

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el SECIHTI (Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Doctorado en Ciencias
en Ciencias de la Vida**

**Extracción y caracterización de compuestos bioactivos de
Amphidinium eilatiense con potencial citotóxico sobre líneas
celulares de cáncer**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Doctora en Ciencias

Presenta:

María del Carmen Osorio Ramírez

Ensenada, Baja California, México
2025

Tesis defendida por
María del Carmen Osorio Ramírez

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Lorena María Durán Riveroll
Codirectora de tesis

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Codirector de tesis

Dra. Johanna Bernáldez Sarabia

Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez

Dra. Leticia González Maya

Dr. Allan D. Cembella

Dr. Luis Miguel Botana López



Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **María del Carmen Osorio Ramírez** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctora en Ciencias en Ciencias de la Vida.

Extracción y caracterización de compuestos bioactivos de *Amphidinium eilatiense* con potencial citotóxico sobre líneas celulares de cáncer

Resumen aprobado por:

Dra. Lorena María Durán Riveroll
Codirectora de tesis

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Codirector de tesis

El número de nuevos casos y muertes a causa del cáncer ha aumentado significativamente en las últimas décadas y es un problema de salud pública a nivel mundial. Una cantidad importante de casos se han relacionado con la resistencia de las células cancerosas a las terapias actuales. Los dinoflagelados marinos son una fuente prometedora en la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios con potencial citotóxico y antiproliferativo para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades. El género *Amphidinium* incluye especies bentónicas y ticoplanctónicas, y algunas de ellas producen compuestos bioactivos con actividades antifúngicas, hemolíticas y citotóxicas. En este estudio se evaluó el potencial citotóxico de metabolitos secundarios presentes en los extractos de tres cepas de *Amphidinium eilatiense* mediante un enfoque de fraccionamiento guiado por bioensayo y análisis metabolómico no dirigido. En este estudio se evaluó el potencial citotóxico de metabolitos secundarios presentes en los extractos de tres cepas de *Amphidinium eilatiense* mediante un enfoque de fraccionamiento guiado por bioensayo y análisis metabolómico no dirigido. El objetivo principal fue extraer y caracterizar la fracción con mayor actividad citotóxica sobre líneas celulares de cáncer de mama y pulmón. Los resultados de la caracterización indicaron que las tres cepas corresponden a *Amphidinium eilatiense*. El fraccionamiento guiado por bioensayo mostró que los extractos y las fracciones poseen actividad citotóxica sobre tres líneas de cáncer de mama (MCF-7, MDA-MB-231 y T47D) y cuatro de pulmón (A549, H661, H1437, H1563). Estos extractos crudos no mostraron una disminución en la viabilidad celular de la célula sana de fibroblastos de pulmón (MRC-5). Las fracciones FNP-5 y FNP-6 mostraron mayor actividad citotóxica sobre las líneas MDA-MB-231 y H1563, que fueron las más sensibles a los extractos y no mostraron efectos citotóxicos sobre la línea celular sana. Para identificar los posibles compuestos responsables de la actividad observada, se realizó un análisis de metabolómica no dirigida mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución de las fracciones FNP-5 y FNP-6. Los datos obtenidos fueron comparados con bases de datos públicas de Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS), y complementados con herramientas *in silico* para la predicción estructural y la anotación de metabolitos. A través de este análisis se identificaron grupos moleculares con características estructurales compatibles con compuestos previamente reportados con actividad citotóxica, así como analitos específicos que podrían ser responsables de la actividad citotóxica observada en los ensayos de viabilidad. La combinación de bioensayos dirigidos, fraccionamiento guiado por bioensayos y caracterización metabolómica no solo vinculó grupos estructurales químicos con citotoxicidad significativa, sino que también generó información para el diseño molecular en el tratamiento del cáncer. Estos hallazgos contribuyen a nuestra comprensión de la diversidad química marina entre los dinoflagelados como recurso para la bioprospección farmacológica, y abren la puerta a futuras investigaciones dirigidas a la validación funcional y el aislamiento de metabolitos con aplicaciones biomédicas.

Palabras clave: dinoflagelados; metabolómica; metabolitos secundarios, viabilidad celular

Abstract of the thesis presented by **María del Carmen Osorio Ramírez** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Life Sciences

Extraction and characterization of bioactive compounds by the dinoflagellate *Amphidinium eilatiense* with cytotoxic potential against cancer cells lines

Abstract approved by:

Dra. Lorena María Durán Riveroll
Codirectora de tesis

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro
Codirector de tesis

The number of new cancer cases and deaths has increased significantly in recent decades, becoming a global public health problem. Notably, many recent and untreatable cases are linked to cancer cells' resistance to current anticancer therapies. Marine dinoflagellates represent a promising resource for discovering new secondary metabolites with cytotoxic and antiproliferative potential for treating cancer and other diseases. The dinoflagellate genus *Amphidinium* includes both tychoplanktonic and benthic species, with some producing bioactive compounds that exhibit antifungal, hemolytic, and/or cytotoxic activities. The cytotoxic effect is particularly significant, as conventional cancer treatments often pose challenges due to side effects (among other factors) that current therapies generate in patients. In this study, the cytotoxic potential of secondary metabolites presents in crude extracts of three *Amphidinium* strains, confirmed by molecular and morphological characterization to belong to *A. eilatiense*, was evaluated using a bioassay-guided fractionation approach combined with untargeted metabolomic analysis. The main objective was to characterize the fractions with the highest cytotoxic activity against breast and lung cancer cell lines. Cytotoxicological screening after bioassay-guided fractionation showed that the fractions of strains AeSQ172, AeSQ177, and AeSQ181 all exhibit cytotoxic activity against three breast cancer cell lines (MCF-7, MDA-MB-231, and T47D) and four lung cancer lines (A549, H661, H1437, and H1563). In contrast, these methanolic extracts did not reduce the viability of the lung fibroblast healthy cell line (MRC-5). Moreover, sub-fractions FNP-5 and FNP-6 showed the highest cytotoxic activity against the MDA-MB-231 and H1563 lines, which were the most sensitive to the extracts. These fractions also did not show cytotoxic effects on the healthy fibroblast cell line. An untargeted metabolomic analysis was conducted by liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry on fractions FNP-5, and FNP-6 to identify the potential compounds responsible for the observed bioactivity. The data obtained were compared with public databases from the Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) and complemented with *in silico* tools for structural prediction and metabolite annotation. Untargeted metabolomics analysis identified molecular groups with structural features compatible with previously reported compounds with cytotoxic activity, and specific analytes that may have contributed to the cytotoxic activity observed in the anti-cancer bioassays. This study provides evidence that *A. eilatiense* serves as a rich source of secondary metabolites with selective cytotoxic activity. The combination of targeted bioassays, bioassay-guided fractionation, and metabolomic characterization not only links chemical structural groups with significant cytotoxicity but also generates valuable information for molecular design in cancer treatment. These findings enhance our understanding of marine chemical diversity among dinoflagellates as a resource for pharmacological bioprospecting and pave the way for further research aimed at functionally validating and isolating metabolites with biomedical applications.

Keywords: cell viability; dinoflagellate; metabolomics; secondary metabolites

Dedicatoria

"No me digas que no se puede hacer. Intenta hacerlo. Si no lo consigues, intenta otra cosa"

Sally Ride

A mis padres y hermanos, donde nacen mis raíces y florecen mis sueños. Gracias por caminar a mi lado en cada paso de este viaje. Este logro también es de ustedes, porque en cada desafío encontré su aliento, en cada caída su apoyo, y en cada alegría, la dicha de compartirla juntos.

Agradecimientos

Este trabajo no sería lo que es sin el apoyo incondicional de tantas personas e instituciones que han hecho posible cada paso en este camino. Quiero expresar un agradecimiento profundo a todas y todos los mexicanos, cuyo esfuerzo colectivo hace posible la existencia de instituciones, programas y espacios que impulsan la ciencia y la educación en nuestro país. Gracias por sostener, con su trabajo y compromiso diario, las bases que permiten que jóvenes como yo podamos formarnos, investigar y soñar con un futuro más justo y con más conocimiento para todas y todos.

Agradezco a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación, antes CONACYT, por el apoyo económico a través de la beca de posgrado, que me permitió dedicarme plenamente a este trabajo. Su apoyo fue mucho más que un sustento: fue la oportunidad de vivir la ciencia con intensidad, compromiso y enfoque. También agradezco al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), por ser el hogar académico donde esta tesis nació, creció y se consolidó, brindándome una formación sólida.

A mis directores de tesis, Dra. Lorena María Durán Riveroll y Dr. Alexei F. Licea Navarro, gracias por su guía incansable, por enseñarme con paciencia y rigor, por confiar en mí incluso cuando yo misma dudaba. Esta tesis es también el reflejo de su compromiso y vocación formadora.

Al comité de tesis, Dra. Johanna Bernáldez Sarabia, Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez, Dra. Leticia González Maya, Dr. Allan Douglas Cembella y Dr. Luis Miguel Botana López, gracias por su tiempo, sus observaciones profundas y su disposición para enriquecer este trabajo. Su apoyo fue fundamental, ya que al tener diferentes perspectivas permitió ver oportunidades para mejorar.

Al Dr. Oscar E. Juárez y al Dr. Yuri Okolodkov, por su apoyo en la identificación morfológica y molecular de las cepas. Gracias por compartir su conocimiento con generosidad.

Al MI. Fabián Alonso Cordero, por su apoyo esencial en la obtención de las imágenes de microscopía.

A la M. en C. Samantha Mireya Jiménez Flores, Dra. Itandehi Betanzo Gutiérrez y al M. en C. Jorge Fernando Díaz Castillo, por su ayuda durante el proceso de obtención de extractos y fraccionamiento, una parte clave de este estudio.

A Mario Fernando Sánchez Bernal, por guiarme en el diseño de todas las imágenes de esta tesis. Su creatividad y sensibilidad visual aportaron claridad, belleza y profesionalismo a cada figura.

Al Dr. Baldomero Esquivel Rodríguez, la Dra. Celia Bustos Brito y el Dr. Leovigildo Quijano, por abrirme las puertas del laboratorio de Productos Naturales en el IQ-UNAM, donde viví una estancia de aprendizaje y crecimiento científico inolvidable.

Al Dr. José Rivera Chávez y el Dr. Enrique Aguilar Ramírez, por el apoyo técnico y por permitirme el uso de equipos clave durante la estancia en el IQ-UNAM.

A la Dra. Laura Janeth Díaz Rubio y el Dr. Iván Córdova Guerrero, por su hospitalidad y hacerme sentir tan cómoda en el Laboratorio de Agroquímica y Productos Naturales de la UABC. Gracias al apoyo y guía logramos replicar un experimento que hizo una máquina muy especializada.

Al Dr. Andrew Turner y el Dr. Ben Maskrey, del Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science, por ayudarme con los análisis químicos y enseñarme de manera tan profesional y comprometida a pesar de la distancia.

Al M en C. Gonzalo Isaí Flores Acosta por el apoyo incondicional, por cuidar de mis células en cuando salía de congreso.

Al Dr. Alan Gerardo Hernández Melgar, por tu amistad y por ser mi guía técnica en el procesamiento de los datos para el análisis de metabolómica. Gracias por compartir tu pasión por la metabolómica, ahora quiero saber más de eso. Sin duda tu ayuda fue clave para avanzar en la interpretación de resultados.

A mis papás: gracias por siempre estar ahí, apoyándome sin importar qué tan loco fuera el proyecto o cuántas veces cambiara de rumbo. Su ejemplo, su paciencia hicieron toda la diferencia. A mis hermanos: gracias por las risas, las porras, los memes salvadores en los días pesados y por siempre decir las cosas como son. Tenerlos cerca hace que todo sea más llevadero, incluso lo más complicado. Este logro también es de ustedes. Somos un gran equipo y me siento afortunada de tenerlos como familia. ¡Gracias por tanto!

A Alonso, por tu presencia significativa a lo largo de este proceso, por las palabras oportunas, la escucha atenta y el impulso silencioso que supiste dar en el momento justo.

A mi amiga, hermana y confidente, Sharlin Landeros, gracias por estar siempre, en todo momento. Por tus abrazos cuando no hacía falta decir nada, por las risas, las historias y por recordarme quién soy cuando parecía olvidarlo. Tu cariño y amistad han sido un refugio y un curita para el corazón. Por muchos años más de amistad y ser siempre las tías viajeras.

A mis amix, Sadot, Alexis y Héctor, por ser esos amigos incondicionales con quienes todo fue más fácil. Gracias por ser mi familia elegida, por las carcajadas eternas, las conversaciones sin filtros, y por estar ahí, firmes, en cada etapa de esta aventura llamada doctorado.

A Dania, Fernanda, Citlalli y Víctor, por su compañía, sus locuras compartidas y esa amistad. Gracias por ser parte de este proceso.

A la familia Careaga Lara, por ser mi querida familia ensenadense, por las tardes de plática y ver series, las comidas que eran el motivo de las reuniones y cada muestra de cariño, simplemente gracias.

A Lesly, Grecia, Román, Roberto, Lolis, Sam, Doris y Rodrigo por su amistad genuina y por acompañarme como amigas y amigos en este camino. Compartir el día a día con ustedes lo hizo todo más llevadero y alegre.

Y a las y los miembros de la casita 4, por ser hogar, por el cafecito de las mañanas, las confidencias, los abrazos espontáneos y por ser siempre la más cool. Gracias por tanto cariño cotidiano y sincero.

A todos ustedes, mi más profundo agradecimiento. Esta tesis también es suya.

Tabla de contenido

Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	xi
Lista de tablas	xiv
Lista de abreviaturas.....	xv
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 Contexto y relevancia de los dinoflagelados.....	2
1.1.2 El género <i>Amphidinium</i> y sus metabolitos	4
1.1.3 Actividades biológicas de los metabolitos de dinoflagelados.....	4
1.1.4 Investigaciones sobre <i>Amphidinium</i> en las terapias contra el cáncer	7
1.1.5 Estudios químicos y mecanismos de acción de los metabolitos.....	8
1.1.6 El cáncer: Características biológicas y perspectivas epidemiológicas.....	11
1.2 Justificación	12
1.3 Hipótesis.....	12
1.4 Objetivos	13
1.4.1 Objetivo general.....	13
1.4.2 Objetivos específicos.....	13
Capítulo 2. Metodología	14
2.1 Establecimiento de cultivos, curvas de crecimiento y producción de biomasa.....	14
2.1.1 Establecimiento de cultivos.....	14
2.1.2 Curvas de crecimiento y tiempo de generación.....	14
2.1.3 Producción de biomasa	15

2.2	Caracterización de las cepas	16
2.2.1	Caracterización morfológica de las cepas de <i>Amphidinium</i> por microscopía óptica y electrónica.....	16
2.2.2	Caracterización molecular.....	17
2.2.3	Secuenciación y análisis filogenético	18
2.3	Obtención de extractos crudos	20
2.3.1	Extractos de cloroformo.....	20
2.3.2	Extracto metanólico	21
2.3.3	Secado de los extractos crudos	21
2.4	Pruebas biológicas.....	22
2.4.1	Líneas celulares	22
2.4.2	Ensayos de viabilidad celular.....	23
2.4.3	Análisis estadísticos.....	25
2.5	Bipartición y fraccionamiento	26
2.5.1	Fraccionamiento de la fase no polar (FNP)	26
2.5.2	Fraccionamiento de la fase polar (FP).....	27
2.5.3	Subfraccionamiento de las fracciones activas FNP-5 y FNP-6.....	28
2.6	Análisis de las fracciones no polares y polares por HP-QTOF	28
2.7	Análisis de las fracciones FNP-5 y FNP-6 por UP-HRMS.....	29
2.8	Análisis metabolómico no dirigido de las fracciones activas FNP-5 y FNP-6	30
Capítulo 3.	Resultados	33
3.1	Cultivos de <i>Amphidinium eilatiense</i>	33
3.2	Caracterización morfológica y molecular.....	35
3.2.1	Caracterización morfológica.....	35
3.2.2	Caracterización molecular.....	36
3.3	Extracción de metabolitos secundarios	37
3.3.1	Producción de biomasa	37

3.3.2	Rendimiento de los extractos crudos.....	38
3.4	Pruebas biológicas de los extractos crudos	39
3.4.1	Efecto citotóxico de los extractos crudos	39
3.5	Bipartición y fraccionamiento químico	45
3.5.1	Bipartición de los extractos crudos metanólicos	45
3.5.2	Fraccionamiento de la fase no polar y polar del extracto crudo metanólico	46
3.5.3	Replicación del fraccionamiento del extracto metanólico de AeSQ181.....	47
3.5.4	Subfraccionamiento de las fracciones FNP-5 y FNP-6.....	48
3.6	Caracterización química	50
3.6.1	Análisis HP-QTOF de las fracciones no polares	50
3.6.2	Análisis HP-QTOF de las fracciones polares	51
3.6.3	Análisis UP-HRMS de las fracciones activas FNP-5 y FNP-6	51
3.6.4	Análisis metabolómico no dirigido de las fracciones FNP-5 y FNP-6	52
3.7	Fraccionamiento guiado por bioensayo.....	59
3.7.1	Fracciones no polares y polares	59
3.7.2	Efecto citotóxico de las subfracciones de FNP-5 y FNP-6	61
3.7.3	Índice de Selectividad.....	62
Capítulo 4.	Discusión	64
4.1	Caracterización de las cepas de <i>Amphidinium eilatiense</i>	64
4.1.1	Caracterización morfológica y molecular	65
4.1.2	Extracción y caracterización química de metabolitos secundarios.....	67
4.2	Actividad citotóxica	68
4.3	Caracterización química de las fracciones activas FNP-5 y FNP-6.....	71
Capítulo 5.	Conclusiones.....	75
Literatura citada		77
Anexos.....		88

Lista de figuras

Figura	Página
Figura 1. Mecanismos de acción de los metabolitos secundarios en las vías de señalización de la apoptosis. Modificado de Pradhan and Ki (2022).....	10
Figura 2. Ruta experimental de los pasos estratégicos en las pruebas biológicas.....	25
Figura 3. Esquema del proceso de bipartición y separación cromatográfica de los extractos metanólicos.....	27
Figura 4. Diagrama completo del proceso del fraccionamiento	29
Figura 5. Curvas de crecimiento de las cepas de <i>Amphidinium eilatiense</i> . Los datos se representan en promedio \pm DE. Los promedios corresponden a tres réplicas.	33
Figura 6. Morfología de las cepas de <i>Amphidinium eilatiense</i> . (a y b) AeSQ172, (c y d) AeSQ177 y (e y f) AeSQ181. Ec= epicono, Hc=hipocono, Nu= núcleo, Cl =cloroplastos, Pi= pirenoide. (a, b y e) vista ventral y (c, d, f) vista dorsal. (b y e) presencia de cuerpos anaranjado-rojo. Aumento de 1,000x. Objetivo de 100x con aceite de inmersión.	35
Figura 7. Micrografías en MEB de las cepas de <i>Amphidinium eilatiense</i> . a) y b) AeSQ172; c) AeSQ177; d) AeSQ181. (a, b, d) vista dorsal, (c) vista ventral. Ec= epicono, Hc=hipocono, S= sulco.....	36
Figura 8. Árbol filogenético de <i>Amphidinium</i> , basado en los genes LSU + ITS rRNA. La filogenia molecular se presenta como un árbol de máxima verosimilitud (ML) consensuado.....	37
Figura 9. Efecto citotóxico de los extractos de cloroformo de las cepas de <i>Amphidinium eilatiense</i> . Los valores se representan como media \pm DE. n=3. * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$, y ns: sin diferencias significativas. Los * indican las diferencias significativas con respecto al control negativo.....	40
Figura 10. Comparación del efecto citotóxico de los extractos de cloroformo en las líneas celulares de cáncer de mama. Los valores se representan como media \pm DE. *** $p \leq 0.001$, y ns: sin diferencias significativas. Los * indican las diferencias significativas entre los tratamientos.....	40
Figura 11. Efecto citotóxico de los extractos de cloroformo de las cepas de <i>Amphidinium eilatiense</i> sobre las líneas celulares de cáncer de pulmón. Los valores se representan como media \pm DE. *** $p \leq 0.001$, y ns: sin diferencia significativas. Los * indican las diferencias significativas con respecto al control negativo.	41
Figura 12. Comparación del efecto citotóxico de los extractos de cloroformo sobre las líneas celulares de cáncer de pulmón. Los valores se representan como media \pm DE. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, y ns: sin diferencia significativas. Los * y los ns indican diferencias entre los tratamientos.	41
Figura 13. Efecto citotóxico de los extractos metanólicos sobre las líneas celulares de cáncer de mama. Los valores se representan como media \pm DE. *** $p \leq 0.001$. Los * indican las diferencias significativas con respecto al control negativo.....	42

- Figura 14. Comparación del efecto citotóxico de los extractos metanólicos sobre las líneas de cáncer de mama. Los valores se representan como media \pm DE. *** $p \leq 0.001$, y ns: sin diferencias significativas..... 43
- Figura 15. Efecto citotóxico de los extractos metanólicos sobre las líneas de cáncer de pulmón. Los valores se representan como media \pm DE. *** $p \leq 0.001$. Los * indican las diferencias significativas con respecto al grupo control..... 44
- Figura 16. Comparación del efecto citotóxico de los extractos metanólico. Los valores se representan como media \pm SD. * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$ y ns: sin diferencias significativas. Los ns indican las diferencias significativas entre los tratamientos. 45
- Figura 17. Efecto de los extractos metanólicos sobre fibroblastos de pulmón humano, MRC-5. Los valores se representan como media \pm DE. *** $p \leq 0.001$, y ns: sin diferencias significativas. Los * indican las diferencias significativas con respecto al grupo control..... 45
- Figura 18. Seguimiento cromatográfico del subfraccionamiento de la fracción no polar 5..... 49
- Figura 19. Seguimiento cromatográfico del subfraccionamiento de la fracción no polar 6..... 50
- Figura 20. Cromatogramas iónicos totales (TIC por sus siglas en inglés) que muestran la superposición de las fracciones FNP-5 (rosa) y FNP-6 (azul) en ambos modos de ionización. a) modo de ionización positiva y b) modo de ionización negativa. Las señales más intensas se destacan con sus correspondientes relaciones m/z 52
- Figura 21. Distribución de las vías metabólicas de los compuestos químicos detectados en modo de ionización positiva para las fracciones bioactivas de *A. eilatiense* de la cepa AeSQ181..... 53
- Figura 22. Distribución de las vías metabólicas de los compuestos químicos detectados en modo de ionización negativa para las fracciones bioactivas de *A. eilatiense* de la cepa AeSQ181..... 53
- Figura 23. Distribución de las superclases de los compuestos químicos detectados en modo de ionización positiva de las fracciones bioactivas..... 54
- Figura 24. Distribución de las superclases de los compuestos químicos detectados en modo de ionización negativa para las fracciones bioactivas. 54
- Figura 25. Red molecular de las subfracciones bioactivas FNP-5 y FNP-6 de la cepa AeSQ181 por UP-HRMS en modo de ionización positiva. (a) (centro) Clústeres (subredes) y bucle propio, ambos contienen compuestos con actividad citotóxica contra líneas celulares cancerosas (b). La abundancia de las características presentes en cada fracción activa está representada por colores: rosa para FNP-5 y azul para FNP-6. Los números romanos corresponden a los compuestos seleccionados. También se muestran los espectros de masas de fragmentación de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) y las estructuras químicas asignadas de cada compuesto de interés. 57
- Figura 26. Red molecular de las subfracciones bioactivas FNP-5 y FNP-6 obtenida por UP-HRMS en modo de ionización negativa. (a) (centro). Clústeres (subredes) y bucle propio, ambos contienen compuestos con actividad citotóxica contra líneas celulares cancerosas (b). La abundancia de las características presentes en cada fracción activa está representada por colores: rosa para FNP-5 y azul para FNP-6. Los números romanos corresponden a los compuestos seleccionados.

También se muestran los espectros de masas de fragmentación de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) y las estructuras químicas asignadas de cada compuesto de interés..... 58

- Figura 27. Comparación del efecto citotóxico de las fracciones no polares en la línea celular MDA-MB-231. Los valores se representan como media \pm SD. n=3. * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$, y ns: sin diferencias significativas. Los * indican las diferencias significativas con respecto al grupo control..... 59
- Figura 28. Comparación del efecto citotóxico de las fracciones no polares en H1563. Los valores se representan como media \pm SD. n=3. * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$, y ns: sin diferencias significativas. Los * indican las diferencias significativas con respecto al grupo control..... 60
- Figura 29. Comparación del efecto citotóxico de las fracciones no polares en MRC-5. Los valores se representan como media \pm SD. n=3. * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$, y ns: sin diferencias significativas. Los * indican las diferencias significativas con respecto al grupo control..... 60
- Figura 30. Comparación del efecto citotóxico de las subfracciones de FNP-5 y FNP-6 en la línea celular MDA-MB-231. Los valores se representan como media \pm SD. *** $p \leq 0.001$, y ns: sin diferencias significativas. Los * indican las diferencias significativas con respecto al control negativo..... 61
- Figura 31. Comparación del efecto citotóxico de las subfracciones de FNP-5 y FNP-6 en la línea celular H1563. Los valores se representan como media \pm SD. n=3. ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, y ns: sin diferencias significativas. Los * indican las diferencias significativas con respecto al control negativo. 62
- Figura 32. Fracciones no polares (FNP) del extracto metanólico de AeSQ181 antes de eliminar el disolvente..... 88
- Figura 33. Fracciones polares (FP) del extracto metanólico de AeSQ181 antes de eliminar el disolvente. 88
- Figura 34. Seguimiento cromatográfico del segundo fraccionamiento de AeSQ181. 88
- Figura 35. Efecto citotóxico de las fracciones polares sobre las líneas celulares. 89

Lista de tablas

Tabla	Página
Tabla 1. Cebadores para la amplificación de distintas regiones del ARNr de <i>Amphidinium</i> spp.....	17
Tabla 2. Componentes de la reacción de la PCR para cada uno de los aislados.....	18
Tabla 3. Condiciones de la PCR de cada uno de los marcadores moleculares.....	18
Tabla 4. Especies, números de acceso de GenBank y referencias de autores para todas las secuencias de especies de <i>Amphidinium</i> utilizadas en este estudio.	19
Tabla 5. Características de líneas celulares de cáncer de mama y pulmón y célula normal.	23
Tabla 6. Características del método utilizado para el análisis de fracciones por HP-QTOF.....	28
Tabla 7. Datos de crecimiento de las cepas de <i>Amphidinium eilatiense</i>	34
Tabla 8. Medidas morfométricas de las cepas de <i>Amphidinium eilatiense</i>	35
Tabla 9. Peso y rendimiento del extracto de cloroformo con respecto a la biomasa seca.	38
Tabla 10. Peso y rendimiento total del extracto metanólico con respecto a la biomasa seca de las cepas.	38
Tabla 11. Bipartición de los extractos crudos metanólicos de las tres cepas de <i>Amphidinium eilatiense</i>	46
Tabla 12. Rendimiento total del extracto crudo metanólico de AeSQ181.	47
Tabla 13. Fracciones obtenidas de fases del extracto crudo metanólico de AeSQ181. FNP = Fracción no polar FP = Fracción polar	47
Tabla 14. Replicación del fraccionamiento del extracto crudo metanólico de AeSQ181.....	48
Tabla 15. Valores de Índice de selectividad (SI) de los extractos para las líneas celulares de cáncer de mama y pulmón	62
Tabla 16. Valores de Índice de selectividad (SI) de las fracciones FNP-5 y FNP-6 para las líneas celulares de cáncer de mama y pulmón.....	63

Lista de abreviaturas

λ	Longitud de onda
EtOAc	Acetato de etilo
ApaF-1	Factor de activación de la apoptosis 1
ASP	Intoxicación amnésica por mariscos
AZP	intoxicación por azaspirácidos por mariscos
Bax	Proteína reguladora de apoptosis
CDK	Cinasas dependientes de ciclina
CFP	Intoxicación ciguatérica por consumo de pescado
CHCl ₃	Cloroformo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSP	Intoxicación diarreica por consumo de mariscos
EtOH	Etanol
FAN	Florecimientos algales nocivos
FNP	Fracciones menos polares
FP	Fracciones polares
H ₂ O _d	Agua destilada
HMDS	Hexametildisilazano
HP-QTOF	Cromatografía de alta resolución acoplado a espectrometría de masas de tiempo de vuelo cuadrupolo
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
ITS	Espaciador transcrito interno
LSU	Subunidad grande del RNA
MCL	Máxima verosimilitud compuesta
MeOH	Metanol
ML	Máxima verosimilitud
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
NSP	Intoxicación neurotóxica por consumo de mariscos
PBS	Buffer fosfato salino
PKS	Policétido sintasa
PSP	Intoxicación paralizante por consumo de mariscos
SFB	Suero fetal bovino
t _g	Tiempo de generación
UV	Radiación ultravioleta

Capítulo 1. Introducción

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en el mundo, y son el cáncer de mama y el de pulmón los tipos más comunes por su alta incidencia y letalidad. A pesar de los avances en la detección temprana y en los tratamientos disponibles, la lucha contra estas enfermedades sigue siendo un desafío. Las terapias convencionales, como la quimioterapia y la radioterapia, aunque efectivas en muchos casos, presentan efectos secundarios significativos al afectar no solo a las células cancerosas, sino también las células normales.

En México, el cáncer de mama es el más frecuente entre las mujeres, y representa aproximadamente el 15% de todos los casos de cáncer. Por su parte, el cáncer de pulmón se encuentra entre las principales causas de muerte tanto en hombres como en mujeres. Esta elevada prevalencia y mortalidad resalta la urgencia de investigar nuevas alternativas terapéuticas que puedan mejorar el tratamiento de estos tipos de cáncer, con un enfoque en moléculas que presenten actividad citotóxica, antiproliferativa y anticancerígena.

En este contexto, los metabolitos secundarios de los dinoflagelados, un grupo de microorganismos marinos, han emergido como una fuente prometedora de compuestos bioactivos con propiedades citotóxicas y anticancerígenas. En particular, las investigaciones centradas en el género *Amphidinium* han ganado relevancia en los últimos años, debido a que sus metabolitos han mostrado actividad citotóxica verificada en pruebas biológicas *in vitro* en diferentes tipos de cáncer, incluidos los de mama, pulmón, cervicouterino, próstata y melanoma, entre otros (Kumagai et al., 2015; Akakabe et al., 2016; Martínez Andrade et al., 2019; Mejía-Camacho et al., 2021). Estos compuestos, a menudo desconocidos en la medicina convencional, ofrecen nuevas perspectivas para el tratamiento del cáncer, ya que poseen la capacidad de inhibir el crecimiento de células cancerosas de manera selectiva sin afectar la viabilidad celular de las células normales (Galasso et al., 2018).

La caracterización química de estos metabolitos es esencial para comprender sus estructuras y mecanismos de acción, lo que permite evaluar su potencial terapéutico en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. Para ello, se emplean diversas técnicas espectroscópicas, como la espectrometría de masas, espectroscopía infrarroja y la resonancia magnética nuclear. Sin embargo, uno de los principales retos en este campo es la limitada cantidad del compuesto puro disponible para su análisis. Para abordar esta limitación, el uso de enfoques complementarios, como la metabolómica, permite la identificación y

la caracterización de prácticamente todos los metabolitos producidos por el organismo, lo que podría facilitar el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos con potencial terapéutico.

El presente trabajo tiene como objetivo profundizar en el potencial de los metabolitos de los dinoflagelados, al evaluar su actividad citotóxica contra células de cáncer de mama y de pulmón, así como caracterizar químicamente las fracciones semipurificadas obtenidas de la biomasa de estos dinoflagelados. A través de esta investigación, se espera contribuir al conocimiento sobre los dinoflagelados y su potencial biotecnológico, así como explorar y abrir nuevas posibilidades para el desarrollo de tratamientos más efectivos y menos tóxicos para los pacientes con cáncer.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Contexto y relevancia de los dinoflagelados

Los ambientes marinos son considerados valiosos reservorios de compuestos químicos diversos, con aplicaciones potenciales en campos como el farmacológico, el cosmético, el alimenticio y el agropecuario. En particular, las microalgas son un grupo funcional formado por microorganismos fotosintéticos que contribuyen con más del 40% de la productividad primaria global en los sistemas acuáticos de agua dulce y marina (Moreno-Garrido, 2008; Martínez Andrade et al., 2018). Dentro de este grupo, se encuentran los dinoflagelados, microorganismos que desempeñan roles fundamentales en el ecosistema como productores primarios y simbioses de otros organismos (Murray et al., 2012).

