Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada

BUSQUEDA DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD BIOMEDICA A PARTIR DE MICROALGAS Y FLUIDO CORPORAL DE PESCADO

TESIS
MAESTRIA EN CIENCIAS

DANIEL MURILLO ORTEGA

ENSENADA, B. C., MARZO DEL 2001.

TESIS DEFENDIDA POR

DANIEL MURILLO ORTEGA

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dr. Facundo Joaquín Márquez Rocha
Director del Comité

Dr. Alexei F. Licea Navarro
Miembro del Comité

Dr. Miguel Angel del Río P.
Miembro del Comité

Dr. Sergio Reyes Coca
Miembro del Comité

Dr. Facundo J. Márquez Rocha
Jefe del Depto. de Biotecnología Marina

Dr. Federico Graef Ziehl
Director de Estudios de Posgrado

23 de marzo del 2001

Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada

CICESE

DIVISIÓN DE OCEANOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA MARINA

"BÚSQUEDA DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD BIOMÉDICA A PARTIR DE MICROALGAS Y FLUIDO CORPORAL DE PESCADO"

Tesis de Maestría
presentada como requisito parcial para
la obtención del grado de:

Maestro en Ciencias con
Especialidad en Biotecnología Marina

Presentada por:
Q. F. B. DANIEL MURILLO ORTEGA

Ensenada, Baja California

Marzo de 2001

RESUMEN del proyecto de Maestría de **DANIEL MURILLO ORTEGA**, para la obtención del grado de **MAESTRO EN CIENCIAS** con especialidad **BIOTECNOLOGÍA MARINA**. Ensenada, Baja California, México. Marzo de 2001.

"BÚSQUEDA DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD BIOMÉDICA A PARTIR DE MICROALGAS Y FLUIDO CORPORAL DE PESCADO"

Resumen Aprobado por:

Dr. Facundo Joaquín Marquez Rocha
Director de Tesis

En años recientes, se ha producido un gran interés entre investigadores (como bioquímicos, químicos de productos naturales o farmacólogos) por metabolitos producidos por microalgas. Esto se debe a que se ha reconocido que las microalgas pueden ser una fuente novedosa de metabolitos biomédicamente activos. Se ha descubierto que las microalgas producen nuevos tipos de estructuras no encontradas en plantas superiores o en otras fuentes tradicionales de fármacos (Shimizu, 1996). El propósito de este trabajo fue hacer la bioprospección de compuestos con actividad antimicrobiana y anticancerígena producidos por microalgas.

Se obtuvieron extractos utilizando diclorometano (D) y hexano (H), estos extractos fueron resuspendidos en dimetilsulfóxido (DMSO) y sometidos a pruebas establecidas para buscar actividad antimicrobiana utilizando cultivos de bacterias patógenas causantes de algunas enfermedades comunes. Encontramos que *Staphylococcus aureus* fue la bacteria más sensible al efecto de la mayoría de los extractos de microalgas, sólo en el caso del extracto de *Arthrospira maxima* (D) no se encontró actividad. *Pseudomonas fluorescens* fue sensible a ambos tipos de extractos de *Chaetoceros muelleri, Tetraselmis suecica* y Fluido corporal de pescado, mientras que *Proteus vulgaris* fue susceptible al efecto de los extractos de fluido corporal de Pescado y de *Arthrospira maxima*. Asimismo se utilizó un cultivo en monocapa de una línea celular de cáncer de colon LIM1215 para determinar actividad anticancerígena, observando una muerte celular producida por los extractos utilizados, principalmente por el extracto de *Arthrospira maxima* (H) y *Chaetoceros muelleri* (D), con la excepción del extracto de fluido corporal de pescado (D) que presentó un aparente aumento en el crecimiento celular. Al final de este trabajo se reafirmó la capacidad que tiene estos organismos para producir compuestos que pueden presentar actividad antibacteriana y anticancerígena que pueden ser posteriormente identificados y utilizados como una fuente alterna en la terapéutica.

Palabras clave: microalgas, anticancerígeno, antibacteriano, biomédico.

ABSTRACT of the Masters of Science project by **DANIEL MURILLO ORTEGA**, to obtain the **MASTER ON SCIENCES** degree in **MARINE BIOTECHNOLOGY**. Ensenada, Baja California, México. February 2001.

"SEARCH FOR NEW BIOMEDICALLY ACTIVE COMPOUNDS PRODUCED BY MICROALGAE AND FISH BODY FLUIDS"

Abstract approved by:

Ph D. Facundo Joaquín Marquez Rocha
Thesis Director

In recent years, there has been a great interest in microalgal metabolites among researchers such as natural products chemists, pharmacologists, and biochemists. This interest has been increased because it has been recognized that the microalgae can be a source of biomedically active metabolites or potential drugs. It has been discovered that the microalgae produce new types of compounds not found in superior plants or other traditional sources for drugs (Shimizu 1996). The goal of this work was carry out a bioprospection for new compounds produced by microalgae with antimicrobial and anticancerigen activity.

We obtained two kind of extracts using dichloromethane (D) and hexane (H), these same extracts were resuspended in dimethilsulfoxide (DMSO) and put under a standard procedures to find antimicrobial activity using cultures of pathogenic bacteria which causes some of the most common diseases. It was found that *Staphylococcus aureus* was the most susceptible bacterium to the effects of the microalgae extracts, only in the case of the extract of *Arthrospira maxima* (D) we did not observe any activity on this bacterium. *Pseudomonas fluorescens* was sensible to both extracts of *Chaetoceros muelleri*, *Tetraselmis suecica* and fish body fluid, whereas *Proteus vulgaris* was susceptible to the effect of fish body fluid and *Arthrospira maxima*. As with bacteria, we tested all the microalgae extracts over a culture in monolayer of a cellular line of colon cancer LIM1215 to determine anticancerigen activity, in this case we found that all extracts promote cellular death, mainly the extracts of *Arthrospira maxima* (H) and *Chaetoceros muelleri* (D), with the exception of the fish body fluid (D) extract which appears to enhance cellular growth. At the end of this work we confirmed the capacity of these organisms for the production of compounds, this compounds can show antibiotic and anticancerigen activity and they can be identified and utilized on the therapeutic field.

Key words: microalgae, anticancerigen, antibacterial, biomedical.

DEDICATORIAS

A mis padres
Juventino y Bertha Alicia
que me dieron la vida y que me han apoyado en todas mis decisiones.
Por darme los valores morales y la educación necesaria para llegar hasta aquí. Los quiero mucho.

A mis hermanos que siempre me han apoyado en las buenas y en las malas, los quiero mucho.
(Tino, Kathy y Cristy)

A mis sobrinos que quiero mucho
(Kathia, Daniel y David)

Gracias por creer en mi.

Al Dr. Sergio Reyes, por sus invaluables consejos y por su ejemplo. Por el apoyo brindado durante mi formación académica a lo largo de mi vida.
A su familia.

A la QFB. Xóchitl Cortéz, por enseñarme los valores mas importantes de la vida y por alentarme a seguir adelante. Por ser el ejemplo a seguir de hoy en adelante. Por su amor incondicional.

A mis amigos QFB Yessica Matas, Biol. Darla Torres, QFB Gloria Leyva, Lic. Román Romero, QFB David Barajas, al Oc. Luis González (EL Mochis), QFB Flor Iris Godinez, Lic. Verónica Carrasco por estar conmigo tanto en los momentos difíciles como en los fáciles, por sus consejos y apoyo.

A todos los que me ayudaron a culminar una etapa más de mi vida,
por su apoyo

Gracias a todos los que creen en mi, pero sobre todo gracias a los que no lo hacen.

Gracias

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis **Dr. Facundo J. Márquez** Rocha por su apoyo y dirección y por sus consejos además de ser un buen amigo.

Al **Dr. Alexei F. Licea** Navarro por su apoyo y dirección desde la carrera universitaria y sobre todo durante el desarrollo de este trabajo. Por ser amigo.

A la **Dra. Beatríz Cordero**, por apoyarme con material y equipo, por sus conocimientos brindados y por su siempre disponibilidad.

Al **Dr. Jorge Cruz** por haberme apoyado en la realización exitosa de la etapa experimental.

Al **Doc. Jorge Olmos** por permitir el uso de sus instalaciones, por darme consejos y además por ser amigo.

A la **Maestra Graciela Rivas** por su apoyo y consejos para el desarrollo de los experimentos.

A la **M. en C. Irma Soria** por el apoyo durante el desarrollo de mi tesis.

Al personal de los departamentos de Acuicultura y Biotecnología, tanto técnicos como investigadores, por su apoyo y disposición de ayudarme.

A los miembros del comité de tesis: Dr. Miguel Ángel del Río, Dr. Sergio Reyes Coca, Dr. Alexei Licea por sus comentarios y críticas constructivas que ayudaron a mejorar el trabajo realizado.

A mis compañeros estudiantes de maestría y amigos: *Brenda Ruiz, Nishmed Barreda, Maggie Talamante, al Sr. Ernesto Meza, Rosario Aguayo, Raquel Pedrin, Diana, Florencia, Asunción, Silvia, Galdy, Marisela, Alejandra Mora, Lorena y Leonel Ochoa, Bernardo, Gaby, Sujey, Noemí Hernadez, Jose L. Sánchez, Patty G., Rebeca Vazquez, Karla Cruz, Laura Urzua, Yuri Fujimura, Paco, Gissel, Gisela Escalante, Tatanka, al Marce, Fausto Arellano, Mario, Carlo y Cecilia Rivas, Alejandro y Rosalia, Lobo, Chris, Xochitl Cortéz y a todos los amigos y compañeros del basket.*

A las secres Cecy, Bibi, Ale y María Elena por aguantarme y ser tan amables conmigo.

A CICESE, por la formación académica y económica por el proyecto no. 623119

A CONACyT por su apoyo económico brindado a través de la beca otorgada y el pago de las colegiaturas.

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Formas de acción que puede presentar un agente antimicrobiano.	8
2.	*Staphylococcus aureus.*	16
3.	Cultivo en placa de *Serratia marcecens.*	17
4.	Colonias de *Klebsiella pneumoniae* cultivada en agar.	17
5.	*Proteus vulgaris.*	18
6.	*Pseudomonas fluorescens.*	18
7.	Cultivo en agar de *Pseumonas aeruginosa.*	19
8.	*Chaetoceros muelleri.*	20
9.	*Tetraselmis suecica.*	21
10.	*Arthrospira máxima.*	22
11.	Producción de biomasa de microalgas.	28
12.	Preparación de extractos de microalgas.	29
13.	Aparato de rota evaporación utilizado en la extracción de compuestos.	31
14.	Procedimiento para determinar actividad antimicrobiana, método Bauer-Kirby de difusión en agar.	34
15.	Manera correcta para observar los resultados en forma de halos de Inhibición.	35
16.	Ejemplo de un cultivo celular en monocapa.	38
17.	Estructura de la sal de tetrazolio y mecanismo de transferencia de electrones.	41
18.	Curva de crecimiento de la microalga *Isochrysis* sp en un cultivo de 18 litros.	42
19.	Gráfica de absorbancia contra tiempo de la microalga *Arthrospira maxima* en 18 litros de volumen de cultivo.	43
20.	Curva de crecimiento de *Chaetoceros muelleri* en un volumen de cultivo de 18 litros.	44
21.	Curva de crecimiento para *Tetraselmis suecica* (18 litros).	44
22.	Extractos obtenido a partir de microalgas resuspendidos en DMSO.	45
23.	Fotografía de acercamiento a uno de los halos de inhibición obtenidos de un cultivo de *Staphylococcus aureus* en contra de un extracto de *Tetraselmis suecica* (D).	48
24.	Halos de inhibición producidos por un extracto de *Isochrysis* sp. (D) en un cultivo de *Staphylococcus aureus.*	49
25.	Fotografía de los halos de inhibición observados en un cultivos de *Proteus vulgaris* producidos por el extracto de Fluido corporal de pescado (H).	50
26.	Datos de diámetro de halo de inhibición producido por los extractos de *Tetraselmis suecica* en las diferentes cepas utilizadas.	51
27.	Actividad antimicrobiana de los extractos de *Isochrysis* sp.	52
28.	Datos obtenidos en el ensayo de actividad antimicrobiana de los extractos de *Chaetoceros muelleri.*	53

Figura Página

29. Actividad antimicrobiana de los extractos de *Arthrospira maxima* en las diferentes cepas de prueba. 53
30. Resultados de actividad antimicrobiana para los extractos de *sanguaza de pescado.* 54
31. Valores de absorbancia obtenidos a partir de los ensayos de actividad anticancerígena. 59
32. Porcentaje de muerte celular en los cultivos de LIM1215 propiciada por el contacto con los extractos orgánicos (1 µl de extracto). 60

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Fuentes utilizadas para la preparación de extractos y su denominación	31
II.	Orden en que fueron utilizados los extractos en el cultivo celular	39
III.	Datos de concentración total de extractos y la relación de concentraciones obtenidas con los disolventes utilizados	46
IV.	Resultados de los ensayos de actividad antimicrobiana	47
V.	Datos de absorbancia del ensayo de actividad anticancerígena adicionando 1 µl de extracto.	56
VI.	Resultados del ensayo de actividad anticancerígena	57

INTRODUCCIÓN

El ambiente marino es una excepcional reserva de productos naturales con bioactividad, muchos de los cuales presentan características estructurales no encontradas en compuestos de origen terrestre (Ireland *et al.*, 1988). Cada año, se incrementa el número de metabolitos marinos novedosos que son reportados en la literatura, indicando que el ambiente marino continua siendo una fuente de productos naturales nuevos y se espera que así sea por muchos años más. Actualmente, como resultado de una investigación extensiva, el estudio de productos naturales marinos es reconocido como un componente integral de la química de productos naturales y una fuente importante para el descubrimiento de nuevos fármacos.

En la década de los 60's, la exploración del ambiente marino inició como una excitante fuente para el aislamiento de nuevos compuestos. Inicialmente, el campo de investigación de productos naturales marinos se enfocó en la caracterización química de metabolitos producidos por algas marinas microscópicas y por invertebrados y, hasta la fecha, se han reportado más de 3,700 productos naturales nuevos producidos por estos grupos (Faulkner, 1995). Existen muchos habitats en el mar que han creado nichos para la evolución de diversas formas de vida. El ambiente marino va desde regiones ricas en nutrientes, hasta lugares en donde existe una gran escasez de éstos, en donde sólo unos pocos microorganismos pueden sobrevivir. Como resultado, los microorganismos marinos forman un complejo y diverso ensamblaje de formas de vida microscópica, de las cuales sólo se han podido cultivar o identificar menos del 5 %.

La capacidad metabólica y fisiológica de los microorganismos marinos les ha permitido sobrevivir en sus habitats únicos, también proveen un gran potencial para la

producción de metabolitos. Se estima que menos del 1 % de los compuestos químicos del ambiente marino se han analizado hasta ahora (Bernan *et al.*, 1997).

El descubrimiento de que los organismos marinos representan una rica fuente de metabolitos secundarios no identificados previamente, no es del todo sorprendente, considerando que muchos géneros de algas e invertebrados habitan exclusivamente en el mar. Aunque nuestro conocimiento de "defensa química" y otras actividades celulares de los metabolitos secundarios es poco, los estudios de los compuestos químicos de organismos marinos han sido exhaustivos, produciendo miles de metabolitos únicos y presentando nuevas clases estructurales, así como grupos funcionales y una alta incidencia relativa de halogenación (Jensen y Fenical, 1994).

El segundo grupo más importante de microorganismos a los que se han estudiado sus productos naturales son las microalgas (Shimizu, 1993). A pesar de su tamaño tan pequeño, las microalgas son esenciales para la cadena alimenticia en el ambiente marino, además de ser los principales productores primarios, convirtiendo dióxido de carbono en compuestos orgánicos que son subsecuentemente utilizados por invertebrados y peces. Existen más de 10,000 especies de microalgas, que se encuentran en cinco grandes divisiones (Carté, 1996). En años recientes, se ha producido un gran interés por metabolitos producidos por microalgas con estructuras químicas y bioactividades diversas. Existen dos principales razones por este naciente interés. Primero, se ha reconocido que las microalgas pueden ser una fuente de nuevos metabolitos o fármacos potenciales. Las microalgas han presentado nuevos tipos de estructuras no encontradas en plantas superiores o en otras fuentes tradicionales de fármacos. La segunda razón por la cual las microalgas han llamado la atención, es el descubrimiento de que éstas pueden ser la fuente primaria de algunas

moléculas novedosas encontradas en invertebrados marinos. Muchas de estas estructuras son fármacos con potencial terapéutico, pero que se encuentran en proporciones muy limitadas en los organismos que las producen (Shimizu, 1996).

Las algas marinas producen muchas sustancias biológicamente activas que son características por sus propiedades químicas y la mayoría de éstas no se presentan en plantas terrestres. De estas sustancias, se ha reportado que los polisacáridos y lípidos tienen actividad biológica. Dentro de dichas actividades, la acción antitumoral y antimicrobiana están incluidas en algunas sustancias (Hiroyuki, 1989).

Las algas marinas pueden crecer autotróficamente utilizando luz, CO_2 y sales minerales, estos organismos son los productores primarios de materia orgánica en el mar. Para poder competir con otros organismos, se espera que estos organismos secreten sustancias tóxicas y/o sustancias inhibitorias del crecimiento bajo ciertas circunstancias. Esto fue observado por primera vez por Harder a principios de siglo. Mas tarde, Prat y colaboradores en 1942 encontraron actividad antibacterial en el alga verde de agua dulce *Chlorella* sp. Desde entonces, muchos compuestos bioactivos han sido aislados de varias algas (Ishitsuka *et al.*, 1988; Berland, 1972; Mason *et al.*, 1982), incluyendo ácidos grasos, terpenos, compuestos carbonilo y compuestos halogenados (Rosell y Stivastava, 1987; Higgs, 1981; Fujimoto *et al.,* 1985).

I.1. Compuestos Encontrados en Microalgas

- Esteroles y compuestos relacionados en membrana.

