



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



Comparación del potencial anticancerígeno de dos extractos de actinomicetos marinos en diferentes líneas celulares de cáncer

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LIC. BIOTECNOLOGÍA EN ACUACULTURA

P R E S E N T A

Alfredo Castellanos Ibarra



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



T E S I S

Comparación del potencial anticancerígeno de dos extractos de actinomicetos marinos en diferentes líneas celulares de cáncer

Presentada por

Alfredo Castellanos Ibarra

y aprobada por el siguiente comité

Dra. Irasema Oroz Parra
Directora de tesis

Dra. Natalie Millán Aguiñaga
Sinodal

Dra. Lus Mercedes López Acuña
Sinodal

RESUMEN

Las actinobacterias son los organismos procariontes más importantes, económica y biotecnológicamente hablando. Son responsables de la producción de la mitad de los compuestos bioactivos que se han descubierto, la mayoría son antibióticos, agentes antitumorales, inmunosupresores y enzimáticos. En diciembre de 2011, previo a la realización de éste trabajo, se llevó acabo el aislamiento de actinobacterias de sedimento marino en Isla Verde, Veracruz y Los Arcos, Puerto Vallarta. Se han reportado bioensayos con estas actinobacterias con un alto potencial anticancerígeno de los extractos crudos contra células de cáncer colorectal (HCT-116). En este trabajo se llevó acabo la extracción de metabolitos de las cepas CNY-484 y CNY-528 pertenecientes al género *Actinoalloteichus* con acetato de etilo, para posteriormente probar su actividad anticancerígena contra seis diferentes líneas celulares de cáncer (colon, hígado, pulmón, cervicouterino y mama) y su actividad citotóxica contra una línea de fibroblastos humanos. Se midió la supervivencia celular por medio de un análisis colorimétrico, normalizando los resultados con el C- (DMSO 1%). El extracto crudo de CNY-484 presentó la mayor reducción de la supervivencia celular en la línea de cáncer cervicouterino HeLa con 91% (**p<0.01), mientras que el extracto crudo CNY-528 presentó una disminución del 93% (**p<0.01), en la línea celular de cáncer de pulmón H1299. Sin embargo, ambos extractos resultaron citotóxicos para la línea celular L929 de fibroblastos humanos presentando una disminución de la supervivencia celular de 75% (*p<0.05) para el extracto CNY-484 y 80% para CNY-528. Con base en los resultados obtenidos, se considera que los extractos de actinobacterias poseen metabolitos con alta capacidad anticancerígena y tienen potencial farmacológico para desarrollar nuevas terapias contra el cáncer.

Palabras clave: Cáncer, actinomicetos marinos, anticancerígeno.

DEDICATORIA

A mis padres, Gabriela y Francisco, por apoyarme en todo momento y por enseñarme a no rendirme ante la adversidad.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer su colaboración a todas las personas que han participado en la realización de este trabajo.

A la Dra. Irasema Oroz, por su asesoramiento, paciencia y ayuda durante todo el proceso.

A la Dra. Natalie Millán, por su contribución en el cultivo bacteriano y extracción.

A la Dra. Lus López por su apoyo durante toda la carrera.

A mis amigos Martin Nuñez, Aldo Cazares, Carolina por estar siempre presentes en momentos difíciles.

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE FIGURAS (Continuación).....	ix
LISTA DE TABLAS.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1 El cáncer y su funcionamiento	3
2.1.1 Apoptosis y su importancia en el desarrollo del cáncer.....	6
2.2 Características generales de las Actinobacterias	8
2.2.1 Actinobacterias reportadas en México	10
2.2.2 Potencial biotecnológico de las actinobacterias.....	10
2.3 Organismos de estudio (CNY-484 & CNY-528).....	12
III- JUSTIFICACIÓN	13
IV- OBJETIVOS.....	14
4.1 Objetivo general	14
V- HIPÓTESIS.....	15
VI- MATERIALES Y MÉTODOS	16

ÍNDICE GENERAL (Continuación)

	Página
6.1 Obtención de las cepas bacterianas.....	16
6.2 Extracción de metabolitos a partir de dos cepas de actinobacterias marinas.....	16
6.3 Cultivo de líneas celulares	17
6.3.1 Preparación del material y equipo.....	17
6.3.2 Cultivo de líneas celulares	17
6.4 Ensayos de citotoxicidad	17
6.5 Análisis de citotoxicidad en células sanas	19
6.6 Análisis estadístico	19
VII- RESULTADOS	20
7.1 Extracción de metabolitos	20
7.2 Cultivo de líneas celulares de cáncer.....	23
VIII- DISCUSIONES.....	30
IX- CONCLUSIONES.....	32
X- REFERENCIAS.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Las seis características del cáncer	3
2	Cascada invasión-metástasis	5
3	Vía extrínseca de la apoptosis	7
4	Vía intrínseca de la apoptosis	7
5	Ciclo de vida de actinobacterias	9
6	Organismos de estudio: Cepa CNY-484 y CNY-528	12
7	Ensayo de citotoxicidad de la línea celular de cáncer de pulmón H1299	18
8	Cultivo de actinobacteria Cepa CNY-528	20
9	Extracción con acetato de etilo de la cepa CNY-528	21
10	Fase acuosa y fase orgánica en embudo de decantación y matraz con fase orgánica.	21
11	Proceso de rotaevaporación de la cepa CNY-528 para obtener el extracto.	22
12	Fotografías del cultivo de células cancerígenas y fibroblastos.	23-24
13	Efecto citotóxico de dos extractos de actinobacterias marinas en las líneas celulares de cáncer de colon Caco-2 y cáncer de hígado Hep G2	25
14	Efecto citotóxico de dos extractos de actinobacterias marinas en las líneas celulares de pulmón H1299 y H1437.	26