Sin embargo, su papel ecológico va más allá de la fotosíntesis. En las últimas décadas, se ha descubierto que algunas especies de dinoflagelados, antes considerados autótrofos, son en realidad mixótrofos, capaces de ajustar su estrategia nutricional e ingerir de presas como bacterias, otros dinoflagelados y protistas (Stoecker et al., 2017). Esta flexibilidad se acompaña de diversos mecanismos de alimentación, lo que les permite explotar una amplia gama de presas en cuanto a tipo y tamaño. A su vez, los dinoflagelados constituyen una fuente clave de alimento para protistas y metazoos con hábitos heterotróficos y mixotróficos, lo que les permite desempeñar así múltiples funciones dentro de las redes tróficas (Jeong et al., 2010; Stoecker et al., 2017)

Los dinoflagelados se han adaptado a una amplia variedad de ambientes, desde aguas polares y templadas, hasta tropicales. Se encuentran en formas de vida bentónicas, pelágicas y simbiotes (parásitos y mutualistas) (Gómez, 2012; Durán-Riveroll et al., 2019). Esta diversidad adaptativa refleja un vasto potencial genético aún por explorar, lo que ha atraído la atención de la comunidad científica debido a las propiedades químicas y biológicas de sus metabolitos secundarios (Durán-Riveroll et al., 2019). Estos metabolitos, que muestran actividad biológica prometedora, podrían tener aplicaciones biotecnológicas en el futuro, particularmente en la prevención y el tratamiento de enfermedades, así como en la industria alimentaria y cosmética (Chau et al., 2017).

Estos son un grupo de microalgas eucariontes, con más de 4,000 especies conocidas (Guiry & Guiry, 2025). Estos microorganismos poseen dos flagelos: uno transversal y otro longitudinal. Una característica notable es que su núcleo carece de histonas, lo que implica que sus cromosomas están condensados de manera permanente (Kashman & Benayahu, 2008). Estos organismos desempeñan una gran variedad de funciones ecológicas, como: a) ser parte importante de la base de la red trófica; b) realizar simbiosis con invertebrados, como los corales y anémonas; y c) ser parte de los agentes responsables de los florecimientos algales nocivos (FAN) (Murray et al., 2012).

En los últimos años, el interés en el estudio de los dinoflagelados ha aumentado debido a su capacidad para producir una gran variedad de biomoléculas con estructuras químicas únicas y con diversas actividades biológicas. Esta característica, junto con el potencial terapéutico de estos compuestos para el tratamiento de patologías humanas, ha sido un tema relevante de estudio en la biotecnología (Kobayashi, 2008; Martínez Andrade et al., 2019).

Además, estos organismos producen una serie de toxinas que, históricamente, se han clasificado según los efectos que causan. Estos síndromes son conocidos como: intoxicación paralizante por consumo de mariscos (PSP, Paralytic Shellfish Poisoning), intoxicación neurotóxica por consumo de mariscos (NSP, Neurotoxic Shellfish Poisoning), intoxicación diarreica por consumo de mariscos (DSP, Diarrheic Shellfish Poisoning), intoxicación por azaspirácido por consumo de mariscos (AZP, Azaspiracid Shellfish Poisoning) e intoxicación ciguatérica (CP, Ciguateric Poisoning). Sin embargo, a pesar de los riesgos asociados al consumo indirecto de estos organismos productores de toxinas (a través del consumo de organismos filtradores, herbívoros o consumidores secundarios), varios estudios biológicos y toxicológicos han mostrado que algunas de estas moléculas, así como otras que no son consideradas toxinas, poseen efectos farmacológicos promisorios que podrían aplicarse en diferentes tratamientos (Alfonso et al., 2016).

1.1.2 El género *Amphidinium* y sus metabolitos

El género *Amphidinium* Claparè et Lachmann está formado por un grupo de dinoflagelados atecados (o desnudos) altamente conservados morfológicamente. Pertenece a la familia Gymnodiniaceae debido a la carencia de material celulósico en sus vesículas, sin embargo, varios estudios filogenéticos no sustentan esta relación (Murray et al., 2012). Los organismos de este género presentan una amplia distribución; se encuentran en aguas templadas y subtropicales, y son muy abundantes en ecosistemas bentónicos. En la actualidad se han aceptado taxonómicamente 92 especies en este género (Guiry & Guiry, 2025), que incluyen formas heterótrofas y autótrofas (Murray & Patterson, 2002; Lauritano et al., 2017).

Los organismos del género *Amphidinium* son productores de una gran variedad de compuestos bioactivos que pueden tener efectos nocivos que se han reportado principalmente en peces (Murray et al., 2015). Además, existe la hipótesis de que estos compuestos podrían acentuar los efectos de la intoxicación ciguatérica, ya que a menudo se encuentran en asociación con dinoflagelados de los géneros *Gambierdiscus* y *Fukuyoa*, productores conocidos de ciguatoxinas (Wu et al., 2020). Sin embargo, algunos compuestos producidos por especies del género *Amphidinium* han probado tener efectos antifúngicos y antimicrobianos (Karafas et al., 2017).

Se ha considerado que estos dinoflagelados son “dinoflagelados modelo” para realizar experimentos en condiciones de laboratorio, ya que crecen bien en cultivo y frecuentemente se les encuentra en colecciones. Por esta razón, se han utilizado en estudios sobre su plástido, su genoma y sobre el primer conjunto de genes de la enzima policétido sintasa (PKS) en un dinoflagelado (Murray & Patterson, 2002; Karafas et al., 2017).

Entre las especies de este género, *A. carterae* y *A. operculatum* se consideran productoras potenciales de compuestos con actividad biológica (Lauritano et al., 2016), debido a que diversos compuestos aislados han mostrado una numerosa variedad de estructuras químicas con actividad antifúngica, hemolítica y anticancerígena (Martínez Andrade et al., 2019).

1.1.3 Actividades biológicas de los metabolitos de dinoflagelados

Los metabolitos secundarios son generalmente moléculas orgánicas de bajo peso molecular, con estructuras químicas variadas y sofisticadas. Se les denomina "secundarios" porque no son esenciales para

el crecimiento del organismo que los produce (Alves et al., 2016; Martínez Andrade et al., 2019). Estos metabolitos desempeñan funciones ecológicas importantes, que a menudo son poco comprendidas, pero que pueden tener una relevancia farmacológica significativa (Barrios-González, 2018; Dwivedi & Sisodia, 2019; Martínez Andrade et al., 2019). Además, se considera que poseen un amplio rango de propiedades con múltiples aplicaciones potenciales, como la citotoxicidad, la actividad antibiótica, antifúngica, inmunosupresora, antiepiléptica y neurotóxica. Por esta razón, se consideran un reservorio importante de nuevos compuestos bioactivos, con posibles aplicaciones en diversos sectores biotecnológicos (Martínez Andrade et al., 2019).

En farmacología se han utilizado metabolitos secundarios de diversos orígenes como antibióticos, inhibidores enzimáticos, inmunomoduladores, agentes antitumorales, pigmentos y nutracéuticos (Thirumurugan et al., 2018). Actualmente, aproximadamente el 60% de los fármacos utilizados en hematología y oncología son metabolitos secundarios naturales o sus derivados. Históricamente, se ha demostrado que los organismos marinos son productores importantes de compuestos bioactivos, como alcaloides, esteroides, terpenos, macrólidos y péptidos, entre otros (Dyshlovoy & Honecker, 2015). Los estudios químicos de los metabolitos secundarios de organismos de origen marino comenzaron a principios de los años 80, principalmente debido a sus propiedades antitumorales, ya que detienen el crecimiento de diversas líneas celulares cancerosas.

En los últimos años se han aislado aproximadamente 28,000 compuestos de organismos marinos, de los cuales 26 están en pruebas clínicas y 23 tienen actividad antitumoral (Dyshlovoy & Honecker, 2015; Lauritano et al., 2016). Además, siete fármacos de origen marino ya están en uso, de los cuales cuatro están aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América (FDA) para el tratamiento del cáncer: a) citarabina, aprobada en 1969 para el tratamiento de la leucemia; b) mesilato de eribulina, aprobado en 2010 para el tratamiento del cáncer de mama metastásico; c) brentuximab vedotin, aprobado en 2011 para el tratamiento del linfoma maligno anaplásico de células T y linfoma de Hodgkin; y d) trabectedina, aprobada en 2015 para el tratamiento de sarcoma de tejidos blandos y cáncer de ovario (Dyshlovoy & Honecker, 2015; Lauritano et al., 2016; Martínez Andrade et al., 2019).

Varios estudios han reportado que algunos compuestos bioactivos de dinoflagelados presentan actividad biológica con alta toxicidad en diferentes líneas celulares cancerosas, lo que los ha llevado a ser considerados como moléculas con actividad biológica con potencial aplicación farmacológica (Chakraborty & Das, 2001). Sin embargo, el mecanismo de acción de estos compuestos no está completamente claro,

ya que es un proceso complejo que involucra múltiples interacciones (Kashman & Benayahu, 2008; Abd El-Hack et al., 2019). En diversas investigaciones se ha observado que las principales propiedades farmacológicas de estos compuestos podrían ser útiles para el tratamiento del cáncer, la diabetes, la enfermedad de Alzheimer, algunas enfermedades infecciosas, para el tratamiento del dolor y en cosmetología (Lauritano et al., 2016). Además, otros estudios mencionan que ciertas ficotoxinas producidas por dinoflagelados marinos podrían ser útiles en el tratamiento de diversas patologías, por ejemplo:

Análogos de saxitoxina, potentes bloqueadores de los canales de sodio regulados por voltaje (Na_v), como tratamiento para el dolor crónico (Cardoso & Lewis, 2018).

Combinación de análogos de saxitoxina para anestesia local (Munday et al., 2013).

Gonyautoxinas (análogos sulfatados de la saxitoxina) para el tratamiento de la pérdida de sensibilidad superficial, fisuras anales (Garrido et al., 2007) y dolor crónico de cabeza por tensión (Lattes et al., 2009).

Yessotoxina y sus análogos para el tratamiento de gliomas, enfermedades neurodegenerativas, procesos asmáticos, enfermedades metabólicas y como inhibidores del crecimiento celular en diferentes líneas celulares cancerosas (Alfonso et al., 2016).

Gambierol para la prevención o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Cao et al., 2021).

Brevetoxinas para el tratamiento de enfermedades pulmonares y fibrosis (George et al., 2012).

Ácido okadaico para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer: estómago, colon, páncreas e hígado (Valdiglesias et al., 2013).

Combinaciones de ficotoxinas para el tratamiento de la dependencia a la nicotina (Assunção et al., 2017).

Los metabolitos secundarios producidos por dinoflagelados son químicamente diversos y tienen variadas estructuras y propiedades farmacológicas (Snyder et al., 2003). Aunque el conocimiento sobre el origen y la síntesis de estos metabolitos es limitado, varios estudios confirman que algunos de ellos comparten un origen biogénico común (Snyder et al., 2003; Rein & Snyder, 2006). Estos compuestos presentan diferentes características estructurales, por lo que su origen proviene de diversas vías metabólicas. En el caso de los

policétidos, su estructura es catalizada por una familia de enzimas llamada policétido sintasa (PKS), cuya vía de síntesis se basa en la condensación de unidades pequeñas de ácidos carboxílicos, un proceso similar al de los ácidos grasos (Rein & Borrone, 1999; Snyder et al., 2003).

Las PKSs se clasifican en tres grupos: I, II y III. Según el tamaño y las características estructurales de los policétidos, se ha propuesto que estos son biosintetizados por la PKS modular tipo I (Snyder et al., 2003). Una característica de estos metabolitos es que son poliéteres tipo escalera o macrociclos, que pueden ser macrólidos, no macrólidos o poliéteres lineales. Además, contienen una alta cantidad de átomos de oxígeno y frecuentemente presentan grupos aromáticos (Rein & Borrone, 1999). En particular, los policétidos producidos por el género *Amphidinium* contienen anillos de macrolactona de diferentes tamaños, furanos, grupos hidroxilo y anillos pirano (Kobayashi et al., 2002).

Las principales familias químicas de metabolitos secundarios producidos por dinoflagelados incluyen: carotenoides, iminas cíclicas, macrólidos, policétidos, polienos y poliéteres (Wellkamp et al., 2020). En particular, el género *Amphidinium* produce metabolitos secundarios que pertenecen a dos familias químicas: los macrólidos y los policétidos. Estos se agrupan en la familia de anfidiololes, los cuales están integrados por los siguientes subgrupos: anfidiololes, luteofanoles, lingshuioles, simbiopolioles, karatungioles, carteraololes; anfidininas; anfirioninas; colopsinoles, y iriomoteólidos (Cousseau et al., 2020; Wellkamp et al., 2020).

1.1.4 Investigaciones sobre *Amphidinium* en las terapias contra el cáncer

El interés en los metabolitos producidos por organismos del género *Amphidinium* ha aumentado en los últimos años, debido a su amplio espectro de actividades bioactivas que incluyen la antifúngica, la hemolítica, la antioxidante, la antibacteriana, y la citotóxica (Shah et al., 2014). Esta última propiedad tiene una particular relevancia para la investigación oncológica (Samarakoon et al., 2013; Espiritu et al., 2017).

La relevancia de la actividad citotóxica y antitumoral de estos metabolitos radica en el creciente problema global que representa el cáncer. A pesar de los avances en los tratamientos, la incidencia de nuevos casos de cáncer ha aumentado considerablemente en las últimas décadas, y esta enfermedad sigue siendo una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Uno de los desafíos más importantes en su tratamiento es la resistencia de las células tumorales a los fármacos quimioterapéuticos estándar. Esta necesidad ha impulsado la investigación hacia la búsqueda de nuevas moléculas con actividad citotóxica,

y los dinoflagelados marinos son una fuente prometedora de compuestos bioactivos (Abd El-Hack et al., 2019).

Diversos estudios han documentado el potencial citotóxico de los metabolitos producidos por especies del género *Amphidinium*. Por ejemplo, Espiritu et al. (2017) demostraron que el anfidinol 2, producido por *A. klebsii*, redujo en 50% la viabilidad celular de la línea celular MCF-7 a una concentración de $4.1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Por otro lado, Shah et al. (2014) reportaron que los compuestos derivados de *A. operculatum* inhibieron entre un 40% y un 60% del crecimiento de la línea celular de leucemia promielocítica HL-60 a una concentración de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. En otro estudio, Samarakoon et al. (2013) demostraron que las fracciones metanólicas, hexanólicas, de cloroformo y de acetato de etilo de *A. carterae* disminuyeron la proliferación celular en la línea HL-60, destacando que la fracción de cloroformo presentó el mayor efecto inhibitorio, con una reducción del 50% en la viabilidad celular tras 24 horas de exposición a una concentración de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Además, Akakabe et al. (2016) identificaron que los iriomoteólidos 10a y 12a producidos por la cepa KCA09053 que corresponde al género de *Amphidinium*, la especie no fue reportada, inhibieron la proliferación de células de cáncer cervicouterino (HeLa), linfocitos B humanos (DG-75) y carcinoma hepatocelular murino (MH134), con valores de concentración inhibitoria media (IC_{50}) de 1.5, 1.2 y $3.3 \mu\text{M}$, respectivamente.

En México, el género *Amphidinium* es uno de los más representativos en el Pacífico Mexicano, y se han reportado al menos seis especies en las costas nacionales (Okolodkov et al., 2022). A pesar de la relevancia de este género, los estudios sobre la citotoxicidad de sus metabolitos en el contexto de la investigación científica en México son limitados. Un estudio realizado por Mejía-Camacho et al. (2021) investigó la actividad citotóxica del extracto etanólico de *A. operculatum* (cepa AA60) recolectada en el Golfo de México, demostraron que presentaba actividad citotóxica en diversas líneas celulares cancerosas. La inhibición del crecimiento celular se observó a una concentración de $24.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($5,110 \text{ céL mL}^{-1}$), con el mayor efecto en la línea celular de cáncer de mama (MCF-7), y se mostró una inhibición superior al 50%.

1.1.5 Estudios químicos y mecanismos de acción de los metabolitos

La obtención e identificación de compuestos bioactivos en organismos marinos y terrestres como los dinoflagelados representa un reto complejo. La identificación del o los compuestos responsables de actividades biológicas, como antibacteriana, citotóxica, anticancerígena o antifúngica, no es tarea fácil. Un enfoque comúnmente utilizado para descubrir productos naturales es el fraccionamiento guiado por

bioensayo, que implica una serie de pasos que involucran el fraccionamiento del extracto y la purificación con base en la actividad biológica (Kildgaard et al., 2017; Reverter et al., 2020).

No obstante, la obtención de los compuestos bioactivos enfrenta múltiples desafíos. Uno de los principales es disponibilidad limitada de material biológico disponible, ya que los cultivos pueden requerir tiempo prolongados y obtener bajos rendimientos. A esto se suman complicaciones técnicas, como tiempos largos de extracción, bajos rendimientos, co-extracción de otros compuestos no deseados, uso excesivo de disolventes orgánicos o la selección inadecuada de los mismos (Getachew et al., 2020). Una vez aislado el compuesto puro, se requieren técnicas espectroscópicas avanzadas para su identificación, entre ellas la espectrometría de masas (EM), la espectroscopía infrarroja (EIR) y la resonancia magnética nuclear (RMN). Esta última destaca por su sensibilidad, que permite el análisis de cantidades en pequeñas cantidades como microgramos o incluso nanogramos. Sin embargo, presenta una limitación importante, requiere que el compuesto sea puro, lo cual resulta en ocasiones de alcanzar cuando se trabaja con mezclas complejas, como los extractos crudos (Reverter et al., 2020).

En los últimos años, el desarrollo de técnicas de alto rendimiento, como las ómicas (metabolómica, genómica, transcriptómica), ha revolucionado el estudio de los metabolitos secundarios. Estas tecnologías permiten analizar moléculas pequeñas (<2,000 Da) y, al mismo tiempo, explorar la diversidad química de los metabolitos (a través del análisis metabolómico y proteómico). Además, facilitan la elucidación de los mecanismos biológicos y moleculares involucrados en la producción de estos metabolitos mediante el análisis genómico y transcriptómico (Rochfort, 2005; Reverter et al., 2020).

Algunos mecanismos de acción involucran la inhibición de proteínas específicas que regulan el ciclo celular, la inducción a la muerte celular programada o apoptosis, la inhibición de la formación de microtúbulos, o pueden evitar la angiogénesis mediante la disminución de la migración celular endotelial y la formación de microtúbulos (Pradhan & Ki, 2022). Algunas de estas moléculas tienen la capacidad de desestabilizar los microtúbulos y los filamentos de actina, lo que lleva a la detención del ciclo celular (Trigili et al., 2011). Otro mecanismo de acción probable está relacionado con la capacidad de modificar la forma de las células y la estructura del citoesqueleto, principalmente por la disrupción del sistema E-cadherina (Leira et al., 2002; Korsnes et al., 2006).

Uno de los mecanismos de mayor interés es la modulación de la apoptosis que se propone en el estudio realizado por Pradhan and Ki (2022), en el cual menciona que algunos metabolitos producidos por los dinoflagelados pueden activar vías de señalización para generar una muerte celular, que podría ser por la

vía intrínseca o extrínseca. La vía intrínseca sucede mediante el aumento de la expresión de la proteína reguladora de apoptosis (Bax), lo que conlleva a la liberación de factores pro-apoptóticos mitocondriales como el citocromo C, que desencadena la activación de la procaspasa-9 y el factor de activación de la apoptosis 1 (ApaF-1). Esta activación desencadena la formación de apoptosomas, lo que induce la activación de las caspasas 9 y 3, y así provoca la muerte celular apoptótica. Algunos otros dañan el ADN, y conducen a la célula a la muerte directamente. En la vía extrínseca, estas moléculas pueden activar a las caspasas 8, 8 /10 y 3/ 7 que terminan con la activación de la caspasa 3 y culmina con la muerte celular apoptótica dependiente de caspasa (Figura 1).

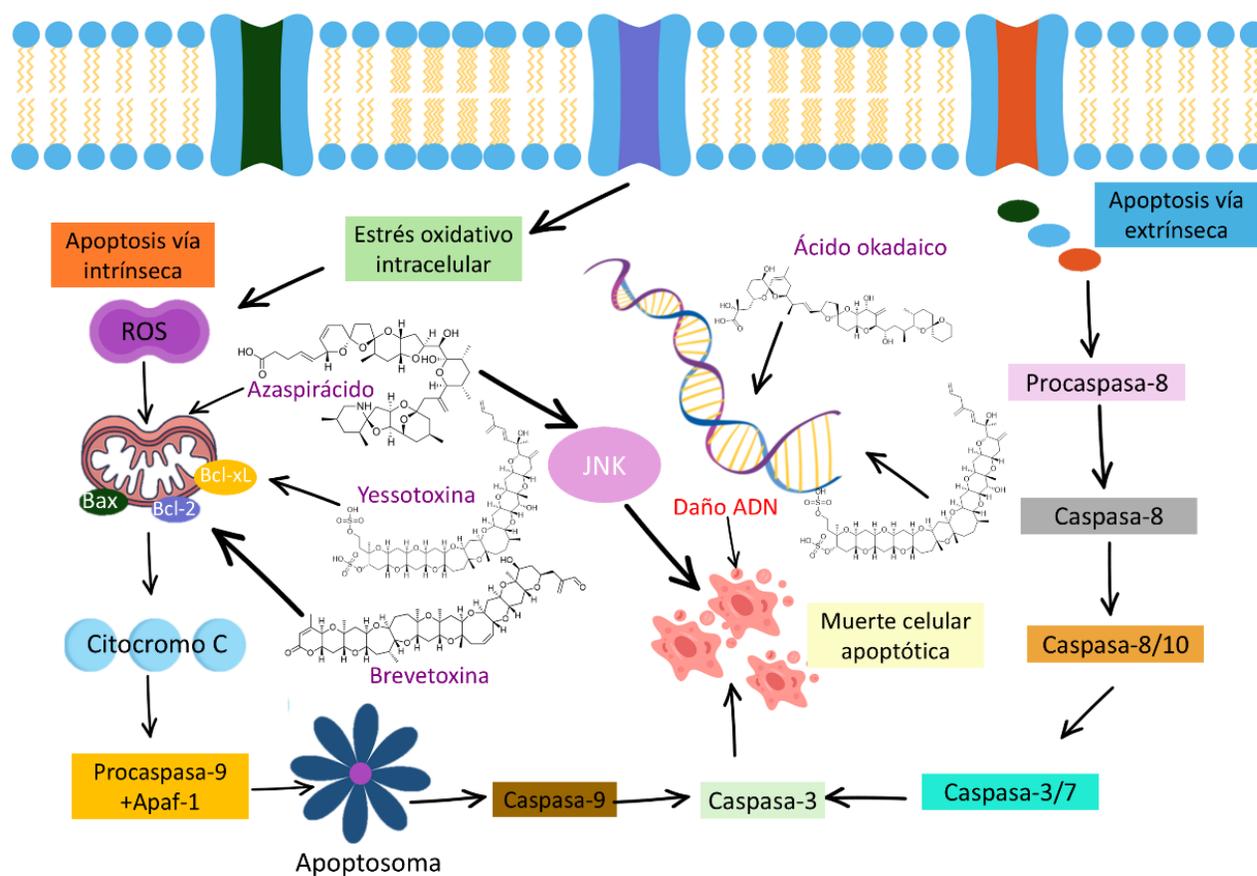


Figura 1. Mecanismos de acción de los metabolitos secundarios en las vías de señalización de la apoptosis. Modificado de Pradhan and Ki (2022)

1.1.6 El cáncer: Características biológicas y perspectivas epidemiológicas

El cáncer es una enfermedad caracterizada por el desarrollo anormal de las células, que incluye la división celular descontrolada y la capacidad de invadir y destruir tejidos normales (Fior, 2019). Esta patología se origina por mutaciones en las vías de señalización celular o por lesiones genéticas en los genes que codifican proteínas involucradas en el ciclo celular (Otto & Sicinski, 2017).

En condiciones fisiológicas normales, las células regulan la producción y la liberación de señales que promueven su crecimiento, así como el inicio y la progresión del ciclo celular. Este equilibrio es crucial para mantener la homeostasis entre la división celular y la apoptosis, lo que asegura la arquitectura y la función normal de las células y los tejidos (Hanahan & Weinberg, 2011). En el caso de las células cancerosas, la homeostasis se ve interrumpida, lo que provoca que las células comiencen a proliferar sin control. Este fenómeno es consecuencia de mutaciones en los genes que regulan la división celular, la apoptosis y el control de la tasa de proliferación, lo que genera un desequilibrio en el ciclo celular (Kashyap & Dubey, 2022).

Las células tumorales presentan varias características distintivas, entre ellas: a) señales de crecimiento autónomas; b) evasión de señales inhibitorias del crecimiento; c) evasión de la muerte celular programada (apoptosis); d) capacidad de replicación ilimitada; e) angiogénesis; f) invasividad y metástasis; g) evasión del sistema inmune; h) reprogramación del metabolismo; e i) inestabilidad genómica (Hanahan & Weinberg, 2011).

En organismos eucariotas, tanto unicelulares como multicelulares, el ciclo celular está organizado y controlado por una red compleja de mecanismos reguladores que aseguran la correcta duplicación del material genético y la progresión de la división celular (Matthews et al., 2022). Este ciclo se divide en cuatro fases: G₀/G₁, S, G₂ y M. La progresión a través de estas fases está regulada por las cinasas dependientes de ciclinas (CDK) (Williams & Stoeber, 2012; Otto & Sicinski, 2017). En el cáncer, el ciclo celular se ve alterado debido a la actividad aberrante de estas cinasas, lo que provoca la pérdida de puntos de control en varias de las fases y, como consecuencia, la inestabilidad genética (Williams & Stoeber, 2012).

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En 2020 se registraron 19.3 millones de nuevos casos y 10 millones de muertes. La incidencia de esta enfermedad continúa aumentando, y se estima que para el año 2040 la tasa de nuevos casos alcanzará los 28.4 millones (Sung et al., 2021). De acuerdo con Sung et al. (2021), América, incluida América Latina y México, ocupa el tercer lugar en

incidencia y mortalidad por cáncer, con 20.9% y 14.2%, respectivamente. En particular, en América Latina se prevé que el número de casos aumente de 1.5 millones a 2.4 millones para 2040 (Piñeros et al., 2022).

Los tipos de cáncer con mayor incidencia en ambos sexos son: cáncer de mama (11.7%), cáncer de pulmón (11.4%), cáncer colorrectal (10%), cáncer de próstata (7.3%) y cáncer de estómago (5.6%). Entre estos, el cáncer de pulmón es la principal causa de muerte, con aproximadamente 1.8 millones de muertes (18%), seguido por el cáncer colorrectal (9.4%), el de hígado (8.3%), el de estómago (7.7%) y el de mama (6.95%) (Sung et al., 2021). A nivel global, el cáncer de mama y el de pulmón son los más prevalentes, tanto en términos de incidencia como de mortalidad. Aunque estos tipos de cáncer no son exclusivos de un sexo, el cáncer de pulmón afecta en mayor proporción a los hombres que a las mujeres. Una de las razones por las cuales el cáncer de pulmón tiene la mayor mortalidad es que, en sus primeras etapas, es asintomático y solo se detecta cuando la enfermedad ya se encuentra en estados avanzados (Nasim & Moua, 2020).

1.2 Justificación

El aumento en la incidencia y las muertes a causa del cáncer genera un reto para los sistemas de salud y económicos. Su tratamiento sigue siendo un desafío debido a que, a menudo, estos no son completamente efectivos y en ocasiones se desarrolla resistencia a los fármacos. La investigación sobre nuevas moléculas para el tratamiento del cáncer es un tema relevante por los problemas que representan los diagnósticos tardíos y la falta de fármacos más eficaces y que generen menos efectos secundarios. Diversos estudios han demostrado que los dinoflagelados son un grupo prometedor para la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos, ya que muchos de sus metabolitos secundarios presentan estructuras químicas únicas que han sido consideradas idóneas para el desarrollo de nuevos fármacos y podrían ser utilizadas para el tratamiento de diferentes enfermedades. Por estos motivos, la búsqueda de compuestos bioactivos capaces de inhibir el crecimiento de células cancerosas de manera específica es trascendental, así como el análisis de la factibilidad de estos compuestos como fármacos para el tratamiento del cáncer.

1.3 Hipótesis

Las cepas AeSQ172, AeSQ177 y AeSQ181 del género *Amphidinium* son productores de metabolitos secundarios con propiedades citotóxicas. El fraccionamiento guiado por bioensayo de los extractos crudos

de estos aislados permitirá la obtención de un compuesto o una fracción semipurificada con efecto citotóxico sobre líneas celulares de cáncer.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar la actividad citotóxica de los extractos crudos y las fracciones de *Amphidinium eilatiense* en líneas celulares de cáncer.

1.4.2 Objetivos específicos

- 1) Determinar la fase de crecimiento exponencial en la que se produce la mayor cantidad de biomasa en los cultivos de *Amphidinium eilatiense* de las tres cepas
- 2) Caracterizar molecular y morfológicamente las cepas AeSQ172, AeSQ177 y AsQ181
- 3) Determinar la actividad citotóxica de los extractos crudos metanólicos y de cloroformo de las tres cepas de *Amphidinium eilatiense* en líneas celulares de cáncer
- 4) Obtener fracciones bioactivas a través del fraccionamiento y purificación de los extractos crudos de *Amphidinium eilatiense*
- 5) Caracterizar químicamente la fracción con mayor actividad citotóxica
- 6) Comparar el efecto citotóxico de las fracciones semipurificadas en las líneas celulares de cáncer de mama y de pulmón

Capítulo 2. Metodología

2.1 Establecimiento de cultivos, curvas de crecimiento y producción de biomasa

2.1.1 Establecimiento de cultivos

Las células para el aislamiento de *Amphidinium eilatiense* se obtuvieron de muestras de pasto marino del género *Zostera* recolectado el 14 de diciembre de 2019, en San Quintín, Baja California (30°27'14"N, 116°00'15"W). El aislamiento de las células para obtener los cultivos monoclonales se realizó con el método de pipeta reducida (Guillard, 2005). Cada célula se colocó en una caja de cultivo celular de 96 pozos con 100 μ L de medio GSe modificado sin extracto de suelo al 50%. Después de observar el crecimiento celular y sin presencia de otros organismos como cianobacterias u otras microalgas, las células se transfirieron a cajas de 24 pozos con 2 mL de medio de cultivo a la misma concentración. Después de obtener en los pozos un mayor contenido de crecimiento celular, se transfirieron a cajas de Petri de 60 x 15 mm y se les asignó el número de cepa. Finalmente, los cultivos se establecieron el 10 de mayo del 2020 y se les asignaron los siguientes códigos: AeSQ172, AeSQ177 y AeSQ181. Cada una de las cepas se transfirió a matraces Erlenmeyer de 100 mL con 50 mL de medio GSe modificado sin extracto de suelo, con el objetivo de generar biomasa suficiente para la determinación de las curvas de crecimiento y la cosecha de biomasa. Los cultivos se mantuvieron en las siguientes condiciones: iluminación a 50 mmol fotones $m^{-2} s^{-1}$ en un fotoperíodo de 12:12 h luz: oscuridad y a una temperatura de 23 ± 2 °C. Actualmente pertenecen a la colección del Laboratorio de Ecología Química de Microalgas del Departamento de Biotecnología Marina del CICESE.

2.1.2 Curvas de crecimiento y tiempo de generación

Las curvas de crecimiento se determinaron mediante conteos celulares. En matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio GSe, se sembró una densidad celular inicial de 500 cél mL^{-1} por triplicado para cada cepa. Cada segundo día se realizaron conteos celulares hasta la fase de decaimiento. Se tomaron 2

mL del cultivo y se realizó el conteo de células vivas en una cámara de Sedgwick-Rafter de un 1 mL en un microscopio óptico (Zeiss Primo Star, Alemania) con un aumento de 100x.

Las tasas de crecimiento se calcularon mediante la siguiente ecuación (Vega & Voltolina, 2007).

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

donde: μ = tasa de crecimiento durante la fase exponencial; X_1 y X_2 = número de células al inicio y fin de la fase exponencial, respectivamente, y t_1 y t_2 = tiempos de inicio y fin de la fase exponencial (días).

Se calculó el tiempo de generación (t_g) a partir de la tasa de crecimiento, mediante la ecuación (Guillard, 1973).

$$t_g = \frac{0.6931}{\mu} \quad (2)$$

2.1.3 Producción de biomasa

La biomasa de las cepas AeSQ172, AeSQ177 y AeSQ181 se obtuvo mediante cultivos en lote en matraces de policarbonato, escalonados desde 100 hasta 700 mL de medio GSe modificado sin extracto de suelo.

La biomasa se recolectó en tubos cónicos de 50 mL, se centrifugó a 4000 xg a 4 °C por 10 min (Megafuge 40K, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Para cuantificar y determinar la relación densidad celular – peso seco (g) de las células, se realizaron 10 conteos de diluciones de los concentrados celulares en una cámara de Sedgwick Rafter en un microscopio óptico (Motic-BA310E, Xiamen, China) con un aumento de 100x. Después de la centrifugación, el sobrenadante se retiró y la biomasa se mantuvo en congelación a -80 °C por 24 h. Posteriormente, los botones celulares congelados se juntaron en un solo tubo y se mantuvieron en congelación a -20 °C hasta su secado por liofilización (Freezone 4.4 plus, Labconco, Kansas, MO, USA).

