

MINISTERIO DE CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE
AGENCIA DE MEDIO AMBIENTE



INFORME FINAL DE RESULTADOS

“Evaluación de las potencialidades químicas y farmacológicas de nuevos productos obtenidos de fuentes marinas con vistas a su aplicación como antimutagénicos y anticancerígenos en el hombre”

2015

Resumen

El proyecto estuvo orientado a investigar la capacidad protectora de nuevos extractos naturales obtenidos a partir de fuentes de origen marino y/o sus componentes mayoritarios frente al daño inducido por reconocidos agentes mutagénicos y cancerígenos ambientales. Se desarrollaron investigaciones preclínicas químico-farmacológicas que permitieron ampliar el conocimiento sobre la biodiversidad marina de Cuba, a partir de la evaluación de cinco especies de algas y angiospermas (*Thalassia testudinum*, *Syringodium filiforme*, *Sargassum fluitans*, *Dictyota pinnatifida* y *Ulva fasciata*). Se obtuvieron las primeras evidencias acerca de novedosas propiedades biológicas de estructuras aisladas y de mezclas de compuestos obtenidos a partir de organismos marinos con potencial uso en la terapia del cáncer. Además, se amplió la información acerca de sus mecanismos de acción, lo cual amplía las posibilidades de utilización de los recursos marinos para la obtención de nuevos bioproductos de interés para la Industria Biofarmacéutica. El proyecto permitió la implementación y el desarrollo de nuevas metodologías y protocolos para el trabajo de investigación. Unido a esto, ha coadyuvado a ampliar los conocimientos sobre la biodiversidad marina y ha contribuido a divulgar la necesidad de su uso racional y su conservación. La detección de efectos de interés biomédico en dos de los extractos estudiados (*Thalassia testudinum* y *Ulva fasciata*) permite recomendar la continuidad futura del trabajo, para la obtención de nuevos productos con propiedades antitumorales, antimetastásicas y/o antimutagénicas como nuevos medicamentos obtenidos de fuentes naturales.

INDICE

1. Introducción	1
Especies seleccionadas para el estudio	4
2. Colecta y preparación de los diferentes extractos evaluados durante el proyecto	6
3. Evaluación de los efectos de los extractos sobre la mutagénesis inducida por diferentes agentes mutagénicos ambientales y de los mecanismos implicados	8
4. Estudios acerca de los efectos de los extractos, fracciones y sus componentes sobre los sistemas responsables de la bioactivación y eliminación de los mutágenos y cancerígenos en el organismo: isoenzimas del P450 y transportadores	12
Evaluación de los efectos sobre el sistema de citocromos del P450	13
Evaluación de los efectos sobre la función de la glicoproteína P (Pgp)	19
Evaluación de los efectos sobre la función de la proteína transportadora BCRP/ABCG2	22
5. Evaluación del potencial citotóxico de los extractos	26
6. Estudios de los efectos antitumorales in vitro del extracto de <i>T. testudinum</i> y de sus componentes, contribución al conocimiento acerca de los mecanismos moleculares implicados	30
Efectos de <i>T. testudinum</i> sobre la proliferación celular (Ensayo de MTT)	30
Efectos del extracto de <i>T. testudinum</i> sobre la proliferación celular (Ensayo de captación de rojo neutro)	31
Efectos de <i>T. testudinum</i> y TB sobre la viabilidad celular en células SW480 en cultivo mediante el ensayo de xCELLigence	33
Efectos de <i>T. testudinum</i> y TB sobre la muerte celular en células tumorales humanas de origen hepático Hep G2	35
Evaluación de los efectos del extracto de <i>T. testudinum</i> sobre genes involucrados en el desarrollo y progresión tumoral	37
7. Evaluación del efecto anti-angiogénico del extracto de <i>T. testudinum</i>	40
Evaluación de los efectos anti-angiogénicos in vitro del extracto de <i>T. testudinum</i>. Ensayo de la herida	41
8. Evaluación del potencial antitumoral del extracto de <i>T. testudinum</i>, la fracción enriquecida en polifenoles obtenida del extracto y de TB en un modelo de tumor primario de carcinoma de colon CT26.WT en ratones	45
9. Efectos del extracto de <i>U. fasciata</i> sobre la genotoxicidad inducida por el benzo(a)pireno in vitro e in vivo	55
Determinación cualitativa de metabolitos presentes en el extracto de <i>U. fasciata</i>	55
Caracterización química del extracto hidroalcohólico de <i>U. fasciata</i>	56
Evaluación del efecto protector in vitro del extracto de <i>U. fasciata</i> frente al daño al ADN inducido por BP	59
Evaluación del efecto protector del extracto de <i>U. fasciata</i> en el modelo de daño al ADN inducido por el BP en ratones	61
Evaluación del efecto protector del extracto de <i>U. fasciata</i> en el modelo de carcinogénesis pulmonar inducida por BP en ratones	63
10. Actualización, ampliación y perfeccionamiento de la base de datos	66
11. Conclusiones generales del proyecto	67
12. Recomendaciones	68
13. Referencias	68

1. Introducción

Los océanos cubren las tres cuartas partes de la superficie terrestre y bajo ellos viven la gran mayoría de las especies animales y vegetales del planeta. Los organismos marinos se encuentran sometidos al enorme desafío que significa la lucha por imponerse y sobrevivir en un medio de grandes enfrentamientos y condiciones adversas. Así, a lo largo de la evolución, las diferentes especies marinas han desarrollado una amplia variedad de armas ofensivas y defensivas para dar respuesta a necesidades vitales tales como nutrirse, desarrollarse y defender su territorio (1). Estas armas van desde la existencia de estructuras corporales hasta la existencia de diversas formas de camuflaje. En este sentido, uno de los mecanismos para dar respuesta a sus necesidades vitales lo constituye la presencia o producción de sustancias químicas capaces de ejercer efectos biológicos específicos sobre otras especies. La diversidad de compuestos bioactivos de las especies marinas, está condicionada por el hecho que los organismos marinos necesitan desarrollarse y sobrevivir en este medio tan competitivo, por lo que han tenido que producir compuestos bioactivos para múltiples propósitos, tales como protegerse a sí mismos de enfermedades, hongos patógenos y depredadores o para otras funciones como la comunicación y la reproducción. Debido a que estos compuestos existen en la naturaleza para propósitos específicos no es sorprendente que muestren propiedades biológicas de gran interés (2).

Sin embargo, la potencialidad de los océanos como fuente de nuevos compuestos bioactivos aún permanece poco explorada. A pesar, de que estos compuestos podrían ser utilizados de forma beneficiosa para el hombre. En la actualidad como consecuencia del cambio climático y la actividad humana desmedida se encuentran en peligro de desaparecer especies aún no estudiadas. Por lo que unido al estudio y prospección del ambiente terrestre se hace necesario acelerar los estudios en esta dirección. La caracterización de la biodiversidad marina, como nueva fuente de obtención de entidades químicas con potenciales aplicaciones beneficiosas, permitirá hacer un uso racional y sostenible perspectiva de los recursos naturales. De ahí, que el descubrimiento y caracterización de nuevos compuestos y estructuras químicas provenientes de organismos marinos con aplicación en la solución, por ejemplo, de los problemas de salud a los que se enfrenta el hombre y a los que el estudio de la biodiversidad terrestre no dado solución aún ha experimentado un interés en los últimos años.

Uno de los retos actuales está en la búsqueda de nuevas alternativas para la prevención y el desarrollo del cáncer. En la actualidad, el cáncer constituye uno de los principales problemas de salud a los que se enfrenta la humanidad (3). El cáncer no es simplemente un problema de los

países ricos: más del 70% de las muertes debidas a la enfermedad ocurrieron en países pobres y en vías de desarrollo. Esta patología que hasta hace unas décadas se consideraba un problema de salud de la tercera edad, en los últimos años ha disminuido considerablemente la edad de inicio de la enfermedad en un porcentaje significativo de personas. Es una enfermedad compleja para la que no se cuenta aún con tratamientos eficaces. Unido a ello, la elevada toxicidad de los tratamientos convencionales y el estrecho margen terapéutico de los fármacos antitumorales justifica la búsqueda de nuevas alternativas para la prevención y manejo de la enfermedad (4).

En Cuba, a pesar de los esfuerzos que realiza el Sistema de Salud, el cáncer se sitúa cada año entre las enfermedades que poseen mayor incidencia y altas tasas de morbi/mortalidad. En la actualidad, el cáncer es la primera causa de muerte en el país (5). Aproximadamente 18,000 cubanos mueren de cáncer (23,4% de total de muertes), unos 28 000 nuevos enfermos se detectan cada año, siendo la más alta incidencia el cáncer de pulmón, próstata y colon en hombres y pulmón, mama y colon en las mujeres (5,6). Existen diferentes programas de salud enmarcados en el diagnóstico y en la búsqueda de nuevas terapias para su tratamiento. A pesar de ello no ha sido posible reducir su incidencia y mortalidad (6). De ahí, que el desarrollo de investigaciones que conlleven a la generación de nuevos productos con un impacto en la terapia de esta enfermedad son de una alta prioridad para el país, que aspira a convertir el cáncer en una enfermedad crónica no trasmisible y controlada.

Estudios epidemiológicos han evidenciado que del 70-90% de los factores de riesgo para el desarrollo del cáncer son medioambientales (7). Entre los principales factores de riesgo están: el tabaco, hábitos alimentarios, inadecuada actividad física, consumo de alcohol y no por ultimo menos importante la exposición continúa a ambientes contaminados, por lo que la intervención de estos factores constituyen de las principales dianas en la prevención y manejo de la enfermedad.

Hasta el presente no se conoce a profundidad como los agentes medioambientales actúan sobre los genes, se sabe que hay modificaciones que se producen a lo largo de la vida en nuestros genes como consecuencia de la resultante del ambiente al que nos hemos expuesto. Si tomamos en cuenta que en las últimas décadas el ambiente en que se desenvuelve la vida del hombre se ha tornado cada vez más enrarecido y adverso, ello pudiera guardar alguna relación con la elevada incidencia y desarrollo del cáncer a nivel mundial. Por lo que teniendo en cuenta, la rica y diversa capacidad de defensa de los organismos marinos, no estaría desacertado pensar que

compuestos extraídos de estas fuentes podrían tener una aplicación en el control y desarrollo de la enfermedad.

Por ejemplo, se conoce que el daño al material genético de la célula, la molécula de ADN, es considerado hoy uno de los pasos más importantes que guían al desarrollo de un tumor a nivel celular (8). Tanto, el estrés endógeno como el exógeno pueden guiar al daño oxidativo del ADN, produciendo mutaciones de las bases, ruptura de cadenas, alteraciones en la expresión de genes, y mutagénesis (9). Las mutaciones en las células somáticas son importantes en el proceso evolutivo, pero ellas también están envueltas en el desarrollo del cáncer. Diferentes tumores están asociados a la presencia de mutágenos y mitógenos en la célula. Sistemas de biotransformación y de reparación del daño al ADN se encargan de eliminar la mayoría de las lesiones, sin embargo, con la edad el daño se incrementa, no siempre puede ser eliminado y se acumulan las lesiones generando la aparición del tumor.

Por otro lado, el metabolismo intermediario que ocurre fundamentalmente en el hígado es otra fuente de mutágenos en el organismo y con ello de la inducción de daño al ADN favoreciendo la iniciación de la carcinogénesis celular, proceso de bioactivación. En este contexto, ha sido identificado compuestos naturales con actividad antioxidante y anti-inflamatoria que protegen al ADN y se han convertido en alternativas para prevenir la enfermedad (10). Un agente quimiopreventivo debe ser capaz de inhibir la formación de radicales libres, así como la formación de agentes alquilantes. Este también debería ser capaz de interceptar los agentes que dañan cuando ellos aún están en el espacio intracelular a través de la inducción o inhibición de sistemas enzimáticos como los de defensa, de biotransformación y eliminación de xenobióticos (11).

Los polifenoles son un grupo numeroso de compuestos presentes en las plantas terrestres que han sido identificados como moléculas con un alto potencial quimiopreventivo (12-18), presentes también en organismos marinos. Sin embargo a diferencia de las investigaciones con las plantas terrestres, las dificultades de acceso al ambiente marino limitaron los conocimientos populares de las potencialidades de estos organismos (1). El ecosistema marino de nuestro país representa una fuente promisoría de este tipo de moléculas. En Cuba, los estudios en esta dirección se iniciaron en la década de los años ochenta, estudios realizados en el Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR) y el Instituto de Oceanología y que tuvieron continuidad en fecha más reciente con los trabajos desarrollados en CEBIMAR.

Dentro de esta línea, el CEBIMAR desarrolló dentro del Programa Ramal de Biodiversidad (2006-2009) el proyecto “Potencialidades de uso de la biodiversidad marina del litoral de la Habana como fuente de compuestos de interés biomédico y otras aplicaciones industriales”. Como parte de los resultados de ese proyecto fueron obtenidas las primeras evidencias acerca de los efectos antioxidantes, anti-inflamatorios y citoprotectores de extractos obtenidas a partir de diferentes organismos marinos. A continuación, durante los años 2010-2012 se desarrolló el proyecto “Estudios químicos, farmacológicos y toxicológicos preclínicos del BM-21, extraído de la planta marina *Thalassia testudinum*, que avalen su uso potencial en la salud humana” que permitió profundizar acerca de los efectos de dicho extracto, así como se definieron aspectos importantes dentro de la química farmacéutica del mismo (19-22). En este contexto surgió el presente proyecto, que permitió a partir de los datos existentes identificar dos extractos obtenidos de fuentes marinas con propiedades quimiopreventivas y anticancerígenas y potencial aplicación en la terapéutica del cáncer en el hombre.

Así, **el objetivo del presente proyecto** se dirigió a ampliar y actualizar los conocimientos de las propiedades químicas y farmacológicas de organismos marinos presentes en las costas de nuestro país, que avalen su posible utilización como productos con capacidad protectora frente al daño inducido por reconocidos agentes mutagénicos y cancerígenos involucrados en el desarrollo del cáncer en el hombre.

En este camino, se revisaron los datos existentes acerca de la caracterización químico-farmacológica de los más de 50 extractos y fracciones provenientes de organismos marinos de nuestra plataforma estudiados en CEBIMAR, así como la información existente relativa a disponibilidad, accesibilidad y sostenibilidad de cada uno de los especímenes y partir de ello fueron seleccionados **cinco especies** para el estudio de su **potencial antimutagénico, genoprotector y antitumoral**.

Especies seleccionadas para el estudio

- *Syringodium filiforme*: La especie *Syringodium filiforme* Kützing in Hohenacker 1852-1962, conocida como hierba de manatí, es una angiosperma de la familia *Cymodoceaceae* que crece sobre fondos arenosos y sedimentos hasta 25m de profundidad en el mar del Caribe y las Antillas. Es una especie abundante que crece en aguas someras, fondos areno-fangosos, de alto contenido de materia orgánica. Un extracto estudiado de esta especie ha sido identificado que es una mezcla de ácidos fenólicos, flavonoides, carbohidratos solubles y en menor medida de

terpenos y aceites esenciales y su tamizaje farmacológico reveló que presenta efectos analgésicos, antiinflamatorios y antioxidantes (23).

- *Thalassia testudinum*: *Thalassia testudinum* (Banks and Soland ex. Koenig) es una angiosperma marina que se encuentra en el Mar Caribe y Océano Atlántico Occidental Tropical. En Cuba se distribuye en ambas costas. Se localiza en aguas pocas profundas desde la zona intermareal y hasta los 25m, aunque es más abundante en aguas someras, fondos areno-fangosos, de alto contenido de materia orgánica. Es el pasto marino más abundante y común del Mar Caribe. Se caracteriza químicamente por la presencia de flavonas glicosiladas sulfatadas como las thalassiolinas A, B y C, siendo la de mayor abundancia la thalassiolina B. Los estudios realizados de un extracto obtenido de esta angiosperma han identificado propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y citoprotectoras en diferentes modelos experimentales (19-22).

- *Ulva fasciata*: La especie *Ulva fasciata* Delile (*Chlorophyta*) aparece con relativa abundancia en la mayor parte de las costas cubanas. En la costa Norte de La Habana se observan cientos de metros del litoral rocoso cubierto por una espesa aglomeración de estas algas, la profundidad de esas acumulaciones varía entre uno y cuatro metros. En varias épocas del año, la acción del mar acumula cientos de toneladas de estas algas lo que justifica los extensos crecimientos de esta especie presentes en la costa habanera. Suele crecer en aguas de alta salinidad y puede encontrarse en aguas poco profundas adheridas a las rocas, específicamente en lugares tranquilos y protegidos, donde el agua de mar se encuentra fuertemente influenciada por los ríos que vacían sus caudales de nutrientes y disminuyen la salinidad. *Ulva fasciata* posee cantidades considerables de polisacáridos sulfatados, compuestos a los que se le atribuyen diferentes propiedades biológicas. Estudios preliminares realizados en CEBIMAR han descrito propiedades antioxidantes en un extracto obtenido de esta especie. En otras latitudes han sido identificadas actividades antitumorales para otras especies de *Ulva* (24, 25).

- *Sargassum fluitans*: alga parda perteneciente a la familia *Ochrophyta*, bentónica, que arriba anualmente, en conjunto con otras especies del género al litoral norte (en mayor abundancia) y sur de las costas cubanas, con una biomasa total estimada de 15415 tm en aproximadamente 790km de costa, lo que posibilita su explotación sostenible y la biodisponibilidad de este recurso en nuestras aguas. Un extracto obtenido de esta especie es una mezcla constituida mayoritariamente por polifenoles y taninos y en menor proporción, terpenos y esteroides. El tamizaje farmacológico mostró que dicho extracto presenta efectos antiinflamatorios, antivirales

y moderada actividad antioxidante (26). En otras latitudes han sido identificadas propiedades antitumorales para otras especies de *Sargassum* (27).

- *Dictyota pinnatifida*: *D. pinnatifida* Kützing 1859 es una especie bentónica perteneciente a la familia *Dictyotaceae*. Esta especie crece en aguas someras, sobre rocas y corales hasta 26 metros de profundidad con relativa abundancia en nuestra plataforma. El tamizaje farmacológico realizado de un extracto obtenido de esta especie reveló que presenta efectos antiinflamatorios, analgésicos y antioxidantes (28).

La primera tarea conllevó la planificación y ejecución de las colectas de cada especie a estudiar. Seguidamente, se procedió en cada caso a la preparación de los extractos para su posterior caracterización químico-farmacológica.

A continuación se exponen los principales resultados comprendidos en el período que abarca esta investigación.

2. Colecta y preparación de los diferentes extractos evaluados durante el proyecto

- Extracto hidroalcohólico obtenido de *Syringodium filiforme*: esta especie fue recolectada en la playa de Guanabo (23°10'44"N y 82°07'01"O), La Habana, Cuba, (Octubre, 2012, 2014) autenticada por el Dr. Areces, Instituto de Oceanología y depositada en la colección del Acuario Nacional de Cuba (ANC). El extracto total fue preparado a partir de 200g del material vegetal seco y molido que fue macerado con 2 000mL de una mezcla etanol: agua en proporción (1:1; v/v); con agitación por 3 días a temperatura de 30±2°C. Luego se procedió a la filtración y concentración en un evaporador rotatorio al vacío y temperatura del baño no superior a 45°C.

- Extracto hidroalcohólico obtenido de *Thalassia testudinum*: esta especie fue recolectada en la playa de Guanabo (23°10'44"N y 82°07'01"O), La Habana, Cuba, (Octubre, 2012, 2014), autenticada por el Dr. Areces, Instituto de Oceanología y depositada en la colección del ANC. El extracto se obtuvo a partir de la maceración de las hojas de la planta durante 4h con ayuda de calor (60-65°C) y agitación mecánica. El porcentaje de etanol utilizado en la extracción fue de 50% y la relación material vegetal/disolvente de 1/10. El extracto obtenido se filtró a presión reducida y luego se concentró hasta obtener 10% de sólidos. Por último se realizó un secado por aspersión obteniendo así el extracto seco.

Obtención de una fracción enriquecida en polifenoles a partir del extracto. A partir de una extracción con cloroformo del extracto total de *T. testudinum* se obtuvo una fracción hidrofílica, cuya caracterización fitoquímica permitió identificar que esta es una mezcla de los principales

polifenoles presentes en el extracto. Para su obtención se estableció y estandarizó un procedimiento de extracción con cloroformo a partir del extracto total. Se partió de un gramo de extracto seco y se procedió a realizar una extracción exhaustiva sólido-líquido con cloroformo. Posteriormente, se filtró y el residuo obtenido se dejó secar en campana hasta la evaporación total del disolvente y se conservó para su posterior evaluación farmacológica.

Además, en el transcurso del proyecto se evaluaron los efectos de una flavona glicosilada, la Thalassiolina B (TB), que fue identificado como el componente mayoritario presente en el extracto (alrededor del 5% del total de polifenoles del extracto). Además, este metabolito fue motivo de interés nuestro debido a que al menos en parte es responsable de las propiedades antioxidantes atribuidas al extracto. El aislamiento y purificación de este compuesto se realizó según una modificación a la técnica descrita por Rowley y col. (29).

- Extracto de hidroalcohólico obtenido de *Ulva fasciata*: la colecta fue realizada en la zona intermareal de la desembocadura del Río Quibú (23°05'47"N y 82°28'01"W), La Habana, Cuba (Marzo, 2013, 2014). Este proceso fue llevado a cabo durante período de bajamar para obtener mayor área expuesta y facilitar la recolección. Los especímenes fueron colectados desde su disco basal, raspando el sustrato en el que se encontraban adheridas, identificados taxonómicamente y colocados en el herbario del ANC. Las muestras fueron lavadas con agua de mar *in situ* y se trasladaron inmediatamente al laboratorio para su procesamiento. Fueron lavadas con H₂O destilada y secadas en incubadora a 60°C. Finalmente, las muestras fueron molidas y almacenadas hasta la preparación del extracto. Se pesaron 50 g del alga seca y se realizó una extracción añadiendo 500 mL de solución hidroalcohólica al 50%. El extracto fue colocado en zaranda por 24 horas, seguidamente fue filtrado y secado para su utilización.

- Extracto de hidroalcohólico obtenido de *Sargassum fluitans*: Las algas fueron colectadas entre el Rincón de Guanabo (23°10'48"N y 82°06'02"W) hasta Boca Ciega (23°10'46"N y 82°09'97"W), identificadas por el Dr. Arsenio Areces y colocadas en el ANC. Todas las muestras fueron lavadas, posteriormente fueron secadas en estufa a 60°C y molinadas, para su conservación. De las muestras molidas se prepararon extractos hidro-alcohólicos, en proporción 1:5 a partir de 878,01g de *Sargassum fluitans*, con solución agua: etanol al 50%. El extracto fue mantenido en agitación en zaranda durante 72 horas a 27 °C, filtrado, centrifugado y concentrado por evaporación rotatoria al vacío a 45°C. Posteriormente fue secado por liofilización. El

tamizaje fitoquímico preliminar del extracto permitió identificar la presencia de terpenos tipo saponinas, flavonoides, polifenoles y alcaloides.

- Extracto de hidroalcohólico obtenido de *Dictyota pinnatifida*: Los ejemplares de esta especie fueron colectados en el Rincón de Guanabo (23°10'44"N y 82°07'01"W) (Mayo, 2012) sobre fondo arenoso. Se colectó una biomasa de 12kg húmedos sobre un fondo de falsos cangilones ubicado a 70 m de la orilla aproximadamente. Los ejemplares fueron autenticados por la Dra. Beatriz Martínez (Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de La Habana) y depositados en el herbario de la colección del ANC. Se preparó un extracto hidroalcohólico al 10%. La caracterización fitoquímica evidenció la presencia de triterpenos, fenoles, flavonoides, saponinas y azúcares y la ausencia de alcaloides.

3. Evaluación de los efectos de los extractos sobre la mutagénesis inducida por diferentes agentes mutagénicos ambientales y de los mecanismos implicados

El ensayo de incorporación en placa con *Salmonella typhimurium* conocido como Ensayo de Ames (30) ha sido hasta la actualidad ampliamente empleado en el tamizaje mutagénico de nuevas sustancias. Ello, ha sido considerado debido a la capacidad con que cuenta la prueba para la detección de agentes mutagénicos que producen mutaciones puntuales del tipo de sustitución de bases o corrimiento del marco de lectura a nivel de la molécula de ADN. Asimismo, el ensayo, también, ha sido utilizado en la detección de compuestos con actividad protectora al ADN, debido a la sensibilidad del método para detectar la capacidad de un compuesto de disminuir el daño primario al ADN inducido por agentes mutagénicos conocidos en este modelo experimental. En este caso, se incubaba el compuesto a evaluar frente a mutágenos cuyo mecanismo de acción es conocido y se detecta la disminución del daño al ADN por la acción del compuesto en estudio a partir del conteo del número de colonias de la bacteria *S. typhimurium* revertantes His⁻ a His⁺ (30).

Así, la primera tarea que fue acometida en el proyecto para estudiar el potencial antimutagénico de los extractos seleccionados consistió en la evaluación de la capacidad protectora de los extractos frente al daño al ADN inducido por reconocidos mutágenos presentes en medioambiente en que se desenvuelve el hombre, compuestos que han sido asociados a la aparición de tumores, y por ende al desarrollo y progresión del cáncer.

Se prepararon placas madres de las cepas de *S. typhimurium* TA 98, 100, 102 obtenidas a partir de congelados permanentes conservados a -70°C. Para el trabajo con la bacteria se prepararon pre-cultivos a partir de las placas madres. Los pre-cultivos fueron incubados durante 16 h a 37°C

comprobada la presencia de los marcadores genéticos. Se adicionaron 2 mL de agar de superficie suplementado con histidina y biotina (10 mL/100mL), 0,1 mL del cultivo, 0,1 mL del compuesto de ensayo y 0,5 mL de la disolución tampón fosfato o la fracción S₉, que permite simular en el ensayo el metabolismo hepático. La mezcla de incubación fue vertida en las placas y las colonias fueron incubadas 48 horas a 37°C. Concluido este período se contaron las colonias revertantes.

En el experimento se incluyeron un control negativo (H₂O destilada), controles positivos, compuestos de reconocida actividad mutagénica: ciclofosfamida (500 µL/placa), benzo(a)pireno (BP) (10 µL/placa), 2 acetil aminoantraceno (10 µL/placa), 1-nitropireno (10 µL/placa), 2 acetil aminofluoreno (5 µL/placa) y 4 quinona (10 µL/placa). Se ensayaron 3 concentraciones de cada extracto. Se presentan los resultados de al menos 5 réplicas en 2 experimentos. El porcentaje de inhibición de la mutagenicidad fue calculado según la fórmula: $[1 - (\# \text{ colonias/placa en presencia mutágeno y el extracto}) / (\# \text{ colonias/placa en presencia solo del mutágeno})] \times 100$.

En la Tabla 1 se muestran los resultados relativos al número de colonias de la bacteria *S. typhimurium* que fueron capaces de revertir la mutación que presenta la cepa después de la exposición a las concentraciones de los extractos. Como puede observarse, a pesar de las potencialidades de los cinco extractos evaluados no todos mostraron efectos protectores promisorios frente al daño primario inducido sobre el ADN. De los productos, el extracto de *T. testudinum* resultó ser el mejor candidato. Este producto inhibió de la mutagenicidad inducida por los diferentes agentes empleados como inductores de daño en este ensayo. Seguido, el extracto de *U. fasciata*, mostró efectos sobre dos de los mutágenos evaluados. Si bien, los extractos obtenidos a partir de las especies de *S. fluitans* y *S. filiforme* mostraron en alguna medida capacidad de reducir el daño de uno u otro agente a las dosis máximas evaluadas, los efectos observados no resultan promisorios. *D. pinnatifida* no mostró efectos protectores observables en nuestras condiciones de experimentación.