Las membranas de los dinoflagelados contienen derivados de colesterol y dinosterol (Shimizu *et al.,* 1976). En la estructura del dinosterol encontramos un grupo 4α- metil y un inusual grupo lateral 23-metil. El dinosterol es altamente resistente a transformaciones químicas, y la molécula intacta se preserva bien en sedimentos viejos como fósiles químicos de dinoflagelados. Los esteroles 4α-metil también se encuentran en las familias Chlorophyta, Euglenophyta y Chrysophyta (Goodwin, 1974), pero el grupo sustituyente 23-metil parece ser característico de los dinoflagelados.

- Saxitoxinas y derivados de goniautoxina

Probablemente los metabolitos más prominentemente producidos por dinoflagelados son las Saxitoxinas y los derivados de goniautoxina. La saxitoxina fue primeramente identificada como la causa de la parálisis por envenenamiento en crustáceos (PSP) en *Alexandrium catenella* (Schantz *et al.,*1966). La neosaxitoxina y goniautotoxina se encontraron primeramente en *A. tamarense* (Shimizu, 1979). Estos compuestos son importantes herramientas farmacológicas ya que son bloqueadores de canales de sodio altamente selectivos (Hall *et al.,* 1987).

- Compuestos poliéter

Otro grupo muy característico de metabolitos producidos por microalgas es el de los éteres policíclicos. El espectacular arreglo lineal de los éteres policíclicos *trans,* representados por la brevetoxina B (Lin *et al.,* 1981) y la brevetoxina A (Shimizu *et al.,* 1986) se encontraron inicialmente en el dinoflagelado *Gymnodinium breve* y posteriormente se encontraron en muchas otras especies de dinoflagelados.

La ciguatoxina y sus congéneres, los cuales son responsables del envenenamiento del pez ciguatera, es producido por *Gambierdiscus toxicus*. Este mismo organismo también produce un fuerte activador de los canales de Ca^{2+}, maitoxina, que tiene una estructura de tres sistemas cíclicos unidos entre sí. Estos éteres policíclicos no se han reportado en organismos terrestres y se cree que son específicos de dinoflagelados, pero recientemente se encontró que *Prymnesium parvum* produce compuestos similares (Igarashi *et al.,* 1994).

- Macrólidos

Los macrólidos son unas de las estructuras encontradas usualmente en metabolitos de *Streptomyces* y muchos antibióticos importantes pertenecen a esta clase. Algunos dinoflagelados producen macrólidos similares. *Amphidinium* spp. aisladas del gusano aplanado *Amphiscolops*, produce una serie de macrólidos representados por amfidinolida B y caribenolida I, que se presentan una alta actividad citotóxica y antitumoral (Ishibashi *et al.*, 1987; Kobayashi e Ishibashi., 1993).

La Goniodomina A es un compuesto antimicótico encontrado en el dinoflagelado *Goniodoma* sp. (también conocido como *Alexandrium*) (Murakami *et al.*, 1988). El Prorocentrólido es un macrólido inusual que contiene nitrógeno, el cual es producido por *Prorocentrum lima*. Algunas cianobacterias también producen algunos tipos de macrólidos como la citoficina, aislada de *Scytonema* spp. (Kodama, 1990).

- Compuestos Policetónicos de cadena abierta

Los dinoflagelados del género *Amphidium,* producen compuesto alquil oxigenados de cadena larga. Estos amfidinoles son altamente antimicóticos. *Amphidinium* spp. también producen un interesante compuesto policarbonilado libre 1,4-policeto, amfiquetido I y II. Los dinoflagelados simbióticos *Symbiodinium* spp. producen zooxanthellatoxinas. Las cuales están reportadas como activadores de los canales de Ca^{2+} (Nakamura *et al.,*1991, 1995).

- Oxilipinas Cíclicas o Eucosanoides

Las oxilipinas son compuestos altamente bioactivos derivados de ácidos grasos poliinsaturados como el ácido araquidónico. Estos juegan un papel muy importante en las funciones biológicas, tales como la quimiotaxis. Se han identificado oxilipinas en macroalgas (Gerwick, 1993); pero existe un limitado número de reportes de tales compuestos en microalgas.

- Péptidos

Un gran número de péptidos de cadena abierta y depsipéptidos han sido aislados de cianobacterias. Muchos de estos péptidos se conocen como una amenaza para la salud pública (Carmichael, 1988). Una característica de estos péptidos es la inclusión de aminoácidos inusuales como aminoácidos β, aminoácidos D y deshidro aminoácidos en estas moléculas.

I.2. Acción Antimicrobiana

Existen varios pasos claves que deben llevarse a cabo para que un agente antimicrobiano tenga éxito inhibiendo o matando al organismo infeccioso (Fig. 1). Primero, el agente debe estar en su forma activa. Segundo, el antibiótico debe alcanzar niveles suficientes o concentraciones adecuadas en el sitio de la infección para poder tener una oportunidad de ejercer el efecto antibacteriano (estar en aproximación anatómica con la bacteria infectante).

Cuando el antibiótico entra en contacto con la superficie de la célula, se produce la adsorción de esta molécula por la superficie celular. Enseguida, debido a que muchos objetivos para los agentes antimicrobianos son intracelulares, se debe dirigir el antibiótico a alguna locación dentro de la célula bacteriana. Una vez que el antibiótico ha alcanzado una suficiente concentración intracelular, la unión a un blanco específico ocurre. Esta unión involucra interacciones moleculares entre el agente antimicrobiano y uno o más componentes bioquímicos que juegan un papel importante en el metabolismo celular del microorganismo. Una unión adecuada a estos componentes resulta en una disrupción de ciertos procesos celulares dependiendo del modo de acción del agente antibacteriano, provocando que el crecimiento celular se detenga o se presente una muerte celular.

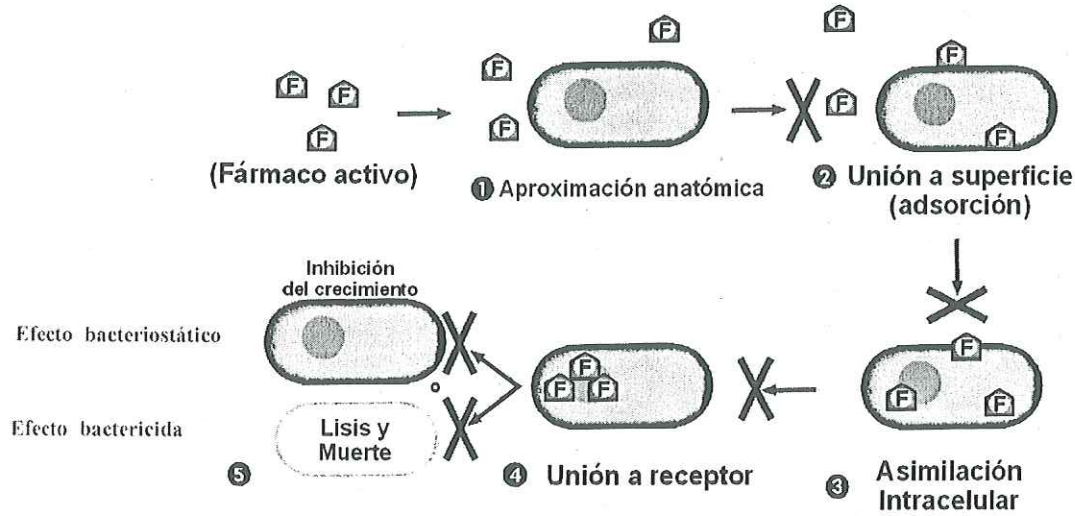

Figura 1 – Formas de acción que puede presentar un agente antimicrobiano.

Los agentes antimicrobianos que inhiben el crecimiento bacterial pero que generalmente no matan a la célula, se conocen como agentes bacteriostáticos. Los agentes que usualmente matan al organismo se dice que son bactericidas.

Existen muchos blancos potenciales dentro de la célula bacteriana, pero aquellas rutas o estructuras más frecuentemente utilizadas como objetivo incluyen la síntesis de pared celular (peptidoglicano), la membrana celular, síntesis de proteínas y síntesis de ácidos nucleícos (Forber, 1999).

1.3. ¿Qué es el cáncer?

El cáncer no es solamente una enfermedad sino más bien un *grupo* de enfermedades. Todas las formas de cáncer hacen que las células del cuerpo cambien y crezcan sin control. La mayoría de las células cancerosas forman una protuberancia o masa llamada *tumor*. Las células del tumor pueden desprenderse y viajar a otras partes del cuerpo

donde pueden seguir creciendo. Este proceso de propagación recibe el nombre de *metástasis*. Cuando el cáncer se propaga, sigue manteniendo el nombre de la parte del cuerpo donde se originó. Por ejemplo, si el cáncer del seno se propaga a los pulmones, sigue siendo cáncer del seno, no cáncer del pulmón.

Otro término para canceroso es *maligno*, así que a un tumor canceroso se le llama maligno. Pero no todos los tumores son cáncer. A un tumor que no es cáncer se le llama *benigno*. Los tumores benignos no crecen ni se propagan como el cáncer. Por lo general no constituyen una amenaza para la vida. Ciertos tipos de cáncer, como el cáncer de la sangre (leucemia), no forman tumores.

Tipos de cáncer colorrectal

Antes de que un cáncer verdadero se desarrolle, frecuentemente hay con anterioridad un cambio en el recubrimiento del colon o del recto. Un cambio es un crecimiento de tejido, llamado *pólipo*. La extirpación de un pólipo en sus inicios puede evitar que se convierta en cáncer. Más del 95% de los tumores cancerosos del colon y del recto (colorrectales) son *adenocarcinomas*[1]. Éstos son tumores cancerosos de las células que recubren el interior del colon y del recto. Hay otros tipos de tumores, más raros, que también pueden desarrollarse en el colon y el recto. La información proporcionada en este documento se refiere solamente a los adenocarcinomas.

Referencia Electrónica:

http://www3.cancer.org/cancerinfo/load_cont.asp?ct=10&doc=91&Language=Spanish)

[1] ***adenocarcinoma***: Cáncer que comienza en las células que alinean ciertos órganos internos y que tienen características glandulares (secretoras), como la próstata.

II.- ANTECEDENTES

Entre muchas de las especies importantes de microalgas se encuentran los dinoflagelados, que son un grupo de protistas flagelados, unicelulares altamente diverso. Los dinoflagelados se caracterizan por su extraordinaria producción de metabolitos secundarios de origen policetónico. De entre los dinoflagelados estudiados hasta ahora, la cepa con mayor producción de compuestos anticancerígenos es *Amphidinium,* aislada de un gusano plano originario de Japón *Amphiscolops* sp. Se han encontrado compuestos que exhiben un efecto citotóxico significativo en contra de líneas celulares de cáncer de colon humano, leucemia y carcinoma[2], entre otros. Un ejemplo de un compuesto anticancerígeno es el Amphidinolide B_1, que es un macrólido citotóxico producido por *Amphidinium* sp. (Rein y Borrone, 1999).

Entre los compuestos anticancerígenos actualmente en investigación, la briostatina 1 sirve como un buen ejemplo de la tendencia pasada y presente en lo que respecta a la investigación biomédica marina. La briostatina 1 fue aislada en pequeñas cantidades a partir del briozuario *Bugula neritina* en los años 70 y su estructura fue dilucidada por cristalografía de rayos-X en 1982. Actualmente se encuentra en la fase clínica de prueba 2 (Faulkner, 2000).

En 1988, Schwart y colaboradores utilizaron un extracto de las microalgas *Arthrospira* (antes Spirulina Catenholz, 1994) y *Dunaliella* (*Spirulina-Dunaliella*) en hamsters a los que se les indujo cáncer bucal aplicando 7,12-dimetilbenzoantraceno

[2] ***carcinoma***: un tumor maligno que inicia en la capa superior (células epiteliales) de órganos. Por lo menos 80% de todos los cánceres son carcinomas.

(DMBA) en solución al 1% con aceite mineral, aplicando tópicamente tres veces por semana durante 28 semanas. El extracto microalgal se aplicó vía oral en dosis continuas de 140 µg en 0.4 ml de aceite mineral tres veces por semana. Después de 28 semanas, los animales tratados con este extracto presentaron una ausencia total de tumor, comparados con el grupo de animales control que presentaron una gran cantidad de tumores con distintos tamaños (Schwartz *et al.*, 1988).

Anteriormente, este mismo grupo realizó un experimento semejante con hámsters induciendo cáncer oral en la bolsa bucal de estos roedores mediante la inyección de DMBA disuelto en MEM modificado (medio mínimo esencial), utilizando el mismo extracto de microalgas. El extracto fue inyectado 2 veces por semana durante 4 semanas. Cada inyección consintió en 250 µg disueltos en 10 ml de MEM. Los resultados presentaron una disminución parcial en el 70% de los animales utilizados (Schwartz y Shklar, 1987).

En 1989, Hiroyuki *et al.* realizaron una prospección utilizando 56 especies de algas marinas para buscar actividad antitumoral. Las microalgas fueron utilizadas como polvo y se administró vía oral a ratones con sarcoma de Ehrlich, siendo el alga *Scytosiphon lomentaria* (Phaeophyta) la que mostró un mayor rango de inhibición (69.8%). Cuando estos polvos fueron administrados intraperitonialmente a ratones con fibrosarcoma, *Sargassum patens* fue la que inhibió mayormente el sarcoma (55.5%) seguida por *Eucheuma cottonii* con 39.8 % (Hiroyuki *et al.*, 1989).

Se sabe que algunas microalgas presentan actividad tipo antitumoral, como *Poteriochromonas malhamensis*, la cual presentó actividad enzimática proteincinasa,

protein tirosin cinasa e inosin monofosfato deshidrogenasa, enzimas activas durante la presencia de algún tipo de cáncer (Gerwick *et al.*, 1994).

Se ha encontrado que la microalga *Arthrospira fulsiformis* puede presentar un efecto inhibitorio en el desarrollo de carcinogénesis oral en animales utilizados como modelo. Se ha evaluado el efecto quimiopreventivo de la actividad de esta microalga aplicando 1g por día en pacientes con cáncer oral logrando una regresión completa de lesiones en un 45% de los pacientes en estudio (Mathew *et al.,* 1995).

Dos nuevos monogalactosil diacilgliceroles fueron aislados del alga de agua dulce *Chlorella vulgaris*, estos diacilgliceroles son promotores antitumorales junto con tres monogalactosil diacilgliceroles y dos digalactosil diacilgliceroles. Este nuevo monogalactosil diacilglicerol conteniendo ácido hexadecadienoico mostró un potencial efecto inhibitorio en contra la promoción de tumores en células Raji (cultivo de células a partir de linfoma[3] de Humano de raza Negra) por parte de antígeno temprano asociado a virus Epstein-Barr (EBV-EA) (Morimoto *et al.,* 1995).

En 1995, se realizó un trabajo utilizando extractos de microalgas encontrando actividad antitumoral en contra de *Agrobacterium tumefaciens* en discos de papa con cada extracto disuelto en 12.5 % de DMSO a una concentración de 25 μg de extracto por disco. De un total de 35 extractos preparados a partir de 17 especies de algas, 11 extractos (9 especies) presentaron más del 20% de inhibición de la iniciación del tumor (El-Masry *et al.*, 1995)

[3] ***linfoma***: Cáncer que se presenta en células del sistema linfático.

En 1997, se realizó una extensiva búsqueda de compuestos anticancerígenos en las costas de Japón, probando 1446 muestras de 306 especies de microalgas marinas. De estas muestras se prepararon extractos utilizando un amortiguador de fosfatos (PBS) y metanol, los cuales fueron probados *in vitro* en contra de células linfáticas de leucemia de ratón (L1210) y en contra de células normales NIH-3T3[4] para buscar actividad citotóxica a menor escala. Como resultado obtuvieron que el alga verde *Cladophoropsis vaucheriaeformis* presentó una mayor actividad citotóxica en contra de las células L1210 y una menor toxicidad en contra de las células normales (Hideki *et al.*, 1997).

Se sabe que el dinoflagelado *Gymnodinium* sp. A3 produce un polisacárido sulfatado extracelular D-galactan asociado con L(+)-ácido láctico con la capacidad de producir citotoxicidad en contra de células linfáticas, especialmente en contra de las células MT-4, induciendo apoptosis, esta muerte celular se cree que se debe a que dicho polisacárido produce una fragmentación del contenido de DNA. Este proceso involucra una disminución en la producción de proteínas secretoras acoplada con un aumento de una gran variedad de productos de genes nuevos, conduciendo a la activación de endonucleasas dependientes de Ca^{+2}, lo que fragmenta el DNA del núcleo. Después de la fragmentación del DNA, la célula misma se fragmenta en cuerpos apoptóticos que son fagocitados por macrófagos (Kenichi y Masahiro, 1998).

Igualmente este polisacárido fue probado en contra de una línea celular de leucemia humana K-562 presentando una fuerte citotoxicidad, induciendo igualmente apoptosis por medio de la fragmentación del contenido de DNA nuclear comprobada mediante

[4] **NIH-3T3**: fibroblastos de embrión de ratón.

morfología celular, fragmentación nuclear, el marcaje *in situ* de los extremos del DNA fragmentado y la fragmentación internucleosomal del DNA (Kenichi *et al.,* 1998).

En lo que respecta a la producción de antibióticos por microalgas, desde 1955 se sabe que las microalgas producen sustancias con capacidad antibiótica que produce un efecto sobre la actividad microbiana en el mar (Neilsen, 1955), de aquí que se iniciaran estudios para determinar qué organismo y qué tipos de compuestos poseen esta actividad antimicrobiana, por lo que en años subsecuentes se realizaron estudios en diferentes tipos de microalgas.

En 1966 Duff y Bruce examinaron la producción de estos compuestos cultivando diferentes microalgas, preparando extractos orgánicos y probándolos en contra de diferentes cepas bacterianas marinas y terrestres siendo los extractos de *Tetraselmis maculata* e *Isochrysis galbana* los que presentaron mayor actividad.

Para 1967, Bruce y Duff identificaron dos compuestos con actividad antibiótica a partir de la microalga *Isochrysis galbana*. El compuesto antibacterial extraído con acetona se analizó por cromatografía en papel y bioautografía (marcaje radioactivo). Se encontró que dos pigmentos con propiedades antimicrobianas pudieron ser identificados midiendo su espectro de absorción como *clorofila a* y derivados, probablemente *feofitina a*, una forma atípica de *clorofila a*.