2.2 Caracterización de las cepas

2.2.1 Caracterización morfológica de las cepas de *Amphidinium* por microscopía óptica y electrónica

Para el análisis morfométrico se vertieron 2 mL de cultivo celular a un microtubo y se fijaron con Lugol ácido. Posteriormente, se tomaron muestras y se colocaron en portaobjetos. Se realizaron observaciones en un microscopio óptico (Motic BA310E, Fujian, China) con un aumento de 1,000x. Se realizaron micrografías con un cámara digital Moticom S6 (Motic, Fujian, China) y las imágenes obtenidas se analizaron con el software Motic Plus 3.0, previamente calibrado con un micrómetro para determinar el tamaño celular (n = 30). Para el análisis morfológico, se tomaron micrografías de los cultivos vivos en un microscopio BA310E (Motic, Fujian, China) con una cámara Moticom S6 (Motic, Fujian, China) con un aumento de 1,000x.

Para la microscopía electrónica de barrido se empleó la metodología propuesta por Pérez-López et al. (2020) con la modificación en el fijado de las células, que se realizó con glutaraldehído (Sigma-Aldrich, Misuri, USA). Brevemente, de los matraces para la obtención de la biomasa, se tomaron 15 mL de cultivo de cada aislado. La biomasa se centrifugó a 4000 x g por 10 min a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y se tomaron alícuotas de 1.5 mL. Las muestras se fijaron con 60 µL de glutaraldehído al 25% (concentración final 0.96%, pureza de ±99%) por 90 min. Transcurrido ese tiempo, se centrifugaron a 4000 x g por 10 min a 4 °C, y se retiró el sobrenadante. Las muestras se lavaron con agua ultrapura (Direct-Q 3UV, Merck, Alemania) a 4 °C. El lavado se efectuó cuatro veces. Posteriormente, se deshidrataron las células añadiendo 1 mL de etanol (EtOH, pureza de ±99%, Sigma-Aldrich, Misuri, USA) al 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 99%. Entre cada concentración etanólica, las muestras se agitaron suavemente y se dejaron reposar por 3 min antes de centrifugar. Después de la concentración de EtOH al 99%, las muestras se centrifugaron con las condiciones descritas anteriormente, se retiró el sobrenadante y se añadieron 200 µL de hexametildisilazano:etanol (HMDS:EtOH) en una relación 1:1 (v/v). Se dejaron reposar hasta su procesamiento. Por último, se centrifugaron, se retiró el sobrenadante y se añadieron 200 µL de HMDS puro.

Para la observación, se homogeneizó la muestra, se colocaron 100 µL en una platina de metal y se dejó secar. Posteriormente, la platina se metalizó con oro por 10 s. Para la obtención de las imágenes se utilizó

un microscopio electrónico de barrido equipado con un detector de electrones retrodispersados con una tensión de aceleración de 3 kV y una distancia de trabajo de 7.0 mm (HITACHI - SU3500, Tokio, Japón).

2.2.2 Caracterización molecular

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de las cepas se utilizó el Kit DNeasy Power Soil (Qiagen, Hilden, Alemania). El proceso de extracción se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones que se detallan a continuación: El botón celular de cada cepa, previamente centrifugado y libre de sobrenadante se colocó en tubos Power beat garnet 50. En cada tubo se vertieron 60 μ L de la solución C1 y posteriormente se colocaron en incubación durante 10 min a 70 °C en un Thermoblock. Transcurrido este tiempo, se colocaron en el homogeneizador (FastPrep-24TM, Massachusetts, USA) durante 30 s a 6 $m s^{-1}$. Este paso se repitió tres veces para asegurar que las membranas se disuelvan completamente. Entre cada ciclo, los tubos se colocaron en hielo por 3 min para evitar su sobrecalentamiento. Finalmente, las muestras se centrifugaron durante 10 min a 10,000 xg a 21 °C. El resto del protocolo de extracción se realizó conforme a las instrucciones del kit. Una vez obtenido el ADN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.2% y se cuantificó el material genético por espectrofotometría de microvolumen (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, Massachusetts, USA).

Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la identificación molecular de las especies de *Amphidinium* se amplificaron la subunidad grande (LSU) y los espaciadores transcritos internos (ITS) del ARNr (Tabla 1).

Tabla 1. Cebadores para la amplificación de distintas regiones del ARNr de *Amphidinium* spp.

Marcador molecular	Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')	Referencia
LSU	D1R	ACCCGCTGAATTTAAGCATA	(Karafas et al., 2017)
LSU	28-1483R	GCTACTACCACCAAGATCTGC	(Seoane et al., 2018)
ITS	ITSF2	TCCCTGTTTCATTGCGCCATTAC	(Hoppenrath et al., 2012)
ITS	ITSR2	TACGTCCCTGCCCTTTGTAC	

La amplificación se realizó con el kit Promega GoTaq Colorless Master Mix (Promega, Madison, USA). En la Tabla 2 se muestran los volúmenes de los componentes necesarios para una reacción de 25 μL . El termociclador se programó con condiciones diferentes para cada uno de los genes (Tabla 3). Finalmente, se tomaron muestras de 5 μL de cada producto de las amplificaciones y del marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Promega, Madison, USA) y se mezclaron con 2 μL de buffer de carga 5x Green GoTaq, los cuales se corrieron electroforéticamente a 90 voltios durante 50 min en un gel de agarosa.

Tabla 2. Componentes de la reacción de la PCR para cada uno de los aislados.

	AeSQ172	AeSQ177	AeSQ181
	μL	μL	μL
GoTaq [1X]	12.5	12.5	12.5
Cebador forward 10 μM	1	1	1
Cebador reverse 10 μM	1	1	1
DNA molde	2.4 [8.3 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$]	1.2 [17.0 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$]	2.1 [9.6 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$]
Agua libre de DNAsa	8.1	9.3	8.4
Volumen de reacción	25.0	25.0	25.0

Tabla 3. Condiciones de la PCR de cada uno de los marcadores moleculares.

Marcador molecular	Condición	Temperatura $^{\circ}\text{C}$	Tiempo	Número de ciclos
LSU	Desnaturalización inicial	98	5 min	40
	Desnaturalización	98	20 s	
	Alineamiento	48	30 s	
	Extensión	72	20 s	
	Extensión final	72	1 min	
ITS	Desnaturalización inicial	95	2 min	35
	Desnaturalización	95	30 s	
	Alineamiento	60	45 s	
	Extensión	72	3 min	
	Extensión final	73	7 min	

2.2.3 Secuenciación y análisis filogenético

Los productos de PCR fueron secuenciados con un analizador genético ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, CA, USA) por seqXcel, Inc (San Diego, CA, USA.). La calidad de las secuencias se evaluó en 4Peaks v1.8 (Nucleics, Sídney, Nueva Gales del Sur, Australia), y solo se consideraron para el análisis las secuencias de buena calidad (calidad media ≥ 20 en la escala PHRED). Todas las secuencias se comprobaron en la base de datos NCBI mediante el análisis BLASTn para determinar las asignaciones de especies.

Los análisis filogenéticos se centraron en dos regiones genómicas diferentes. La primera incluía el espaciador transcrito interno 1, el ARN ribosómico 5,8 S y el espaciador transcrito interno 2 (ITS1-5,8S rRNA-ITS2); la segunda región consistía en el operón génico del ARN ribosómico 28S de subunidad grande (LSU). Las secuencias disponibles correspondientes a estas regiones de las especies de *Amphidinium* se recuperaron de la base de datos de nucleótidos GenBank (Tabla 4). Las secuencias correspondientes del dinoflagelado *Heterocapsa* sp., lejanamente relacionado, se utilizaron como grupo externo en los análisis filogenéticos. Se construyeron árboles filogenéticos para cada región por separado, y después se construyeron árboles alternativos para ambas regiones concatenadas (Litaker et al., 2003; Karafas et al., 2017).

Tabla 4. Especies, números de acceso de GenBank y referencias de autores para todas las secuencias de especies de *Amphidinium* utilizadas en este estudio.

Especie	GenBank	Autores	GenBank	Autores
<i>A. carterae</i>	FJ907458	Zhao et al. (no publicado)	AY460578	Zhao et al. (no publicado)
<i>A. eilatiensis</i>	AJ417900	(Lee et al.)	AJ417900	(Lee et al.)
<i>A. fijiensis</i>	KY697937	(Karafas et al.)	MZ351945	Luo et al. (no publicado)
<i>A. gibbosum</i>	MK418355	Zhang et al. (no publicado)	AY455672	(Jørgensen et al.)
<i>A. magnum</i>	OM177176	Xie, H. (no publicado)	KY070341	(Karafas et al.)
<i>A. massartii</i>	FJ823531	(Stern et al.)	AY455670	(Jørgensen et al.)
<i>A. operculatum</i>	MK605120	Yiu et al. (No publicado)	AY455674	
<i>A. paucianulatum</i>	KY697960	(Karafas et al.)	KY070345	(Karafas et al.)
<i>A. pseudomassartii</i>	KY697945		AY460588	(Murray et al.)
<i>A. steinii</i>	MZ359142	Luo et al. (no publicado)	AY460593	
<i>A. theodori</i>	KY697942	(Karafas et al.)	KY697986	(Karafas et al.)
<i>A. thermaeum</i>	KY697956		KY070365	
<i>A. tomasii</i>	KY974334		KY697984	
<i>Heterocapsa</i> sp.	JN020158	Zadabbas et al. (no publicado)	AY371082	De Salas, M. (no publicado)
<i>A. carterae</i>	OQ448886	(Durán-Riveroll et al.)	MT325892	(Durán-Riveroll et al.)
<i>A. eilatiensis</i>	OQ448892		OQ435732	
<i>A. eilatiensis</i>	OQ448891		OQ435731	
<i>A. eilatiensis</i>	OQ448890		OQ435730	
<i>A. massartii</i>	OQ448887		MT325893	
<i>A. operculatum</i>	OQ448888		MT325891	
<i>A. theodori</i>	OQ448889		MT325890	

Los alineamientos se realizaron de manera independiente para cada gen con los algoritmos MUSCLE y ClustalW (35, 36). La visualización y recorte se realizaron en MEGA7, y luego se utilizaron para realizar todos los análisis filogenéticos. Para ambos genes, se compararon con el enfoque en máxima verosimilitud

(ML). El método ML se basa en un modelo de sustitución de nucleótidos, se empleó MEGA7 para encontrar el modelo de sustitución que mejor se ajustara a cada gen. En el método ML, los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos Neighbor-Joining y BioNJ a la matriz de distancias por pares estimadas utilizando la Máxima Verosimilitud Compuesta (MCL) y seleccionando la topología de árbol con un valor de log-verosimilitud superior. Se utilizó una distribución Gamma discreta para modelar las diferencias en la tasa evolutiva entre sitios. El árbol de consenso ML se obtuvo después de 2000 réplicas de Bootstrap. Los árboles óptimos se seleccionaron tras la comparación por el mejor soporte y congruencia de las ramas de bootstrap, según análisis filogenéticos previos de especies de *Amphidinium* (Felsenstein, 1985; Lee et al., 2013; Karafas et al., 2017).

2.3 Obtención de extractos crudos

Para la obtención de los extractos crudos, la biomasa cosechada que se encontraba a -20 °C se congeló a -80 °C para su liofilización. El tiempo mínimo de congelación a -80 °C fue de 24 h, y se liofilizaron por un periodo aproximado de 120 h. Una vez finalizado el secado, las muestras fueron pesadas, selladas y colocadas en congelación a -20 °C hasta la extracción.

2.3.1 Extractos de cloroformo

Para la extracción con cloroformo (CHCl₃), la biomasa liofilizada se descongeló a temperatura ambiente. Se tomaron 500 mg de biomasa de cada cepa y se colocaron en un tubo para centrífuga de 15 mL. Posteriormente, se vertieron 4 mL de CHCl₃. Para asegurar la que las células se disuelvan completamente, los tubos fueron colocados en un vórtex por 45 s a máxima velocidad, y se centrifugaron a 15,000 xg por 20 min a 4 °C. El extracto de CHCl₃ fue filtrado con filtros de fibra de vidrio de 0.22 µm de tamaño de poro (Whatman, USA). Finalmente, los extractos fueron colocados en viales de vidrio de 5 mL para su secado posterior.

2.3.2 Extracto metanólico

Para obtener el extracto metanólico, la biomasa de cada cepa se colocó en un mortero y se ejerció fuerza mecánica para asegurar la ruptura celular. La biomasa triturada se colocó en frascos de vidrio de 200 mL y se añadieron 200 mL de metanol (MeOH). Posteriormente, se agitó en un vórtex por 1 min a máxima velocidad por 5 veces. Por último, para asegurar la extracción del material intracelular, las muestras se colocaron en hielo y se realizó una lisis celular por ultrasonidos con un sonicador Q125 (QSONICA, Mississippi, USA), el procedimiento consistió en cinco ciclos de 1 min (45 s de pulsaciones y 15 s de descanso) cada uno a una frecuencia de 20 kHz. Los extractos metanólicos se dejaron macerar por 120 h y transcurrido ese tiempo, se repitió la agitación y la sonicación. Finalmente, el metanol se vertió en tubos de centrifugación de 50 mL y se centrifugaron a 11,000 xg por 45 min a 4 °C. El extracto metanólico fue filtrado con filtros de fibra de vidrio de 0.22 µM de tamaño de poro (Whatman, USA). Por último, fueron colocados en frascos de vidrio de 5 mL hasta el secado.

2.3.3 Secado de los extractos crudos

Para la eliminación del disolvente y secado de los extractos metanólicos de las cepas AeSQ172, AeSQ177 y AeSQ181, se colocaron en un matraz bola, se vertió el volumen total correspondiente a cada una de las cepas, los cuales fueron colocados en un rotavapor (Buchi R-114, Flawil, Suiza) con las siguientes condiciones: presión 337 mbar y temperatura 40 °C. Los extractos se mantuvieron en el rotavapor hasta la sequedad. Los extractos crudos se recuperaron con la mínima cantidad del disolvente y se colocaron en la campana de extracción para disminuir su volumen. Posteriormente, se mezclaron con agua tridestilada, en una relación MeOH:H₂O de 7:3 (v/v) para su congelación por 48 h a -80 °C; transcurrido este tiempo, se liofilizaron. Aquellos extractos que no se lograron secar por completo se sometieron a una segunda eliminación de disolvente en un concentrador de vacío speedvac RVT400 (Savant, Massachusetts, USA). Las condiciones del concentrador fueron: 4 h a 45 °C. Los botones fueron recuperados y se les añadió agua tridestilada en una relación MeOH:H₂O de 7:3 (v/v) para liofilizar y eliminar por completo los disolventes (agua y metanol). Finalmente, los extractos, tanto de cloroformo como metanólicos, se pesaron y se mantuvieron en una campana de extracción para eliminar todo el solvente. Posteriormente, se guardaron hasta su uso.

2.4 Pruebas biológicas

2.4.1 Líneas celulares

Para los ensayos biológicos se utilizaron dos tipos de células de cáncer: de mama y de pulmón. Para cada tipo de cáncer se eligieron diferentes tipos de líneas celulares, tres para mama y cuatro para pulmón. Como grupo control se utilizó una línea celular de fibroblastos de pulmón humano (Tabla 5).

Las líneas celulares de cáncer de mama utilizadas en este estudio fueron: MCF-7 (adenocarcinoma, ATCC® HTB-22™), T47D (carcinoma de mama, ATCC® HTB-133™) y MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama, ATCC® HTB-26™). Las líneas de cáncer de pulmón estuvo conformado por: A549 (carcinoma de pulmón, ATCC® CCL-185™) NC-H1563 (carcinoma de células no pequeñas de pulmón, ATCC® CRL-5875™), NC-H1437 (carcinoma de células no pequeñas de pulmón, ATCC® CRL-5872™) y NC-H661 (carcinoma de células grandes, ATCC® HTB-183™). La línea celular MRC-5 (fibroblastos de pulmón, ATCC® CCL-171™), que es una línea celular normal de pulmón humano, se utilizó como control. Las líneas celulares se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC®). Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂ en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640, Corning, NY, USA) para T47D, NC-H1563, NC-H1437 y NC-H661; medio Minimum Essential Medium Eagle (MEM Eagle, Gibco, Grand Island, NY, USA) para MCF-7 y MCR-5; Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Cytiva, South Logan, UT, USA) para MDA-MB-231 y A549. Todos los medios de cultivo fueron suplementados con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10% (Biowest, Nuaille, Francia) y antibiótico – antimicótico al 1% (Sulfato de estreptomina y penicilina G sódica, Gibco, Waltham, MA, USA).

La confluencia óptima se consideró entre 70 - 80%; una vez obtenido este porcentaje, se retiró el medio celular y se añadieron 6 mL del buffer salino fosfatado (PBS) para retirar por completo los restos celulares. Posteriormente, para desprender las células de la superficie de la caja de cultivo, se adicionó 1 mL 0.24% de tripsina-EDTA (Gibco, Grand Island, NY, USA) y de inmediato se colocaron en la incubadora a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂ por 4 min. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 4 mL de medio de cultivo suplementados. El volumen total, de 5 mL, se homogeneizó, y de acuerdo con la confluencia inicial y el mantenimiento de las células, se realizó cambio de medio, expansión de células o conteo celular.

Tabla 5. Características de líneas celulares de cáncer de mama y pulmón y célula normal.

Líneas celulares de cáncer de mama		
Nombre	Tipo	Receptores/proteínas
MCF-7	Luminal A Carcinoma ductal	ER ⁺ PR [±] HER2
MDA-MB-231	Basal Adenocarcinoma	ER ⁻ PR ⁻ HER2 ⁻
T47D	Luminal A Carcinoma ductal	ER ⁺ PR [±] HER2 ⁻
Líneas celulares de cáncer de pulmón		
A549	Carcinoma	CDKN2A TP53
NC-H661	Carcinoma	CDKN2A TP53
NC-H1437	Adenocarcinoma	CDKN2A TP53
NC-H1563	Adenocarcinoma	CDKN2A TP53
Fibroblastos inmortalizados		
MRC-5	Fibroblastos de pulmón humano	

2.4.2 Ensayos de viabilidad celular

Efecto citotóxico de los extractos crudos

Para determinar la viabilidad celular se realizaron ensayos colorimétricos empleando el reactivo MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfopenil)-2H-tetrazolio). En las placas de cultivo celular de 96 pozos se colocaron 5x10³ células por pozo en un volumen final de 100 µL, posteriormente, se incubaron en las condiciones descritas, por 24 h. Transcurrido el tiempo, se adicionaron 100 µL de los extractos metanólicos y de cloroformo, libres de disolventes, a una concentración de 100 µg mL⁻¹ en 0.1% de dimetilsulfóxido (DMSO). El DMSO se utilizó como vehículo de administración para todos los bioensayos en el diseño experimental porque disuelve compuestos polares y no polares debido a su naturaleza anfipática y no muestra actividad biológica a bajas concentraciones. Sin embargo, a altas concentraciones (>5%), disminuye significativamente la viabilidad celular debido a su citotoxicidad y provocar la muerte celular (de Abreu Costa et al., 2017; Lee & Park, 2017). El DMSO se utiliza a menudo como vehículo de administración para la penetración celular y como sustituto con extractos crudos para permitir resultados comparables, con mezclas complejas de compuestos no identificados con actividades biológicas desconocidas. Consecutivamente, se colocaron en la incubadora a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂

por 48 h. El grupo control correspondió a células tratadas con 0.1% del vehículo, DMSO. Como control positivo de muerte celular se utilizó DMSO al 5%. Transcurrido el tiempo de exposición de 48 h a los tratamientos, se adicionaron 10 μ L de MTS-PBS por pozo. Las placas de cultivo celular se incubaron 3 h para las líneas celulares de cáncer de pulmón y 4 h para las líneas celulares de cáncer de mama a 37 °C. Las absorbancias se leyeron a 492 nm en un lector de placas EPOCH (Biotek, Winnoski, USA). El efecto citotóxico de los extractos crudos se evaluó en la línea celular MCR-5, con las mismas condiciones antes mencionadas.

Efecto citotóxico de fracciones polares (FP) y no polares (FNP)

Para determinar el efecto citotóxico de las fracciones se seleccionaron las líneas cancerosas que mostraron mayor sensibilidad a los extractos crudos (sección 3.4.1). Se siguió la metodología descrita en la sección 2.4.2 con la siguiente modificación: las fracciones, libres de disolvente, a una concentración de 50 μ g mL⁻¹ en 0.1% de dimetilsulfóxido (DMSO) como control negativo.

Efecto citotóxico de las subfracciones de FNP-5 y FNP-6

El efecto citotóxico de las subfracciones se evaluó en las líneas celulares más sensibles. Los experimentos se realizaron con la metodología descrita en la sección 2.4.2, con la siguiente modificación: el control positivo correspondió a paclitaxel a una concentración final de 500 nM (Figura 2).

Índice de selectividad

El índice de selectividad de los extractos, las fracciones con mayor actividad citotóxica y las subfracciones activas hacia las células normales y cancerosas se determinó mediante la siguiente ecuación. Para ello, se realizó una modificación en la que dicho índice se calculó con el porcentaje de viabilidad celular en lugar de la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) (Fotakis & Timbrell, 2006; Indrayanto et al., 2021):

$$SI = \frac{\text{Porcentaje de viabilidad de las células sanas}}{\text{Porcentaje de viabilidad celular de las células cancerosas}} \quad (3)$$

donde un valor $SI \geq 1$ significa que el compuesto exhibe un mayor efecto citotóxico en la línea celular cancerosa en comparación con la línea celular normal. Valores de $SI \geq 3$ indican que el compuesto podría

considerarse con un anticancerígeno prospectivo. Y valores de SI ≥ 10 están asignados como muestras con alta selectividad y potencial para continuar con investigaciones adicionales.

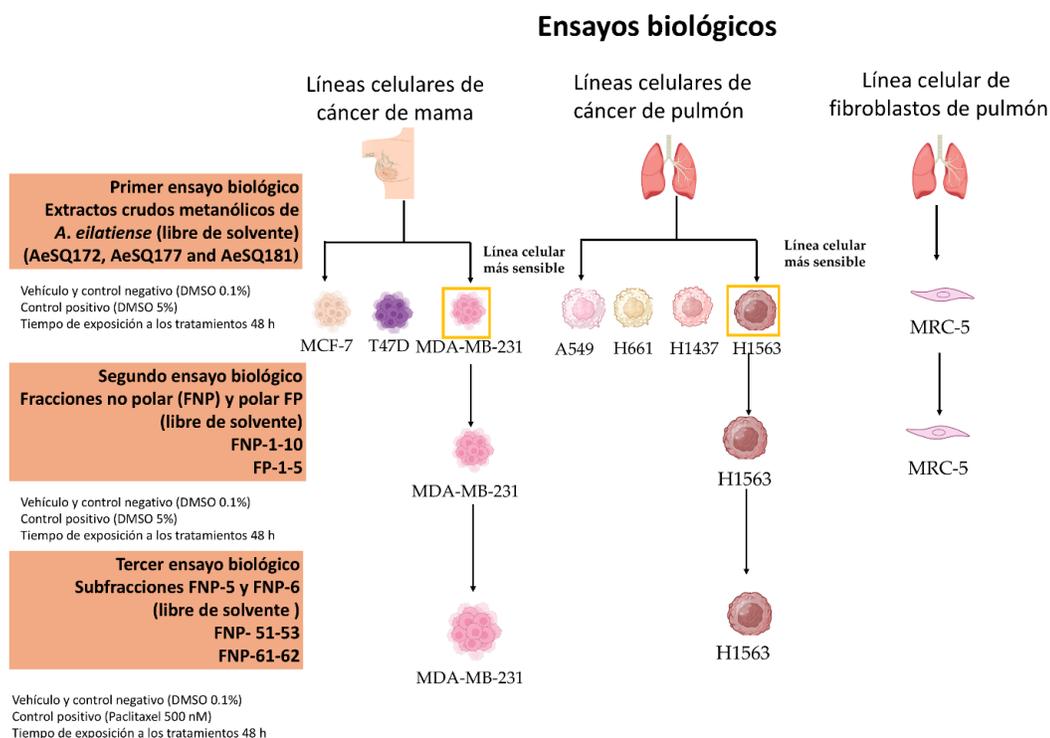


Figura 2. Ruta experimental de los pasos estratégicos en las pruebas biológicas.

2.4.3 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU). Cada experimento se evaluó con tres experimentos independientes (réplicas biológicas), y cada uno de ellos se realizó por triplicado (réplicas técnicas, $n=3$). Los valores se expresaron como la media \pm desviación estándar. Los datos fueron previamente analizados para verificar que cumplieran con los criterios de normalidad con la prueba Shapiro-Wilk y la igualdad de varianzas con el software InfoStast 2020 (InfoStast Software, Argentina). La comparación de los datos se realizó con el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido por una prueba post-hoc test de Tukey. Los valores de $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***) fueron considerados estadísticamente significativos, con respecto al grupo control.

2.5 Bipartición y fraccionamiento

Se seleccionó el extracto con mayor actividad citotóxica en función de los resultados obtenidos de los ensayos de viabilidad celular (sección 3.4). Al mismo tiempo, se continuó con la producción de biomasa en lote de la cepa AeSQ181 en las condiciones descritas en la sección 2.1.3. Inicialmente, se realizó una bipartición de los extractos metanólicos (Figura 3). La masa utilizada de cada uno de los extractos fue: 2 g de AeSQ181; 0.4637 g de AeSQ177; y 0.3034 g de AeSQ172.

El extracto crudo se colocó en un matraz Erlenmeyer, se añadieron 100 mL de agua destilada (H_2O_d) y se agitó para disolver el extracto. Posteriormente, el volumen se vertió en un embudo de separación y se añadieron 100 mL de acetato de etilo (EtOAc). La mezcla se lavó con H_2O_d (2 x 100 mL). De este proceso se obtuvieron dos fases: 1) la fase polar, que corresponde al H_2O_d a la cual se le asignó el código "FP", y 2) la fase no polar, que corresponde al EtOAc, cuyo código asignado fue "FNP". Los volúmenes finales fueron de 300 y 100 mL, respectivamente. Cada una de las fases se vertió en un matraz bola previamente pesado y se colocó en un rotavapor (Buchi R-210, Flawil, Suiza) para la evaporación de los disolventes. Se aplicó vacío parcial para reducir la presión interna, de 95 mbar y 30 °C para la FNP, y de 23 mbar y 30 °C para la FP. Estas condiciones permitieron la evaporación eficiente de los disolventes a bajas temperaturas. Las muestras permanecieron en el rotavapor hasta alcanzar la sequedad completa. Posteriormente, las fases se recuperaron con la mínima cantidad de MeOH y se colocaron en un desecador al vacío para asegurar la eliminación total del disolvente.

2.5.1 Fraccionamiento de la fase no polar (FNP)

El fraccionamiento de la fase no polar (FNP) se realizó mediante cromatografía Flash Sephacore (Pure C810 Flash, Buchi, Flawil, Suiza). La fase estacionaria fue sílica gel 60 (230-400 mallas, Sigma-Aldrich, Misuri, USA) empacada en una columna abierta de vidrio. La fase móvil fue una mezcla de hexano/EtOAc en un gradiente de 20 a 100% EtOAc. Las condiciones de la cromatografía fueron las siguientes: un tiempo de corrida de 75 min, con una tasa de flujo de 30 mL min⁻¹. La detección se realizó con radiación ultravioleta (UV) a una longitud de onda (λ) de 240 nm a 800 nm. El volumen de recolección fue de 40 mL. El contenido de los tubos se juntó en función de las cromatografías de capa fina, las cuales se realizaron con placas precoladas con sílica gel 60 F254 con indicador fluorescente. Los productos se visualizaron con luz UV a λ de 254 nm y 365 nm y se revelaron con sulfato cérico. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente (23 - 30 °C) hasta el análisis químico.

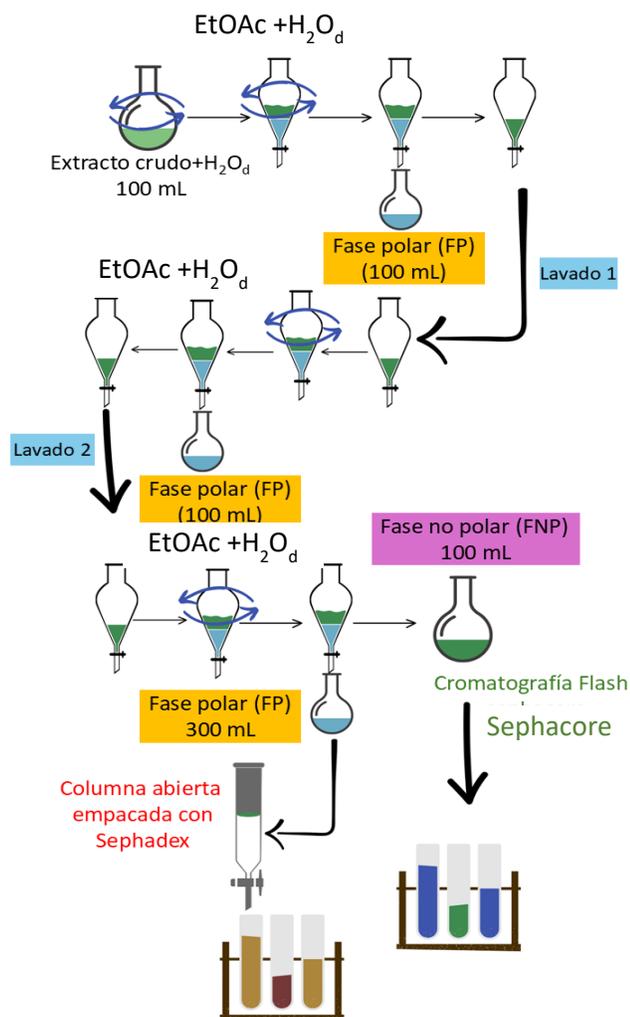


Figura 3. Esquema del proceso de bipartición y separación cromatográfica de los extractos metanólicos.

2.5.2 Fraccionamiento de la fase polar (FP)

El fraccionamiento de la fase polar (FP) se realizó en una columna abierta de vidrio (62 cm de largo y 2 cm de diámetro) empacada con Sephadex (LH-20, Pharmacia Biotech). La fase móvil fue MeOH de grado reactivo. El volumen de recolección fue de 10 mL. Las fracciones totales del extracto crudo metanólico de AeSQ181 se mantuvieron en temperatura ambiente (23 – 30 °C) hasta realizar las pruebas biológicas.

2.5.3 Subfraccionamiento de las fracciones activas FNP-5 y FNP-6

La Figura 4 muestra el seguimiento de todo el proceso, desde la extracción de los extractos crudos hasta la obtención de las fracciones con mayor actividad citotóxica. Las fracciones FNP-5 y FNP-6, que presentaron la mayor actividad en las pruebas biológicas, fueron sometidas a un segundo fraccionamiento, conforme a lo descrito en la sesión 2.5.2.

2.6 Análisis de las fracciones no polares y polares por HP-QTOF

Para identificar los compuestos presentes en las fracciones no polares (FNP-2,3,5,6,7 y 8) y polares (FP-1,3,4 y 5), las muestras fueron analizadas mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas de tiempo de vuelo cuadrupolo (HP-QTOF) (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). El análisis se realizó en un equipo Agilent 1260; la separación se realizó con una columna RP-C18 150 x 2.1 mm y 3 μm (Sigma; Misuri, USA) a temperatura ambiente (23-30 $^{\circ}\text{C}$). Las condiciones del análisis se detallan en la tabla 6.

Tabla 6. Características del método utilizado para el análisis de fracciones por HP-QTOF.