Las cepas TA98, TA100 y TA102 utilizadas en el estudio: TA98 permite detectar mutágenos del tipo de corrimiento del marco de lectura en el ADN, TA 100 detecta sustituciones de pares de bases del tipo G-A y la TA 102 es una cepa útil para detectar agentes que dañan el par A-T, debido a la formación de radicales libres como consecuencia del estrés oxidativo a nivel celular (30). En este estudio se evaluaron los efectos de los extractos sobre el daño inducido por agentes con diferentes estructuras y modos de acción para generar el daño. BP, el 1-nitropireno, 4-quinona y el 2aminoantraceno son reconocidos mutágenos medio-ambientales, mientras que la

ciclofosfamida es un fármaco con acción citotóxica utilizado en la terapia antineoplásica. El efecto antimutagénico observado en el extracto de *T. testudinum* a la máxima concentración evaluada (1000 µg/mL) se comportó en el orden: ciclofosfamida (50%) > 1-Nitropireno (47%) > BP (39%) > 2-acetil aminofluoreno (34%) > 4-quinona (31%) > 2-Amino antraceno (30%). La mayoría de estos compuestos son mutágenos oxidativos. Sus mecanismos de daño al material genético han sido asociados a la producción de especies reactivas del oxígeno y a la oxidación del hierro causando daño a las macromoléculas, donde sobresale el ADN y depleción de las defensas antioxidantes endógenas del organismo (31-33). Por tanto, nuestros hallazgos sugieren que las propiedades antioxidantes descritas para este extracto podrían ser responsables de la protección observada frente al daño inducido por: BP, 2acetil aminofluoreno, 1-nitropirene, aminoantraceno y ciclofosfamida. Una significativa protección frente al daño inducido por la ciclofosfamida fue observada a concentraciones más bajas (100 µg/mL) del extracto. Existen rutas metabólicas involucradas en la mutagenicidad inducida por este compuesto además, del estrés oxidativo (34). Asimismo, el metabolismo intermediario está muy comprometido en la mutagenicidad del BP y del 2 acetil amino fluoreno, por lo que otros mecanismos relacionados con la modulación de los sistemas que metabolizan y eliminan xenobióticos, además de su capacidad antioxidante, no deben ser descartados como posibles dianas de acción del extracto. Por otro lado, el extracto obtenido del alga verde *U. fasciata*, también, resultó otro candidato a tener en consideración debido a los efectos protectores observados frente al daño inducido por el benzo(a)pireno y el nitropireno (Tabla 1).

Tabla 1. Efectos de extractos obtenidos de fuentes marinas sobre el daño inducido en el ADN por agentes mutagénicos ambientales (Test de Ames).

Productos Evaluados	µg/mL	Ciclofosfamida	Benzo(a)pireno	2-Aminoantraceno	1-nitropireno	2-acetil, aminofluoreno	4-Quinona
Control (vehículo)	0	107,0±0,6	23,0±2,1	290,0±2,6	102,0±1,5	28,0±1,5	290,0±3,0
Mutágeno	0	290,0±2,6	228,0±1,5	647,0±3,6	273,0±2,5	894,0±10,2	860,0±2,5
<i>T. testudinum</i>	10	227±3,8	215,0±5,9	639,0±4,5	270,0±2,0	890,0±11,2	851,0±3,1
	100	127,0±2,5*(36)	180,0±6,5 (21)	549,0±3,6	153,0±2,2*(24)	887,0±11,0	849,0±2,0
	500	101,0±7,0*(37)	151,0±4,2*(34)	404,0±1,5*(38)	112,0±2,5*(45)	765,0±14,0	705,0±5,5 (18)
	1000	99,0±2,1*(50)	138,0±3,6*(39)	451,0±2,6*(30)	108,0±1,0*(47)	583,0±7,5*(34)	596,0±5,5*(31)
<i>U. fasciata</i>	50	280,0±1,8	231,0±2,9	644,0±3,0	281,0±2,1	900,0±8,2	863,0±5,5
	500	267,0±2,4	166,0±5,5* (27)	612,0±2,6	203,0±4,0* (25)	874,0±4,5	803,0±3,2
	1000	268,0±2,9	144,0±2,2* (36)	601,0±3,1	189,0±3,5* (30)	878,0±10,8	694,0±4,2(18)
<i>S. fluitans</i>	50	283,0±3,6	228,0±1,9	640,0±3,1	271,0±4,0	869,0±9,2	862,0±1,9
	500	291,0±2,8	228,0±9,1	637,0±4,6	252,0±2,9	894,0±4,2	859,0±2,1
	1000	279,0±4,6	228,0±1,5	643,0±6,6	253,0±1,5	878,0±2,9	845,0±2,5
<i>S. filiforme</i>	50	278,0±2,0	233,0±1,5	650,0±2,8	265,0±2,1	890,0±9,7	867,0±3,5
	500	281,0±2,6	208,0±1,5	646,0±3,3	274,0±3,5	864,0±11,0	835,0±2,0

	1000	280,0±3,1	198,0±1,7	632,0±4,6	243,0±5,6	881,0±7,2	700,0±1,5(19)
<i>D. pinnatifida</i>	50	295,0±1,6	222,0±3,2	646,0±1,4	273,0±1,5	878,0±9,2	872,0±2,6
	500	280,0±2,4	228,0±1,9	637,0±1,6	277,0±2,9	887,0±12,1	873,0±4,4
	1000	289,0±2,9	211,0±5,5	655,0±3,9	280,0±6,5	866,0±7,8	856,0±6,7

Se informa # colonias contadas/placa. Cada valor representa $\bar{x} \pm \text{SEM}$ de 5 repeticiones y 2 experimentos por separado. Los experimentos con ciclofosfamida, 2 acetilaminofluoreno y benzo(a)pireno se realizaron en presencia de activación metabólica S₉. *p < 0,05 Test de U de Mann Whitney, diferencias significativas con respecto al compuesto mutagénico.

A partir de los efectos antimutagénicos observados para el extracto de *T. testudinum* fue de interés evaluar la contribución de los componentes de dicho producto a esta propiedad. Así, se evaluaron los posibles efectos antimutagénicos de una fracción obtenida del extracto que está constituida por los principales polifenoles identificados en el mismo y de la Thalassiolina B (TB), una flavona aislada del extracto. Como se explica en el acápite anterior, TB es el componente mayoritario de la fracción polifenólica y es responsable al menos en parte de las propiedades antioxidantes atribuidas al extracto. Las dosis evaluadas en el ensayo se encuentran en correspondencia con las cantidades relativas de estos componentes en las dosis efectivas del extracto en este modelo (100-1000 $\mu\text{g}/\text{placa}$). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2. Tanto, la fracción polifenólica como TB a las dosis máximas evaluadas fueron capaces de reducir significativamente la mutagenicidad inducida por la ciclofosfamida, el benzo(a)pireno, 1-nitropireno y la 4-quinona, mientras que en el caso de la TB, a diferencia de la fracción que si disminuyó significativamente el daño inducido por el 2-acetil aminofluoreno, este compuesto a la dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{placa}$ disminuyó el daño inducido por este mutágeno, sin que se observaran diferencias significativas con respecto al control (Tabla 2).

Tabla 2. Efectos de la fracción polifenólica y la Thalassiolina B extraídos de *T. testudinum* sobre el daño inducido en el ADN por agentes mutagénicos ambientales (Test de Ames).

Productos Evaluados	$\mu\text{g}/\text{mL}$	Ciclofosfamida	Benzo(a)pireno	1-nitropireno	2-acetil, aminofluoreno	4-Quinona
Control (vehículo)	0	132,0±0,9	28,0±2,9	122,0±1,5	37,0±21	292,0±3,9
Mutágeno	0	300,0±2,6	201,0±1,0	303,0±1,5	994,0±16,0	869,0±5,5
Fracción <i>T. testudinum</i>	50	302,0±1,2	211,0±5,3	290,0±2,0	990,0±15,2	851,0±3,1
	250	212,0±5,0*(30)	145,0±2,2*(28)	231,0±2,2(23)	987,0±8,0	859,0±2,0
	500	177,0±2,4*(41)	132,0±3,5*(34)	128,0±1,0*(57)	699,0±6,5*(30)	621,0±2,5*(28)
Thalassiolina B	5	227,0±3,8	205,0±3,9	300,0±2,0	1000,0±18,2	862,0±5,1
	25	230,0±2,4	162,0±2,5*(27)	232,0±2,2(24)	987,0±14,0	874,0±2,9
	50	211,0±1,0*(30)	138,0±3,2*(31)	200,0±2,9*(33)	995,0±9,0	640,0±5,5*(26)

Se informa el # colonias contadas/placa. Cada valor representa $\bar{x} \pm \text{SEM}$ de 5 repeticiones y 2 experimentos por separado. Los experimentos con ciclofosfamida, 2 acetilaminofluoreno y benzo(a)pireno se realizaron en presencia de activación metabólica S₉. *p < 0,05 Test de U de Mann Whitney, diferencias significativas con respecto al compuesto mutagénico.

Estos resultados sugieren que polifenoles presentes en *T. testudinum*, así como su componente mayoritario (TB) se encuentran involucrados en su capacidad de protección frente al daño

inducido por estos agentes. Estos compuestos son inductores en el organismo de la formación de mutaciones puntuales, lo que constituye una de las premisas requeridas a nivel celular para que se inicie el desarrollo tumoral, entre otros procesos.

En general se demostró que el extracto de *T. testudinum*, la fracción polifenólica obtenida del extracto y la TB muestran efectos antimutagénicos frente al daño inducido por agentes mutágenos y carcinógenos ambientales en el ensayo de incorporación en placas en la bacteria *S. typhimurium* (Prueba de Ames). Además, se evidencia que el extracto de *U. fasciata* exhibe efectos antimutagénicos frente al daño inducido por el BP y el 1- nitropireno, en este ensayo. Los extractos obtenidos de las especies *S. fluitans*, *D. pinnatifida* y *S. filiforme* no protegieron del daño al ADN bajo nuestras condiciones de ensayo.

4. Estudios acerca de los efectos de los extractos, fracciones y sus componentes sobre los sistemas responsables de la bioactivación y eliminación de los mutágenos y cancerígenos en el organismo: isoenzimas del P450 y transportadores

Cuando un compuesto de origen ajeno a un organismo entra en contacto con él, se producen una serie de interacciones entre ambos que determinan una resultante que puede ser beneficiosa o no. Así, el organismo reacciona intentando eliminar al compuesto exógeno o xenobiótico bien de forma directa o mediante la modificación previa de su estructura (metabolismo) encaminada a producir derivados que puedan ser más solubles y fácilmente eliminados. El hígado es el órgano que posee la mayor capacidad biotransformadora del organismo siendo el más implicado en ese conjunto de reacciones enzimáticas destinadas a aumentar la solubilidad de los xenobióticos y a facilitar su eliminación (35).

Las reacciones de Fase I (oxidación, reducción e hidrólisis) modifican los compuestos poco solubles o lipofílicos en metabolitos más polares que el original. Dentro de los sistemas de enzimas encargados en el organismo, y particularmente en el hígado, de estas reacciones sobresale el sistema de isoenzimas del citocromo P450, responsable del metabolismo intermediario de más del 75% de xenobióticos a los que se expone el hombre. Las reacciones de Fase II consisten en la conjugación de los compuestos o sus metabolitos, con moléculas endógenas polares dando lugar a productos mucho más solubles y excretables. Así, los compuestos pueden ser tóxicos *per se*, o tras su transformación pueden originarse metabolitos tóxicos y muy reactivos. El mecanismo de toxicidad más frecuente es la generación de metabolitos reactivos (electrofilicos, radicales libres) que reaccionan con las macromoléculas

alterando su funcionalidad, fuente de daño celular implicada en el desarrollo y progresión de enfermedades de elevada morbi-mortalidad en el hombre, como el cáncer (36).

En este sentido, la modulación de estos sistemas enzimáticos constituyen nuevas dianas farmacológicas encaminadas a la búsqueda de compuestos capaces de modular la biotransformación de los xenobióticos, mediante la inhibición de la formación de metabolitos reactivos y/o el incremento de la actividad de conjugación de los compuestos o sus metabolitos tóxicos para que sean excretados y eliminados de organismo. Los modelos experimentales más empleados para el estudio de la capacidad de modulación de la función de estos sistemas comprenden: microsomas hepáticos (sistema subcelular obtenido mediante la ultracentrifugación de homogenados de hígado), supersomas (microsomas obtenidos a partir de células manipuladas para la expresión de un único P450) y los cultivos primarios que constituyen los modelos más próximos al hígado (35). Los hepatocitos, tanto de animales de laboratorio como humanos, expresan las funciones típicas del hígado adulto durante un tiempo de cultivo determinado.

Ha sido reconocido que los polifenoles, compuestos identificados en los extractos en estudio, son capaces de modular la actividad de estos sistemas (37-39). Unido a ello, nuestras primeras evidencias experimentales sugieren que las propiedades antimutagénicas observadas (Tabla 1) no solo se encuentran asociadas a propiedades antioxidantes. Así, nos propusimos estudiar los efectos de los extractos seleccionados sobre la función y expresión de las principales isoenzimas del sistema del P450 (Fase I), la UDP-glucuronil transferasa (Fase II) y dos proteínas transportadoras: glicoproteína P y BCRP, sistemas de transporte no solo involucrados en la eliminación de xenobióticos, además, responsables de fallos terapéuticos relacionados con mecanismos de multi-resistencia a los antitumorales en el hombre. A continuación se describen los principales resultados de este trabajo, parte de los mismos se encuentran publicados en *J. Functional Foods* (2012) y en *Drug Metabolism and Personalized Medicine* (2015), para detalles ver anexos.

Evaluación de los efectos sobre el sistema de citocromos del P450

El estudio de los efectos de los productos sobre la actividad de las enzimas de biotransformación se realizó a diferentes niveles de organización celular. Fueron realizados experimentos en microsomas de ratas y humanos y en supersomas humanos, así como hepatocitos en cultivo, empleando para ello células tanto de ratas como de origen humano.

En los experimentos realizados en microsomas y supersomas, estos fueron expuestos durante 10 min a los productos de prueba. En el caso de los hepatocitos, las células se expusieron durante 48 h a los extractos. En todos los casos, concluido el período de incubación fueron determinadas las actividades enzimáticas de los siguientes citocromos del sistema del P450: CYP1A1, 1A2, 3A, 2D, 2C, 2B y 2E, lo que se realizó mediante incubación directa con los sustratos apropiados para cada enzima evaluada. La actividad enzimática se determinó mediante incubación de las células con un coctel de sustratos específicos y posterior cuantificación por HPLC-MS/MS de los metabolitos formados (40). Además, se realizaron estudios para evaluar los efectos sobre la expresión a nivel génico de estos sistemas. Para ello, primeramente se aisló el ARNm, seguidamente se determinaron los niveles de expresión de las enzimas o proteínas mediante técnicas de RT-PCRq. En todos los casos se emplearon compuestos inductores clásicos de estos sistemas enzimáticos a nivel hepático, como controles del experimento.

El estudio de los posibles efectos de los cinco extractos evaluados sobre las principales enzimas del sistema del P450 evidenció que el extracto de obtenido de *T. testudinum* inhibió significativamente la actividad catalítica del CYP1A en microsomas de ratas, efecto que fue corroborado en los microsomas de origen humano. En este modelo experimental, además, tras la incubación con concentraciones de 100 µg/mL del extracto se observaron efectos inhibitorios sobre la actividad del CYP3A, sin modular la función del resto de los citocromos evaluados (CYP2A, 2D, 2E1, 2C), se muestran resultados en microsomas humanos (Figura 1). Los extractos de *D. pinnatifida* y *S. filiforme* no modificaron la actividad de ninguna de las enzimas evaluadas en las series experimentales realizadas, mientras que el extracto de *S. fluitans* fue capaz de inhibir moderadamente la actividad del CYP3A en microsomas de ratas, sin que ello alcanzara significación estadística (datos no mostrados).

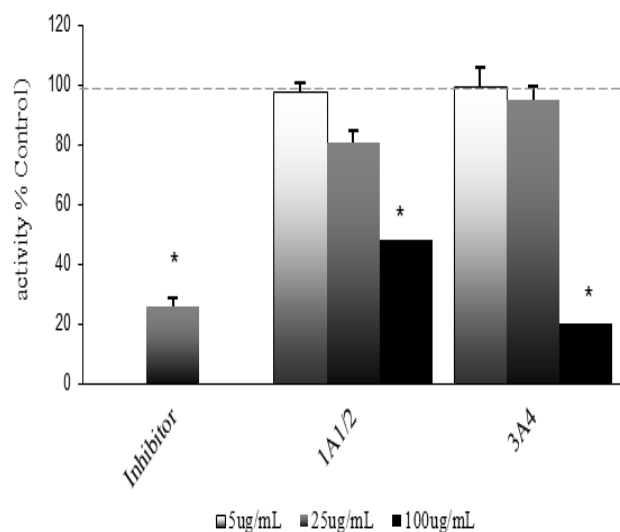
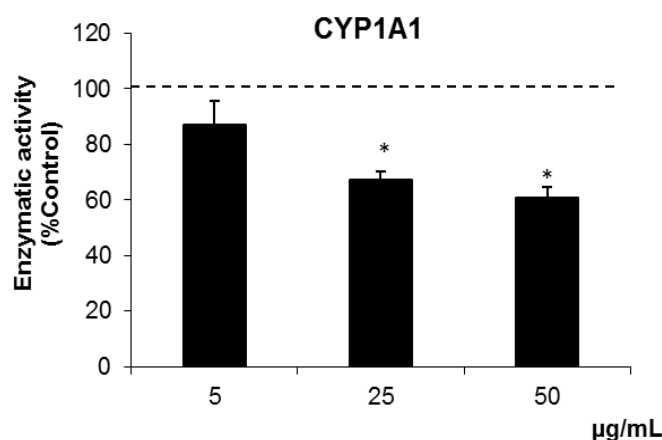


Figura 1. Efectos del extracto obtenido de *T. testudinum* sobre el CYP1A y 3A en microsomas humanos. Se presentan los resultados como medias \pm SEM del porcentaje respecto a la actividad detectada en el cultivo control (100 % actividad). La actividad enzimática del CYP1A1 y 3A4, fue medida tras la incubación de microsomas humanos obtenidos de un banco de hígados humanos con las concentraciones del extracto (5, 25 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 10 min. * $p \leq 0.05$ (test de Student).

Por otro lado, el extracto obtenido de *U. fasciata* mostró una significativa inhibición del CYP1A1 en ambos modelos experimentales, en la Figura 2 se muestran los resultados obtenidos en microsomas de ratas. Teniendo en cuenta, que esta inhibición de la actividad del CYP1A1 producida por el extracto de *U. fasciata* se encuentra en concordancia con los efectos inhibitorios del extracto sobre la mutagenicidad inducida por el benzoapireno, un compuesto que se transforma a metabolito reactivo y mutagénico por la actividad de este citocromo (Tabla 1), se decidió investigar el tipo de interacción que se establece entre el extracto y este sistema enzimático. Así, se realizaron experimentos de cinética enzimática en supersomas humanos que expresan la actividad del CYP1A1 expuestos a diferentes concentraciones del extracto. La determinación a partir de las curvas Mikaelis-Menten de los parámetros, V_{max} (velocidad máxima de reacción) y K_i (constante de afinidad) permitió identificar que el extracto de *U. fasciata* es un inhibidor mixto de la actividad del CYP1A1 en nuestras condiciones de experimentación (Figura 2).

A) Microsomas de ratas



B) Supersomas humanos que expresan el CYP1A1

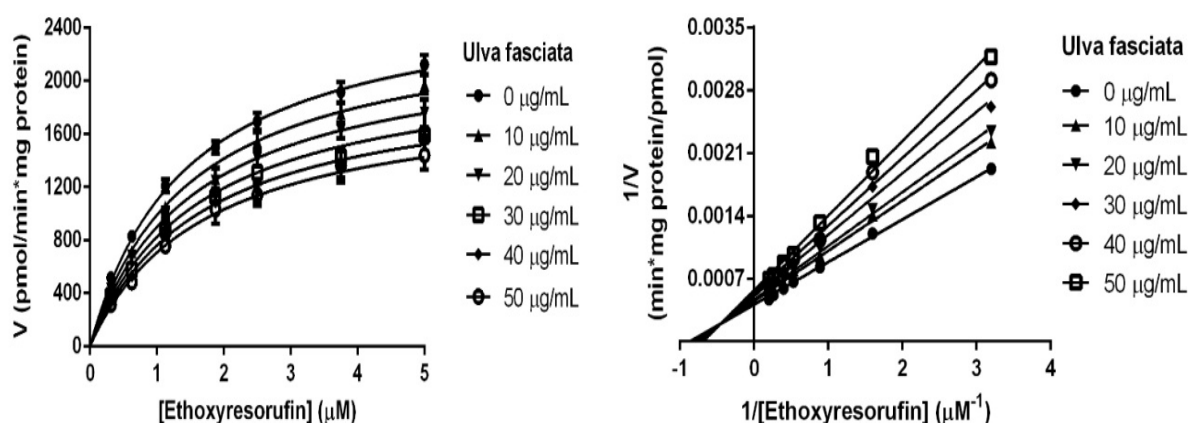


Figura 2. Efectos del extracto de *U. fasciata* sobre la función de la enzima CYP1A1. A) Efectos sobre la actividad enzimática del citocromo 1A1, tras la incubación de los microsomas con diferentes concentraciones del extracto durante 10 min. B) Parámetros cinéticos (V_{max} y K_i) determinados en supersomas humanos tras la incubación con el extracto que permitieron caracterizar el tipo de inhibición que tiene lugar. $V_{max} = 2677 \pm 51$ pmol/min/mg proteína, $K_i = 67,9 \pm 9,3$ µg/mL. Tipo de inhibición: mixta.

Concluidos los ensayos realizados en microsomas hepáticos se continuó la evaluación de los efectos de los extractos en estudio sobre este sistema de biotransformación, pero empleando en este caso como modelo experimental el cultivo primario de hepatocitos de ratas. Como ya se ha planteado, este es un biomodelo que mantiene la integridad estructural y funcional de los hepatocitos y por tanto se acerca mucho más a lo que sucede en el hígado.

El estudio de los posibles efectos de los cinco extractos sobre las principales enzimas del sistema del P450 mostró que el extracto de obtenido de *T. testudinum* inhibió significativamente la actividad catalítica de los CYP2C19 y 2E1. Además, *T. testudinum* fue capaz de inducir la actividad del CYP2B6, mientras que no moduló la actividad del resto de los citocromos evaluados (CYP1A1, 3A4, 2D6 y 2C9) (Figura 3). Fueron corroborados los efectos del extracto de *U. fasciata* sobre la actividad del CYP1A1. Se observó una reducción significativa de la

actividad de este citocromo, en el orden de un 28% respecto a los controles, células solo expuestas al medio de cultivo. El extracto obtenido de *S. fluitans* mostró una ligera inhibición del citocromo 3A4 (alrededor de un 16% respecto al control), y fue capaz de inducir la actividad del CYP2B6. *S. filiforme* no modificó significativamente la actividad de ninguna de las enzimas evaluadas. Mientras, que los posibles efectos del extracto obtenido de *D. pinnatifida* no fueron evaluados en este modelo experimental.

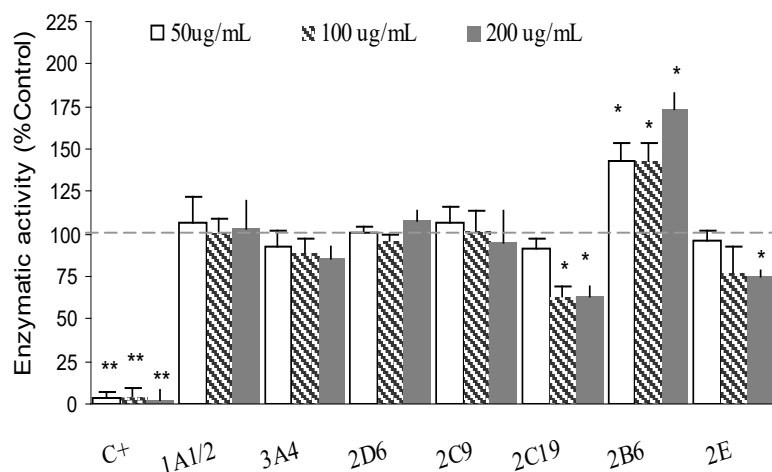


Figura 3. Efectos del extracto de *T. testudinum* sobre la actividad de los citocromos del P450 en hepatocitos de ratas. Las células se incubaron durante 48 h con las concentraciones del extracto (50, 100 y 200 µg/mL). Concluido este periodo, se incubaron durante 2 h con un coctail de sustratos específicos para cada enzima a evaluar. Al finalizar, se determinó la actividad enzimática por HPLC/MS. Se presentan los resultados como medias \pm SEM del porcentaje respecto a la actividad detectada en el cultivo control (100 % actividad). * $p \leq 0,05$ (test de Student).

Por último, teniendo en cuenta que el extracto de *T. testudinum* apuntaba a ser un producto de los más promisorios y mostraba una gama de efectos sobre este sistema de enzimas, se continuó la investigación profundizando en sus efectos a nivel de la actividad y la expresión de estas isoenzimas en el ensayo de hepatocitos de origen humano en cultivo, que sin lugar a dudas hasta la fecha constituye el modelo experimental *in vitro* más cercano a lo que ocurre en el hígado humano (35). Se determinaron los efectos del extracto y de la TB sobre las actividades enzimáticas de los enzimas CYP1A1/2, 2D6, 3A4, 2C9, 2A6 y sobre las enzimas de conjugación: glucoroniltransferasa (UGT) total y las isoenzimas UGT1 y UGT9.

Los resultados mostraron que tanto el extracto (100 y 250 µg/mL) como TB (100 y 200 µM) inhiben la actividad de estas isoenzimas mostrando diferentes grados de inhibición (Figura 4). Sin embargo, cuando se estudiaron estos efectos a nivel del ARNm sólo se apreció inhibición de la expresión del CYP3A4 (lo que se correspondió con la disminución de la correspondiente actividad catalítica) (Figura 5). Sorpresivamente, a diferencia de la disminución observada de la

actividad del CYP1A, se observó un incremento dependiente de la concentración del ARNm de este citocromo, lo que sugiere una inducción *in vitro* de la expresión del CYP1A1. En principio estos resultados podrían parecer no coherentes, no obstante, otros autores han descrito efectos similares para este tipo de moléculas (41, 42), habida cuenta de los complejos mecanismos moleculares que median las interacciones de los polifenoles con estos sistemas. Además, se apreciaron diferencias con los efectos observados cuando las mismas enzimas fueron evaluadas en hepatocitos de rata (Figura 3), lo que sugiere que podrían existir diferencias metabólicas entre la rata y el humano a la hora de metabolizar el extracto, lo que debe ser tomado en cuenta en estudios futuros.

