

EVALUACIÓN CITOTÓXICA Y CLASTOGÉNICA EN LINFOCITOS HUMANOS DE UN 5 α , 8 α -EPIDIOXIESTEROL

CYTOTOXIC AND CLASTOGENIC EVALUATION ON HUMAN LYMPHOCYTES OF A 5 α , 8 α -EPIDIOXYSTEROL

Diana M. MARQUEZ F.¹, Andres PAREJA.¹, Maria E. MARQUEZ F.², Alejandro MARTINEZ M.^{1*}

Recibido: Mayo 30 de 2008 Aceptado: Agosto 19 de 2008

RESUMEN

El 5 α , 8 α -epidioxiesterol se obtiene por oxidación fotoquímica a partir del 7-deshidrocolesterol. El compuesto se analiza mediante técnicas cromatográficas y espectrales lo que permite identificarlo como 5 α , 8 α -epidioxi-colesta-6-én-3 β -ol (también llamado peróxido del 7-deshidrocolesterol). Adicionalmente, se evalúa el efecto citotóxico y clastogénico mediante el ensayo cometa y la prueba de exclusión con el colorante vital azul de tripano. Se evalúan las concentraciones de 5 α , 8 α -epidioxicolesterol para determinar su efecto sobre los linfocitos de sangre periférica humana. Se determina que ninguna de las concentraciones de 5 α , 8 α -epidioxicolesterol presenta efectos clastogénicos aunque, la mayor concentración muestra un leve efecto citotóxico. Estos resultados sugieren realizar otras pruebas *in vitro* e *in vivo* con el fin de evaluar el comportamiento sobre otros sistemas celulares y además realizar otro tipo de ensayos de actividad con el fin de determinar su potencial bioactivo.

Palabras clave: 5 α , 8 α -epidioxiesterol, citotoxicidad, clastogenicidad.

ABSTRACT

5 α , 8 α -epidioxysterol is obtained by photochemical oxidation of 7-dehydrocholesterol. This compound is analyzed using chromatographic and spectral techniques. This analysis identifies the compound as: 5 α , 8 α -epidioxy-cholesta-6-en-3 β -ol. Cytotoxic and clastogenic effects of 5 α , 8 α -epidioxysterol by comet and exclusion assays with the tripan blue dye are evaluated. Three concentrations are used to determinate its effect on human lymphocytes from peripheral blood. No concentration shows clastogenic effect but the higher concentration exhibited cytotoxic effect. These results are interesting for this compound but it is necessary to do other *in vitro* and *in vivo* assays to evaluate the behavior on other cellular systems with the goal to determinate its bioactive potential.

Keywords: 5 α , 8 α -epidioxysterol, cytotoxicity, clastogenicity.

1 Grupo de Productos Naturales Marinos, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia. Calle 57 N° 53-108, Bloque 2, Laboratorio 131.

2 Grupo de Biotecnología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Calle 59 N° 63-20, Bloque 19, Laboratorio 115.

* Autor a quien debe dirigirse la correspondencia: amart@farmacia.udca.edu.co

INTRODUCCIÓN

Los organismos marinos, y en particular las esponjas y celenterados, constituyen una fuente importante de una gran variedad de moléculas con estructuras novedosas, muchas de ellas con diferentes actividades biológicas. Dentro de las clases de compuestos más reportados entre los organismos marinos están los esteroides, algunos de ellos con interesantes estructuras y actividades biológicas. Entre los esteroides bioactivos aislados de diferentes fuentes marinas se encuentran los compuestos llamados epidioxisteroles, los cuales han demostrado tener un amplio potencial bioactivo (1-16). Dado el amplio espectro de actividades biológicas que han manifestado los epidioxisteroles, en este trabajo se sintetiza el 5 α , 8 α -epidioxi-colesta-6-én-3 β -ol (también llamado peróxido del 7-deshidrocolesterol), a partir del 7-deshidrocolesterol, con el fin de evaluar compuestos con el núcleo esteroidal y características similares a los epidioxisteroles ya reportados, que puedan tener potencial bioactivo.

