

Búsqueda, aislamiento e identificación de nuevos compuestos con actividad antitumoral procedentes de un organismo marino del género *Capnella*

Elena Maganto Burgos^{1,2}, Laura Coello Molinero²

1 Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2 Área de Química de Productos Naturales, Departamento de I+D, Pharmamar S.A., 28770 Colmenar Viejo, Madrid, España.

Resumen

El cáncer constituye una de las principales causas de muerte a escala mundial. En el año 2012, se le atribuyeron 8,2 millones de defunciones. Pese a los enormes esfuerzos realizados por los centros de investigación y empresas farmacéuticas de todo el mundo, las terapias utilizadas en la actualidad solo ayudan a un porcentaje de pacientes, sobre todo aquellos cánceres de diagnóstico temprano. En el resto, la enfermedad presentará un curso funesto a pesar del tratamiento, pues aún no existen terapias eficaces para combatirlos. Por este motivo, la búsqueda de nuevas terapias capaces de acabar con estos tipos de cáncer, más avanzados y agresivos, constituye uno de los principales objetivos de la investigación biomédica. Entre las entidades dedicadas a la búsqueda de nuevos compuestos se encuentra Pharmamar. Pharmamar es una compañía biofarmacéutica que lleva a cabo un programa pionero de biotecnología marina para el descubrimiento de nuevos medicamentos. El mar constituye su fuente para la investigación, y su gran biodiversidad sirve de modelo para el descubrimiento de fármacos innovadores con actividad antitumoral. En el presente trabajo se detalla la metodología empleada en esta compañía para la extracción, fraccionamiento y purificación de moléculas con actividad citotóxica, a partir de organismos marinos. Se ha tomado como ejemplo el procedimiento llevado a cabo con un organismo del género *Capnella*, describiendo las técnicas que se utilizaron para la obtención de tres sesquiterpenos de citotoxicidad moderada, pertenecientes al grupo de los "capnellenes".

Palabras clave: bioprospección; cáncer; *Capnella sp.*; compuesto antitumoral; cromatografía; resonancia magnética nuclear.

Cita: Elena Maganto, Laura Coello (2014) Búsqueda, aislamiento e identificación de nuevos compuestos con actividad antitumoral procedentes de un organismo marino del género *Capnella* Dianas 3(1): e20140912. ISSN 1886-8746 journal.dianas.e20140912 URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Editores: María José Carmena y Alberto Domingo, Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

Recibido: 27 de junio de 2014

Copyright: © 2014 Elena Maganto Burgos et al.

Este es un artículo open-access distribuido bajo licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

*E-mail: elena.maganto@edu.uah.es



Introducción

El cáncer es una de las patologías que causa mayor porcentaje de muertes en el mundo desarrollado. En el año 2012, la carga mundial de cáncer alcanzó los 14 millones de casos nuevos al año, una cifra que se prevé que aumente hasta los 22 millones anuales en las próximas dos décadas [1]. En este mismo año, los cánceres diagnosticados con mayor frecuencia a nivel mundial fueron el de pulmón (el 13,0% del total), el de mama (el 11,9%) y el cáncer colorrectal (el 9,7%) [1].

Dada su enorme complejidad, muchas clases de cáncer aún carecen de terapias eficaces con las que poder combatirlos, y en estos casos, la medicina paliativa pasa a ser la única opción. Por ese motivo, la búsqueda de nuevas moléculas con capacidad antitumoral constituye un pilar fundamental en el campo de la investigación biomédica y farmacéutica.

Desde un punto de vista farmacológico, el estudio de la naturaleza ha sido muy importante en la búsqueda de nuevos compuestos activos gracias a la enorme biodiversidad de la misma; esto se conoce como bioprospección [2]. Dado que la mayor parte de la superficie terrestre está cubierta de agua, y que en ella reside el 80% de la vida del planeta [2], los organismos marinos han recibido una considerable atención como fuente de nuevos compuestos, para el tratamiento de múltiples patologías [3], entre ellas el cáncer.

Muchos invertebrados sésiles que habitan los arrecifes, han desarrollado un gran repertorio químico de defensa contra depredadores, parásitos y competidores, cuyo modo de acción consiste fundamentalmente en la inhibición del crecimiento celular. Esto los convierte en organismos tremendamente interesantes de

cara a la identificación de compuestos citotóxicos capaces de destruir las células tumorales [4]. La actividad investigadora de Pharmamar, se fundamenta en esta premisa, ya que la búsqueda de nuevos fármacos en esta empresa se basa en el “screening” de macroorganismos marinos, tales como esponjas y cnidarios, y también de microorganismos (generalmente del orden actinomicetes) con la finalidad de hallar nuevas moléculas con potencial terapéutico antitumoral.

En el presente trabajo, se detalla el procedimiento necesario para el aislamiento, la caracterización y la elucidación de nuevas moléculas con actividad citotóxica, extraídas de organismos marinos, tomando como ejemplo, el llevado a cabo sobre un organismo del género *Capnella*, un tipo de coral blando que se ha demostrado que produce una gran cantidad de metabolitos activos [5, 6].

Materiales y métodos

Recolección de la muestra biológica

El espécimen, perteneciente al género *Capnella*, fue recolectado durante una expedición de submarinismo a 80 metros de profundidad cerca de la isla de Dili, Indonesia. El organismo se muestra en la Figura 1, en una fotografía tomada justo antes de su recogida. Una vez recogido, fue congelado a -20°C y almacenado en estas condiciones. Una vez finalizada la expedición, fue transportado y entregado en las mismas condiciones de frío a Pharmamar donde tras realizarse la clasificación taxonómica (especificada en la figura 1) bajo el código ORMA113435, hacer una evaluación previa de su citotoxicidad con una pequeña parte y comprobar por HPLC-MS que no contiene compuestos conocidos en la base de datos de Pharmamar, se pasó al departamento de Química de Productos Naturales para su completa evaluación. El peso del organismo entregado al departamento de Productos Naturales fue de 15 gramos.