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
15	Efecto citotóxico de dos extractos de actinobacterias marinas en las líneas celulares de cervicouterino HeLa y cáncer de mama MCF7.	27
16	Efecto citotóxico de dos extractos de actinobacterias marinas en la línea celular L929 de fibroblastos.	28

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Compuestos antitumorales producidos por actinomicetos marinos	11

I. INTRODUCCIÓN

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, el cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial y fue responsable de 9.6 millones de defunciones en 2018; se identifican cinco tipos de cáncer responsables del mayor número de fallecimientos: pulmonar, hepático, colorrectal, gástrico y de mama.

El cáncer es un término que involucra un grupo de más de cien diferentes enfermedades que surgen cuando hay defectos en la regulación fisiológica que causan una proliferación sin restricciones de células anormales (Sivakumar *et al.*, 2007).

Las terapias convencionales incluyen la cirugía, inmunoterapia, radioterapia y la quimioterapia, que consiste en el tratamiento con distintos tipos de fármacos. La quimioterapia puede tener distintos efectos secundarios ya que la habitual falta de especificidad, debido al desconocimiento de las dianas moleculares afectadas, hace que los compuestos no discriminen entre células neoplásicas y sanas (Sarmiento-Vizcaíno, 2016) por lo cual existe una necesidad urgente de encontrar nuevos agentes terapéuticos que sean más específicos para el tratamiento del cáncer (Adrian & Collin, 2018).

Dentro de la búsqueda de estos nuevos agentes terapéuticos se encuentran los productos naturales, también llamados metabolitos secundarios, los cuales se definen como pequeñas moléculas orgánicas producidas por un organismo, que no son esenciales para su crecimiento, desarrollo y reproducción (Dewick, 2002) y que juegan un rol importante en la adaptación del organismo ante situaciones estresantes como escasez de nutrientes, presencia de depredadores, bajas temperaturas, etc (Bourgaud *et al.*, 2001).

De los principales productores de metabolitos secundarios con actividad biológica en la naturaleza, se encuentran las actinobacterias, entre las que destaca *Streptomyces* como principal género productor (Sarmiento-Vizcaíno, 2014).

Las actinobacterias son bacterias gram-positivas, con alto contenido de guanina y citosina en su ADN, se encuentran ampliamente distribuidas en ecosistemas terrestres y acuáticos,

principalmente en el suelo donde desempeñan un rol importante en la descomposición de materia orgánica (Sharma *et al.*, 2014; Dhanasekaran & Jiang, 2016).

La mayoría de los metabolitos secundarios se han encontrado en actinomicetos terrestres; sin embargo, la tasa de descubrimiento de nuevos metabolitos de actinomicetos terrestres está disminuyendo debido a la sobreexplotación de estos por las industrias farmacéuticas y agroquímicas. Por lo tanto, el descubrimiento de taxones nuevos o raros se ha convertido en un foco importante en la búsqueda de la próxima generación de agentes farmacéuticos (Hug *et al.*, 2018) siendo el sedimento marino una fuente potencial para el aislamiento de actinobacterias productoras de importantes compuestos bioactivos como el Salinosporamide A obtenido a partir de *Salinispora tropica* aislada de sedimentos del Golfo de California, México (Torres-Beltrán, 2009).

Con base en lo anterior, en el presente trabajo se probó la bioactividad anticancerígena de dos extractos crudos (CNY-484 & CNY-528) de actinobacterias marinas frente a seis líneas celulares de cáncer y la bioactividad citotóxica frente a una línea de fibroblastos humanos.

II. ANTECEDENTES

2.1 El cáncer y su funcionamiento

Según el Instituto Nacional del Cáncer, el cáncer es el nombre dado a las enfermedades en las que hay células anormales que se multiplican sin control y pueden invadir los tejidos cercanos.

Hanahan y Weinberg, (2000) propusieron un modelo que define las seis propiedades que adquiere y caracterizan a un tumor maligno: potencial replicativo ilimitado, autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a inhibidores del crecimiento, evasión de la apoptosis, angiogénesis mantenida y capacidad de invadir tejidos y generar metástasis (Fig. 1).