Característica	Condición
Columna	RP-C18 (HiBar HR 150 x 2.1 mm x 3 μm)
Flujo	400 $\mu\text{L mL}^{-1}$
Fase A	H ₂ O ultrapura+ 0.1% ácido acético
Fase B	Metanol (MeOH) + 0.1% ácido acético
Gradiente de elución	20% (A) a 95% de (B)
Tiempo de corrida	15 Min

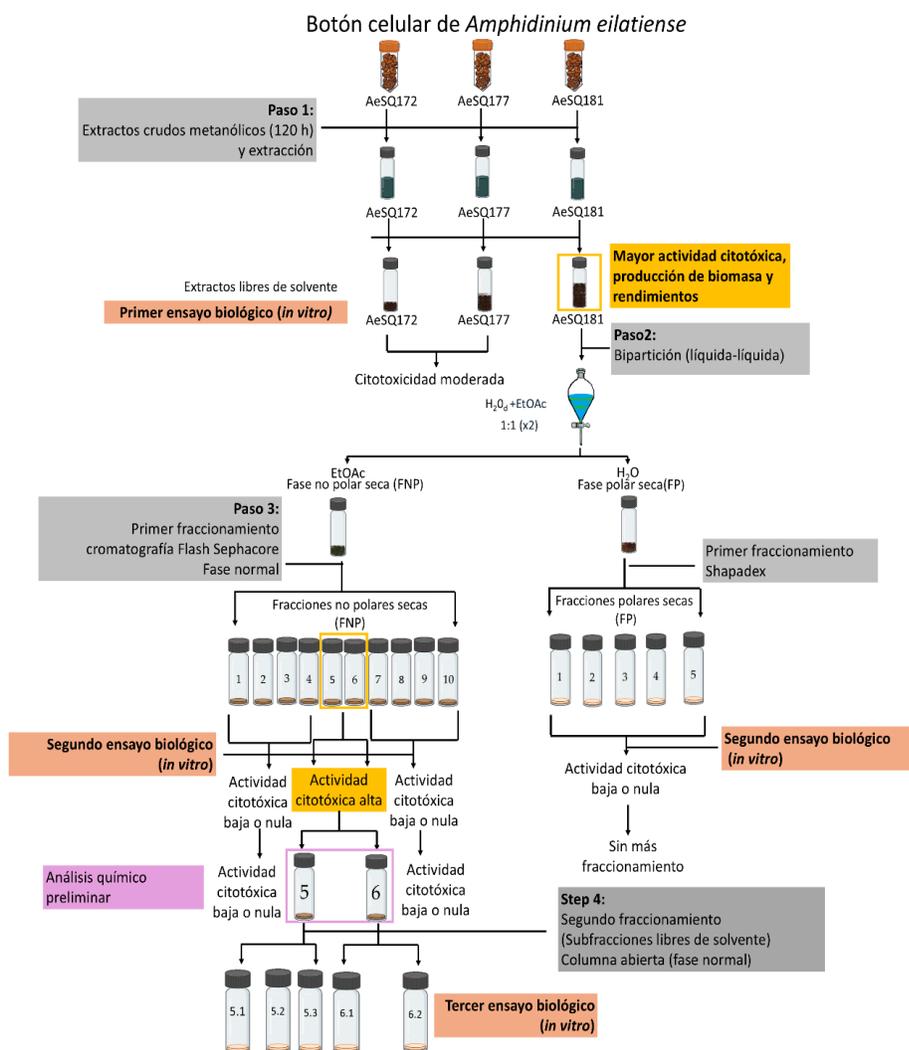


Figura 4. Diagrama completo del proceso del fraccionamiento

2.7 Análisis de las fracciones FNP-5 y FNP-6 por UP-HRMS

Las fracciones no polares activas, FNP-5 y FNP-6, previamente liofilizadas se resuspendieron en MeOH (grado HP-MS) para su análisis preliminar por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UP-HRMS). La separación cromatográfica se realizó con una columna HSS T3 (Waters, Milford, MA, EE. UU.) (100 × 2,1 mm; 1,7 μm) mantenida a 40 °C, con las fases móviles A (100 % H₂O) y B (100 % acetonitrilo), ambas con un 0,1 % de ácido fórmico. Las condiciones iniciales fueron 100 % A, mantenidas durante 4 min, y aumentadas a 98 % B a los 21 min, con un tiempo de ciclo de 30 min, con un flujo de inyección de 2 μL. El efluente se dirigió a la sonda HESI entre 0,2 y 25 min. El análisis UP-HRMS se realizó con un espectrómetro de masas Orbitrap Exploris 120 acoplado a un sistema Vanquish UPLC

(ThermoFisher, Hemel Hempstead, Reino Unido). Los datos se adquirieron por separado en los modos de ionización positiva y negativa, con una resolución de 120,000 barridos desde 75-1000 o 150-1500 m/z , con un voltaje capilar de +3500 o -2500 V. El gas envolvente se ajustó a 50 °C, el gas auxiliar a 10 °C y las temperaturas del tubo de transferencia de iones y del vaporizador a 325 y 350 °C, respectivamente. Para los experimentos MS2 dependientes de los datos, los cuatro iones más intensos seleccionados de un barrido completo con una resolución de 60,000 se sometieron a fragmentación utilizando energías de colisión normalizadas del 20 %, 40 % y 100 % y se analizaron con una resolución de 15,000. Para todos los experimentos, se utilizó un calibrador interno al inicio de cada ejecución con una masa de bloqueo de m/z 203.0855.

2.8 Análisis metabólico no dirigido de las fracciones activas FNP-5 y FNP-6

Para el procesamiento de las bases de datos de las fracciones FNP-5 y FNP-6, se empleó la metodología propuesta por Hernández-Melgar et al. (2024), en la cual se utilizaron programas de acceso libre y herramientas en línea. Los pasos del procesamiento fueron: 1) alineamiento y extracción de las características, que se realizaron con el software MZmine 3.9.0 y 2) la identificación de los metabolitos se llevó a cabo mediante Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS).

Los conjuntos de datos de UP-HRMS con la extensión .d fueron convertidos al formato .mzXML con la herramienta MSconvert de ProteoWizard, versión 3.0.24033. Posteriormente, los datos fueron procesados con el programa MZmine, versión 3.9 (Schmid et al., 2023) para los modos de ionización positiva y negativa, por separado. Los parámetros para la detección de características fueron los siguientes: detección de masa (centroide, $2.0E5$ y $2.0E3$ para MS1 y MS2, respectivamente); constructor de cromatogramas ADAP (Myers et al., 2017) (mínimo de escaneos consecutivos de 4, intensidad mínima para escaneos consecutivos de $2.0E5$, altura mínima absoluta de $4.0E5$, y tolerancia de m/z de $0.002 m/z$ o 5.0 ppm); suavizado de cromatogramas; resolutor de cromatogramas ADAP (Myers et al., 2017) (umbral S/N de 10, la altura mínima de característica de 2, el umbral de coeficiente/área de 100, rango de duración de picos: 0.01-0.5; y rango de onda de tiempo de retención (RT): 0.01-0.09); para el agrupador de picos isotópicos (tolerancia de m/z configurada en $0.002 m/z$ o 5 ppm, tolerancia de tiempo de retención de 0.2 min, carga máxima de 1, e isótopo representativo establecido en el más intenso); la alineación RANSAC (Pluskal et al., 2010) (la tolerancia de m/z de $0.002 m/z$ o 5 ppm, para la tolerancia de tiempo de retención fue de 0.02 min, y la tolerancia de tiempo de retención después de la corrección fue de 0.01 min; el número mínimo de puntos de 0.7 y valor umbral de 0.2); y el relleno de huecos. Se aplicaron tres filtros: 1) el filtro

para las características duplicadas, 2) el de eliminación de características detectadas en los blancos, y 3) el filtro MS2 para mantener solo las características con espectros MS/MS. La lista de características resultante se exportó como una tabla de cuantificación de características (.csv) y un resumen espectral MS2 (.mgf) para análisis posteriores.

Se realizó una Red Molecular Basada en Características (FBMN) (Nothias et al., 2020) utilizando la plataforma web GNPS. Los archivos .csv y .mgf preprocesados generados por MZmine se subieron a la plataforma GNPS para la creación de redes moleculares y la anotación automatizada de metabolitos mediante coincidencia espectral. Los parámetros clave incluyeron en una tolerancia de masa de iones precursores y de producto de 0.02 Da, un puntaje de coseno mínimo de 0.6, y al menos cuatro iones fragmentados compartidos. Las bases espectrales de DEREPLICATOR+ y MolDiscovery, que se encuentran dentro de la plataforma GNPS, fueron utilizadas para la identificación de los metabolitos. Se aplicaron los siguientes ajustes para su análisis: las tolerancias de la masa de iones precursores y el fragmento fue de 0.02 Da, la carga máxima de 1, y la base de datos completa, que contiene aproximadamente 720,000 compuestos. Además, se utilizó una base de datos personalizada derivada de la base de datos completa de productos naturales marinos (Comprehensive Marine Natural Products Database, CMNPD) (Lyu et al., 2021) para el análisis de MolDiscovery. Dado que MolDiscovery y DEREPLICATOR+ no eran compatibles con los conjuntos de datos en modo negativo, se utilizó MS-FINDER (Tsugawa et al., 2016; Lai et al., 2018) en su lugar. El archivo .mgf que contenía MS2 generado por MZmine fue analizado utilizando la interfaz gráfica del programa SIRIUS (versión 5.8.5) (Dührkop et al., 2019) para determinar la fórmula química, la estructura molecular (Dührkop et al., 2015; Hoffmann et al., 2022) y las asignaciones de clase química (Dührkop et al., 2021; Kim et al., 2021).

Las anotaciones tentativas obtenidas de los metabolitos mediante la coincidencia de las bibliotecas espectrales de GNPS y las herramientas *in silico* fueron clasificadas automáticamente en clases químicas utilizando la ontología NPClassifier. Los resultados de FBMN, DEREPLICATOR+, CSI:FingerID, MolDiscovery, MS-FINDER, CANOPUS, y NPClassifier (Kim et al., 2021) se integraron mediante un script personalizado basado en MolNetEnhancer (Ernst et al., 2019), el cual está disponible en MassIVE (<https://massive.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/massive.jsp>) con el código **MSV000097363**. La red final de salida se visualizó en Cytoscape (versión 3.10.1) (Shannon et al., 2003), con los nodos coloreados al nivel SUPERCLASS. Algunas anotaciones de metabolitos predichas por herramientas de derreplicación *in silico* carecían de nombres químicos precisos y solo proporcionaban cadenas SMILES. Para resolverlo, se utilizó el traductor SMILES-TO-IUPAC-name (STOUT) para convertir las cadenas SMILES en nombres de acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés) (Rajan et al., 2021).

El análisis de datos y la visualización se realizaron utilizando el lenguaje R (versión 4.3) dentro del entorno de desarrollo RStudio (versión 2023.06.0). Se crearon tablas detalladas de información molecular con el paquete MetaboCoreUtils (Rainer et al., 2022) y cheminf (Cao et al., 2008). Para la manipulación de datos, se utilizaron las bibliotecas dplyr (Wickham et al., 2020) y data.table. Los gráficos circulares fueron generados utilizando la biblioteca Plotly.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Cultivos de *Amphidinium eilatiense*

Curvas de crecimiento y tasas de generación

En las curvas de crecimiento de las tres cepas se identificó la fase de adaptación, de crecimiento exponencial (se indica el inicio y el final de esta fase en color rojo) y de decaimiento. En ellas se observó que las tres cepas presentan el mismo tiempo de adaptación. Sin embargo, no se observó claramente una fase estacionaria en ninguna de las cepas, ya que inmediatamente después del fin de la fase de crecimiento exponencial comenzó el declive celular (Figura 5).

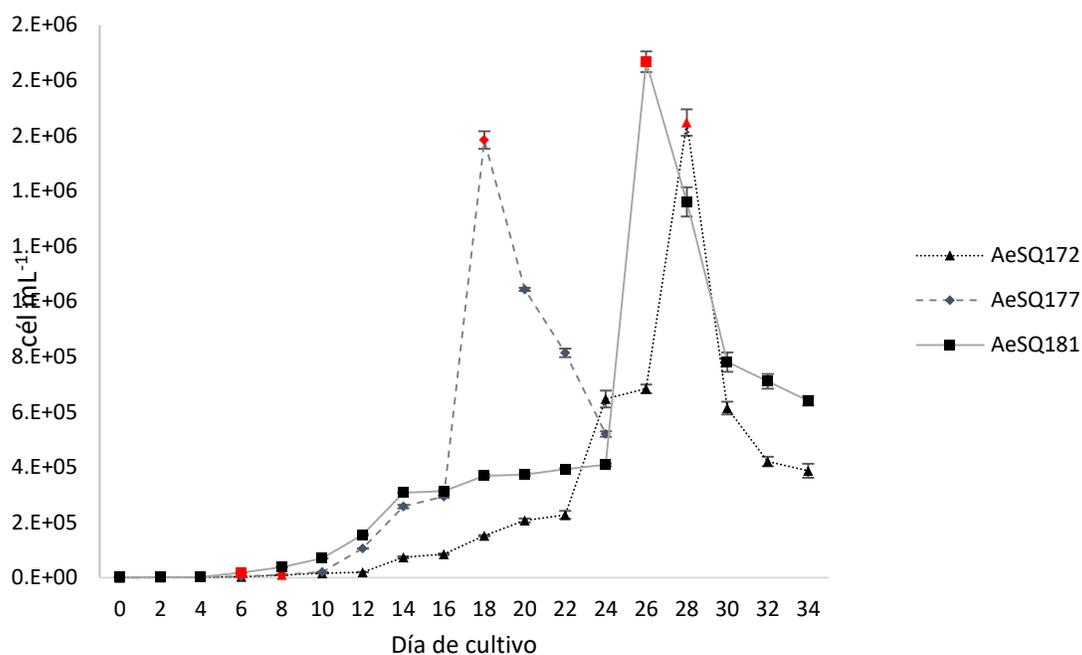


Figura 5. Curvas de crecimiento de las cepas de *Amphidinium eilatiense*. Los datos se representan en promedio \pm DE. Los promedios corresponden a tres réplicas.

En la Figura 5 se observa que la curva de crecimiento de la cepa AeSQ172 se estableció en un lapso de 34 días. La fase de adaptación fue de 6 días, y la fase exponencial inició en el día 8 y terminó el día 28, con una densidad máxima de $1.6 \times 10^6 \pm 4.7 \times 10^4$ cél mL⁻¹. La tasa de crecimiento fue de 0.26 ± 0.0 div día⁻¹ con un tiempo de generación de 2.7 ± 0.04 días (Tabla 6).

La curva de crecimiento de la cepa AeSQ177 se estableció en un lapso de 24 días. La fase de adaptación para esta cepa fue de 6 días. La fase exponencial inició el día 8 y terminó el día 18, con una densidad celular máxima de $1.5 \times 10^6 \pm 3.21 \times 10^4$ cél mL⁻¹ (Figura 5). La tasa de crecimiento fue de 0.5 ± 0.000 div día⁻¹ con un tiempo de generación de 1.4 ± 0.001 días (Tabla 6).

Los cultivos de AeSQ181 fueron analizados en un lapso de 34 días para poder establecer la curva de crecimiento. La fase de adaptación fue de 4 días. Después comenzó la fase exponencial en el día 6, y fue la de mayor tiempo de duración. La curva terminó en el día 26, con una densidad máxima de $1.8 \times 10^6 \pm 3.8 \times 10^4$ cel mL⁻¹ (Figura 5). La tasa de crecimiento fue de 0.2 ± 0.002 div día⁻¹ con un tiempo de generación de 3 ± 0.023 días (Tabla 7).

Tabla 7. Datos de crecimiento de las cepas de *Amphidinium eilatiense*.

Cepa	Densidad máxima (cel mL ⁻¹)	Tasa de crecimiento (div día ⁻¹)	Tiempo en alcanzar la densidad máxima (días)	Inicio de la fase exponencial (días)	Fin de la fase exponencial (días)	Tiempo de generación (días)
AeSQ172	$1.6 \times 10^6 \pm 47,258$	0.26 ± 0.0	28 ± 0.0	8 ± 0.0	28 ± 0.0	2.7 ± 0.0
AeSQ177	$1.5 \times 10^6 \pm 32,146$	0.50 ± 0.0	18 ± 0.0	8 ± 0.0	18 ± 0.0	1.4 ± 0.0
AeSQ181	$1.8 \times 10^6 \pm 37,859$	0.23 ± 0.00	26 ± 0.0	6 ± 0.0	26 ± 0.0	3.00 ± 0.0

Se reportan los promedios \pm la desviación estándar

Al comparar las curvas de crecimiento se observó que la cepa AeSQ177 alcanzó la fase de decaimiento en menor tiempo. Además, se observó que la fase exponencial de AeSQ172 y AeSQ181 fue semejante, pues solo hubo dos días de diferencia en el final de la fase de decaimiento (Figura 5).

3.2 Caracterización morfológica y molecular

3.2.1 Caracterización morfológica

El análisis morfológico de las tres cepas de *Amphidinium eilatiense* indica que son células redondeadas, ovaladas o en forma de pera. En la Tabla 8 se muestran las dimensiones de cada aislado. El epicono es pequeño y creciente hacia arriba y hacia la izquierda. El flagelo se localiza cerca del epicono. El núcleo se localiza en la parte antapical, y en el centro se observa el pirenoide central. Se observaron varias formas como resultado de las variaciones metabólicas; además, se observó el movimiento del flagelo transversal. En algunos individuos se observaron cuerpos color anaranjado-rojo (Figura 6b y e). Asimismo, los cloroplastos en forma ovalada de color amarillo se observaron en la periferia celular (Figura 6 y 8).

Tabla 8. Medidas morfométricas de las cepas de *Amphidinium eilatiense*.

Cepa	Longitud (μm)			Ancho (μm)		
	Máxima	Mínima	Promedio \pm DE	Máximo	Mínimo	Promedio \pm DE
AeSQ172	15	10	13.03 \pm 1.11	9	6	8.1 \pm 0.75
AeSQ177	16	12	14.69 \pm 4.49	10	6	9.40 \pm 2.87
AeSQ181	16	12	13.56 \pm 1.05	10	6	8.82 \pm 0.93

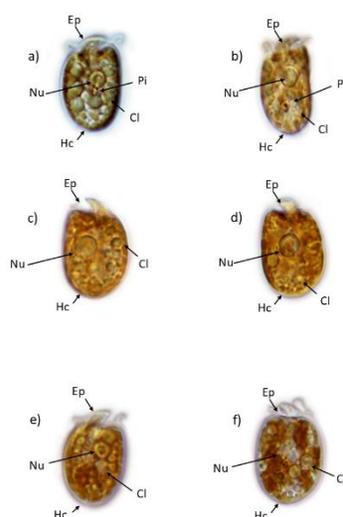


Figura 6. Morfología de las cepas de *Amphidinium eilatiense*. (a y b) AeSQ172, (c y d) AeSQ177 y (e y f) AeSQ181. Ec= epicóno, Hc=hipocono, Nu= núcleo, Cl =cloroplastos, Pi= pirenoide. (a, b y e) vista ventral y (c, d, f) vista dorsal. (b y e) presencia de cuerpos anaranjado-rojo. Aumento de 1,000x. Objetivo de 100x con aceite de inmersión.

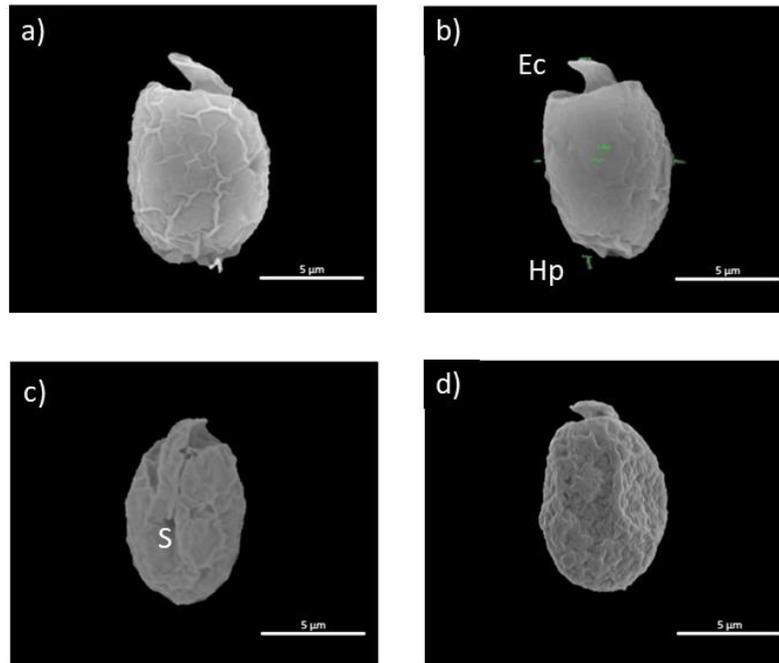


Figura 7. Micrografías en MEB de las cepas de *Amphidinium eilatiense*. a) y b) AeSQ172; c) AeSQ177; d) AeSQ181. (a, b, d) vista dorsal, (c) vista ventral. Ec= epicono, Hc=hipocono, S= sulco.

3.2.2 Caracterización molecular

Para el análisis filogenético se generó una nueva matriz concatenada que incluyó la secuencia de 20 especies de *Amphidinium* con los dos marcadores, LSU + ITS, más la secuencia de grupo externo (*Heterocapsa* sp.). Para la formación de los árboles se realizaron 2160 regiones analizadas. La selección del árbol se basó en el valor de soporte de la rama y la congruencia de acuerdo con los análisis anteriores según (Karafas et al., 2017). De acuerdo con los criterios antes mencionados, se obtuvo un árbol filogenético con el método de máxima verosimilitud (ML). El árbol filogenético obtenido agrupó a las cepas de este trabajo con la especie *Amphidinium eilatiense* (anteriormente *A. eilatiensis*), los cuales aparecen con el número asignado en el cepario, en el recuadro rojo. Las longitudes de las ramas entre las secuencias de nucleótidos analizados muestran que los nodos entre AeS172, AeSQ177 y AeSQ181 y *Amphidinium eilatiense* tiene un 100% de similitud, a diferencia con *A. carterae* que se obtuvo una similitud de 89% (Figura 8).

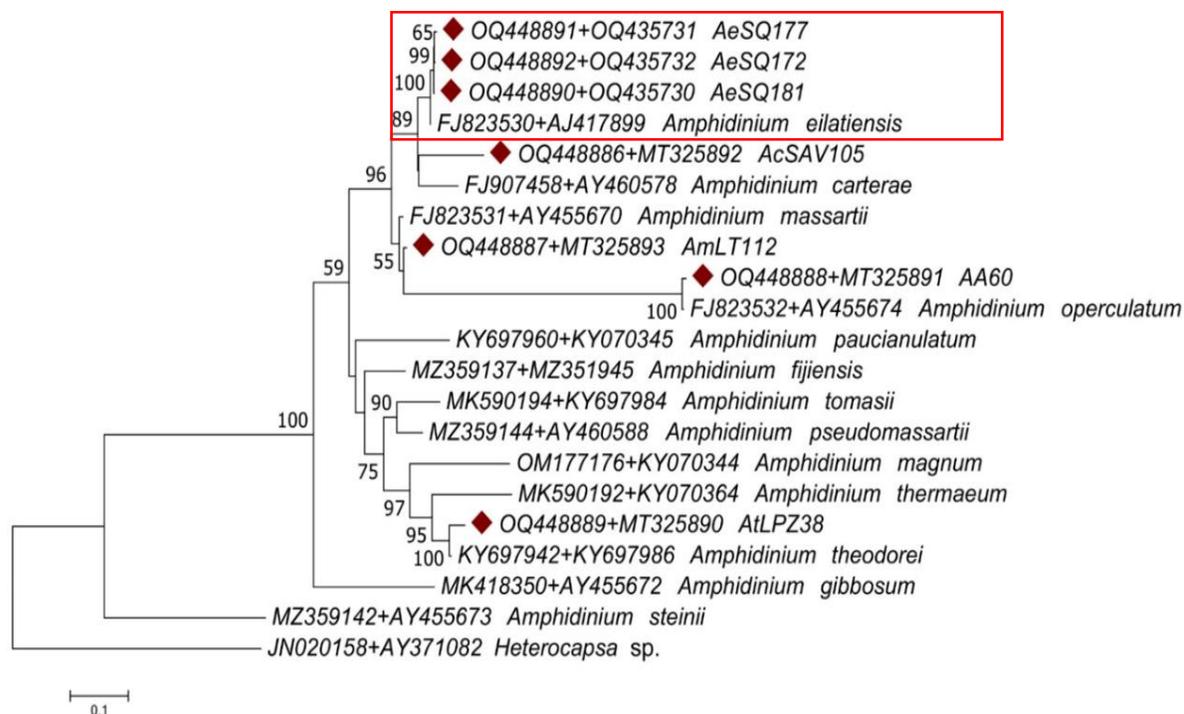


Figura 8. Árbol filogenético de *Amphidinium*, basado en los genes LSU + ITS rRNA. La filogenia molecular se presenta como un árbol de máxima verosimilitud (ML) consensuado.

3.3 Extracción de metabolitos secundarios

3.3.1 Producción de biomasa

Las tres cepas de *Amphidinium eilatiense* presentaron diferencias en la producción de biomasa, expresada en peso seco, de acuerdo con los volúmenes de cultivo utilizados. La cepa AeSQ181, cultivada en 105 litros, produjo 12.4 g de biomasa seca. En comparación, AeSQ172, cultivada en 60 litros, generó 3.3 g, mientras que AeSQ177, a partir de 50 litros, produjo 2.6 g.

Estas variaciones reflejan diferencias inherentes en la tasa de crecimiento y acumulación de biomasa entre cepas, incluso bajo condiciones de cultivo similares. La cepa AeSQ181 destaca por su alta productividad, lo que la convierte en una candidata prioritaria para estudios posteriores de extracción de metabolitos y aplicaciones biotecnológicas.

3.3.2 Rendimiento de los extractos crudos

Extractos de cloroformo

Se obtuvieron 161 mg de extracto crudo de cloroformo de la cepa AeSQ172, con un rendimiento del 32% con respecto a la biomasa seca de 500 mg, y fue este el que presentó el mayor rendimiento. Para la cepa AeSQ177, el rendimiento fue del 27% con respecto a la biomasa seca. En el caso del de la cepa AeSQ181, se obtuvo un rendimiento del 24% (Tabla 9).

Tabla 9. Peso y rendimiento del extracto de cloroformo con respecto a la biomasa seca.

Aislado	Peso seco (mg)	Rendimiento (%)
AeSQ172	161	32
AeSQ177	137	27
AeSQ181	118	24

Extracto metanólico

Se obtuvieron 1.5 g de extracto crudo metanólico para la cepa AeSQ172, con un rendimiento del 49% con respecto a la biomasa seca, y fue este el que presentó mayor rendimiento. Para la cepa AeSQ177, el rendimiento fue del 41% con respecto a la biomasa seca. En el caso de la cepa AeSQ181, se obtuvo un rendimiento del 37% (Tabla 10).

Tabla 10. Peso y rendimiento total del extracto metanólico con respecto a la biomasa seca de las cepas.

Aislado	Peso seco (g)	Rendimiento (%)
AeSQ172	1.60	49
AeSQ177	1.07	41
AeSQ181	4.54	37

3.4 Pruebas biológicas de los extractos crudos

3.4.1 Efecto citotóxico de los extractos crudos

3.4.1.1 Extractos de cloroformo

En las líneas celulares del cáncer de mama, varios extractos de cloroformo disminuyeron la viabilidad celular de manera significativa a una concentración de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ después de una exposición de 48 h a los tratamientos. En la Figura 9a se muestra que la línea celular MCF-7 presentó mayor disminución en la viabilidad celular al ser expuesta a los tres extractos de cloroformo. El extracto AeSQ181 fue el que disminuyó la viabilidad en más del 80%. En la línea T47D se observó que el extracto de cloroformo de AeSQ181 disminuyó significativamente la viabilidad celular en 17%. Con el mismo extracto, pero en la línea celular MDA-MB-231, no se observó una disminución significativa en la viabilidad celular (Figura 9).

En esta misma línea celular, MDA-MB-231, los extractos de las cepas AeSQ172 y AeSQ177 disminuyeron significativamente la viabilidad celular con respecto al control negativo, células tratadas con DMSO al 0.1%. La disminución de la viabilidad fue 10% para AeSQ172 y 8% para AeSQ177. En contraste, los extractos AeSQ172 y AeSQ177 no disminuyeron significativamente la viabilidad celular en la línea celular T47D (Figura 9). Al comparar el efecto citotóxico del extracto de cloroformo de las tres cepas en las líneas celulares de cáncer de mama, se observó un efecto similar cuando se evaluaron en T47D y MDA-MB-231, por lo tanto, en estas líneas celulares no existen diferencias significativas entre los extractos de cloroformo. En el caso de la línea celular MCF-7 sí se observaron diferencias significativas entre los tres extractos (Figura 10).

Al comparar el efecto citotóxico del extracto de cloroformo de las tres cepas en las líneas celulares de cáncer de mama se observó un efecto similar cuando se evaluaron en T47D y MDA-MB-231, por lo tanto, en estas líneas celulares no existen diferencias significativas entre los extractos de cloroformo. En el caso de la línea celular MCF-7 sí se observaron diferencias significativas entre los tres extractos (Figura 10).

En las líneas celulares de cáncer de pulmón, los extractos de cloroformo disminuyeron la viabilidad celular de manera significativa en las cuatro líneas celulares. Se observó que el extracto de cloroformo de AeSQ172 disminuyó significativamente la viabilidad celular en las líneas A549, H1437, y H1563 en 26%, 64% y 20%, respectivamente (Figura 11). Con el mismo extracto, pero en la línea celular H661, no se observó una disminución significativa en la viabilidad celular. En la línea celular H661 los extractos de AeSQ177 y AeSQ181 disminuyeron la viabilidad en 20% con respecto al control negativo. La línea celular en la que se observó mayor disminución de la viabilidad celular fue H1437 con respecto a las otras.

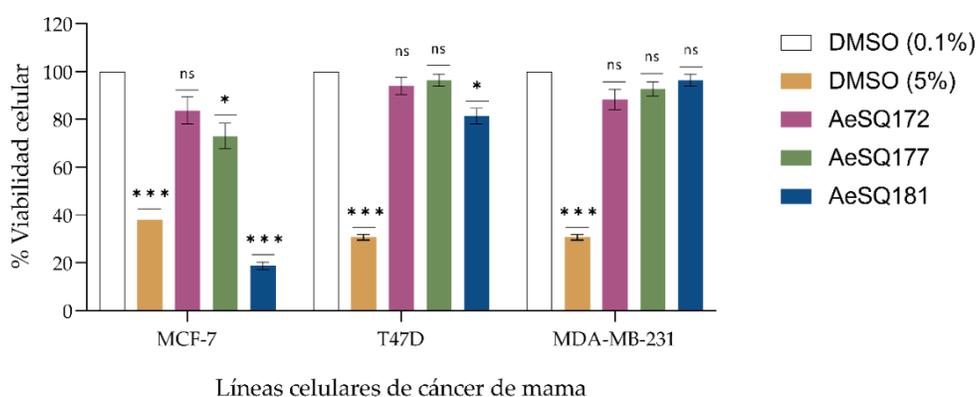


Figura 9. Efecto citotóxico de los extractos de cloroformo de las cepas de *Amphidinium eilatiense*. Los valores se representan como media \pm DE. $n=3$. $*p \leq 0.05$, $***p \leq 0.001$, y ns: sin diferencias significativas. Los * indican las diferencias significativas con respecto al control negativo.

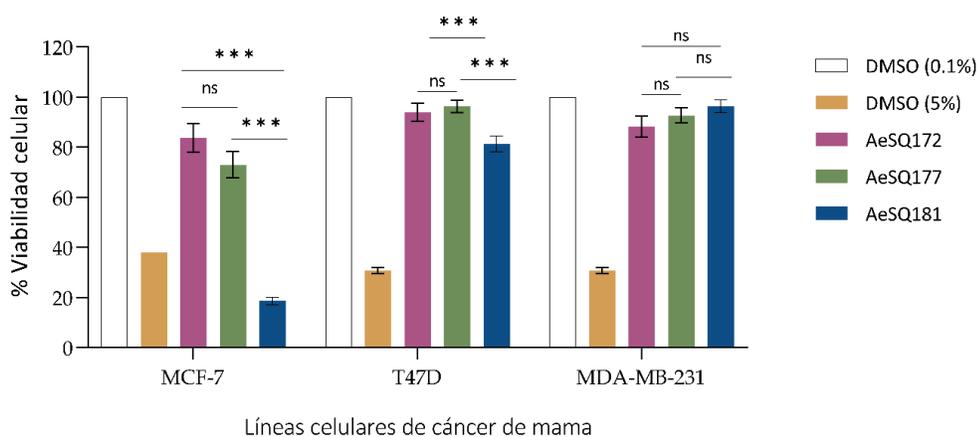


Figura 10. Comparación del efecto citotóxico de los extractos de cloroformo en las líneas celulares de cáncer de mama. Los valores se representan como media \pm DE. $***p \leq 0.001$, y ns: sin diferencias significativas. Los * indican las diferencias significativas entre los tratamientos.

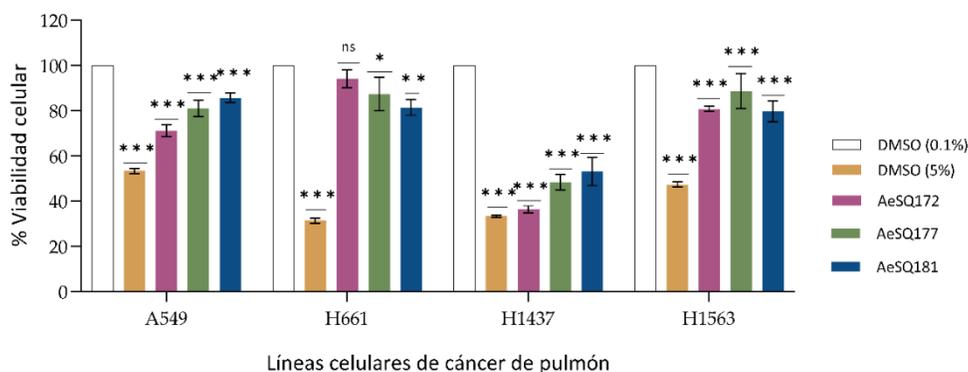


Figura 11. Efecto citotóxico de los extractos de cloroformo de las cepas de *Amphidinium eilatiense* sobre las líneas celulares de cáncer de pulmón. Los valores se representan como media \pm DE. *** $p \leq 0.001$, y ns: sin diferencia significativas. Los * indican las diferencias significativas con respecto al control negativo.