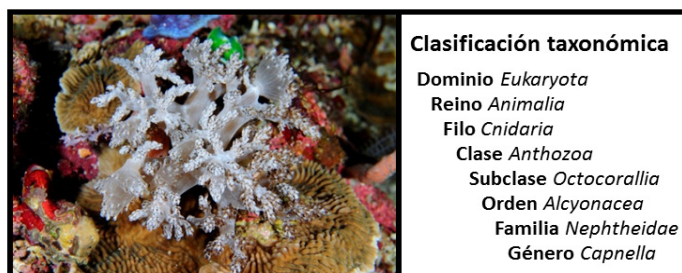


Figura 1.- Imagen del espécimen de *Capnella* sp. recogido durante la expedición y clasificación taxonómica.

Extracción con disolventes

El organismo congelado fue triturado y sometido a dos extracciones distintas:

Extracción con disolventes orgánicos. Se añadió una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1) hasta cubrir por completo la muestra (60 mL). Se mantuvo 20 minutos en agitación con ayuda de un agitador magnético y 30 en reposo, y se filtró a vacío utilizando un embudo Buchner. Este procedimiento se repitió dos veces más, se juntaron los extractos y se concentró utilizando un rotavapor, obteniendo el extracto orgánico.

Extracción con H_2O . Se incorporó agua destilada hasta cubrir la muestra (60 mL) y se repitió el procedimiento anterior una única vez, obteniendo el extracto acuoso.

Fraccionamiento del extracto orgánico mediante VLC con sílice RP18

Para el fraccionamiento del extracto orgánico, se realizó una cromatografía líquida a vacío en fase reversa (VLC-RP), utilizando como fase estacionaria sílice RP18 y como fase móvil, varios disolventes en orden decreciente de polaridad, con el fin de realizar una separación de los diferentes componentes que contiene el organismo en diferentes fracciones en relación a su polaridad.

Fracción	RP1	RP2	RP3	RP4
Fase móvil	$\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{OH}$ (3:1)	$\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:3)	CH_3OH	CH_2Cl_2

Tabla 1.- Fase móvil utilizada durante la VLC-RP.

Se comienza disolviendo el extracto orgánico, en este caso en metanol y añadiéndole sílice RP18 para formar la cabeza de columna, evaporando a continuación el disolvente. Se incorpora sobre una placa filtrante de 3 cm de diámetro interno a la que previamente se añadió sílice RP18 como fase estacionaria y se acondicionó con el primer disolvente a utilizar. La altura de la sílice, una vez incorporada la cabeza de columna, fue de 2,9 cm. A continuación se fueron incorporando volúmenes de 60 mL de varios disolventes y mezclas de disolventes de manera secuencial, de mayor a menor polaridad, siguiendo el

orden que aparece en la tabla 1. Una vez evaporados los disolventes, se vializaron las fracciones, y se pesaron.

Ensayo de citotoxicidad

Para evaluar la actividad citotóxica de cada una de las fracciones orgánicas obtenidas y del extracto acuoso se enviaron 0,15 mg de cada uno de ellos al departamento de Screening. En este departamento, la actividad citotóxica se determinó utilizando cuatro líneas celulares: MDA-MB-231 (cáncer de mama), A549 (cáncer de pulmón), HT29 (cáncer colorrectal) y PSN1 (páncreas). Los tratamientos se ensayaron en todas las líneas celulares mencionadas a tres concentraciones: 25 µg/mL, 5 µg/mL y 1 µg/mL.

Para la determinación cuantitativa de la citotoxicidad, se utilizó el método colorimétrico de la sulforodamina B [7], midiendo la viabilidad celular antes del tratamiento y 48 horas después, utilizando como control células sin tratamiento. Tomando como referencia la densidad celular a tiempo cero y analizando la densidad celular del control tras 48 horas, se pudo determinar el crecimiento celular normal. Considerando 100% el crecimiento del control durante ese lapso de tiempo, se pudo determinar el crecimiento celular, expresado en porcentaje, que tuvo lugar en presencia de tratamiento. Así, los resultados de la actividad del compuesto van de -100% a >100%. El 100% o superior correspondería a un crecimiento igual al del control, lo que significa que el tratamiento no afecta a la viabilidad ni al crecimiento celular. Un 0% correspondería a un tratamiento citostático, pues el número de células se mantiene constante. En cambio, si entramos en valores < 0 % estamos hablando de un tratamiento citotóxico, con el cual las células han sufrido alteraciones que les impiden proliferar y han desencadenado su muerte.

Análisis de las fracciones activas mediante HPLC-MS

El análisis de la fracción RP2, la única fracción activa, se realizó mediante cromatografía de alta resolución en fase reversa asociada a espectrometría de masas (HPLC-MS), en un equipo Agilent 1100 Series LC/MSD. Como fase estacionaria se utilizó una columna Symmetry C18 analítica (4,6 x 150mm; 5 µm) y como fase móvil, CH₃CN+0,04% TFA y H₂O + 0,04% TFA, a un flujo de 0,8mL/min, utilizando el gradiente general indicado en la tabla 2. La muestra se disolvió en CH₃OH a una concentración de 1mg/mL y se inyectaron 0,1 mL (0,1 mg de muestra). Las longitudes de onda utilizadas para la detección de los picos fueron 215 nm y 254 nm.

Tiempo (min)	0	5	35	40
CH₃CN+0.4%TFA (%)	5	5	100	100

Tabla 2.- Método de análisis de las fracciones activas mediante HPLC-MS.

Purificación de los compuestos presentes en la fracción activa mediante HPLC

Tomando como referencia el cromatograma del HPLC-MS, se determinó un método adecuado para la separación de los compuestos que contenía la fracción activa procedente de la VLC-RP. La búsqueda del método se realizó en un HPLC analítico Agilent 1100 con bomba cuaternaria e inyección automática. El método final que resultó idóneo para la separación de los compuestos fue el siguiente: como fase estacionaria se utilizó una columna analítica XBridge C18 (5 µm, 4,6 x 150mm) y como fase móvil se utilizó CH₃CN y H₂O, con el gradiente especificado en la tabla 3, a un flujo de 0,8 mL/min.

Luego se escaló a un HPLC preparativo Agilent 1100 de bomba cuaternaria e inyección manual, utilizando como fase estacionaria una columna preparativa XBridge C18 (5 µm, 19 x 150 mm) y como fase móvil, CH₃CN y H₂O, con el gradiente especificado en la tabla 3, a un flujo de 15 mL/min. La muestra se disolvió en CH₃OH a una concentración de 50mg/mL y cada inyección fue de 0,4 mL (20 mg de muestra por inyección).