Figura 1. Las seis características del cáncer. Modificada de Hannah & Weinberg, 2000.

Una de las características de las células tumorales es su alta tasa de proliferación. A diferencia de los tejidos normales, se pierde la homeostasis que regula cuidadosamente la entrada al ciclo de división celular y por ende, el número de células y la arquitectura y función del tejido.

Normalmente, las células son estimuladas por señales externas de proliferación (principalmente factores de crecimiento) que activan receptores presentes en la superficie celular. Este evento permite la activación consecutiva de vías de señalización intracelular que regulan la progresión a través del ciclo celular, el crecimiento de la célula, favoreciendo la supervivencia celular (Hanahan & Weinberg, 2011).

La tasa de proliferación aumentada de las células tumorales es favorecida por la evasión de los mecanismos de regulación negativa de la división celular, controlados por los genes supresores de tumores. Estos genes actúan a distintos niveles, limitando el crecimiento tumoral y la proliferación (Sánchez, 2013).

El crecimiento de los tumores está condicionado por la tasa de muerte celular. La disminución del número de células ocurre principalmente por apoptosis, un mecanismo normal que mantiene la homeostasis tisular. La apoptosis es activada por diversos estímulos, los que confluyen en vías moleculares comunes y que culminan con la activación de cisteínas proteasas llamadas caspasas, las que llevan a cabo la degradación celular hasta formar pequeños cuerpos apoptóticos que son fagocitados por otras células (Strasser *et al.*, 2011).

Las células tumorales desarrollan mecanismos que les permiten evadir la apoptosis. Estos son:

- Alteración en el balance de proteínas pro- y anti-apoptóticas.
- Disminución de la actividad de las caspasas
- Falla en la señalización del receptor de muerte

La mayor parte de las muertes asociadas a tumores sólidos se deben a la diseminación a distancia de las células tumorales y el consecuente desarrollo de metástasis. Del tumor primario, solo algunas células adquieren mutaciones que les permite desarrollar el potencial de invadir el tejido que las rodea (invasión) y posteriormente sitios distantes (metástasis). El establecimiento de una metástasis ocurre en una serie de eventos consecutivos denominados cascada invasión-metástasis (Fig. 2). A partir del tumor primario, las células comienzan la invasión local, continuando con la intravasación en vasos sanguíneos o linfáticos y tránsito a través de estas vías, la salida de las células desde estos vasos y entrada al parénquima de tejidos distantes (extravasación), concluyendo con la formación de pequeños nódulos de células cancerosas (micrometástasis) que

crecen hasta desarrollar tumores macroscópicos (colonización) clínicamente detectables (Sánchez, 2013).



Figura 2. Cascada invasión-metástasis. Obtenida de Sánchez, 2013.

La mayor parte de las células pueden pasar por un número limitado de divisiones celulares, lo que se ha denominado límite de Hayflick. Cuando las células alcanzan este punto, pueden entrar en dos estados no-proliferativos: la senescencia y la muerte por apoptosis. En los extremos de los cromosomas hay secuencias múltiples en tándem, denominados telómeros, que se acortan progresivamente en cada división celular hasta un punto que amenaza la estabilidad celular. Solo algunas células del organismo (como las células germinales reproductivas) pueden sobrepasar este límite y dividirse de manera indefinida, al igual que las células tumorales en un proceso denominado inmortalización. En estas células se expresa la proteína telomerasa, una ADN polimerasa que adiciona segmentos repetitivos a los extremos del ADN telomérico, evitando su acortamiento. Esta proteína está ausente en la mayoría de las células del organismo, pero se expresa de manera funcional en cerca de un 90% de las células tumorales (Sánchez, 2013).

Durante el desarrollo de tumores, la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos pre-existentes o angiogénesis es necesaria para suplir de nutrientes y oxígeno a los tejidos en formación. En el cáncer, la estimulación de la angiogénesis favorece el crecimiento tumoral y la metástasis (Sánchez, 2013).

La angiogénesis está regulada por diversas vías en las que participan moléculas anti- y pro-angiogénicas que en tejidos normales se encuentran en balance. La pérdida de este balance en el tejido tumoral favorece el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de células precursoras endoteliales (Sun, 2012). El crecimiento tumoral genera hipoxia local que funciona como estímulo para la producción de citoquinas angiogénicas como VEGF, factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) entre otras (Sánchez, 2013).

2.1.1 Apoptosis y su importancia en el desarrollo del cáncer

La apoptosis es una muerte celular programada, dependiente de energía, altamente regulada, en la cual la célula activa una cascada de señalización que conduce a la muerte celular sin desencadenar una respuesta inflamatoria (Chen & Lai, 2009), el organismo mantiene la homeostasis celular eliminando células dañadas por medio de este proceso (Kroemer *et al.*, 2009).