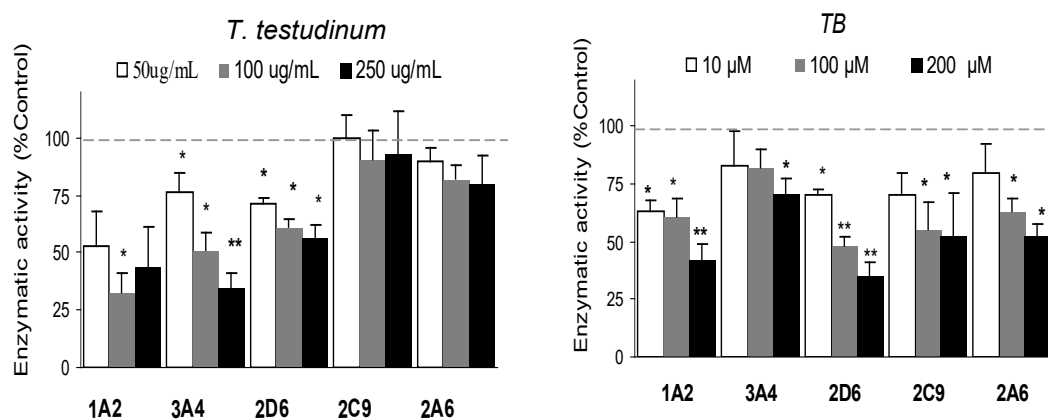


Figura 4. Efectos del extracto de *T. testudinum* y la TB sobre las actividades del P450 en hepatocitos humanos. Las células fueron incubadas durante 48 h con el extracto y la TB. Seguidamente, las actividades de los CYP1A2, 3A4, 2D6, 2C9 y 2A6 fueron determinadas mediante incubación directa de las monocapas con un coctel de sustratos específicos para cada enzima. Los valores de actividad enzimática son expresados como porcentaje del control y representan la media \pm SEM de 3 experimentos. * < p 0,05 respecto al control, Student *t*-test.

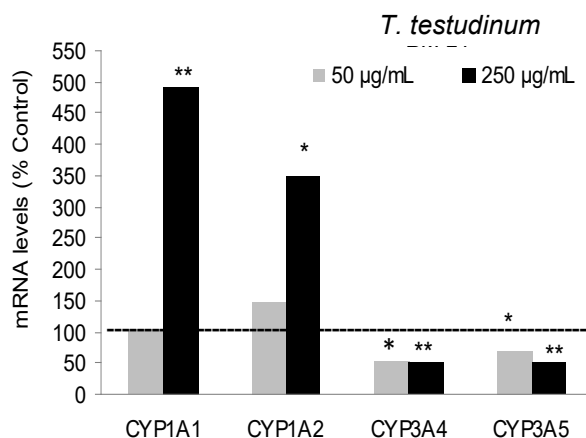


Figura 5. Influencia del extracto de *T. testudinum* sobre la expresión del RNAm del CYP1A y CYP3A en hepatocitos humanos en cultivo. Los niveles de ARNm fueron cuantificados por RT-PCR determinados 48 h después de la incubación de los hepatocitos con el extracto (50 y 250 µg/mL). Los resultados se expresan como porcentaje del control determinadas las veces del ARNm correspondiente respecto al contenido de RNA/ β -actina (gen

constitutivo) en los controles. Los datos son expresados como media \pm SEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ respecto al control (Dunnett's test).

Asimismo se observó una inhibición de la actividad catalítica de las enzimas UGT1A1, UGT1A9 y UGT, responsables de las reacciones hepáticas de glucuronidación de muchos xenobióticos (Figura 6), no evidenciándose cambios apreciables a nivel del ARNm (datos no mostrados). Estos resultados constituyen los primeros hallazgos de los posibles efectos de productos obtenidos de *T. testudinum* sobre enzimas de Fase II del metabolismo de xenobióticos.

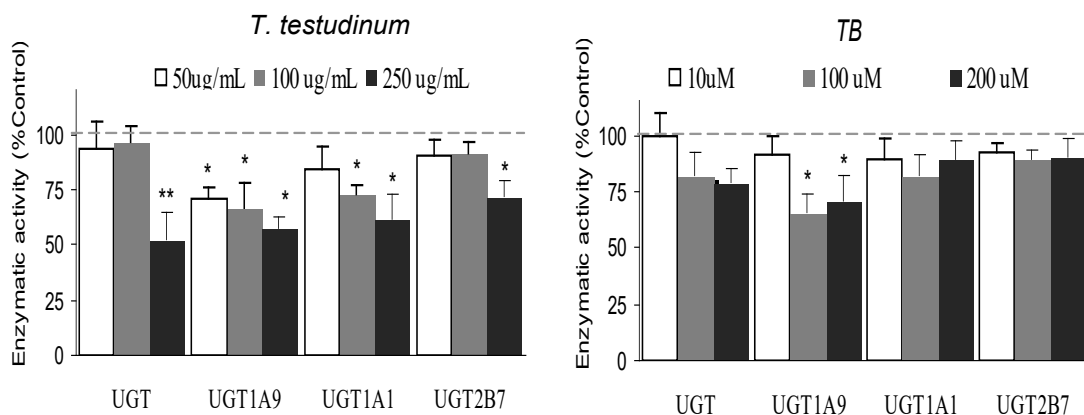


Figura 6. Efectos del extracto de *T. testudinum* y TB sobre las actividades de enzimas de Fase II del metabolismo en hepatocitos humanos. Las células fueron incubadas durante 48 h con el extracto y la Thalassiolina B (TB). Seguidamente, las actividades de la UDP-glucoronil transferasa y sus isoenzimas fueron determinadas mediante incubación directa de las monocapas con un coctel de sustratos específicos para cada enzima. Los valores de actividad enzimática son expresados como porcentaje del control y representan la media \pm SEM de 3 experimentos. * $p < 0,05$ respecto al control, Student *t*-test.

Para esta etapa se demostró que el extracto obtenido de *T. testudinum* es capaz de modular *in vitro* enzimas de Fase I y II del metabolismo, responsables de la bioactivación de numerosos compuestos extraños en el organismo. Se destaca su capacidad de inhibición de la actividad de los citocromos 1A, 3A y 2E y de inductor de la actividad de la UDP-glucoronil transferasa, por la importancia que ello pudiera tener para modificar la bioactivación a nivel hepática de mutágenos y carcinógenos humanos.

Así mismo se pudo comprobar que el extracto obtenido de *U. fasciata* inhibe la actividad del CYP1A1, enzima responsable de la bioactivación de diferentes agentes mutagénicos en el organismo.

Evaluación de los efectos sobre la función de la glicoproteína P (Pgp)

A pesar de los logros alcanzados en el tratamiento de las enfermedades malignas, la resistencia a los fármacos empleados en la terapéutica del cáncer constituye hoy día un gran obstáculo para

alcanzar la curación de un número significativo de pacientes. Estudios realizados a la fecha han identificado varios genes, proteínas y vías metabólicas implicados en este fenómeno. Hasta el momento, el más estudiado es el gen MDR1 (del inglés multi drug resistance gene) y su producto, la glicoproteína P (43). La glicoproteína P (Pgp) es una proteína de membrana que pertenece a la familia de transportadores ABC. Esta familia está constituida por proteínas de eflujo dependientes de la energía del ATP, (del inglés, ATP-binding cassette) y actúan en las células como bombas extractoras de compuestos endógenos y exógenos a nivel celular a expensas de energía, incluidos los fármacos entre los que sobresalen diferentes citostáticos. Ha sido demostrado que esta proteína se encuentra expresada en diferentes tejidos tanto normales como tumorales, donde es responsable de la aparición de un fenotipo de resistencia simultánea a múltiples fármacos antitumorales (44). La importancia clínica de este hecho ha llevado a múltiples estrategias para evitar o revertir los efectos de la resistencia a las drogas antineoplásicas.

Han sido realizados numerosos estudios encaminados a la búsqueda de compuestos que presenten la capacidad de inhibir la función de la Pgp en células tumorales, lo que podría contribuir a revertir la resistencia al tratamiento antitumoral en la práctica clínica. Además, resulta de gran importancia conocer cómo se modula este transportador en presencia de tóxicos y carcinógenos. En este sentido, han sido identificados diferentes productos naturales, entre los que se destacan los polifenoles, como promisorios inhibidores tanto de la función como de la expresión de este transportador a nivel de la membrana de diferentes estirpes celulares (45).

El estudio de los posibles efectos del extracto de *T. testidunum* sobre la función/expresión de Pgp mostró que el extracto es capaz de inhibir la función de este transportador de manera dependiente de la concentración en hepatocitos humanos (Figura 7), sin afectar significativamente la expresión a nivel del gen MDR1 que codifica para la síntesis de Pgp. Este efecto fue corroborado sobre células de origen tumoral: MCF-7 (tumor de mama) y CT26 (tumor de colon) (Figura 8).

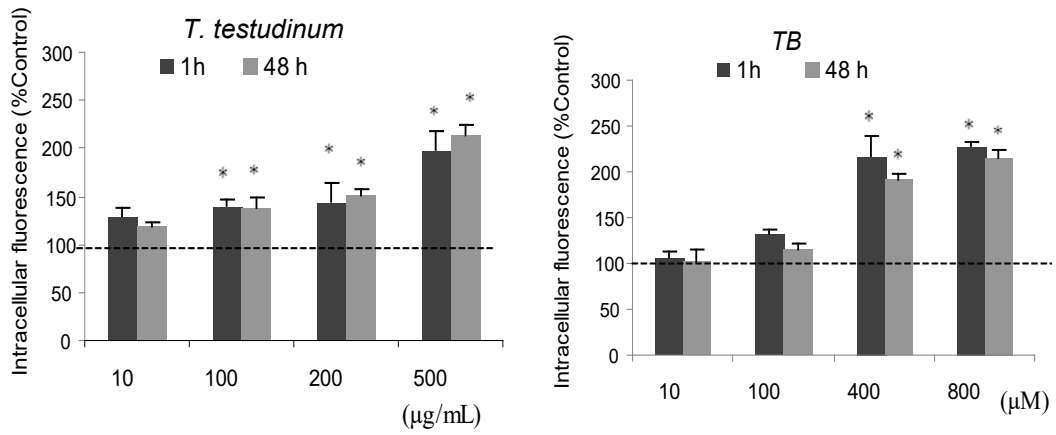


Figura 7. Efectos del extracto de *T. testudinum* y su componente TB sobre la función de la glicoproteína P en hepatocitos humanos. Barras en negro representan 1h exposición a los productos, Barras gris representan 48 h exposición. El incremento de la fluorescencia intracelular se presenta como porcentaje del control (celulas no expuestas, 100% viabilidad) y es inversamente proporcional a la actividad del sistema.

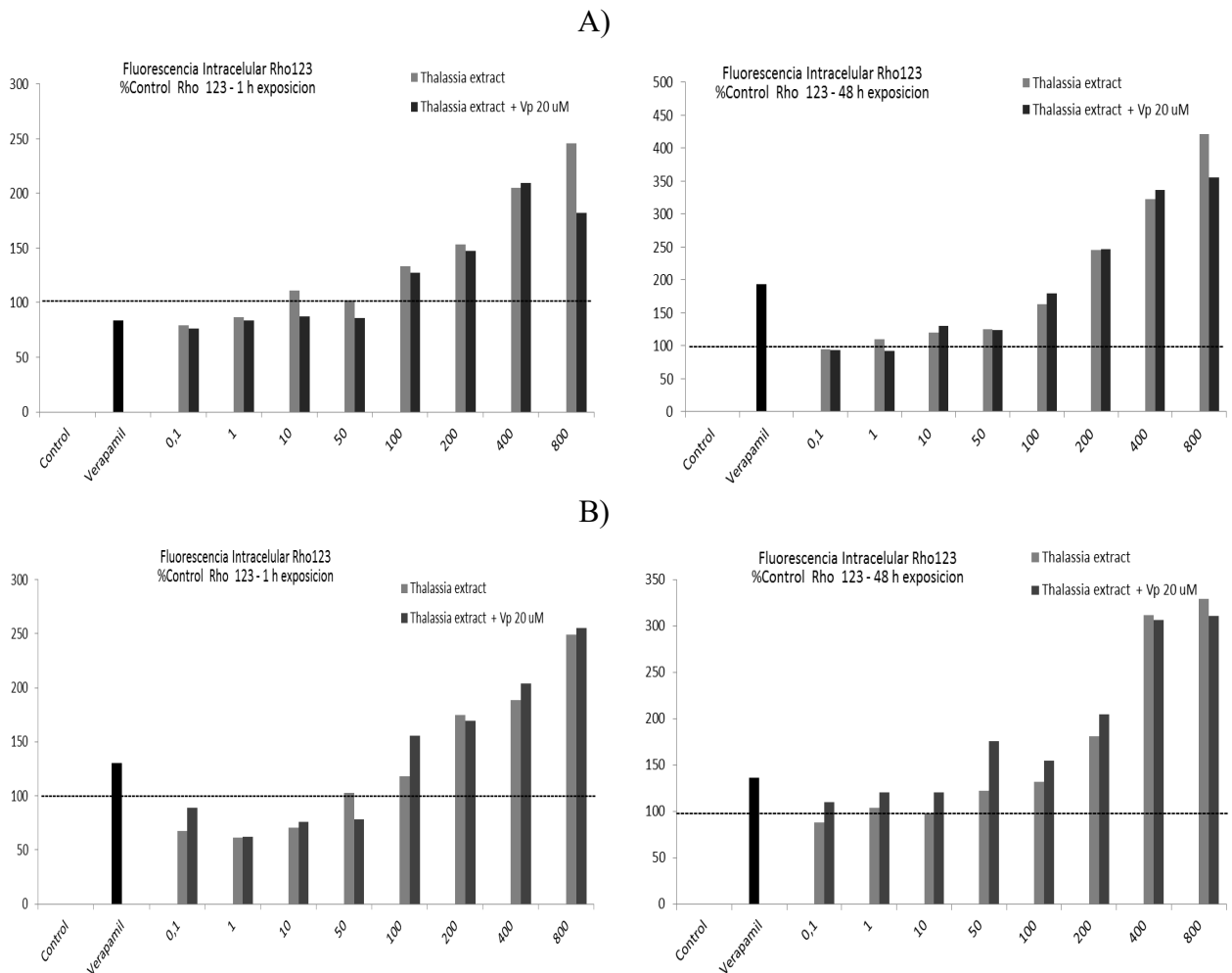


Figura 8. Efectos del extracto de *T. testudinum* sobre la función de la glicoproteína P en células tumorales (MCF-7 y CT26). A) células de tumor de mama MCF-7, B) células de tumor de colon CT26. El incremento de la fluorescencia intracelular se presenta como porcentaje del control (células no expuestas, 100% viabilidad) y es inversamente proporcional a la actividad del sistema. Se empleó el verapamilo, sustrato e inhibidor de la proteína como control interno del experimento.

Evaluación de los efectos sobre la función de la proteína transportadora BCRP/ABCG2

La proteína BCRP/ABCG2 es un transportador de membrana dependiente de ATP ampliamente distribuida a nivel celular, encargada del transporte activo de sustratos de naturaleza variada. Este transporte está implicado en la protección de las células frente a la entrada de compuestos tóxicos y sus metabolitos, en la biodisponibilidad de fármacos, en el transporte de hormonas y en el fenómeno de multi-resistencia a los fármacos. Por estas razones, el conocimiento del espectro de agentes que interactúan con esta proteína resulta de gran interés en el control de la eliminación de un gran número de compuestos tóxicos del organismo y en la mejora del manejo terapéutico de enfermedades, entre las que se destaca el cáncer.

Han sido identificados estructuras con naturaleza polifenólica que interactúan con la proteína BCRP, ya sea como sustratos, inhibidores o inductores (46). Así, fue de interés como parte de la caracterización de las potencialidades bioactivas del extracto de *T. testudinum* estudiar su posible interacción con este transportador, para determinar si el extracto es sustrato y/o inhibidor de BCRP, empleando para ello diferentes ensayos en las células MDCK y en sus subclones transducidos con BCRP de humana (HBCRP) y bcrp de ratón (Bcrp1). Primeramente, se investigaron los efectos citotóxicos del extracto sobre estas células (Ensayo del MTT). Seguidamente, se estudió la interacción del producto con el transportador en presencia o no de un sustrato específico de BCRP, la mitoxantrona, y de un inhibidor de sistema Ko143.

Cultivo celular

Las células se cultivaron en DMEM con glutamato y suplementado con penicilina (50 U/mL), estreptomycin (50 µg/mL), y 10% (v/v) de suero bovino fetal a 37°C en presencia de CO₂ al 5%. Las células se sub-cultivaron mediante tripsinización cada tres o cuatro días.

Ensayos de citotoxicidad

Las células se sembraron a una densidad de 8.000-10.000 células/pozo y se incubaron 24 horas. Después, fueron lavadas e incubadas durante 24 horas a 37°C con las diferentes concentraciones del extracto (10-1000 µg/mL). Además, se realizaron incubaciones que también contenían el inhibidor específico de BCRP, Ko143 (1µM).

Concluido el periodo de incubación se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Este ensayo fue realizado según Mosmann (47). Las células fueron cargadas con el MTT durante 3 h. Seguidamente, se determinó la cantidad de MTT reducido solubilizando las células con 150µL de DMSO/porozo. Se leyeron las placas a 550 nm en un lector de Elisa (SUMA). La DO se tomó como índice de la cantidad de formazan formado a partir de la reducción del MTT. El porcentaje de viabilidad celular se calculó mediante la siguiente fórmula: viabilidad (%) = (DO tratados/DO control) x 100. La concentración inhibitoria media (CI₅₀) fue calculada para cada línea a partir de las curvas de dosis-respuesta.

Ensayos de interacción

Las células fueron sembradas a 15 000 cel/mL hasta sub-confluencia. Después, las células se pre-incubaron durante 1 hora a 37°C, en presencia únicamente el inhibidor Ko143 (1µM) o de la sustancia en estudio como posible inhibidor a diferentes concentraciones. A continuación, se añadió mitoxantrona, sustrato de BCRP, dejando incubar 1 hora más. Posteriormente, fueron

lavadas y tripsinizadas. Las células se recogieron, se centrifugaron a 1000 r/min. a 4°C durante 5 min. A continuación, se determinó la acumulación de mitoxantrona por citometría de flujo (excitación 448 nm, emisión y 650nm). Se estimó la fluorescencia correspondiente según Pavek *et al.* (48). Los resultados se presentaron como porcentajes de viabilidad celular en relación a los controles expuestos a la mitoxantrona.

Los resultados muestran el porcentaje de viabilidad en los diferentes tipos de células MDCK, tras la incubación con diferentes concentraciones de *T. testudinum* (Figura 9). Como se observa se evidenciaron diferencias en el grado de toxicidad inducido por el extracto sobre estas líneas celulares (Figura 9A).

Por otro lado, el análisis diferencial de la citotoxicidad inducida entre las células MDCK-Parentales y aquellas que sobre-expresan el transportador, fue utilizado para determinar si este producto es sustrato de BCRP. Así, una mayor sensibilidad a un compuesto por parte de las células parentales que por las transfectadas con el transportador, puede deberse a que este sea un sustrato de BCRP; de manera que la concentración intracelular del compuesto en células que sobre-expresan este transportador disminuye en comparación con las parentales, demostrando su resistencia al mismo. Las células transfectadas con BCRP de humana y en especial las transfectadas con *Bcrp1* de ratón mostraron viabilidad superior a la línea parental, manteniéndose este efecto en el intervalo de concentraciones estudiadas. Para poder afirmar que este efecto se debe a la expulsión del extracto fuera de la célula por el transportador BCRP y no a otro tipo de transportador, se realizaron incubaciones con el extracto en presencia de un inhibidor específico de BCRP, el compuesto Ko143. Así, si efectivamente es sustrato de BCRP, en presencia de Ko143 la sensibilidad al mismo por parte de las células que sobre-expresaban el transportador debe reducirse considerablemente su viabilidad, aproximándose a la de las células parentales. Para analizar este efecto se compararon los valores EC_{50} (concentración de extracto que produce un 50% de viabilidad).

De esta manera, al analizar el efecto de la inhibición del transporte mediado por *bcrp1* (murino) y por HBCRP (humana) en la incubación con *T. testudinum*, puede observarse que disminuye la resistencia a este extracto en las células que sobre-expresan el transportador. Esto también se observa al comparar los valores de EC_{50} obtenidos, el valor de EC_{50} tras la exposición de las células MDCK-*bcrp1* al extracto de *T. testudinum* es de 1378 $\mu\text{g/mL}$ y al inhibir este transportador se reduce a 317,7 $\mu\text{g/mL}$, valor más semejante al EC_{50} de las células parentales. En

células MDCK-HBCRP también se produce este efecto pasando de un valor de 741,6 $\mu\text{g/mL}$ a 438.3 $\mu\text{g/mL}$. En base a esto, podemos afirmar que el extracto de *T. testudinum* se comporta en estas condiciones experimentales como sustrato de BCRP, especialmente de bcrp1, donde la diferencia entre los valores EC_{50} es significativamente mayor.

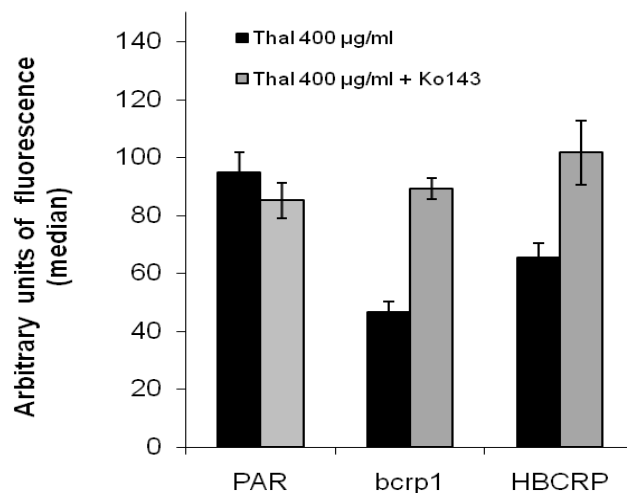


Figura 9. Influencia del extracto de *T. testudinum* sobre la actividad el transportador BCRP en células MCDK-II. PAR, células MCDK-II parenterales, bcrp1, células MCDK-II transfectadas con el transportador de origen murino, HBCRP, células MCDK-II transfectadas con la proteína transportadora de origen humano. Barras en negro células expuestas al extracto, barras en gris células expuestas al extracto en presencia de Ko143, inhibidor específico de BCRP.

Por otro lado, en la Figura 10 se muestran los resultados de los efectos del extracto de *T. testudinum* sobre la acumulación de la mitoxantrona, sustrato de BCRP. La retención de la mitoxantrona fue mucho más baja en los subclones (MDCK-Bcrp y MDCK-BCRP) que en las células parentales, lo que indica la habilidad de las células MDCK-Bcrp y MDCK-BCRP que sobre-expresan BCRP para expulsar la mitoxantrona con respecto a las parentales. El extracto se comportó como inhibidor de BCRP, lo que se evidencia ya se observó un significativo incremento dependiente de la concentración en la fluorescencia detectada, al exponer conjuntamente el sustrato y el extracto de *T. testudinum* en las células que sobre-expresan BCRP. Esto podría atribuirse erróneamente a la acumulación intracelular de mitoxantrona como consecuencia de la inhibición del transportador por el extracto. Sin embargo, al analizar la fluorescencia inherente al extracto, se vio que presentaba auto-fluorescencia, por lo que los valores obtenidos no pueden relacionarse directamente con la concentración intracelular de mitoxantrona, ni utilizarse como medida de inhibición de BCRP. Sin embargo, si es posible hacer uso de esta propiedad del extracto de *T. testudinum* para comprobar su actividad como sustrato de BCRP en estas condiciones experimentales.

Para estudiar la posible inhibición de BCRP por este producto, las células se incubaron durante 1 h en presencia del extracto y de un inhibidor del sistema, Ko143. Los resultados obtenidos demostraron que el extracto fue capaz de actuar como inhibidor de la función de este transportador, resultando más sensibles las células transfectadas con la proteína de origen humano.

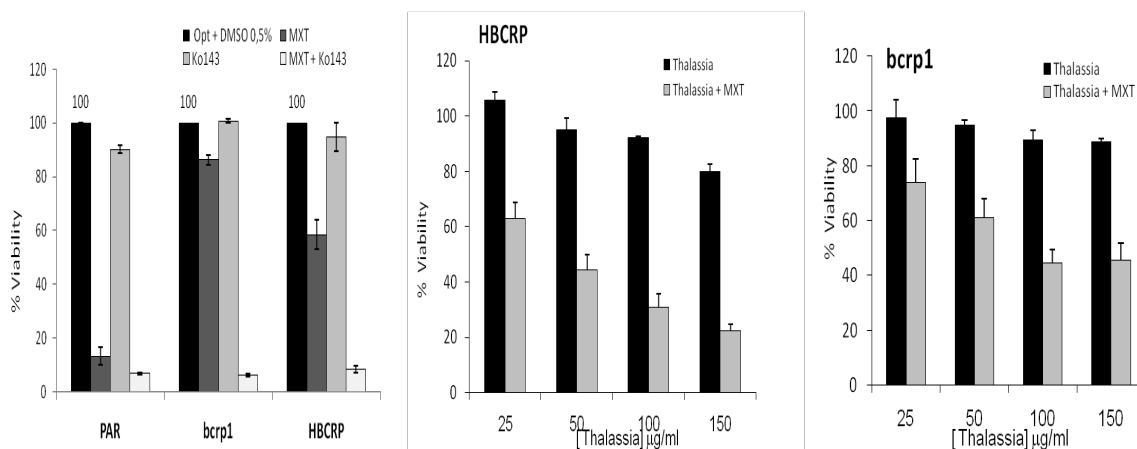


Figura 10. Efectos del extracto *T. testudinum* sobre la toxicidad de la mitoxantrona (MTX) en células MDCKII (Ensayo del MTT). Porcentaje de viabilidad de células MDCKII parenterales y transducidas Bcrp1 (murina) y BCRP (humana) frente a mitoxantrona (10 µM) en presencia y ausencia del inhibidor de BCRP, Ko143 (1 µM). Se presentan medias ± S.D. de 3 experimentos independientes.

Para esta tarea se concluye que el extracto *T. testudinum* es sustrato e inhibidor de la proteína transportadora de xenobióticos BCRP en células MDCK, lo que es importante considerar como una potencial aplicación clínica en la modulación del comportamiento cinético de fármacos que se eliminen a través de este sistema de transporte.

5. Evaluación del potencial citotóxico de los extractos

Como hemos referido anteriormente, en las últimas décadas los organismos marinos han sido reconocidos como una fuente de obtención de novedosas estructuras con amplias potencialidades farmacológicas dentro de las que encuentran las antioxidantes, anti-proliferativas, citotóxicas y antiinflamatorias. Propiedades estas que en numerosas ocasiones han sido identificadas y descritas en una misma entidad, lo que no resultaría alarmante si se toma en consideración la estrecha relación que ha sido reconocida entre los procesos de estrés oxidativo, inflamación y el desarrollo tumoral.

La citotoxicidad puede ser definida como la capacidad que poseen ciertos compuestos de producir una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño que puede ser detectado (49). Para la cuantificación de la citotoxicidad es necesaria la implementación de diferentes tipos de ensayos que se encuentran descritos empleando diversos métodos y estrategias

para realizarlos. Entre los métodos para cuantificar la citotoxicidad de un compuesto se cuenta con los que miden actividad metabólica celular y los que se basan en el principio de exclusión celular. Estos métodos para determinar la citotoxicidad de un compuesto incluyen: a) contacto de células vivas en medio de cultivo y expuestas a cantidades conocidas de los compuestos a ser analizados; b) incubación de las células en diferentes intervalos de tiempos; c) un colorante que tenga un estado oxidado, un agente transferidor de electrones, un sustrato para la enzima citoplasmática, un cofactor para la enzima citoplasmática; d) la enzima citoplasmática liberada de las células muertas a través de la cual se determina la citotoxicidad del compuesto a analizar (49).