En una investigación previa (17) se comprobó que los 5 α , 8 α -epidioxisteroles de la esponja *Ircinia campana* son productos de oxidación de los esteroides con núcleo $\Delta^{5,7}$ -3-hidroxiandrostadieno, y se han reportado estudios de actividad citotóxica y genotóxica para una fracción de 5 α , 8 α -epidioxisteroles (18). Además, en otro estudio se observó que la luz y el oxígeno catalizan la reacción para la formación de este tipo de compuestos en una esponja del género *Axinyssa* (3). Así pues, en este trabajo se sintetiza uno de los compuestos 5 α , 8 α -epidioxisteroles identificados en la fracción obtenida a partir de la oxidación de los esteroides nativos de la esponja *Ircinia campana*. Además, debido al potencial promisorio de este grupo de sustancias, surge la necesidad de realizar pruebas de actividad biológica tales como citotóxica y clastogénica que puedan mostrar sus efectos colaterales y uso potencial.

Para evaluar la clastogenicidad del compuesto se selecciona el ensayo cometa, mediante la detección de los quiebres de cadena sencilla y los sitios lábiles al álcali (19), ya que este ensayo es considerado como prueba regulatoria para evaluar genotoxicidad en los compuestos que se pretende utilizar, como productos farmacéuticos (20-21), y la prueba de exclusión con el colorante vital azul de tripano utilizando tres concentraciones del compuesto sintetizado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los solventes metanol, cloroformo, diclorometano, acetato de etilo, utilizados en el proceso de extracción y oxidación son grado reactivo. Se utilizó vidriería marca pirex durante el proceso de síntesis del 5 α , 8 α -epidioxisterol. Los análisis de infrarrojo se realizaron en un espectrofotómetro infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR Spectrum I), marca Perkin Elmer. La muestra se leyó sobre una celda de selenuro de zinc. Los análisis de resonancia magnética nuclear, se realizaron en un equipo de resonancia magnética nuclear Bruker AMX 300 (300 MHz), y utilizando cloroformo deuterado como solvente. Los análisis CG/EM se realizaron en un equipo marca Agilent 5973 con cromatógrafo de gases serie 6890 que consta de un inyector automático. El modo de inyección fue splitless utilizando helio como gas de arrastre a 0,9 ml / min. La temperatura del inyector fue de 270°C. Se utilizó una columna HP5-MS (30m x 0,25mm x 0,25 μ) con una programación de horno desde 200°C hasta 290°C a una tasa de 5 °C / min. El rango de masas fue de 40 a 500 daltons. Se inyectó 1 μ l de muestra disuelta en diclorometano. Todos los análisis por cromatografía en capa fina se realizaron sobre cromatofolios de sílicagel 60 F₂₅₄. Como reveladores se utilizaron una lámpara multibanda de luz UV 254/366 nm (115 voltios, 60Hz y 0,16 amperios) modelo UVGL-58 MINERALIGHT®, y una solución de ácido fosfomolibdico (Merck) al 5% en etanol, con calentamiento.

Los fraccionamientos por cromatografía en columna se realizaron con sílica gel 40 (Merck). La separación del compuesto se hizo por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) en un equipo Agilent® serie 1100 que consta de una bomba isocrática, detector ultravioleta programable, inyector manual Rheodyne® y software ChemStations® instalado en un computador compatible. Los solventes acetonitrilo y metanol (EMD) y agua para los análisis CLAE fueron grado cromatográfico.

Obtención del 5 α , 8 α -epidioxicolesterol. Se preparó una solución de 500 mg de 7-deshidrocolesterol (Merck®) disuelto en 15 ml de cloroformo. La solución se colocó en reflujo abierto y fue sometida a agitación constante y a exposición de luz directa de una lámpara de luz halógena 50 vatios (120 voltios), Philips® Master N-Flood 30, durante 24 horas con verificaciones a diferentes intervalos de tiempo mediante cromatografía en capa fina, utili-