Este proceso de muerte tiene dos vías ya caracterizadas que dependen de una cascada proteolítica irreversible y amplificadora mediada por caspasas (Alberts *et al.*, 2008).

La vía extrínseca se activa mediante ligandos extracelulares que se unen a receptores de muerte de la superficie celular, a diferencia de la vía intrínseca que se activa por señales intracelulares que se generan cuando las células experimentan estímulos de estrés (Romero-Espejo, 2017).

En la vía extrínseca, los receptores de muerte celular reclutan las procaspasas -8 y -10 mediante proteínas adaptadoras, formando el DISC; mientras que en la vía intrínseca el citocromo *c*, que se libera del espacio inter-membrana de las mitocondrias, activa a Afap1, que se ensambla formando un apoptosoma, estructura que recluta y activa la procaspasa-9 (Fig. 3) (Romero-Espejo, 2017).

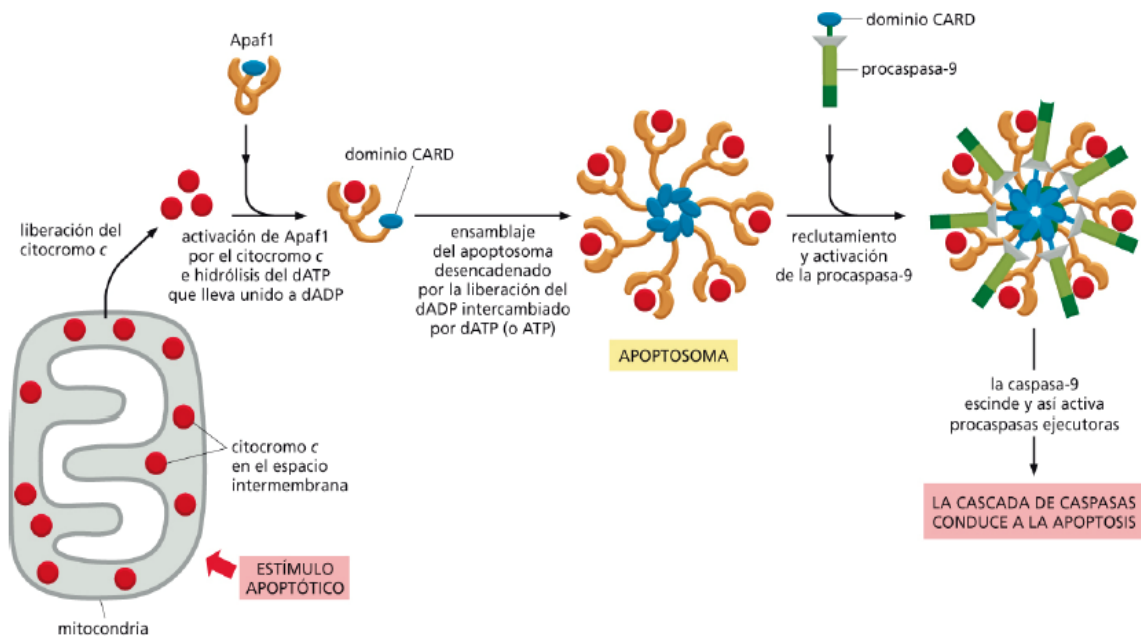


Figura 3. Vía intrínseca de la apoptosis (Modificada de Alberts *et al.*, 2008).

Los receptores de muerte de la superficie celular activan la vía extrínseca de la apoptosis (Alberts *et al.*, 2008), que se produce tras la unión de ligandos extracelulares (mensajero de muerte) que se unen a receptores de muerte de la superficie celular (Romero-Espejo, 2017).

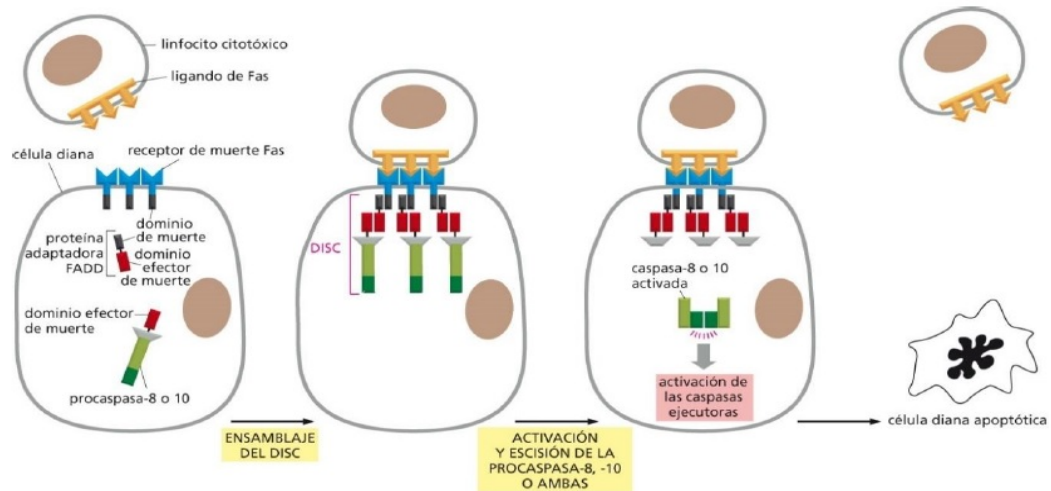


Figura 4. Vía extrínseca de la apoptosis (Modificada de Alberts *et al.*, 2008).