De tal forma, como parte de los objetivos de este proyecto, entre las primeras tareas que se acometieron se decidió estudiar los posibles efectos citotóxicos y anti-proliferativos de los extractos seleccionados en una batería de células que se encuentran entre las recomendadas para la realización de estos ensayos. Para ello, dichos efectos fueron evaluados en un panel de líneas celulares de origen tumoral y no tumoral, y utilizó como primera medida de la viabilidad celular el ensayo de reducción del MTT.

Mantenimiento y procedimiento para la obtención de los cultivos celulares.

Las líneas celulares derivadas de tumor (Hep G2, PC12, CT26, 4T1, SW80, Hela, MDA-MB231, MCF-7, RKO, neuroblastoma humano) y las líneas celulares no-tumorigenicas (Vero, 3T3, J774, C9, BHK2) utilizadas en el estudio se adquirieron originalmente de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Fueron donadas por el Centro de Inmunología Molecular (CIM) y el Centro de Investigación y Desarrollo de los Medicamentos (CIDEM) en el caso de los estudios realizados en Cuba. En los estudios realizados en el extranjero fueron procedentes de los bancos de células establecidos en los diferentes laboratorios de los centros colaboradores (Unidad de Hepatología Experimental, Hospital La Fe, España, Departamento de Toxicología y Medicina Genómica, UNAM, México, Departamento de Farmacología, Universidad Minas Gerais y el Departamento de Ciencias Biomédicas, Universidad de Amberes, Bélgica.

Además, fueron evaluados los efectos en cultivos primarios preparados a partir de diferentes tejidos: hepatocitos de ratas y humanos, neuronas de ratas y linfocitos de sangre periférica de origen humano.

En todos los casos, las células fueron cultivadas en frascos de 75 cm² con medio DMEM, suplementado con glutamina 2 mmol/L, antibiótico y suero bovino fetal al 10 %. Después de

recuperadas de la tripsina, se sembraron en placas a razón de $4 \cdot 10^4$ células/pozo y se incubaron toda la noche a 37°C en atmósfera húmeda.

Ensayo de citotoxicidad

Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de los productos (1-1000 $\mu\text{g/mL}$) durante 48 h. En todos los casos los extractos fueron disueltos en el medio de cultivo. Células solo expuestas al medio de crecimiento fueron utilizadas como control negativo del experimento. Al finalizar el periodo de exposición, se determinó la viabilidad celular de cada cultivo mediante el ensayo de MTT (47).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPadPrism, versión 5. Los valores fueron expresados como las medias \pm desviación estándar de las medias (DE). En todos los casos se procesaron resultados de al menos tres cultivos, considerando al menos cinco repeticiones/tratamiento. Para comparar las medias de los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple. Cuando se obtuvieron diferencias intra-grupos experimentales, de acuerdo al ANOVA, se aplicó la prueba de Tukey *a posteriori*. Valores probabilísticos $*p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

La exposición de las células a los diferentes extractos en estudio durante 48h de exposición evidenció diferencias en la viabilidad celular de un producto a otro y su vez entre las diferentes estirpes celulares empleadas en el estudio. A partir de los resultados obtenidos en todos los casos, se determinó la concentración de cada extracto que es capaz de inhibir el 50% del efecto máximo del crecimiento celular (IC_{50}). En la Tabla 1 se presentan los valores de IC_{50} calculados a partir de los datos de viabilidad celular después de 48h de exposición a diferentes concentraciones de los productos evaluados en el panel de líneas celulares tumorales y no tumorales empleado en el estudio. Como ya hemos planteado, la exposición de las células a los extractos no siempre conllevó que se produjera una disminución de la viabilidad celular, por lo que la IC_{50} en algunos casos no pudo ser calculada. El extracto obtenido de *T. testudinum* fue el único producto que fue capaz de modular la viabilidad celular, el resto de los productos evaluados no produjeron cambios significativos en el crecimiento celular en ninguno de los ensayos realizados. *T. testudinum* provocó una disminución de la viabilidad de las células tumorales, sin afectar prácticamente la viabilidad de las células de origen no tumoral evaluadas (Tabla 3).

Tabla 3. Descripción del origen, tumorigenicidad y sensibilidad de extractos obtenidos de fuentes marinas sobre diferentes tipos celulares. (Se presentan los resultados en valores de IC₅₀, en µg/mL).

Tipo celular	Origen	Tumorigenicidad	<i>T. testudinum</i>	<i>S. fluitans</i>	<i>D. pinnatifida</i>	<i>S. filiforme</i>	<i>U. fasciata</i>
Hepatocitos	RATA	No tumoral	> 1000	689	> 1000	> 1000	> 1000
Hepatocitos	HUMANO	No tumoral	> 1000	> 1000	> 1000	982	> 1000
C9	RATA	No tumoral	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
Linfocitos	HUMANO	No tumoral	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	899
Neuronas	RATAS	No tumoral	> 1000	889	> 1000	> 1000	> 1000
VERO	RINON MONO VERDE	No tumoral	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	903
3T3	FIBROBLASTOS RATON	No tumoral	> 1000	685	> 1000	767	> 1000
J774	MACROFAGOS HUMANO	No tumoral	> 1000	> 1000	ND	ND	> 1000
BHK-2	RINON	No tumoral	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
HepG 2	HEPATOMA HUMANO	Tumoral	185	625	> 1000	> 1000	> 1000
PC12	GLIA HUMANO	Tumoral	135	756	ND	878	789
Neuroblastoma	HUMANO	Tumoral	156	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
CT26	CARCINOMA COLON MURINO	Tumoral	502	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
SW80	CARCINOMA COLON HUMANO	Tumoral	67	ND	ND	ND	> 1000
HELA	CARCINOMA CERVIX HUMANO	Tumoral	267	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
MCF-7	TUMOR MAMA HUMANO	Tumoral	626	ND	ND	ND	> 1000
MDA-MB231	TUMOR MAMA HUMANO	Tumoral	500	ND	ND	ND	> 1000
4T1	TUMOR MAMA MURINO	Tumoral	129	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
RKO	CARCINOMA COLON	Tumoral	234	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000

IC₅₀, representa la concentración que inhibe la viabilidad del 50% de la población celular.
Tiempo de exposición a las sustancias de prueba 48 h.

Estos resultados mostraron que el extracto de *T. testudinum* no afecta la viabilidad de células normales mientras que induce de manera dependiente de la concentración inhibición de la viabilidad de diferentes células tumorales en nuestras condiciones de ensayo. Sin embargo los extractos obtenidos de las especies *S. fluitans* *U. fasciata*, *D. pinnatifida* y *S. filiforme* no son citotóxicos bajo nuestras condiciones de ensayo. A partir de los estos hallazgos se decidió evaluar los posibles efectos antitumorales del extracto de *T. testudinum* y de sus componentes, así como profundizar en los mecanismos moleculares involucrados en dichos efectos.

6. Estudios de los efectos antitumorales *in vitro* del extracto de *T. testudinum* y de sus componentes, contribución al conocimiento acerca de los mecanismos moleculares implicados

Efectos de T. testudinum sobre la proliferación celular (Ensayo de MTT)

Los resultados previamente observados (Tabla 3) fueron corroborados cuando se evaluaron los efectos del extracto de *T. testudinum* en diferentes células hepáticas (hepatoma humano HepG2 y células de origen no tumoral como hepatocitos humanos, hepatocitos ratas, cultivo primario y células en cultivo), así como en células tumorales de origen neuronal (PC12 y neuroblastoma humano) y células normales obtenidas de neuronas aisladas de ratas (Figura 11). A pesar de que ha sido cuestionado en la literatura si la inhibición de manera diferencial el crecimiento en células tumorales y no tumorales resulta un criterio adecuado a tomar en cuenta como índice de selectividad en la evaluación del potencial antitumoral de un nuevo producto (50). Los hallazgos observados por nosotros que demuestran que el extracto induce efectos diferentes sobre la viabilidad de las células tumorales con respecto a las no tumorales resultaron de interés. En este sentido fueron desarrollados otros estudios.

La incubación de células tumorales (HepG2, PC12 y neuroblastoma humano) con el producto mostró que el efecto antiproliferativo del extracto se encuentra a partir de concentraciones superiores a 200 µg/mL (Figura 11). En el caso de las células normales (hepatocitos y neuronas en cultivo) se evidenció que se requieren concentraciones superiores del extracto para inhibir el 50% de la proliferación celular (CI₅₀ media por encima de 500 µg/mL).

Las diferencias en la respuesta celular a la exposición del extracto se observaron más evidentes en las células de origen neuronal que en las células hepáticas, lo que pudiera estar relacionado al hecho de que el hígado es el principal órgano encargado de la biotransformación de los compuestos exógenos en el organismo, y aunque hoy día se conoce que las neuronas también son capaces de metabolizar, ello sucede en mucha menor medida. En este sentido, el metabolismo hepático pudiera jugar un papel importante en la transformación de los metabolitos presentes en el extracto, con una repercusión sobre sus efectos biológicos, por lo que estas evidencias deben ser tomadas en consideración para estudios futuros.

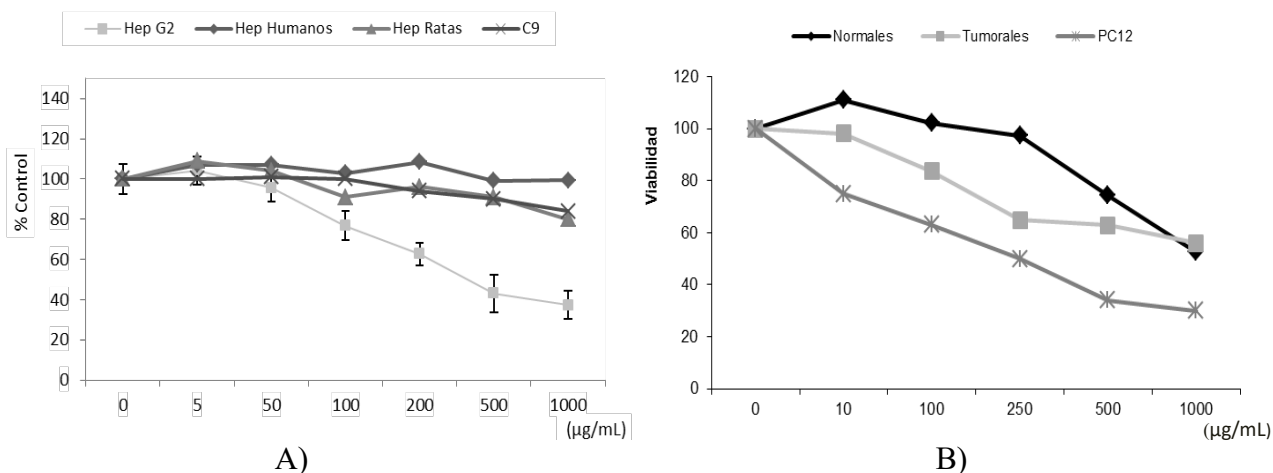


Figura 11. Efectos sobre la proliferación celular del extracto de *T. testudinum* tras la incubación de las células hepáticas (A) y neuronales (B) con el extracto durante 48h (Ensayo de MTT). La figura permite observar las diferencias en la viabilidad celular de las diferentes estirpes celulares expuestas a concentraciones entre 1-1000 L del extracto.

El extracto de *T. testudinum* no modifica la proliferación celular de células de origen no tumoral, mientras que es capaz de inducir una significativa inhibición dependiente de la concentración de este proceso en células de origen tumoral bajo nuestras condiciones de ensayo.

Efectos del extracto de T. testudinum sobre la proliferación celular (Ensayo de captación de rojo neutro)

Ha sido recomendado durante el tamizaje de citotoxicidad de un nuevo producto que se emplee más de un ensayo para evaluar su potencial tóxico (50). Esto reviste mayor interés si para predecir el potencial citotóxico de productos con propiedades antioxidantes se utiliza el ensayo del MTT. En dicho ensayo, que utiliza como criterio de viabilidad celular la capacidad energética de la mitocondria, organelo muy involucrado en los procesos de estrés oxidativo, lo que podría llevar a que aparezcan falsos positivos cuando se evalúan compuestos antioxidantes (47). Teniendo en cuenta estos hechos, en el presente trabajo se evaluó el potencial de toxicidad del extracto empleando el ensayo de captación del rojo neutro.

Los resultados obtenidos en el ensayo de captación del Rojo Neutro permitieron corroborar los efectos observados con anterioridad en el ensayo del MTT.

Cultivo celular

Las células fueron cultivadas (hepatocitos, HepG2, neuronas y PC12) y sembradas placas a razón de $2 \cdot 10^4$ células/pozo y se incubaron toda la noche a 37°C en atmósfera húmeda.

Ensayo de captación del rojo neutro

A las 24 h de sembradas, las células fueron expuestas a los compuestos de ensayo. Las células fueron expuestas a concentraciones de 10, 100, 500 y 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del extracto durante 48 h. Al finalizar fueron cargadas con el colorante. Por último, se liberó al medio la cantidad de rojo neutro que permaneció en las células viables, empleando ácido acético 1%, etanol 50% y H_2O 49%. La densidad óptica (DO) fue leída a 540 nm en un lector de placas ELISA (SUMA). En todos los casos, la DO obtenida se tomó como índice de la cantidad de rojo neutro captado por las células vivas.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPadPrism, versión 5. En la determinación de la normalidad de los datos se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Después de demostrar la normalidad en la distribución de la viabilidad celular, se realizó una Prueba t-test y la prueba de Mann Whitney *a posteriori*. En todos los casos se procesaron resultados al menos dos cultivos, considerando seis repeticiones/tratamiento.

El rojo neutro es un colorante catiónico débil que penetra a las células a través de las membranas por difusión pasiva y es almacenado en los lisosomas. En este caso independientemente de su mecanismo de acción, si el compuesto que se evalúa interfiere en el proceso de división y multiplicación celular, se reducirá el número de células del cultivo lo que podrá ser detectado al cuantificar la cantidad del colorante retenido por las células vivas (51). Los resultados obtenidos permitieron corroborar los efectos observados en el ensayo del MTT (Figura 12). Fueron corroborados los efectos antiproliferativos del extracto de *T. testudinum* en diferentes células (hepatoma humano HepG2, PC12 y hepatocitos de ratas y neuronas en cultivo), sugiriendo que el extracto induce diferentes grados de toxicidad de una célula a otra, lo que resulta más marcado en las células tumorales.

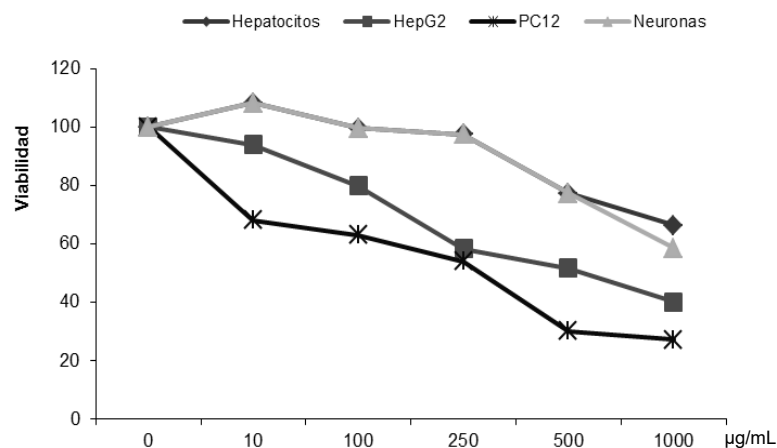


Figura 12. Efectos sobre la proliferación celular del extracto de *T. testudinum* en diferentes células (Ensayo de Captación del Rojo neutro). Las células fueron expuestas a a concentraciones entre 1-1000 µg/mL del extracto durante 48h. Concluido el período de incubación se determinó la viabilidad celular a través de la determinación de rojo neutro presente en las células viables. La figura permite observar las diferencias en la viabilidad celular de las diferentes estirpes celulares (Hepatocitos y neuronas de rata en cultivo, HepG2 y PC12).

El extracto de *T. testudinum* provoca una disminución de la viabilidad celular superior en celulares tumorales que en células normales, determinado en el ensayo de captación de rojo neutro.

Efectos de T. testudinum y TB sobre la viabilidad celular en células SW480 en cultivo mediante el ensayo de xCELLigence

El Ensayo de xCELLigence es un método que evalúa la viabilidad celular debido a la exposición a concentraciones de un producto a través de la medición de la respuesta dinámica de las células. Es un ensayo sensible y novedoso. Se calcula un índice celular como medida de la impedancia eléctrica en el cultivo. Este índice es proporcional al número de células vivas, células adheridas en el fondo del pozo (52). Este estudio fue utilizado como otro criterio de evaluación de los efectos antiproliferativos del extracto de *T. testudinum* y su componente mayoritario. Para ello, fue seleccionada la línea celular humana de cáncer de colon SW480, que resultó ser de las células más sensibles al efecto del extracto (Tabla 3).

Cultivo celular

Las células derivadas de cáncer de colon SW480 se adquirieron originalmente a partir de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Para el cultivo celular se empleó DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, glutamina 2% y penicilina/estreptomicina al 1%. Las células fueron mantenidas a 37°C y 5% de CO₂. Después de recuperadas de la tripsina, se

sembraron en placas a razón de $1 \cdot 10^4$ células/pozo en el ensayo 24 h de exposición y $0,5 \cdot 10^4$ células/pozo para 72 h y se incubaron toda la noche a 37°C en atmósfera húmeda.

Ensayo de xCELLigence

El ensayo fue realizado utilizando un sistema sensor electrónico celular en tiempo real, xCELLigence-RTCA (Roche Applied Science, o RT-CES) según describen Abassi y cols. (52). Se evaluó la actividad antiproliferativa del extracto de *T. testudinum* (50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y de la TB (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en estas condiciones experimentales. En placa-E de 16 pozos con un microelectrodo incrustado se sembraron 4000 células/pozo, las cuales se dejaron adherir durante las primeras 18 horas, luego se adicionaron los productos a las diferentes concentraciones a evaluar. Se midieron las variaciones en la impedancia eléctrica en las células mediante microelectrodos interdigitales integrados al fondo de los pocillos de la placa. Para ello, se tomaron mediciones de impedancia cada 5 minutos durante un tiempo total de 72 horas.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPadPrism, versión 5. En la determinación de la normalidad de los datos se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Después de demostrar la normalidad en la distribución de la viabilidad celular, se realizó una Prueba t-test y la prueba de Mann Whitney *a posteriori*. En todos los casos se procesaron resultados al menos tres cultivos, considerando seis repeticiones/tratamiento.

En la Figura 13 se presentan los valores obtenidos de las mediciones realizadas a lo largo de 96 horas de cultivo. A las 24 horas después de la siembra de las células se adicionaron las diferentes concentraciones de ambos productos. Los resultados más significativos son los que reflejan los cambios acontecidos durante las 72 horas después del tratamiento con el extracto y la TB, antes de que las células alcanzaran la confluencia y saturaran los pocillos de cultivo. La curva superior (roja) refleja el comportamiento de la proliferación celular en células no tratadas (control). Se puede apreciar como concentraciones de 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del extracto (curva en verde y azul oscuro), inhiben totalmente la proliferación celular. Resulta interesante que las concentraciones de TB proporcionales a las que encuentran en el extracto a las concentraciones de 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no inhibieron el índice celular, lo que sugiere otros componentes presentes en la mezcla deben ser los responsables del efecto anti-proliferativo observado, si bien no se debe descartar la hipótesis de que el sinergismo a nivel celular que se puede estar estableciendo entre los diferentes

componentes de la mezcla, incluida TB, sea el responsable de la inhibición de la proliferación celular.

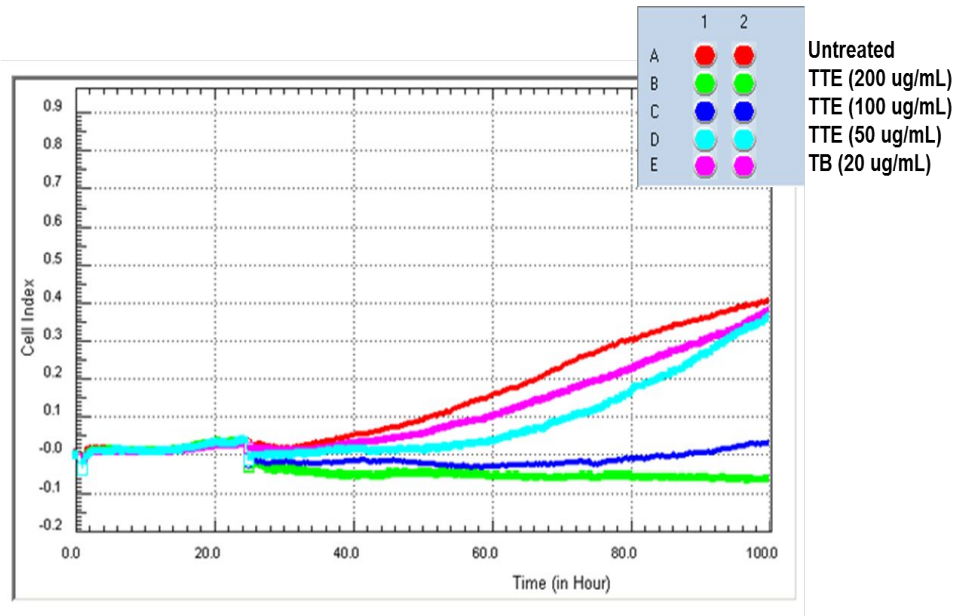


Figura 13. Evaluación de los efectos anti-proliferativos del extracto de *T. testudinum* y TB en células de cáncer de colon SW480. Imagen representativa de la proliferación celular del extracto de *T. testudinum* y TB en células SW480 mediante el empleo del método de xCELLigence. Los valores se muestran como índice de viabilidad celular. La adición de los tratamientos se realizó 24 horas después de sembradas las células. Las células fueron expuestas a los productos durante 72 h.

El extracto de *T. testudinum* presenta efectos antiproliferativos en células de cáncer de colon SW480, medido en el ensayo xCELLigence. Se corroboró que TB no afecta la viabilidad celular en nuestras condiciones de ensayo.

Efectos de T. testudinum y TB sobre la muerte celular en células tumorales humanas de origen hepático Hep G2

En este caso, la potencial de toxicidad del extracto de *T. testudinum* y de TB se evaluó empleando una plataforma de análisis de alto contenido (del inglés HCS, high content screening) en células tumorales humanas de origen hepático. Este es un sistema automático de microscopía de fluorescencia que combina el uso de formatos miniaturizados para determinar los efectos de los productos sobre marcadores de daño celular. Es una novedosa metodología que proporciona información de alta complejidad y que resulta muy sensible para la medición del daño a nivel de células vivas (53).

Diseño experimental

El estudio se realizó en las células HepG2, hepatoma humano, y además, muestran capacidad metabolizadora. Para ello, se expusieron las células a diferentes concentraciones del extracto (10-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y de TB (1-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 24 h de exposición. Seguidamente, las células se incubaron con diferentes sondas fluorescentes que permitieron evaluar los efectos del extracto sobre la viabilidad celular a través de la medición de los diferentes marcadores de daño celular. Concluido el periodo de exposición, las células se incubaron durante 30 min con la combinación de sondas fluorescentes que permitieron medir: cambios en la concentración de calcio intracelular (Fluo4 AM), peroxidación lipídica (BODIPY 665), contenido de DNA y células apoptóticas (Hoechst 33342) y viabilidad celular (yoduro de propidio). Al finalizar, las células fueron lavadas y se analizaron en el sistema de análisis de alto contenido Scan^R (Olympus).

En la Figura 14 se presentan los resultados obtenidos en esta prueba tras incubar las células de hepatoma humano HepG2 con las diferentes concentraciones del extracto y la TB durante 24 h. El ensayo permitió medir cuatro marcadores de daño celular bajo las mismas condiciones experimentales. Fueron determinados los efectos de estos productos sobre la viabilidad celular, los cambios en la concentración de calcio intracelular, la producción de radicales libres y el contenido de DNA y células apoptóticas. Como era esperado, la incubación con el extracto de *T. testudinum* provocó una disminución de la viabilidad celular dependiente de la concentración, mientras que TB, que se evaluó en el rango de concentraciones en el que se encuentra esta flavona en las concentraciones probadas del extracto en el ensayo, no provocó daños tóxicos a las células.

La realización de este ensayo permitió aportar nuevas evidencias acerca de los mecanismos que se encuentran involucrados en los efectos tóxicos descritos para el extracto. Como se aprecia en la Figura 14, en la medida que disminuyó la viabilidad celular en las células expuestas a *T. testudinum* se incrementó la concentración intracelular de Ca^{2+} , la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y los daños a nivel nuclear. Estos resultados nos permiten sugerir que en este modelo celular el extracto de *T. testudinum* por encima de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se comporta como un producto oxidante que induce cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} , provocando daños consecuentes a nivel de la membrana nuclear. Fue corroborado que la TB no es capaz de provocar daños sobre el comportamiento de estos parámetros en las células, lo que nos hace pensar que este componente del extracto por sí solo no es el responsable de los efectos tóxicos inducidos por *T. testudinum*.

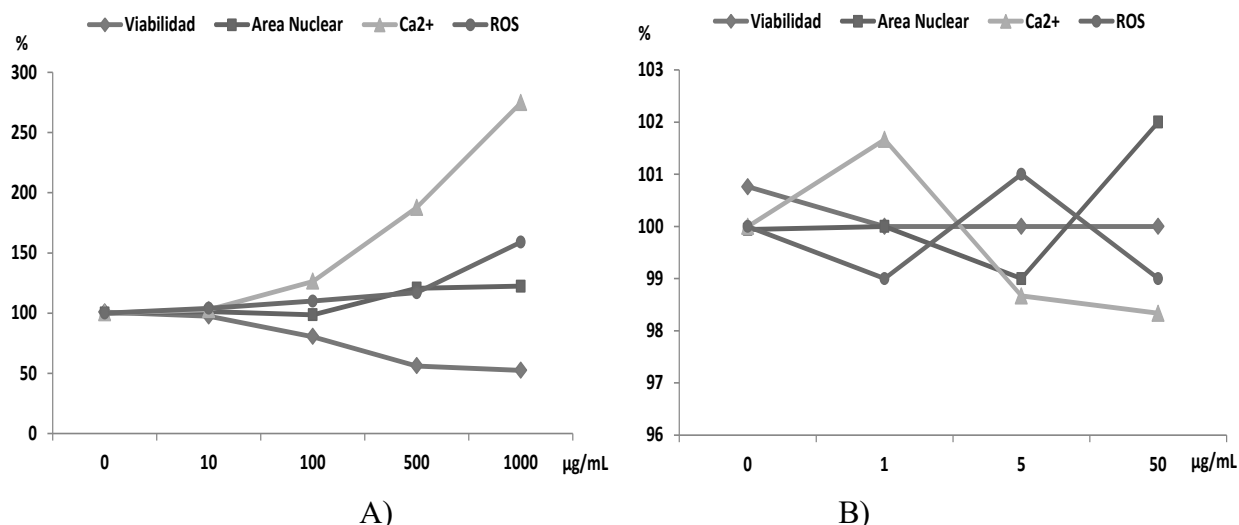


Figura 14. Evaluación de los efectos citotóxicos del extracto de *T. testudinum* y TB en células de hepatoma HepG2 (Ensayo multiparamétrico). Las células se incubaron con diferentes concentraciones del extracto *T. testudinum* (10-1000 µg/mL) y la TB (1-50 µg/mL) durante 24 h. Concluido este periodo, se incubaron durante 30min con la sondas fluorescentes para determinar: concentración de calcio intracelular (Fluo4 AM), producción de radicales libres (DCF), potencial de membrana mitocondrial (TMRM), contenido de DNA y células apoptóticas (Hoechst 33342) y viabilidad celular (yoduro de propidio). Se presentan los resultados como porcentaje con respecto a las células controles (medio de cultivo) media ± SEM de tres cultivos con tres repeticiones cada uno.