zando sílicagel F₂₅₄ como fase estacionaria y hexano: acetato de etilo (2:1) como fase móvil con el fin de hacerle seguimiento a la reacción. Como revelador se utilizó una solución de ácido fosfomolibdico al 5% en etanol, con calentamiento. La formación del compuesto oxidado se observó a través de la desaparición progresiva de la mancha correspondiente al patrón de 7-deshidrocolesterol Rf 0,6 (absorbe luz UV 254 nm), y la aparición de una mancha de Rf 0,23 después de revelar con ácido fosfomolibdico al 5% en etanol. El compuesto formado se purificó por cromatografía de columna usando sílica gel como fase estacionaria y hexano: acetato de etilo (2:1) como fase móvil (451 mg). El análisis del espectro de RMN-¹H de 300 MHz mostró las señales características de un 5 α , 8 α -epidioxiesterol. Se ensayaron tres concentraciones del compuesto (0,0001mg/ml, 0,01 mg/ml y 1 mg/ml) para determinar su efecto citotóxico y clastogénico sobre linfocitos.

Obtención y aislamiento de linfocitos.

Los linfocitos fueron aislados de sangre humana periférica heparinizada, obtenida de donadores saludables, utilizando el método de separación por densidades con Hystopaque-1077 (SIGMA) como se describe: inicialmente, la sangre se centrifugó a 1500 RPM por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en PBS en proporción 1:1. Posteriormente se adicionaron 3 mL de Hystopaque-1077, nuevamente se centrifugó a 2000 rpm por 30 minutos, y finalmente se realizaron dos lavados con la misma solución salina y las células se resuspendieron en 2mL de PBS. La viabilidad después del proceso de aislamiento fue determinada por la técnica de exclusión de colorante vital azul de tripano y sólo se trabajó con los aislados que superaron el 90% de viabilidad.

Pruebas de citotoxicidad y clastogenicidad.

Las suspensiones celulares de linfocitos aisladas fueron tratadas con 0,0001mg/ml, 0,01 mg/ml y 1 mg/ml del 5 α , 8 α -epidioxicolesterol a 4°C durante 30 minutos. Para cada uno de los experimentos se incluyeron controles negativo (10 μ l de metanol que fue el (No. de solvente en el cual se disolvieron las muestras) y positivo (100 μ M de H₂O₂). Cada tratamiento se hizo por triplicado.

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

Para evaluar la citotoxicidad de los compuestos se utilizó la prueba de exclusión de colorante vital azul de tripano al 0,1% después del tratamiento con

el compuesto. Se observaron y contabilizaron al microscopio 100 células y se determinó el porcentaje de viabilidad mediante la siguiente fórmula:

Para evaluar el potencial clastogénico del compuesto se utilizaron concentraciones de 2×10^5 células/ml suspendidas en agarosa de bajo punto de fusión (0,5% PBS libre de Ca⁺⁺, Mg⁺⁺) en placas pretratadas con 100 μ l de agarosa de punto de fusión normal (0,5% PBS libre de Ca⁺⁺, Mg⁺⁺). Después de 6 minutos a 4 °C, las placas fueron colocadas en solución de lisis (2,5M NaCl, 0,1M EDTA, 10 mM Tris-HCL 10% DMSO 1% de Triton x 100) pH 10, durante 60 minutos a 4°C; luego fueron incubadas en búffer de electroforesis 0,3 M, NaOH 200 mM, EDTA 1mM, pH = 13 durante 30 minutos en un cuarto oscuro a 4°C antes del corrido electroforético, el cual se realizó durante 30 minutos a 25V y 300 mA. Las placas fueron lavadas con búffer neutralizante (0,4 M Tris-HCL; pH = 7,5), coloreadas con bromuro de etidio, visualizadas en un microscopio Olympus provisto de un sistema de fluorescencia, y fotografiadas con una cámara digital Pixera modelo VCS 10132.