En 1978, se encontró que la microalga *Chaetoceros lauderi* fue capaz de producir un compuesto antibiótico de naturaleza lipídica y fotosensible, la oxidación de los compuestos por la luz incrementaba la actividad antimicrobiana. Se realizó una extracción

lipídica de células de *Chaetoceros lauderi* y fueron identificados en su gran mayoría como ácidos grasos insaturados por medio de cromatografía en capa fina. Un número de bacterias Gram positivas (*S. aureus, B. subtilis, S. faecalis*, etc.) y varios bacilos marinos Gram negativos fueron sensibles a estos compuestos, mientras que las bacterias entéricas Gram negativas no lo fueron. La luz solar produjo una desaparición parcial de estos compuestos, pero aparecieron antibióticos polares con una actividad más fuerte (Gauthier *et al.*, 1978).

Se ha encontrado que las especies de microalgas *Dunaliella salina* y *Dunaliella bardawil* son productoras de compuestos antimicrobianos, como se pudo constatar en experimento realizado por Lustigman (1988) en la que se tuvo un efecto inhibitorio en cepas bacterianas como *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli y Staphylococcus epidermidis*.

En 1989 se realizaron cultivos de diferentes microalgas con la finalidad de encontrar actividad antibiótica de extractos orgánicos utilizando hexano y metanol además de utilizar el sobrenadante de los cultivos de las mismas. De entre las microalgas en estudio se utilizó una cepa de *Tetraselmis suecica*, la cual presentó actividad con el extracto orgánico con hexano en contra de una cepa de *Staphylococcus aureus* (Kellam y Walker, 1989).

Se realizó una búsqueda de compuestos antibacteriales en la microalga *Chlorococcum* HS-101, de la cual se produjeron diferentes extractos que fueron probados en contra de diferentes microorganismos logrando detectar actividad antimicrobiana (Souichi *et al.*, 1993).

II.1.- Características de las bacterias utilizadas:

Staphylococcus aureus (Fig.2): cocos Gram-positivos (familia Micrococcaceae) que crecen en racimos irregulares, no tienen motilidad, son aerobios facultativos y fermentan glucosa. El diámetro de un coco individual es de 0.7 a 1.2 μm. Forma colonias opacas, bien definidas, redondas, regulares y convexas. El clásico color amarillo oro de *Staphylococcus* es debido a la producción de carotenoides. *S. aureus* elabora un gran número de factores de superficie y proteínas secretadas, muchas de las cuales están implicadas en algunos tipos de patogenicidad (Sonenshein *et al.*, 1993). Su hábitat normal es la flora humana de la nasofaringe y piel. Este microorganismo está asociado con infecciones en humanos, es colonizador de diferentes superficies de piel y mucosas. Las infecciones son adquiridas cuando la cepa colonizante logra entrar a un sitio normalmente estéril como resultado de algún trauma o abrasión en la piel o superficie mucosa. *S. aureus* es transmitida de persona a persona. Infecciones ocasionadas por *S. aureus*: produce generalmente necrosis de tejido, infecciones de la piel como foliculitis y carbunco; varias infecciones de heridas; infecciones profundas que pueden producir bacteriemia y puede involucrar huesos, coyunturas, órganos internos, síndromes en neonatos, síndrome de shock[5] tóxico y envenenamiento con comida contaminada (Forber *et al.*, 1999).

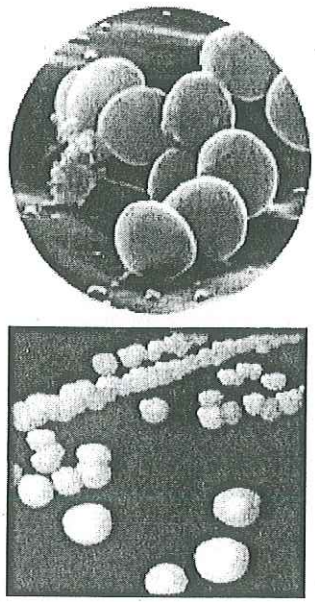

Figura 2.-*Staphylococcus aureus.*

[5] Enfermedad atribuida a *S. aureus*. Se produce cuando esta bacteria secreta una toxina muy potente que es absorbida hacia el torrente sanguíneo y la mitad de los casos reportados están asociados con mujeres que usan tampones, la mitad de estas resultan con infecciones localizadas.

Serratia marcecens, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteos vulgares* *(Fig. 3, 4 y 5)*:

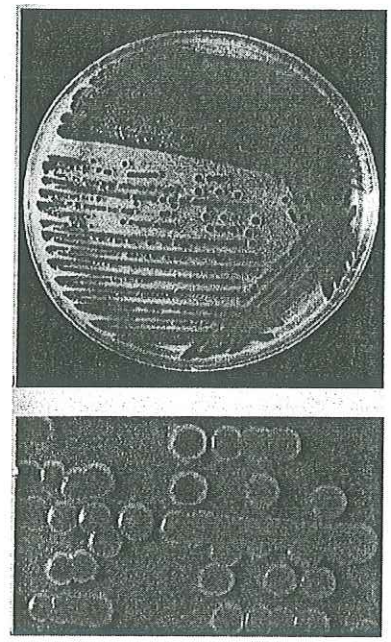

Figura 3. Cultivo en placa de *Serratia marcecens*

Estas bacterias pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, todas son bacilos o cocobacilos Gram-negativas, todas son oxidasa negativas y son organismos fermentadores de glucosa que crecen en agar MacConkey. Las bacterias de esta familia habitan una gran variedad de nichos incluyendo el tracto gastrointestinal humano, el tracto gastrointestinal de otros animales y una variedad de sitios ambientales. Como los reservorios de estos organismos varían, también su forma de transmisión a humanos difiere. Para aquellas bacterias que colonizan de manera normal al hombre, las infecciones resultan cuando las cepas bacterianas propias del paciente (cepas endógenas) establecen infecciones en sitios del cuerpo normalmente estériles. Estos organismos pueden pasar de un paciente a otro.

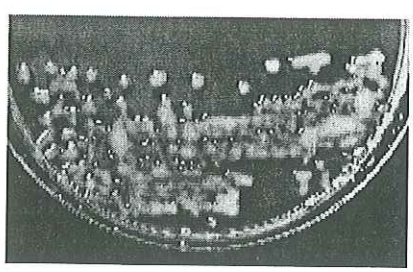

Figura 4. Colonias *Klebsiella pneumoniae* cultivada en agar.

Tales infecciones dependen del estado de debilidad del paciente hospitalizado y son adquiridas de manera intra hospitalaria. Todas son patógenas oportunistas y a pesar de ser consideradas oportunistas, producen un gran número de factores de virulencia, tales como endotoxinas, que pueden provocar infecciones fatales.

La manera más común de transmisión es endógena, o de persona a persona, especialmente en pacientes hospitalizados (Forber *et al.*, 1999).

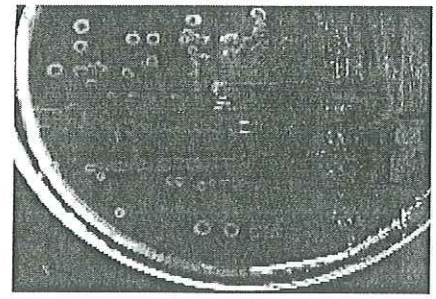

Figura 5. *Proteus vulgaris*

Pseudomonas aeruginosa y *Pseudomonas fluorescens* *(Fig. 6):*

El género *Pseudomonas* de la familia Pseudomonadaceae contiene más de 140 especies, la mayoría de las cuales son saprofíticas. Más de 25 especies están asociadas con humanos. La mayoría de las *Pseudomonas* que causan enfermedades en humanos están asociadas con infecciones oportunistas. Dentro de estas bacterias se encuentran *P. fluorescens* y *P. aeruginosa*. Debido a la frecuencia con la cual se relaciona con enfermedades humanas, *P. aeruginosa* es la que ha recibido mayor atención. Las bacterias del género *Pseudomonas* son bacilos Gram-negativos que miden 0.5 a 0.8 µm por 1.5 a 3.0 µm. Casi todas las cepas tienen motilidad por medio de un solo flagelo polar, y algunas cepas tienen dos o tres flagelos. Los aislamientos clínicos tienen generalmente pili, que puede ser antifagocítico y ayuda probablemente en la conexión bacteriana, de tal modo promoviendo su colonización.

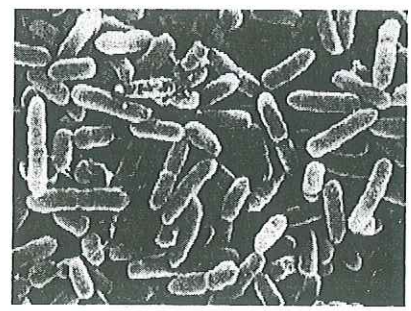

Figura 6. *Pseudomonas fluorescens*

Manifestaciones clínicas. P. aeruginosa es la causante del 80% de las infecciones oportunistas por *Pseudomonas*. La infección por *P. aeruginosa* es un problema serio en los pacientes hospitalizados con cáncer, fibrosis quística y quemaduras; los casos de fatalidad son del 50%. Otras infecciones causadas por las especies de *Pseudomonas* incluyen endocarditis, pulmonía e infecciones del tracto urinario, del sistema nervioso central, heridas, ojos, oídos, piel y del sistema músculo esquelético.

Epidemiología. Las especies del género *Pseudomonas* habitan normalmente el suelo, el agua y la vegetación y se pueden aislar de la piel, de la garganta, y de las heces de personas sanas. Colonizan el alimento del hospital, fregaderos, equipo de limpieza y equipo respiratorio. El contagio es de paciente a paciente vía contacto con los fomites o por la ingestión del alimento y del agua contaminados .

Referencia Electrónica: (http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch027.htm).

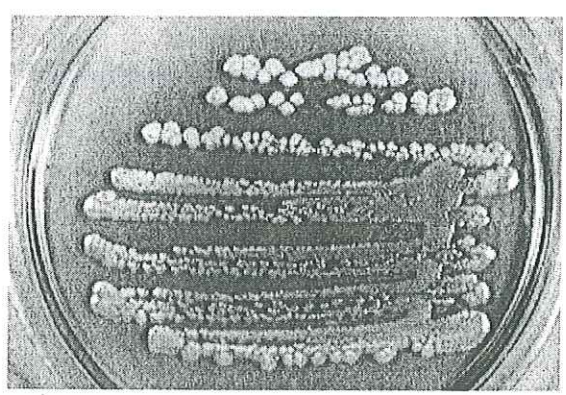

Figura 7. Cultivo en agar de *P. aeruginosa*

II.2.- Microalgas Utilizadas

Las microalgas son utilizadas como alimento vivo para todos los estadios de moluscos, para el estadio larval de algunos crustáceos y algunos estadios tempranos de especies de peces, así como para rotíferos, copépodos y eufácidos.

- *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1*), Familia Diatomophyceae :

La microalga marina *Chaetoceros muelleri* (Fig 8) es una diatomea costera, eurihalina y planctónica, que se distribuye en regiones templadas y subtropicales; pertenece a la clase Bacillarophyceae, es de forma rectangular y unicelular, algunas veces forma colonias de dos o tres células, mide 8-12 x 7-10 micras excluyendo las setas (Brown *et al.*, 1997).

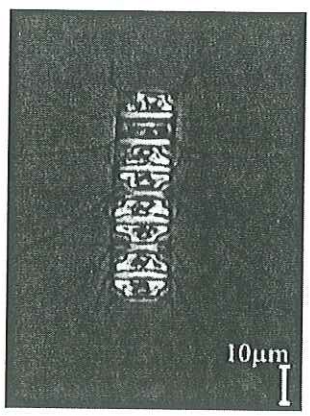

Figura 8. ***Chaetoceros muelleri***

Células de color café, alargadas de 4 a 9 µm. Presenta cuatro flagelos. Las condiciones óptimas de salinidad y temperatura son 35 ‰ y 15 a 30°C. Alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados. En acuicultura se utiliza normalmente para la alimentación de reproductores de moluscos . Referencia electrónica: (http://www.cibnor.mx/malgas/echm-1.html)

- *Isochrysis* sp. (IS-X-1*), Familia: Prymnesiophyceae

Células pequeñas esféricas de color amarillo paja a café. Dimensiones: 5-6 µm de longitud, 2-4 µm de ancho, salinidad entre 8 y 32 ‰. Alto contenido de lípidos (Cohen, 1986; Whyte, 1987), principalmente los ácidos grasos poliinsaturados (Helm & Laing, 1987) como el C20:5 (EPA, ácido eicosapentaenoico) (López-Alonso *et al.*, 1992). Esta

microalga es utilizada principalmente como alimento vivo para algunos estadios de moluscos y crustáceos en granjas acuícolas.

Referencia electronica : (http://www.cibnor.mx/malgas/eisg-1.html)

- ***Tetraselmis suecica*** (TE-S-1*) Familia Chlorophyceae:

Tetraselmis es un género importante (con más de 50 especies) de flagelados verdes. Células verdes brillante fusiformes de 4 - 9 µm de diámetro y 12 - 16 µm de largo. Presentan cuatro flagelos polares (Fig. 9). La mayoría de las especies se localizan en los ambientes marinas costeros, principalmente en agrupaciones en forma de poza de mareas, pero también existen algunas especies de agua dulce y algunos invertebrados marinos albergan a la especie de una manera exo- o endosimbióticamente. Su posición filogenética verdadera aparece estar cerca de la base de uno de los clases principales de las algas verdes de la familia Chlorophyceae. Ciertas especies de *Tetraselmis* (que se pueden enumerar bajo otros nombres, por lo general *Platymonas* o *Prasinocladus)*, y el género relacionado *Scherffelia* son importantes organismos experimentales en biología celular y fisiología de plantas superiores. Fueron de gran importancia en el descubrimiento y la subsecuente caracterización de la centrina (caltractin) de la familia de las proteínas cito esqueléticas. Algunas especies, principalmente *Tetraselmis suecica*, son también importantes en acuicultura como organismos del alimento para peces y los crustáceos juveniles. *Tetraselmis suecica* contiene ácidos grasos poliinsaturados: C20:5 (EPA, ácido

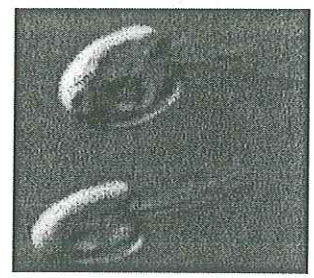

Figura 9. *Tetraselmis suecica*

eicosapentaenoico) y C22:6 (DHA, ácido docosahexaenoico). Se utiliza como alimento de larvas de moluscos y crustáceos. Presenta actividad antifúngica (Kellan *et al.*, 1989).

Referencas electrónicas:

(http://megasun.bch.umontreal.Ca/protists/tets /summary .html)

(http://www.cibnor.mx/malgas/etes-1.html)

- *Arthrospira maxima* (Lago de Texcoco):

El género *Arthrospira* (antes conocida como Spirulina) de la familia Oscillatoriaceae contiene al grupo de microalgas filamentosas caracterizada por células en forma de cadena (tricomas) en espiral rodeadas por una cubierta delgada. Las dimensiones, el grado de enrollamiento y la longitud de los filamentos varia entre especies (Fig. 10). Su forma de espiral es la característica más distintiva que permite la separación de este género de otros dentro de la misma familia (Ciferri y Tiboni, 1985).

Después del aislamiento de las primeras especies en 1827, *Arthrospira oscillarioides*, de agua dulce, varias especies de *Arthrospira* se han reportado en diferentes ambientes: aguas salobres, en el mar, en estanques salinos, etc. Algunos miembros de esta familia se han encontrado en regiones sub-árticas, lagunas tropicales y en aguas termales. Estos organismos son ubicuos y son capaces de adaptarse a condiciones extremas en el medio (Ciferri y Tiboni, 1985).

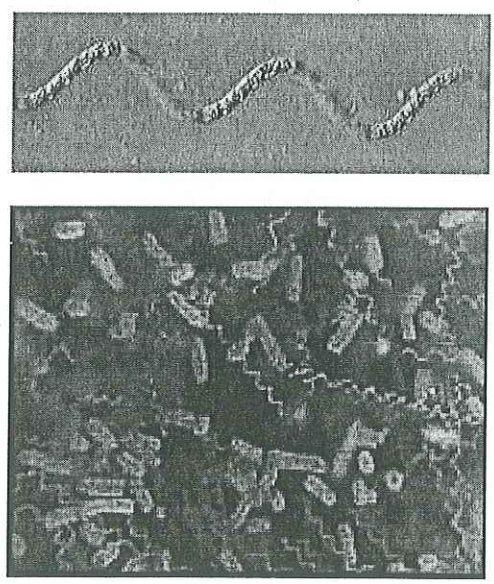

Figura 10. ***Arthrospira maxima***

Recientemente se ha encontrado que *Arthrospira* produce compuestos con diferentes actividades biomédicas, principalmente anticancerígena y antiviral, de esta última se ha encontrado actividad anti-HIV (Ayehunie *et al.,* 1998), anti-herpes simples (Hayashi y Hayashi, 1996). De la microalga *Arthrospira platensis* se aisló un polisacárido sulfatado, Calcium Spirulan, con actividad antiviral contra estos mismo agentes virales (Hayashi *et al.,* 1996).

*Clave cepario Acuicultura CICESE

III.- JUSTIFICACIÓN

Actualmente existen diversos padecimientos que afectan al ser humano de diversas formas, principalmente infecciones que son provocadas por microorganismos patógenos las cuales son tratadas con antibióticos de amplio espectro, ya que éstos organismos son cada día más resistentes a las terapias convencionales. Otro padecimiento muy común es el cáncer, que es el resultado de alteraciones en algunas de las funciones celulares o por mutaciones ocasionadas por diversos factores como son la contaminación o alguna infección viral, las cuales llegan a provocar el crecimiento irregular y en forma descontrolada de estas células produciendo tumores. Existen actualmente distintas formas de tratamiento para algunas de estas enfermedades pero que no son del todo exitosas y pueden llegar a producir efectos secundarios más severos que la misma enfermedad. Algunos tipos de cáncer son tratados con medicamentos altamente tóxicos (en ocasiones con dosis muy altas) que no son selectivos y dañan no sólo a las células tumorales sino a las células normales de cualquier órgano produciendo efectos colaterales muy severos. Se sabe que del ambiente terrestre se han producido la mayor parte de los medicamentos existentes actualmente en el mercado, pero poco a poco se han ido agotando las fuentes de nuevos fármacos lo que nos lleva a enfocar la investigación al ambiente marino.

