







Evaluación de la actividad citotóxica de derivados de la clorofila microalgal en líneas celulares

Evaluation of the cytotoxic activity of microalgal chlorophyll derivatives in cell lines

Arriaga-Montoya, Sabrina I. , Chávez-Ávalos, Fernando , Jiménez-Zúñiga, Marcos I. , Rodríguez-Cuevas, Eduardo , Fuentes Hernández, Janeth  y Alarcón Bonilla, Jesús 

Universidad Tecnológica de Tecámac, División Químico Biológicas, 55749, Tecámac, Estado de México, México.

Resumen

Factores ambientales y genéticos, han deteriorado la calidad de vida de la población, incrementándose los padecimientos crónico degenerativos como el cáncer, donde la cirugía o la quimioterapia afectan la salud del paciente. La fototerapia como tratamiento alternativo basada en la administración de oxo clorofila, es absorbida por células cancerosas y activada al exponerlas a luz roja generando radicales libres, alterando su metabolismo. La clorofila A se obtuvo a partir de *Chlorella spp.* en fotobiorreactores con medio basal de Bold modificado con almidón de arroz en fotoperiodos de 12 h. La clorofila A se purificó en una columna de sílica gel eluyendo con etanol absoluto y concentrando por rotavapor. La oxoclorofila A se obtuvo por pirolisis en anoxia o acidificación. La actividad antioxidante se midió por el método del guayacol. Se determinó su efecto citotóxico en *Artemia salina* a diluciones 1:13, 1:20 y 1:40 de oxoclorofila A, registrando una mayor citotoxicidad en la obtenida por pirolisis, con una DL_{50} calculada (Graphpad Prism) de 1.198%. Posteriormente, se evaluará su efecto citotóxico en líneas celulares humanas sanas y malignas y en ratón.

Palabras Clave:

Chlorella spp., Citotoxicidad, Clorofila A, Fototerapia, Oxoclorofila A, Microalgas

Abstract

Environmental and genetic factors have deteriorated the quality of life of the population, increasing chronic degenerative diseases such as cancer, where surgery or chemotherapy affect the patient health. Phototherapy as alternative treatment, which is based on the administration of oxo chlorophyll, is absorbed by cancer cells, and activated by exposing them to the red light, generating free radicals, altering their metabolism. Chlorophyll A was obtained from *Chlorella spp.* in photobioreactors with Bold basal medium modified using rice starch in 12 h photoperiods. Chlorophyll A was purified by silica gel column eluting with absolute ethanol, concentrated by rotary evaporator. Oxo chlorophyll A was obtained by pyrolysis under anoxic conditions and by acidification. Its antioxidant activity was measured by the guaiac method. Its cytotoxic effect was determined in *Artemia salina* at 1:13, 1:20 and 1:40 dilutions of oxochlorophyll A. Higher cytotoxicity was registered than the one obtained by pyrolysis. LD_{50} calculated (Graphpad Prism) was 1.198%. Subsequently its cytotoxic effect in healthy and malignant human cell lines and in mice it will be evaluated.

Keywords:

Chlorella spp., Cytotoxicity, Chlorophyll A, Phototherapy, Oxochlorophyll A, Microalgae

1. Introducción

Los efectos bioacumulativos de contaminantes junto con estilos de vida no saludables, han incrementado las enfermedades crónico-degenerativas como las vasculares, diabetes o cáncer.

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación rápida de células que han perdido la capacidad de controlar su

crecimiento y su número de divisiones (inmortalidad), con cierta des diferenciación de la línea celular a la que le dio origen y que pueden invadir otros órganos, proceso llamado metástasis. Según el INEGI (2018) en el periodo de 2011 a 2016, el rango de edades entre 30 y 59 años se registraron 10 decesos por cada cien mil habitantes específicamente de órganos digestivos. Por último, en el caso específico de cáncer de mama 16 mujeres de 20 años o más por cada 100,000 habitantes mueren en México por esta enfermedad.

*Autor para la correspondencia: jabbio@hotmail.com

Correo electrónico: ileanaarriaga21@gmail.com (Sabrina I. Arriaga-Montoya), fernandochavez.ava@gmail.com (Fernando Chávez-Ávalos), mjimenez.zuniga@hotmail.com (Marcos I. Jiménez-Zúñiga), ercvip@gmail.com (Eduardo Rodríguez-Cuevas), jan_1402@hotmail.com (Janeth Fuentes Hernández)

Los tratamientos para el cáncer son: cirugía, radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia, los cuales tienen sus limitaciones o efectos adversos. Complementariamente se han desarrollado estrategias a partir de extractos purificados y concentrados de vegetales, cianobacterias o microalgas como antocianinas de frutos rojos, bacterioclorofila o la clorofila A respectivamente. Caso específico es la oxoclorofila A obtenida a partir de la oxidación *in vitro* de la clorofila A microalgal que se utiliza en la Terapia Fotodinámica (TFD) (Hynninen, S., y Mesilaakso, 2006).