La longitud de onda utilizada para la detección fue 215 nm. Se recogió cada pico separadamente, a continuación se evaporó el disolvente, se vializó y se pesó cada fracción.

Tiempo (min)	0	30	35
CH₃CN (%)	10	55	100

Tabla 3.- Método de separación de las fracciones activas mediante HPLC.

Análisis de citotoxicidad de las fracciones de HPLC

Del mismo modo, 0,15mg de cada una de las fracciones de HPLC fueron enviadas al departamento de Screening para realizar una valoración de la actividad citotóxica de cada una de ellas, sobre las cuatro líneas tumorales mencionadas anteriormente y a las mismas diluciones.

Elucidación de las moléculas purificadas mediante resonancia magnética nuclear y HPLC-MS

Se realizó un análisis por HPLC-MS de cada fracción de HPLC para determinar el peso molecular de cada molécula. El espectro obtenido se comparó con los espectros de la base de datos de Pharmamar, para determinar coincidencia con alguna molécula ya conocida en la empresa (“desreplificación”). Las fracciones que correspondían a picos en el HPLC se disolvieron en CDCl₃ (cloroformo deuterado) o CD₃OD (metanol deuterado), en función de la polaridad, y se realizó un análisis mediante espectros de RMN de protón, de carbono, HSQC, HMBC y COSY de cada una de ellas con un equipo Varian “Unity 500” a 500/125 MHz (¹H/¹³C).

Análisis de citotoxicidad de los compuestos puros

Los compuestos puros fueron enviados nuevamente al departamento de Screening. La actividad citotóxica se determinó utilizando las cuatro líneas celulares ya mencionadas, mediante la técnica de la sulforodamina B. En este caso se realizaron 10 diluciones diferentes del compuesto que iban de 1µg/mL a 0,0026µg/mL, y las células se mantuvieron sometidas al tratamiento durante 72 horas. Se realizó la curva dosis-respuesta, y a partir de los resultados obtenidos se calculó el índice de crecimiento (GI50), el índice de inhibición de crecimiento (TGI) y la dosis letal del compuesto (LC50), todo expresado en µg/ml y molaridad.

Resultados y discusión

Tras realizar las extracciones con disolventes, se obtuvieron dos extractos: un extracto orgánico de 620 mg, y uno acuoso de 30 mg. Después de llevar a cabo el fraccionamiento del extracto orgánico mediante VLC-RP se obtuvieron cuatro fracciones. Los pesos se muestran en la tabla 4. A priori, no se realiza una VLC-RP del extracto acuoso, ya que éste contiene sales inorgánicas, y normalmente no reporta actividad.

Fracción	RP1	RP2	RP3	RP4
Peso (mg)	441,8	101,3	47,3	41,3

Tabla 4.- Pesos obtenidos de cada fracción, tras ser concentradas y vializadas.

A continuación fueron enviados 0,15 mg de cada una de las fracciones y del extracto acuoso al departamento de Screening, para el análisis de la actividad citotóxica. Para evaluar la actividad citotóxica de los compuestos se utilizan las cuatro líneas celulares tumorales ya mencionadas. La razón por la que se utilizan estas líneas celulares concretas para el análisis de citotoxicidad de los compuestos, es que las líneas de cáncer de mama, de cáncer de pulmón y de cáncer colorrectal, actualmente corresponden a los tres cánceres más frecuentes [1], mientras que la línea celular de páncreas, proviene de un cáncer con muy mal pronóstico y con baja respuesta a los tratamientos de primera línea (quimioterapia, radioterapia y cirugía). Los resultados del análisis de actividad reportados se muestran en la figura 2.

Pos	Sample	Extr	Description	Aliquot	Organism	Assay	Sel	Colon				Lung-NSCLC				Breast				Pancreas			
								HT29		A549		MDA-MB-231		PSN1		HT29		A549		MDA-MB-231		PSN1	
								25	5	1	25	5	1	25	5	1	25	5	1	25	5	1	
ORMA113435 DP1FR/002403																							
29	ORMA113435	RP	DILI-287	ORMA113435-QUI-D1DM/001RP/001	Capnella	AT-SC 16/01/2013		84,3	112,3	104,2	80,2	102,4	104,1	96,7	101,2	102,3	84	110,6	109,4				
30	ORMA113435	RP	DILI-287	ORMA113435-QUI-D1DM/001RP/002	Capnella	AT-SC 16/01/2013		-07,3	-25	84,6	33,1	80,7	87,4	37,1	78,1	101,7	-98,7	-90,9	-50				
31	ORMA113435	RP	DILI-287	ORMA113435-QUI-D1DM/001RP/003	Capnella	AT-SC 16/01/2013		-96,6	-83,6	54	-88,8	85,7	92,4	2	85,9	97,9	-88,7	-81,1	89,9				
32	ORMA113435	RP	DILI-287	ORMA113435-QUI-D1DM/001RP/004	Capnella	AT-SC 16/01/2013		82,8	78,2	79,3	74,1	93,2	99,4	52,5	83,5	76	83,9	96,3	92,7				
33	ORMA113435	A	DILI-287	ORMA113435-QUI-H1A/001	Capnella	AT-SC 16/01/2013		83,7	80,6	77,6	51,2	75,2	77,1	59,5	90,3	87,3	67,3	87,2	89,6				

Selection criteria: 1) At least three cell lines: <-25%; <25%; <100%. 2) One cell line: <-50% at all concentrations tested.
 Color Code for Macro Sample: Scuba Diving (blue) Rebreather - Medium Depth (50 m) (grey) Rebreather - Deep Water (80m) (pink)
 PharmaMar, S.A. (Grupo Zeltia) - Cell Biology Department - Page 7/9 - Report generated on 24/09/13

Figura 2.- Resultados de actividad de las fracciones de RP y del extracto acuoso de la ORMA 113435.

Los baremos que determinan si una fracción es o no activa, establecen que, para que sea activa debe cumplir una de estas dos condiciones:

- Al menos debe haber tres líneas celulares con un valor más negativo del -25%, más bajo del 25% y más bajo del 100%, en sus tres concentraciones.

- Al menos debe haber una línea celular con un porcentaje más negativo del -50% en todas las concentraciones realizadas.