Los receptores de muerte poseen en su región intracelular el denominado dominio de muerte, necesario para la activación de la apoptosis (Alberts *et al.*, 2008). Como se indica en la figura 4, FasL (Ligando), induce apoptosis tras la unión a su receptor Fas; que tras su aleación y

oligomerización se une a la proteína adaptadora FADD, a través de su dominio de muerte. FADD a su vez, a través de su dominio efector de muerte, se une a la caspasa-8; formando el complejo de señalización inductor de muerte (DISC), que finalmente activará una serie de caspasas efectoras que inducirán la apoptosis (Naval *et al.*, 2004).

Un compuesto anticancerígeno ideal debe inhibir, detener o revertir la progresión del cáncer a través de su citotoxicidad o por sus propiedades para inducir apoptosis (Kumar *et al.*, 2012).

La eliminación exitosa de las células cancerosas del cuerpo depende de la activación de la muerte celular por apoptosis (Oroz-Parra *et al.*, 2016).

2.2 Características generales de las Actinobacterias

Las actinobacterias son un grupo de bacterias Gram-positivas, en su mayoría aerobias, con un alto contenido de guanina y citosina en su ADN, se encuentran ampliamente distribuidas en ecosistemas terrestres y acuáticos, principalmente en el suelo, donde desempeñan un rol esencial en el reciclaje de biomateriales refractarios al descomponer complejas mezclas de polímeros de animales, plantas y hongos muertos (Sharma, 2014; Dhanasekaran & Jiang, 2016; Evangelista-Martínez *et al.*, 2017).

Como podemos observar en la Figura 5, su crecimiento comienza con la germinación de una espora sobre un sustrato sólido generando hifas que se ramifican a intervalos más o menos regulares y que se extiende radialmente. El micelio resultante, o micelio vegetativo, consiste en hifas que o bien penetran en el sustrato o bien crecen sobre su superficie. Cuando crecen en un sustrato sólido como el agar, la red ramificada de hifas que desarrollan crece tanto sobre la superficie del sustrato como en su interior, formando un micelio de sustrato. Muchas Actinobacterias tienen un micelio aéreo que se extiende por encima del sustrato y forma esporas asexuales, de pared fina, llamadas conidios o conidiosporas, en las puntas de los filamentos. La formación de esporas se desarrolla en respuesta a la privación de nutrientes (Fernández, 2005).

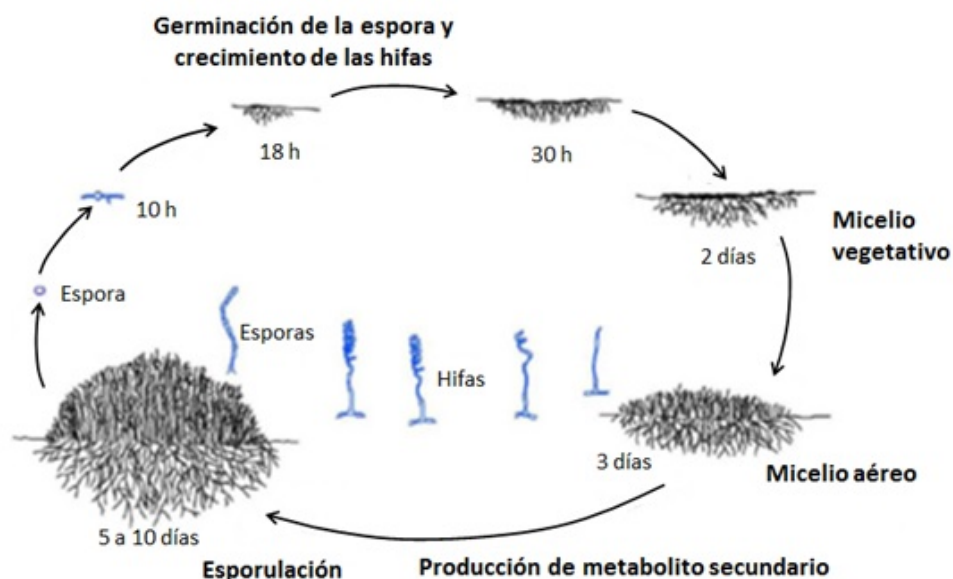


Figura 5. Ciclo de vida de actinobacterias. Obtenida de <https://agrologia.wordpress.com/2015/10/26/actinomicetos/>

Posteriormente, se desarrollan ramificaciones aéreas del micelio vegetativo que dan lugar al micelio aéreo. Estas hifas aéreas sufren un proceso de diferenciación que incluye por un lado diferentes cambios morfológicos según la especie y por otro la formación de las esporas. El ciclo de desarrollo se completa con la germinación de las esporas y la expansión de la colonia (Pelaz-Guerra, 2014).