1.1. Clorofila A y oxo clorofila A

Las clorofilas poseen una estructura porfirínica, formada por cuatro anillos pirrólicos con un átomo de magnesio en su centro, un anillo de ciclopentanona y un éster de fitol unido a uno de los anillos de pirrol que provee a la molécula de una cola lipófila. La diferencia entre las distintas clorofilas existentes (se conocen al menos siete) se encuentran en los sustituyentes que presentan; así la clorofila "a" (verde azulada) presenta un grupo metilo (-CH₃) en el carbono 3, y la "b" (verde amarillento) un grupo aldehído (-CHO) en la misma posición. (Lallana & Lallana, 2003).

La clorofila-A tiene una fórmula química C₅₅H₇₂O₅N₄Mg, exhibe un color visual verde-hierba, y los picos de absorción están a 430nm y 662nm (Olmo, 2012).

La oxo clorofila A es un derivado de la Clorofila-A que se obtiene a partir de la oxidación de ésta por cambio de pH, exposición a luz UV, cambio de temperatura o pirólisis, convertida cuantitativamente en 13²-dimetoxicarbonil-13²-oxo clorofila A, cuando es desaireado en solución de piridina y dejado toda la noche a 100°C en un tubo sellado (Hynninen, S., y Mesilaakso, 2006). El precursor de dicho compuesto que es la clorofila A se puede obtener a partir de la microalga *Chlorella sp.*, que crece en forma aislada con un tamaño entre 2-12 µm, con una reproducción por esporulación en un tiempo entre 8 a 24 h. con un promedio de 20 h. (Infante y col. 2012; Ramírez Carmona y col., 2013; Sandoval Rio Frio, 2013).

1.2. Terapia Fotodinámica

La TFD consiste en la irradiación de un tejido tumoral con una fuente de luz que estimula un agente foto sensibilizante absorbido por las células cancerosas (como las porfirinas a las cuales pertenece la clorofila) en un ambiente rico en oxígeno (Morton, 2002), generando especies reactivas de oxígeno (EROs) que provocan una necrosis por coagulación, inducción de apoptosis celular, micro trombosis de vasos tumorales de neoformación e inflamación intensa de la zona por liberación de factores vasoactivos y procoagulantes. En algunos días se forma una escara que precede a la regeneración del epitelio normal (Cappugi y col. 2001).

La selectividad del tratamiento con respecto al tejido sano adyacente se basa en la mayor capacidad que tienen las células tumorales o alteradas para captar y concentrar la sustancia foto sensibilizante y su menor velocidad de eliminación. El tratamiento fotodinámico se realiza en dos etapas:

- Administración del agente foto sensibilizante mediante una inyección intravenosa absorbido en mayor cantidad por las

células cancerosas. Durante varios días tras la inyección del agente foto sensibilizante, se eliminará de la mayoría de las células normales, pero permanecerá en las células cancerosas (Morton CA, 2002).

- La luz de un láser se dirigirá a las células cancerosas contenidas en la cavidad quirúrgica y en los bordes de resección, activando el agente foto sensibilizante contenido en el interior de las células cancerosas y provocando su muerte (Rappaport, 2012).

En el campo de la oncología, para la evaluación *in vitro* de la citotoxicidad de la oxo clorofila A se pueden emplear líneas celulares (Morales A, 2005) derivadas de las células tumorales obtenidas por biopsia de pacientes, las cuales se propagan en un cultivo celular en condiciones idóneas para ser mantenidas de manera indefinida (Tolosa, 2016).

Por lo que en el presente proyecto se evaluará la inocuidad del extracto de oxo clorofila A y B y se calculará la concentración tóxica en *Artemia salina* como bioindicador y en posteriores estudios evaluar su efecto citotóxico en modelos *in vivo* (Pacheco, 2011).