Pos	Sample	Extr	Description	Aliquot	Organism	Assay	Sel	Colon			Lung-NSCLC			Breast			Pancreas		
								HT29			A549			MDA-MB-231			PSM1		
								25	5	1	25	5	1	25	5	1	25	5	1
ORMA113435 DP1FR/002418																			
17	ORMA113435	RP	DILI-287	ORMA113435-QUI-01/DM/001RP/002	Capnella	AT-SC 29/01/2013	active	-85,8	-86,8	49,4	-4,3	-48,7	68,3	-15,3	78,4	69,2	-64,2	-97,4	-81,2
18	ORMA113435	RP	DILI-287	ORMA113435-QUI-01/DM/001RP/003	Capnella	AT-SC 29/01/2013		-86,2	-28,1	62,1	-48,8	74,5	92	-18,4	75,9	84,7	-85,8	-77,7	68,5

Selection criteria: 1) At least three cell lines: <-25%; <25%; <100%. 2) One cell line: <-50% at all concentrations tested.
 Color Code for Macro Samples: Souba Diving (blue) Rebreather - Medium Depth (50 m) (grey) Rebreather - Deep Water (80m) (pink)
 PharmaMar, S.A. (Grupo Zeltia) - Cell Biology Department - Page 7/9 - Report generated on 24/09/13

Figura 3.- Resultados de actividad de las fracciones RP2 y RP3 de la ORMA 113435 enviadas por segunda vez.

Pese a que las fracciones RP2 y RP3 manifestaron actividad antitumoral en la línea celular de páncreas y en la de cáncer colorrectal, no cumplieron las condiciones necesarias para considerarse activas. Por este motivo, se volvieron a reenviar ambas fracciones al departamento de Screening, para confirmar los resultados obtenidos la primera vez. Los resultados se muestran en la figura 3.

En este caso, la fracción RP2 sí cumplió con las condiciones de actividad, por lo que a partir de este momento se continuó trabajando únicamente con ella.

A continuación se realizó una cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) sobre la fracción activa RP2. El cromatograma se muestra en la figura 4.

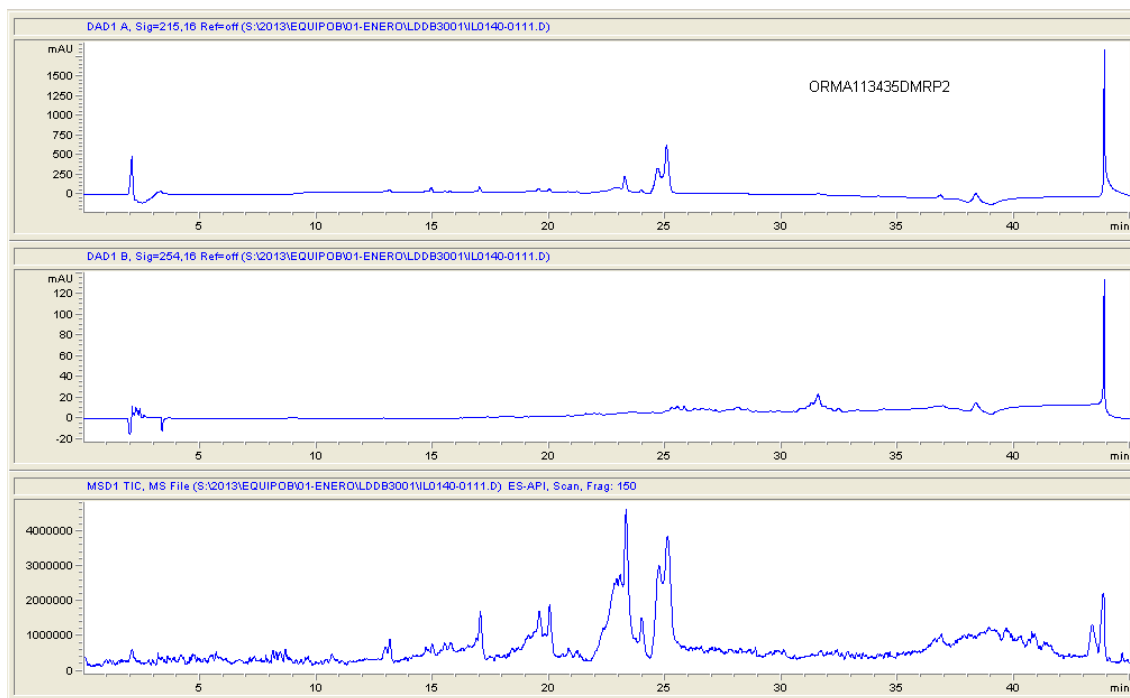


Figura 4.- Cromatograma de la fracción RP2.

De acuerdo con el cromatograma de la figura 4, los compuestos que contenía la fracción RP2 eran de una polaridad media, por lo que teniendo en cuenta el método general empleado en este cromatograma (tabla 2), se procedió a la búsqueda del método idóneo para separar adecuadamente los compuestos contenidos en esta fracción, a través de los cálculos correspondientes y mediante diversas pruebas empleando una columna analítica. Finalmente se decidió emplear la columna XBridge con el método especificado en la tabla 3.

Para la recolección de los diferentes compuestos que contenía la fracción se utilizó la columna XBridge preparativa, en la que se consigue cargar mayor cantidad de muestra, y por consiguiente, acortar el tiempo de recolección. El cromatograma que se obtuvo aparece en la figura 5. Cada pico, muestra su tiempo de retención en la columna.

Los picos recogidos separadamente, aparecen en el cromatograma de la figura 5 nombrados como "HP" y el número correspondiente. El resto del cromatograma, que contiene picos con baja absorción ultravioleta, se recogió en la fracción HP1. De acuerdo con esto se obtuvieron 9 fracciones. El peso de cada fracción se muestra en la tabla 5.