Finalmente, las imágenes fueron analizadas con el programa CASP (Commet Assay Software Project) el cual es de dominio público y fue obtenido de Internet (<http://www.casp.of.pl>) para cuantificar el daño del ADN (17) por medio de las variables Olive Tail Moment (OTM = distancia (centro gravedad cabeza-centro de gravedad cola) / % de DNA cola) y Comet Length (CL = longitud cola + longitud cabeza). Para ambos tipos de pruebas, citotóxica y genotóxica, los datos se generaron con base en un diseño de bloques completos al azar, tomando la muestra de cada donante como factor de bloqueo. Se evaluaron cinco tratamientos: tres concentraciones de 5 α , 8 α -epidioxicolesterol y dos controles, uno positivo y uno negativo (cada tratamiento se hizo por triplicado). Los análisis de varianza y las correspondientes pruebas de medias (Duncan) se realizaron con ayuda del software estadístico Statgraphics Plus, versión 2.1.

RESULTADOS

La oxidación fotoquímica del 7-deshidrocolesterol se produce con participación del oxígeno del aire para dar el correspondiente 5 α , 8 α -epidioxicolesterol (3), como lo demuestra el espectro de RMN-¹H y CG/EM. Las señales de protones metílicos entre 0,6 y 1,0 ppm, un multiplete en 3,9 ppm correspondiente

al protón ligado al carbono 3, una señal doblete en 6,4 ppm (d, J 8,5 Hz) correspondiente al protón olefínico H-7, y una señal doblete centrada en 6,5 ppm (d, J 8,5 Hz) correspondiente al otro protón olefínico H-6, confirman esta asignación. El rendimiento en el proceso de oxidación fue del 83,5%.

Los datos espectroscópicos para el compuesto epidioxiesterol son los siguientes: 5 α , 8 α -epidioxicolesta-6-én-3 β -ol. RMN- ^1H (CDCl_3 , 300MHz): δ 0,6-1,0 (3H, s, C-18, C-19, C-21, C-26, C-27), δ 3,90 (1H, m, H-3), δ 6,24 (1H, d, J=8,5 Hz, H-7), δ 6,50 (1H, d, J=8,5 Hz, H-6). El espectro de masas mostró el ión intenso m/z: 384, correspondiente a la pérdida de 2 átomos de oxígeno, de un epidioxiesteroide de peso molecular 416 g / mol consistente con la fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_3$. Además, se observaron los iones m/z: 398 ($\text{M}-\text{H}_2\text{O}$), 366 ($\text{M}-\text{O}_2-\text{H}_2\text{O}$), 351 ($\text{M}-\text{O}_2-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3$), que son característicos de los 5 α , 8 α -epidioxiesteroles (16), 253 ($\text{M}-\text{O}_2$ -cadena lateral- H_2O). Estos datos son consistentes con un epidioxiesterol con la cadena lateral de 8 átomos de carbono. Este compuesto es también llamado peróxido del 7-deshidrocolesterol y presentó un tiempo de retención en el análisis de gases de 19,07 min.

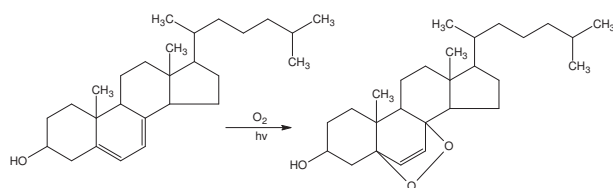


Figura 1. Reacción que produce el 5 α , 8 α -epidioxicolesta-6-én-3 β -ol a partir del 7-deshidrocolesterol

Los resultados del ensayo cometa del 5 α , 8 α -epidioxicolesterol en las tres concentraciones evaluadas no mostraron efecto clastogénico ya que los resultados de la muestra no presentan diferencia significativa con el control negativo, pero sí con el control positivo (véase la figura 2).

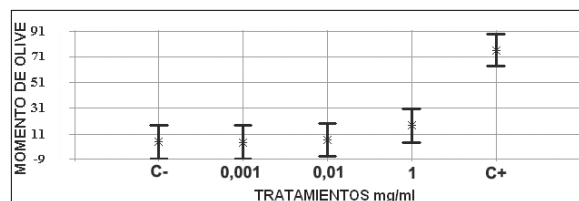


Figura 2. Evaluación clastogénica por ensayo cometa de tres concentraciones (0,0001mg/ml, 0,01 mg/ml y 1 mg/ml) del peróxido del 7-deshidrocolesterol.