Existen padecimientos que han afectado por muchos años y que aún afectan de una forma severa a la población en general y para los cuales no se cuenta con una terapia efectiva para combatirlos. La necesidad de encontrar terapias novedosas en contra de algunos de estos padecimientos nos lleva a la necesidad de realizar una bioprospección en organismos marinos debido al descubrimiento de la capacidad que tienen estos organismos

para producir sustancias con actividad biomédica y que además estos no son producidos por organismos del ambiente terrestre.

El propósito de este trabajo es la de realizar una búsqueda de compuestos con potencial farmacológico con la meta de encontrar algún posible compuesto con actividad antimicrobiana en contra de algunos microorganismos patógenos más incidentes en infecciones comunes en la población y en pacientes hospitalizados. Otro propósito de esta investigación es la búsqueda de metabolitos con la capacidad de producir un efecto anticancerígeno en contra de células de colon afectadas por cáncer, de manera que se puedan obtener a futuro fármacos para tratar estos tipos de padecimientos y que además el proceso de obtención sea de bajo costo para que pueda estar al alcance de personas de bajos recursos principalmente en los países en vías de desarrollo para los cuales los tratamientos actuales no están a su alcance económicamente.

Este trabajo servirá para establecer metodologías y estrategias experimentales para realizar estudios de bioprospección de nuevos fármacos con actividad antibacteriana y anticancerígena.

IV.- OBJETIVO GENERAL

Buscar compuestos con actividad antimicrobiana y anticancerígena a partir de microalgas y fluidos corporales de pescado.

V.- OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la actividad antimicrobiana de extractos de microalgas y subproductos pesqueros contra bacterias patógenas.
2. Determinar la actividad anticancerígena de los extractos anteriores en una línea celular de cáncer de colon.

VI.- MATERIAL Y MÉTODOS

VI.1.- Microorganismos

Se utilizaron 3 cepas monoalgales de microalgas marinas y una microalga de agua salobre proporcionadas por el cepario del Departamento de Acuicultura de CICESE. Las especies de microalgas utilizadas fueron: *Chaetoceros muelleri* (CH-M-1*), *Isochrysis* sp. (IS-X-1*), *Tetraselmis suecica* (TE-S-1*) de agua de mar y *Arthrospira maxima* (aislada del Lago de Texcoco) de agua salobre. Se utilizó además, un extracto de fluido corporal de pescado, obtenido mediante cocción y prensado anchoveta completa, separando el aceite por centrifugación. Este producto fue obtenido de una planta procesadora de harina de pescado local.

VI.2.- Condiciones de Cultivo

Se utilizó el medio de cultivo "f/2" (Guillard y Ryther, 1962) de agua de mar enriquecido con una mezcla de vitaminas (ver anexo) para las microalgas de agua de mar y el medio mineral "SOT" (ver anexo) con metales traza para la microalga *Arthrospira maxima.* Se utilizó CO_2 como fuente de carbono y como regulador de pH dentro del cultivo; los cultivos se mantuvieron con una agitación y una intensidad luminosa constante con lámparas fluorescentes (6 Klux). La agitación se llevó a cabo mediante aireación utilizando filtros estériles para evitar contaminación.

Los cultivos se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de vidrio de 250 ml con un volumen de trabajo de 100 ml, manteniendo los cultivos hasta una densidad óptica de 0.5. Una vez lograda la densidad, se procedió a la transferencia de los 100 ml del cultivo a frascos de vidrio de 1.5 lt con un volumen de trabajo de 1 litro manteniendo el cultivo el

* Clave cepario Acuicultura, CICESE.

tiempo necesario para alcanzar un valor de absorbancia de 0.5, para después proceder a transferir el litro de cultivo a un volumen de 17 litros en botellones de vidrio de 18 litros de capacidad (Fig. 11).

Para iniciar los cultivos, se esterilizaron por separado los componentes de cada medio por calor húmedo en autoclave. Para los botellones de 18 litros se utilizó cloro comercial (hipoclorito de sodio al 5%) para esterilizar, agregando 3 ml cloro/litro de cultivo dejando reposar por 24 horas aproximadamente. Para eliminar el exceso de cloro, se agregó tiosulfato de sodio, 150 mg por litro de agua de mar y con aireación por 24 horas antes de agregar los nutrientes (Breese y Malouf, 1974).

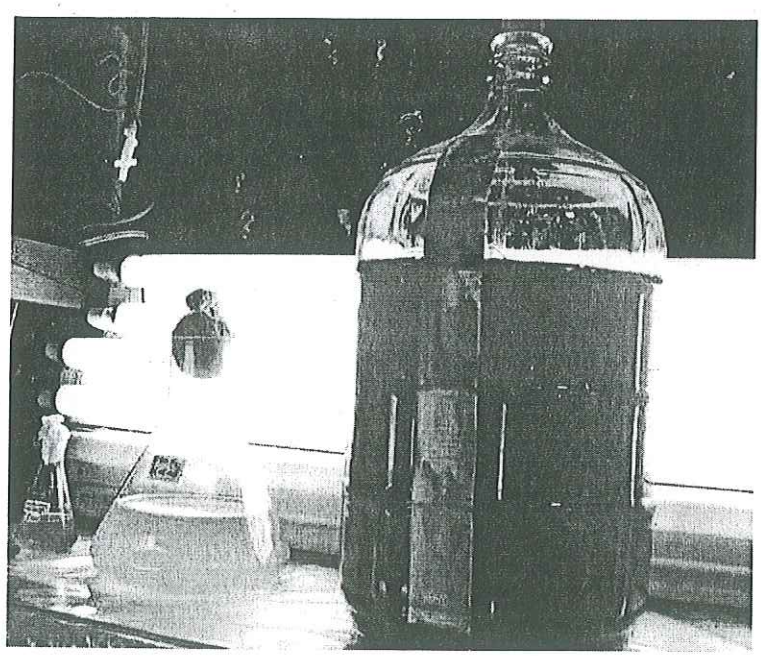

Figura 11. Producción de biomasa de microalgas

VI.3.- Obtención de biomasa y preparación de extractos.

Una vez que el cultivo alcanzó la fase de crecimiento lento, se procedió a la recuperación de la biomasa mediante centrifugación, 3,500 rpm durante 15 minutos, utilizando una centrifuga modelo K, International Equipment Co.

Se utilizaron tubos de plástico de 50 ml, a 3,500 rpm durante 15 minutos. Una vez terminado el tiempo de centrifugación se procedió a la recuperación de las células, el sobrenadante fue eliminado. La biomasa recuperada fue almacenada a –20 °C de temperatura. El primer paso en la preparación de los extractos fue descongelar la biomasa previamente obtenida y almacenada a baja temperatura. Una vez descongeladas las células se utilizó un aparato de ultrasonido "Ultrasonic Procesor" modelo GE 100 para romper las células y así liberar el contenido intracelular; utilizando una amplitud de 80 Mhz, durante 2 minutos con pulsaciones de 3 segundos. Se recomienda tratar de alcanzar al menos un porcentaje aproximado del 80% de células lisadas. Con esto se obtiene un extracto crudo de las microalgas. Una vez que se tuvo el extracto crudo se procedió a la extracción con diclorometano (CH_2Cl_2) o hexano (C_6H_{14}).

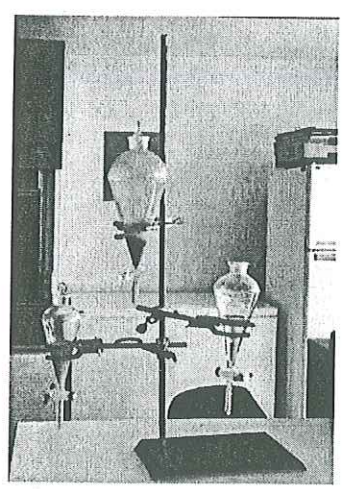

Figura 12. Preparación de extractos de Microalgas.

Se adicionó una cantidad conocida de extracto crudo a un embudo de separación de 500 ml para facilitar la recuperación de la fase orgánica (Fig. 12). Se agregaron dos volúmenes del disolvente (hexano o diclorometano) en una proporción 1:2 (1 volumen de biomasa húmeda: 2 volúmenes de disolvente) y se agitó vigorosamente eliminando los gases producidos por la agitación. Se dejaron reposar aproximadamente por 5 minutos hasta observar la formación de dos fases bien definidas.

Se recuperó la fase orgánica y se realizó una segunda extracción a la fase acuosa, procediendo de la misma manera que en la primera extracción, una vez más recuperando la fase orgánica. Para eliminar la humedad remanente en la fase orgánica, esta se pasó por un papel filtro cubierto con una cama de sulfato de sodio para eliminar humedad, y se almacenaron a temperatura ambiente en recipientes color ámbar de 200 ml para evitar la descomposición, por exposición a la luz, de algunos de los posibles compuestos disueltos por el disolvente.

VI.4.- Concentración

El siguiente paso fue la eliminación del disolvente y para ello se utilizó un aparato de rotaevaporación "Rotary Evaporator" marca Yamato modelo RE-51 (Fig. 13). La evaporación se llevó a cabo bajo las mismas condiciones para todos los extractos, a una temperatura de 40° C a 150 rpm hasta sequedad total y se recuperó el extracto del matraz bola de 500 ml del equipo de rotaevaporación utilizado 2 ml de disolvente correspondiente para ser almacenado en pequeños viales de vidrio (previamente secados en estufa) y se protegieron de la luz solar. Ya en los recipientes de vidrio se procedió a eliminar con nitrógeno gaseoso el disolvente hasta dejar el extracto seco; una vez seco se volvió a pesar

para saber el peso total del mismo. Para iniciar los ensayos se resuspendieron los extractos en 2 ml de dimetilsulfóxido (DMSO). Se almacenaron los extractos en recipientes de vidrio protegidos contra la luz para poder ser utilizados en los pasos subsecuentes de la etapa experimental. Al finalizar esta parte del experimento se tuvieron 10 extractos (Tabla I).

Tabla I. Fuentes utilizadas para la preparación de extractos y su denominación.

	Extracción con Hexano	Extracción con Diclorometano
Arthrospira maxima	Art (H)	Art (D)
Chaetoceros muelleri	Cha (H)	Cha (D)
Fluido corporal de pescado	Fcp (H)	Fcp (D)
Isochrysis sp.	Iso (H)	Iso (D)
Tetraselimis suecica	Tes (H)	Tes (D)

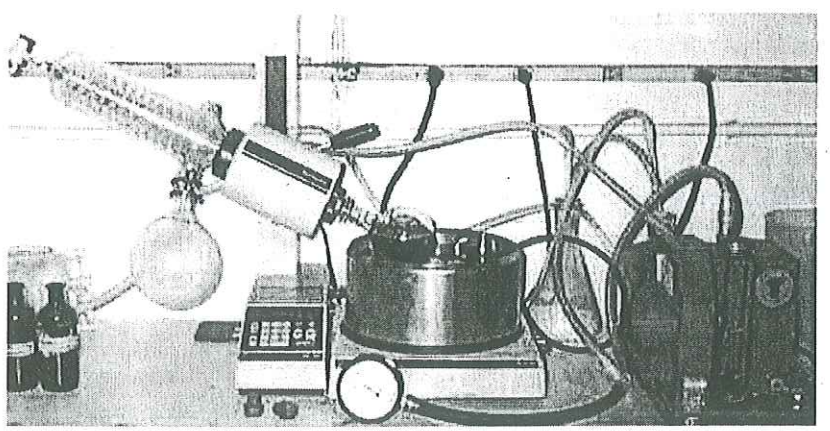

Figura 13. Aparato de rotaevaporación utilizado para la eliminación del disolvente utilizado en la extracción de compuestos.

VI.5.- Ensayo de actividad antimicrobiana

Las bacterias utilizadas fueron: *Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Serratia marcecens, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens y Proteus vulgaris* proporcionadas por el Dr. Olmos Soto (Microbiología Molecular, Departamento de Biotecnología Marina CICESE) Las cepas fueron proporcionadas de manera liofilizadas por lo que se procedió a activarlas inoculándolas en medio rico Luria Bertani (LB) y se incubaron a 37 °C en cajas de cultivo con medio LB sólido durante 24 horas.

VI.5.a.- Procedimiento

La determinación de la actividad antimicrobiana se llevó a cabo mediante el "método Bauer–Kirby de difusión en agar" (Forber 1999) (Fig. 14). En placas de cultivo conteniendo medio LB sólido se inoculan los microorganismos en prueba, cantidades conocidas del extractos son adicionados a discos de papel de filtro o sensidiscos de aproximadamente 6 mm, los cuales son colocados en la superficie del agar y se deja difundir el extracto en el agar. A cierta distancia del disco, la concentración mínima inhibitoria (MIC), que es la cantidad mínima de agente necesario para inhibir el crecimiento del organismo de prueba es alcanzada. La actividad antimicrobiana se corroboró por la formación de un halo de inhibición alrededor del disco de papel. Pasando este punto, el crecimiento ocurre, pero el crecimiento cerca del disco es nulo. Para este trabajo se realizó una modificación al método mencionado anteriormente, dicha modificación fue en la manera de sembrar los microorganismos en la placa de cultivo para lo cual se realizó una capa sembrada de manera que el crecimiento en el agar fuera más uniforme,

proporcionando una mejor observación de los resultados de los ensayos, a este método se le conoce como "Método de la doble capa en agar".

VI.5.b.- Preparación de Capa Base

Se colocan 20 ml del medio Luria Bertani sólido previamente fundido y esterilizado en cajas petri a ser utilizadas (estériles). Dejar solidificar en una superficie lo más horizontal posible para que se pueda tener una capa homogénea en toda la caja.

VI.5.c.- Preparación del Inóculo

Se toman una o dos asadas de un cultivo joven (24 horas) de cada uno de los microorganismos a ser utilizados y se disuelven en un tubo de ensayo con solución salina (0.9 %) estéril hasta obtener un valor de absorbancia de 1.0 a una longitud de onda de 600 nm.

VI.5.d.- Preparación de la Capa Sembrada

Se toma medio LB sólido preparado anteriormente y se funde, y por cada 100 ml de medio se le agregan 2.5 ml de la suspensión de inóculo preparada previamente, homogeneizar y se procede a agregar 5 ml a cada una de las cajas con la capa base ya solidificada; se recomienda dar un pequeño movimiento rotatorio a la caja para dispersar muy bien el medio para posteriormente dejar solidificar (Nota: al adicionar la suspensión de inóculo al medio LB, éste no deberá estar muy caliente porque podría matar a los microorganismos, pero tampoco muy frío, puesto que se formaría un gel y no podríamos tener una buena capa de siembra). Después de gelificada la capa sembrada, se colocan los discos que fueron impregnados anteriormente con los extractos en estudio.

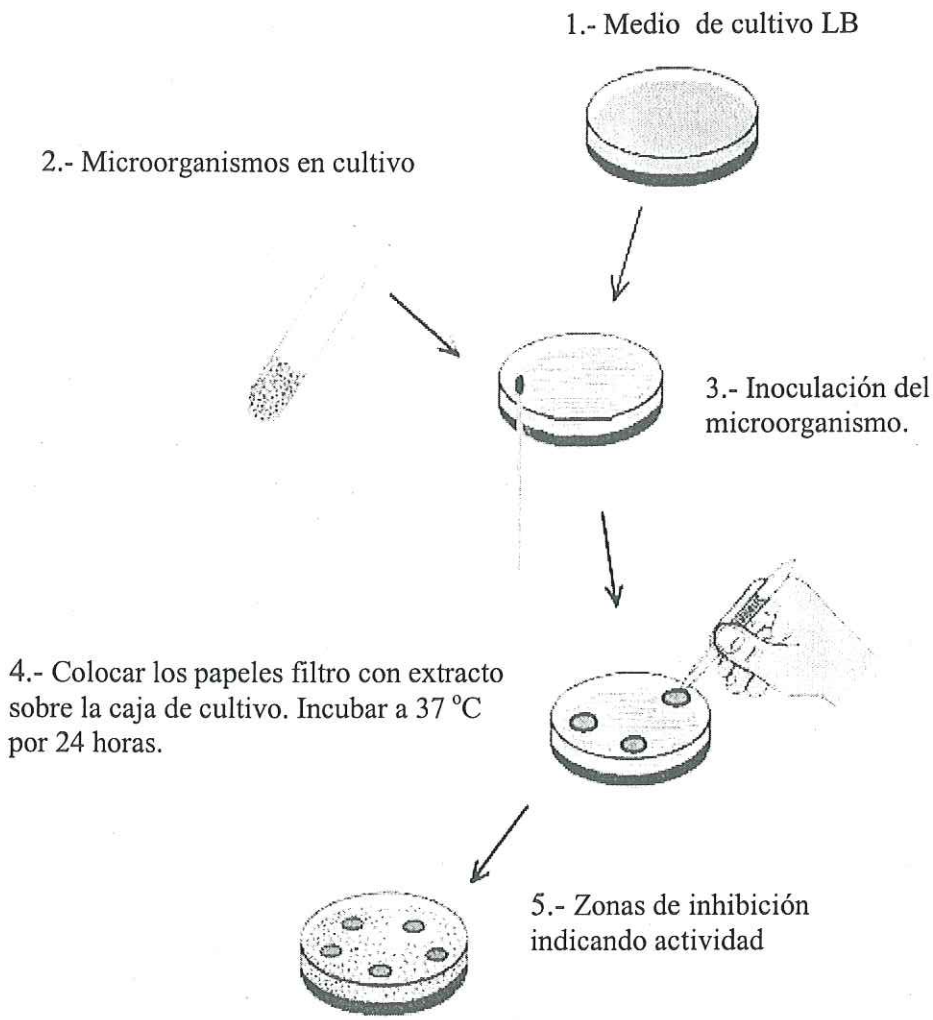

Figura 14. Procedimiento para determinar actividad antibacteriana utilizando el Método Bauer-Kirby de difusión en agar.