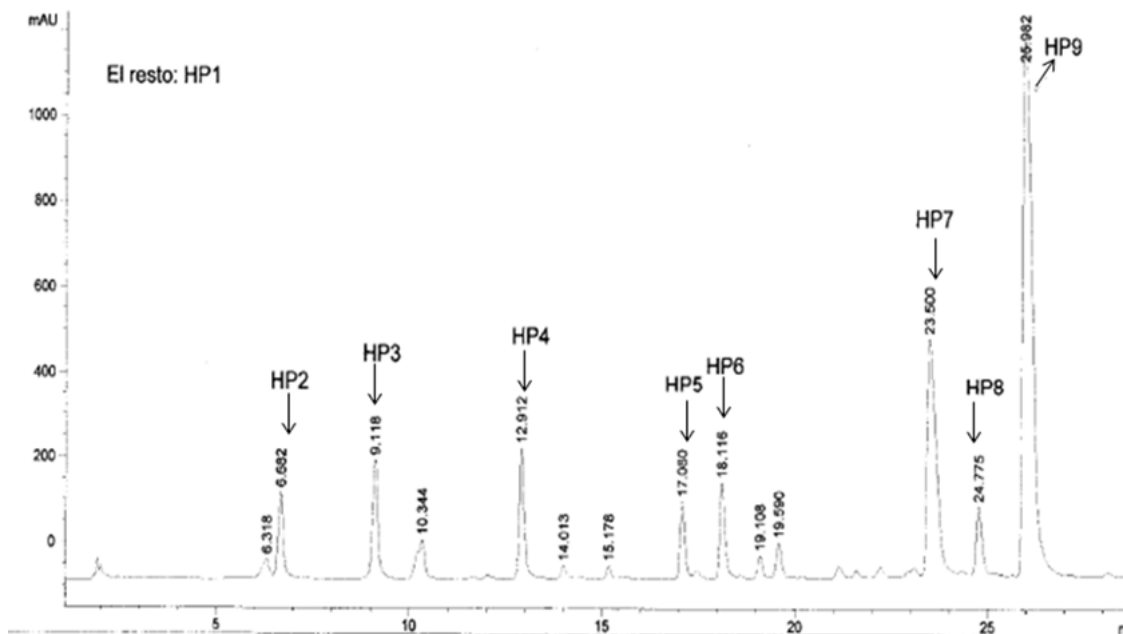


Figura 5.- Cromatograma de la fracción RP2 donde se muestran las distintas fracciones que se recogieron separadamente.

Fracción	HP1	HP2	HP3	HP4	HP5	HP6	HP7	HP8	HP9
Tiempo retención (min)	-	6,682	9,118	12,912	17,080	18,116	23,500	24,775	25,982
Peso (mg)	23,6	1,8	1,8	2,2	1,9	3,0	13,9	2,1	23,3

Tabla 5.- Pesos y tiempos de retención de las fracciones obtenidas por HPLC.

Pos	Sample	Extr	Description	Aliquot	Organism	Assay	Sel	Colon			Lung-NSCLC			Breast			Pancreas		
								HT29			A549			MDA-MB-231			PSN1		
								25	5	1	25	5	1	25	5	1	25	5	1
ORMA113435 DP1FR002510																			
41	ORMA113435	HPLC	DILI-287	ORMA113435-QUI-01DM/001RP002HPLC001	Capnella	AT-SC 24/04/2013		-54,8	-32,7	71,7	-34,9	76,7	88,9	9,8	84,3	95,8	-87	-39,5	-44,7
42	ORMA113435	HPLC	DILI-287	ORMA113435-QUI-01DM/001RP002HPLC002	Capnella	AT-SC 24/04/2013		113,3	83,9	118,9	102,9	94,7	100,6	104,6	93,2	99,1	61,8	82,1	95,6
43	ORMA113435	HPLC	DILI-287	ORMA113435-QUI-01DM/001RP002HPLC003	Capnella	AT-SC 24/04/2013		0,5	8,4	73,7	9,3	27	94,7	-3,6	78,9	103	-76,2	-36,3	77,6
44	ORMA113435	HPLC	DILI-287	ORMA113435-QUI-01DM/001RP002HPLC004	Capnella	AT-SC 24/04/2013		108,7	99,9	109,5	102,9	96,2	99,9	103,1	92	99,6	100	89,1	103,3
45	ORMA113435	HPLC	DILI-287	ORMA113435-QUI-01DM/001RP002HPLC005	Capnella	AT-SC 24/04/2013		112,8	113,8	109,1	135,5	92,5	101,6	103,1	101	101,9	36,4	88,6	115,3
46	ORMA113435	HPLC	DILI-287	ORMA113435-QUI-01DM/001RP002HPLC006	Capnella	AT-SC 24/04/2013		16,3	94,5	103,4	21	90,3	96,1	91,6	96,2	99,6	21,2	58,1	111,4
47	ORMA113435	HPLC	DILI-287	ORMA113435-QUI-01DM/001RP002HPLC007	Capnella	AT-SC 24/04/2013		111,9	105,2	102,2	101,7	89,6	93	117,5	102,2	94,1	98	88,1	67,4
48	ORMA113435	HPLC	DILI-287	ORMA113435-QUI-01DM/001RP002HPLC008	Capnella	AT-SC 24/04/2013		73,9	92,5	94,4	78,3	79,3	80,6	67,6	64,7	80,9	74,8	89,6	
49	ORMA113435	HPLC	DILI-287	ORMA113435-QUI-01DM/001RP002HPLC009	Capnella	AT-SC 24/04/2013	Active	-67,3	-50,3	47,3	35,6	67,5	64,4	36,3	83,1	97,4	-90,6	-86,2	-77

Selection criteria: 1) At least three cell lines: <-25%; <25%; <100%. 2) One cell line: <-50% at all concentrations tested.

Color Code for Macro Samples: Scuba Diving (blue) Rebreather - Medium Depth (50 m) (grey) Rebreather - Deep Water (80m) (pink)

PharmaMar, S.A. (Grupo Zeltia) - Cell Biology Department - Page 7/9 - Report generated on 24/09/13

Figura 6.- Resultados de actividad de las fracciones de HPLC.

Nuevamente, fueron enviados 0,15 mg de cada fracción al departamento de Screening para un análisis de actividad, con el fin de esclarecer cuál o cuáles de las moléculas era/n la/s responsable/s de la actividad citotóxica que manifestaba inicialmente la fracción RP2.

Los resultados de actividad reportados por el departamento de Screening en referencia a las fracciones de HPLC se muestran en la figura 6.

De acuerdo con los baremos prefijados para determinar la positividad o negatividad de la actividad citotóxica de una fracción, solo la HP9 resultó activa, por obtenerse un valor más negativo de un -50% de actividad citotóxica en las tres concentraciones de la línea PSN1 de pancreas.