2. Metodología

En la Figura siguiente se muestra la estrategia experimental realizada durante la investigación

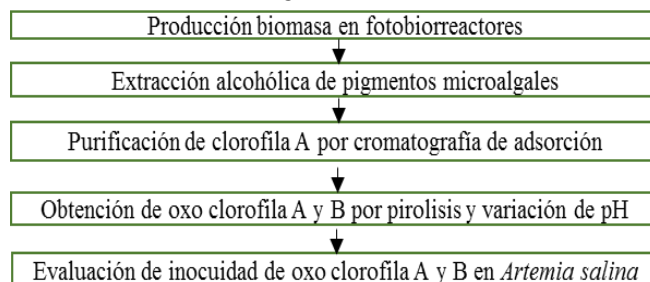


Figura 1: Estrategia experimental para la evaluación de inocuidad de oxo clorofila A y B en *Artemia salina*.

A partir de un consorcio de microalgas se realizó una serie de diluciones decimales utilizando como diluyente Solución Salina Estéril (SSE, NaCl al 0.85%) hasta observar en la dilución correspondiente solo a *Chlorella sp.* por conteo en cámara de Neubauer

La determinación de la densidad celular microalgal se calculó por medio de:

$$D.C. = Cc * 25 * 10000 \quad (1), \quad \text{donde:}$$

D.C. Densidad celular (cel/mL)

Cc: Promedio de células por cuadrante

25: número de cuadrantes centrales

10000: Factor de dilución

Se pesó la cantidad correspondiente por litro de medio de cultivo basal de Bold modificado con almidón de arroz y se disolvieron con agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 1 L. A la par se preparó la mezcla de micronutrientes y se adicionó 1 mL al medio de cultivo. Se homogeneizó y se esterilizó por calor húmedo a 121 °C/15 psi/15 min.

El medio basal de Bold estéril se inoculó con *Chlorella sp.* a una densidad celular de 1×10^7 células/mL y se incubó a

temperatura ambiente por 15 días con una inyección de aire de 60 mL/min a 1000 candelas de iluminación en fotoperiodos de 12 h de luz por 12 h. de oscuridad.

La determinación de la biomasa en peso seco se hizo utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\text{PST} = (\text{PSFM} - \text{PSF}) / \text{VF} \quad (2a)$$

$$\text{PSI} = (\text{PSC} - \text{PSF}) / \text{VF} \quad (2b)$$

$$\text{PSO} = \text{PST} - \text{PSI} \quad (2c) \quad \text{donde:}$$

PST: Peso Seco Final

PSI: Peso Seco Inicial

PSO: Peso seco de la biomasa

PSF: Peso seco del filtro sin muestra

PSFM: Peso del filtro con muestra

PSC: Peso del filtro con muestra calcinada

VF: Volumen de muestra filtrado

A partir de la suspensión celular obtenida en el medio basal de Bold se colectó en tubos Falcon de 50 mL y se hirvió en baño maría a 263 °C/10 min. Posteriormente, se enfriaron y se centrifugaron a 6000 rpm/5 min. De cada tubo se desechó el sobrenadante y al paquete celular se le adicionó 2 mL de etanol al 70%, se hirvió en baño maría a 115 °C/25 min. y posteriormente se congeló a -5 °C/24 h. Se atemperó y se centrifugó a 6000 rpm/5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo de ensaye previamente envuelto en papel aluminio y se determinó su concentración por absorbancia a 630, 645, 663, 664, 665 y 666 nm.

Para la separación de los pigmentos vegetales se llevó a cabo por cromatografía de adsorción en una columna de cromatografía. Para ello se empaquetó una columna con sílica gel a la mitad de su capacidad, se limpió la sílica gel con ácido acético al 25% por elución. Se activó la columna con metanol puro y posteriormente se adicionó el sobrenadante del tubo de ensaye envuelto en papel aluminio en la columna y se eluyó con etanol absoluto. Se colectaron las fracciones eluidas en volúmenes de 5 mL en tubos de ensaye. Por último se concentró la clorofila A obtenida y eliminación del etanol por rotavapor.

Para la cuantificación de la cantidad de clorofilas por el método de Mackinney se aplicaron las siguientes ecuaciones:

$$\text{Clorofila A} = (12,7 * A_{663\text{nm}}) - (2,69 * A_{645\text{nm}}) \quad (3a)$$

$$\text{Clorofila B} = (22,9 * A_{645\text{nm}}) - (4,68 * A_{663\text{nm}}) \quad (3b)$$

$$\text{Clorofila Total} = (20,2 * A_{645\text{nm}}) - (8,02 * A_{663\text{nm}}) \quad (3c)$$

A partir de la clorofila A purificada se llevó a cabo su oxidación por dos métodos.