VI.5.e.- Discos de Papel

Para este ensayo se utilizaron discos de papel de 6 mm (BBL Blank Paper Disks). Para iniciar los ensayos se tomaron volúmenes de 5, 20 y 25 µl para adicionar a los discos y así estandarizar el volumen a utilizar en los ensayos posteriores. Una vez que el volumen de extracto fue adicionado al disco, se dejó secar durante una noche a 37 °C. Después de este lapso de tiempo, se pueden colocar sobre la capa inoculada en la caja petri para continuar

con el ensayo. Al término de 24 horas de incubación a 37 °C se observaron los posibles resultados en forma de halos de inhibición (Fig. 15).

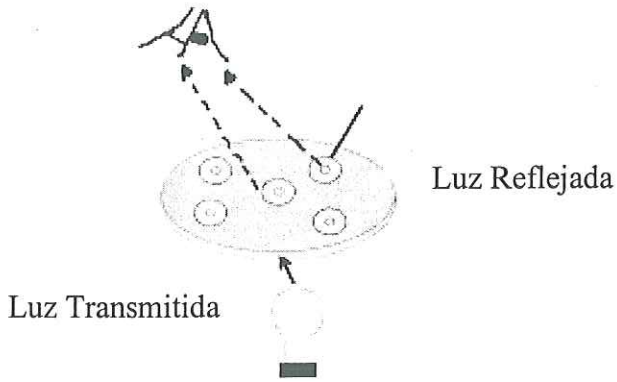

Figura 15. Esquema en donde se representa la manera correcta para observar los resultados en forma de halos de inhibición.

Para los ensayos finales se utilizó un volumen de 25 µl por disco de papel para todos los extractos en todos los cultivos de bacterias. Como control positivo se utilizó el antibiótico mezcla Imipenem/cilastatina a una concentración de 2 mg ml^{-1} adicionando 10 µl en los discos de papel. Se eligió Imipenem a pesar de ser un antibiótico muy fuerte por que es uno de los pocos antibióticos que inhiben el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*.

Se realizaron ensayos de toxicidad para determinar si el disolvente pudo inhibir el crecimiento de los microorganismos dándonos un posible resultado falso. Se adicionaron 5 µl, 20 µl y 25 µl de disolvente en discos de papel filtro y se colocaron sobre una caja de cultivo inoculados con el microorganismo y se procedió de la misma manera que con cada uno de los extractos obtenidos. Los experimentos se realizaron por triplicado y se tomaron los diámetros promedios de los halos formados en cada uno de las cajas de cultivo.

VI.6.- Determinación de actividad anticancerígena

Para los ensayos de actividad anticancerígena se utilizó la línea celular LIM1215 (donadas por el Dr. Barbas, Scripps Research Institute, UCSD) de cáncer de colon. Estas células fueron cultivadas en cajas para cultivo de tejidos, en los cuales fueron realizados los ensayos. El crecimiento de la línea celular es en monocapa.

Nota: todos los procedimientos que involucran líneas celulares se llevaron a cabo bajo una campana de flujo laminar en el laboratorio de bioseguridad clase II (Tecnológico de Tijuana) bajo condiciones estrictas de asepsia para minimizar el riesgo de contaminación de las células con bacterias, levaduras o micoplasmas. Todas las líneas celulares fueron tratadas como si fueran altamente peligrosas. Los cultivos continuos de líneas celulares se asume que están libres de infecciones por virus, ya que pueden contener algunos virus latentes que pueden infectar a la persona que trabaje con ellas.

Las células se mantuvieron en criopreservación dentro de viales con dimetilsulfóxido (DMSO) a -70 °C para poder mantener las células viables por periodos largos.

VI.6.a.- Activación de las líneas celulares (cultivo en monocapa).

Se tomó 1 ml de células más 9 ml de medio RPMI enriquecido con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico (Penicilina 5,000 UI ml^{-1} y Estreptomicina 5,000 ug ml^{-1}). La mezcla se colocó en incubación dentro de una caja petri para cultivo de tejidos a 37 °C con una atmósfera de CO_2 al 5% durante 24 horas. El paso en el que las células son descongeladas es determinante para poder lograr que el cultivo sea exitoso. Se descongeló el vial con células en baño de agua a 37 °C agitando constantemente. Es muy importante

que al momento preciso en que se descongelen las células se adicionen al medio lo más rápido posible para evitar que el disolvente en el que se encuentran preservadas ataque las células y disminuya la viabilidad de éstas. Se realizó un recambio del medio a las 24 horas aspirando el medio de la caja y agregando medio RPMI fresco. Se colocaron en incubación durante 96 horas a 37 °C con una atmósfera de CO_2 al 5% (Fig. 16).

Una vez que la monocapa alcanzó a cubrir entre 80 y 100% de la placa de cultivo se procedió a la propagación de las células para aumentar la biomasa celular. Se eliminó el medio de cultivo y se adicionó 1 ml de tripsina y se incubaron por 1 minuto a 37 °C. Después de la incubación se diluyó la enzima agregando medio fresco. Se realizó un conteo celular utilizando un hematocitómetro. Se colocaron 5000 células por cada pozo en una placa de 96 pozos con fondo plano y se incubaron a 37 °C con una atmósfera controlada de 5% de humedad durante 72 horas. Una vez resuspendidas las células, se procedió a su propagación adicionando 200 µl de la suspensión celular en cada uno de los pozos de la placa de cultivo con 24 pozos de fondo plano y con medio fresco. Después de esto se colocaron en incubación por 48 horas a 37 °C con una atmósfera de CO_2 al 5%, se esperó hasta la formación de más del 80% de la monocapa. Se tomó una cantidad aproximada de $1x10^6$ de células para preservar en DMSO.

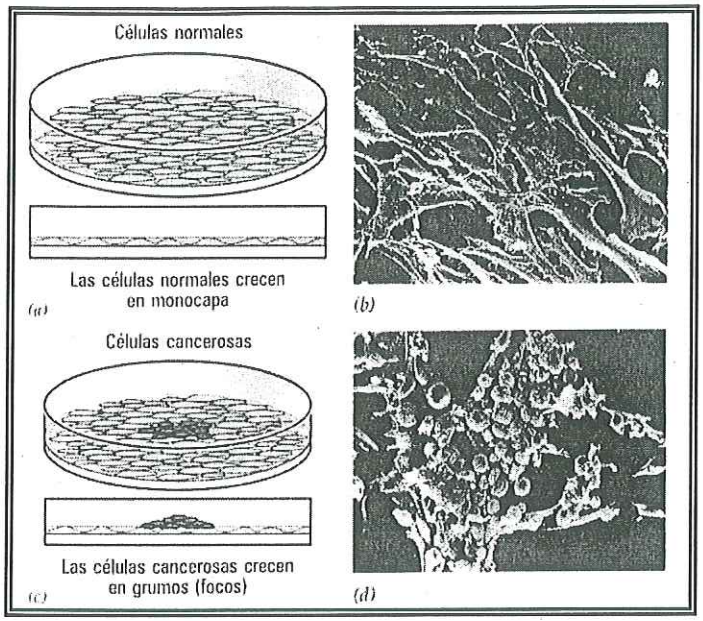

Figura 16.- Ejemplo de un cultivo celular en monocapa. (a) Células normales (b) Imagen de células normales en microscopio electrónico (c) Cultivo de células cancerosas (d) Microscopia electrónica de células cancerosas.

VI.6.b.- Actividad anticancerígena

Una vez alcanzada la formación de monocapa en placas de cultivo con 96 pozos, se realizaron los primeros ensayos de actividad anticancerígena. Para los ensayos se probaron 2 volúmenes, 1 µl y 10 µl por pozo. El orden en que fueron colocados los extractos se presenta en la Tabla II.

Tabla II.- Orden en que fueron utilizados los extractos en el cultivo celular

Línea	*1 µl*	*10 µl*
1	Art (D)	Art (D)
2	Art (H)	Art (H)
3	Cha (D)	Cha (D)
4	Cha (H)	Cha (H)
5	Fcp (D)	Fcp (D)
6	Fcp (H)	Fcp (H)
7	Iso (D)	Iso (D)
8	Iso (H)	Iso (H)
9	Tes (D)	Tes (D)
10	Tes (H)	Tes (H)
11	DMSO	DMSO
12	RPMI	RPMI

Art: *Arthrospira maxima*
Cha: *Chaetoceros muelleri*
Fcp: Fluido corporal de pescado
Iso: *Isochrysis* sp.
Tes: *Tetraselmis suecica*

DMSO: control
RPMI: control

D: Diclorometano
H: Hexano

Una vez colocados los extractos, se dejaron en contacto con las células durante 72 horas manteniendo el cultivo en las mismas condiciones de temperatura y CO_2. Inmediatamente después de finalizado el tiempo de incubación se procedió a la determinación de la actividad anticancerígena.

VI.6.c.-Procedimiento para determinar Actividad Anticancerígena

Se utilizó un método colorimétrico para determinar el número de células viables en proliferación o para ensayos de citotoxicidad. Este método tiene un reactivo que contiene un compuesto [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-4(sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interna; MTS] y un reactivo acoplador de electrones (fenazin etosulfato; PES).

Las sales de tetrazolio son fácilmente reducidas enzimáticamente a productos formazán[6] fuertemente coloridos por la cadena de transporte de electrones de la célula viva, ya sea directamente o a través de un intermediario, un acarreador de electrones (PES). La dirección del cambio de color, de la forma oxidada o incolora a la forma reducida o colorida, es única entre las tinciones utilizadas para este propósito. Las células viables desarrollan color de manera que es directamente proporcional a su actividad metabólica. El MTS es una sal ionizada e incolora, soluble en agua y capaz de entrar a las células.

Referencia electrónica:

(http://164.195.100.11/netahtml/srchnum.htm No. Patente 5,185,450)

La reacción se lleva a cabo como lo muestra la Figura 17. Generalmente la sal de tetrazolio es reducida a través de la reacción con un mediador en forma reducida o a través de una reacción directa con NADH o NADPH, los cuales son generados a partir de NAD o NADP respectivamente, por la reacción de las deshidrogenasas y sus sustratos, como la lactato deshidrogenasa y el ácido láctico. Las soluciones de sales de tetrazolio son casi incoloras y sus productos formazan dan lugar a una solución fuertemente colorida, de colores anaranjado, rojo, azul o púrpura.

Referencia electrónica: (http://www.dojindo.com/newsletter/review_vol2.html#4)

[6] Compuesto colorido altamente lipofílico utilizado para detectar actividad deshidrogenasa en ensayos colorimétricos.

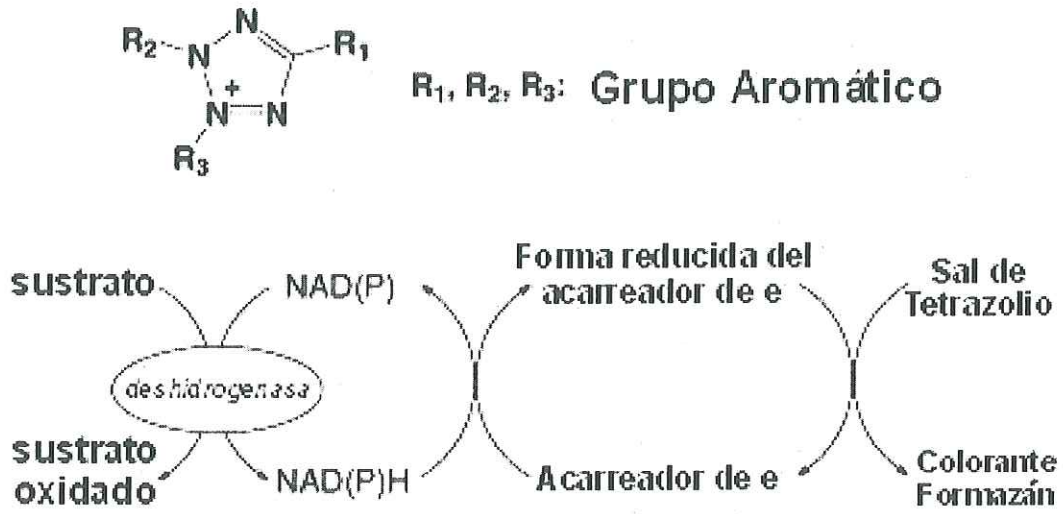

Figura 17. Estructura de la sal de tetrazolio y mecanismo de transferencia de electrones

El compuesto tetrazolio MTS (Reactivo de Owens) es bioreducido por las células en un producto formazán colorido, este producto tiene la cualidad de ser soluble en el medio para el cultivo de tejidos, esta cualidad le da la facilidad de poder ser detectado sin la necesidad de eliminar el medio de cultivo, de esta manera la lectura espectrofotométrica es directa.

El ensayo se lleva a cabo adicionando una pequeña cantidad de reactivo MTS directamente a los pozos de cultivo, se incuba durante 1-4 horas y después leer absorbancia a 450 nm en un lector de ELISA (ver anexo).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII.1. Curvas de crecimiento de microalgas

Las gráficas siguientes muestran las cinéticas de crecimiento para cada una de las microalgas utilizadas así como los días en que se inició la recuperación de la biomasa.

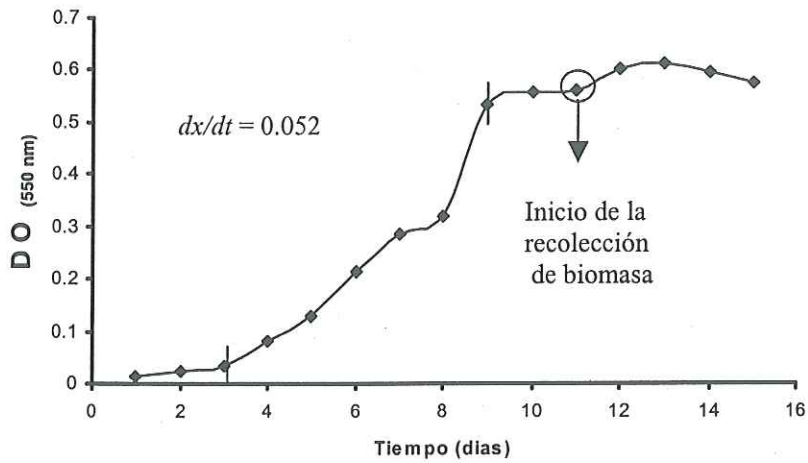

Figura 18. Curva de crecimiento de la microalga *Isochrysis* sp. en un volumen de cultivo de 18 litros.

Los datos de la Figura 18 indican la etapa del crecimiento celular, el inicio de la recuperación de la biomasa y la velocidad de crecimiento para el cultivo de *Isochrysis* sp. La biomasa fue recolectada en el día 11 tratando de tomar las células en la fase de crecimiento lento o al inicio de la fase estacionaria, pues se sabe que en esta fase de la curva se presenta la producción de metabolitos secundarios en mayores proporciones. Se puede apreciar en la curva una aparente entrada a la fase estacionaria a partir del día 9, pero a partir de ahí se observó un aumento en la biomasa por lo que se continuó la curva de crecimiento por tres días más hasta observar valores menos variables.

En la Figura 19 se presenta la curva de crecimiento de *Arthrospira maxima*, se observa un aumento en la densidad del cultivo comparado con las otras especies utilizadas, *Arthrospira maxima* alcanzó valores de absorbancia mayores a 1, mientras que sólo en el caso de *Tetraselmis suecica* se alcanzaron valores de absorbancia mayores a 0.8, lo que nos indica que tuvimos una mayor cantidad de células en el mismo lapso de tiempo para *Arthrospira maxima*. Aunque no se observo una fase de crecimiento lento definida y no se obtuvo una fase estacionaria, se inició la recuperación de biomasa en el día 17, ya que de acuerdo a la curva, el cultivo empezó a decaer.

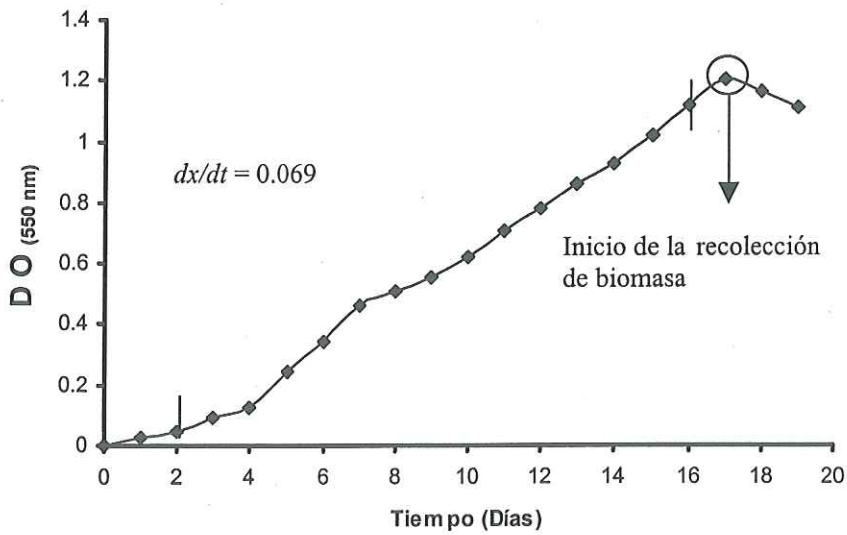

Figura 19. Curva de crecimiento de la microalga *Arthrospira maxima* en 18 litros de cultivo.

Como se puede apreciar en las Figuras 20 y 21, la recuperación de biomasa de los cultivos para las microalgas *Tetraselmis suecica y Chaetoceros muelleri* se inició en el decimosegundo y undécimo día de cultivo respectivamente, tratando de tomar a las células en la etapa de crecimiento lento cerca de la entrada a la fase estacionaria. Se puede observar que para el cultivo de *Tetraselmis suecica* se obtuvo una mayor densidad óptica, siendo la

especie con mayor crecimiento después de *Arthrospira maxima*, en lo que respecta a la velocidad de crecimiento, *Arthrospira maxima* fue la especie que presentó una velocidad mayor seguida por *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis* sp. y *Chaetoceros muelleri*.