Al comparar el efecto citotóxico de los extractos de cloroformo se observaron diferencias significativas entre los de AeSQ172 y AeSQ181 en las líneas celulares A549, H661 y H1434. En las mismas líneas, pero comparando el efecto de los extractos AeSQ177 y AeSQ181 no se observaron diferencias significativas, lo que sugiere que su efecto es similar. En las líneas celulares H661 y H1563, los extractos de AeSQ172 y AeSQ177 no mostraron diferencias significativas. En particular, la línea celular H1563 fue la única en la que se observó que existen diferencias significativas entre AeSQ177 y AeSQ181, además de que, entre AeSQ172 y AeSQ181 no existen diferencias significativas (Figura 12).

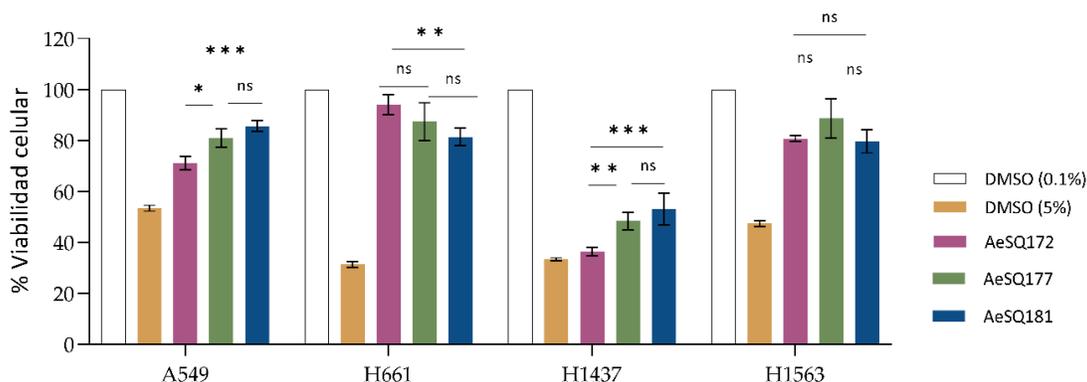


Figura 12. Comparación del efecto citotóxico de los extractos de cloroformo sobre las líneas celulares de cáncer de pulmón. Los valores se representan como media \pm DE. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, y ns: sin diferencia significativas. Los * y los ns indican diferencias entre los tratamientos.

Los resultados de estas pruebas biológicas mostraron que el efecto citotóxico de los extractos de cloroformo en los dos tipos de cáncer presentó porcentajes similares en la disminución de la viabilidad celular, con la excepción de las líneas celulares MCF-7 y H1437 (Figuras 10 y 12). Sin embargo, al comparar la viabilidad celular entre las siete líneas celulares se observó que la mayor disminución se registró en el panel de pulmón. Además, durante el tiempo de exposición de los extractos de cloroformo se observaron diferentes cambios morfológicos en las líneas celulares. Algunos de estos cambios fueron cuerpos celulares redondos, desprendimiento de la superficie y agregación celular.

3.4.1.2 Extractos metanólicos

En las líneas de cáncer de mama, los extractos metanólicos disminuyeron la viabilidad celular de manera significativa en las tres líneas celulares con respecto al control negativo, a una concentración de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Se observó que el extracto metanólico de la cepa AeSQ177 fue el que provocó mayor disminución en la viabilidad en las líneas celulares T47D y MDA-MB-231, en un 26% y 38%, respectivamente (Figura 13).

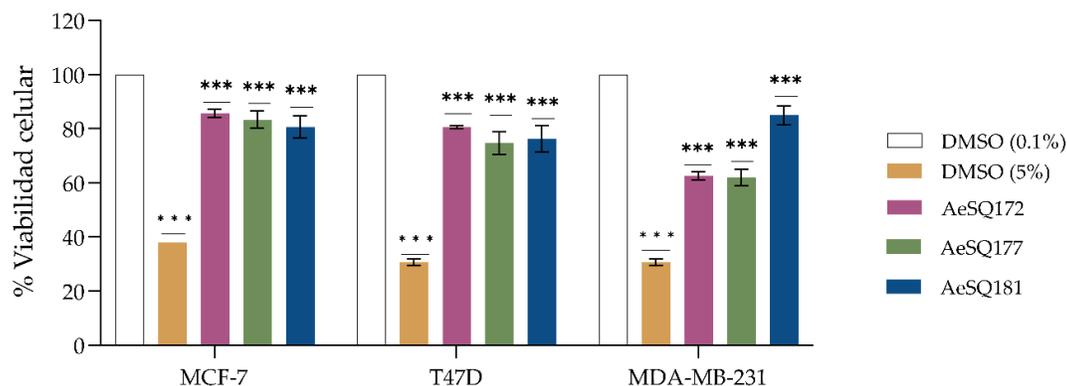


Figura 13. Efecto citotóxico de los extractos metanólicos sobre las líneas celulares de cáncer de mama. Los valores se representan como media \pm DE. *** $p \leq 0.001$. Los * indican las diferencias significativas con respecto al control negativo.

Al comparar el efecto citotóxico del extracto metanólico de las tres cepas en las líneas celulares de mama no se observaron diferencias significativas cuando se evaluaron en las líneas celulares MCF-

7 y T47D. Sin embargo, al comparar los extractos metanólicos de AeSQ172 con AeSQ181, y AeSQ177 con AeSQ181, sí se observaron diferencias significativas cuando se probaron en la línea celular MDA-MB-231. Al comparar el efecto del extracto AeSQ172 con AeSQ177 no se encontraron diferencias significativas en el efecto causado en la línea celular triple negativo (Figura 14).

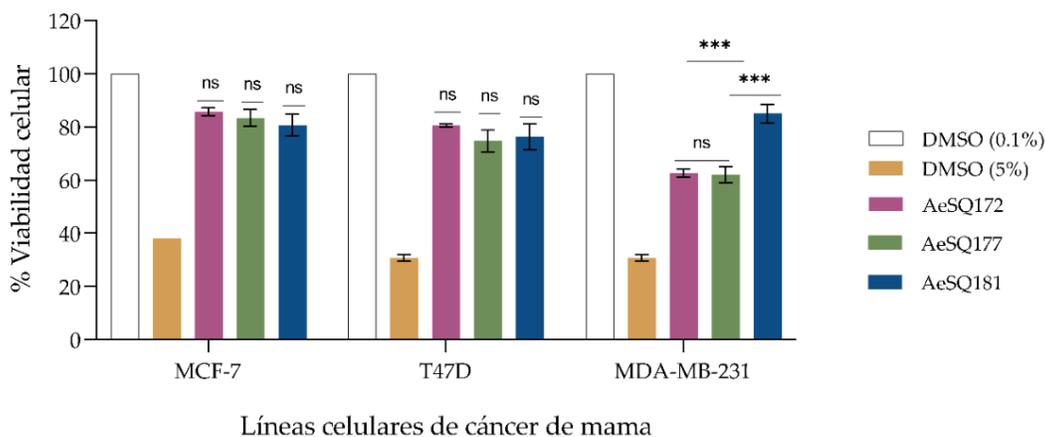


Figura 14. Comparación del efecto citotóxico de los extractos metanólicos sobre las líneas de cáncer de mama. Los valores se representan como media \pm DE. *** $p \leq 0.001$, y ns: sin diferencias significativas.

Por otra parte, los extractos metanólicos en las líneas celulares de cáncer de pulmón, a una concentración de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, disminuyeron la viabilidad celular de manera significativa en las cuatro líneas celulares con respecto al control negativo. En la línea celular A549 se observó que los extractos crudos de AeSQ172 y AeSQ177 disminuyeron la viabilidad en 17%. Por otra parte, en la línea celular H1437, se observó que los extractos de AeSQ177 y AeSQ181 disminuyen significativamente la viabilidad celular en 22% y 21%, respectivamente. Por el contrario, en la línea celular H661, los extractos de AeSQ172 y AeSQ181 fueron los que mostraron mayor efecto citotóxico ya que inhibieron en 21% la viabilidad celular. En este panel de células, el extracto de AeSQ181 fue el que disminuyó en mayor porcentaje la viabilidad celular de las líneas A549, H661 y H1563 en 20%, 21% y 35%, respectivamente (Figura 15). Al comparar el efecto citotóxico del extracto metanólico de las tres cepas en el panel de pulmón se observó que no existen diferencias significativas entre extractos (Figura 16). Durante el tiempo de exposición de los extractos metanólicos se observaron cambios morfológicos en las líneas celulares. Algunos de estos fueron cuerpos celulares redondos, desprendimiento de la superficie y agregación celular.

Se observó que el efecto citotóxico de los extractos metanólicos en las siete líneas celulares de cáncer mostraron similitudes en la disminución de la viabilidad celular en un porcentaje de entre el 20 y 30%. Aunado a lo anterior, se observó que el efecto causado por los extractos metanólicos no presentó diferencias significativas entre los tratamientos, tanto en mama como en pulmón. Sin embargo, al comparar la disminución de la viabilidad celular, se observó un mayor efecto citotóxico en el panel de cáncer de pulmón.

Los resultados de las primeras pruebas biológicas de esta investigación mostraron que el efecto citotóxico del extracto metanólico fue mayor que el extracto de cloroformo en el panel de células de cáncer de mama y pulmón.

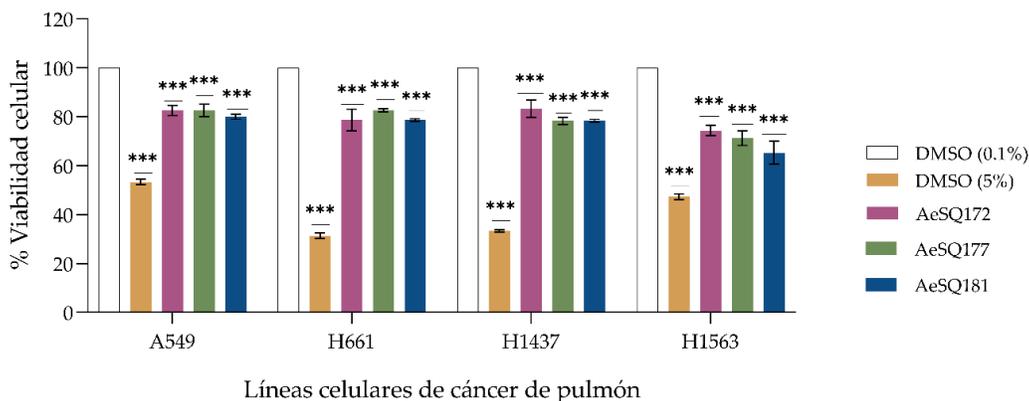


Figura 15. Efecto citotóxico de los extractos metanólicos sobre las líneas de cáncer de pulmón. Los valores se representan como media \pm DE. *** $p \leq 0.001$. Los * indican las diferencias significativas con respecto al grupo control.

En la Figura 17 se muestra que la línea celular normal de fibroblastos de pulmón humano, MRC-5, presentó un aumento en el porcentaje de viabilidad celular estadísticamente significativo con respecto al grupo control; razón por la cual el extracto de la cepa AeSQ177 y AeSQ181 aparecen marcadas con asteriscos. Sin embargo, los extractos metanólicos a esta concentración no mostraron efecto negativo en la viabilidad celular con respecto al grupo control (Figura 17).

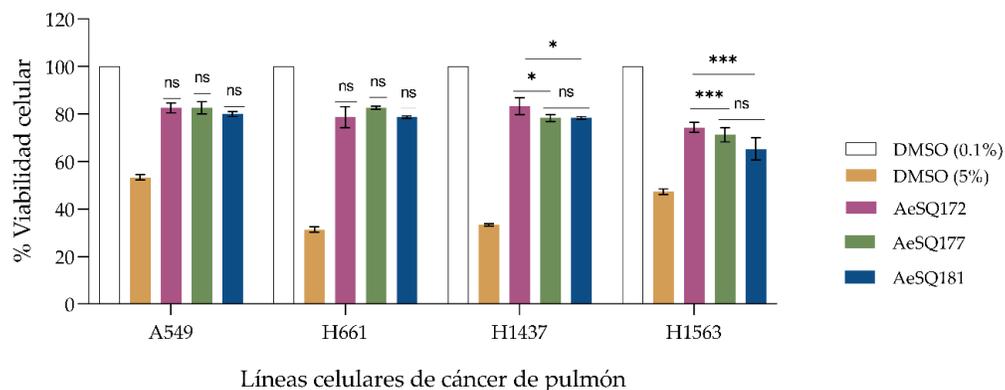


Figura 16. Comparación del efecto citotóxico de los extractos metanólico. Los valores se representan como media \pm SD. * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$ y ns: sin diferencias significativas. Los ns indican las diferencias significativas entre los tratamientos.

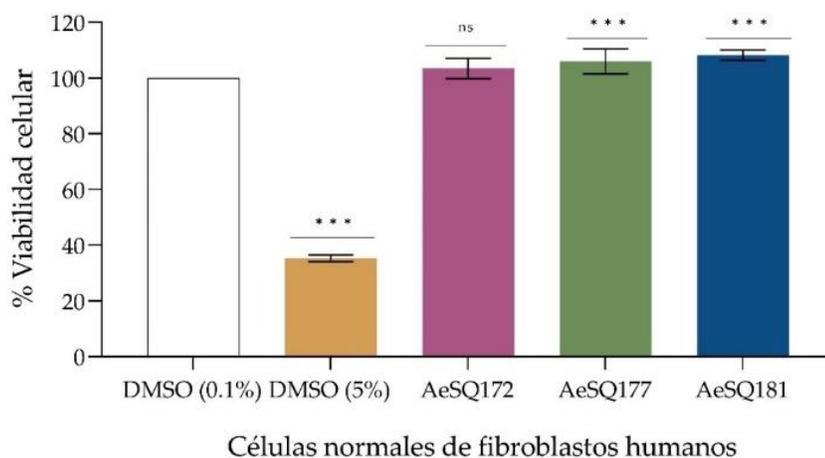


Figura 17. Efecto de los extractos metanólicos sobre fibroblastos de pulmón humano, MRC-5. Los valores se representan como media \pm DE. *** $p \leq 0.001$, y ns: sin diferencias significativas. Los * indican las diferencias significativas con respecto al grupo control.

3.5 Bipartición y fraccionamiento químico

3.5.1 Bipartición de los extractos crudos metanólicos

Del proceso de bipartición (líquido-líquido) se obtuvieron dos fases, la fase no polar (FNP) y la fase

polar (FP) de cada extracto crudo metanólico. De la cepa AeSQ172 se obtuvieron 111 mg de la FNP y 76 mg de la FP, con un rendimiento total del 62%. De AeSQ177 se obtuvieron 91 mg de la FNP y 201 mg de la FP, con un rendimiento de 63% (Tabla 11). Para la cepa AeSQ181 se obtuvieron 1.80 g de la FNP y 0.66 g de la FP, con un rendimiento total de 82% (Tabla 12).

3.5.2 Fraccionamiento de la fase no polar y polar del extracto crudo metanólico

Del fraccionamiento de la fase no polar se obtuvieron 62 tubos con un total de 0.96 mg, los cuales se agruparon en 10 fracciones en función de los resultados de la cromatografía en capa fina. A estas se les asignó el código FNP + número de fracción (Anexo Figura 32) (Tabla 12). En el caso de la fase polar se obtuvieron 15 tubos, los cuales se agruparon en cinco fracciones finales y el código que se les asignó fue FP + número de fracción (Anexo Figura 33). El rendimiento total de las dos fases, FNP y FP, fue de 82% con respecto al peso total del extracto inicial (Tabla 13). Para esta fase, FP, no se realizó el segundo fraccionamiento debido a que no fue activa en las pruebas biológicas

Tabla 11. Bipartición de los extractos crudos metanólicos de las tres cepas de *Amphidinium eilatiense*.

Cepa	Peso del extracto (g)	Disolvente	Fase	Total (g)	Total (mg)	Peso final por cepa (g)	Rendimiento (%)
AeSQ172	0.30	AcEt	FNP	0.11	111	0.187	62
		H ₂ O	FP	0.077	76		
AeSQ177	0.46	AcEt	FNP	0.09	91	0.292	63
		H ₂ O	FP	0.20	201		
AeSQ181	1	AcEt	FNP	0.59	592	0.855	85
		H ₂ O	FP	0.26	263		
AeSQ181	1	AcEt	FNP	0.51	507	0.789	79
		H ₂ O	FP	0.28	282		
AeSQ181	1	AcEt	FNP	0.70	700	0.820	82
		H ₂ O	FP	0.12	120		

Tabla 12. Rendimiento total del extracto crudo metanólico de AeSQ181.

Fase	Peso inicial del extracto (g)	Peso de la fracción (g)	Total (g)	Rendimiento por Fase (%)	Rendimiento total (%)
No polar	3	0.59	1.80	60	82
		0.50			
		0.70			
Polar		0.26	0.66	22	
	0.28				
	0.12				

Tabla 13. Fracciones obtenidas de fases del extracto crudo metanólico de AeSQ181. FNP = Fracción no polar FP = Fracción polar

Peso inicial	Peso inicial de la fracción (g)	Núm. de vial	Fracción	Peso total (g)	Rendimiento por fracción	Rendimiento con respecto al peso total
3.000	0.665	1	FP	0.28	41*	22
		2	FP			
		3	FP			
		4	FP			
		5	FP			
1.799		1'	FNP	1.15	64	38
		2'	FNP			
		3'	FNP			
		4'	FNP			
		5'	FNP			
		6'	FNP			
		7'	FNP			
		8'	FNP			
		9'	FNP			
		10'	FNP			
2,464						82

3.5.3 Replicación del fraccionamiento del extracto metanólico de AeSQ181

De acuerdo con los resultados obtenidos de las pruebas biológicas se replicó el proceso de extracción, partición y fraccionamiento de más biomasa de la cepa AeSQ181 con la finalidad de

obtener mayor cantidad de las FNP-5 y FNP-6, debido a que estas fracciones mostraron mayor actividad citotóxica de acuerdo con las pruebas biológicas.

El peso total para la réplica del fraccionamiento de la fase no polar fue de 720 mg. De este proceso se obtuvieron 230 tubos que se agruparon en 10 fracciones. El peso final obtenido del fraccionamiento fue de 180.54 mg (Tabla 14). Las fracciones obtenidas de la replicación se contrastaron con las fracciones FNP-5 y FNP-6 del primer fraccionamiento mediante cromatografía de capa, las cuales se realizaron con placas precoladas con sílica gel 60 F254 con indicador fluorescente. Los productos se visualizaron con luz UV a λ de 254 nm y 365 nm y se revelaron con sulfato cérico. Las fracciones similares se juntaron para realizar el siguiente fraccionamiento.

Tabla 14. Replicación del fraccionamiento del extracto crudo metanólico de AeSQ181.

Fracción	Peso (mg)
F1	51
F2	9.4
F3	5.4
F4	14.54
F5	8
F6	49.6
F7	25.6
F8	5.1
F9	2.4
F10	9.5
	180.54

En el segundo fraccionamiento no se encontraron fracciones similares a la FNP-5. A diferencia de la fracción 6, se observó que las fracciones 6.1, 6.2 y 7 mostraron señales similares a la FNP-6 al realizar la cromatografía de capa fina, por lo que se procedió a unir las en una sola (Anexo, Figura 34).

3.5.4 Subfraccionamiento de las fracciones FNP-5 y FNP-6

Después del seguimiento cromatográfico realizado mediante cromatografía en capa fina (TLC) de todos los tubos obtenidos durante la replicación del fraccionamiento, estos se agruparon con base en las señales observadas. Como resultado, se obtuvieron diez fracciones, las cuales se compararon

con las fracciones FNP-5 y FNP-6. Aquellas que presentaron perfiles similares fueron combinadas para continuar con el subfraccionamiento. El peso final de cada una de las fracciones seleccionadas fue de 55.6 mg para FNP-5 y 63 mg para FNP-6.

Del subfraccionamiento de FNP-5 se obtuvieron 285 tubos, que fueron agrupados en 11 tubos después del seguimiento cromatográfico. En la Figura 18 se muestran tres cuadros que indican el agrupamiento de las subfracciones: amarillo para la subfracción 5.1, verde para la subfracción 5.2 y rojo para la subfracción 5.3. En el caso de FNP-6, se obtuvieron 264 tubos, los cuales, tras su análisis cromatográfico, se agruparon en 15 tubos finales. En la Figura 19 se muestran con un recuadro amarillo los tubos que fueron agrupados para la subfracción 6.1 y en rojo los tubos correspondientes a la subfracción 6.2

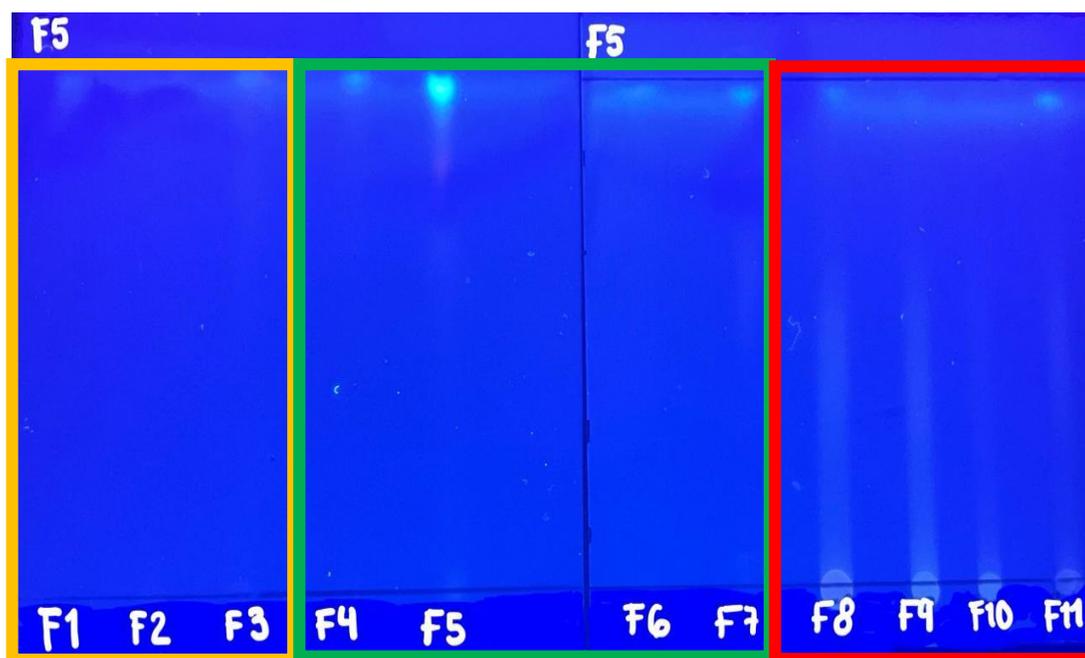


Figura 18. Seguimiento cromatográfico del subfraccionamiento de la fracción no polar 5.

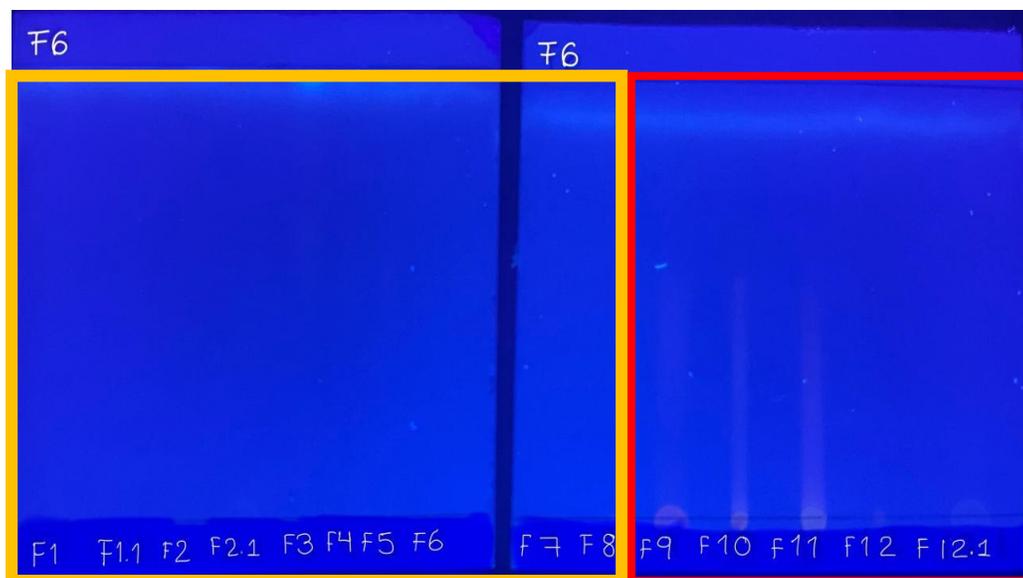


Figura 19. Seguimiento cromatográfico del subfraccionamiento de la fracción no polar 6.

3.6 Caracterización química

3.6.1 Análisis HP-QTOF de las fracciones no polares

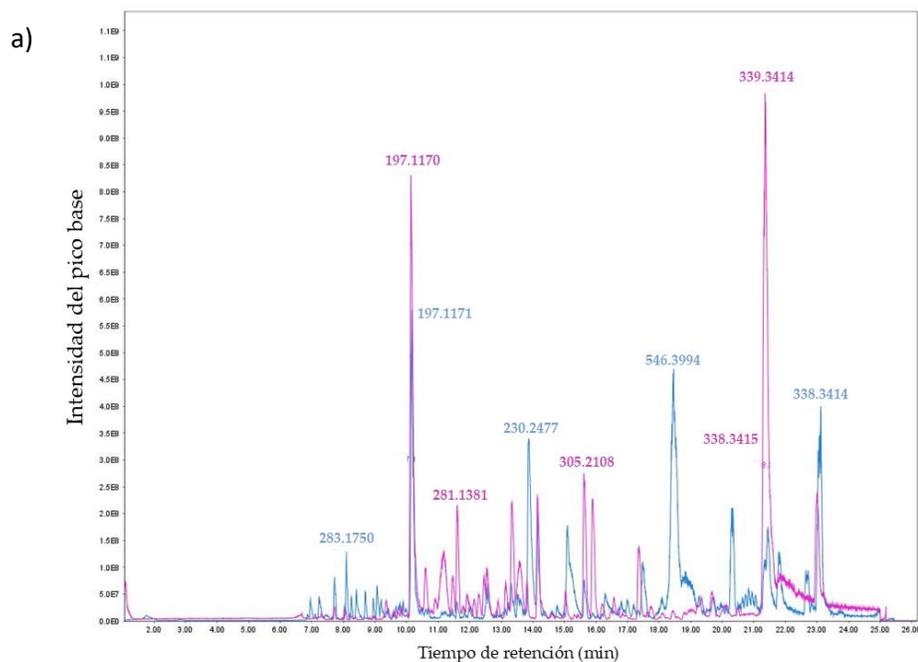
Las fracciones no polares: 2,3,5,6,7, 8, analizadas mediante HP-QTOF, se identificaron varios picos de absorción con distintos tiempos de retención (TR). En la fracción FNP-2 se observaron 12 picos de absorción con TR entre 0.95 y 14.89 min. En la fracción FNP-3, se identificaron 20 picos de absorción, cuyos TR variaron entre 0.6 y 14.77 min, junto con 20 señales de masa/carga (m/z) abundantes. La fracción FNP-5 presentó ocho picos de absorción, con TR de entre 0.7 y 14.96 min, y en todo el escaneo se observaron 8 señales de masa/carga (m/z) abundantes. Por su parte, en la fracción FNP-6 se identificaron 24 picos de absorción con TR entre 0.69 y 14.88 min y se observaron 24 señales (m/z) abundantes. En la fracción FNP-7 se detectaron 26 picos de absorción con TR entre 0.6 y 13.61 min. Finalmente, en la fracción FNP-8 se identificaron 21 picos de absorción con un tr entre 0.7 y 13.61 min y en el cromatograma se observaron 20 señales (m/z) abundantes que coincidían con cada uno de los picos identificados.

3.6.2 Análisis HP-QTOF de las fracciones polares

El análisis de las fracciones polares: 1,3,4,5, se identificaron picos de absorción con distintos TR. En la fracción FP-1 se observaron 12 picos de absorción, con TR entre 0.71 y 13.55 min. En la fracción FP-3, se identificaron 12 picos de absorción, cuyos TR oscilaron entre 0.7 y 13.57 min. La fracción FP-4 presentó ocho picos de absorción, con TR entre 0.72 y 13.57 min. Finalmente, en la fracción FNP-5 se identificaron 30 picos de absorción, con TR entre 0.7 y 14.38 min.

3.6.3 Análisis UP-HRMS de las fracciones activas FNP-5 y FNP-6

Se obtuvo un perfil metabolómico no dirigido de las fracciones bioactivas no polares FNP-5 y FNP-6 de *Amphidinium eilatiense* de la cepa AeSQ181 utilizando UP-HRMS en los modos de ionización positiva y negativa (ESI +/-). Los cromatogramas de iones totales en ambos modos se presentan en las Figuras 20a y b. En el modo positivo, se registraron 2,182 señales en la fracción FNP-5 y 3,270 en la FNP-6. En el modo de ionización negativa, se identificaron 1,903 señales en la fracción FNP-5 y 2,730 en la FNP-6.



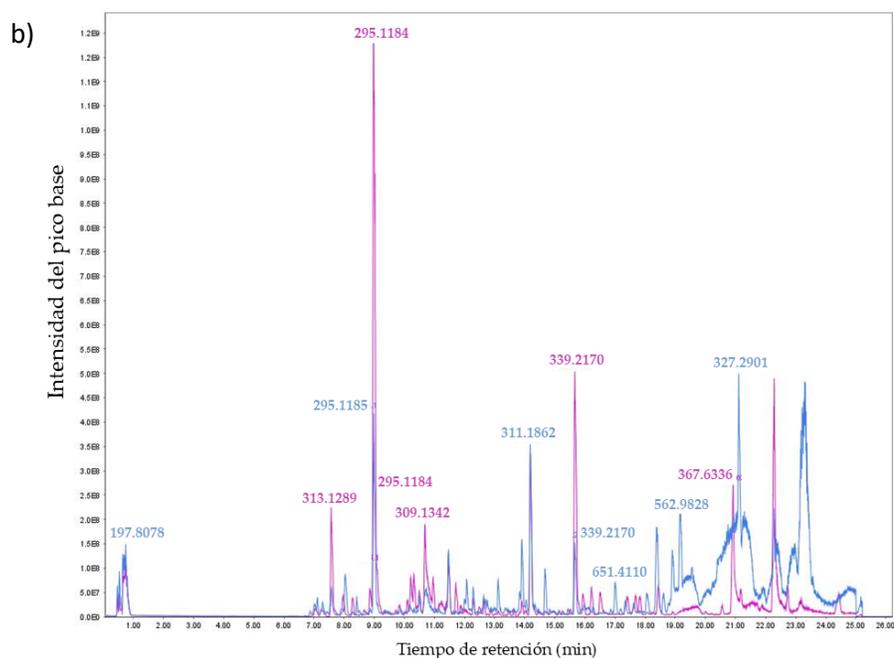


Figura 20. Cromatogramas iónicos totales (TIC por sus siglas en inglés) que muestran la superposición de las fracciones FNP-5 (rosa) y FNP-6 (azul) en ambos modos de ionización. a) modo de ionización positiva y b) modo de ionización negativa. Las señales más intensas se destacan con sus correspondientes relaciones m/z .

3.6.4 Análisis metabolómico no dirigido de las fracciones FNP-5 y FNP-6

El análisis metabolómico no dirigido de las fracciones FNP-5 y FNP-6 reveló que la cepa AeSQ181 presenta una composición química variada y compleja. En la FNP-5, se identificaron seis vías metabólicas, con un total de 203 características en el modo de ionización positiva, y fue la vía de los ácidos grasos la más representativa, con 36% del total. La segunda vía más destacada fue la de los alcaloides, que representó un 28%, seguida de las rutas de aminoácidos y péptidos (Figura 20). En FNP-6, se identificaron siete vías metabólicas, con la inclusión de carbohidratos como principal diferencia con respecto a FNP-5. Al igual que en FNP-5, la vía de los ácidos grasos fue la más prominente, y representó el 22.71% de 1,418 características. Los aminoácidos y péptidos fueron la segunda vía más representada, con 22.64%, seguidas de los policétidos, con 19.39% (Figura 21). En el modo de ionización negativa se encontraron siete vías metabólicas en ambas fracciones. La vía de los ácidos grasos fue la más abundante, y representaron el 28.15% de 735 características en FNP-5 y el 30.02% de 1,259 características en FNP-6. Los alcaloides fueron la segunda vía más representada, con 27.49% en FNP-5 y 29.39% en FNP-6. En este modo de ionización, la ruta de aminoácidos y péptidos ocupó el tercer lugar (Figura 22).

En el análisis quimiotaxonómico a nivel de superclase, se identificaron 13 superclases en las fracciones FNP-5 y FNP-6 en el modo de ionización positiva. En FNP-5, la superclase más abundante fue la de los lípidos y moléculas similares a lípidos, con 27.09% (total = 203), mientras que en la FNP-6 predominó la clase de los ácidos orgánicos y derivados, con 27% (total = 1,418). Las diferencias incluyeron la presencia de hidrocarburos en FNP-5 y nucleósidos, nucleótidos y análogos en FNP-6 (Figura 23).