El extracto obtenido de *T. testudinum* (100-1000 µg/mL) induce pérdida de la viabilidad celular, asociado a un incremento de las concentraciones de Ca²⁺ intracelular, de la producción de especies reactivas del oxígeno y daño de la membrana nuclear después de 24 h de exposición en células HepG2. Además en estas condiciones experimentales se demostró que TB no es un compuesto citotóxico.

Evaluación de los efectos del extracto de T. testudinum sobre genes involucrados en el desarrollo y progresión tumoral

Con el objetivo de conocer acerca de los mecanismos involucrados en los efectos antitumorales del extracto de *T. testudinum* se realizaron experimentos que permitieron estudiar sus efectos sobre la expresión de genes que codifican para dianas moleculares implicadas en el desarrollo y progresión tumoral. Para el estudio, a partir de los resultados observados en los ensayos de citotoxicidad se seleccionaron dos líneas celulares (SW480 cáncer de colon y MCF-7, cáncer de mama). A continuación se presentan los principales resultados obtenidos que forman parte de la fase experimental de una tesis de doctorado que se encuentra prevista su discusión en 2016.

Cultivo celular

Las células derivadas de cáncer de colon (SW480) y de cáncer de mama (MCF-7) se adquirieron originalmente a partir de la ATCC y se cultivaron en DMEM suplementado. Las células fueron

mantenidas a 37°C y 5% de CO₂. Después de recuperadas de la tripsina, se sembraron a razón de 1x10⁴ células/pozo y se incubaron toda la noche a 37°C en atmósfera húmeda.

Efectos del extracto de *T. testudinum* sobre la expresión de genes en células de cáncer de colon y mama a través del ensayo de microarreglos de oligonucleótidos

Las células fueron expuestas durante 8 horas a la concentración de 200 µg/mL del extracto de *T. testudinum*. Concluido este periodo, se aisló el ARN total utilizando un kit comercial AllPrep DNA/RNA/Protein (Quiagen, EUA). Seguidamente, se amplificaron 500 ng de ARN total mediante el empleo de un kit de amplificación Illumina Total Prep RNA (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). El ARN amplificado fue procesado hasta su hibridación. Al finalizar este proceso, las láminas fueron lavadas y se cuantificaron las señales en un lector de microarreglos Iscan Illumina. El análisis de los genes expresados se realizó utilizando el paquete de programas "BeadArray" (v2.8.1) (54). Los valores de significación estadística *p* fueron corregidos para múltiples pruebas de hipótesis, y fueron ajustados (*adjpval*), utilizando el método de Benjamín y Hochberg (55).

Además, se emplearon herramientas bioinformáticas implementadas en el programa Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Pathway Knowledge Base (Ingenuity® Systems, CA, EE.UU.) para la identificación de los genes que se expresaron diferencialmente. Según lo que propone Lin y cols., (56) se seleccionaron los genes cuyos valores de expresión variaban en 1,5 veces ($|FC| \geq 1,5$) con respecto al control y presentaron valores de *p* ajustados por el método de Benjamini y Hochberg (*adjpval* < 0,05). Se utilizó la prueba exacta de Fischer para determinar la probabilidad de cada gen de ser modulado significativamente con respecto a las células no tratadas.

Los efectos de *T. testudinum* (200µg/mL) sobre la expresión de los genes fueron estudiados en células SW80, que resultaron ser las más sensibles al extracto en el ensayo de viabilidad celular (Tabla 3). Los resultados obtenidos permitieron identificar más de 1000 genes cuya expresión fue modulada por el extracto en nuestras condiciones experimentación, según los criterios de identificación utilizados.

Seguidamente, para realizó la anotación funcional de los genes mediante el uso del programa IPA, lo que permitió obtener información acerca de los procesos biológicos asociados a los genes que fueron modulados con el tratamiento. El análisis bioinformático de los datos experimentales reveló que el mayor porcentaje de genes modulados está asociado con procesos de movimiento, crecimiento y proliferación celular, entre otros (Figura 15).

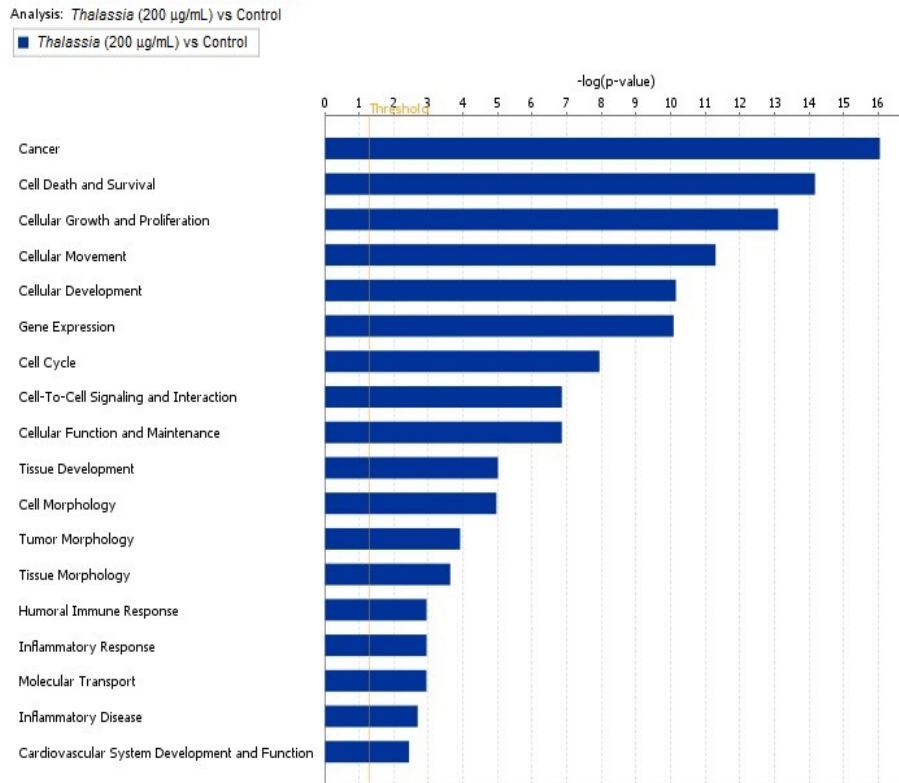
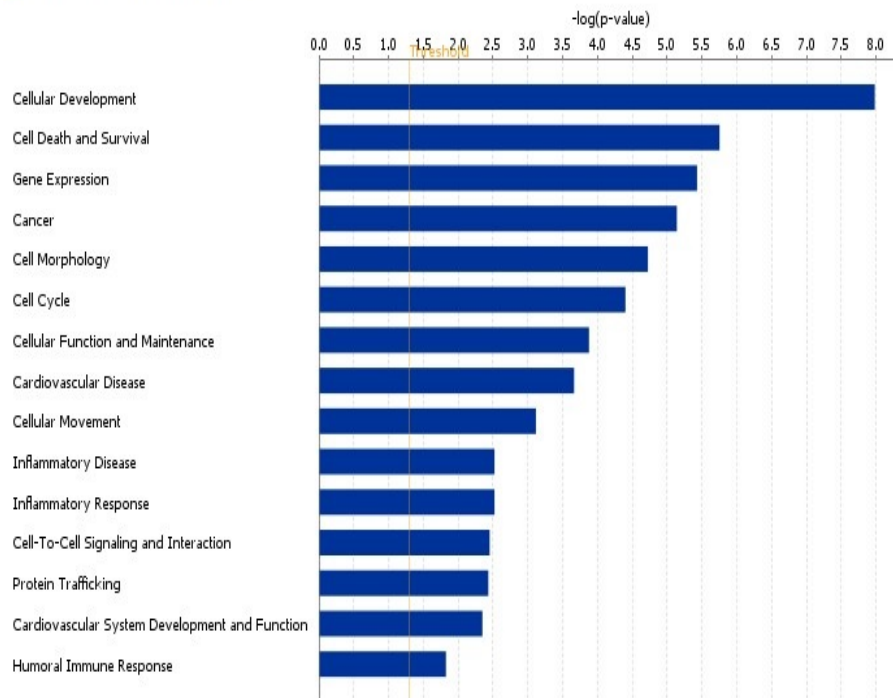


Figura 15. Identificación de genes que se expresaron diferencialmente en células humanas de cáncer de colon SW480 tratadas con el extracto de *T. testudinum*. Las células fueron tratadas durante 8 h con concentraciones de (200µg/mL) del extracto. La clasificación se realizó utilizando el programa IPA. La significación estadística se estimó de acuerdo al método implementado por Benjamini y Hochberg ($adjpval < 0,05$). Los valores de p fueron ajustados para múltiples comparaciones por el método de Bonferroni ($p < 0,05$).

Por otro lado, la Figura 16 muestra el análisis de los datos experimentales que se realizó tras el tratamiento con el extracto de *T. testudinum* en las células tumorales de mama (MCF-7). En este caso, se identificó que el mayor número de genes modulados por el extracto estaban asociados a procesos como: la proliferación (329 genes), la muerte (319 genes) y la supervivencia (262 genes) de la célula.

Analysis: *Thalassia* (200 µg/mL) vs Control

■ *Thalassia* (200 µg/mL) vs Control



© 2000-2015 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 16. Identificación de genes que se expresaron diferencialmente en células humanas de tumor de mama MCF-7 tratadas con el extracto de *T. testudinum*. Las células fueron tratadas durante 8 h con concentraciones de (200µg/mL) del extracto. La clasificación se realizó utilizando el programa IPA. La significación estadística se estimó de acuerdo al método implementado por Benjamini y Hochberg ($\text{adjpval} < 0,05$). Los valores de p fueron ajustados para múltiples comparaciones por el método de Bonferroni ($p < 0,05$).

Estos estudios permitieron sugerir que tanto en las células SW80 de carcinoma de colon como en estas de tumor de mama, el extracto obtenido de *T. testudinum* a concentraciones de 200µg/mL es capaz de modular la expresión de vías y rutas de señalización involucrados en la progresión del cáncer.

El efecto antitumoral *in vitro* del extracto de *T. testudinum* es mediado por la modulación de genes involucrados en procesos de proliferación, muerte y supervivencia celular, así como de apoptosis y angiogénesis.

7. Evaluación del efecto anti-angiogénico del extracto de *T. testudinum*

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros pre-existentes (57). Se trata de un proceso fisiológico natural que se pone en marcha en respuesta a la demanda de nutrientes por parte de los tejidos en desarrollo, tanto en el embrión como en el organismo adulto. Durante la angiogénesis, las células endoteliales, responsables de la formación de los nuevos vasos sanguíneos, responden a señales químicas procedentes de los tejidos en

desarrollo, creando estructuras capilares que responderán a las nuevas necesidades de nutrición y excreción.

En el año 1971, Folkman (58) propuso la hipótesis de que el crecimiento tumoral es dependiente de este proceso. Actualmente se sabe que la angiogénesis juega un papel determinante en la progresión tumoral, la invasión y la metástasis (59). Para que un tumor sólido pueda sobrepasar el tamaño crítico de 1-2 mm y comenzar a expandirse necesita de la formación continua de nuevos vasos que ayuden a mantener el crecimiento tumoral (60).

Las evidencias obtenidas acerca del potencial antitumoral *in vitro* del extracto de *T. testudinum*, sugirieron la evaluación de sus posibles efectos antiangiogénicos. Para ello, fueron realizados dos modelos clásicos de angiogénesis tumoral. Así, nos propusimos determinar *in vitro* el efecto del extracto sobre la migración de células endoteliales humanas. Seguidamente, se evaluaron los efectos *in vivo* sobre el proceso de formación de vasos sanguíneos durante el desarrollo embrionario en el modelo experimental de la membrana corioalantoidea de pollo. Los resultados obtenidos en este trabajo forman parte de la fase experimental de una tesis de doctorado que se encuentra prevista su discusión en 2016.

Evaluación de los efectos anti-angiogénicos in vitro del extracto de T. testudinum. Ensayo de la herida

Cultivo celular

La línea celular endotelial derivada de endotelio vascular transformada EA.hy926, se adquirió originalmente de la ATCC. Las células fueron en medio DMEM, suplementado con glutamina 2 mmol/l, antibiótico y suero bovino fetal al 10%. Después de recuperadas de la tripsina, se sembraron a razón de $4 \cdot 10^5$ cel/pozo por 24 h y se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda.

La migración celular endotelial es un paso necesario de la angiogénesis (61). El modelo *in vitro* del cierre de la herida es un ensayo que permite evaluar la actividad migratoria de las células mediante la realización de una franja (“herida”) a lo largo de una monocapa de células en cultivo. La migración celular es cuantificada mediante el conteo del número de células que colonizan la línea raspada en un período de tiempo determinado.

Las células se cultivaron hasta que alcanzaron la confluencia. Se realizaron líneas verticales en cada pocillo raspando con la punta de una pipeta sobre la monocapa celular. Fueron expuestas a dos concentraciones del extracto (100 y 200 µg/mL). Concluidas las 24 horas de tratamiento, se

fijaron las células en metanol, se realizó una tinción con violeta cristal y se fotografiaron las áreas sobre las que se realizaron las heridas a tiempos cero y 24 h. La superficie libre de células se cuantificó mediante un análisis de imagen y se normalizó con respecto a sus respectivos valores a tiempo cero. El porcentaje de cierre de la herida se calculó midiendo la brecha después de 24 horas de exposición en relación con las cero horas de tratamiento. Para el análisis de imagen se utilizó el programa Image J.

Como se muestra en las Figuras 17 y 18, la migración de las células endoteliales hacia la zona de la herida se incrementó significativamente ($###p < 0,01$) en el grupo tratado con bFGF, control de inducción de angiogénesis respecto al grupo control. La exposición de las células a concentraciones de 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$ del extracto no conllevó a que se observaran cambios significativos de la migración celular respecto al grupo control (cultivo expuesto a medio solo). Mientras, que la evaluación cuantitativa de la migración muestra una reducción significativa a 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$ del extracto en presencia del bFGF ($***p < 0,001$; respecto al grupo bFGF) después de 24 horas de tratamiento (Figura 18), lo que demuestra que el extracto de *T. testudinum* inhibió la migración inducida por el factor recombinante bFGF en células endoteliales humanas (EA.hy926) tras 24 h de exposición, en el ensayo de la herida.

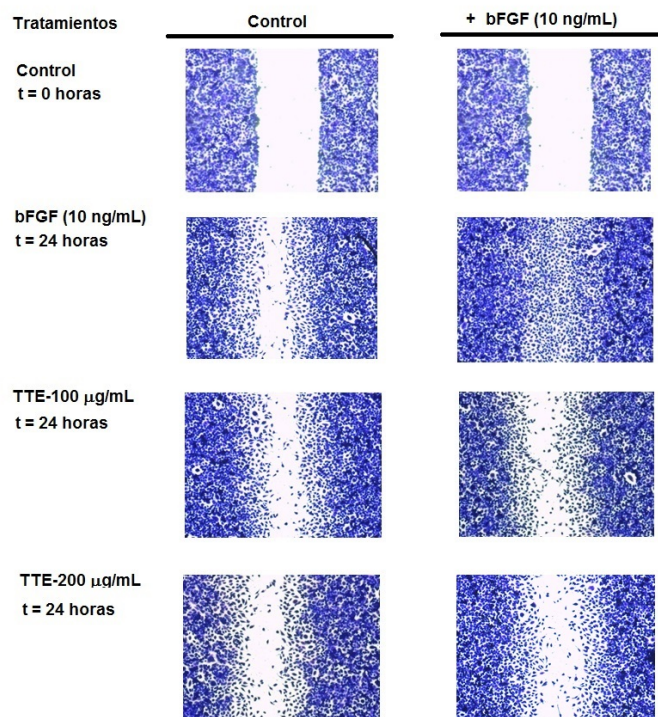


Figura 17. Inhibición de la migración de las células endoteliales humanas EA.hy926 estimuladas con bFGF. Fotografías de los efectos del tratamiento con el extracto de *T. testudinum* (TTE) tras realizar la herida en la monocapa endotelial. Se observa como el extracto provoca un retraso en la migración celular estimulada con bFGF, después de 24 horas de exposición.

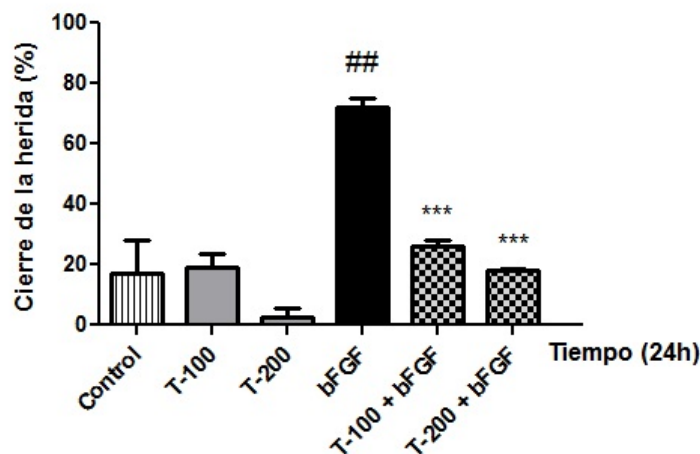


Figura 18. Cuantificación de cierre de la herida. Ensayo de la cicatrización de heridas de células endoteliales humanas EA.hy926 estimuladas con bFGF y tratadas durante 24 horas con el extracto de *T. testudinum* (TTE). El gráfico representa la media \pm la desviación estándar (media \pm DE) del porcentaje de cierre de la herida con respecto a la herida original. Los resultados son representativos de tres experimentos. ## $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ diferencias estadísticamente significativas en relación al grupo control y tratado con bFGF, respectivamente.

Evaluación de los efectos anti-angiogénicos in vivo del extracto de T. testudinum. Ensayo de la membrana corioalantoidea de embriones de pollo (CAM assay)

La membrana corioalantoidea (CAM) del embrión de pollo aparece durante el desarrollo embrionario como consecuencia de la fusión del alantoides con el corion y se acompaña de la formación de vasos sanguíneos. La CAM es de fácil acceso a través de la cáscara del huevo y es un ensayo de gran utilidad para la evaluación de los efectos antiangiogénicos de los compuestos.

Los huevos fertilizados se incubaron durante 3 días a 37°C. El día 4, se pincharon con una jeringa y se extrajeron de 2-2,5 mL de albúmina. De esta forma se consiguió la creación de una falsa cámara de aire en el lateral del huevo. Se localizó la zona de crecimiento de la CAM. Los huevos fueron devueltos a la incubadora hasta el día 10. Seguidamente, se expusieron los huevos a las concentraciones del extracto en discos ubicados sobre la membrana. Como control para la estimulación de la angiogénesis se probaron discos que contenían el factor humano de crecimiento de fibroblastos (bFGF). En cada CAM, se colocaron dos discos, uno que contenía el disco control y otro tratado. Los huevos se incubaron hasta el día 14. Al finalizar, las CAM fueron removidas, los discos se retiraron y se tomaron fotografías de la superficie de la CAM. El índice vascular se midió según Attoub y cols, (62). Se contaron las intersecciones vasculares en una cuadrícula y se cuantificó el índice angiogénico = $(t-c)/c$, donde t representa el número de intersecciones en la zona cubierta por el disco de prueba y c el número de intersecciones en la zona cubierta por el disco control en un mismo huevo.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Graphpad Prism 5. Los valores fueron expresados como las medias \pm desviación estándar (DS). Para comparar las medias de los datos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple. Cuando se obtuvieron diferencias intra-grupos experimentales, se aplicó la prueba de Mann Whitney *a posteriori*. Valores probabilísticos * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ fueron considerados estadísticamente significativos.

En este estudio se utilizó una variante del modelo de CAM, que conlleva la coordinación e integración de respuestas multicelulares durante el desarrollo del embrión de pollo para determinar el efecto del extracto sobre la angiogénesis *in vivo*. Tras 48 h de tratamiento, se observaron las estructuras de los vasos sanguíneos utilizando un microscopio anatómico. Como se muestra en la Figura 19, se observó un patrón vascular normal con ramificaciones en el grupo control, mientras que el tratamiento con el bFGF estimuló la formación de nuevos vasos en más de un 40%, estadísticamente diferente en comparación con el control (medio DMEM libre de suero).

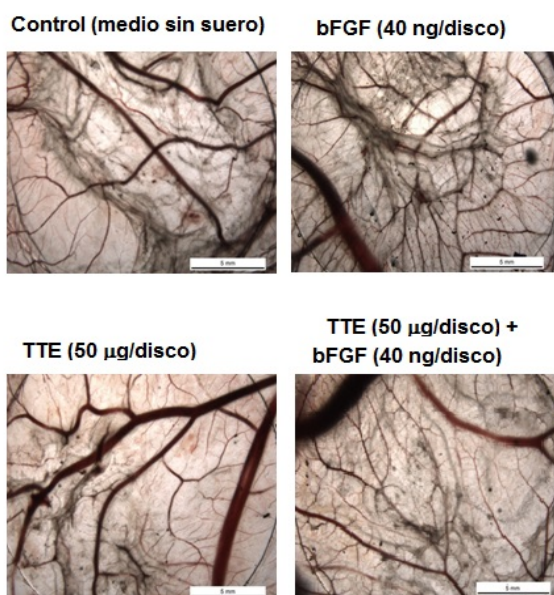


Figura 19. Ensayo *in vivo* del efecto antiangiogénico del extracto de *T. testudinum* sobre la membrana corioalantoidea (CAM). Fotografías de la vascularización de los discos sobre la CAM. Se presenta una muestra representativa de las membranas: tratadas con medio sin suero (control), tratadas con el extracto *T. testudinum* (TTE), con bFGF (inductor angiogénesis) y en presencia de TTE+bFGF.

Por otro lado, en la Figura 20 se observa como el índice de angiogénesis con el tratamiento del extracto (50 $\mu\text{g}/\text{disco}$) fue significativamente disminuido (** $p < 0,01$; ### $p < 0,01$), en comparación con el grupo control y el grupo bFGF los resultados indicaron que el extracto pudo suprimir *in*

vivo tanto la angiogénesis basal de la CAM como la formación de nuevos vasos sanguíneos inducidos por bFGF. Estos resultados constituyen las primeras evidencias experimentales acerca del potencial anti-angiogénico del extracto de *T. testudinum*.

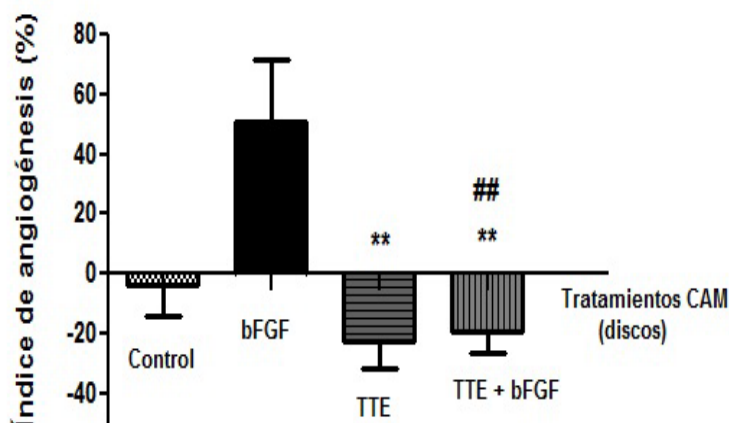


Figura 20. Índices de angiogénesis de la CAM de huevos de pollo. El gráfico representa la media \pm la desviación estándar (media \pm de) de los porcentajes del índice angiogénico ante la exposición de la CAM a diferentes condiciones experimentales (control, tratados con TTE, bFGF y TTE+bFGF) durante 48h. El test de Mann-Whitney fue empleado para el análisis estadístico, ** $p < 0,01$, ## $p < 0,01$ diferencias estadísticamente significativas respecto al índice de angiogénesis del grupo control (discos tratados con medio libre de suero) y al grupo estimulado con bFGF (inductor angiogénesis), respectivamente. En cada experimento 10 huevos fueron evaluados para cada condición.

Los resultados mostraron que el extracto de *T. testudinum* (100 y 200 $\mu\text{g/mL}$) inhibió *in vitro* la migración de células endoteliales humanas estimuladas con bFGF. Así mismo el extracto de *T. testudinum* (50 $\mu\text{g/disco}$) inhibió *in vivo* tanto la angiogénesis basal de la membrana corioalantoidea del huevo, así como la formación de nuevos vasos sanguíneos inducidos por bFGF.

8. Evaluación del potencial antitumoral del extracto de *T. testudinum*, la fracción enriquecida en polifenoles obtenida del extracto y de TB en un modelo de tumor primario de carcinoma de colon CT26.WT en ratones

Los resultados obtenidos hasta el presente sugieren que el extracto de *T. testudinum* presenta actividad antitumoral. Sin embargo, a pesar de las evidencias obtenidas en los estudios *in vitro* resultaba imprescindible corroborar dichos efectos en un modelo *in vivo* que permitiera evaluar el efecto del extracto en el organismo como un todo. Se evaluaron los efectos antitumorales del extracto en un modelo murino de tumor primario de carcinoma de colon. Por otro lado, sabido las propiedades antitumorales y anticancerígenas que se le atribuyen a varios polifenoles naturales, en este caso se decidió también evaluar los efectos de una fracción rica en polifenoles extraída del extracto de *T. testudinum* y de la TB, como posibles responsables de dicho efecto. Con este propósito se procedió a desarrollar un método de aislamiento y obtención de dicha fracción que quedó establecido en el Departamento de Química de CEBIMAR.

Así, con el objetivo de evaluar el potencial antitumoral *in vivo* de estos productos se evaluaron los efectos en un modelo experimental de inducción de tumor primario mediante la administración subcutánea de células tumorales de carcinoma de colon (CT26) a ratones. A continuación se presentan los principales resultados obtenidos, este trabajo formó parte de la fase experimental de una tesis de doctorado que se encuentra prevista su discusión en 2016. Este estudio que se desarrolló en colaboración con instituciones nacionales y extranjeras, permitió la introducción y estandarización de nuevas metodologías de trabajo en las instalaciones de CEBIMAR, tanto desde el punto de vista químico como farmacológico.

Cultivo celular

La línea celular murina derivada de cáncer de colon (CT26.WT) se adquirió originalmente a partir de la ATCC. Las células se cultivaron en DMEM-F12 suplementado con suero fetal bovino al 10%, glutamina 2% y penicilina/estreptomicina al 1%. Las células fueron mantenidas a 37°C y 5% de CO₂.

Animales de experimentación

Se utilizaron ratones Balb/c machos, (18-20g), provenientes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), Cuba. Los animales se adaptaron durante 7 días a las condiciones de experimentación y permanecieron bajo condiciones controladas de: temperatura (21-24°C), humedad (60-65 %), ciclo alternativo luz/oscuridad de 12 horas, así como alimentación y agua *ad libitum*.

1ra serie experimental. El día 0 del experimento se realizó la inoculación de las células tumorales (10^5 células) por vía subcutánea en el flanco derecho de los animales. Después de 10 días y antes del debut tumoral, los animales se aleatorizaron y se distribuyeron a razón de 10 animales/grupo. Seguidamente, fueron administrados con los productos acorde al siguiente diseño experimental:

- Grupo 1: Control negativo del experimento. Administración oral del vehículo (agua destilada).
- Grupo 2: T-50 mg/kg. Administración oral del extracto de *T. testudinum* 50 mg/kg.
- Grupo 3: T-100 mg/kg. Administración oral del extracto de *T. testudinum* 100 mg/kg.
- Grupo 4: T-100 mg/kg + Cisplatino 2,5 mg/kg.
- Grupo 5: T-100 mg/kg + Cisplatino 5 mg/kg.
- Grupo 6: Cisplatino 5 mg/kg. Administración intraperitoneal.