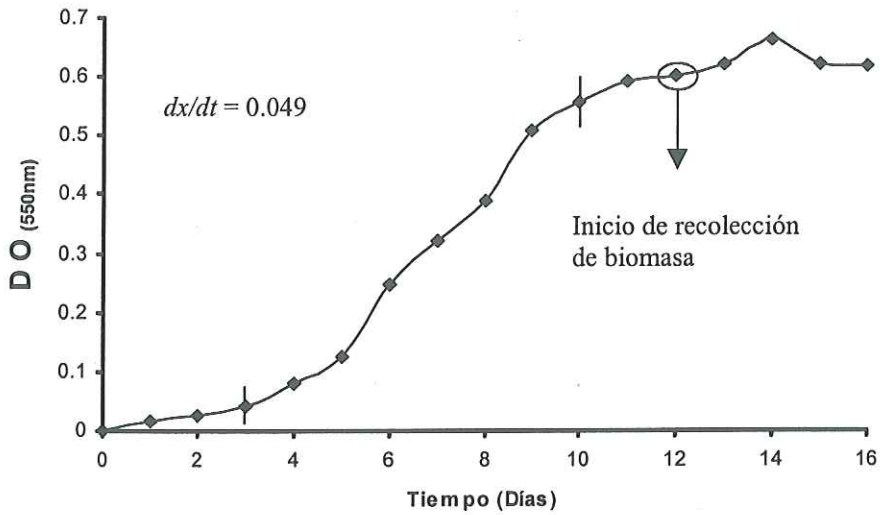

Figura 20. Curva de crecimiento de la microalga *Chaetoceros muelleri* en un cultivo de 18 litros.

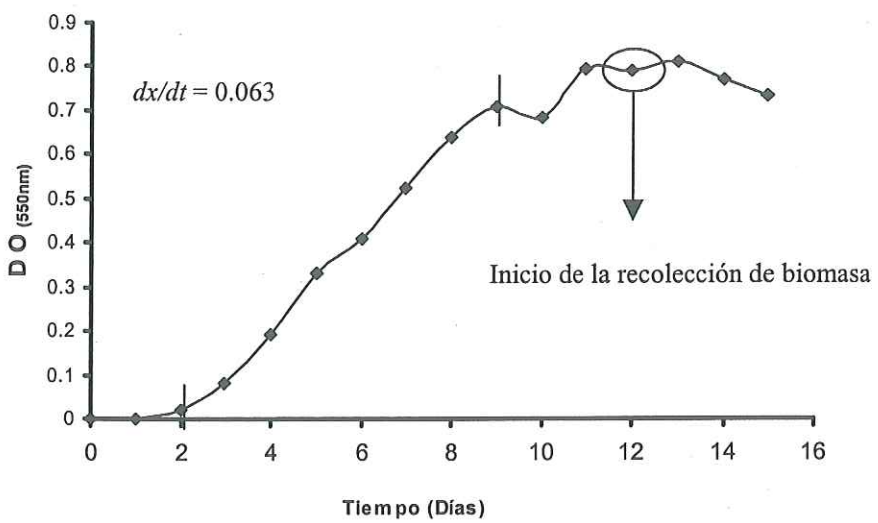

Figura 21. Curva de crecimiento de la microalga *Tetraselmis suecica* (18 litros).

VII.2. Extractos obtenidos

Se utilizaron 40 ml de biomasa para las microalgas *Chaetoceros muelleri*, *Tetraselmis suecica* e *Isochrysis* sp., mientras que para *Arthrospira maxima* se utilizaron 50 ml de la biomasa recuperada. Para el caso del preparado de fluido corporal de pescado se utilizaron 10 ml. A partir de esto se obtuvieron 10 extractos, de los cuales 5 fueron extraídos con Diclorometano y 5 con Hexano (Fig. 22). Una vez eliminado el disolvente se pesó cada uno de los viales y se tuvieron las concentraciones para cada uno de los extractos (Tabla III)

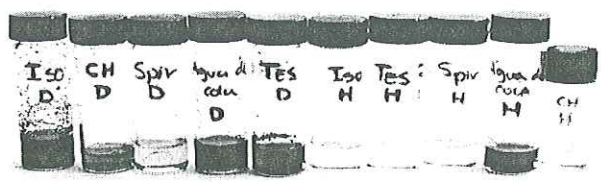

Figura 22. Extractos obtenido a partir de microalgas resuspendidos en DMSO.

En los datos de la Tabla III se presentan las concentraciones de los extractos (mg de extracto seco por ml de DMSO). Se aprecia que en las microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Isochrysis* sp. la concentraciones fueron mayores al utilizar diclorometano que al utilizar hexano, en donde las concentraciones fueron bajas. Las mayores concentraciones se produjeron en los extractos de *Tetraselmis suecica y* fluido corporal de pescado, la primera extraída con hexano mientras que la segunda con diclorometano. Para el caso de los extractos de *Arthrospira maxima* fueron los que presentaron una menor concentración a pesar de haber utilizado una mayor cantidad de biomasa.

Tabla III. Datos de concentración total de extractos y la relación entre las concentraciones obtenidas con los disolventes utilizados.

Extracto		Extracción con Diclorometano (mg ml^{-1})	Extracción con Hexano (mg ml^{-1})	Relación D/H
Arthrospira	(Art)	17.5	17.5	1.00
Chaetoceros	(Cha)	65.0	25.5	2.60
Fluido de pescado	(Fcp)	162.5	712.5	0.23
Isochrysis	(Iso)	80.0	40.0	2.00
Tetraselimis	(Tes)	127.5	77.5	1.65

La relación entre los disolventes utilizados nos proporciona un dato acerca de la afinidad de los compuestos por el tipo de disolvente, de esta manera podemos suponer que tipo de compuestos predominan, polares o apolares y que tipos de disolventes son mejores para la extracción en estos microorganismos.

Cabe mencionar que en los extractos se encuentra una mezcla de compuestos y no sabemos cuál o cuáles tienen actividad antimicrobiana o anticancerígena. Estos datos de la tabla corresponden a las concentraciones totales de cada extracto, los cuales reflejan la cantidad de compuestos puede tener una relación cercana con respecto a grupos neutros y cargados a excepción del fluido corporal de pescado que preferentemente son grupos hidrofóbicos.

VII.3. Actividad Antimicrobiana

En los ensayos de la actividad antimicrobiana se obtuvieron halos de inhibición con diferentes diámetros. Los datos de la Tabla IV nos indica los extractos que produjeron un efecto inhibitorio en el crecimiento bacteriano de *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus y Proteus vulgaris*.

Tabla IV. Resultados de los ensayos de actividad antimicrobiana. Los datos presentados son los diámetros de los halos de inhibición en milímetros.

Extracto	*Pseudomonas fluorescens*	*Proteus vulgaris*	*Staphylococcus aureus*
Art (D)	-	-	-
Art (H)	-	7.85	9.00
Cha (D)	13.33	-	11.00
Cha (H)	15.00	-	9.00
Fcp (D)	15.33	7.83	13.00
Fcp (H)	16.66	10.33	13.66
Iso (D)	-	-	8.66
Iso (H)	-	-	10.50
Tes (D)	12.33	-	15.33
Tes (H)	-	-	8.66

Para comprobar que los halos de inhibición formados alrededor de los discos impregnados con extractos fueron producto de la acción de algunas de las moléculas recuperadas en la extracción, fue necesario realizar un ensayo de toxicidad el cual se realizó de manera simultanea a los demás ensayos. Este ensayo se realizó con los tres disolventes utilizados: extracción (diclorometano y hexano) y para la resuspensión (DMSO). Como resultado de este ensayo pudimos corroborar que ninguno de los disolventes afectó el crecimiento celular de las cepas utilizadas, por lo que se pudo comprobar que los resultados no fueron producto de un falso positivo ocasionado por los disolventes utilizados.

De las bacterias usadas en este ensayo, 3 de ellas, *Klebsiella pneumoniae, Serratia marcecens y Pseudomonas aeruginosa* no presentaron halos de inhibición al estar en contacto con los extractos, el crecimiento bacteriano fue homogéneo en todas las placas de cultivo, se consideró entonces que estos organismos son resistentes a los compuestos contenidos en los extractos.

De las bacterias sensibles a algunos de los compuestos contenidos en los extractos, dos fueron bacterias Gram positivas y una Gram negativa esto le da a los extractos la característica de tener acción antibiótica de amplio espectro.

Pseudomonas fluorescens fue sensible a los compuestos contenidos en los extractos de *Tetraselmis suecica* (D), *Chaetoceros muelleri* (D y H) y al extracto de fluido corporal de pescado (D y H), siendo estos últimos los que produjeron un mayor diámetro de halo en este microorganismo.

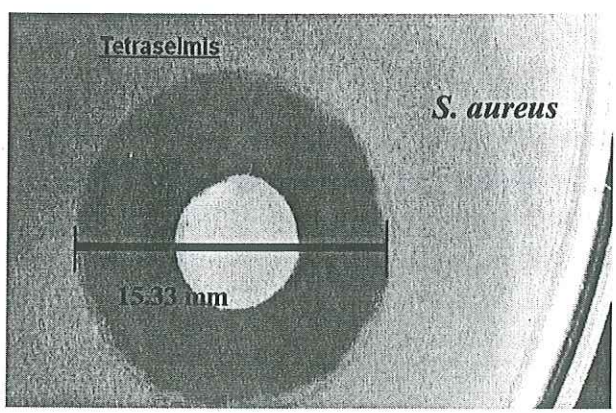

Figura 23. Fotografía de acercamiento a uno de los halos de inhibición obtenidos de un cultivo de *Staphylococcus aureus* en contra de un extracto de *Tetraselmis suecica* (D).

Staphylococcus aureus fue la bacteria más sensible, los extractos con un mayor efecto fueron los de *Tetraselmis suecica* (D) con un diámetro promedio de 15 mm (Fig. 23), fluido corporal de pescado (D y H) con 13 mm y *Chaetoceros muelleri* (D) con 11 mm de diámetro promedio (Fig. 24). Los cultivos de *Proteus vulgaris* (Fig. 25), fueron sensibles a los extractos de fluido corporal de pescado D y H (7.83 y 10.3 mm respectivamente) *Arthrospira maxima* (H) con 7.85 mm, donde el extracto fluido corporal de pescado (H) fue el que presentó un mayor diámetro de inhibición (Tabla IV).

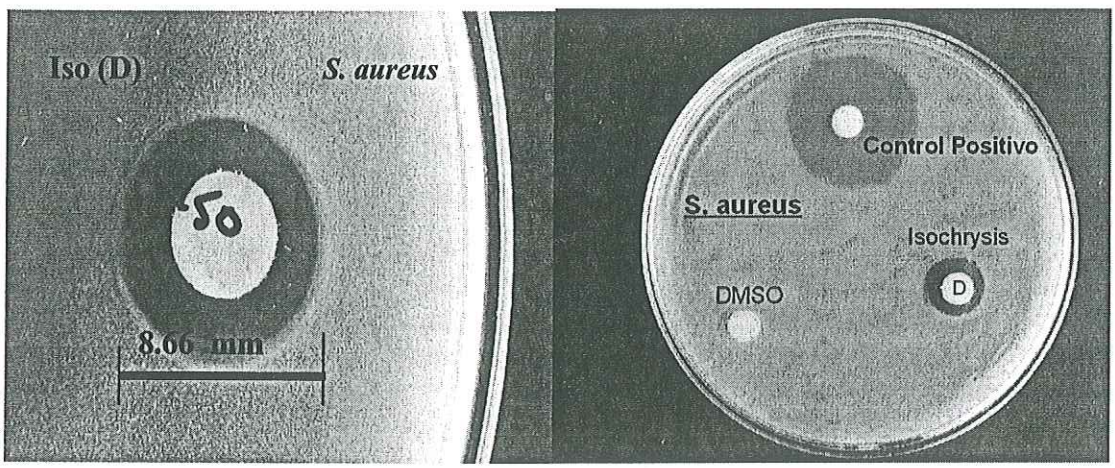

Figura 24. Halos de inhibición producidos por un extracto de *Isochrysis* sp (D) en un cultivo de *Staphylococcus aureus* (Imipenem como control positivo).

Los diámetros de los halos formados en los cultivos de *P. fluorescens* tuvieron en promedio valores entre 12 y 16 mm, tomando en cuenta que el diámetro del halo es directamente proporcional a la concentración del extracto, se puede pensar que existe una actividad considerable de los extractos con resultado positivo (Tabla IV).

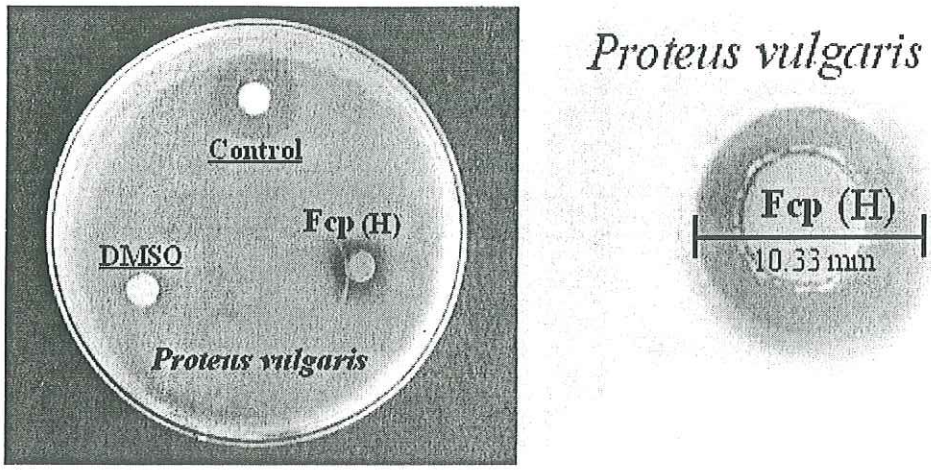

Figura 25. Fotografía de los halos de inhibición observados en un cultivo de *Proteus vulgaris* producidos por el extracto de *Fluido corporal de pescado* (H).

Para *S. aureus* se presentaron valores promedio desde 8 hasta 15 mm, la deferencia entre los diámetros producto de los diferentes extractos es debida ya sea a que los extractos presentaron concentraciones diferentes de acuerdo a los disolventes y al organismo utilizado, debido a que los compuestos bioactivos no se encuentran en las mismas proporciones, o debido a que se tienen compuestos distintos con actividades distintas, y pueden estar en concentraciones muy bajas que no se aprecia actividad (Tabla IV).

En los ensayos con *P. vulgaris* se presentaron halos de inhibición únicamente con tres extractos, los cuales dieron diámetros entre 7 y 10 mm (Tabla IV), estos valores son bajos tomando en cuenta que los discos de papel utilizados tienen 6 mm de diámetro, pero como no sabemos cuál es la concentración real del o de los compuestos activos, no podemos determinar la actividad real de estos.

En la Figura 26 tenemos los datos de la relación entre bacterias sensibles a los extractos de *Tetraselmis suecica* y los diámetros de los halos de inhibición.

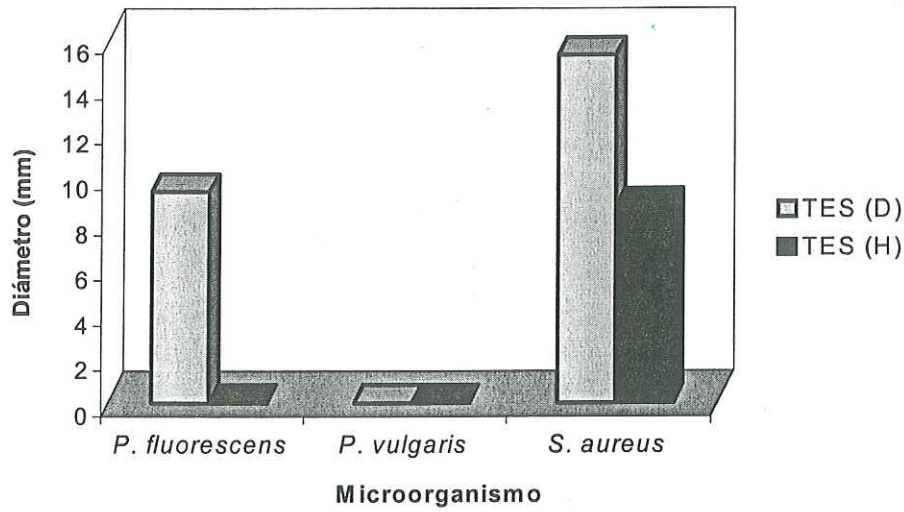

Figura 26. Datos de diámetro de halo de inhibición producido por los extractos de *Tetraselmis suecica* en las diferentes cepas utilizadas.

Se aprecia que el extracto de Tes (D) presentó actividad en *P. fluorescens* (12.33 mm) y *S. aureus* (15.33 mm) mientras que le extracto de Tes (H) solo fue activo en contra de *S. auresus* (8.66) a un nivel más bajo que el extracto anterior.

Los datos de la Figura 27 nos muestran que de los extractos de *Isochrysis* sp. Iso (D y H) tuvieron actividad solo en los cultivos de *S. aureus*, 8.66 y 10.5 mm respectivamente. Este resultado se debe a que los disolventes diclorometano y hexano presentan diferentes polaridades por lo que al realizar las extracciones, en la fase orgánica (fase del disolvente) se atrapan moléculas con características afines al disolvente utilizado, por lo tanto algunas de las moléculas en cada extracto son diferentes.

Para el caso de la Figura 28 en donde se muestran los datos de los resultados de los ensayos con los extractos de *Chaetoceros muelleri* se puede observar una actividad similar para ambos extractos, Cha (H) y Cha (D), produciendo halos de inhibición con diámetros promedio entre 9 y 15 mm pero únicamente en las cepas de *S. aureus y P. fluorescens*.

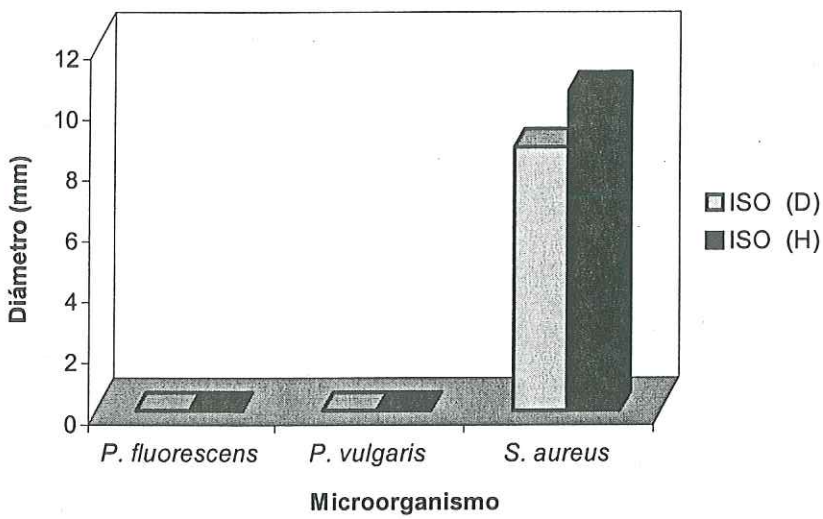

Figura 27. Actividad antimicrobiana de los extractos de *Isochrysis* sp.