En el modo negativo, se identificaron 12 superclases en FNP-5 y 14 en FNP-6. Para FNP-5, los ácidos orgánicos y derivados fueron la superclase más representada, con 37.91 % (total = 753), mientras que en FNP-6, los lípidos y moléculas similares a lípidos fueron los más abundantes, con 30.97% (total = 1,259). Una diferencia clave entre las fracciones fue la ausencia de lignanos, neolignanos y compuestos relacionados, así como nucleósidos y análogos en FNP-5 (Figura 24).

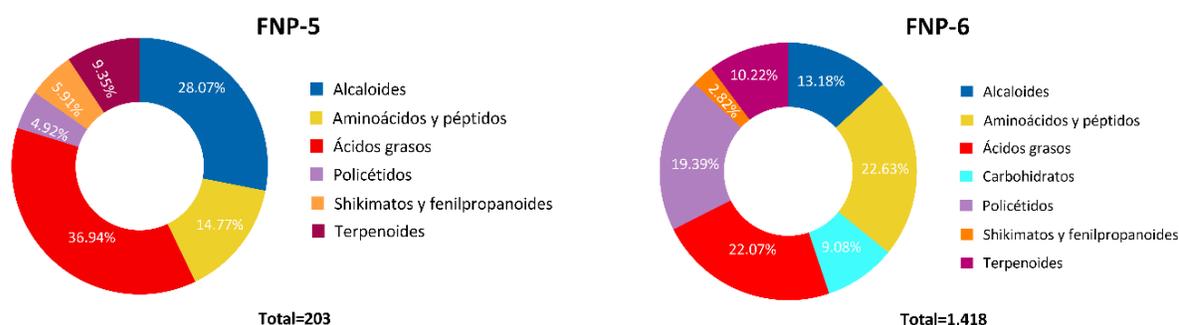


Figura 21. Distribución de las vías metabólicas de los compuestos químicos detectados en modo de ionización positiva para las fracciones bioactivas de *A. eilatiense* de la cepa AeSQ181.

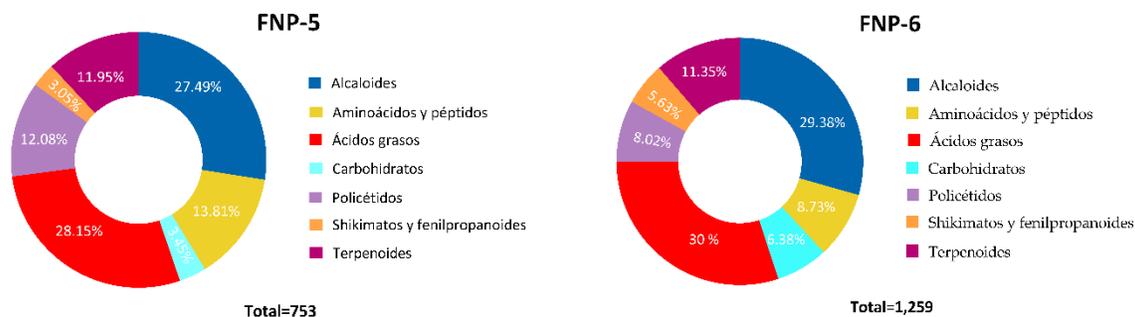


Figura 22. Distribución de las vías metabólicas de los compuestos químicos detectados en modo de ionización negativa para las fracciones bioactivas de *A. eilatiense* de la cepa AeSQ181.

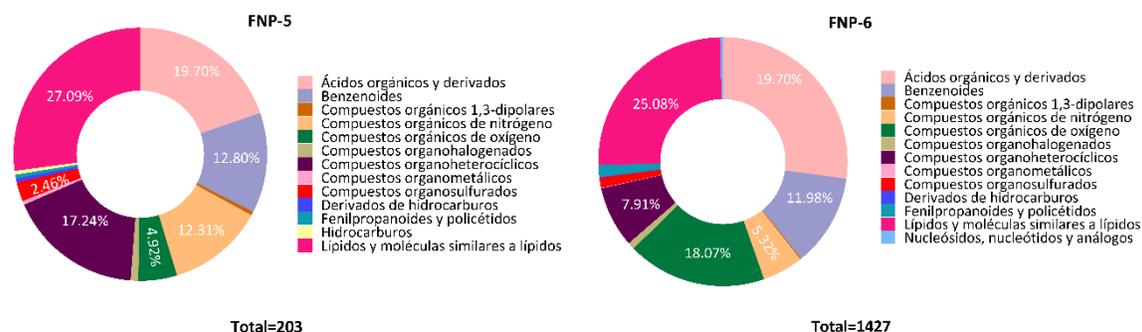


Figura 23. Distribución de las superclases de los compuestos químicos detectados en modo de ionización positiva de las fracciones bioactivas

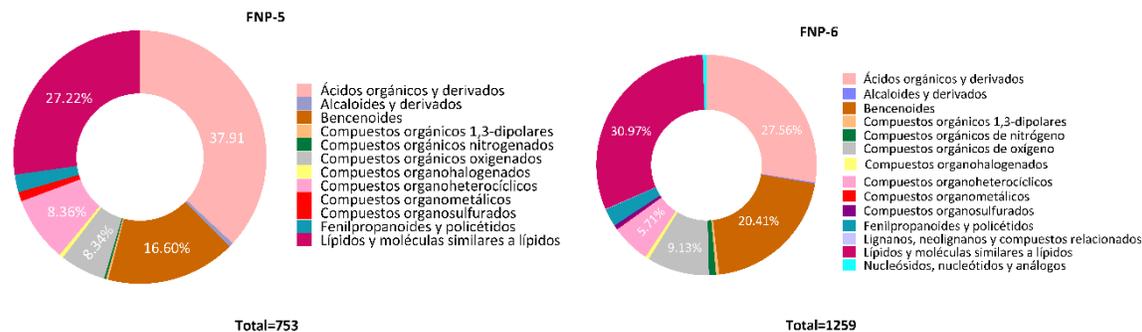


Figura 24. Distribución de las superclases de los compuestos químicos detectados en modo de ionización negativa para las fracciones bioactivas.

La red molecular obtenida del análisis de las fracciones FNP-5 y FNP-6 en modo positivo (Figura 25) incluyó 2,223 nodos y 1,215 componentes conectados, con un promedio de 5.3 vecinos por nodo.

En contraste, la red molecular generada en modo negativo para las mismas fracciones (Figura 26) mostró 3,706 nodos, 2,133 componentes conectados y un promedio de 4.8 vecinos por nodo. Ambos modos de ionización se utilizaron para comparar la abundancia de características, se evaluaron las similitudes y diferencias entre las fracciones, así como su impacto en el ensayo biológico. La FNP-6 presentó un mayor número de características únicas en comparación con FNP-5.

El análisis reveló que ambas fracciones contienen una gran variedad de familias químicas, tanto en modo positivo como en modo negativo. Al realizar una búsqueda manual en las bases de datos de características generadas por UP-HRMS para compuestos con actividad citotóxica y anticancerígena, se identificaron varios compuestos de interés. En el modo positivo (Figura 25), se identificaron cuatro características previamente reportadas con actividad citotóxica en diferentes líneas celulares. Una de estas características fue la erucamida (I), una amida de ácido graso que aparece como un bucle único en la red molecular. La erucamida, detectada a los 23.12 min con una masa de 337.26 Da, fue anotada por GNPS y clasificada en la superclase de los ácidos grasos y la clase de las N-acil amidas. Según la intensidad del área del pico, la erucamida se encontró en mayor cantidad en FNP-6 (20.76%) que en FNP-5 (14.18%).

Otro compuesto identificado fue el ergosta-5,7,22-trien-3-ol (II), un fitosterol anotado por CSIFingerID (SIRIUS), clasificado dentro de los esteroides y la subclase de los esteroides ergostanos. Este compuesto solo se encontró en FNP-6, con un área de pico de 18.21%, y fue detectado a un TR de 18.07 min con un $[M+H-H_2O]^+$ de m/z 379.34. Además, se identificó la linoleamida (III), una amida de ácido graso detectada a los 17.09 min con un $[M+H]^+$ y m/z 280.26 (masa: 279.26 Da). Esta molécula fue anotada con DEREPLICATOR+ y clasificada como una amida de ácido graso en la superclase de los ácidos grasos y la clase de las N-acil etanolaminas. Solo se encontró en FNP-6, con un área de pico de 19.12%. También se identificó la 9-octadecenamida (IV), un compuesto derivado de la misma vía de síntesis de ácidos grasos, presente solo en FNP-6 con un área de pico de 20.06%. Estas amidas, linoleamida y 9-octadecenamida, se agruparon en el mismo clúster (Clúster 2) (Figura 26), y ambas fueron más abundantes en FNP-6.

En el análisis en modo negativo, se identificaron dos grupos y un bucle único. El bucle único encontrado fue el ácido 3,4,5-trimetoxicinámico (V), con un $[M-H]^-$ de m/z 237.08 (238.08 Da), detectado a los 10.13 min. Este compuesto estuvo presente en ambas fracciones, con áreas de pico de 16.2 en FNP-5 y 13.23 en FNP-6. Según la anotación de MSFINDER, se clasifica como un policétido, dentro de los policétidos cíclicos y la clase de los ácidos fenólicos simples.

En el primer clúster se identificó el 1,2-dioctanoil-sn-glicerol (VI), con $[M-H]^-$ con una m/z 343.24, con una masa final 344.24 Da, y un TR de 14.02 min. Este compuesto pertenece a la vía de síntesis de ácidos grasos, a la superclase de los octadecanoides y a la clase de los octadecanoides. Se

encontró en ambas fracciones con áreas de pico de 16.66% en la FNP-5 y 18.88% en la FNP-6. En el segundo clúster se identificaron dos compuestos: la 2'3'-dihidroxi-flavona (VII), detectada a los 15.19 min con un [M-H]⁻ m/z 255.07 (256.07 Da), y la trihidroxicalcona (VIII), con un TR de 15.1 min y una [M-H]⁻ m/z de 255.07, con una masa final de 256 Da. Ambos compuestos fueron exclusivos de FNP-6, con áreas de pico de 20.33 y 16.60%, respectivamente.

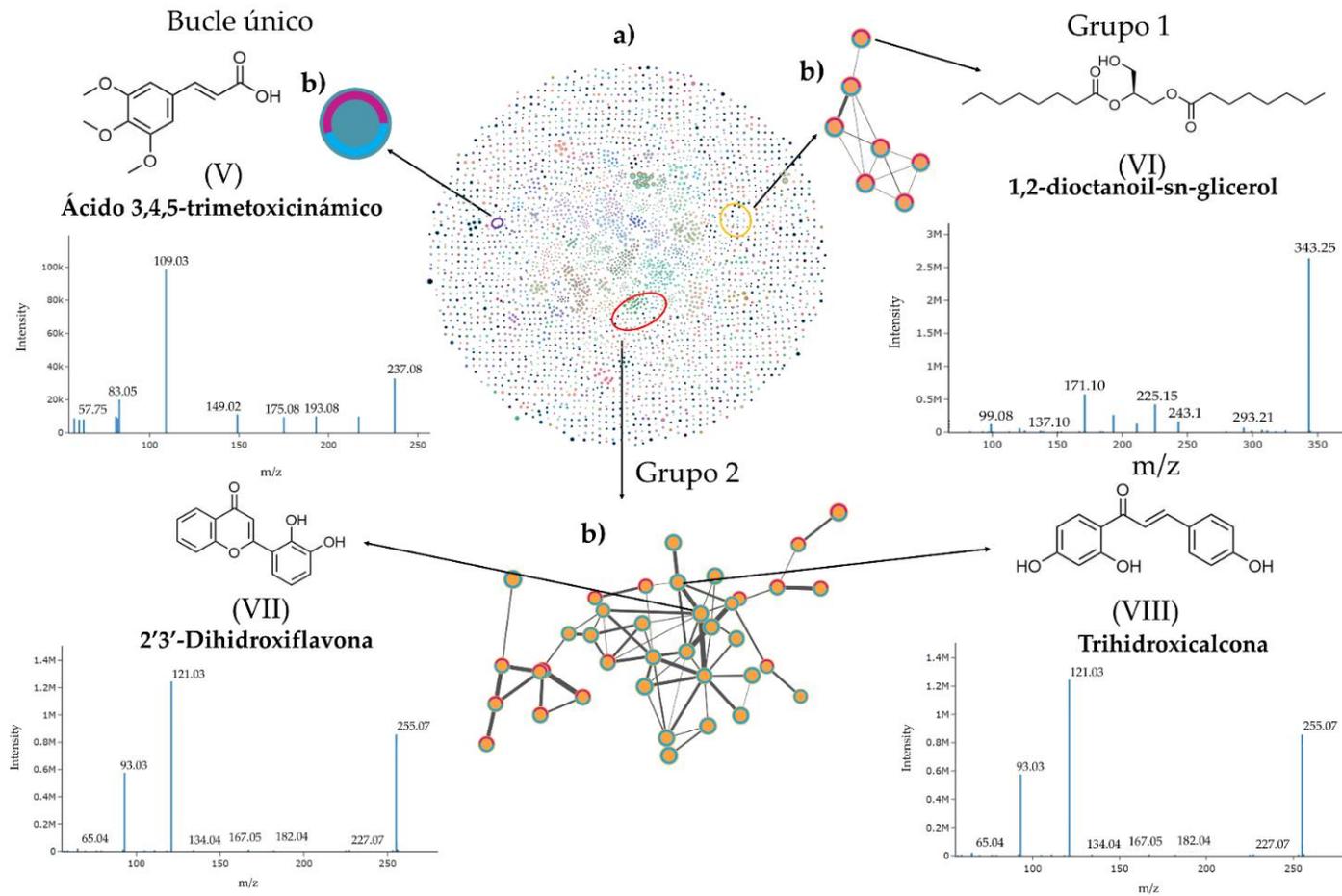


Figura 26. Red molecular de las subfracciones bioactivas FNP-5 y FNP-6 obtenida por UP-HRMS en modo de ionización negativa. (a) (centro). Clústeres (subredes) y bucle propio, ambos contienen compuestos con actividad citotóxica contra líneas celulares cancerosas (b). La abundancia de las características presentes en cada fracción activa está representada por colores: rosa para FNP-5 y azul para FNP-6. Los números romanos corresponden a los compuestos seleccionados. También se muestran los espectros de masas de fragmentación de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) y las estructuras químicas asignadas de cada compuesto de interés.

3.7 Fraccionamiento guiado por bioensayo

3.7.1 Fracciones no polares y polares

3.7.1.1 Efecto citotóxico de las fracciones FNP y FP sobre la línea celular MDA-MB-231

En la línea celular de mama, MDA-MB-231, las fracciones polares (FP) no mostraron efecto citotóxico significativo (Anexo, Figura 35a). Por otra parte, las fracciones no polares (FNP) sí disminuyeron la viabilidad celular de manera significativa a una concentración de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ con respecto al control negativo. En la Figura 27 se muestra que 8 de 10 fracciones mostraron efecto citotóxico significativo. La fracción con mayor efecto fue FNP-5 e inhibió el crecimiento celular en 47 %.

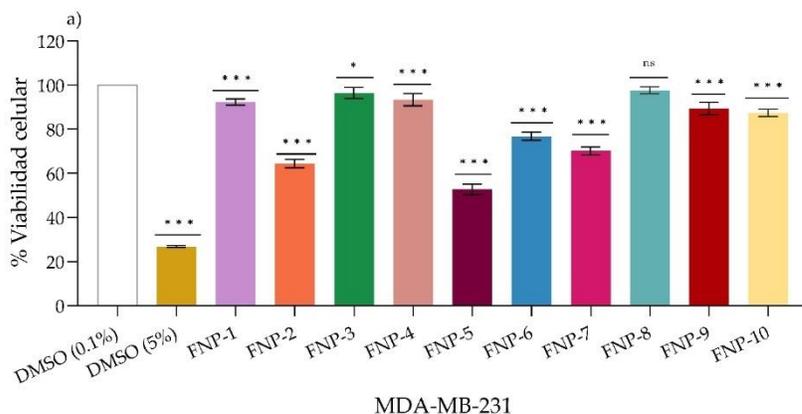


Figura 27. Comparación del efecto citotóxico de las fracciones no polares en la línea celular MDA-MB-231. Los valores se representan como media \pm SD. $n=3$. * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$, y ns: sin diferencias significativas. Los * indican las diferencias significativas con respecto al grupo control.

3.7.1.2 Efecto citotóxico de las fracciones FNP y FP sobre la línea celular H1563

Los ensayos de viabilidad muestran que, al igual que en la línea de mama, en la línea celular H1563, las fracciones polares no exhibieron efecto citotóxico significativo (Anexo, Figura 35b). En esta línea celular se observó que 5 de las 10 fracciones no polares disminuyeron la viabilidad celular de manera significativa a una concentración de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ con respecto al control negativo. En la Figura 28 se muestra que las

fracciones con mayor efecto fueron F5, F6 y F2 inhibiendo el crecimiento celular en 55, 48 y 30 %, respectivamente.

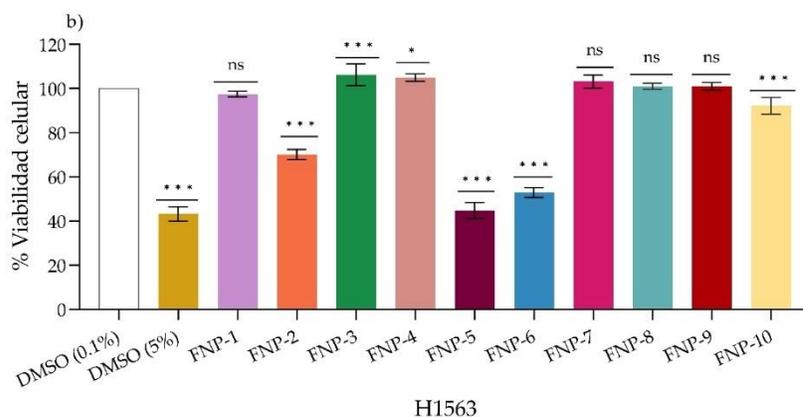


Figura 28. Comparación del efecto citotóxico de las fracciones no polares en H1563. Los valores se representan como media \pm SD. $n=3$. * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$, y ns: sin diferencias significativas. Los * indican las diferencias significativas con respecto al grupo control.

3.7.1.3 Efecto citotóxico de las fracciones FNP y FP sobre la línea MRC-5

En las células de fibroblastos de pulmón MRC-5 se observó que la fracción FNP-5, que mostró el mayor efecto citotóxico en las células de cáncer, disminuye la viabilidad celular en un 16%. Por otra parte, la fracción FNP-6, que también tuvo efecto citotóxico en MDA-MB-231 y H1563, no mostró tal efecto en la MRC-5 (Figura 29). Al igual que en las células cancerosas, las fracciones polares no mostraron efecto negativo en esta línea celular normal (Anexo, Figura 35c).

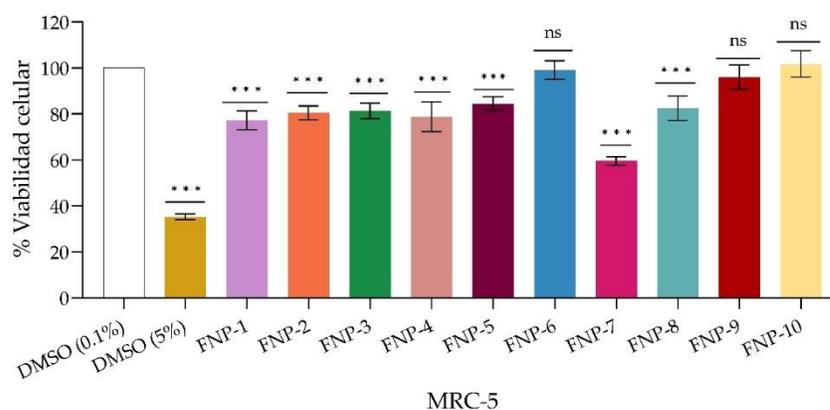


Figura 29. Comparación del efecto citotóxico de las fracciones no polares en MRC-5. Los valores se representan como media \pm SD. $n=3$. * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$, y ns: sin diferencias significativas. Los * indican las diferencias significativas con respecto al grupo control.

3.7.2 Efecto citotóxico de las subfracciones de FNP-5 y FNP-6

Subfracciones no polares

Después del segundo fraccionamiento de las fracciones activas FNP-5 y FNP-6, se obtuvieron las siguientes subfracciones: de la FNP-5 tres subfracciones, denominadas FNP-5.1, FNP-5.2 y FNP-5.3; de la FNP-6 dos subfracciones: FNP-6.1 y FNP-6.2.

De acuerdo con los ensayos de viabilidad realizados en la línea celular MDA-MB-231, las fracciones FNP-5.1, FNP-5.2 y FNP-6.2, a una concentración de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, fueron las únicas que redujeron significativamente la viabilidad celular en un 12%, 18% y 13%, respectivamente. Por otro lado, las fracciones FNP-5.3 y FNP-6.1 no mostraron efecto citotóxico (Figura 30). En esta línea celular de cáncer de mama, la fracción FNP-5.2 fue la que presentó el mayor efecto; sin embargo, al compararla con el efecto de la fracción FNP-5, no se observó el mismo nivel de citotoxicidad.

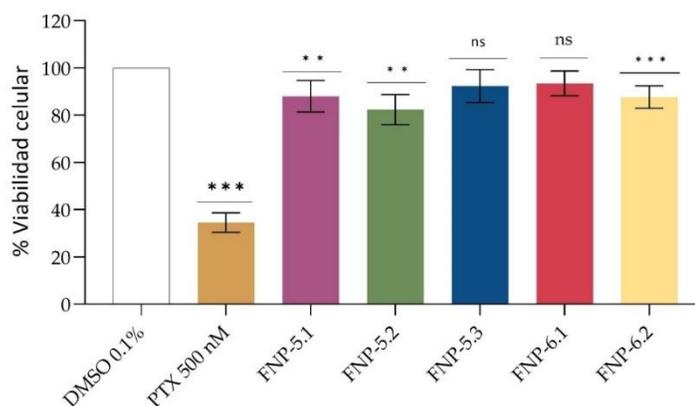


Figura 30. Comparación del efecto citotóxico de las subfracciones de FNP-5 y FNP-6 en la línea celular MDA-MB-231. Los valores se representan como media \pm SD. *** $p \leq 0.001$, y ns: sin diferencias significativas. Los * indican las diferencias significativas con respecto al control negativo.

En la línea celular H1563 de cáncer de pulmón, las cinco subfracciones disminuyeron significativamente la viabilidad celular a una concentración de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ en comparación con el control negativo (Figura 31). Entre estas, la FNP-5.1 fue la que mostró el mayor efecto citotóxico, al reducir la viabilidad celular en un 43%. Al comparar el porcentaje de inhibición de la FNP-5.1 con el de la FNP-5, se observó una diferencia del 12%, por lo que, nuevamente, la fracción menos purificada, FNP-5, mostró mayor actividad citotóxica.

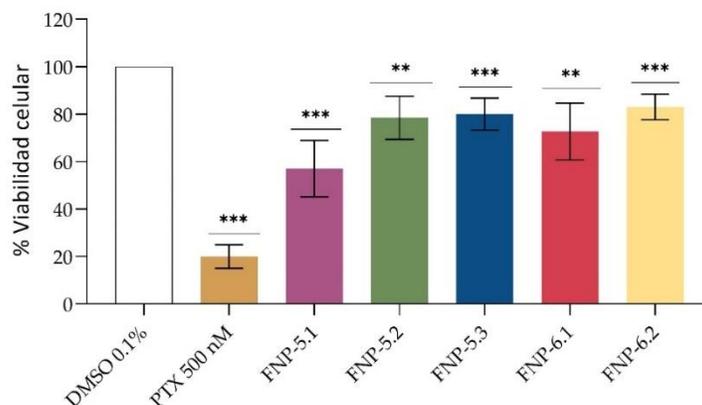


Figura 31. Comparación del efecto citotóxico de las subfracciones de FNP-5 y FNP-6 en la línea celular H1563. Los valores se representan como media \pm SD. $n=3$. $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$, y ns: sin diferencias significativas. Los * indican las diferencias significativas con respecto al control negativo.

3.7.3 Índice de Selectividad

Los datos del Índice de Selectividad (SI) indicaron que los extractos crudos metanólicos de las tres cepas, en especial el obtenido de la cepa AeSQ18, mostró valores más altos en 5 de 7 líneas celulares evaluadas (Tabla 15). Para mostrar selectividad, el IS debe ser superior a 5, aunque en algunos casos se puede considerar de 2. Entonces, aunque los extractos no fueron superiores a 2, estos al no disminuir la viabilidad de la línea MRC-5 se consideraron para los siguientes fraccionamientos.

Tabla 15. Valores de Índice de selectividad (SI) de los extractos para las líneas celulares de cáncer de mama y pulmón

Línea celular de cáncer		Extracto metanólico		
		AeSQ172	AeSQ177	AeSQ181
Mama	MCF-7	1.2	1.28	1.35
	T47D	1.27	1.41	1.42
	MDA-MB-231	1.63	1.71	1.27
Pulmón	A549	1.24	1.28	1.35
	H661	1.3	1.28	1.37
	H1437	1.32	1.36	1.3
	H1563	1.39	1.49	1.66

Asimismo, los valores de IS revelaron que las fracciones no polares FNP-5 y FNP-6 presentaron los valores más altos en comparación con las demás fracciones en las líneas celulares MDA-MB-231 y H1563 (Tabla

16). Si consideramos lo antes mencionadas, estos no fueron superiores a 2, pero la FNP-5 en la línea H1563 se observó un valor de 1.93, el cual con podría ser considerado como selectivo.

Tabla 16. Valores de Índice de selectividad (SI) de las fracciones FNP-5 y FNP-6 para las líneas celulares de cáncer de mama y pulmón.

Fracciones	SI MDA-MB-231	SI H1563
FNP-1	0.84	0.79
FNP-2	1.25	1.14
FNP-3	0.84	0.81
FNP-4	0.85	0.75
FNP-5	1.63	1.93
FNP-6	1.29	1.87
FNP-7	0.84	0.57
FNP-8	0.84	0.81
FNP-9	1.08	0.95
FNP-10	1.16	1.1

Capítulo 4. Discusión

¿Cómo y cuándo se producen los metabolitos secundarios?, ¿por qué poseen potencial farmacológico?, y ¿cuáles son sus impactos en la búsqueda y desarrollo de nuevas moléculas? Estas preguntas motivaron el desarrollo de esta tesis y siguen siendo fundamentales para orientar investigaciones futuras. Para abordarlas, se empleó un enfoque multidisciplinario basado en la ecología química marina, una disciplina emergente que estudia las interacciones entre organismos a través de señales químicas, muchas de las cuales están mediadas por metabolitos secundarios. Este campo permite entender cómo y por qué ciertos compuestos bioactivos, que incluye a las toxinas, son producidos en contextos ecológicos específicos como competencia, defensa o comunicación (Pohnert et al., 2007; Hay, 2009).

En particular, los dinoflagelados marinos se destacan como productores de metabolitos secundarios con funciones ecológicas que a menudo se traducen en efectos tóxicos hacia otros organismos. Sin embargo, esas mismas propiedades biológicas citotoxicidad, actividad neurotóxica, antimicrobiana o antiproliferativa son precisamente las que despiertan el interés farmacológico, por lo que la ecología química, entonces, no solo explica los factores ambientales y evolutivos que inducen la síntesis de estos compuestos, sino que también orienta su descubrimiento y evaluación de los compuestos al vincular sus roles funcionales en la naturaleza con sus mecanismos de acción en modelos biológicos (Hay, 2009; Martins et al., 2014).

Así, la tesis se fundamenta en esta perspectiva integradora, en la cual comprender el contexto ecológico de la producción de los metabolitos secundarios permite revalorarlos como moléculas con potencial en las áreas de la biomedicina y la biotecnología. En particular, los dinoflagelados del género *Amphidinium*, se consideran productores prometedores de metabolitos secundarios con aplicaciones biomédicas, debido a que estos metabolitos presentan actividad citotóxica, anticancerígena y antiproliferativa. Por esta razón, el presente estudio se enfocó en la obtención de metabolitos secundarios de las cepas AeSQ172, AeSQ177 y AeSQ181, de la especie *Amphidinium eilatiense*, aisladas de la región de San Quintín, Baja California, con propiedades citotóxicas.

4.1 Caracterización de las cepas de *Amphidinium eilatiense*

El aumento de la densidad celular de los dinoflagelados depende de las condiciones del cultivo, como de

la disponibilidad de nutrientes, de la intensidad lumínica y de las fases de crecimiento de cada organismo (Martínez Andrade et al., 2018). En este estudio, el ciclo de vida de las tres cepas de *Amphidinium eilatiense*, AeSQ172, AeSQ177 y AeSQ181 mostraron las mismas fases de crecimiento, pero con diferencias notables en los tiempos para alcanzar cada una de las fases (Figura 5), a pesar de haber sido recolectadas del mismo sitio, el mismo día y mantenidas bajo condiciones idénticas. Esta variabilidad sugiere diferencias fisiológicas o genéticas entre las cepas, que podrían estar relacionadas con mecanismos particulares de regulación metabólica, lo cual podría ser relevante para futuras aplicaciones biotecnológicas. Al comparar estos resultados con estudios con la especie cercana filogenéticamente, *A. carterae*, se observa que la densidad celular máxima obtenida por Shah et al. (2014), fue de 1.5×10^3 células mL⁻¹, con una tasa de división de 0.317 divisiones día⁻¹, mientras que en este estudio las cepas de *A. eilatiense*, alcanzaron entre 1.5×10^6 y 1.8×10^6 células mL⁻¹, valores considerablemente superiores (Tabla 6). Esto sugiere que probablemente *A. eilatiense* presenta mayor eficacia a tomar los nutrientes disponibles o al estrés, lo que podría estar asociado a la regulación del ciclo celular.

Asimismo, se contrastan los datos obtenidos con el trabajo realizado por Valenzuela-Espinoza et al. (2011), quienes evaluaron la densidad celular de *A. carterae* en distintas concentraciones de nutrientes y niveles de luz, donde la variación consistió en la cantidad de nitratos y fosfatos (NaNO₃/NaH₂PO₄) añadida al medio de cultivo. Las concentraciones fueron: baja (441.5/18.1 μM), media (883/36.3 μM) y alta (1766/72.6 μM), junto con cuatro niveles de luz continua (50, 150, 300 y 750 μmol quanta m⁻² s⁻¹). Las densidades celulares máximas obtenidas en la fase exponencial en estas condiciones fueron: 1.91×10^6 , 2.15×10^6 y 2.33×10^6 células mL⁻¹, respectivamente. La densidad de 1.91×10^6 fue similar a la obtenida en este estudio, aunque con condiciones experimentales diferentes. Esto sugiere que probablemente *A. eilatiense* podría alcanzar niveles más altos de densidad celular, lo que representa una ventaja para su cultivo en escala sin tantas modificaciones a las condiciones experimentales.

4.1.1 Caracterización morfológica y molecular

En este estudio, los análisis morfológicos basados en microscopía óptica y electrónica de barrido permitieron asignar las cepas AeSQ172, AeSQ177 y AeSQ181 al género *Amphidinium*. La morfología de este género puede variar entre especies, con tamaños que oscilan entre 6 y 43 μm de largo y 5 a 35 μm de ancho. Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con las descripciones morfológicas previas para el género. Las cepas (n=30) tuvieron una longitud de entre 10 y 16 μm y un ancho de entre 6 y 10 μm (Tabla 7). Al comparar estas medidas con las de especies previamente descritas, podría asignarse a las

cepas estudiadas como *A. carterae*, ya que las dimensiones de esta especie varían entre 10 y 20 μm de largo y 9 a 13 μm de ancho (Durán-Riveroll et al., 2023a). Otra especie con medidas similares es *A. eilatiense*; Lee et al. (2003) reportaron un tamaño promedio de $13.2 \pm 0.3 \mu\text{m}$ de largo y $8 \pm 0.3 \mu\text{m}$ de ancho. Al comparar las medidas de los organismos en este estudio, el promedio de la cepa AeSQ172 fue de $13.03 \pm 1.11 \mu\text{m}$ de largo y $8.1 \pm 0.75 \mu\text{m}$ de ancho; la cepa AeSQ177 tuvo un promedio de $14.69 \pm 4.49 \mu\text{m}$ de largo y $9.40 \pm 2.87 \mu\text{m}$ de ancho; y la cepa AeSQ181 presentó un promedio de $13.56 \pm 1.05 \mu\text{m}$ de largo y $8.82 \pm 0.93 \mu\text{m}$ de ancho. Estos valores, en especial los de la cepa AeSQ172, sugieren que la especie podría ser más cercana a *A. carterae*. No obstante, las similitudes morfológicas entre especies del género requieren un análisis más allá del tamaño, debido a su superposición en los rangos de medición y a la alta plasticidad morfológica que caracterizan a estos dinoflagelados.