La prueba de citotoxicidad realizada con el colorante vital azul de tripano mostró que la concentración mayor (1mg/ml) de la muestra evaluada presentó una supervivencia de células menor del 50 %, pero las dos concentraciones menores (0,0001mg/ml y 0,01 mg/ml) no mostraron efecto citotóxico, similar al control negativo (véase la figura 3).

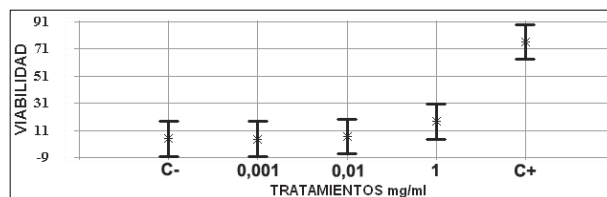


Figura 3. Citotoxicidad mediante coloración vital con azul de tripano de tres concentraciones (0,0001mg/ml, 0,01 mg/ml y 1 mg/ml) del peróxido del 7-deshidrocolesterol

DISCUSIÓN

En el presente estudio se obtuvo un compuesto bioactivo, un epidioxiesterol por síntesis a partir de un compuesto comercial sin actividad biológica, el 7-deshidrocolesterol, con una metodología sencilla y rápida para realizar en el laboratorio. Esta metodología permite sintetizar compuestos del tipo 5 α , 8 α -epidioxiesteroles a partir de esteroides con núcleo $\Delta^{5,7}$ -3-hidroxiandrostadieno, lo cual es interesante si se tiene en cuenta que se ha reportado que los compuestos epidioxiesteroles tienen un amplio espectro de actividades biológicas (1-15), y la forma de obtención es tan sencilla que pueden producirse cantidades apreciables que permitirán realizar mayor número de bioensayos con el fin de determinar otras actividades biológicas. Además, la fácil obtención de este compuesto permitirá realizarle modificaciones estructurales, lo que generará nuevas entidades químicas con potencial bioactivo.

De otro lado, los resultados de los ensayos de actividad biológica muestran que las tres concentraciones del 5 α , 8 α -epidioxicolesterol evaluadas no tienen efecto clastogénico sobre los linfocitos humanos, ni tampoco efecto citotóxico en las concentraciones menor e intermedia evaluadas. Sin embargo, la concentración mayor mostró leve efecto citotóxico, lo cual sugiere que se pueden seguir realizando ensayos de actividad sobre otras líneas celulares antitumorales con el fin de evaluar su respuesta frente a este tipo de compuesto. El hecho de que el 5 α , 8 α -epidioxi-