Los grupos experimentales que recibieron el tratamiento por vía oral se administraron con una frecuencia diaria durante 14 días consecutivos. Mientras, que la administración intraperitoneal del cisplatino se realizó con una frecuencia semanal (días 12, 18 y 24). El comienzo de la medición del tamaño tumoral se realizó partir del día 14. Los tumores se midieron con un pie de rey, tres veces por semana y el volumen tumoral se estimó utilizando la fórmula: Volumen= (ancho (mm))² x largo (mm)/2. El día 28 se sacrificaron los animales por dislocación cervical para la evaluación del tumor primario. Se determinó el peso del tumor de cada uno de los animales. Posteriormente, los tumores fueron procesados para su correspondiente análisis inmunohistoquímico e histopatológico.

2da serie experimental: con el objetivo de evaluar el efecto de la fracción rica en polifenoles obtenida del extracto, y de la TB, se procedió con el siguiente diseño experimental:

- Grupo 1: Control negativo del experimento. Administración oral de agua destilada.
- Grupo 2: TB-5. Administración oral de TB 5 mg/kg.
- Grupo 3: FT-5. Administración oral de la fracción rica en polifenoles 5 mg/kg.
- Grupo 3: FT-25. Administración oral de la fracción rica en polifenoles 25 mg/kg.
- Grupo 5: T-10. Administración oral del extracto de *T. testudinum* 10 mg/kg.
- Grupo 6: T-50. Administración oral del extracto de *T. testudinum* 50 mg/kg.

- Grupo 7: T-100. Administración oral del extracto de *T. testudinum* 100 mg/kg.
 - Grupo 8: Cisplatino 5 mg/kg (Cp- 5). Administración intraperitoneal (tres dosis, cada 5 días)
- Evaluación de los efectos sobre la expresión diferencial de genes mediante el estudio de microarreglos de oligonucleótidos

En la primera serie experimental, se extrajeron los tumores de cada animal y una porción de la masa tumoral se tomó para aislar el ARN, mediante el empleo de un kit estándar de extracción de ARN (Quiagen, EUA). A continuación, se amplificaron 500 ng de ARN total utilizando el kit de amplificación de ARN Illumina TotalPrep (Life Technologies, USA). El ARN fue procesado hasta su hibridación. Concluido esta etapa, las láminas fueron lavadas y se cuantificó cada señal obtenida en un lector de microarreglos Iscan Illumina. El análisis de cada muestra se realizó utilizando el paquete "BeadArray" (v2.8.1) (54). La identificación de los genes modulados en cada muestra analizada se realizó utilizando herramientas bioinformáticas implementadas en el programa IPA (56). Los valores de significación estadística p fueron corregidos para múltiples pruebas de hipótesis, los p obtenidos para cada uno de los genes fueron ajustados utilizando el método de Benjamín y Hochberg, (55).

Estudio inmuno-histoquímico

Se tomaron muestras de los tumores, se diseccionaron en fragmentos pequeños y se colocaron en formol al 4%, durante 24 horas. Luego, los fragmentos se incluyeron en bloques de parafina, y se cortaron en un micrótopo. Las láminas preparadas fueron marcadas con el anticuerpo CDC47, medida de la proliferación celular. Se cuantificó en cada lámina, el número de células marcadas positivamente, en un total de 500 células/lámina.

Determinación de marcadores de estrés oxidativo

Durante el sacrificio, fueron extraídas muestras de sangre de cada animal y se aisló el suero. En el suero de los animales se determinó la concentración de malondialdehído (MDA), como medida de la peroxidación lipídica. Además, fueron medidos los productos avanzados de la oxidación de las proteínas (PAOP) según describe Descamps-Latscha y col. (63).

Evaluación de la Sobrevida

Como parte del estudio se cuantificó el tiempo de vida de cada animal. Para ello, se tomó como criterio de muerte de los animales, el hecho de que apareciera un punto de necrosis en la zona de la piel donde sobresalía la masa tumoral o el hecho de que el volumen tumoral en el animal fuese superior a 2000 mm³.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPadPrism, versión 5. En la determinación de la normalidad de los datos se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. La variable volumen tumoral, se analizó mediante la prueba ANOVA de dos vías y la prueba de Bonferroni *a posteriori*. Las variables de peso del tumor y los marcadores de daño oxidativo fueron analizados mediante el t-Test y la prueba Mann Whitney *a posteriori*, respectivamente. El análisis inmunohistoquímico se realizó mediante el empleo de la Prueba de Fischer. En todos los casos se tomó como criterio de significación estadística $p \leq 0,05$.

La administración oral del extracto de *T. testudinum* a dosis de 50 y 100 mg/kg produjo un retardo significativo del crecimiento tumoral en los animales tratados respecto a los controles (Figura 21). Los animales administrados con el cisplatino (5 mg/kg, vía i.p), compuesto empleado como control positivo del experimento, mostraron los efectos antitumorales esperados.

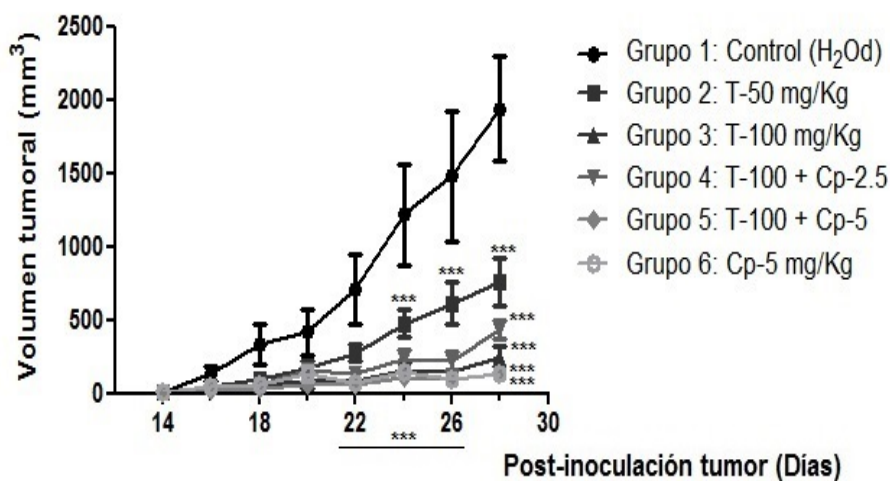


Figura 21. Efecto antitumoral del extracto hidroetanólico de *Thalassia testudinum* administrado por vía oral a ratones (Modelo singénico de cáncer CT26/Balb/c). Se muestran los valores medios \pm DE del crecimiento tumoral de los animales. T: extracto de *T. testudinum*, Cp: cisplatino. A partir del día 22 post-inoculación de las células tumorales se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control, (ANOVA de dos vías, y prueba Bonferroni *a posteriori* ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

El día 28 después de la inoculación del tumor, los animales fueron sacrificados. En correspondencia con la disminución del volumen tumoral, como se aprecia en la Figura 22 el peso de los tumores de los animales tratados disminuyó significativamente respecto al grupo control.

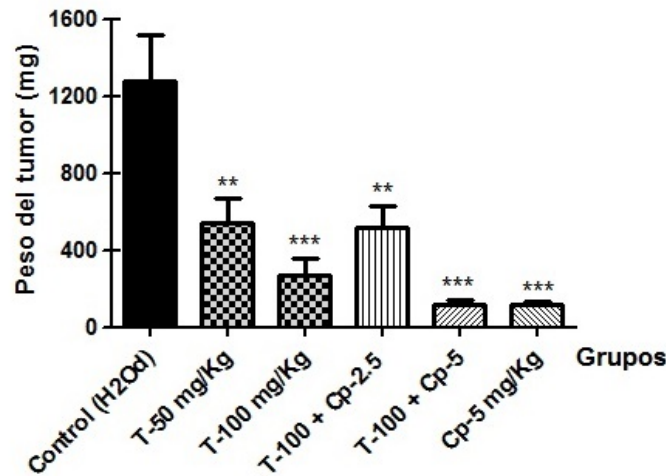


Figura 22. Peso de los tumores en los distintos grupos de tratamiento, posterior a la inoculación de la carga tumoral con el carcinoma de colon CT26.WT. El gráfico muestra el peso de los tumores (media \pm DE) de los animales tratados acorde al diseño experimental (T: extracto de *T. testudinum*, Cp: cisplatino). Se sacrificaron los animales y se extrajeron los tumores, día 28 del experimento. Se observaron diferencias estadísticamente significativas según ANOVA de una vía y la prueba Dunnett's *a posteriori*, con respecto al grupo control (** $p < 0,01$, *** $< 0,001$).

Con el propósito de conocer acerca de las dianas moleculares y los procesos biológicos modulados tras la exposición al extracto de *T. testudinum*, se tomaron muestras de la masa tumoral de los animales tratados con la dosis de 100 mg/kg y se comparó su patrón de expresión génica con respecto a la expresión observada en los animales controles (Figura 23). El análisis de los datos reveló que el mayor número de genes que en estas condiciones experimentales son modulados por el extracto se encuentran asociados a procesos relacionados con el movimiento, el crecimiento y la proliferación celular. Evidencias experimentales que se corresponden con lo observado en el estudio *in vitro*. Sin embargo, en este caso, es de destacar que también, son sustancialmente modulados genes asociados a la respuesta inflamatoria y al estrés oxidativo, lo que está en correspondencia a su vez con las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias previamente descritas para el extracto.

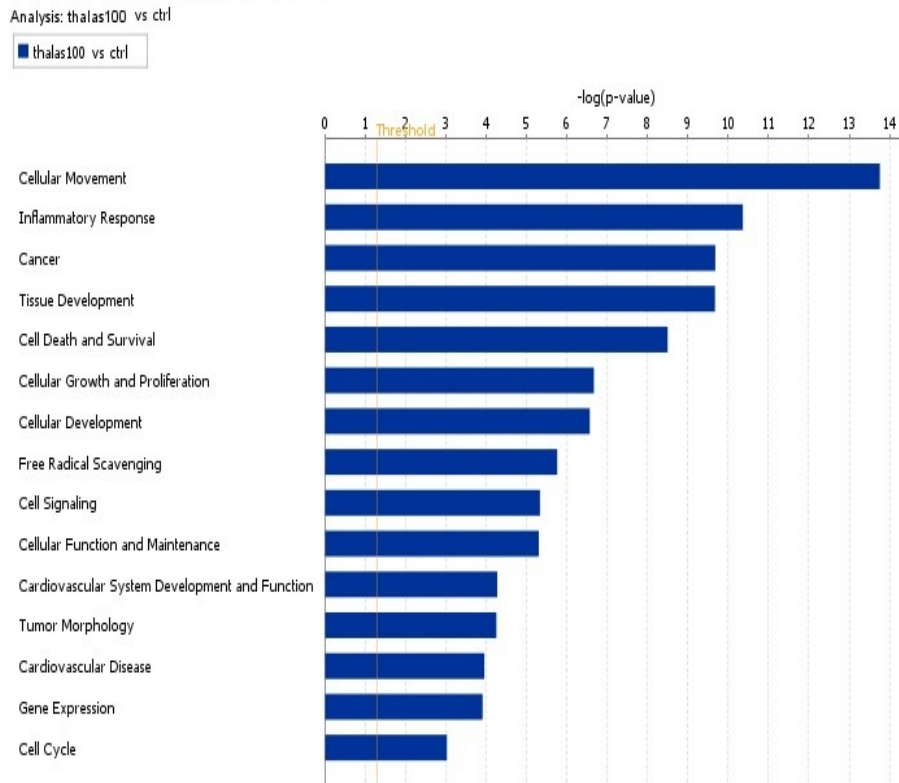


Figura 23. Efectos del extracto de *T. testudinum* sobre la expresión génica en el modelo de tumor primario de carcinoma de colon CT26WT. La gráfica muestra los procesos a nivel celular que muestran un patrón de expresión a nivel génico diferente en los animales tratados (100 mg/kg) con respecto a los controles. La clasificación se realizó mediante la utilización del programa IPA. La clasificación se realizó de acuerdo al método propuesto por Benjamini y Hochberg ($\text{adjpval} < 0,05$).

Para corroborar la predicción de la inhibición de la expresión de genes involucrados en la proliferación celular, se evaluó mediante tinción inmuno-histoquímica el marcaje del anticuerpo CDC47 (colorea positivamente a las células que se encuentran en las fase G1y S del ciclo celular). En la Figura 24A se muestran fotografías representativas de la inhibición de la proliferación celular en el modelo de tumor primario, inducido por CT26.WT; tanto del grupo tratado con el extracto (100 mg/kg), como del grupo control positivo (cisplatino 5 mg/kg), a través del marcaje de CDC47. Mientras que la gráfica (Figura 24B) se observa como esta inhibición de la proliferación es disminuida significativamente con respecto al control, en todos los grupos de tratamientos evaluados en la primera serie experimental.

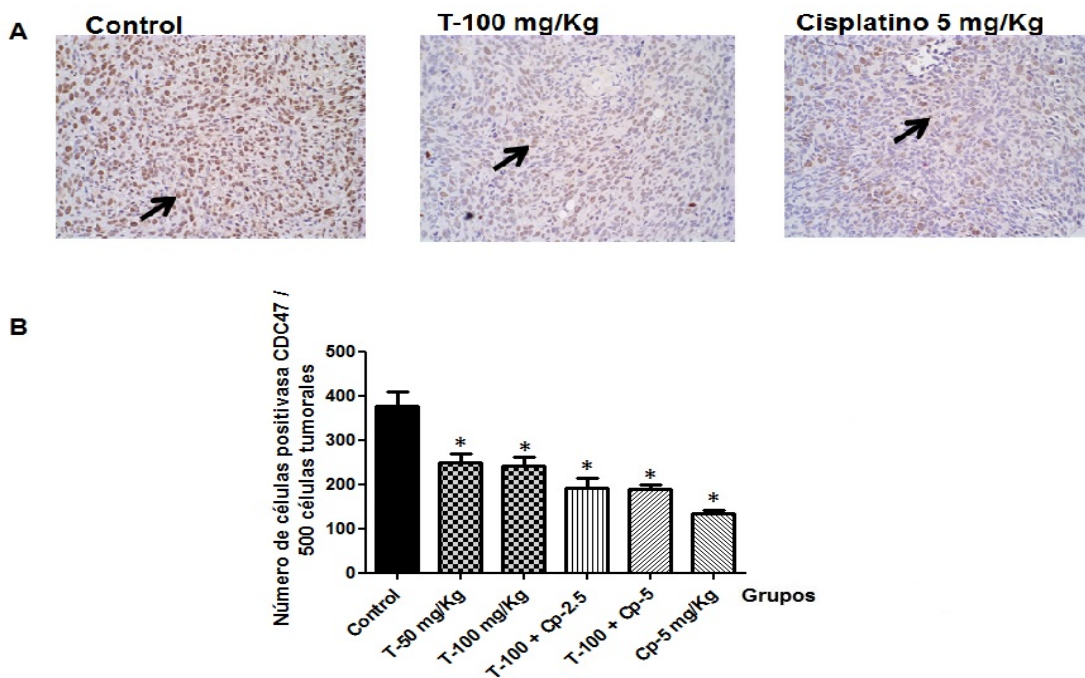


Figura 24. Efecto antiproliferativo; en un modelo singénico de cáncer CT26/Balb/c. A) Micrografías representativas de secciones transversales tumorales. Las flechas indican las células en proliferación celular (Fase G1 y S del ciclo celular). 100x. B) Conteo morfométrico del número de células positivas a CDC47, por cada 500 células tumorales. Los datos representan la media \pm DS (* $p < 0,05$, t-test) diferencias significativa entre los valores del control y los grupos tratados.

En una segunda serie experimental, se determinó cómo podrían estar contribuyendo los metabolitos secundarios presentes en el extracto en su efecto antitumoral en este modelo experimental. Como se muestra en la Figura 25, el tratamiento por vía oral con el componente mayoritario (TB, dosis de 5 mg/kg) y la fracción rica en polifenoles (FT, dosis de 5 y 25 mg/kg), ejercen una inhibición significativa del volumen tumoral. La dosis de TB fue seleccionada, teniendo en cuenta que este compuesto se encuentra en el extracto en una proporción alrededor del 5%, y que 100 mg/kg es una dosis del extracto efectiva en este modelo. El cisplatino, control positivo del ensayo produjo los efectos esperados.

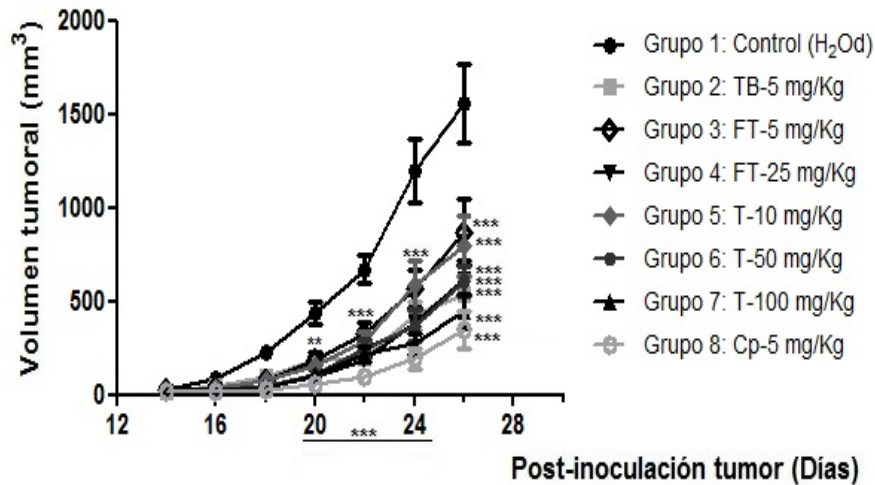


Figura 25. Efecto antitumoral del extracto hidroetanólico de *T. testudinum*, su fracción polifenólica y componente mayoritario; administrado por vía oral en el modelo singénico de cáncer CT26/Balb/c. El gráfico muestra las curvas de crecimiento tumoral (media \pm DE) de los animales tratados acorde al diseño experimental (TB: Thalassiolina B, FT: Fracción polifenólica del extracto, T: extracto de *T. testudinum*, Cp: cisplatino). A partir del día 20 post-inoculación de las células tumorales se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto al volumen tumoral del grupo control, según ANOVA de dos vías (** $p < 0,01$, *** $< 0,001$) y la prueba Bonferroni *a posteriori*, con respecto al grupo control. Cada punto representa 10 tumores para todos los grupos experimentales. El experimento fue repetido dos veces con resultados similares.

En la Figura 26, se pueden observar las fotografías representativas de la masa tumoral de cada uno de los grupos experimentales.

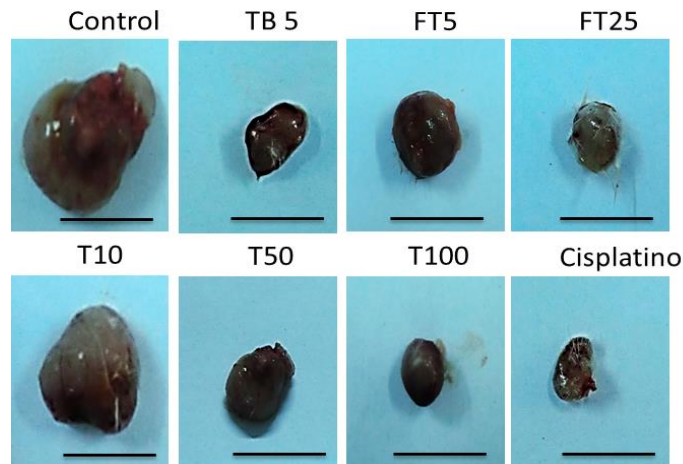


Figura 26. Fotografías de los tumores en el modelo singénico de cáncer CT26/Balb/c. El gráfico muestra fotografías representativas de los tumores a los 26 días posterior a la inoculación de las células CT26.WT. El tratamiento de los diferentes grupos se realizó acorde al diseño experimental (TB: Thalassiolina B, FT: Fracción polifenólica del extracto, T: extracto de *T. testudinum*, Cp: cisplatino).

Con el objetivo de evaluar si los efectos antioxidantes del extracto de *T. testudinum* podrían estar involucrados el efecto antitumoral observado, en este experimento se midieron marcadores de daño oxidativo a lípidos (MDA) y a proteínas (PAOP) en el suero de los animales de los diferentes grupos experimentales.

Como se observa en la Figura 27, el extracto de *T. testudinum* reduce tanto los niveles de peroxidación lipídica y daño a proteínas a la dosis de 100 mg/kg, resultado este que se corresponde con los blancos moleculares y funciones biológicas que se predijeron en el estudio de microarreglos realizado. En este caso, la dosis de 50 mg/kg del extracto produjo también una significativa inhibición del daño inducido a las proteínas en este modelo. En los grupos tratados con la fracción polifenólica y la TB también se observó que los valores de MDA (**p<0,01) y de PAOP (**p<0,01) son reducidos significativamente con respecto al grupo control de inducción del tumor primario, animales en los que se observó un mayor ambiente oxidativo a nivel sistémico con respecto a los tratados con los productos.

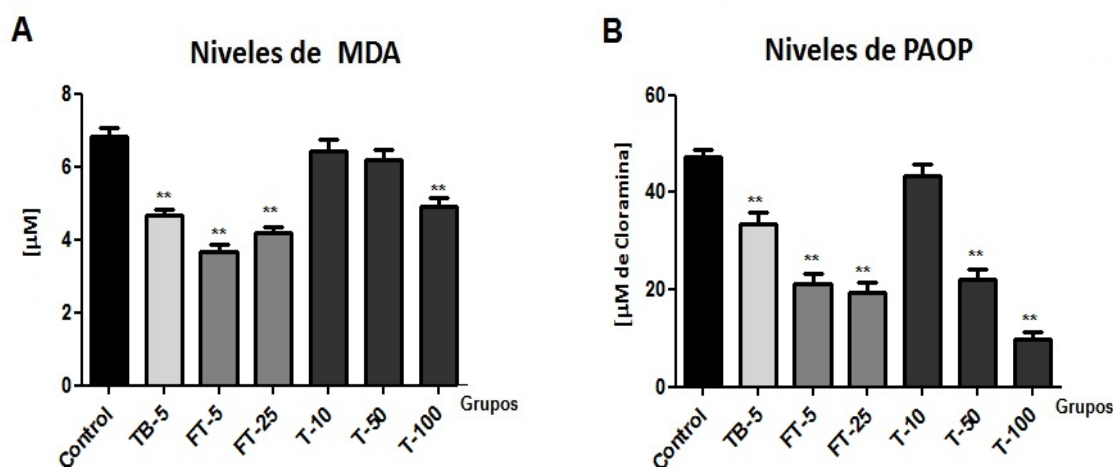


Figura 27. Efecto antioxidante del tratamiento por vía oral del extracto de *T. testudinum*, la fracción polifenólica y TB en un modelo singénico de cáncer CT26/Balb/c. A) Los niveles de peroxidación de los lípidos se midieron por la concentración de malondialdehído (MDA). B) Los niveles de oxidación de las proteínas se midieron por la concentración de los productos avanzados de la oxidación de las proteínas (PAOP). La concentración PAOP se expresó como μM de cloramina. En las gráficas se muestran los valores promedios (Medias \pm SD) obtenidos de cada grupo experimental (10 ratones/grupo). La comparación entre los grupos se realizó mediante una prueba t-test (p<0,001***).

La supervivencia de todos los animales en el estudio se siguió durante 52 días después de la inoculación de las células de adenocarcinoma de colon CT26.WT. En la Figura 28 es posible apreciar que los tratamientos con la TB (TB-5 mg/kg), la fracción rica en polifenoles (FT-25 mg/kg) y el extracto de *T. testudinum*, (T-50 y T-100 mg/kg) fueron capaces de incrementar significativamente los días de supervivencia de los animales en los que se indujo un tumor primario (*p<0,05 y **p<0,01; Long-Rank). El cisplatino se empleó como control positivo del experimento.

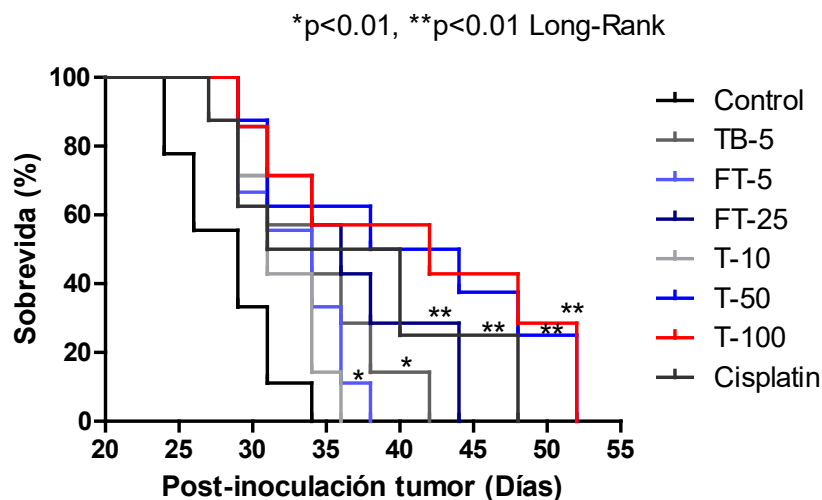


Figura 28. Porcentajes de supervivencia de ratones Balb/c inoculados con células tumorales de colon CT26.WT. El gráfico representa el porcentaje de supervivencia hasta 52 días después de la inoculación del tumor primario (n=12). Los animales después de 12 días de la inyección subcutánea de las células CT26.WT ($1 \cdot 10^5$ células/200 μ L) fueron tratados por vía oral durante 14 días con TB: Thalassiolina B, FT: Fracción polifenólica del extracto, T: extracto de *T. testudinum*, y por vía i.p con Cisplatino-5 mg/kg (tres dosis cada 6 días). Los datos fueron analizados estadísticamente por Kaplan-Meier, log-rank test, (*p<0,05 y **p<0,01).

El efecto antitumoral del extracto de *T. testudinum* está mediado por la inhibición de la proliferación celular, así como la modulación de la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo generado en los animales en el modelo de tumor primario inducido por células de carcinoma de colon CT26.WT.

9. Efectos del extracto de *U. fasciata* sobre la genotoxicidad inducida por el benzo(a)pireno *in vitro* e *in vivo*

En este acápite, se describen los principales resultados acerca de la evaluación de los efectos protectores del extracto de *U. fasciata* frente al daño genotóxico inducido por el BP en ratones, trabajo aceptado para su publicación en la revista *Evidencie Complementary and Alternative Medicine* (2015) para detalles ver anexos.

El estudio comprendió no solo la evaluación genoprotectora y quimiopreventiva del extracto, además, se profundizó en la caracterización fitoquímica de esta especie, se identificaron metabolitos presentes en el extracto que pudieran ser responsables de los efectos observados.

Determinación cualitativa de metabolitos presentes en el extracto de U. fasciata

Para identificar cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios presentes en el extracto de *U. fasciata* se realizó un tamizaje fitoquímico según el método propuesto por Miranda y Cuéllar (64). Fueron determinados el contenido de sólidos, azúcares, proteínas y polifenoles totales.