El género *Actinoalloteichus* (Tamura *et al.*, 2000), al cual pertenecen nuestros organismos de estudio, se compone de cinco especies: *Actinoalloteichus hymeniacidonis*, *Actinoalloteichus hoggarensis*, *Actinoalloteichus nanshanensis* y *Actinoalloteichus spitiensis* (Schaffert *et al.*, 2016). Los miembros de este género forman sustrato y micelio aéreo con agregación de cadenas de esporas rectas. Sus paredes celulares contienen ácido diaminopimérico y son ricas en glutamato, glucosamina y alanina. Los principales ácidos grasos celulares son iso-C_{15:0}, anteiso-C_{15:0}, iso-C_{16:0} y C_{17:0}. La menaquinona predominante es MK-9(H4), con presencia de MK-8(H4) y MK-9(H2) en pequeñas cantidades. El contenido de guanina y citosina en su ADN es de 72-73% (Nouiou *et al.*, 2017).

2.2.1 Actinobacterias reportadas en México

Se colectaron dos cepas AMS CNY-331 y AMS165 CNY-330 en Loreto, B.C. a una profundidad de 20 a 300m. Ambas pertenecientes a la especie *Salinispora pacifica* (Aviña-Melgoza, 2012).

En 2012, Becerril-Espinosa et al., realizaron un estudio de bioactividad de actinobacterias cultivables a partir de sedimento marino de la Bahía de Todos Santos, México, identificándolas mediante las secuencias del gen 16S ARNr. En total, 26 cepas fueron cultivadas e identificadas, representando tres familias del orden Actinomycetales, pertenecientes a los géneros *Streptomyces* (77%), *Micromonospora* (20%) y *Nocardia* (3%).

Castro-Ochoa, (2014) reportó 28 cepas de aisladas de sedimentos marinos colectados en Puerto Vallarta y Veracruz. Dentro de estas cepas se encuentran nuestros organismos de estudio CNY-484 y CNY-528. Las 28 cepas abarcaron seis géneros diferentes, el más representativo fue el género *Salinispora*, seguido del género *Actinoalloteichus* y *Nocardiopsis* y, finalmente, los géneros *Micromonospora*, *Streptomyces* y *Saccharomonospora*. El género *Salinispora* fue el primero en ser reportado como marino obligado por Mincer et al. (2002). Actualmente no se ha registrado ninguna especie de este género en el medio terrestre, por lo que se considera un género marino autóctono (Castro-Ochoa, 2014).

En 2015, Cruz-López aisló 46 cepas a partir de 17 muestras de sedimento marino de Loreto, B.C., clasificando cuatro cepas solo hasta orden (*Actinomycetales bacterium*) (9%), cinco no se lograron identificar (11%), las restantes pertenecieron a los géneros *Streptomyces* (39%) *Salinispora* (24%), *Actinomadura* (7%), *Nomomuraea* (6%), *Micromonospora* (4%).

2.2.2 Potencial biotecnológico de las actinobacterias

Las actinobacterias son de considerable interés en biotecnología debido a la capacidad de producir metabolitos bioactivos con actividad antimicrobiana, antitumoral, inmunoestimulante, antiparasitaria, entre otras (León et al., 2016).

La cantidad de metabolitos secundarios bioactivos producidos por microorganismos es de 23,000, de los cuales 10,000 son producidos por actinomicetos. Dentro de los actinomicetos, 7,600 compuestos son producidos por la especie *Streptomyces* (Subramani & Aalbersberg, 2012).

Las actinobacterias producen una variedad de metabolitos secundarios de un gran interés comercial y farmacológico. Con el descubrimiento de la actinomicina, un gran número de antibióticos se han derivado de actinobacterias, especialmente del género *Streptomyces* (Dhanasekaran & Jiang, 2016).

Es necesario el descubrimiento de nuevos fármacos para contrarrestar y revertir la propagación de patógenos resistentes a los antibióticos y para combatir enfermedades que amenazan la vida como el cáncer (Fernandez-Perez *et al.*, 2015)

Los actinomicetos son uno de los grupos productores de metabolitos secundarios más eficientes y tienen suma importancia desde el punto de vista industrial. Destacan los géneros *Streptomyces*, *Saccharopolyspora*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora* y *Actinoplanes* como principales productores de moléculas de importancia comercial (Solanki *et al.*, 2008).