Lee et al. (2003) mencionan que otro criterio diferencial entre *A. carterae* y *A. eilatiense* radica en la ausencia de placas tecales o unidades poligonales obvias en esta última, lo que concuerda con nuestros resultados, ya que en nuestras cepas tampoco se observaron. Asimismo, se ha reportado que *A. eilatiense* presenta seis lóbulos en los cloroplastos; sin embargo, no fue posible distinguir esta característica en los organismos de este estudio. Por otro lado, se ha señalado que la morfología de *A. eilatiense*, *A. carterae* y *A. klebsii* es similar, aunque la diferencia principal radica en la forma del surco en el epicono. En el caso de *A. eilatiense*, este surco es menos profundo en comparación con las otras dos especies, lo que, por sí solo, no es suficiente para determinar la especie con certeza. Por esta razón, también se realizó la identificación molecular. La necesidad de apoyarse en herramientas moleculares refleja las limitaciones del enfoque morfológico cuando se trata de organismos con estructuras celulares simples y altamente variables; además, resalta la importancia de complementar técnicas para evitar ambigüedades en la clasificación, especialmente cuando se trabaja con organismos crípticos (Murray et al., 2012).

La clasificación taxonómica de los dinoflagelados del género *Amphidinium* presenta dificultades debido a diversas razones. Entre ellas se encuentran su distribución cosmopolita, su capacidad de habitar una amplia variedad de ambientes acuáticos, la diversidad morfológica y trófica que presentan y su notable plasticidad biológica en el ciclo de vida. Esta plasticidad, sumada a la falta de placas tecales complica aún más la determinación de las especies utilizando exclusivamente características morfológicas, lo que puede generar errores en la identificación molecular y en los análisis filogenéticos (Durán-Riveroll et al., 2023a). En este contexto, el análisis filogenético no solo permite confirmar identidades morfológicas complicadas, sino que proporciona un marco evolutivo que da solidez a la clasificación, al evidenciar relaciones genéticas reales entre cepas y especies.

La reconstrucción filogenética se realizó mediante un análisis de Máxima verosimilitud (ML) a partir de secuencias parciales de las regiones variables D1-D6 de la región LSU y ITS-1-ITS-2, lo que permitió identificar las cepas AeSQ172, AeSQ177 y AeSQ181 como *Amphidinium eilatiense*. El primer registro de esta especie se realizó en 2003 en Israel por Lee et al. (2003), y es filogenéticamente muy cercana a *A. carterae*, como se observa en el árbol filogenético del presente estudio (Figura 8). Este es el primer registro de la especie en el Pacífico Norte y en las costas mexicanas (Durán-Riveroll et al., 2023a). Esta expansión geográfica representa un hallazgo importante, ya que amplía el rango de distribución conocido para la especie y plantea preguntas sobre su dispersión, adaptación y posible diversidad genética regional, aspectos que abren nuevas líneas de investigación tanto en la ecología como en evolución de dinoflagelados.

4.1.2 Extracción y caracterización química de metabolitos secundarios

El género *Amphidinium* es considerado un productor potencial de metabolitos secundarios, principalmente de la familia de los policétidos. El complejo policétido es uno de los más importantes, y ha sido evaluado y extraído de diversas especies del género, entre ellas *A. carterae*, *A. gibbosum*, *A. massartii* y *A. operculatum*. No obstante, estas especies también producen otros metabolitos, como anfidosolactonas, lasonólidos, iriomoteólidos, anfiriones, colopsinolos, anfezonol, y anfidirinas (Barone et al., 2024). Diversos estudios previos han demostrado que varias especies recolectadas en las costas mexicanas son productoras de metabolitos secundarios con actividad citotóxica (Wellkamp et al., 2020; Mejía-Camacho et al., 2021). En este contexto, Durán-Riveroll et al. (2023b) mostraron que las cepas AeSQ172, AeSQ177 y AeSQ181, identificadas como *A. eilatiense*, presentaron un perfil toxicológico único, caracterizado por anfidinolos. Por esta razón, en este estudio se procedió con la extracción, el fraccionamiento y la caracterización química de sus metabolitos secundarios.

En cuanto a los rendimientos, se obtuvo un total de 12.3 g de biomasa liofilizada de AeSQ181 a partir de 105 L de cultivo, mientras que para las cepas AeSQ172 y AeSQ177 se obtuvieron 3.2 g y 2.4 g a partir de 60 y 50 L de cultivo celular, respectivamente. La diferencia en el volumen cosechado de la cepa AeSQ181 con respecto a las otras dos se debe a que los cultivos de esta cepa mostraron una mayor estabilidad bajo condiciones de iluminación de $50 \text{ mmol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ con un fotoperíodo de 12:12 h luz: oscuridad y a una temperatura de $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. En el estudio realizado por Ternon et al. (2022) indicaron que a partir de un solo cultivo de 120 L de *Ostreopsis* cf. *ovata*, otro tipo de dinoflagelado bentónico, se obtuvo 3.5 g de biomasa, lo que resalta el alto rendimiento observado para AeSQ181 incluso a menor escala.

Este resultado sugiere que la cepa AeSQ181 podría presentar características fisiológicas particulares que favorecen su crecimiento en condiciones controladas. En este sentido, se ha propuesto algunas especies de dinoflagelados bentónicos, como *Amphidinium carterae*, están adaptados a ambientes de baja irradiancia y muestran una notable flexibilidad nutricional a través de estrategias como la mixotrofia y la absorción de nutrientes orgánicos (Rodrigues & Patil, 2022). Este tipo de adaptaciones les permite sobrevivir en condiciones ambientales variables, lo que podría explicar la estabilidad del crecimiento y la productividad de la cepa AeSQ181 en este estudio.

Por otro lado, la mixotrofia en dinoflagelados puede activarse bajo limitación de nutrientes inorgánicos, lo que incrementa la capacidad de algunas especies para competir en entornos pobres en nitrógeno o fósforo (Li et al., 2012). Aunque en este trabajo no se evaluaron las estrategias nutricionales de *Amphidinium eilatiense*, es posible que AeSQ181 posee estrategias que le confieren una ventaja fisiológica frente a otras cepas. La combinación de estas características podría explicar su eficiencia en la producción de biomasa en condiciones de laboratorio. Por lo que estos resultados abren la posibilidad de realizar estudios posteriores enfocados en la caracterización fisiológica y transcriptómica de *A. eilatiense*, con el fin de comprender mejor los factores que determinan su capacidad de adaptación y crecimiento con el fin de entender estas dinámicas no solo para mejorar su cultivo a mayor escala, sino también para explorar su potencial farmacológico.

4.2 Actividad citotóxica

Desde 1970 se han aislado más de 21,000 productos naturales de diversas especies marinas debido a la notable diversidad estructural y las actividades biológicas de estos compuestos, los cuales han mostrado un notable potencial farmacológico, biomédico, químico, terapéutico y toxicológico (Gallardo-Rodríguez et al., 2012). En este contexto, los dinoflagelados han atraído relevancia en los últimos años por su capacidad de producir metabolitos secundarios con actividad biológica, especialmente la actividad citotóxica (Cousseau et al., 2020). En particular, diversos miembros del género *Amphidinium* han sido reconocidos como productores de compuestos bioactivos, que incluye a los anfidinolos entre otros, cuyas propiedades citotóxicas han sido documentadas (Wellkamp et al., 2020).

En este estudio se documentó por primera vez a *A. eilatiense* en costas mexicanas y se evaluó su actividad citotóxica de tres extractos contra líneas celulares de cáncer de mama y pulmón. Hasta la fecha, no existían reportes sobre la actividad citotóxica de esta especie sobre líneas celulares de cáncer y células normales,

por lo que este trabajo representa un avance en el conocimiento de su potencial biotecnológico. Se demostró que los extractos crudos de las cepas AeSQ172, AeSQ177 y AeSQ181 poseen actividad citotóxica contra siete líneas celulares de cáncer de mama y pulmón, sin afectar significativamente la viabilidad celular de las células normales.

De acuerdo con Durán-Riveroll et al. (2023b), estas cepas presentan un perfil químico interesante, al producir una mayor cantidad de anfidiololes en comparación con otras cepas de *Amphidinium*. En particular, destaca el compuesto AM02 presente en 18% en AeSQ172, 16% en AeSQ177 y 37.3% en AeSQ181. Este anfidiolol fue reportado previamente por Espiritu et al. (2017) como bioactivo en ensayos sobre líneas celulares cancerosas, lo cual explica, al menos en parte, los efectos observados en este estudio.

Los extractos metanólicos de las cepas estudiadas disminuyeron la viabilidad celular de las líneas celulares MCF-7, T47D, MDA-MB-231, A549, H661, H1437 y H1563 al comparar con el grupo control, sin embargo, al evaluar las diferencias entre tratamientos, no mostraron diferencias significativas. Este resultado es interesante, porque a pesar de que cada cepa presentó un perfil distintivo de anfidiololes, como se reportó previamente por Durán-Riveroll et al. (2023b), en las pruebas biológicas no se observaron diferencias significativas entre los extractos metanólicos en cuanto al efecto citotóxico observado. Esto podría relacionarse a que las cepas producen una gran variedad de anfidiololes, por lo que la diversidad química podría influir en la actividad biológica.

Los resultados obtenidos son comparables, aunque se observó que los extractos de este estudio fueron menos citotóxicos a lo reportado en otros estudios. Por ejemplo, el extracto metanólico de *A. operculatum* inhibió entre un 40% y un 60% de la viabilidad celular en la línea celular de leucemia promielocítica aguda HL-60, a una concentración de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Shah et al., 2014). Por otro lado, Mejía-Camacho et al. (2021) mostraron que el extracto etanólico de la misma especie inhibió el crecimiento celular en 60% en las líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7) y adenocarcinoma de pulmón (SKLU-1) a una concentración de 24.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Cabe destacar que las líneas celulares empleadas en esos estudios no coinciden con las utilizadas en el presente trabajo, a excepción de la línea celular MCF-7, por lo que las diferencias del perfil molecular de cada célula podría influir en los resultados obtenidos (Sun et al., 2020).

Además, en otros estudios, *A. carterae* ha mostrado una inhibición completa la viabilidad celular de las líneas celulares de carcinoma de pulmón humano (A549), línea celular de melanoma (A2058), línea celular de hepatoma humano (HepG2), línea celular de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) y línea celular

de cáncer de páncreas (MiaPaca-2), a una concentración de $175 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Martínez Andrade et al., 2019), aunque con un perfil de bioactividad inespecífica y alta toxicidad. En contraste, los extractos de *A. eilatiense*, disminuyeron la viabilidad celular moderada (20 y 30%) a una concentración de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, sin afectar a las células normales, atributo importante en la búsqueda de nuevas moléculas.

Las fracciones no polares de AeSQ181 indican que las fracciones FNP-5 y FNP-6 son las que mostraron mayor actividad citotóxica en las líneas celulares evaluadas. Sin embargo, al continuar el fraccionamiento y evaluar las subfracciones, se observó una pérdida de la actividad citotóxica. Esta disminución podría atribuirse a la manipulación de las muestras, el almacenamiento o la degradación de compuestos sensibles a factores como la luz, la temperatura o la oxidación (Vieira et al., 2020; Zhou et al., 2022). En este contexto, los experimentos realizados por Ruiz-Medina et al. (2022) demostraron que la actividad antioxidante de extractos de macroalga *Dasycladus vermicularis* se disminuyó hasta en un 35% al utilizar material seco en lugar de material húmedo, por lo que sugieren que el manejo del material biológico tiene un papel crítico al trabajar con material biológico.

Por otra parte, esta disminución de la actividad también puede deberse a la pérdida de efectos sinérgicos entre compuestos presentes en los extractos crudos. La fracción FNP-5.1 presentó la mayor actividad citotóxica en la línea celular H1563, con un 43% de inhibición, lo cual indica la posible presencia de uno o más compuestos activos. No obstante, la disminución progresiva de la actividad en otras subfracciones sugiere que la actividad inicial podría depender de la interacción entre varios metabolitos. Este tipo de sinergia ha sido ampliamente reportado en productos naturales (Wagner & Ulrich-Merzenich, 2009), y en un estudio realizado por Barone et al. (2024) explican que los anfidiololes pueden exhibir bioactividad aditiva o sinérgica cuando están en combinación con otros compuestos.

Asimismo, en la línea celular MDA-MB-231, se observó que la fracción FNP-5 había mostrado inhibir la viabilidad celular en 47%, pero este efecto no se mantuvo o incluso fue inferior tras el fraccionamiento. Esta variación podría deberse a la separación de los compuestos sinérgicos durante la purificación, lo que resalta la importancia de evaluar el efecto individual y combinado para verificar el efecto. Otro estudio realizado por De Vera et al. (2018) señalaron que la selectividad de los extractos de los dinoflagelados *Gambierdiscus australes*, *Alexandrium tamarense* y *Prorocentrum arenarium* mostraron actividad antiproliferativa en varias líneas celulares, que incluyen MCF-10A (células de mama no cancerosas), MCF-7 (células de cáncer de mama), LNCaP y PC-3 (células de cáncer de próstata). Sin embargo, en su investigación se destacó que la selectividad hacia una línea celular en particular puede depender de los compuestos presentes en los extractos o de los metabolitos producidos por las especies de dinoflagelados,

lo que sugiere que la diversidad química de los extractos podría explicar las variaciones en la actividad biológica observada en diferentes líneas celulares.

En conjunto, estos resultados resaltan la importancia de considerar tanto la estabilidad química como las interacciones entre compuestos al evaluar la actividad biológica de los extractos, las fracciones y subfracciones. Por lo que, la disminución de la actividad biológica en las fracciones con los procesos de purificación no necesariamente indica ausencia de compuestos activos, sino que podría reflejar la fragmentación de redes sinérgicas. Por esta razón, es necesario entender con mayor profundidad el potencial farmacológico de estos extractos, será necesario aplicar herramientas como metabolómica dirigida y estudios de sinergia que permitan explorar mecanismos de acción y selectividad en un contexto más fisiológico.

4.3 Caracterización química de las fracciones activas FNP-5 y FNP-6

La metabolómica es una herramienta que permite la caracterización y el estudio de las características metabólicas, las vías biosintéticas y los mecanismos subyacentes que modulan las interacciones celulares de los organismos con su entorno (García-Portela et al., 2018). Aunque la metabolómica tiene un gran potencial para revelar nuevos compuestos bioactivos, toxinas, pigmentos y otros metabolitos, este enfoque se ha aplicado solo en algunos casos a dinoflagelados o dentro de estrategias integradas de técnicas *ómicas* revisadas por (Rochfort, 2005; García-Portela et al., 2018; Bi et al., 2019; Beedessee et al., 2020; Roussel et al., 2023). Las técnicas avanzadas de espectrometría de masas, como las combinaciones de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) y a espectrometría de masas de alta resolución (LC-HRMS), son indispensables en el análisis de mezclas químicamente complejas en metabolómica. Estos métodos son particularmente efectivos para la separación, la identificación, la cuantificación y el análisis de metabolitos en mezclas semipurificadas (Estevez & Gago-Martinez, 2023). Es evidente que el uso de herramientas de detección molecular altamente sensibles como espectrometría de masas en tándem (MS/MS) es clave para explorar el espacio químico a un nivel de detalle antes difícilmente alcanzable. Por otro lado, el uso de estos equipos de detección en extremo precisos implica una mayor profesionalización del personal que debe hacer uso de estos. La aplicación y el seguimiento minucioso de los protocolos para utilizar estos equipos debe ser una prioridad, con el fin de evitar la presencia de contaminantes en las muestras. En este estudio, sí fueron detectados algunos contaminantes que, aparentemente, no influyeron en la percepción

de las características químicas que componen el microcosmos del espacio químico de esta cepa de *A. eilatiense* (Oehme et al., 2002).

Los estudios previos no metabolómicos relacionados con las comparaciones de citotoxicidad entre especies y cepas de *Amphidinium* se han centrado en la posible bioactividad de los anfidinolos (AM), el grupo de metabolitos bioactivos más conocido y caracterizado de este género. De hecho, la selección de las cepas (AeSQ172, AeSQ177 y AeSQ181) para los experimentos actuales sobre actividad citotóxica contra líneas celulares de cáncer de mama y pulmón se basó principalmente en la alta diversidad y cuota celular de los AM producidos por estas cepas, algunas de las cuales muestran actividad citotóxica. Se sabe que las tres cepas producen el compuesto con actividad citotóxica comprobada (Espíritu et al., 2017): anfidinol 02 (AM02). Sin embargo, en el presente estudio metabolómico no se identificó algún miembro de la familia química de los anfidinolos en las fracciones más activas. Esto sugiere que los AM no son los únicos responsables de la citotoxicidad reportada entre las cepas de *Amphidinium*, aunque los congéneres bioactivos siguen siendo elusivos e indocumentados.

Una posible razón de la no detección de los AM, a pesar de que, según estudios previos, la producción de AM por célula es alta para las cepas seleccionadas (Durán-Riveroll et al., 2023b), puede estar relacionada con el efecto del metabolismo de *A. eilatiense* en distintas condiciones de nutrientes e intensidad lumínica durante su cultivo. Es destacable el posible efecto compuesto entre estas dos variables, esto se respalda por un estudio realizado por Molina-Miras et al. (2022), en el que, al manipular las concentraciones de fotones de luz, nitratos y fosfatos en los cultivos de *A. carterae*, lograron cuadruplicar la cantidad de AM producidos por la misma cepa. Este aumento se observó cuando las células fueron expuestas a un fotoperíodo de 24:0 h (luz:oscuridad) con una intensidad lumínica de $0.57 \text{ mmol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y una relación nitrógeno a fósforo de 5 (N:P = 5). Al comparar los métodos de cultivo entre el estudio de Durán-Riveroll (que sirvió como base para el diseño de este estudio doctoral) y el de Molina-Miras, es importante destacar que la intensidad lumínica utilizada en el estudio de Durán-Riveroll fue mucho mayor ($50 \text{ mmol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), pero el fotoperíodo en ambos estudios fue de 12:12 h, en comparación con la fuente continua de luz utilizada en el estudio de 2022. Además, la proporción de nutrientes en el estudio de Durán-Riveroll et al. (2023b) fue de 0.5 (N:P = 0.5), en contraste con la proporción 10 veces mayor (N:P = 5) utilizada en el estudio de Morales-Miras et al. (2022). Estos factores, como la iluminación inconstante y la menor concentración de nutrientes clave (nitratos y fosfatos) en el medio de cultivo, podrían haber reducido la cantidad de AM producidos en las cepas del presente estudio, de modo que su concentración fuera demasiado baja para ser detectada. Al contrastar este estudio con el realizado por Durán-Riveroll et al. (2023b) se observó que las condiciones experimentales fueron las mismas. Sin embargo, en dicho

estudio, las condiciones de cultivo no afectaron a la producción de anfidiolos; de hecho, la cepa AeSQ181 fue la que reportó la mayor cantidad de anfidiolos. Esto sugiere que otros factores podrían estar involucrados en la variabilidad de nuestros resultados.

Una posible explicación a este fenómeno se encuentra en el estudio de Barone et al. (2024), en la que se menciona que un cambio en la temperatura o la plasticidad metabólica de *A. carterae*, especie hermana de *A. eilatiensis*, puede incrementar la concentración de lípidos; y si se considera que tanto los lípidos como los policétidos comparten el mismo precursor metabólico, el acetil-CoA, es posible establecer también esta hipótesis en nuestro estudio; ya que como se muestra en las figuras 21 y 22 una mayor prevalencia de lípidos podría deberse a una redistribución metabólica, en la cual una mayor proporción del acetil-CoA se utilizó para la síntesis de lípidos en lugar de policétidos, como los anfidiolos.

Los dinoflagelados son capaces de producir una amplia gama de productos naturales, incluidos ácidos grasos, pigmentos y polisacáridos, que han demostrado tener actividades antiproliferativas, citotóxicas y antitumorales (Sugawara et al., 2007; Assunção et al., 2017). El análisis metabolómico de las fracciones bioactivas de *A. eilatiense* AeSQ181 reveló una variedad de características químicas con potencial, no solo para citotoxicidad, sino también para otras actividades biológicas. Al comparar las fracciones FNP-5 y FNP-6, es evidente que esta última es químicamente más compleja. Sin embargo, los resultados de ambos modos de ionización sugieren que la cepa AeSQ181 emplea diversas vías de biosíntesis para producir productos naturales con potencial biológico. Se anotaron un total de 19 características en modo positivo a través de la Base de Datos Integral de Productos Naturales Marinos (CMNPD). Por ejemplo, dos características identificadas, Noyapyrone A y Melearoride A, de AeSQ181, han sido reportadas como activas contra bacterias y hongos, respectivamente.

Las características químicas destacadas en este estudio fueron seleccionadas en función de su actividad citotóxica previamente reportada, algunas de las cuales muestran propiedades anticancerígenas contra varias líneas celulares tumorales. Un ejemplo de esto es la 9-octadecenamida (IV), ubicada en el grupo 2 en modo positivo, derivada del ácido oleico, que induce la mortalidad celular en células de carcinoma hepatocelular (HepG2). Otro compuesto relevante dentro del mismo clúster, la linoleamida (III), una amida primaria también conocida como amida del ácido linoleico, exhibe actividad citotóxica como antagonista del canal de calcio TRPV2. Este canal TRPV2, expresado en varias líneas celulares de cáncer, desempeña un papel crucial en las vías de señalización de supervivencia y metástasis. En contraste, la erucamida (I), otra amida grasa encontrada en un bucle único comparte la misma actividad antagonista de TRPV2, pero se localiza en una región diferente de la red molecular. Aunque la erucamida (I) y la linoleamida (III) se

encuentran en regiones distintas de la red molecular, tienen propiedades químicas y biológicas similares (Siveen et al., 2020). Esta aparente redundancia química podría complicar la detección y aislamiento de compuestos con actividades biológicas de interés. La redundancia refleja la alta complejidad dentro del espacio químico de los productos naturales producidos por estas cepas de dinoflagelados, lo que abre un camino prometedor para futuras investigaciones y descubrimientos de compuesto bioactivos. Dado que los dinoflagelados constituyen una fuente rica de esteroides novedosos y poco comunes, el ergosta-5,7,22-trien-3-ol (II), más conocido como ergosterol o provitamina D₂, se destaca del clúster 1. Este compuesto genera actividad citotóxica y puede detener el ciclo celular en células de mieloma (Peat et al., 2023).

Finalmente, en cuanto a los compuestos metabólicos clave detectados en modo de ionización negativa, la red molecular generada produjo dos grupos y un bucle único. El compuesto 1,2-dioctanoyl-sn-glicerol (VI) ha sido evaluado en un ensayo de afinidad para la proteína de membrana TRPC7 (NCBI, 2025). Esta proteína está implicada en varias formas de cáncer metastásico, incluidos cáncer de mama, próstata, páncreas, así como leucemia y neuroblastoma (Meng et al., 2021), lo que la convierte en una prioridad de investigación.

Capítulo 5. Conclusiones

Este proyecto doctoral tuvo como objetivo principal obtener fracciones o compuestos con actividad citotóxica contra el cáncer de mama y de pulmón. Para poder abordar los objetivos, una de las primeras contribuciones de este estudio fue la identificación molecular y morfológica de tres cepas del género *Amphidinium* con potencial farmacológico: AeSQ172, AeSQ177 y AeSQ181. Estas cepas pertenecen a la colección viva de dinoflagelados del Laboratorio de Ecología Química de Microalgas, y fueron identificadas como *A. eilatiense*. Este hallazgo representa el primer registro de esta especie en México y en América.

Uno de los primeros retos de esta investigación fue la obtención de fracciones semipurificadas o compuestos puros. Para superar estas limitaciones, se estandarizaron dos protocolos de fraccionamiento para *A. eilatiense*, uno automatizado y otro tradicional. Estos protocolos pueden ser útiles no solo para la obtención de metabolitos secundarios de esta especie, sino también para otras especies de dinoflagelados y otros microorganismos.

Por otro lado, trabajar con extractos crudos y fracciones obtenidas de microorganismos de lento crecimiento implica diversos desafíos, como la baja disponibilidad de biomasa, los bajos rendimientos de extracción y fraccionamiento y la posible presencia de contaminantes. Todos estos desafíos dificultan la caracterización química. A pesar de estas dificultades, las estrategias implementadas en este estudio permitieron confirmar la hipótesis inicial. Se concluye que las fracciones semipurificadas FNP-5 y FNP-6, obtenidas de la cepa AeSQ181, de acuerdo con su composición química, contienen metabolitos secundarios con actividad citotóxica.

Los resultados obtenidos de las pruebas biológicas demostraron que las tres cepas de *A. eilatiense* disminuyeron la viabilidad celular en todas las líneas celulares de cáncer evaluadas, lo que confirma que las tres son productoras de metabolitos secundarios con actividad citotóxica. En particular, las fracciones no polares (FNP), en comparación con las fracciones polares (FP), mostraron una mayor actividad citotóxica en las células MDA-MB-231 (cáncer de mama) y H1563 (cáncer de pulmón). Además, los Índices de Selectividad indicaron que estas fracciones tienen una mayor afinidad por las células cancerosas que por las células normales, lo que refuerza los resultados obtenidos en pruebas con la línea celular de fibroblastos normales de pulmón humano (MRC-5). Esto sugiere que las fracciones no polares FNP-5 y FNP-6 tienen un importante potencial para futuras investigaciones.

Sin embargo, una de las limitantes en la evaluación de la actividad citotóxica en células normales fueron las condiciones de cultivo, lo que hace necesario estandarizar su manejo y asegurar que las células crezcan en condiciones óptimas para el análisis en investigaciones futuras, para asegurar la comparación de los efectos en células cancerosas y no cancerosas.

Finalmente, la implementación de la metabolómica permitió ampliar los análisis. Aunque no se logró aislar un compuesto puro debido a la limitada cantidad de material biológico que hizo imposible realizar más fraccionamientos, sí fue posible identificar diversas moléculas presentes en las fracciones activas. Algunas de estas han sido reportadas previamente en bases de datos como GNPS, mientras que otras fueron detectadas mediante herramientas *in silico*. Estas moléculas, aunque forman parte de mezclas complejas, podrían estar involucradas en la actividad citotóxica observada en las pruebas biológicas.

Estos hallazgos confirman que los dinoflagelados de la especie *A. eilatiense* producen metabolitos con potencial farmacológico, lo que abre la puerta a futuras investigaciones para evaluar su posible aplicación en el desarrollo de nuevos tratamientos contra el cáncer.

Literatura citada

- Abd El-Hack, M. E., Abdelnour, S., Alagawany, M., Abdo, M., Sakr, M. A., Khafaga, A. F., Mahgoub, S. A., Elnesr, S. S., & Gebriel, M. G. (2019). Microalgae in modern cancer therapy: Current knowledge. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 111, 42-50. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.069>
- Akakabe, M., Kumagai, K., Tsuda, M., Konishi, Y., Tominaga, A., Kaneno, D., Fukushi, E., Kawabata, J., Masuda, A., & Tsuda, M. (2016). Iriomoteolides-10a and 12a, cytotoxic macrolides from marine dinoflagellate *Amphidinium* species. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 64(7), 1019-1023. <https://doi.org/https://doi.org/10.1248/cpb.c16-00026>
- Alfonso, A., Vieytes, M. R., & Botana, L. M. (2016). Yessotoxin, a promising therapeutic tool. *Marine Drugs*, 14(2), 30. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md14020030>
- Alves, C., Pinteus, S., Horta, A., & Pedrosa, R. (2016). High cytotoxicity and anti-proliferative activity of algae extracts on an in vitro model of human hepatocellular carcinoma. *Springerplus*, 5(1), 1-13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s40064-016-2938-2>
- Assunção, J., Guedes, A. C., & Malcata, F. X. (2017). Biotechnological and pharmacological applications of biotoxins and other bioactive molecules from dinoflagellates. *Marine Drugs*, 15(12), 393. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md15120393>
- Barone, M. E., Murphy, E., Fierli, D., Campanile, F., Fleming, G. T., Thomas, O. P., & Touzet, N. (2024). Bioactivity of amphidinol-containing extracts of *Amphidinium carterae* grown under varying cultivation conditions. *Current Microbiology*, 81(11), 1-10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00284-024-03862-y>
- Barrios-González, J. (2018). Secondary metabolites production: physiological advantages in solid-state fermentation. *Current developments in biotechnology and bioengineering*, 257-283. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00013-X>
- Beedessee, G., Kubota, T., Arimoto, A., Nishitsuji, K., Waller, R. F., Hisata, K., Yamasaki, S., Satoh, N., Kobayashi, J. i., & Shoguchi, E. (2020). Integrated omics unveil the secondary metabolic landscape of a basal dinoflagellate. *BMC Biology* 18, 1-16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12915-020-00873-6>
- Bi, Y., Wang, F., & Zhang, W. (2019). Omics analysis for dinoflagellates biology research. *Microorganisms*, 7(9), 288. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/microorganisms7090288>
- Cao, L., Guler, M., Tagirdzhanov, A., Lee, Y.-Y., Gurevich, A., & Mohimani, H. (2021). MolDiscovery: Learning mass spectrometry fragmentation of small molecules. *Natural Communications* 12(1), 3718. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41467-021-23986-0>
- Cao, Y., Charisi, A., Cheng, L.-C., Jiang, T., & Girke, T. (2008). ChemmineR: a compound mining framework for R. *Bioinformatics*, 24(15), 1733-1734. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn307>
- Cardoso, F. C., & Lewis, R. J. (2018). Sodium channels and pain: From toxins to therapies. *British Journal of Pharmacology* 175(12), 2138-2157. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/bph.13962>

- Chakraborty, T. K., & Das, S. (2001). Chemistry of potent anti-cancer compounds, amphidinolides. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 1(2), 131-149. <https://doi.org/https://doi.org/10.2174/1568011013354660>
- Chau, V. M., Phan, V. K., & Nguyen, H. D. (2017). Marine natural products and their potential application in the future. *ASEAN Journal on Science and Technology for Development*, 22(4), 297-311. <https://doi.org/https://doi.org/10.3125/asean.v22i3.385>
- Cousseau, A., Siano, R., Probert, I., Bach, S., & Mehiri, M. (2020). Marine dinoflagellates as a source of new bioactive structures. *Studies in Natural Products Chemistry*, 65, 125-171. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817905-5.00004-4>
- de Abreu Costa, L., Henrique Fernandes Ottoni, M., Dos Santos, M. G., Meireles, A. B., Gomes de Almeida, V., de Fátima Pereira, W., Alves de Avelar-Freitas, B., & Eustáquio Alvim Brito-Melo, G. (2017). Dimethyl sulfoxide (DMSO) decreases cell proliferation and TNF- α , IFN- γ , and IL-2 cytokines production in cultures of peripheral blood lymphocytes. *Molecules*, 22(11), 1789. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules22111789>
- De Vera, C. R., Díaz Crespín, G., Hernández Daranas, A., Montalvão Looga, S., Lillsunde, K.-E., Tammela, P., Perälä, M., Hongisto, V., Virtanen, J., & Rischer, H. (2018). Marine microalgae: promising source for new bioactive compounds. *Marine Drugs*, 16(9), 317. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md16090317>
- Dührkop, K., Fleischauer, M., Ludwig, M., Aksenov, A. A., Melnik, A. V., Meusel, M., Dorrestein, P. C., Rousu, J., & Böcker, S. (2019). SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. *Nature Methods* 16(4), 299-302. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41592-019-0344-8>
- Dührkop, K., Nothias, L.-F., Fleischauer, M., Reher, R., Ludwig, M., Hoffmann, M. A., Petras, D., Gerwick, W. H., Rousu, J., & Dorrestein, P. C. (2021). Systematic classification of unknown metabolites using high-resolution fragmentation mass spectra. *Nature Biotechnology* 39(4), 462-471. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41587-020-0740-8>
- Dührkop, K., Shen, H., Meusel, M., Rousu, J., & Böcker, S. (2015). Searching molecular structure databases with tandem mass spectra using CSI: FingerID. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(41), 12580-12585. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.1509788112>
- Durán-Riveroll, L. M., Cembella, A. D., & Okolodkov, Y. B. (2019). A review on the biodiversity and biogeography of toxigenic benthic marine dinoflagellates of the coasts of Latin America. *Frontiers in Marine Science* 6, 148. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00148>
- Durán-Riveroll, L. M., Juárez, O. E., Okolodkov, Y. B., Mejía-Camacho, A. L., Ramírez-Corona, F., Casanova-Gracia, D., Osorio-Ramírez, M. d. C., Cervantes-Urieta, V. A., & Cembella, A. D. (2023a). Morphological and molecular characterization of the benthic dinoflagellate *Amphidinium* from coastal waters of Mexico. *Phycology*, 3(2), 305-324. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/phycolgy3020020>
- Durán-Riveroll, L. M., Weber, J., & Krock, B. (2023b). First identification of amphidinols from Mexican strains and new analogs. *Toxins*, 15(2), 163. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/toxins15020163>