Además, se utilizó la Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas metodología que permitió ampliar la caracterización fitoquímica de la especie. En este caso, se pesaron 100 mg del extracto total seco y fue disuelto en una mezcla de diclorometano-agua (1:1). Se filtró la mezcla y fue separada la fracción orgánica por partición y concentrada. La fracción apolar obtenida fue inyectada en un cromatógrafo gaseoso con detector de espectrometría de masas y los cromatogramas correspondientes fueron obtenidos.

En la Tabla 1 se muestran los resultados del tamizaje fitoquímico realizado a los extractos obtenidos por elución con solventes de diferentes polaridades de la especie *U. fasciata*. El estudio demostró que la mayoría de los metabolitos presentes en la especie son de naturaleza polar (extractos etanólico y acuoso)

Tabla 4. Tamizaje fitoquímico de la especie *U. fasciata*.

Metabolitos	Tipo de extracto		
	Etéreo	Etanol	Agua
Aceites esenciales	-	NR	NR
Lactonas/Coumarinas	+	+	NR
Alcaloides	++	++	+
Triterpenos/esteroides	+	-	NR
Catequinas	NR	-	NR
Azúcares Reductores	NR	++	++
Saponinas (Espuma)	NR	+	+
Fenoles/taninos	NR	+	+
Aminoácidos	NR	++	+
Flavonoides	NR	+	+
Antocianinas	NR	-	NR
Mucílagos	NR	NR	+

Leyenda: (NR) no se realiza, (+) presencia, (++) abundancia

*Caracterización química del extracto hidroalcohólico de *U. fasciata**

La Tabla 5 muestra el resultado de las determinaciones de sólidos totales, carbohidratos y proteínas solubles, así como el contenido de polifenoles totales en el extracto hidroalcohólico obtenido de *U. fasciata*.

Tabla 5. Metabolitos presentes en el extracto hidroalcohólico de *U. fasciata*.

Parámetro	Resultado
Sólidos Totales (mg/mL extracto)	5,57±0,21
Proteínas Solubles (mg/g extracto seco)	1,04±0,02
Azúcares Totales (mg/g extracto seco)	326±1,38
Polifenoles (mg/g extracto seco)	5,91±0,33

Como puede ser observado, la especie posee mayoritariamente metabolitos del tipo alcaloides y azúcares reductores. En menor medida, presenta saponinas, fenoles/taninos y flavonoides, lo que se corresponde con los resultados del tamizaje fitoquímico (Tabla 4). Los azúcares totales se encuentran en mayor proporción dentro del extracto en comparación con los polifenoles y proteínas (Tabla 5). Es importante señalar que las algas marinas constituyen un recurso renovable de mucha importancia, ya que producen polisacáridos solubles extraíbles con soluciones acuosas, además, existen polisacáridos sulfatados que forman la pared celular en las algas verdes (65). *U. fasciata* posee cantidades considerables de estos componentes, y su contenido que varía de acuerdo a la zona de crecimiento y a la época del año (66).

Por otro lado, el análisis por cromatografía gaseosa de una fracción clorofórmica obtenida del extracto mostró que en el cromatograma obtenido aparecen ocho señales entre los 6-10 min de tiempo de retención, de los cuales fueron identificados siete compuestos (Figura 29). La mayoría de los picos se corresponden con ácidos grasos y sus derivados, aproximadamente a los 8 minutos aparece una señal intensa correspondiente al ácido palmítico que resultó ser el compuesto mayoritario detectado en esta fracción.

Se ha referido en la literatura la presencia de estos compuestos en otras especies de *Ulva* colectadas en la India, donde se aisló e identificó la presencia del N-palmitoil-2- amino-1,3,4,5-tetrahidroxi-octadecano (67). Por otro lado, otro trabajo refiere la presencia de ácidos grasos en *U. pertusa* (68), que describe el aislamiento del 2-hidroxi-hexadecanoico (25), y del ácido 2-oxo-hexadecanoico (26) en esta especie.

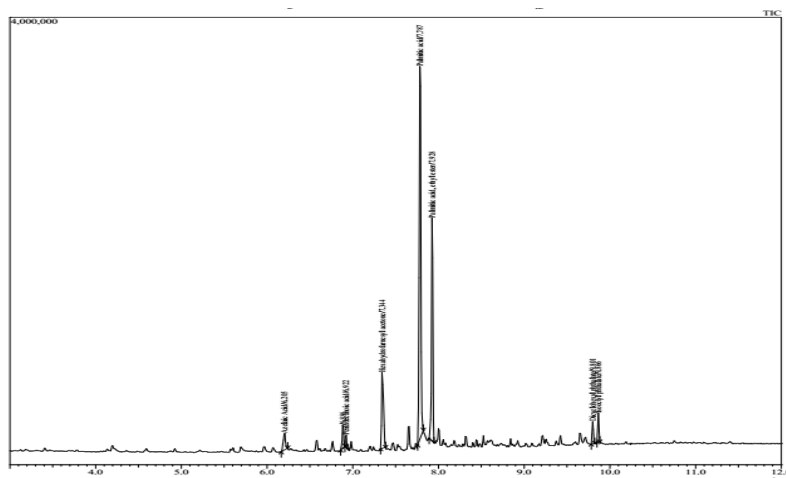


Figura 29. Cromatograma gaseoso obtenido de la fracción de diclorometano del extracto de *U. fasciata*.

El tamizaje fitoquímico del extracto de *U. fasciata* permitió identificar el alto contenido de polisacáridos presentes en esta especie marina. Mientras que el análisis de cromatografía gaseosa evidenció la presencia de ácidos grasos en una fracción clorofórmica obtenida del extracto de *U. fasciata*, donde el ácido palmítico fue identificado como el componente mayoritario.

Teniendo en cuenta:

- la naturaleza de los componentes identificados en *U. fasciata*,
 - los efectos inhibitorios de *U. fasciata* sobre la mutagenicidad inducida por el benzo(a)pireno en la cepa TA98 de la bacteria *S. typhimurium*, así como,
 - la inhibición que ejerce este extracto sobre la actividad del CYP1A1 en microsomas de ratas, citocromo responsable de la bioactivación del benzo(a)pireno en humanos,
- se estudiaron los efectos del extracto de *U. fasciata* en modelos *in vitro* e *in vivo* de protección al daño al ADN inducido por este carcinógeno.

El BP es un compuesto mutagénico que ha sido reconocido carcinógeno ambiental en el hombre. Este agente químico es comúnmente encontrado en el humo del tabaco, en los residuos de las industrias, en las carnes cocidas a la brasa, entre otras. El BP requiere para su bioactivación a mutágeno y carcinógeno de ser metabolizado en el organismo. Ha sido referido que este proceso tiene lugar por la acción, entre otras enzimas, del CYP1A1 (Figura 30). En este sentido, ha sido planteado que aquellos compuestos capaces de inhibir la actividad de estos sistemas pudieran actuar como anticarcinógenos y quimiopreventivos. Por lo que a partir de las evidencias experimentales con respecto a los efectos de *U. fasciata* se estudiaron los efectos de esta especie sobre la toxicidad inducida por el BP. Primeramente, se estudiaron los efectos empleando como modelo experimental células epiteliales de hígado de rata y posteriormente, en dos modelos *in vivo* de daño genotóxico y de carcinogénesis química en ratones.

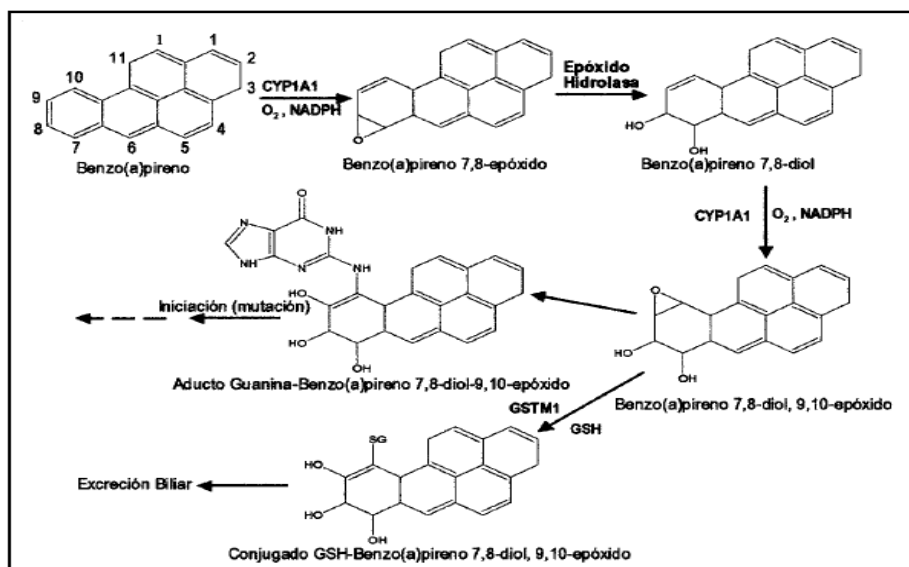


Figura 30. Metabolismo intermediario del benzo(a)pireno.

Evaluación del efecto protector in vitro del extracto de U. fasciata frente al daño al ADN inducido por BP

Cultivo celular

En el estudio se emplearon células C9, esta es una línea celular obtenida de epitelio de hígado de ratas. Las células se cultivaron en DMEM con glutamato y suplementado con penicilina (50 U/mL), estreptomycin (50 µg/mL), y 10% (v/v) de suero bovino fetal a 37°C en presencia de CO₂ al 5%. Las células se sub-cultivaron mediante tripsinización cada tres o cuatro días.

Diseño experimental

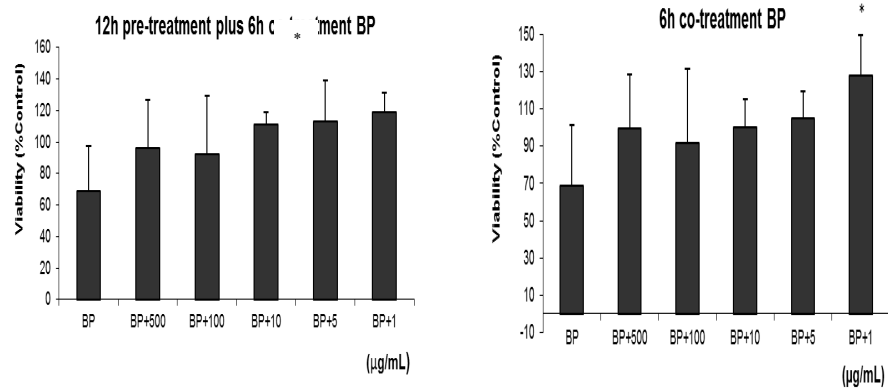
Las células se sembraron a una densidad de 8 000-10 000 células/pozo y se incubaron en presencia o no del extracto de *U. fasciata* y del BP como se describe a continuación.

1ra serie experimental: Las células fueron expuestas por 12 h a diferentes concentraciones del extracto (10-1000 µg/mL). Seguidamente fueron tratadas por 6-h más a BP solo, o a ambos productos a la vez durante este tiempo de exposición. *2da serie experimental:* las células fueron expuestas por 12 h a diferentes concentraciones del extracto (10-1000 µg/mL); lavadas y expuestas a ambos productos o a BP solo por 24-h. En otro caso, además, fueron expuestas a ambos productos por 24 h. *3ra serie experimental:* las células fueron tratadas en similares condiciones a la 2da serie experimental, pero en este caso el periodo de incubación fue de 48-h. Concentración de BP empleada fue 10 µM. Al finalizar los tratamientos se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Este ensayo fue realizado según Mosmann (47).

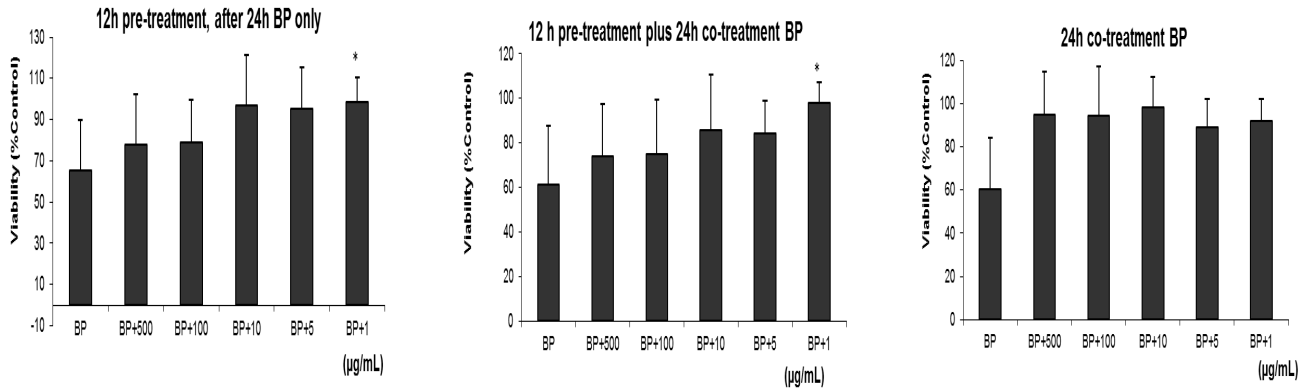
En la Figura 31 se muestran los efectos del extracto de *U. fasciata* en la citotoxicidad inducida por el BP en células C9, epitelio de hígado de ratas. El estudio demostró que aunque de manera general las diferentes concentraciones evaluadas protegieron del daño citotóxico inducido por el BP, la concentración más baja evaluada (1 µg/mL) resultó ser la más efectiva, a este nivel fue abolida en un 100% la toxicidad inducida por este compuesto en el cultivo celular. Todos los tiempos de exposición al extracto (6, 12, 24 y 48 h) tanto en pre-, co- y post-tratamientos protegieron del daño, aunque los efectos más sostenidos fueron encontrados tras 48 h de exposición. Estos resultados se correspondieron con los efectos antimutagénicos observados frente a la mutagénesis inducida por este agente en la cepa TA98 de la bacteria *S. typhimurium* (Ensayo de Ames, Tabla 1). A su vez pudiera estar asociado a los efectos antioxidantes descritos anteriormente para este extracto y con los efectos inhibitorios observados por nosotros sobre la

actividad del CYP1A en microsomas de ratas (Figura 2), enzima responsable de la bioactivación del BP a nivel hepático.

A)



B)



C)

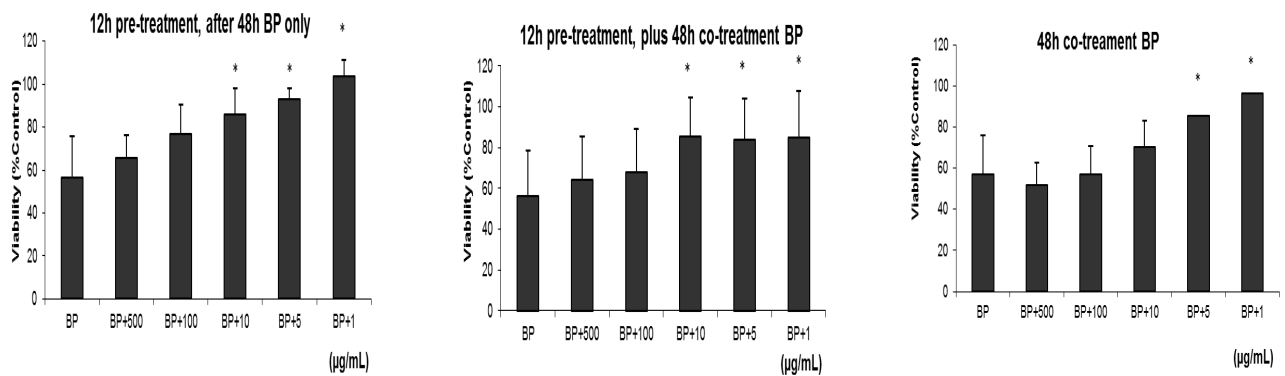


Figura 31. Efectos del extracto de *U. fasciata* frente al daño inducido por el benzo(a)pireno en células C9 (Ensayo del MTT). A): células expuestas por 12 h a diferentes concentraciones del extracto y seguidamente por 6-h más a BP solo, o a ambos productos. B): células expuestas por 12 h a diferentes concentraciones del extracto; lavadas y expuestas a ambos productos o a BP solo por 24-h. En otro caso, expuestas a ambos productos por 24 h. C): células tratadas en similares condiciones a la serie experimental B, en este caso el periodo de incubación fue de 48-h. Concentración de BP 10 µM. Al finalizar los tratamientos se determina la viabilidad celular por el método del MTT. Los resultados se expresan como porcentaje del control (células no expuestas). Cada serie representa la media ± SD de al menos tres experimentos con tres repeticiones. * $p < 0,05$ significativamente diferente a las células expuestas a BP solo (Dunnett's test).

Se demostró que el extracto obtenido de *U. fasciata* protege del daño citotóxico inducido por el BP en células C9, de epitelio de hígado de ratas bajo nuestras condiciones de ensayo.

Evaluación del efecto protector del extracto de U. fasciata en el modelo de daño al ADN inducido por el BP en ratones

Se utilizaron 40 ratones machos Balb/c (5-6 semanas de edad), provenientes del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México. Los animales fueron mantenidos en condiciones de temperatura ($25\pm 1^\circ\text{C}$) y humedad (60%), expuestos a ciclos de luz-oscuridad de 12 h y con libre acceso a los alimentos y el agua.

Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en cuatro grupos experimentales (n=10): control negativo, administrados vía oral con los vehículos utilizados para disolver el extracto de *U. fasciata* y el BP (agua y aceite de soya, respectivamente). Control positivo, animales tratados con BP, para inducir la genotoxicidad mediante la administración de una dosis única de 250 mg/kg de BP, por vía oral, el día 5 de la administración del extracto. Grupos pre-tratados por vía oral con dosis diarias de 50, 100 y 250 mg/kg de *U. fasciata* durante 5 días. Al finalizar el experimento, se practicó la eutanasia de los animales. Se extrajeron los hígados, los cuales se lavaron con solución salina y se conservaron hasta la preparación de los microsomas según describe Maron y Ames (47). A continuación, fue determinada la actividad de las enzimas del sistema del P450 CYP1A1/2 en los microsomas obtenidos de los animales controles y tratados con el extracto. La actividad enzimática se determinó según se describe en el acápite 4.

Además, fueron extraídos los fémures de cada animal y se cuantificó de la inducción de la formación de micronúcleos (MN) en los eritrocitos de la médula ósea como índice de la evaluación de los efectos del extracto sobre el daño genotóxico del BP a este nivel (daño a nivel cromosómico). El procesamiento de las muestras de fémur de los animales para la obtención de los MN y su posterior análisis fue realizado según Hayashi y cols., (69).

En la Figura 32 se muestran los efectos sobre la actividad del CYP1A1/2 en microsomas de ratas obtenidos de animales pre-tratados durante cinco días con dosis orales del extracto de *U. fasciata* y seguidamente administrados con BP (250 mg/kg) con respecto a los controles. La exposición al extracto conllevó a que se produjera una disminución significativa dependiente de la dosis de la actividad del CYP1A1 en los animales tratados, lo se correspondió con las observaciones previas (Figura 2) y refuerza la hipótesis que este extracto es un inhibidor de la enzima en cuestión.

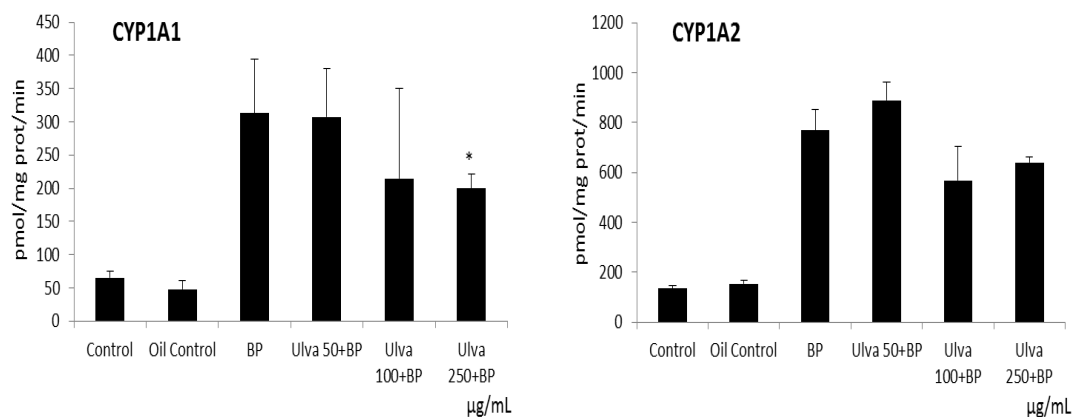


Figura 32. Efectos del pre-tratamiento de dosis orales del extracto de *U. fasciata* sobre la actividad enzimática del CYP1A en microsomas hepáticos de ratones BALB/C machos expuestos a benzo(a)pireno (BP). Las actividades catalíticas de los CYP1A1 y CYP1A2 fueron determinadas en los microsomas de los animales pre-tratados durante 5 días con el extracto (50, 100 y 250 mg/kg) y de los controles, el último día de la administración del extracto todos los animales fueron administrados con una dosis única de BP (250 mg/kg). Se presentan medias \pm SD, * $< p$ 0,05, (Dunnett's test).

Por otro lado, es conocido que la exposición a este agente mutagénico a la dosis empleada en el ensayo (250 mg/kg) es capaz de inducir daño al ADN que se traduce en un daño cromosómico en los animales expuestos. Un compuesto con propiedades antioxidantes que, además, sea capaz de inhibir la actividad metabólica del CYP1A1 y por tanto con ello, la formación de los metabolitos reactivos debería proteger a la molécula de ADN del daño cromosómico inducido por este agente. En la Tabla 6 se muestra la disminución significativa de los niveles de micronúcleos en la médula ósea de los animales pre-tratados con dosis orales entre 50-250 mg/kg del extracto respecto a los controles no tratados, lo que permite afirmar que el extracto obtenido de *U. fasciata* muestra actividad antigenotóxica en este modelo experimental.

Tabla 6. Efectos del extracto de *U. fasciata* sobre el daño genotóxico inducido por el benzo(a)pireno en ratones.

	Índice Citotoxicidad	Micronúcleos
Control negativo	1,08 \pm 0,28	4,3 \pm 0,8
Control de vehículo	2,10 \pm 0,47	6,6 \pm 2,6
BP (250 mg/kg)	2,23 \pm 0,75	15,3 \pm 2,6
<i>U. fasciata</i> (50mg/kg) + BP (250 mg/kg)	2,48 \pm 0,50	7,9 \pm 1,9**
<i>U. fasciata</i> (100mg/kg) + BP (250 mg/kg)	1,88 \pm 0,25	5,3 \pm 1,4**
<i>U. fasciata</i> (250mg/kg) + BP (250 mg/kg)	2,63 \pm 0,47	5,15 \pm 0,65**

BP, benzo(a)pireno, ** $p < p$ 0,01, Dunnett's test

Podemos afirmar que el extracto obtenido de *U. fasciata* administrado por vía oral a dosis en el rango de 50-250 mg/kg durante cinco días protege del daño genotóxico inducido por el BP en

ratones. Mientras que la inhibición de la función metabólica del CYP1A1 por este producto parece estar involucrada en los mecanismos responsables de la protección observada.

Evaluación del efecto protector del extracto de U. fasciata en el modelo de carcinogénesis pulmonar inducida por BP en ratones

En el estudio se utilizaron 40 ratones machos de la línea Balb/c de seis semanas de edad, provenientes del CENPALAB, La Habana, Cuba. Los animales fueron mantenidos en condiciones reguladas de temperatura ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) y humedad (60%), expuestos a ciclos de luz-oscuridad de 12 h y con libre acceso a los alimentos y el agua. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de CEBIMAR y desarrollado según las regulaciones de la Guía Europea para el uso y cuidado de animales de experimentación.

Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en cuatro grupos experimentales (n=10): grupo control, animales tratados por vía oral con las sustancias vehículos utilizados para disolver el extracto de *U. fasciata* y el BP (agua destilada y aceite de soya, respectivamente). La carcinogénesis pulmonar fue inducida en el resto de los animales mediante la administración de dos dosis semanales de 50 mg/kg de BP, por vía oral, durante cuatro semanas. El segundo grupo fue administrado con BP (50 mg/kg) solo, mientras que los animales del tercer y cuarto grupo fueron tratados por vía oral con una dosis diaria de 100 y 400 mg/kg de *U. fasciata*, respectivamente y BP. La administración del extracto comenzó una semana antes de la primera dosis de BP y se mantuvo durante 18 semanas.

Durante todo el experimento fue medido el peso corporal de todos los animales en el estudio. Al finalizar el experimento, se practicó la eutanasia de los animales mediante la administración de una sobredosis de pentobarbital sódico (90 mg/kg por vía intraperitoneal). Inmediatamente, se extrajeron los pulmones y el hígado, fueron lavados y pesados.

Determinación de marcadores de estrés oxidativo

Los biomarcadores redox fueron determinados en el suero de los animales mediante técnicas espectrofotométricas (Espectrofotómetro Pharmacia, Suiza). La concentración de glutatión reducido (GSH) fue determinada mediante el método propuesto por Sedlak y Lindsay (70). Los niveles de malonildialdehído (MDA) fueron cuantificados mediante el método propuesto por Erdelmeier y cols. (71) y los productos avanzados de la oxidación de proteínas (PAOP) fueron cuantificados según el método descrito por Witko-Sarsat y cols. (72).

Determinación de la inducción de la formación de micronúcleos en la médula ósea de los animales tratados.

Los fémures de cada animal fueron extraídos y los micronúcleos formados fueron cuantificados según describen Hayashi y cols. (69).

En la Figura 33 se muestra el comportamiento del peso corporal durante el tratamiento en los diferentes grupos experimentales. Como se observa, los animales del grupo tratado solo con el BP mostraron una disminución del peso a partir de la semana tres del experimento, lo cual se mantuvo hasta la semana quince. En cambio, el peso de los animales tratados con *U. fasciata* fue comparable con los animales del grupo control no expuesto. Estos resultados se corresponden con lo planteado en la literatura (73). En el modelo de carcinogénesis inducida por BP está reportado que los animales sufren una pérdida de peso en la medida que se inicia y se desarrolla el proceso tumoral. En el presente estudio, el tratamiento con el extracto evitó la disminución del peso corporal, lo cual sugiere un efecto protector del extracto de esta alga verde. Por otra parte, el análisis del porcentaje de peso del hígado y los pulmones respecto al peso corporal no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los diferentes grupos de tratamiento (datos no mostrados).