Por pirolisis: Se colocó en un tubo de ensaye 45 mL de solución de piridina al 0.1%. En otro tubo se adicionó 45 mL de clorofila A. Se taparon los tubos con tapones de hule horadados y unidos por medio de un tubo de vidrio en forma de U. Se colocó el sistema de oxidación en un recipiente y se generó las condiciones anóxicas por el sistema Gas Pack y se procedió a calentar a 100 °C por 92 h.

Por choque de pH. Se adicionó 10 mL del extracto purificado de clorofila A con 9 mL de acetona y 1 mL de MgCO₃ 0.1M. Se incubaron por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron a 5000 rpm/5 min. Se decantó el sobrenadante y se adicionó 5 gotas de HCl 0.1

N. Se midió la concentración de la oxo clorofila A por espectrofotometría de absorción (Caez Pérez, 2005).

Se evaluó su actividad antioxidante de la oxo clorofila A por la técnica del guayacol. Para ello, se depositó 1 mL de oxo clorofila A en un tubo de ensaye y se adicionó 6 mL de agua destilada. Se tomó un mL de la mezcla obtenida y se transfirió a un tubo de ensaye con 3 mL de H₂O₂. Se adicionó por triplicado 1 mL de la última mezcla a un tubo de ensaye conteniendo 1 mL de guayacol al 0.5 % en etanol al 50%. Se mezcló e incubó por 15 a 20 min. Se leyeron las muestras a 475 nm.

Se realizó la prueba de dosis letal 50 (DL₅₀) por el método Reed y Muench para evaluar la toxicidad de la oxo clorofila A se realizó un bioensayo con *Artemia sp.* Para tal fin, en una placa de poliestireno estéril se depositó 20 mL de Solución de NaCl al 3% a 12 pocillos. Se rotularon 4 grupos de pocillos y se evaluaron tres concentraciones 0.5, 1.0 y 1.5 mL de los extractos de oxo clorofila A obtenidos por pirolisis y por choque de pH (el control positivo se adicionó las mismas cantidades de etanol absoluto). Se colocaron 10 artemias en cada pocillo (sin quistes) e incubaron a temperatura ambiente por 20 h. Se cubrió la placa con papel aluminio. Se contabilizaron las artemias vivas al final de periodo de incubación.

3. Resultados y discusión

Hasta la dilución una dilución 1:1x10¹⁰ se consiguió aislar al género *Chlorella spp* a partir del consorcio microalgal (Ver Figura 1) con una densidad celular de 1.125x10⁶ cel/mL.

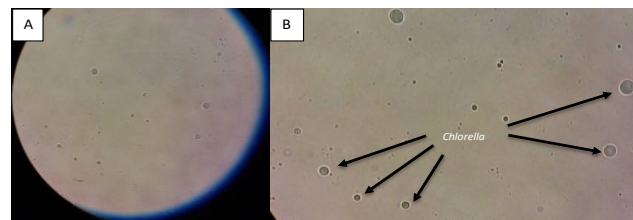


Figura 2: Morfología microcópica de *Chlorella spp.* a 10X(A) y 40X (B).

Al final del periodo de incubación se obtuvo una densidad celular de 2.95x10⁷ cel/mL lo que correspondió a 1.69 mg/mL de biomasa por peso seco, resultados similares obtenidos por Arredondo Vega (2007).

Con base a las absorbancias registradas en la Tabla 1., la concentración obtenida en el extracto etanólico al 70% de clorofila A fue de 8.4 mg/mL, Clorofila B fue de 3.71 mg/mL y de Clorofila Total fue de 12.11 mg/mL.

Tabla 1: Absorbancias registradas del extracto alcohólico a partir de *Chlorella spp*

λ (nm)	Absorbancia
645	1.602
663	0.593

Las concentraciones de los pigmentos purificados a la salida de la columna de adsorción fueron: 10% de Caroteno, 27% de Clorofila A, 48% de Clorofila B y 16% de Xantofilas.

La concentración de oxo clorofila A y B obtenida por el método de pirolisis fue de 0.028 mg/mL y por el método de choque por pH fue de 0.035 mg/mL En ambos casos se obtuvo un efecto antioxidante similar por el método del guayacol.

Para la evaluación de la toxicidad inicial del extracto alcohólico de la clorofila, así como de la oxo clorofila A y B obtenida por pirolisis y por choque de pH antes de la exposición a la luz roja, se muestra en la Tabla 2 con volúmenes de 0.5, 1.0 y 1.5 mL de cada extracto.