Tras realizar un HPLC-MS de todas las fracciones procedentes de la purificación mediante HPLC, se determinó el peso molecular de cada molécula, y se comparó el espectro de masas con los existentes en la base de datos de Pharmamar, para determinar si eran moléculas nuevas, o eran moléculas previamente

aisladas. Se obtuvieron 8 moléculas distintas (HP2-HP8): cinco nuevas (HP3, HP4, HP5, HP6 y HP7) y tres ya aisladas por otros grupos de investigación ajenos a Pharmamar (HP2, HP8 y HP9).

A continuación se realizaron análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de todas las moléculas, lo que permitió elucidar la estructura molecular mediante la determinación de los carbonos y los protones de la molécula y las correlaciones existentes entre ambos.

Elucidación estructural del compuesto 1. Comparación con los compuestos 2 y 3.

El compuesto que salió activo, correspondiente a la fracción HP9, lo llamaremos compuesto 1, al de la HP2, compuesto 2, y al de la HP8, compuesto 3.

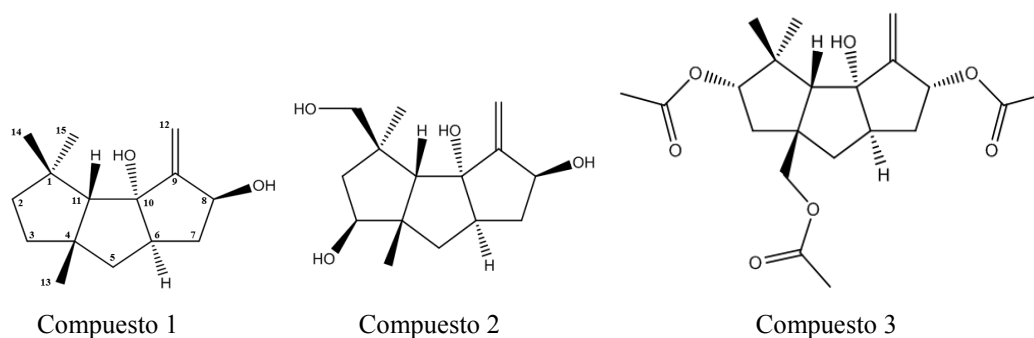


Figura 7.- Compuestos 1, 2 y 3. Estructura de las moléculas contenidas en la fracción HP9, HP2 y HP8, respectivamente.

El espectro de masas del compuesto 1 se muestra en la figura 8. El peso de este compuesto es de $M=236,2$ g/mol. Habitualmente suele aparecer el ión $M+1$ y en algunos casos, el $M+23$ ($M+Na$), pero estos no aparecen en este espectro de masas. En este caso el peso molecular se deduce a partir de dos fragmentaciones que corresponden a pérdidas de OH , $M-17$ (219,2 g/mol), pérdida de un OH y $M-34$ (201,4 g/mol), pérdida de 2 OH .

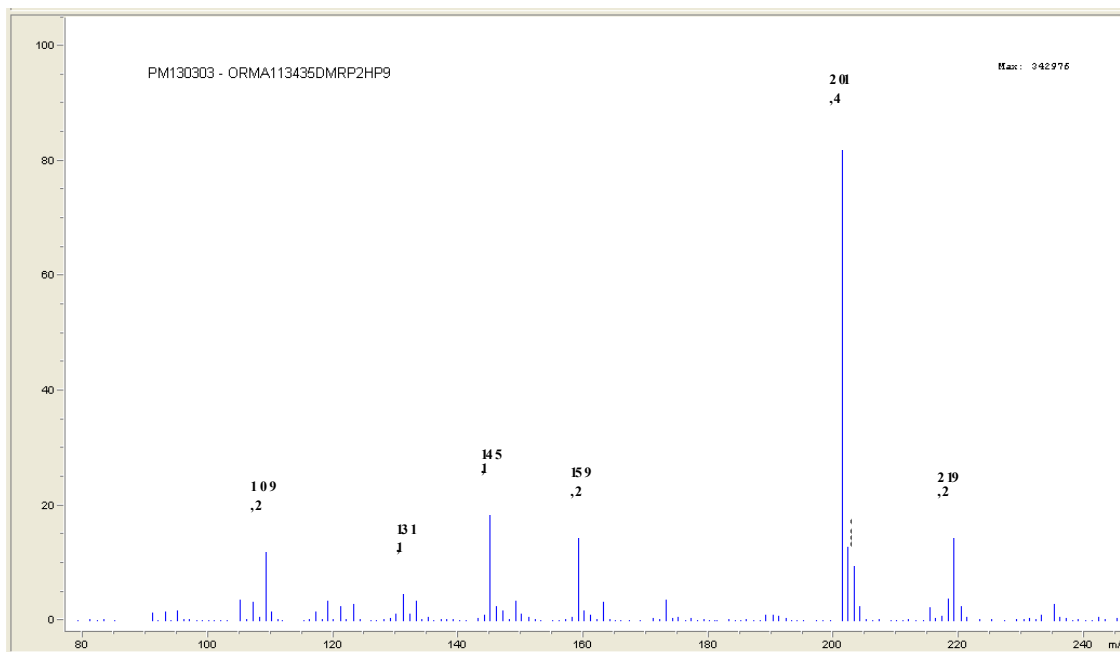


Figura 8.- Espectro de masas del compuesto 1.

En la tabla 6 se muestran los datos extraídos de los diferentes análisis de RMN realizados con la molécula que contenía la fracción HP9 (compuesto 1), que permitieron elucidar la estructura de la misma. El 1H -RMN (anexo 1) da información del número y tipo de hidrógenos diferentes que hay en la molécula. La multiplicidad de la señal da información de los protones cercanos acoplados y la posición en el espectro (desplazamiento químico), al igual que en el ^{13}C (anexo 2), determina el entorno químico del núcleo, y por tanto da información de grupos funcionales a los que pertenecen o que están cerca. Con el COSY podemos saber la correlación protón-protón en átomos cercanos. El HSQC indica qué hidrógenos están unidos a qué carbonos a un enlace y el HMBC permite conocer las interacciones protón-carbono a dos o tres enlaces. Con toda esta información, se pudo elucidar la estructura del compuesto 1 (figura 7).