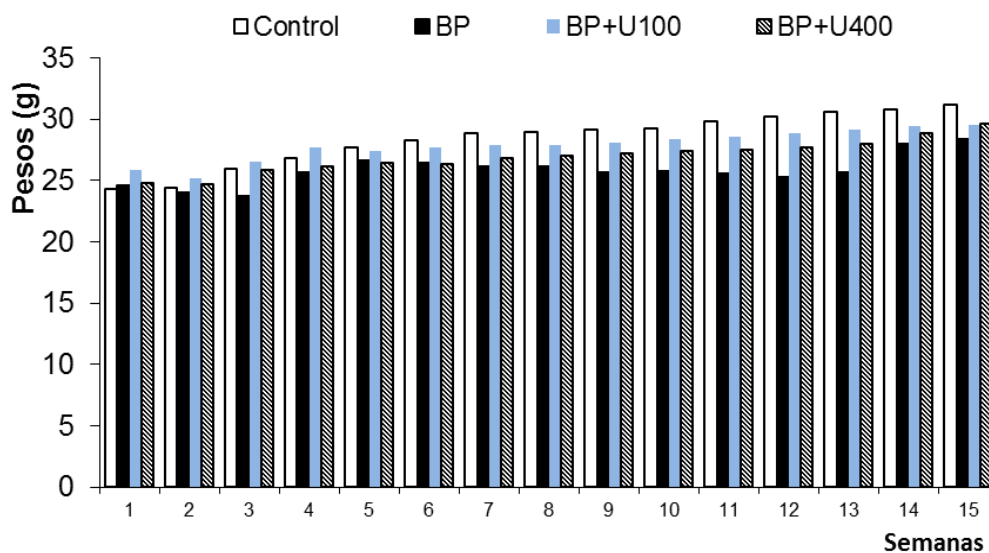


Figura 33. Comportamiento del peso corporal en los diferentes grupos experimentales. BP, benzo(a)pireno, U100, extracto de *U. fasciata* administrado a la dosis de 100mg/kg, U400 extracto de *U. fasciata* administrado a la dosis de 100mg/kg

Existen evidencias que demuestran el papel del BP en la inducción de carcinogénesis pulmonar y el posterior desarrollo de los tumores en los animales expuestos (74, 75). Durante el metabolismo

del BP, donde juega un papel determinante la actividad del citocromo CYP1A1 (Figura 30) se genera el metabolito carcinogénico 7,8-diol-9,10-epóxido-benzo(a)pireno, a la vez que se generan especies reactivas del oxígeno (76). Estas especies oxidantes producen una disminución de los mecanismos de defensa antioxidante, lo que conlleva a la instauración de un estrés oxidativo en el organismo que contribuye con el desarrollo del proceso de carcinogénesis (73). Ello ha llevado a proponer la hipótesis de que productos naturales con propiedades antioxidantes puedan proteger del desarrollo tumoral en este modelo (73, 77). En el presente estudio se pudo constatar que el tratamiento con el extracto obtenido de *U. fasciata* fue capaz de prevenir el daño oxidativo a la dosis de 400 mg/kg (Figura 34), a la vez que preservó los niveles de glutatión reducido (GSH), el cual representa una de las primeras líneas de defensa antioxidante en el organismo (78). Reportes de la literatura han demostrado que el tratamiento con extractos obtenidos a partir de algas, entre ellas *U. fasciata* inducen la actividad de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (79, 80). Dichas propiedades antioxidantes podrían estar relacionadas con el efecto anti-carcinogénico observado en el presente estudio.

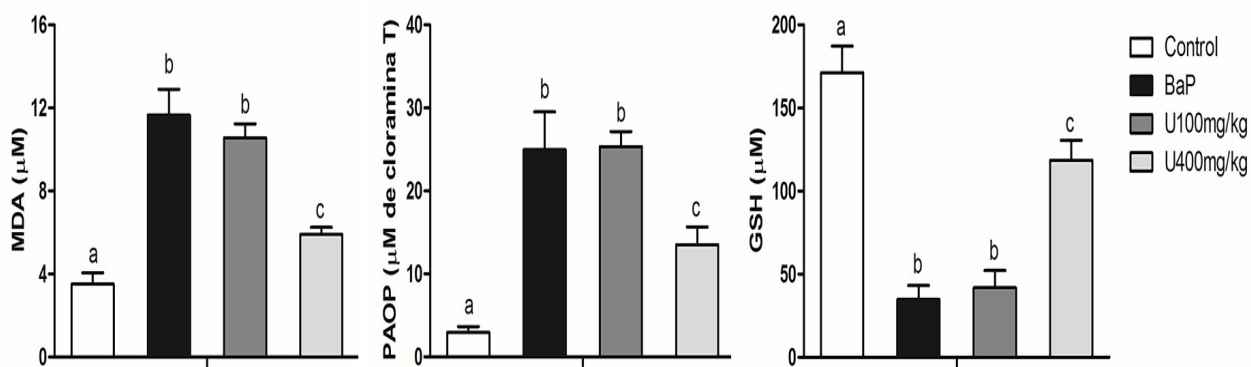


Figura 34. Efecto del tratamiento con el extracto *U. fasciata* sobre marcadores de estrés oxidativo. Las barras representan la media \pm D.E. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0,05$, ANOVA, Bonferroni post-test). BaP, benzo(a)pireno, U, *U.fasciata*. MDA, malonildialdehído, GST, glutatión reducido.

Por último, también, fue cuantificada la inducción de la formación de micronúcleos en el fémur de los animales como criterio de daño al ADN en este modelo experimental. El tratamiento con la dosis máxima de 400 mg/kg protegió a los animales del daño genotóxico inducido por el BP (Figura 35).

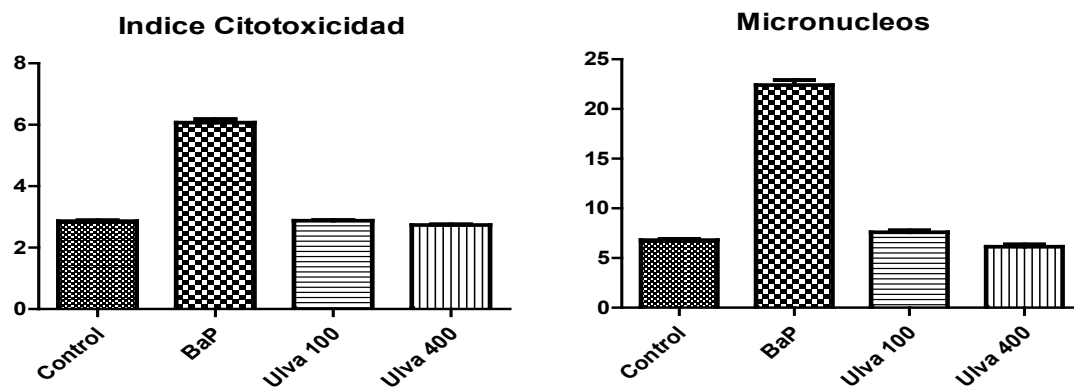


Figura 35. Efecto del tratamiento con el extracto *U. fasciata* sobre el daño al ADN inducido por el BP en ratones. Las barras representan la media \pm D.E. BaP, benzo(a)pireno, Ulva, extracto de *U. fasciata* (100 y 400 mg/kg).

Los ácidos grasos y los carotenoides están presentes en un alto contenido las algas verdes, incluyendo la especie de *U. fasciata* evaluada en el presente trabajo. Trabajos fitoquímicos previos demostraron que el extracto evaluado contiene en su composición carbohidratos, proteínas, saponinas, alcaloides y flavonoides (66). La caracterización fitoquímica mediante Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas de una fracción clorofórmica asilada del extracto permitió identificar que el ácido palmítico es un componente mayoritario en dicha fracción y que se encuentra presente en el extracto (Figura 29). Nadathur y cols., (81) reportaron propiedades antimutagénicas para este compuesto frente al daño inducido por la metilnitrosoguanidina. Por otro lado, han sido reportadas propiedades antimutagénicas para el ácido iso-palmítico en un modelo de daño inducido por el 7,12-dimetil benzoantraceno. Este efecto, además, fue asociado a la inhibición de la actividad del CYP1A1 por este compuesto. Sin embargo, a pesar de las coincidencias, otros estudios deben ser realizados para poder dilucidar si la presencia del ácido palmítico y sus derivados se encuentra asociada a los efectos antigenotóxico del extracto del alga verde *U. fasciata* observados en el presente trabajo.

Se comprobó que el extracto obtenido del alga verde *U. fasciata* podría ser una fuente de obtención de nuevos candidatos a suplementos o fitomedicamentos con potencial aplicación en la prevención del cáncer y otras enfermedades asociadas a los procesos de bioactivación de compuestos extraños en el organismo.

10. Actualización, ampliación y perfeccionamiento de la base de datos

Se actualizó y se amplió la base de datos creada en el proyecto 2007-2009. Esta base de datos contiene toda la información acumulada de las especies en estudio (número catalográfico,

imágenes, colectas, características químicas y farmacológicas) obtenida en etapas previas en el CEBIMAR, las cuales fueron actualizadas con los resultados correspondientes al presente proyecto. De tal forma, se amplió la información acerca de la caracterización química y de las potencialidades como posibles fuentes de obtención de nuevos antitumorales y anticancerígeno de uso humano para dos especies, *Thalassia testudinum* y *Ulva fasciata*. Se amplió la descripción de metodologías empleadas para la consecución de los nuevos resultados y se incrementaron las publicaciones en el tema. De esta manera, se amplían los conocimientos acerca de las potencialidades de la biodiversidad marina cubana, la necesidad de su protección y uso sostenible, así como coadyuva a elevar la educación medio ambiental a un sector menos especializado.

11. Conclusiones generales del proyecto

En el curso del desarrollo del presente proyecto quedó demostrado que,

- ✓ Los extractos obtenidos de las especies *S. filipendula*, *D. pinnatifida* y *F. filiforme* no resultaron promisorios candidatos como agentes capaces de proteger del daño al ADN inducido por reconocidos agentes mutagénicos y cancerígenos ambientales bajo nuestras condiciones de ensayo.
- ✓ Se informa por primera vez las propiedades antimutagénicas, moduladoras de los sistemas que metabolizan los compuestos extraños al organismo y antitumorales de un extracto obtenido de la angiosperma marina *Thalassia testudinum*.
- ✓ Se demostró que el efecto antitumoral del extracto de *T. testudinum* está mediado por la modulación de procesos de proliferación, muerte y supervivencia celular, así como de inflamación, estrés oxidativo y angiogénesis.
- ✓ Se demostró que los componentes de naturaleza polifenólica presentes en el extracto de *T. testudinum* se encuentran involucrados en los efectos antitumorales observados.
- ✓ Se demostraron por primera vez las propiedades antimutagénicas y genoprotectoras de un extracto obtenido del alga verde *Ulva fasciata*.
- ✓ Se actualizó y amplió la base de datos BIOPROMA desarrollada en CEBIMAR y registrada en CENDA.
- ✓ El trabajo realizado durante el presente proyecto ha contribuido al conocimiento y valoración de las potencialidades biomédicas de la biodiversidad marina de Cuba.
- ✓ Se amplió y se profundizó en la caracterización de las propiedades químicas y farmacológicas de extractos/compuestos obtenidos a partir de organismos marinos.

Por todo lo anteriormente expuesto, en nuestra consideración se ha cumplido con los objetivos propuestos a inicios del proyecto y han quedado sentadas las perspectivas para un futuro trabajo encaminado a la obtención de nuevos productos con aplicaciones terapéuticas basado en el uso racional y sostenible de nuestros recursos marinos.

12. Recomendaciones

- ✓ Continuar los estudios preclínicos necesarios que permitan avalar las potencialidades del extracto obtenido a partir de las hojas de *T. testudinum* como posible candidato a utilizar como alternativa terapéutica en el manejo y control del cáncer en nuestro país.
- ✓ Continuar los estudios preclínicos necesarios que permitan avalar las potencialidades del extracto obtenido a partir del alga verde *U. fasciata* como un nuevo producto con potencial aplicación en la prevención del daño inducido por contaminantes ambientales en humanos.
- ✓ Mantener actualizada la base de datos con los nuevos datos que se obtengan en nuestras investigaciones y las nuevas metodologías que se incluyan.
- ✓ Continuar ampliando el trabajo de divulgación ambiental.

13. Referencias

- 1-Jain, R., Sonawane, S., Mandrekar, N. (2008). Marine organisms: Potential source for drug discovery, *Current Science* 94, pp. 292.
- 2- Munro, M.H.G., and Blunt, J.W. (2009). *Marine Literatura Data Base*. Univ. of Canterbury, New Zealand.
- 3-Parkin, D et al. *Global Cancer Statistics, 2002*. *CA Cancer J Clin* 2005 55: 74-108
- 4-Web of World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/research/es/>
- 5-Cooper R et al. *Health in Cuba*. *Int J Epidemiology* 2006; 35:817–824.
- 6-Anuario estadístico de salud 2012. Ministerio de salud pública. División nacional de estadística la habana; 2012 disponible en: http://files.sld.cu/dne/files/2013/04/anuario_2012.pdf.
- 7-Link F. and Balaguer A. (2010). Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. *Biochemical Pharmacology* 80, 1771–1792.
- 8-Friedrich M, Schwarz M, Furstenberger G. Promotion and cocarcinogenesis. In Arcos 8-8-Argus J.C., Woo YT. (eds), *Chemical Induction of Cancer, Modulation and Combination Effects*. Boston, MA, 995: pp. 123-184.
- 9-Slaga TJ, Budunova V, Gimenez-Conti I, Aldaz CM. (1996). The mouse skin carcinogenesis model. *J Invest Dermatol Symp Proc.*, 1: 151-156.
- 10-DiGiovanni J. (1992). Multistage carcinogenesis in mouse skin. *Pharmacol Ther.*, 54: 63-128.
- 11-Zhao J, Wang J, Chen Y, Agarwal R. (1999). Anti-tumor promoting activity of a polyphenolic fraction isolates from grape seeds in the mouse skin two stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin gallate as the most effective antioxidant constituent. *Carcinogenesis*, 20: 1737-1745.
- 12-Klaunig JE, Xu Y, Isenberg JS, Bachowski S, Kolaja KL, Jiang J, Stevenson DE, Walborg EF Jr. (1998). The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ Health Perspect*, 106(1), 289-295.

- 13-De Flora S., Izzotti A., Randerath, K. (1996). DNA adducts and chronic degenerative diseases. Pathogenetic relevance and implications in preventive medicine. *Mutat. Res*, 366, 197-238.
- 14-A.R.M. Ruhul Amin, Omer Kucuk, Fadlo R. Khuri, and Dong M. Shin. (2009). Perspectives for cancer prevention with natural compounds. *Journal of Clinical Oncology*, 27(16), 2712-25.
- 15-Park, E.J., Pezzuto, J. M. (2002). Botanicals in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev.*, 21, 231-255.
- 16-S. Reuter, S.C. Gupta, M. Chaturvedi, B. Aggarwal (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology and Medicine* 49, 1603–1616.
- 17-Sporn M, Suh N. (2002). Chemoprevention: approach to controlling cancer. *Nat Rev Cancer* 2:537–43.
- 18-Thomas NS, George K, Namasivayam N. (2015). Molecular aspects and chemoprevention of dimethyl aminoazobenzene induced hepatocarcinogenesis: A review. *Hepatol Res*. 14. doi: 10.1111/hepr.12569.
- 19-Regalado, E.L., Valdés O., Menendez R., Morales R., Laguna A., Thomas O., Hernandez Y., Nogueiras C., Gaysinski M., Kijjoa A., (2011). Phytochemical analysis and antioxidant capacity of BM-21, a bioactive extract rich in polyphenolic metabolites from the sea grass *Thalassia testudinum*, *Food Chemistry*, in press.
- 20-Rodríguez, M., Laguna, A., Regalado, E.L., Menéndez, R., Garateix, A. (2010). Procedimiento de obtención de un producto de origen marino procedente de la planta marina *Thalassia testudinum*. Patent No. CU 23607.
- 21-Regalado, E.L., Rodríguez, M., Menéndez, R. (2009). Repair of UVB-Damaged Skin by the Antioxidant Sulphated Flavone Glycoside Thalassiolin B Isolated from the Marine Plant *Thalassia testudinum* Banks ex König, *Marine Biotechnology*. 11, 74–80.
- 22-Garateix, A., Salceda, E., Menéndez, R., Regalado, E.L., López, O., Garcia, T., Morales, R.A., Laguna, A., Thomas, O.P., Soto, E. (2011). Antinociceptive effect of *Thalassia testudinum* extract is mediated by inhibition of the acid sensing ionic channels by phenolic compound thalassiolin B, *Molecular Pain*. 7, 10-14.
- 23- Gonzales K, Valdés O, Laguna A, Martínez M, González JA. (2004). Efecto antioxidante y contenido polifenólico de *Syringodium filiforme* *Cymodoceaceae*, *Rev. Biol. Trop.* 59 (1): 465-472
- 24-Nuñez R, Garateix A, Laguna A, et al., Caribbean marine biodiversity as a source of new compounds of biomedical interest and others industrial applications. *Pharmacology on line* 3: 111-119, 2006.
- 25-Cano, M., J. Díaz, O. Valdés-Iglesias, T. Chopin (2004); Distribución, cobertura y concentración de pigmentos de *Ulva fasciata* Delile en un sector de la costa Norte de La Habana, Cuba; *Hidrobiología*, 12, 15-18.
- 26-Base de datos BIOPROMA, CEBIMAR, AMA, La Habana, Cuba.
- 27-Villareal, L., Soria, M., Guerra, G., Ayala, N. 2010. Antibacterial and anticancer activity of seaweeds and bacteria associated with their surface. *Revista de Biología Marina y Oceanográfica*. 45 (2).
- 28-Menéndez R, Fernández M, García N. (2010). Las algas marinas como fuente de nuevos agentes anti-inflamatorios. *Revista Electrónica Cuba: Medio Ambiente y Desarrollo*, (19).
- 29- Rowley, D.C., Hansen, M.S., Rhodes, D., Sotrifer, C.A., Ni, H., Mccammon, J.A., Bushman, F.D., Fenical, W. (2002). Thalassiolins A-C: New Marine-Derived Inhibitors of HIV cDNA Integrase. Center of Marine Biotechnology and Biomedicine, Scripps Institution of

- Oceanography California, University of California-San Diego, La Jolla, California. *Biorganic & Medicinal Chemistry*, 10, 3619-3625.
- 30- Maron M., Ames, B., 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mut. Res.* 113, 173–210.
 - 31-Gustafson, D.L., Pritsos, C.A., 1992. Oxygen radical generation and alkylating ability of mitomycin C
 - 32-Grisolia, C.K., 2002. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutation Research* 1518, 145–48.
 - 33- Tsuji, P.A., Walle, T., 2007. Benzo[a]pyrene-induced cytochrome P450 1A and DNA binding in cultured trout hepatocytes – inhibition by plant polyphenols. *Chemical Biological Interactions* 15 169(1), 25–31.
 - 34- Gnanasekaran S, Chandrasekaran G. (2015). Immunostimulant and chemoprotective effect of vivartana, a polyherbal against cyclophosphamide induced toxicity in Swiss albino mice. *J Exp Ther Oncol.* 11(1):51-61.
 - 35- Gómez-Lechón, M.J., Castell, J.V. (1998). Primary culture of human hepatocytes. In: *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures*. Griffiths, J.B., Doyle, A., Newell, D.N, John Wiley & Sons Ltd. Baffins Lane, England, 12B: 15.1-15.7
 - 36- Gómez-Lechón M.J., O'Connor, E., Donato, M.T., Castell, J.V. (2003). Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes by alteration of mitochondrial function and generation of ROS, *Biochem. Pharmacol.* 66, 2155-2167
 - 37- Aszalos, A. Role of ATP-binding cassette (ABC) transporters in interactions between natural products and drugs, *Current Drug Metabolism* 9 (2008), pp. 1010–1018.
 - 38- Lambert, J.D., Sang, S., Lu, A.Y., and Yang, C.S. Metabolism of dietary polyphenols and possible interactions with drugs, *Current Drug Metabolism* 8(5) (2008), pp. 499-507.
 - 39- Rodeiro I. et al., (2008). Modulation of P450 enzymes by Cuban natural products rich in polyphenolic structures in rat hepatocytes. *Chemico-Biol. Inter.*, 172, 1-10.
 - 40- Lahoz A, Donato MT, Picazo L, Castell JV, Gómez-Lechón MJ. (2008). Assessment of cytochrome P450 induction in human hepatocytes using the cocktail strategy plus liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Drug Metab Lett.* 2(3):205-9.
 - 41- Hodek, P., Trefil, P., and Stiborova, M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds.
 - 42- Ciolino H.P., and Yeh, G.C. The flavonoid galangin is an inhibitor of CYP1A1 activity and an agonist/antagonist of the aryl hydrocarbon receptor, *British Journal Cancer* 79 (1999), pp. 1340–1346.
 - 43-Chieli E., Romiti N., Lin C., Rodeiro I., Garrido G. (2009). In vitro effects of *Mangifera indica* and polyphenols derived on BCB1/P-glycoprotein activity. *Food Chem Tox.* 47, 2703-10.
 - 44- Alvarez, A., Pulido, M. (2008). Transportadores de tipo ABC: consecuencias de su interacción con flavonoides, *boletín latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas* 7, pp. 296-311.
 - 45- Izzo, A., Ernst, E. Interactions between herbal medicines and prescribed drugs: a systematic review, *Drugs* 61 (15), (2001), 2163–2175.
 - 46- Robey, R.W., Medina-Perez, W.Y., Nishiyama, K., Lahusen, T., Miyake, K., Litman, T., Senderowicz, A.M., Ross, D.D., Bates, S.E., 2001. Overexpression of the ATP-binding cassette half-transporter, ABCG2 (Mxr/BCrp/ABCP1), in flavopiridol-resistant human breast cancer cells. *Clinical Cancer Res:* 7, 145-152.
 - 47- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunology Methods*, 65, 55-63, 1983.

- 48- Pavek, P., Merino, G., Wagenaar, E., Bolscher, E., Novotna, M., Jonker, J.W., Schinkel, A.H., 2005. Human breast cancer resistance protein: interactions with steroid drugs, hormones, the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridine, and transport of cimetidine. *The Journal of Pharmacology and Experimental therapeutics*. 312, 144-152.
- 49- Repetto M. (2009). *Toxicología Fundamental, Capitulo 3, Madrid, España, 4ta Ed*
- 50- Taylor P, Colman N., Bajoon J. (2014). The search for plants with anticancer activity: pitfalls at the early stages. *J. Ethnopharmacology* 158 (2014) 246–254
- 51- INVITTOX Protocol. THE FRAME CYTOTOXICITY TEST (NEUTRAL RED ASSAY), 3a, 1990.
- 52-Abassi YA, Jackson JA, Zhu J, O'Connell J, Wang X, Xu X. (2004). Label-free, real-time monitoring of IgE-mediated mast cell activation on microelectronic cell sensor arrays. *J Immunol Methods*. 292(1-2):195-205.
- 53-Tolosa L., Rodeiro I., Donato MT, Herrera J., Delgado R., Castell, Gomez-Lechon MJ. (2013) Multiparametric evaluation of the cytoprotective effect of the *Mangifera indica* L. stem bark extract and mangiferin in Hep-G2 cells. *J. Pharmacy Pharmacology*, 65, 1073–1082.
- 54- Dunning MJ, Smith ML, Ritchie ME, Tavaré S (2007) beadarray: R classes and methods for Illumina bead-based data. *Bioinformatics* 23: 2183-2184.
- 55- Hochberg Y, Benjamini Y. (1990). More powerful procedures for multiple significance testing. *Stat Med*. 9(7):811-8.
- 56- Lim E, Wu D, Pal B, Bouras T, Asselin-Labat ML, Vaillant F, Yagita H, Lindeman GJ, Smyth GK, Visvader JE. (2010). Transcriptome analyses of mouse and human mammary cell subpopulations reveal multiple conserved genes and pathways. *Breast Cancer Res.*;12(2):R21.
- 57- Carmeliet P, Jain RK: Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000, 407:249-257.
- 58- Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications, *N. Engl. J. Med*. 285 (1971): 1182-1186.
- 59- Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: The next generation, *Cell* 144 (2011): 646-674.
- Hunter J. Lectures on the principles of surgery, in: J. Palmer (Ed.), *The Works John Hunter*, London, 1787: 368.
- 60- Bergers G., Benjamin L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch, *Nat. Rev. Cancer*. 3 (2003):401-410.
- 61- Borges J, Tegtmeier FT, Padron NT, Mueller MC, Lang EM, Stark GB: Chorioallantoic membrane angiogenesis model for tissue engineering: a new twist on a classic model. *Tissue Eng* 2003, 9:441-450.
- 62-Attoub S, Arafat K, Gélaude A, Al Sultan MA, Bracke M, Collin P, Takahashi T, Adrian TE, De Wever.
bioactivated by xanthine dehydrogenase. *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 35, 147–151.
- 63-Descamps-Latscha, B., Witko-Sarsat, V., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A.T., Gausson, V., Mothu, N., London, G.M. y Jungers, P. (2005) Advanced oxidation protein products as risk factors for atherosclerotic cardiovascular events in nondiabetic predialysis patients, *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, 45, 39-47.
- 64-Miranda M. Cuellar A. (2000). Método para la marcha fitoquímica. *Rev. Cub. Farmacia*, 1, 45-67.

- 65- Bourgougnon N, Roussakis C, Kornprobst JM, Lahaye M. (1994). Effects in vitro of sulfated polysaccharide from *Schizymenia dubyi* (Rhodophyta, Gigartinales) on a non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line (NSCLC-N6). *Cancer Lett.* 30;85(1):87-92.
- 66-Cano, M. Bases biológicas para el uso óptimo de las poblaciones naturales de *Ulva fasciata* Delile, 1813 (*Chlorophyceae*); Tesis en opción al grado de Dr. en Ciencias Biológicas, UH, Cuba, 2008.
- 67- Silva M, Vieira L, Almeida AP, Kijjoa A. (2013). The marine macroalgae of the genus *Ulva*: chemistry, biological activities and potential applications. *Oceanography* 1: 101.
- 68- Garson MJ. 1993. The Biosynthesis of Marine Natural Products. *Chem Rev.* 93: 1699-1733
- 69- Hayashi, M., Tice, R.R., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D., Kirsh-Volders, M., Olesson, Jr., Vannier, B. (1994). In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mut. Res.* 312, 293-296.
- 70- Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and non-protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25:192-205.
- 71-Erdelmeier, I., Gerard-Monnier, D., Yadan, J.C. y Chaudiere, J. (1998) Reactions of N-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxidation, *Chem Res Toxicol*, **11**, 1184-1194.
- 72-Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen-Khoa T, Capeillere-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 1998; 161:2524-2532.
- 73- Kamaraj S, Vinodhkumar R, Anandakumar P, Jagan S, Ramakrishnan G, Devaki T. The effects of quercetin on antioxidant status and tumor markers in the lung and serum of mice treated with benzo(a)pyrene. *Biol Pharm Bull* 2007; 30:2268-2273.
- 74- Hans Peter W, Deuter M, Imilda E. Chemoprevention of tobacco smoke induced lung carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis* 2000; 21:977-982.
- 75- Knuckles ME, Inyang F, Ramesh A. Acute and subchronic oral toxicities of benzo[a]pyrene in F-344 rats. *Toxicol Sci* 2001; 61:382-388.
- 76-Nebert DW, Shi Z, Gálvez-Peralta M, Dragin N. Oral benzo[a]pyrene: understanding pharmacokinetics, detoxication, and consequences -Cyp1 knockout mouse lines as a paradigm. *Mol Pharmacol* 2013; 84:304-313.
- 77- Khazir J, Riley DL, Pilcher LA, De-Maayer P, Mir BA. Anticancer agents from diverse natural sources. *Nat Prod Commun.* 2014; 9:1655-69.
- 78- Circu ML, Aw TY. (2008). Glutathione and apoptosis. *Free Radic Res.* 42(8):689-706.
- 79-Matanjun P, Mohamed S, Mustapha NM, Muhammad K, Ming CH. Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo. *J Appl Phycol* 2008; 20:367-73.
- 80-Namvar F, Mohamed S, Fard S. Polyphenol-rich seaweed (*Euclima cottonii*) extract suppresses breast tumour via hormone modulation and apoptosis induction. *Food Chem.* 2012; 130:376-382.
- 81- Nadathur SR, Carney JR, Gould SJ, Bakalinsky AT. (1996). Palmitic acid is the major fatty acid responsible for significant anti-N-methyl-N'-nitro-N-nitroguanidine (MNNG) activity in yogurt. *Mutat Res.* 4;359(3):179-89.