Tabla 2: Efecto de la toxicidad en *Artemia salina*.

Extracto	Sobrevivencia (%)		
	0.5 mL	1.0 mL	1.5 mL
Alcohólico al 70%	90	70	0
o-clorofila A por pirolisis	0	0	0
O-clorofila A y B por pirolisis	100	60	30
O-clorofila A y B por choque pH	90	80	80

Como se puede apreciar el efecto de toxicidad fue del 100 % en los tres volúmenes evaluados de oxo clorofila A obtenida por pirolisis, de acuerdo con Rapport y col. (2012) se pudo haber generado anilina a partir de piridina al que se le atribuye su efecto citotóxico. Estos resultados no eran los esperados ya que aún no se habían expuesto a la luz roja para desencadenar su efecto citotóxico. En cambio, donde hubo una mayor supervivencia fue en la oxo clorofila A y B obtenida por choque de pH, aunque lo esperado debió ser una supervivencia al 100 % antes de la exposición a la longitud de onda de la luz roja.

Para evaluar el grado de toxicidad de los extractos a partir del cálculo de la dosis letal 50 (DL₅₀) utilizando el programa Graphpad Prism se obtuvieron unas concentraciones del 1.087% para el extracto alcohólico de clorofila A, oxo clorofila A y B por pirolisis 1.198% y para el extracto de oxo clorofila A y B por choque de pH fue del 1.299%. cómo se muestran en las siguientes figuras.

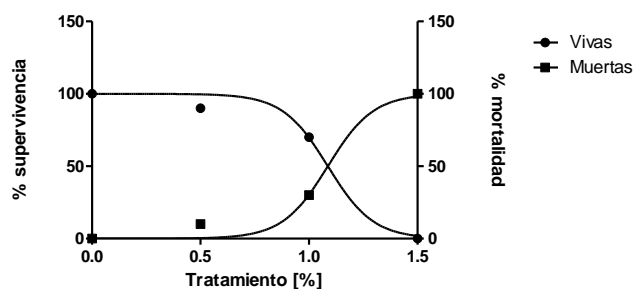


Figura 3: DL₅₀ para el extracto alcohólico de clorofila A

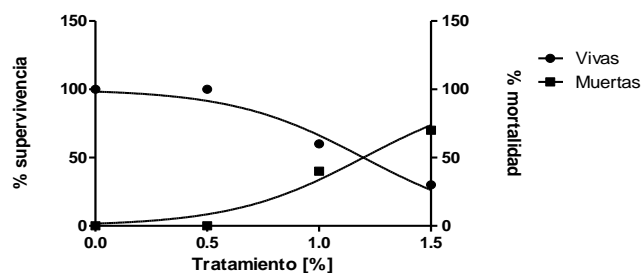


Figura 4: DL₅₀ para el extracto de oxo clorofila A y B obtenido por pirolisis

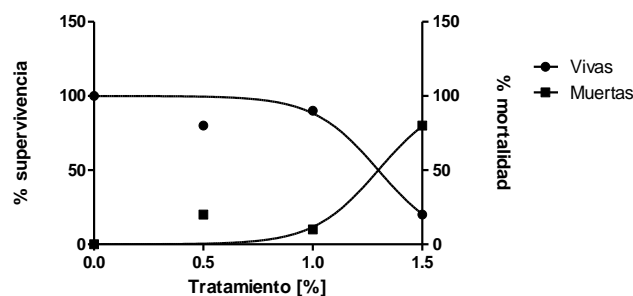


Figura 5: DL₅₀ para el extracto de oxo clorofila A y B obtenido por choque de pH

4. Conclusiones

A partir de una biomasa final de 1.69 mg/mL se obtuvieron un 69% de clorofila A y 31% de clorofila B en el extracto alcohólico al 70%. La concentración de los pigmentos purificados por cromatografía de adsorción fue de 48% de clorofila B, 27% de clorofila A, 16% de Xantofilas y 10% de Caroteno.

Por el método de choque por pH se obtuvo un 125 % más de oxo clorofila A comparado con el registrado por el método de pirolisis.

Sin embargo, los resultados esperados de inocuidad o citotoxicidad inicial de los diferentes extractos no fueron los esperados ya que el 100% de las artemias salinas murieron al final de la prueba con oxo clorofila A obtenida por pirolisis presumiblemente por la presencia de anilina generada a partir de la piridina durante la reacción. En cambio, el mejor comportamiento se registró en el extracto de oxo clorofila A y B obtenido por choque de pH.