Para los extractos de *Arthrospira máxima* únicamente se tuvo un efecto inhibitorio en la cepa de *S. aureus.* y *P. vulgaris* presentando halos de 9.0 y 7.85 mm de diámetro respectivamente. Estos halos fueron producto de la acción Art (D) que fue el presento actividad únicamente (Fig. 29).

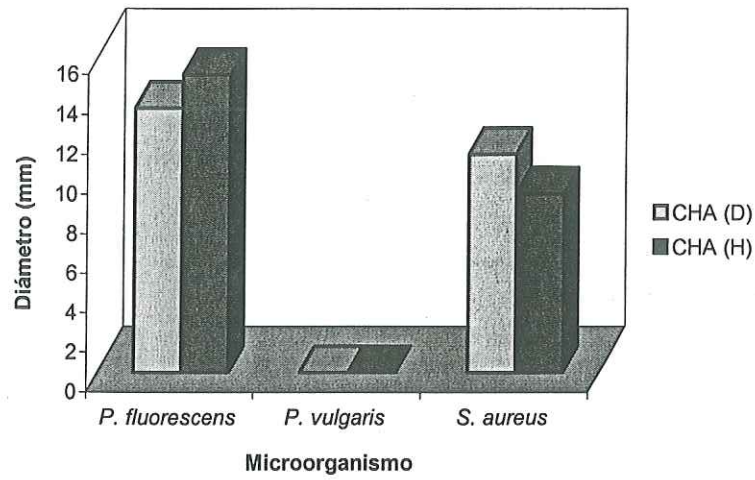

Figura 28. Datos obtenidos en el ensayo de actividad antimicrobiana de los extractos de *Chaetoceros muelleri.*

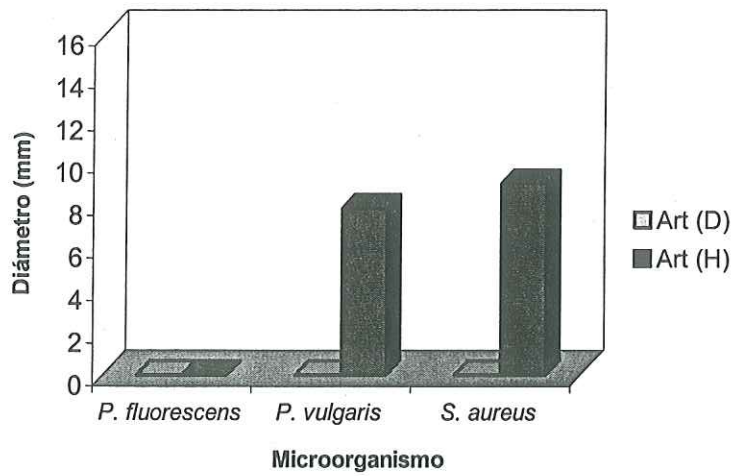

Figura 29. Prueba de actividad de los extractos de *Arthrospira maxima* en las diferentes cepas a prueba.

En los extractos de fluido corporal de pescado (Fcp) se obtuvieron halos de inhibición en las cepas *S. aureus, P. vulgaris y P. fluorescens*. Los halos formados en *P. fluorescens.* fueron los de mayor tamaño, principalmente en extracto de fluido corporal de pescado (H), mientras que para *P. vulgaris y P. fluorescens* los resultados fueron muy similares. (Fig. 30).

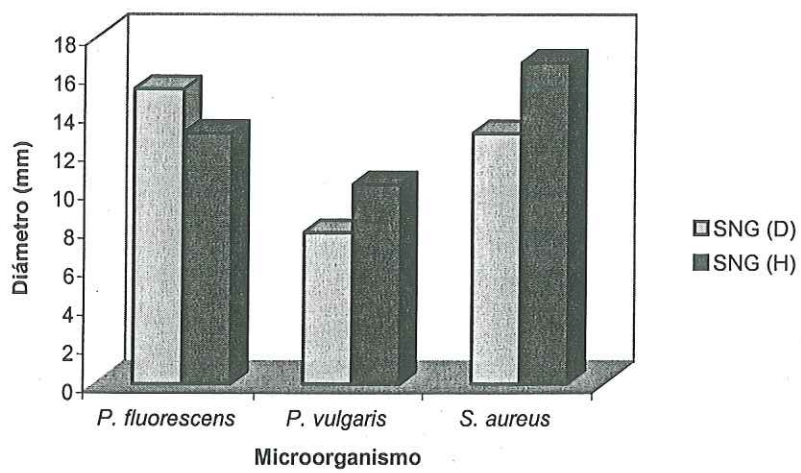

Figura 30. Resultados de actividad antimicrobiana para los extractos de fluido corporal de pescado.

VII.4. Ensayo de actividad anticancerígena

Se logró activar la línea celular de cáncer de colon LIM1215 y se pudo obtener un cultivo en monocapa en las placas con 96 pozos. Después de esto iniciamos la propagación de células resembrándolas en una placa nueva y manteniéndolas en incubación hasta la formación de un 80 % de monocapa. Una vez que obtuvimos una cantidad suficiente, iniciamos el ensayo de actividad anticancerígena.

Para el ensayo en el que utilizamos 1 µl de extracto por pozo tuvimos como resultado que 9 de los 10 extractos utilizados presentaron un efecto inhibitorio considerable en contra de las células cancerígenas (Tabla V). En particular los extractos de Cha (D) con un valor promedio de absorbancia 0.525, Tes (D) con 0.566, Iso (D) con 0.523 y Art (H) que presentó el valor más bajo de absorbancia con 0.517, indicando una actividad anticancerígena mayor comparada con el resto de los extractos, los cuales presentaron igualmente actividad inhibitoria considerable, pero a un nivel más bajo. De manera contraria, el extracto de Fcp (D) tuvo un valor de absorbancia de 1.36 por lo que no presentó efecto inhibitorio alguno sobre el crecimiento celular.

En los pocillos de la fila 11, en los cuales se adicionó 1µl de disolvente DMSO, los valores de absorbancia en estos pocillos fueron mayores a 1.2, la coloración de los cultivos fue intensa indicando que no existió inhibición del crecimiento celular en las células cancerígenas. De igual manera, para los pocillos de la fila 12, se agregó 1 µl del medio RPMI utilizado para el cultivo celular como control negativo (Tabla V), aquí los valores de absorbancia presentados fueron igualmente altos, con valores por arriba de la unidad, al

igual que en los pozos con disolvente, indicando un crecimiento normal de las células cultivadas.

Tabla V. Datos de absorbancia del ensayo de actividad anticancerígena adicionando 1 µl de extracto.

Extracto	A	B	Promedio
Art (D)	0.822	0.520	0.671
Art (H)	0.511	0.524	0.517
Ch (D)	0.554	0.497	0.525
Ch (H)	0.729	0.523	0.626
Fcp (D)	1.271	1.449	1.36
Fcp (H)	0.884	0.624	0.754
Iso (D)	0.550	0.597	0.573
Iso (H)	0.719	0.671	0.695
Tes (D)	0.565	0.568	0.566
Tes (H)	1.179	0.752	0.965
DMSO	1.209	1.503	1.356
RPMI	1.262	1.266	1.264

Art: *Arthrospira maxima*
Cha: *Chaetoceros muelleri*
Fpc: Fluido corporal de pescado
Iso: *Isochrysis* sp.
Tes: *Tetraselmis suecica*

DMSO: control
RPMI: control

El color observado en los cultivos celulares depende de la acción de los extractos sobre las células, es decir, que si los extractos producen muerte celular, las enzimas (deshidrogenasa) que reducen el compuesto presente en el reactivo utilizado (MTS) no presentan actividad, así que en el cultivo no se presenta una coloración. Esto nos indica que se produjo una muerte celular y, entre menor sea la tonalidad del medio, mayor muerte de células. Por lo contrario, si existe un gran número de células viables en el cultivo, el compuesto tetrazolio es reducido por acción enzimática, produciendo una coloración característica, en este caso se presentó una coloración marrón, la cual es directamente proporcional a la concentración de enzima, de esta manera podemos conocer la cantidad de

células vivas midiendo la formación de este compuesto colorido utilizando la longitud de onda a la que absorbe la luz (450 nm).

Los cultivos celulares que fueron puestos en contacto con 10 µl de extracto presentaron un resultado poco confiable, debido a que en los pocillos en donde se agregaron 10 µl de DMSO como control se obtuvieron valores de absorbancia muy bajos indicando una muerte celular, por lo que los resultados positivos aparentes en los demás pocillos en donde se aprecia una muerte celular considerable, pues presentaron una coloración marrón muy tenue o casi imperceptible, puede ser por el efecto del disolvente y no por el efecto directo de los extractos sobre la monocapa.

Tabla VI. Resultados del ensayo de actividad anticancerígena utilizando 10 µl de extracto.

Extracto	C	D	Promedio
Art (D)	0.586	0.559	**0.572**
Art (H)	0.778	0.798	**0.788**
Ch (D)	0.847	0.833	**0.84**
Ch (H)	0.711	0.704	**0.707**
Fcp (D)	1.188	1.214	**1.201**
Fcp(H)	1.646	1.725	**1.685**
Iso (D)	0.882	0.857	**0.870**
Iso (H)	1.583	7.479	**1.531**
Tes (D)	0.931	0.915	**0.923**
Tes (H)	0.680	0.676	**0.678**
DMSO	0.613	0.639	**0.626**
RPMI	1.352	1.363	**1.357**

Entonces, de acuerdo a la lectura de absorbancia del control negativo podemos descartar la posibilidad de un efecto anticancerígeno utilizando 10 µl de extracto, debido a que sabemos que con 10 µl de DMSO, se inhibe el crecimiento celular porque a este volumen de disolvente se produce un efecto tóxico en las células cultivadas. Por lo anterior, estos datos fueron descartados para los análisis posteriores (Tabla VI).

La Figura 31 nos muestra el comportamiento que siguieron los cultivos al contacto con 1 µl de cada uno de los extractos y los controles, así como la desviación estándar para cada uno de ellos. Se puede apreciar como en los extractos en los que se utilizó diclorometano como disolvente de extracción, los valores de absorbancia fueron ligeramente más bajos que los observados en los extractos en los que se utilizó hexano.

El valor de absorbancia más bajo se presento al utilizar el extracto de Art (H) con 0.517, esto nos indica un mayor efecto anticancerígeno en relación a los demás extractos preparados, esto nos ayuda a posteriormente investigar con más detalle los metabolitos producidos por *Arthrospira máxima.* Los extractos de Tes (H) y Fcp (D) presentaron los valores altos de absorbancia, esto nos indica que estos extractos tuvieron un efecto muy bajo en el crecimiento para Tes (H), mientras que para Fcp (D), el valor de absorbancia fue superior al esperado promoviendo el crecimiento celular.

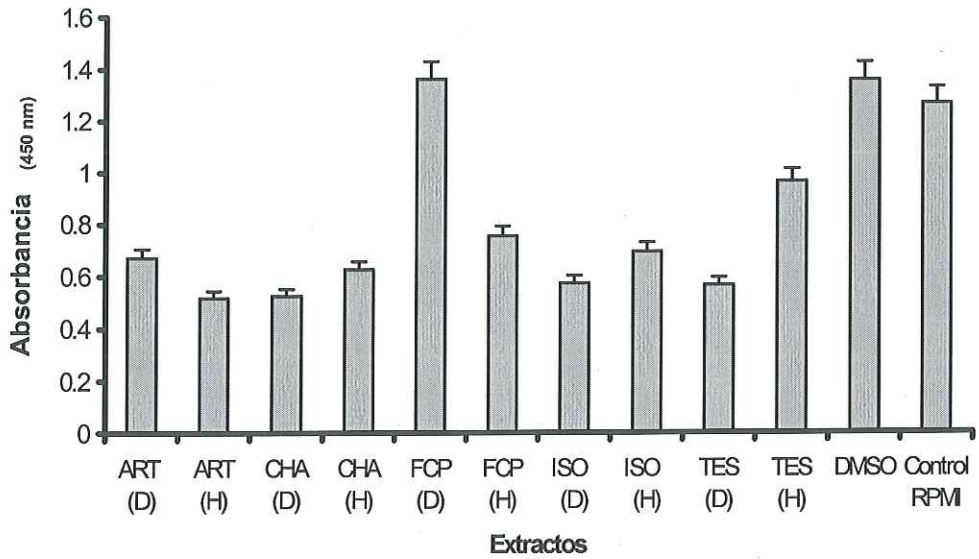

Figura 31. Valores promedio de absorbancia obtenidos a partir de los ensayos de actividad anticancerígena (1µl de extracto). Barra = desviación estándar.

Como los valores de absorbancia de la mayoría de los extractos fueron bajos, comparados con los valores obtenidos por los controles, excepto Fcp (D), esto nos indica que al entrar en contacto el extracto con las células, el crecimiento celular se detuvo y se produjo una muerte celular, ya sea por apoptosis o por necrosis.

Estos resultados son muy alentadores, ya que al analizar los volúmenes de extracto utilizados en los ensayos positivos podemos notar que el efecto observado fue muy considerable, lo que nos indica que los compuestos que se encuentran en los extractos son activos a muy baja concentración.

En la gráfica 32 se presentan los porcentajes sobrevivencia celular presentado al final del ensayo tomando a los pozos con DMSO como el 100% de sobrevivencia De esta forma, los extractos de Cha (D y H), Art (H) e Iso (D y H) presentaron porcentajes por debajo del 50%.

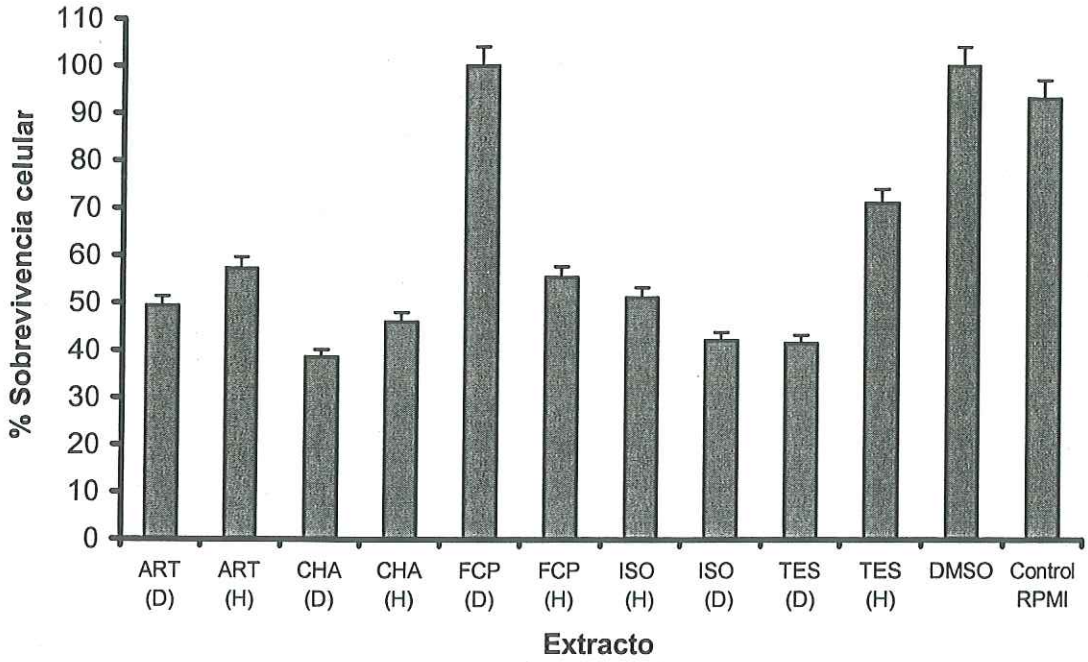

Figura 32. Porcentaje de sobrevivencia celular en los cultivos de LIM1215 (1 µl de extracto).

Cabe hacer notar que el porcentaje de células vivas en el caso de los resultados obtenidos con el extracto de Fcp (D), en el cual se pudo apreciar un porcentaje mayor al control indicando un crecimiento celular mayor al final del ensayo comparando con el presentado en los pozos con el control (DMSO), por lo tanto podemos pensar que dentro de este extracto pueden existir compuestos que promueven el crecimiento celular, por lo que al contrario de ser tóxico para la célula se aumenta la cantidad de células. Entonces, los resultados nos sugieren que los extractos de microalgas utilizados, contienen compuestos con la capacidad de producir algún efecto sobre el crecimiento celular.

VIII. CONCLUSIONES

Al finalizar este trabajo se corroboró que las microalgas tienen la capacidad de producir compuestos con actividad biomédica. Al realizar el ensayo de actividad antimicrobiana se pudo observar que las microalgas utilizadas y el subproducto pesquero tienen la capacidad de producir compuestos con la habilidad de inhibir el crecimiento celular de algunas cepas de bacterias. Esta capacidad se pudo constatar al observar la formación de halos de inhibición transparentes alrededor de los discos utilizados en los cultivos de bacterias. De acuerdo con los resultados, comprobamos que los extractos de la microalga *Tetraselmis suecica* fueron de los que presentaron una actividad antimicrobiana mayor, de igual manera los extractos de fluido corporal de pescado presentaron halos de inhibición considerables principalmente en contra de la bacteria *Staphylococcus aureus*.

También se confirmó que éstos organismos poseen la capacidad de producir compuestos anticancerígenos, los cuales inhibieron el crecimiento en un línea celular de cáncer de colon LIM1215. El efecto fue notable utilizando un volumen muy bajo de los extractos (1 µl) lo que para fines terapéuticos es muy bueno por que no sería necesario aplicar grandes dosis para poder observar un efecto y de esta manera disminuir los posibles efectos secundarios de su administración.