colesterol no muestre resultado clastogénico en las concentraciones evaluadas motiva a seguir realizando ensayos de actividad biológica, así como otras evaluaciones genotóxicas, como pruebas mutagénicas y antiproliferativas, con el fin de determinar su potencial bioactivo y utilidad.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI) de la Universidad de Antioquia y a la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín por la financiación de esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Martínez A, Robledo S, Muñoz D, Blair S, Higueta E, Echeverri E, et al. Antiparasitic activity of metanol extracts and isolated fractions from caribbean sponges. *Vitae* 2001; 8: 71-77.
- Márquez D, Robledo S, Martínez A. Antileishmanial epidioxysterols from extracted sterols of the Colombian marine sponge *Ircinia campana*. En: Custodio MR, Lôbo-Hajdu G, Hajdu E, Muricy G (eds). *Porifera research: biodiversity, innovation and sustainability*. Rio de Janeiro: Série Livros 28. Museu Nacional; 2007. p. 433-437.
- Iwashima M, Terada I, Iguchi K, Yamori T. New biologically active marine sesquiterpenoid and steroid from the Okinawan sponge of the genus *Axinyssa*. *Chem. Pharm. Bull.* 2002; 50(9): 1286-1289.
- Petrictcheva NV, Duque C, Fujimoto Y. Ambrosinosterol: un nuevo 5 α 8 α -epidioxisterol citotóxico aislado de la esponja marina *Axinyssa ambrosia*. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 2001; 25(97): 569-577.
- Sheu JH, Chang KC, Duh CY. A cytotoxic 5 α ,8 α -epidioxysterol from a soft coral *Sinularia species*. *J. Nat. Prod.* 2000; 63(1):149-51.
- Gauvin A, Smadja J, Akin M, Faure R, Gaydou E-M. Isolation of bioactive 5 α , 8 α - epidioxy sterols from the marine sponge *Luffariella cf. variabilis*. *Can. J. Chem. / Rev. Can. Chim.* 2000; 78(7): 986-992.
- Sera Y, Adachi K, Shizuri Y. A new epidioxy sterol as an antifouling substance from a palauan marine sponge, *Lendenfeldia chondrodes*. *J. Nat. Prod.* 1999; 62(1):152-4.
- Saludes JP, Garsón MJ, Franzblau SG, Aguinaldo AM. Antitubercular constituents from the hexane fraction of *Morinda citrifolia* Linn. (Rubiaceae). *Phytoter. Res.* 2002; 16: 683-685.
- Abourriche A, Charrouf M, Chaib N, Bennamara A, Bontemos N. Isolation and bioactivities of epidioxysterol from the tunicate *Cynthia savigny*. *Il Fármaco* 2000; 55: 492-494.
- Fujimoto H, Nakayama M, Hakayama Y, Yamazaki M. Isolation and characterization of immunosuppressive components of three mushrooms, *Pisolithus tinctorius*, *Microporus flabelliformis* and *Lenzites betulina*. *Chem. Pharm. Bull.* 1994; 42: 694-697.
- Macías FA, Simonet AM, Galindo JCG. Bioactive steroids and triterpenes from *Melilotus messanensis*. Study of their allelopathic potencial. *J.Chem. Ecol.* 1997; 23: 1781-1803.
- Yasukawa K, Akihisa T, Kanno H, Kaminaga T, Izumida M, Sakoh T, et al. Inhibitory effects of sterols isolated from *Chlorella vulgaris* on 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation and tumor promotion in mouse skin. *Biol. Pharm. Bull.* 1996; 19(4): 573-576.
- Casteel DA. Peroxy natural products. *Nat. Prod. Rep.* 1999; 16: 55-73.
- Jyh-Horng S, Kuie-Chi C, Chang-Yih. A cytotoxic 5 α 8 α -epidioxysterol from a soft coral *Sinularia species*. *J. Nat. Prod.* 2000; 63:149-151.
- Yutaka S, Kyoko A, Yoshikazu S. A new epidioxy sterol as an antifouling substance from a Palauan marine sponge, *Lendenfeldia chondrodes*. *J. Nat. Prod.* 1999; 62:152-154.
- Petrictcheva NV, Duque C, Dueñas A, Zea S, Fujimoto Y. Ambrosinosterol: un nuevo 5 α ,8 α -Epidioxisterol Citotóxico aislado de la Esponja Marina *Axinyssa ambrosia*. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 2001; 25(97): 569-577.
- Márquez DM, Martínez A. Antileishmanial epidioxysterols from the Colombian marine sponge *Ircinia campana* are oxidation products from naturally occurring $\Delta^{5,7}$ sterols. *Vitae* 2007; 14(1): 61-66.
- González C, Pareja A, Márquez ME, Márquez DM, Martínez A, Higueta E. Efecto citotóxico y clastogénico en linfocitos humanos de la fracción de 5 α ,8 α - epidioxisteroles de la esponja marina *Ircinia campana* del Caribe colombiano. *Acta Farm. Bonaerense* 2005; 24 (1): 75-9.
- Speit G, Hartmann A. The contribution of excision repair to the DNA-effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis.* 1995; 10: 555-559.
- Hartmann A, Plappert U, Poetter F, Suter W. Comparative study with the alkaline comet assay and the chromosome aberration test. *Mut. Res.* 2003; 536: 27-38.
- Mac Gregor J, Casciano D, Muller L. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. *Mut. Res.* 2000; 455: 3-20.