El compuesto 1, corresponde a una molécula ya conocida, la $\Delta^9(12)$ -Capnellene- $8\beta,10\alpha$ -diol [3,5,6,8]. Al comparar el espectro de masas y el análisis de RMN de esta molécula con las que contenían las fracciones HP2 y HP8, nombradas como compuesto 2 y compuesto 3 respectivamente, se observó que se trataba de dos análogos, que se diferenciaban exclusivamente en la presencia de una serie de radicales en determinados carbonos de la molécula. Las diferencias entre ellas se muestran en la figura 7 y en la tabla 7. Así, comparando con la molécula $\Delta^9(12)$ -Capnellene- $8\beta,10\alpha$ -diol (compuesto 1), la $\Delta^9(12)$ -Capnellene- $3\beta,8\beta,10\alpha$ -14tetrol (compuesto 2) tiene un OH en la posición 3 y otro en la 14, y la $2\alpha, 8\beta, 13$ -triacetoxycapnell-9(12)-ene- 10α ol (compuesto 3) cuenta con tres acetatos en las posiciones 2, 8 (sustituyendo a un OH) y 13.

Nº	δ C (ppm)	δ H (ppm)	Nº H	Multiplicidad	J (Hz)	COSY	HMBC
1	44,1	-	C	-	-	-	3
2	43,2	1,50	CH ₂	m	-	-	11, 14, 15
3	42,1	1,50 1,73	CH ₂	m m	- -	- 8	5, 13
4	50,0	-	C	-	-	-	3, 5, 13
5	46,3	1,30 1,93	CH ₂	dd dd	7,6, 13,8 9,2, 13,8	6 6	3, 7, 11, 13
6	49,7	2,49	CH	m	-	5, 7, 11	5, 7, 11
7	38,0	1,50 2,35	CH ₂	m ddd	- 7,3, 8,5 13,8	- 6, 8	5,6
8	73,7	4,80	CH	m	-	3, 6, 7, 12	6, 7, 12
9	162,5	-	C	-	-	-	6, 7, 11, 12
10	90,3	-	C	-	-	-	5, 6, 7, 12
11	65,8	1,87	CH	s	-	5, 6	3, 5, 13, 15
12	109,8	5,33	CH ₂	s	-	8	-
13	32,8	1,08	CH ₃	s	-	-	3, 5
14	31,5	1,15	CH ₃	s	-	-	2, 11, 15
15	24,1	1,27	CH ₃	s	-	-	3, 11, 14

Tabla 6.- Tabla con la información extraída de los distintos análisis de RMN del compuesto 1.

Molécula	Fracción	Nº Compuesto	Fórmula química	Peso molecular (gr/mol)
$\Delta^9(12)$ -Capnellene- $8\beta,10\alpha$ -diol	HP9	1	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	236,2
$\Delta^9(12)$ -Capnellene- $3\beta,8\beta,10\alpha$ -14tetrol	HP2	2	C ₁₅ H ₂₄ O ₄	268,2
$2\alpha, 8\beta, 13$ -triacetoxycapnell-9(12)-ene- 10α ol	HP8	3	C ₂₁ H ₃₀ O ₇	394,2

Tabla 7.- Comparación de las moléculas de las fracciones HP2, HP8 y HP9.

Las moléculas nuevas se registraron en la base de datos de Pharmamar, y todos los compuestos puros se enviaron al departamento de Screening para realizar un último análisis de citotoxicidad (figura 9). La condición que debe cumplir la molécula, para que sea aceptada como potencial antitumoral es que uno de los tres parámetros determinados (GI50, TGI o LC50), sea igual o mayor a 10^{-7} M.

Pos	Compound Batch num	Shipment	Dil	External Ref Project	Aliquot	Assay	Lung-NSCLC		Colon		Breast		Pancreas		
							A549	HT29	MDA-MB-231	PSN1					
DP1CP/000952							GI50	> 1.0E+01	> 4.23E-05	5.3E-01	2.24E-06	> 1.0E+01	> 4.23E-05	4.2E-01	1.79E-06
23							TGI	> 1.0E+01	> 4.23E-05	9.2E-01	3.89E-06	> 1.0E+01	> 4.23E-05	5.3E-01	2.24E-06
1817LA072F9							LC50	> 1.0E+01	> 4.23E-05	1.6E+00	6.77E-06	> 1.0E+01	> 4.23E-05	6.6E-01	2.79E-06
DP1CP/000952							GI50	> 1.0E+01	> 3.73E-05	> 1.0E+01	> 3.73E-05	> 1.0E+01	> 3.73E-05	> 1.0E+01	> 3.73E-05
17							TGI	> 1.0E+01	> 3.73E-05	> 1.0E+01	> 3.73E-05	> 1.0E+01	> 3.73E-05	> 1.0E+01	> 3.73E-05
1817LA072F8							LC50	> 1.0E+01	> 3.73E-05	> 1.0E+01	> 3.73E-05	> 1.0E+01	> 3.73E-05	> 1.0E+01	> 3.73E-05
DP1CP/000952							GI50	> 1.0E+01	> 2.54E-05	> 1.0E+01	> 2.54E-05	> 1.0E+01	> 2.54E-05	> 1.0E+01	> 2.54E-05
22							TGI	> 1.0E+01	> 2.54E-05	> 1.0E+01	> 2.54E-05	> 1.0E+01	> 2.54E-05	> 1.0E+01	> 2.54E-05
1817LA072F8							LC50	> 1.0E+01	> 2.54E-05	> 1.0E+01	> 2.54E-05	> 1.0E+01	> 2.54E-05	> 1.0E+01	> 2.54E-05

Figura 9.- Actividad de los compuestos puros 1, 2 y 3, en el orden citado, expresada en $\mu\text{g/mL}$ y en molaridad.

Tras analizar los resultados de actividad obtenidos con nuestros compuestos puros 1, 2 y 3, se determinó que ninguno de ellos había alcanzado *in vitro* un valor de actividad citotóxica suficientemente alto como para avanzar a un ensayo *in vivo*, amén de que se trataba de compuestos ya conocidos.