Entonces:

1. De los compuestos producidos por las microalgas utilizadas en este trabajo, existen algunos que fueron extraídos con disolventes orgánicos con la capacidad de afectar el crecimiento de células bacterianas, algunas con características de patogenicidad muy

importantes en diversas infecciones. Estos compuestos presentaron la cualidad de afectar tanto bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, lo que les da la característica de ser de amplio espectro, cualidad muy importante en el caso de fármacos antimicrobianos.

2. Algunos de los compuestos extraídos por microalgas presentaron efecto inhibitorio en células cancerígenas de colon produciendo muerte celular, en este caso en células de cáncer de colon LIM1215. Estos compuestos pueden ser de naturaleza lipídica (ácidos grasos insaturados) o compuestos antioxidantes como pigmentos.
3. La baja concentración a la cual se presentó el efecto en ambos casos nos indica la gran actividad de estos compuestos. Esto les da una característica favorable debido a que en la actividad terapéutica, es muy conveniente tener compuestos que actúen a concentraciones muy bajas.

IX. PERSPECTIVAS

Al finalizar este trabajo, se presentan las siguientes recomendaciones:

- Purificación e identificación total de los componentes activos de los extractos.
- Realizar pruebas de toxicidad a los extractos
- Estudio sobre el mecanismo de acción antibacterial
- Análisis para determinar la inducción a muerte celular.

LITERATURA CITADA

- Ausubel F., Brent R., Kingston R., Moore D., Seidman J., Smith J. y Struhl K. (1992) **Short Protocols in Molecular Biology**. Segunda Edición. Editorial John Wiley & Sons. New York. 1-3.

- Ayehunie S., Belay A., Baba T. y Ruprecht R. (1998) **Inhibition of HIV-1 replication by an aqueous extract of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*).** Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology. 18: 7-12.

- Bernan V., Greenstein M. y Maiese W. (1997) **Marine microorganisms as a source of new natural products**. Advances in Applied Microbiology. 43: 57-90.
- Breese W. y Malouf R., (1974) **Hatchery manual for the pacific oyster**. Oregon State University, Sea Grant College Program, 21.
- Brown M., Jeffrey S., Volkman J. y G. A. Dunstan (1997). **Nutritional properties of microalgae for mariculture**. Aquaculture. 315-331.

- Bruce D. y Duff, D. (1967). **The identification of two antibacterial products of marine planktonic algae *Isochrysis galbana***. Journal of General Microbiology. 48: 293-298.

- Carmichael WW. (1988). **Toxins of freshwater algae.** En: AT tu (ed.), Handbook of Natural Toxins. Editorial Marcel Dekker, New York. Vol 3.p 121-147.
- Carté B. K. (1996). **Biomedical Potential of Marine Natural Products**. Bioscience. 46 (4): 271-286.
- Castenholz R., (1994) **Oxigenic photoautotrophic bacteria**. En: Holt J. G., Krieg N.R., Sneath P. H. A., Staley J. T., Williams S. T. (eds.) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th edition. Williams and Wilkins Publishers, Baltimore: 393.
- Ciferri O. y Tiboni O. (1985) **The biochemistry and industrial potential of *Spirulina***. Annual Reviews Microbiology. 39: 503-26.

- Duff D. y Bruce D. (1966). **The antibacterial activity of marine planktonic algae.** Canadian Journal of Microbiology. 5(12): 877-884.

- El-Masry M., Mostafa M., Ibrahim A. y El-Naggar M. (1995) **Marine algae that display anti-tumorigenic activity against *Agrobacterium tumefaciens*.** FEMS Microbiology Letters 128: 152-156.

- Faulkner D. J. (1995). **Natural products reports.** Natural Products Reports 12: 223-269.

- Faulkner D. J. (2000). **Highlights of marine natural products chemistry (1972-1999).** Natural Products Report., 1-6, 17.

- Forber B., Sahm D. y Weissfeld A. (1999) **Diagnostic Microbiology**. Décima edición. Editorial Mosby, 234-237, 509, 607-609.

- Gauthier M., Bernard P. y Aubert M. (1978). **Production d'un antibiotique lipidique photo-sensible par la diatomée marine *Chaetoceros lauderi*** (RALFS). Annals on Microbiology. (Institute Pasteur) 129 B: 63-70.

- Gerwick WH (1993). **Carbocyclic oxylipins of marine origin**. Chemistry Reviews. 93:1807-1823.

- Gerwick W., Roberts M., Proteau P. y Chen J. (1994) **Screening cultured marine microalgae for anticancer-type activity**. Journal of Applied Phycology. 6: 143-149.

- Goodwin T. W. (1974). **Sterols**. Algal physiology and biochemistry. Editorial WDP Stewart. Berkeley: University of California Press. 266-280.

- Guillard, R. y Ryther J. (1962) **Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervaceae* (Cleve).** Canadian Journal of Microbiology. 8: 229-239.

- Hall S., Strichartz G., Moczydlowski E., Ravindran A. y Reichardt PB. (1987) **The saxitoxins: sources, chemistry and pharmacology**. (Eds.) S. Hall, S. G. Strichartz. Marine Toxins ACS Symposium, series 418. Washington DC: American Chemistry Society. 29-65.
- Hayashi T. y Hayashi K (1996) **Calcium Spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green algae *Spirulina platensis***. Journal of Natural Products. 59: 83-87.
- Hayashi T., Hayashi K. y Kojima I. (1996) **A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: *in vitro* and *ex vivo* evaluation of anti-herpes simples virus and anti-human immunodeficiency virus activities.** Aids Research and Human Retroviruses. 15(12):1463-1471.
- Hideki H., Tadahide N. y Yuto K. (1997) **Selective antitumor activity in vitro from marine algae from Japan coasts.** Biological Pharmaceutical Bulletin. 20(5): 541-546.
- Hiroyuki N., Hideomi A., Koichi A., Shinziro H. y Kazutosi N. (1989) **Antitumor activity of polysaccharides and lipids from marine algae**. Nippon Suisan gakkaishi (antes Bulletin of Japaness Society of Science and Fisheries) 55(7): 1265-1271.
- Hiroyuki N., Hideomi A., Koichi A., Shinziro H. y Kazutosi N. (1989). **Studies on the antitumor activity of marine algae**. Nippon Suisan gakkaishi (antes antes Bulletin of Japaness Society of Science and Fisheries.) 55 (7):1259-1264.
- Igarashi T., Satake M. y Yasumoto T. (1994) **Structural study of prymnesins isolated fron the red tide algae *Prymnesium parvum***. Sym. Chem. Nat. Prod. 36:89-97.
- Ireland C., Roll D., Molinsky T., McKee T., Zabriske T. y Swersey J. (1988). **Uniqueness of the marine environment: categories of marine natural products from invertebrates.** En: Fautin D. G., (ed.) Biochemical Importance of marine organisms. San Francisco (CA): California Academy of Science. p. 41 - 57

- Ishibashi M., Ohizumi Y., Hamashima M., Nakamura H. e Hirata Y. (1987). **Amphidinolide-B, a novel macrolide with potent antineoplasic activity from marine dinoflagellate *Amphidinium* sp.** J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1127-29.

- Jensen P. y Fenical W. (1994). **Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: ecological perspectives.** Annual Reviews of Microbiology. 48: 559-584.

- Joffe S. y Thomas R. (1989). **Phytochemicals: a renewable global resource.** Agricultural Biotechnology. News Information 1: 697–700.

- Kellam S. y Walker J. (1989). **Antibacterial activity from marine microalgae in laboratory culture.** Br. Phycol. J. 24: 191-194.

- Kellam S., Cannell R., Owsianka A., y Walker, J. M. (1988). **Results of a large-scale screening programme to detect antifungal activity from marine and freshwater microalgae in laboratory culture.** Br. Phycol. J. 23: 45-47.

- Kenichi S., Eiichi K., Masahiro M., Shiro S. y Koichi O. (1998) **Induction of apoptosis by a marine microalgal polysaccharide in human leukemic cell line.** Journal Marine Biotechnology. 6: 241-243.

- Kenichi S., Masahiro M. y Koichi O. (1998) **Marine microalgal polisaccharide induces apoptosis in human lymphoid cell.** Journal Marine Biotechnology. 6: 35-38.

- Kodama M. (1990). **Possible links between bacteria and toxin production in algal blooms.** En: (Eds.) E. Granéli, B. Sunström, L. Edler, Dm Anderson. Toxic Marine Phytoplankton. New York: Elsevier. 52-61.

- Kobayashi J. e Ishibashi M. (1993). **Bioactive metabolites of symbiotic marine microorganisms.** Chemical Reviews. 93: 1753-69.

- Licea A. (1994) **Incremento de la respuesta inmunológica de linfocitos T dirigida contra *Mycobacterium leprae*, utilizando polímeros de péptidos sintéticos.** Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. p 16.

- Lin Y., Risk M., Ray S., Van Engen D. y Clardy J. (1981) **Isolation and structure of brevetoxin B from the "red tide" dinoflagellate Ptychodiscus brevis (Gymmodium breve).** Journal of the American Chemistry Society 103: 6773-75.

- Lustigman B. (1988). **Comparison of antibiotic production from four ecotypes of the marine algae, *Dunaliella*.** Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology. 40: 18-22

- Marquez F., Sasaki K., Nishio N. y Nagai S. (1995) **Enhancement of biomass and pigment production during growth of Spirulina platensis in mixotrophic culture.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 62: 159-164.

- Mathew B., Sankaranarayanan R., Nair P., Varghese T., Somanathan T., Amma B., Amma N. y Krishnan M. (1995). **Evaluation of chemoprevention of oral cancer with *Spirulina fusiformis*.** Nutrition and Cancer. 2 (24): 197-201.

- Morimoto T., Nagatsu A., Murakami N., Sakakibara J., Tokuda H., Nishino H. e Iwashima A. (1995) **Anti-tumor-promoting glyceroglycolipds from the green algae *Chlorella vulgaris*.** Phytochemistry. 5 (40): 1433-1437.

- Murakami M., Makabe K., Yamaguchi K., Konosu S., Wälchli M. (1988) **Goniodomin A, a novel polyether macrolide from the dinoflagellate *Goniodoma pseudogoniaulax*.** Tetrahedron Letters. 29: 1149-52.

- Nakamura H., Asari T., Murai A., Kan Y. y Kondo T. (1995) **Zooxanthellatoxin A, a potent vasoconstrictive 62-membered lactones from a symbiotic dinoflagellate.** Journal of American Chemistry. 117: 550-51.

- Nakamura H., Asari T., Ohizumi Y., Kobayashi J., Yamasu T. y Murai A. (1991) **Isolation of zooxanthellatoxins, novel vasoconstrictive substances from the zooxanthella *Symbiodinium* sp.** Toxicon. 31: 371-76.

- Neilsen E. S. (1955) **The production of antibiotics by plankton algae and its effect upon bacterial activities in the sea.** Deep – Sea Res. 3 (Suppl.), 496-497.
- Rein K. y Borrone J. (1999) **Polyketides from dinoflagellates: origin, pharmacology and biosynthesis**. Comparative Biochemistry and Physiology Part B. 124: 117-131.
- Schantz E., Lynch J., Vayvada G., Matsumoto K. y Ropoport H. (1966). **The purification and characterization of the poison produced by Gonyaulax catenella in axenic culture**. Biochemistry 5: 1191-95.
- Schwartz J. y Shklar G. (1987) **Regression of experimental hamster cancer by beta carotene and algae extracts**. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 45:510-515.
- Schwartz J, Shklar G, Reid S, Trickler D. (1988) **Prevention of experimental oral cancer by extracts of Spirulina-Dunaliella algae.** Nutrition and Cancer. 2 (11): 127-134.
- Serrano H. S. (1992) **Regulación por fuente de carbono en la biosíntesis de Lincomicina por *Streptomyces lincolnensis* Atcc 25466.** Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California. pp. 57-59.
- Shimizu Y, Alam M, Kobayashi A. (1976). **Dinosterol, the mayor sterol with a unique side chain in the toxic dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis***. Journal of the American Chemistry Society. 98: 1059.
- Shimizu Y., Chou H., Bando H., Van Dune G. y Clardy J. (1986) **Structure of brevetoxin A (GB-1 Toxin), the most potent toxin in the Florida red tide organism Gymmodium breve (Ptychodiscus brevis).** Journal of the American Chemistry Society. 108: 514-15.
- Shimizu Y. (1979) **Dinoflagellate toxins**. In Marine Natural products-Chemical and biological perpectives. Editorial PJ Scheuer, p 1-42. New York, Academic Press.

- Shimizu Y. (1993) **Microalgal metabolites.** Chemical reviews 93: 1685-1698.
- Shimizu Y. (1996) **Microalgal metabolites: A new perspective**. Annual Reviews of Microbiology. 50:431-65
- Singleton P., Sainbury D. (1997). **Dictionary of Microbiology and Molecular Biology**. Jhon Wiley and Sons, Segunda edición, New York 811p.
- Sonenshein A., Hoch J., Losick R. (1993) **Bacillus Subtilis and other Gram-positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics**. Editorial American Society for Microbiology. 17-22
- Souichi O., Thomas C., Naoto I., Masaomi K. y Hideaki M. (1993) **Antibiotic substance produced by a newly isolated marine microalga, Chlorococcum HS-101**. Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology. 50: 171-178.

ANEXO

COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS UTILIZADOS

1. **Composición del medio rico Luria Bertani** (Frederick *et al.*, 1992)

COMPONENTES	
Extracto de Levadura	5 g
NaCl	5 g
Triptona	10 g
NaOH 1N	1ml
H_2O destilada	1000 ml
Para preparar LB sólido adicionar:	
Agar	15 g

2. **Medio de agua de mar enriquecido f/2 para microalgas** (Guillard y Ryther, 1962)

1. NUTRIENTES MAYORES	
1.1.- $NaNO_3$	75 g
1.2- $NaH_2PO4.H_2O$	5g
1.3.-$Na_2SiO_3.9H_2O$	30g
1.4.-H_2O destilada	1000 ml

2.-METALES TRAZA	
A.- Solución Primaria	
2.1.- $CuSO_4.5H_2O$	0.98 g
2.2.- $ZnSO_4.7H_2O$	2.20g
2.3.- $CoCl_2.6H_2O$	1.00g
2.4.- $MnCl_2.4H_2O$	18.00g
2.5.- $Na_2MoO_2.2H_2O$	18.00g
H_2O destilada	1000.00 ml

B.- Solución Secundaria	
$FeCl_3.6H_2O$	3.15 g
FeEDTA	5.00 g
Agregar un ml/lt de cada una de las soluciones primarias	
H_2O destilada	1000.00 ml

3.-VITAMINAS	
A.- Solución Primaria	
A.1.-Biotina cristalizada	0.1g
B.2-Cianocobalamina	1.0g

B.- Solución Secundaria	
Biotina	1 ml de sol. A.1
Cianocobalamina (B12)	1 ml de sol. B.1
Tiamina Clorhídrica	20 mg
H_2O destilada	1000 ml

Medio Mineral SOT para *Arthrospira* (Marquez *et al.*, 1995).

Componentes	
$NaHCO_3$	16.80 g
K_2HPO_4	0.50 g
$NaNO_3$	2.50 g
K_2SO_4	1.00 g
NaCl	1.00 g
$MgSO_47H_2O$	0.20 g
$CaCl_22H_2O$	0.04 g
$FeSO_47H_2O$	0.01 g
$Na_2EDTA2H_2O$	0.08 g
Mezcla de metales traza A5	1.00 ml
Mezcla de minerales traza B6 Modificado	1.00 ml
Agua destilada	1000.00 ml

Ajustar medio para un pH final de 9.0.

Mezcla de minerales traza B6 Modificado

COMPONENTES	
NH_4NO_3	0.23 g
$K_2Cr_2(SO_4)_424H_2O$	96.00 mg
$NiSO_47H_2O$	47.80 mg
$Na_2WO_42H_2O$	17.90 mg
$Ti_2(SO_4)_3$	40.00 mg
Agua destilada	1000.00 ml

Mezcla de metales traza A5

Componenetes	
H_3BO_3	2.86 g
$MnCl_24H_2O$	1.81 g
$ZnSO_47H_2O$	0.22 g
$NaMoO_42H_2O$	0.39 g
$CuSO_45H_2O$	0.07 g
$Co(NO_3)_26H_2O$	49.40 mg
Agua destilada	1000.00 ml

Medio RPMI 1640, Sigma (Licea, 1994)

Componentes	$mg.l^{-1}$
L-ARGININA (base libre)	200.0
L-ASPARAGINA	50.0
Ác. L-ASPARTICO	20.0
L-CISTINA	50.0
Ac.L-GLUTAMICO	20.0
L-GLUTAMINA	300.0
Glutation (reducido)	1.0
GLICINA	10.0
L-HISTIDIAN	15.0
L-HIDROXIPROLINA	20.0
L-ISOLEUCINA	50.0
L-LEUCINA	50.0
L-LISINA, HCl	40.0
L-METIONINA	15.0
L-FENILALANINA	15.0
L-PROLINA	20.0
L-SERINA	20.0
L-TREONINA	20.0
L-TRIPTOFANO	0.5
L-TIROSINA	20.0
L-VALINA	20.0

Solución con Vitaminas

Componentes	mg/l
Biotina	0.200
Vitamina B12	0.005
D-Pantotenato, Ca	0.250
Coline,Cl	3.000
Acido folico	1.000
i-Inositol	35.000
Nicotinamida	1.000
Piridoxal, HCl	1.000
Pyridoxina, HCl	1.000
Riboflavina	1.000
Tiamina, HCl	0.200

Procedimiento para determinar Actividad Anticancerígena

- Protocolo general

  1.- Si el reactivo esta almacenado a –20 °C, descongelar, esto toma aproximadamente 90 minutos a temperatura ambiente o 10 minutos en baño de agua a 37 °C hasta descongelar por completo.

  2.- Tomar 20 µl del reactivo y colocarlos en cada uno de los pozos que contiene las muestras en 100 µl de medio de cultivo.

  3.- Incubar la placa de 1-4 horas a 37 °C en ambiente húmedo y con una atmósfera de 5% de CO_2.

  4.- Realizar la lectura de absorbancia a 450 nm.

  Referencia electrónica:
  (http://catalog.promega.com/catalog/catinfo.asp?idx=649)