían ejercer su acción antitumoral el o los compuestos contenidos

en los extractos evaluados, responsables del efecto antimitótico.

Efecto sobre el ciclo celular

El efecto de los extractos metanólicos de *A. fragilísima*, *D. simplex* y *C. sertularioides* sobre el ciclo celular se debe al bloqueo producido en la fase mitótica, el cual es una de las formas de acción reportadas para los compuestos quimioterapéuticos. Este hallazgo se constituye en el primer informe que determina el blanco de acción de los extractos evaluados derivados de macroalgas marinas reportados en la literatura. Su modo de acción podría ser semejante al de los grupos de compuestos que actúan de esta forma, los cuales ejercen su acción impidiendo la polimerización de los dímeros de tubulina que constituyen los microtúbulos que

forman el huso acromático. Entre los compuestos de origen natural que constituyen este grupo se encuentran la Colchicina y derivados, la Podofilotoxina, la Esteganacina, las Combretastatinas, entre ellas la A4, y el Fenstatin, los cuales comparten ciertos sitios estructurales, como la presencia del anillo trimetoxibenceno y otro anillo aromático con dos sustituyentes oxigenados adyacentes, del primero de los cuales se sabe que es importante para la interacción con la tubulina.

En consecuencia al bloqueo mitótico se puede activar el proceso de muerte celular programada o apoptosis, mecanismo de acción que ha sido reportado para el extracto metanólico de *A. zonata* (7), y posiblemente sea una estrategia mas efectiva que aquellas que intentan interrumpir la progresión de la proliferación celular (13), la cual sería una característica importante de los nuevos fármacos quimioterapéuticos que podrían ser desarrollados a partir de los extractos evaluados. Otra utilidad promisoría de estos extractos, o de sus moléculas antimitóticas, es el uso como análogo o en reemplazo del Colcemid® para los estudios básicos de ciclo celular, debido a su gran poder antimitótico, porque al comparar el índice mitótico del extracto metanólico de *D. simplex* y el del Colcemid® después de 12 horas de tratamiento, se encontró un índice mitótico de $84\% \pm 3.5$ en los cultivos tratados con el extracto natural, es superior al índice mitótico de $47\% \pm 3.2$ encontrado en los cultivos tratados con el antimitótico comercial.

Ensayo de actividad selectividad

Contrario a lo esperado, el extracto metanólico de las macroalgas marinas evaluadas presentó mayor actividad antimitótica que el Colcemid® en el sistema de linfocitos T normales de sangre periférica humana, posiblemente porque el blanco molecular de estos extractos son los microtúbulos, como en la mayoría de los compuestos antimitóticos reportados (14), y los microtúbulos son requeridos para la migración de los cromosomas en la cariocinesis y este proceso es común a ambos tipos celulares. De tal manera que la actividad citotóxica selectiva previamente reportada (5, 6) podría deberse a las diferentes susceptibilidades de los sistemas celulares en relación a la concentración de las sustancias citotóxicas; sin embargo, no se probó si los extractos y las concentraciones evaluadas en las células de la línea HT29 presentan la misma actividad citotóxica selectiva que en líneas normales establecidas,

como las empleadas en los estudios japoneses. La actividad selectiva podría encontrarse en diferentes mecanismos de acción a nivel mitótico por la interacción con procesos de dinámica, regulación y modificaciones postranscripcionales no estudiados hasta ahora, manifestando una verdadera especificidad y potencial utilidad en el tratamiento del cáncer (14, 15).

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Marine and Highland Bioscience Center, Saga University, del Japón, por la bibliografía suministrada, y a Marta Cecilia Díaz, del Instituto Colombiano de Investigaciones Marinas de Colombia, por la colección e identificación del material vegetal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Núñez R, Garateix A, Laguna A, Fernández M, Ortiz E, Llanio M, et al. Caribbean marine biodiversity as a source of new compounds of biomedical interest and others industrial applications. *Pharmacologyonline*. 2006; 3: 111-119.
- Mayer A. Antitumor and cytotoxic compounds. *The Pharmacologist*. 1999; 41 (4):159-164.
- Jaspars M. Testing the water. *Chem Ind*. 1999; 51-55.
- Menéndez J. Nuevos antitumorales de origen marino. *Ann Real Acad Nac Farm*. 2005; 71: 341-363.
- Harada H, Noro T, Kamei Y. Selective antitumor activity in vitro from marine algae from Japan coasts. *Biol Pharm Bull*. 1997; 20 (5): 541-546.
- Harada H, Kamei Y. Selective cytotoxicity of marine algae extracts to several human leukemic cell lines. *Cytotechnology*. 1997; 25 (1-3): 213-219.
- Kanegawa K, Harada H, Myouga H, Katakura Y, Shirahata S, Kamei Y. Telomerase inhibiting activity in vitro from natural resources, marine algae extracts. *Cytotechnology*. 2000; 33 (1-3): 221-227.
- Bula-Meyer G. Estado actual de la taxonomía de las macroalgas marinas de Colombia. *Bol Ecotrópica*. 1998; 33: 1-14.
- McKeehan W, McKeehan K, Hammond S, Ham R. Improved medium for clonal growth of human diploid cells at low concentrations of serum protein. *In vitro*. 1977; 13: 399-416.
- Moorhead P, Nowell P, Mellan W, Battips D, Hungerford D. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res*. 1960; 20: 613-616.
- Perry P, Wolff S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*. 1974; 251:156-158.
- Puck T, Steffen J. Life cycle analysis of mammalian cells. I. A method for localizing metabolic events within the life cycle, and its application to the action of Colcemide and Sublethal doses of X-Irradiation. *Biophys J*. 1963; 3 (5): 379-397.
- Peralta O, Bahena M, Díaz C, Madrid V. Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud Pública México*. 1997; 39: 451-462.
- Correia J, Lobert S. Physicochemical Aspects of Tubulin-Interacting Antimitotic Drugs. *Curr Pharm Des*. 2001; 7: 1213-1228.
- Lobert S, Correia J. Meth. *Enzymology, energetics of macromolecules, Part C*. 2000; 323:77.