Conclusiones

En la presente memoria, se ha detallado el método empleado para el aislamiento de compuestos con actividad citotóxica a partir de organismos marinos. Partiendo de un espécimen del género *Capnella*, se han obtenido tres moléculas pertenecientes al grupo de los “capnellenes”. Estas moléculas han mostrado una actividad antitumoral moderada, en consonancia con los resultados reportados por otras investigaciones ajenas a Pharmamar, donde se utilizaron otras líneas celulares, tales como HELA y células KB [5]; por este motivo, sería interesante probar los efectos de estos compuestos en otras líneas celulares tumorales, para determinar si los niveles de actividad citotóxica son más altos en otros tipos de cáncer. Por otro lado, los capnellenes no solo han demostrado tener efecto antitumoral, sino que también han sido catalogados como posible tratamiento antiinflamatorio en enfermedades neuroinflamatorias [3]. En definitiva, la investigación en relación a esta molécula no debería finalizar aquí, ya que probablemente, con futuros análisis, se descubrirían nuevos efectos de estas moléculas en otros tipos de cáncer y en otras patologías.

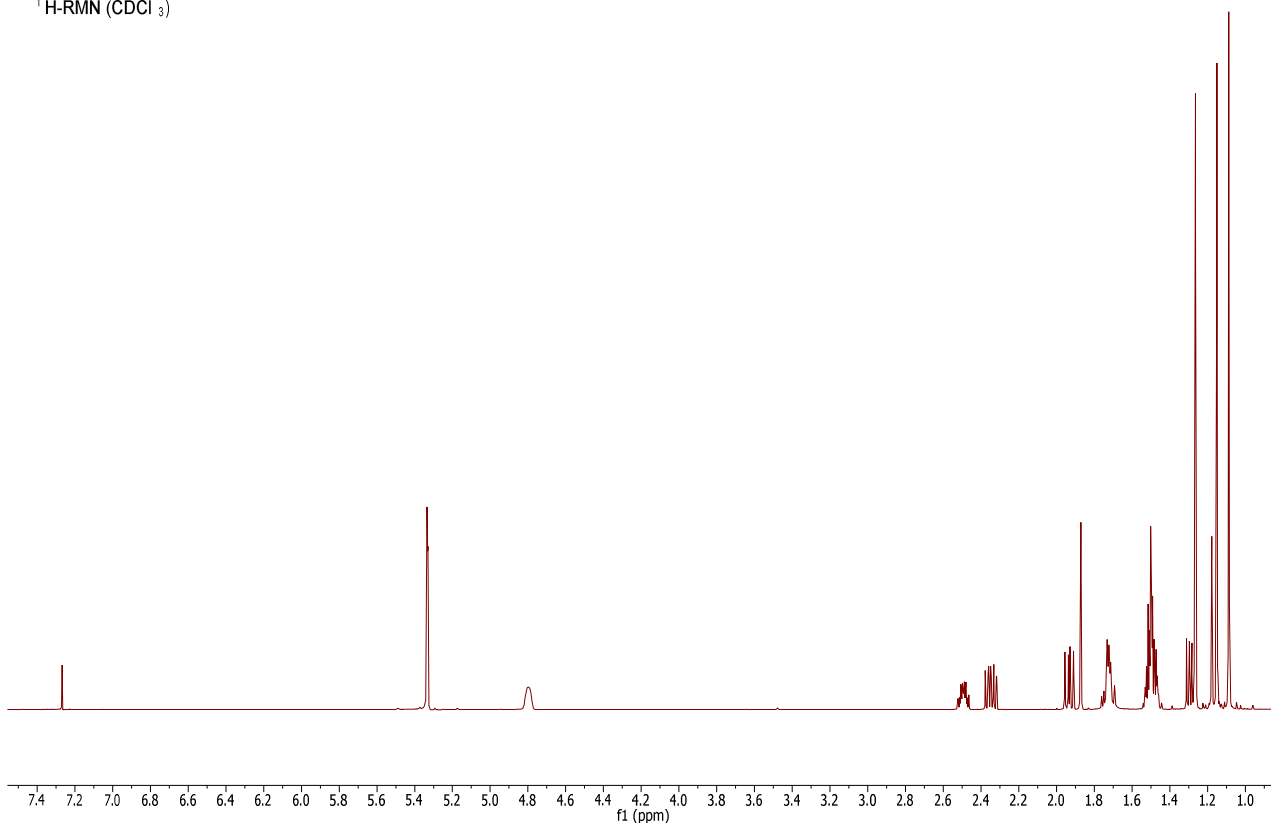
Referencias

1. Cáncer 2014 (22 Junio). En Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/cancer-report-20140203/es/>
2. Cooper, E.L.; Hiradabayashi, K.; Strychar K.B. y P.W. Sammarco. 2014. Coral and Their Potential Applications to Integrative Medicine. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 2014: 184959.
3. Jean, Y.H.; Chen, W.F.; Sung, C.S.; Duh, C.Y.; Huang, S.Y.; Lin, C.S.; Tai, M.H.; Tzeng, S.F. y Z.H. Wen. 2009. Capnellene, a natural marine compound derived from soft coral, attenuates chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. British Journal of Pharmacology. 158(3): 713-725.
4. Pawlik J.R. 1993. Marine Invertebrate Chemical Defenses. Chemical Reviews. 93: 1911-1922.
5. Shen, Y.; Tzeng, G; Kuo, Y. y A.T. Khalil. 2008. Cytotoxic Activity of Capnellene-8 β ,10 α -diol Derivatives from a Soft Coral *Capnella* sp. Journal of the Chinese Chemical Society. 55: 828-833.
6. Chang, C.; Wen, Z.; Wang, S. y C. Duh. 2008. Capnellenes from the Formosan Soft Coral *Capnella imbricata*. Journal of Natural Products. 71(4):619-621.
7. Vichai, V. y K. Kirtikara. 2006. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. Nature Protocols. 1: 1112-1116.
8. Sheikh, Y.M.; Singy, G.; Kaisin, M.; Eggert, H. y C. Djerassi. 1976. Chemical studies of marine invertebrates-XIV. Four representatives of a novel sesquiterpene class-the capnellane skeleton. Tetrahedron. 32:1171-1178.

Anexos

Anexo 1.- ¹H-RMN del compuesto 1

¹H-RMN (CDCl₃)



Anexo 2.- ¹³C-RMN del compuesto 1.

¹³C-RMN (CDCl₃)