- Dwivedi, G. R., & Sisodia, B. S. (2019). Secondary metabolites: metabolomics for secondary metabolites. In V. Kumar Gupta & A. Pandey (Eds.), *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering* (pp. 333-344). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63504-4.00022-0>
- Dyshlovoy, S. A., & Honecker, F. (2015). Marine compounds and cancer: where do we stand? *Marine Drugs*, 13(9), 5657-5665. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md13095657>
- Ernst, M., Kang, K., Caraballo-Rodríguez, A., Nothias, L., Wandy, J., Chen, C., Wang, M., Rogers, S., Medema, M., & Dorrestein, P. (2019). MolNetEnhancer: enhanced molecular networks by integrating metabolome mining and annotation tools *Metabolites*, 9, 144. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/metabo9070144>
- Espiritu, R. A., Tan, M. C. S., & Oyong, G. G. (2017). Evaluation of the Anti-Cancer Potential of Amphidinol 2, a Polyketide Metabolite from the Marine Dinoflagellate *Amphidinium klebsii*. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 10(4).
- Estevez, P., & Gago-Martinez, A. (2023). Contribution of mass spectrometry to the advances in risk characterization of marine biotoxins: Towards the characterization of metabolites implied in human intoxications. *Toxins*, 15(2), 103. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/toxins15020103>
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *evolution*, 39(4), 783-791. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/2408678>
- Fior, R. (2019). Cancer-when cells break the rules and hijack their own planet. In R. Fior & R. Zilhão (Eds.), *Molecular and Cell Biology of Cancer: When Cells Break the Rules and Hijack Their Own Planet* (pp. 1-20). https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-11812-9_1
- Fotakis, G., & Timbrell, J. A. (2006). *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters* 160(2), 171-177. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.07.001>
- Galasso, C., Nuzzo, G., Brunet, C., Ianora, A., Sardo, A., Fontana, A., & Sansone, C. (2018). The marine dinoflagellate *Alexandrium minutum* activates a mitophagic pathway in human lung cancer cells. *Marine Drugs*, 16(12), 502. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md16120502>
- Gallardo-Rodríguez, J., Sánchez-Mirón, A., García-Camacho, F., López-Rosales, L., Chisti, Y., & Molina-Grima, E. (2012). Bioactives from microalgal dinoflagellates. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1673-1684. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.07.005>
- García-Portela, M., Reguera, B., Sibat, M., Altenburger, A., Rodríguez, F., & Hess, P. (2018). Metabolomic profiles of *Dinophysis acuminata* and *Dinophysis acuta* using non-targeted high-resolution mass spectrometry: effect of nutritional status and prey. *Marine Drugs*, 16(5), 143. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md16050143>
- Garrido, R., Lagos, N., Lagos, M., Rodríguez-Navarro, A. J., García, C., Truan, D., & Henriquez, A. (2007). Treatment of chronic anal fissure by gonyautoxin. *Colorectal Disease*, 9(7), 619-624. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1463-1318.2006.01183.x>
- George, J., Baden, D. G., Gerwick, W. H., & Murray, T. F. (2012). Bidirectional influence of sodium channel activation on NMDA receptor-dependent cerebrocortical neuron structural plasticity. *Proceedings*

of the National Academy of Sciences, 109(48), 19840-19845.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.1212584109>

- Getachew, A. T., Jacobsen, C., & Holdt, S. L. (2020). Emerging technologies for the extraction of marine phenolics: Opportunities and challenges. *Marine Drugs*, 18(8), 389.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md18080389>
- Gómez, F. (2012). A quantitative review of the lifestyle, habitat and trophic diversity of dinoflagellates (Dinoflagellata, Alveolata). *Systematics and Biodiversity*, 10(3), 267-275.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1080/14772000.2012.721021>
- Guillard, R. (1973). Division rates In J. Stein (Ed.), *Handbook of phycological methods*. Cambridge University Press
- Guillard, R. (2005). Purification method for microalgae. In D. Andersen (Ed.), *Algal culturing techniques* (pp. 117-132). Academic Press.
- Guiry, M., & Guiry, G. (2025). AlgaeBase. World-wide electronic publication, University of Galway. In *AlgaeBase*.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5), 646-674.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hay, M. E. (2009). Marine chemical ecology: chemical signals and cues structure marine populations, communities, and ecosystems. *Annual Review of Marine Science* 1, 193-212.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev.marine.010908.163708>
- Hernández-Melgar, A. G., Guerrero, A., & Moreno-Ulloa, A. (2024). Chronic Exposure to Petroleum-Derived Hydrocarbons Alters Human Skin Microbiome and Metabolome Profiles: A Pilot Study. *Journal of Proteome Research*, 23(10), 4273-4285.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.4c00256>
- Hoffmann, M. A., Nothias, L.-F., Ludwig, M., Fleischauer, M., Gentry, E. C., Witting, M., Dorrestein, P. C., Dührkop, K., & Böcker, S. (2022). High-confidence structural annotation of metabolites absent from spectral libraries. *Nature Biotechnology* 40(3), 411-421.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41587-021-01045-9>
- Hoppenrath, M., Murray, S., Sparmann, S. F., & Leander, B. S. (2012). Morphology and molecular phylogeny of *Ankistrodinium* gen nov. (Dinophyceae), a new genus of marine sand-dwelling dinoflagellates formerly classified with *Amphidinium* 1. *Journal of phycology*, 48(5), 1143-1152.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01198.x>
- Indrayanto, G., Putra, G. S., & Suhud, F. (2021). Validation of *in-vitro* bioassay methods: Application in herbal drug research. *Profiles of drug substances, excipients and related methodology*, 46, 273-307.
- Jeong, H. J., Yoo, Y. D., Kim, J. S., Seong, K. A., Kang, N. S., & Kim, T. H. (2010). Growth, feeding and ecological roles of the mixotrophic and heterotrophic dinoflagellates in marine planktonic food webs. *Ocean Science Journal* 45, 65-91. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12601-010-0007-2>

- Jørgensen, M. F., Murray, S., & Daugbjerg, N. (2004). *Amphidinium* revisited. I. Redefinition of *Amphidinium* (Dinophyceae) based on cladistic and molecular phylogenetic analyses *Journal of Phycology*, 40(2), 351-365. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2004.03131.x>
- Karafas, S., Teng, S. T., Leaw, C. P., & Alves-de-Souza, C. (2017). An evaluation of the genus *Amphidinium* (Dinophyceae) combining evidence from morphology, phylogenetics, and toxin production, with the introduction of six novel species. *Harmful Algae*, 68, 128-151. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.08.001>
- Kashman, Y., & Benayahu, Y. (2008). Toxins of marine invertebrates and microorganisms In *Selected Topics In The Chemistry Of Natural Products* (pp. 127-153). https://doi.org/https://doi.org/10.1142/9789812790781_0005
- Kashyap, A. K., & Dubey, S. K. (2022). Molecular mechanisms in cancer development. In *Understanding Cancer* (pp. 79-90). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99883-3.00016-0>
- Kildgaard, S., Subko, K., Phillips, E., Goidts, V., De la Cruz, M., Díaz, C., Gotfredsen, C. H., Andersen, B., Frisvad, J. C., & Nielsen, K. F. (2017). A dereplication and bioguided discovery approach to reveal new compounds from a marine-derived fungus *Stilbella fimetaria*. *Marine Drugs*, 15(8), 253. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md15080253>
- Kim, H. W., Wang, M., Leber, C. A., Nothias, L.-F., Reher, R., Kang, K. B., Van Der Hooft, J. J., Dorrestein, P. C., Gerwick, W. H., & Cottrell, G. W. (2021). NPClassifier: a deep neural network-based structural classification tool for natural products. *Journal of Natural Products*, 84(11), 2795-2807. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00399>
- Kobayashi, J. i. (2008). Amphidinolides and its related macrolides from marine dinoflagellates. *The Journal of Antibiotics* 61(5), 271-284. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/ja.2008.39>
- Kobayashi, J. i., Shimbo, K., Sato, M., & Tsuda, M. (2002). Amphidinolides H2– H5, G2, and G3, New Cytotoxic 26-and 27-Membered Macrolides from Dinoflagellate *Amphidinium* sp. *The Journal of Organic Chemistry*, 67(19), 6585-6592.
- Korsnes, M. S., Hetland, D. L., Espenes, A., Tranulis, M. A., & Aune, T. (2006). Apoptotic events induced by yessotoxin in myoblast cell lines from rat and mouse. *Toxicology in Vitro* 20(7), 1077-1087. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.01.022>
- Kumagai, K., Minamida, M., Akakabe, M., Tsuda, M., Konishi, Y., Tominaga, A., Tsuda, M., Fukushi, E., & Kawabata, J. (2015). Amphirionin-2, a novel linear polyketide with potent cytotoxic activity from a marine dinoflagellate *Amphidinium* species. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(3), 635-638. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.12.003>
- Lai, Z., Tsugawa, H., Wohlgemuth, G., Mehta, S., Mueller, M., Zheng, Y., Ogiwara, A., Meissen, J., Showalter, M., & Takeuchi, K. (2018). Identifying metabolites by integrating metabolome databases with mass spectrometry cheminformatics. *Nature Methods* 15(1), 53-56. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nmeth.4512>
- Lattes, K., Venegas, P., Lagos, N., Lagos, M., Pedraza, L., Rodriguez-Navarro, A., & García, C. (2009). Local infiltration of gonyautoxin is safe and effective in treatment of chronic tension-type headache.

- Lauritano, C., Andersen, J. H., Hansen, E., Albrigtsen, M., Escalera, L., Esposito, F., Helland, K., Hanssen, K. Ø., Romano, G., & Ianora, A. (2016). Bioactivity screening of microalgae for antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, anti-diabetes, and antibacterial activities. *Frontiers in Marine Science* 3, 68. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00068>
- Lauritano, C., De Luca, D., Ferrarini, A., Avanzato, C., Minio, A., Esposito, F., & Ianora, A. (2017). De novo transcriptome of the cosmopolitan dinoflagellate *Amphidinium carterae* to identify enzymes with biotechnological potential. *Scientific Reports* 7(1), 11701. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-017-12092-1>
- Lee, H., & Park, J. B. (2017). Evaluation of the effects of dimethylsulphoxide on morphology, cellular viability, mRNA, and protein expression of stem cells culture in growth media. *Biomedical Reports*, 7(4), 291-296. <https://doi.org/https://doi.org/10.3892/br.2017.961>
- Lee, J. J., Olea, R., Cevalco, M., Pochon, X., Correia, M., Shpigel, M., & Pawlowski, J. (2003). A marine dinoflagellate, *Amphidinium eilatensis* n. sp., from the benthos of a mariculture sedimentation pond in Eilat, Israel. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50(6), 439-448. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2003.tb00270.x>
- Lee, K. H., Jeong, H. J., Park, K., Kang, N. S., Yoo, Y. D., Lee, M. J., Lee, J.-w., Lee, S., Kim, T., & Kim, H. S. (2013). Morphology and molecular characterization of the epiphytic dinoflagellate *Amphidinium massartii*, isolated from the temperate waters off Jeju Island, Korea. *Algae*, 28(3), 213-231. <https://doi.org/https://doi.org/10.4490/algae.2013.28.3.213>
- Leira, F., Alvarez, C., Vieites, J., Vieytes, M., & Botana, L. (2002). Characterization of distinct apoptotic changes induced by okadaic acid and yessotoxin in the BE (2)-M17 neuroblastoma cell line. *Toxicology in Vitro* 16(1), 23-31. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(01\)00095-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0887-2333(01)00095-9)
- Li, J., Glibert, P. M., Alexander, J. A., & Molina, M. E. (2012). Growth and competition of several harmful dinoflagellates under different nutrient and light conditions. *Harmful Algae*, 13, 112-125. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.005>
- Litaker, R. W., Vandersea, M. W., Kibler, S. R., Reece, K. S., Stokes, N. A., Steidinger, K. A., Millie, D. F., Bendis, B. J., Pigg, R. J., & Tester, P. A. (2003). Identification of *Pfiesteria piscicida* (Dinophyceae) and *Pfiesteria*-like organisms using internal transcribed spacer specific PCR assays *Journal of Phycology*, 39(4), 754-761. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2003.02112.x>
- Lyu, C., Chen, T., Qiang, B., Liu, N., Wang, H., Zhang, L., & Liu, Z. (2021). CMNPD: a comprehensive marine natural products database towards facilitating drug discovery from the ocean. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D509-D515. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/nar/gkaa763>
- Martínez Andrade, K. A., Lauritano, C., Druka, D., Romano, G., Grohmann, T., Jaspars, M., Martín, J., Díaz, C., Cautain, B., & de la Cruz, M. (2019). Amphidinol 22, a new cytotoxic and antifungal amphidinol from the dinoflagellate *Amphidinium carterae*. *Marine Drugs*, 17(7), 385. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md17070385>

- Martínez Andrade, K. A., Lauritano, C., Romano, G., & Ianora, A. (2018). Marine microalgae with anti-cancer properties. *Marine Drugs*, 16(5), 165. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md16050165>
- Martins, A., Vieira, H., Gaspar, H., & Santos, S. (2014). Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: Tips for success. *Marine Drugs*, 12(2), 1066-1101. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md12021066>
- Matthews, H. K., Bertoli, C., & de Bruin, R. A. (2022). Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(1), 74-88. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41580-021-00404-3>
- Mejía-Camacho, A. L., Durán-Riveroll, L. M., & Cembella, A. D. (2021). Toxicity bioassay and cytotoxic effects of the benthic marine dinoflagellate *Amphidinium operculatum*. *Journal of Xenobiotics*, 11(2), 33-45. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/jox11020003>
- Molina-Miras, A., Bueso-Sánchez, A., Cerón-García, M. d. C., Sánchez-Mirón, A., Contreras-Gómez, A., & García-Camacho, F. (2022). Effect of nitrogen, phosphorous, and light colimitation on amphidinol production and growth in the marine dinoflagellate microalga *Amphidinium carterae*. *Toxins*, 14(9), 594. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/toxins14090594>
- Moreno-Garrido, I. (2008). Microalgae immobilization: current techniques and uses. *Bioresource Technology* 99(10), 3949-3964. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.040>
- Munday, R., Thomas, K., Gibbs, R., Murphy, C., & Quilliam, M. A. (2013). Acute toxicities of saxitoxin, neosaxitoxin, decarbamoyl saxitoxin and gonyautoxins 1&4 and 2&3 to mice by various routes of administration. *Toxicon*, 76, 77-83. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.09.013>
- Murray, S., Flø Jørgensen, M., Daugbjerg, N., & Rhodes, L. (2004). *Amphidinium* revisited. II. resolving species boundaries in the *Amphidinium operculatum* species complex (Dinophyceae), including the descriptions of *Amphidinium trulla* sp. nov. and *Amphidinium gibbosum*. *Journal of Phycology*, 40(2), 366-382. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2004.03132.x>
- Murray, S., & Patterson, D. J. (2002). The benthic dinoflagellate genus *Amphidinium* in south-eastern Australian waters, including three new species. *European Journal of Phycology*, 37(2), 279-298. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1017/S0967026202003591>
- Murray, S. A., Garby, T., Hoppenrath, M., & Neilan, B. A. (2012). Genetic diversity, morphological uniformity and polyketide production in dinoflagellates (*Amphidinium*, Dinoflagellata). *PLoS One*, 7(6), e38253. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038253>
- Murray, S. A., Kohli, G. S., Farrell, H., Spiers, Z. B., Place, A. R., Dorantes-Aranda, J. J., & Rusczyk, J. (2015). A fish kill associated with a bloom of *Amphidinium carterae* in a coastal lagoon in Sydney, Australia. *Harmful Algae*, 49, 19-28. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.08.003>
- Myers, O. D., Sumner, S. J., Li, S., Barnes, S., & Du, X. (2017). One step forward for reducing false positive and false negative compound identifications from mass spectrometry metabolomics data: new algorithms for constructing extracted ion chromatograms and detecting chromatographic peaks. *Analytical Chemistry* 89(17), 8696-8703. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00947>

- Nasim, F., & Moua, T. (2020). Lung cancer in combined pulmonary fibrosis and emphysema: a large retrospective cohort analysis. *ERJ Open Research* 6(4). <https://doi.org/https://doi.org/10.1183/23120541.00521-2020>
- NCBI. (2025). *PubChem Bioassay Record for AID 1224878, A CellTox Green Cytotoxicity Assay to monitor cytotoxicity in HepG2 cells - 24 hour.* <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/1224878>
- Nothias, L.-F., Petras, D., Schmid, R., Dührkop, K., Rainer, J., Sarvepalli, A., Protsyuk, I., Ernst, M., Tsugawa, H., & Fleischauer, M. (2020). Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nature Methods* 17(9), 905-908. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41592-020-0933-6>
- Oehme, M., Berger, U., Brombacher, S., Kuhn, F., & Kölliker, S. (2002). Trace analysis by HPLC-MS: contamination problems and systematic errors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21(5), 322-331. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(02\)00503-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0165-9936(02)00503-4)
- Okolodkov, Y. B., Durán-Riveroll, L. M., Band-Schmidt, C. J., Leyva-Valencia, I., Gárate-Lizárraga, I., & Cembella, A. D. (2022). A review on marine benthic dinoflagellates in Mexico. *Hidrobiológica*, 32(3). <https://doi.org/https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2022v32n3/okolodkov>
- Otto, T., & Sicinski, P. (2017). Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 17(2), 93-115. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nrc.2016.138>
- Peat, T. J., Gaikwad, S. M., Dubois, W., Gyabaah-Kessie, N., Zhang, S., Gorjifard, S., Phyto, Z., Andres, M., Hughitt, V. K., & Simpson, R. M. (2023). Drug combinations identified by high-throughput screening promote cell cycle transition and upregulate Smad pathways in myeloma. *Cancer Letters*, 568, 216284. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.canlet.2023.216284>
- Pérez-López, H., Durán-Riveroll, L., Gómez-Lizárraga, L. E., & Mendoza-Garfias, M. B. (2020). Simple method for preparing delicate dinoflagellate of the genus *Amphidinium* for scanning electron microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, 26(S2), 1366-1369. <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S1431927620017857>
- Piñeros, M., Laversanne, M., Barrios, E., de Camargo Cancela, M., de Vries, E., Pardo, C., & Bray, F. (2022). An updated profile of the cancer burden, patterns and trends in Latin America and the Caribbean. *The Lancet Regional Health—Americas*, 13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lana.2022.100294>
- Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., & Orešič, M. (2010). MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* 11, 1-11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-395>
- Pohnert, G., Steinke, M., & Tollrian, R. (2007). Chemical cues, defence metabolites and the shaping of pelagic interspecific interactions. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(4), 198-204.
- Pradhan, B., & Ki, J.-S. (2022). Phytoplankton toxins and their potential therapeutic applications: A journey toward the quest for potent pharmaceuticals. *Marine Drugs*, 20(4), 271. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md20040271>
- Rainer, J., Vicini, A., Salzer, L., Stanstrup, J., Badia, J. M., Neumann, S., Stravs, M. A., Verri Hernandez, V., Gatto, L., & Gibb, S. (2022). A modular and expandable ecosystem for metabolomics data

- annotation in R. *Metabolites*, 12(2), 173. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/metabo12020173>
- Rajan, K., Zielesny, A., & Steinbeck, C. (2021). STOUT: SMILES to IUPAC names using neural machine translation. *Journal of Cheminformatics*, 13(1), 34. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s13321-021-00512-4>
- Rein, K. S., & Borrone, J. (1999). Polyketides from dinoflagellates: origins, pharmacology and biosynthesis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 124(2), 117-131. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(99\)00107-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0305-0491(99)00107-8)
- Rein, K. S., & Snyder, R. V. (2006). The biosynthesis of polyketide metabolites by dinoflagellates. *Advances in Applied Microbiology* 59, 93-125. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(06\)59004-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2164(06)59004-5)
- Reverter, M., Rohde, S., Parchemin, C., Tapissier-Bontemps, N., & Schupp, P. J. (2020). Metabolomics and marine biotechnology: coupling metabolite profiling and organism biology for the discovery of new compounds. *Frontiers in Marine Science* 7, 613471. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fmars.2020.613471>
- Rochfort, S. (2005). Metabolomics reviewed: a new “omics” platform technology for systems biology and implications for natural products research. *Journal of Natural Products*, 68(12), 1813-1820. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/np050255w>
- Rodrigues, R., & Patil, J. (2022). Response of benthic dinoflagellates *Amphidinium carterae* and *Bysmatrum gregarium* to salinity changes and prolonged darkness: elucidation through laboratory experiments. *Aquatic Ecology*, 56(4), 1113-1126. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10452-022-09960-y>
- Roussel, A., Mériot, V., Jauffrais, T., Berteaux-Lecellier, V., & Lebouvier, N. (2023). OMICS Approaches to Assess Dinoflagellate Responses to Chemical Stressors. *Biology*, 12(9), 1234. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/biology12091234>
- Ruiz-Medina, M. A., Sansón, M., & González-Rodríguez, Á. M. (2022). Changes in antioxidant activity of fresh marine macroalgae from the Canary Islands during air-drying process. *Algal research*, 66, 102798. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102798>
- Samarakoon, K. W., Ko, J.-Y., Rahman, S. M. M., Lee, J.-H., Kang, M.-C., Kwon, O.-N., Lee, J.-B., & Jeon, Y.-J. (2013). *In vitro* studies of anti-inflammatory and anticancer activities of organic solvent extracts from cultured marine microalgae. *Algae*, 28(1), 111-119. <https://doi.org/https://doi.org/10.4490/algae.2013.28.1.111>
- Schmid, R., Heuckeroth, S., Korf, A., Smirnov, A., Myers, O., Dyrland, T. S., Bushuiev, R., Murray, K. J., Hoffmann, N., & Lu, M. (2023). Integrative analysis of multimodal mass spectrometry data in MZmine 3. *Nature Biotechnology* 41(4), 447-449. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41587-023-01690-2>
- Seoane, S., Molina-Miras, A., López-Rosales, L., Sánchez-Mirón, A., Cerón-García, M., García-Camacho, F., Madariaga, I., & Molina-Grima, E. (2018). Data on the *Amphidinium carterae* Dn241EHU isolation and morphological and molecular characterization. *Data in Brief*, 20, 1-5. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.07.036>

- Shah, M. M. R., Samarakoon, K. W., Ko, J., Lakmal, H. C., Lee, J., An, S., & Jeon, Y. (2014). Potentiality of benthic dinoflagellate cultures and screening of their bioactivities in Jeju Island, Korea. *African Journal of Biotechnology*, 13(6), 792-805. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5897/AJB2013.13250>
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research* 13(11), 2498-2504. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- Siveen, K. S., Nizamuddin, P. B., Uddin, S., Al-Thani, M., Frenneaux, M. P., Janahi, I. A., Steinhoff, M., & Azizi, F. (2020). TRPV2: a cancer biomarker and potential therapeutic target. *Disease Markers* 2020(1), 8892312. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2020/8892312>
- Snyder, R., Gibbs, P., Palacios, A., Abiy, L., Dickey, R., Lopez, J. V., & Rein, K. (2003). Polyketide synthase genes from marine dinoflagellates. *Marine Biotechnology* 5, 1-12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10126-002-0077-y>
- Stern, R. F., Andersen, R. A., Jameson, I., Kuepper, F. C., Coffroth, M.-A., Vulot, D., Le Gall, F., Veron, B., Brand, J. J., & Skelton, H. (2012). Evaluating the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) as a candidate dinoflagellate barcode marker. *PLoS One*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042780>
- Stoecker, D. K., Hansen, P. J., Caron, D. A., & Mitra, A. (2017). Mixotrophy in the marine plankton. *Annual review of marine science*, 9(1), 311-335. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010816-060617>
- Sugawara, T., Yamashita, K., Sakai, S., Asai, A., Nagao, A., Shiraishi, T., Imai, I., & Hirata, T. (2007). Induction of apoptosis in DLD-1 human colon cancer cells by peridinin isolated from the dinoflagellate, *Heterocapsa triquetra*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71(4), 1069-1072. <https://doi.org/https://doi.org/10.1271/bbb.60597>
- Sun, H., Wang, Y., Cheff, D. M., Hall, M. D., & Shen, M. (2020). Predictive models for estimating cytotoxicity on the basis of chemical structures. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 28(10), 115422. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115422>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Ternon, E., Glukhov, E., Trytten, E., Lemée, R., & Gerwick, W. H. (2022). On the Hunt for New Toxin Families Produced by a Mediterranean Strain of the Benthic Dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*. *Toxins*, 14(4), 234. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/toxins14040234>
- Thirumurugan, D., Cholarajan, A., Raja, S., & Vijayakumar, R. (2018). An introductory chapter: secondary metabolites. In R. Vijayakuma & S. Raja (Eds.), *Secondary metabolites-sources and applications* (pp. 3-21). <https://doi.org/10.5772/intechopen.79766>

- Trigili, C., Pera, B., Barbazanges, M., Cossy, J., Meyer, C., Pineda, O., Rodriguez-Esrich, C., Urpí, F., Vilarrasa, J., & Díaz, J. F. (2011). Mechanism of Action of Cytotoxic Macrolides Amphidinolide X and J. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules28135249>
- Tsugawa, H., Kind, T., Nakabayashi, R., Yukihira, D., Tanaka, W., Cajka, T., Saito, K., Fiehn, O., & Arita, M. (2016). Hydrogen rearrangement rules: computational MS/MS fragmentation and structure elucidation using MS-FINDER software. *Analytical Chemistry* 88(16), 7946-7958. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00770>
- Valdiglesias, V., Prego-Faraldo, M. V., Pásaro, E., Méndez, J., & Laffon, B. (2013). Okadaic acid: more than a diarrheic toxin. *Marine Drugs*, 11(11), 4328-4349. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md11114328>
- Valenzuela-Espinoza, E., Millán-Núñez, R., Santamaría-del-Ángel, E., & Trees, C. C. (2011). Macronutrient uptake and carotenoid/chlorophyll a ratio in the dinoflagellate *Amphidinium carteri* Hulbert, cultured under different nutrient and light conditions. *Hidrobiológica*, 21(1), 34-48.
- Vega, B. O. A., & Voltolina, D. (2007). Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*, 1, 17-25.
- Vieira, M. V., Pastrana, L. M., & Fuciños, P. (2020). Microalgae encapsulation systems for food, pharmaceutical and cosmetics applications. *Marine Drugs*, 18(12), 644. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md18120644>
- Wagner, H., & Ulrich-Merzenich, G. (2009). Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 16(2-3), 97-110. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.12.018>
- Wellkamp, M., García-Camacho, F., Durán-Riveroll, L. M., Tebben, J., Tillmann, U., & Krock, B. (2020). LC-MS/MS method development for the discovery and identification of amphidinols produced by *Amphidinium*. *Marine Drugs*, 18(10), 497. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md18100497>
- Wickham, H., François, R., Henry, L., Müller, K., & Vaughan, D. (2020). *dplyr: A grammar of data manipulation*.
- Williams, G. H., & Stoeber, K. (2012). The cell cycle and cancer. *The Journal of Pathology* 226(2), 352-364.
- Wu, Z., Luo, H., Yu, L., Lee, W. H., Li, L., Mak, Y. L., Lin, S., & Lam, P. K. (2020). Characterizing ciguatoxin (CTX)-and Non-CTX-producing strains of *Gambierdiscus balechii* using comparative transcriptomics. *Science of the Total Environment*, 717, 137184. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137184>
- Zhou, J., Wang, M., Saraiva, J. A., Martins, A. P., Pinto, C. A., Prieto, M. Á., Simal Gandara, J., Cao, H., Xiao, J., & Barba, F. J. (2022). Extraction of lipids from microalgae using classical and innovative approaches. *Food Chemistry*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132236>

Anexos



Figura 32. Fracciones no polares (FNP) del extracto metanólico de AeSQ181 antes de eliminar el disolvente

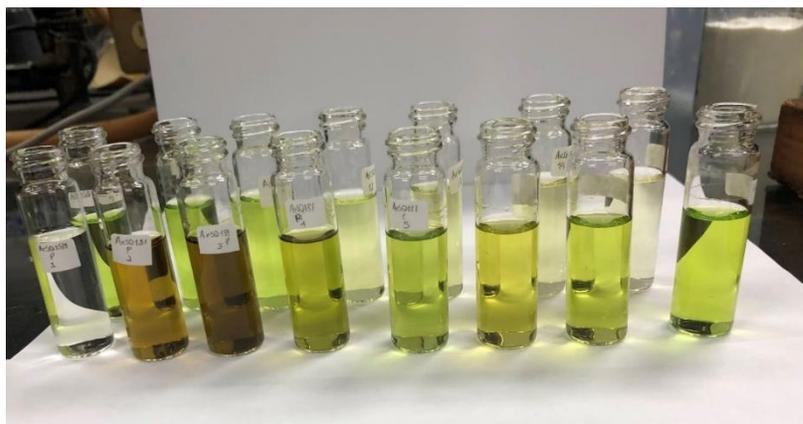


Figura 33. Fracciones polares (FP) del extracto metanólico de AeSQ181 antes de eliminar el disolvente.

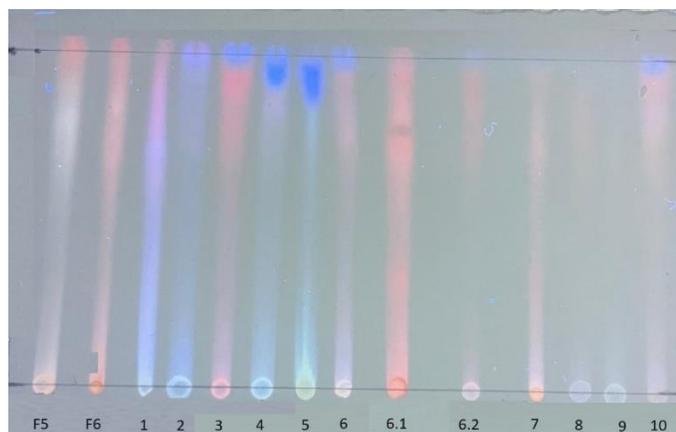


Figura 34. Seguimiento cromatográfico del segundo fraccionamiento de AeSQ181.

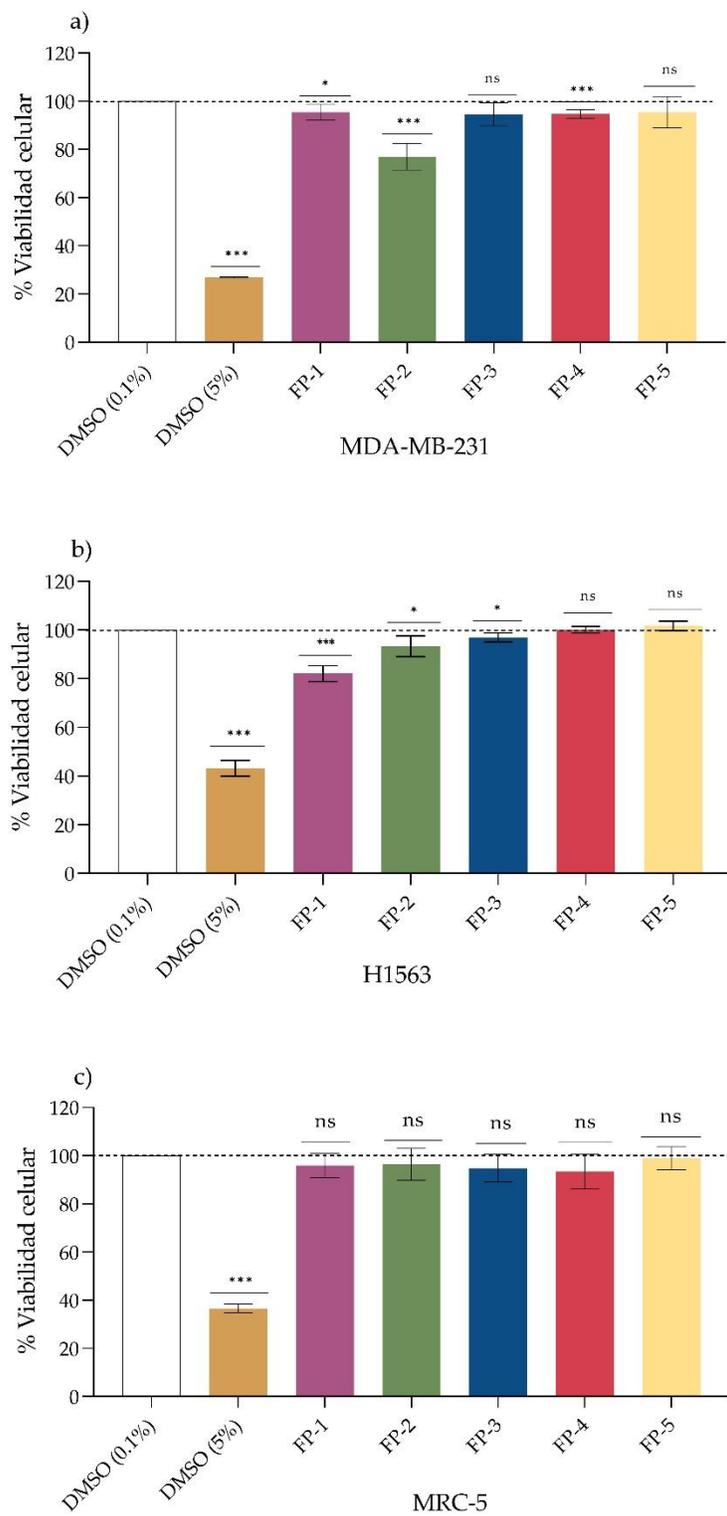


Figura 35. Efecto citotóxico de las fracciones polares sobre las líneas celulares.