Olano, (2009) realizó un estudio detallado de los compuestos antitumorales producidos por actinomicetos marinos, en la tabla 1 se listan algunos de los más importantes.

Tabla 1. Compuestos antitumorales producidos por actinomicetos marinos. (Modificada de Olano, 2009)

Compuesto	Tipo de estructura	Organismo	Referencia
Actinofuranones	Policétido	<i>Streptomyces sp.</i>	Cho <i>et al.</i> , 2006
Altemicidina	Isoprenoides	<i>Streptomyces siوياensis</i>	Takahashi <i>et al.</i> , 1989
Ammosamidas	Pyrroloiminoquinona	<i>Streptomyces sp.</i>	Hughes <i>et al.</i> , 2009
Arciriaflavina A	Indolocarbazol	<i>Actinomycete sp.</i>	Liu <i>et al.</i> , 2007
Arenamidas	Péptido no ribosomal	<i>Salinispora arenicola</i>	Asolkar <i>et al.</i> , 2009
Marinomicinas	Policétido	<i>Marinispora sp.</i>	Kwon <i>et al.</i> , 2006
Marmicinas	Policetido	<i>Streptomyces sp.</i>	Martin <i>et al.</i> , 2007
Parimicina	Policétido	<i>Streptomyces sp.</i>	Maskey <i>et al.</i> , 2002
Salinisporamidas	Policétido	<i>Salinispora tropica</i>	Buchanan <i>et al.</i> , 2005
Estaurosporinas	Indolocarbazole	<i>Streptomyces sp.</i> <i>Micromonospora sp.</i>	Itoh <i>et al.</i> , 2003 & Hernández <i>et al.</i> , 2000

2.3 Organismos de estudio (CNY-484 & CNY-528)

La cepa CNY-484 fue colectada el 19 diciembre de 2011 en Isla Verde, Veracruz (19°12' 17''N, 96°4'25''W) por medio de buceo libre y la cepa CNY-528 fue colectada el 14 de diciembre de 2011 en Los Arcos, Bahía de Banderas, Jalisco (20°30'47.7"N, 105°19'42.06"W). Fueron aisladas por el Centro de Biotecnología Marina y Biomedicina del Instituto de Oceanografía, SCRIPPS utilizando el método de estampado para su aislamiento y el medio A1 (medio de agar (14 gr), levadura (4 gr), peptona (2gr) almidón (10gr), 22 gr de sal, 1 litro de cultivo).

Ambas cepas pertenecen al género *Actinoalloteichus* el cual se compone de bacterias Gram-positivas, aeróbicas, con hifas vegetativas ramificadas (Schaffert *et al.*, 2016) (Figura 6).

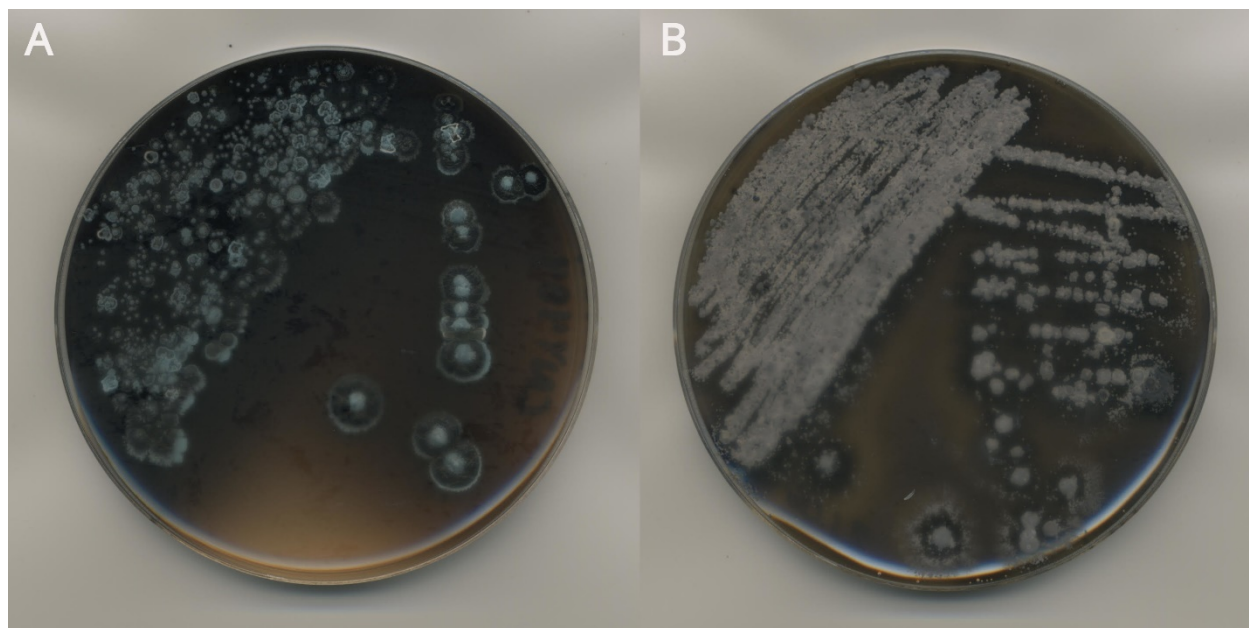


Figura 6. Organismos de estudio: A) CNY-484, B) CNY-528. Género *Actinoalloteichus*.