Es por ello que en experimentos futuros se optimizará un método de purificación para la oxo clorofila A obtenida por pirolisis y por choque de pH. Además de evaluar el efecto citotóxico de ambos extractos después de la exposición a la luz roja de las artemias y calcular la dosis letal 50 en líneas celulares y modelos animales con tumores epiteliales.

Referencias

- Arredondo, V. B. O. 2007. Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico. 23-25. La paz, Baja California, México. Recuperado el 03 de Marzo de 2020, de https://www.researchgate.net/publication/281783352_Determinacion_de_peso_seco_y_contenido_organico_e_inorganico
- Caez, P. A., 2005. Decoloración de anaranjado de metilo a través de un proceso de fotocatalisis de clorofila activada. Bogota, Colombia. Recuperado el 20 de Febrero de 2020, de <https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/10539/u258425.pdf?sequence=1>
- Cappugi P, C. P., 2001. Topical 5-aminolevulinic acid and photodynamic therapy in dermatology. A minireview. J Chemother. DOI: 10.1179/joc.2001.13.5.494
- Hynninen, P. H., S., L. T., & Mesilaakso, M. (23 de enero de 2006). Demethoxycarbonylation and oxidation of 13 2(S/ R)-hydroxy-chlorophyll a to 13 2-demethoxycarbonyl-13 2-oxo-chlorophyll a and Mg-purpurin-18 phytol ester. Helsinki, Finland. DOI: 10.1016/j.tetlet.2005.12.106
- INEGI. (2018). INEGI. Recuperado el 08 de febrero de 2020, de Estadísticas de salud: <https://www.inegi.org.mx/> *
- Infante, C., Angulo, E., Zárate, A., Florez, J. Z., Barrios, F., & Zapata, C., 2012. Propagación de la microalga *Chlorella sp.* en cultivo por lote: Cinética del crecimiento celular. La Serena, Chile 159-164. ISSN: 0718-8706

- Lallana, V. & Lallana, M. d. (2003). Manual de Prácticas de Fisiología Vegetal. 13-16 Recuperado el 15 de Enero de 2020, de http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/fisiologiaveg/m_didactico/manual_practicas/ExtPig_bED.pdf *
- Morales, A. P. P., Pérez, P., Mendoza, R., Compagnone, R., Suarez, A.I., Arvelo, F., Ramírez, J. L & Galindo-Castro, I. (2005). Cytotoxic and proapoptotic activity of ent-16 α -17 α -dihydroxykaurane on human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Cancer Lett.* 218:109-16. DOI: 10.1016/j.canlet.2004.07.009
- Morton, C.A., Brown, S. B., Collins, S., Ibbotson, S., Jenkinson, H., Kurwa, H., Langmack, K., Mckenna, K., Moseley, H., Pearse, A. D., Stringer, M., Taylor, D. K., Wong, G & Rhodes, L.E. (2002). Guidelines for topical photodynamic therapy. *British Photodermatology group. Br J*, 146. DOI:10.1046/j.1365-2133.2002.04719.x
- Olmo, M. (2012). Los Pigmentos en la Fotosíntesis. Obtenido de hyperphysics:<http://hyperphysics.phyastr.gsu.edu/hbasees/Biology/pigpho.html> *
- Pacheco, G. J. D. (2011). Determinación de la toxicidad aguda (CL50) del extracto de polvillo de carbón frente a larvas de *Artemia franciscana*. Cartagena Colombia. Obtenido de <https://core.ac.uk/download/pdf/11054386.pdf>
- Rappaport, S. M., Li, H., Grigoryan, H., Funk, W. E. & Williams, E. R., 2012 Adductomics: characterizing exposures to reactive electrophiles. *Toxicol. Lett.* 213, 83–90 .DOI: 10.1016/j.toxlet.2011.04.002
- Sandoval R, M. A. (Febrero de 2013). Diseño, construcción y propuesta en marcha de un fotobiorreactor piloto para el crecimiento de la microalga *Chlorella sp* en el laboratorios de Biotecnología y energías renovables de la empresa eléctrica Quinto. Ecuador. Recuperado el 21 de Enero de 2020, de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/6487/1/T-ESPE-047130.pdf>
- Tolosa, A. (16 de Septiembre de 2016). Importancia de la validación de las líneas celulares utilizadas en investigación. Obtenido de Genotipia. Genética Médica news. https://genotipia.com/genetica_medica_news/lineas-celulares-validacion/