III- JUSTIFICACIÓN

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, se prevé que el número de casos aumente en un 70%, aproximadamente, en los próximos 20 años. Las terapias convencionales incluyen la cirugía, inmunoterapia, radioterapia y la quimioterapia, que consiste en el tratamiento con distintos tipos de fármacos. Este tipo de terapias pueden tener efectos secundarios tóxicos ya que la falta de especificidad, debido al desconocimiento de las dianas moleculares afectadas, hace que los compuestos no discriminen entre células neoplásicas y sanas.

Las actinobacterias son un grupo de bacterias Gram-positivas productoras de diversos compuestos bioactivos utilizados actualmente como antibióticos y enzimas, sin embargo, los estudios relacionados con el descubrimiento de metabolitos provenientes de actinomicetos marinos con potencial anticancerígeno son muy escasos.

Por este motivo es de suma importancia evaluar el potencial anticancerígeno de dos cepas de actinomicetos aislados de sedimento marino de Puerto Vallarta y Veracruz, con la finalidad de encontrar nuevos metabolitos con potencial farmacológico que puedan desarrollar terapias alternativas para combatir el cáncer.

IV- OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar el efecto citotóxico de dos extractos de actinobacterias aisladas de sedimentos marinos de México, en diferentes las líneas celulares de cáncer humano: colon (Caco-2), hígado (HepG2), mama (MCF7), pulmón (H1299 y H1437) y cervicouterino (HeLa).

4.2 Objetivos particulares

- Probar bioactividad anticancerígena de los extractos crudos CNY-484 y CNY-528 con diferentes líneas celulares de cáncer.
- Determinar citotoxicidad de los extractos crudos con células de fibroblastos humanos (L929).

V- HIPÓTESIS

En los extractos de las cepas CNY-484 y CNY-528 de actinobacterias marinas existe por lo menos un componente con potencial antitumoral, que presente un efecto citotóxico en las líneas de cáncer de colon (Caco-2), hígado (HepG2), mama (MCF7), pulmón (H1299 y H1437) y cervicouterino (HeLa).

VI- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención de las cepas bacterianas

La cepa CNY-484 fue aislada de sedimento marino colectado el 19 de diciembre de 2011 en Isla Verde, Veracruz. (19° 12' 17'' N, 96° 4' 25'' W) por medio de buceo libre, a una profundidad de 15 metros.

La cepa CNY-528 fue aislada de sedimento marino colectado el 14 de diciembre de 2011 en Los Arcos, Puerto Vallarta (20° 32' 68'' N, 105° 17' 38'' W) por medio de buceo libre, a profundidades de 1 a 7 metros.

6.2 Extracción de metabolitos a partir de dos cepas de actinobacterias marinas.

Se empleó la técnica de extracción con acetato de etilo. Las cepas se precultivaron en 24 ml de medio líquido (agar, peptona, almidón y levadura al 75% de agua de mar) y se incubaron a temperatura ambiente con agitación continua a 160 rpm. Al séptimo día se transfirieron alícuotas (5% v/v) a matraces Erlenmeyer con 100 ml de medio líquido, y se incubaron nuevamente a temperatura ambiente con las mismas condiciones durante siete días.

Para la extracción con acetato de etilo, se empleó la técnica líquido-líquido que consistió en mezclar el medio de cultivo de la cepa bacteriana con 100 ml de acetato de etilo. Se agitó durante dos horas y se vertió en un embudo de separación, se dejó en reposo 20 minutos para la separación de la fase orgánica de la fase acuosa. La fase orgánica se recuperó en un matraz, filtrando a través de una membrana de 45 µm. Se concentró por rotaevaporación al vacío con una presión de 20 Hg a 25°C, y se registró el peso neto del extracto crudo. Se realizó la extracción química con solo el medio de cultivo para obtener un blanco de medio y utilizarlo en ensayos posteriores.

6.3 Cultivo de líneas celulares

6.3.1 Preparación del material y equipo

Todo el material utilizado para trabajar con líneas celulares se esterilizó y el equipo a utilizar se limpió, para tenerlo bajo condiciones extremas de asepsia. Los medios de cultivo utilizados fueron RPMI-1640 1x con L-glutamina (Corning), suplementado con antibiótico-antimicótico y suero fetal bovino (SFB) (Corning), y EMEM, 10% SFB, 2mM L-Glutamina (Oroz-Parra, 2016).

6.3.2 Cultivo de líneas celulares

Se cultivaron diferentes líneas celulares de cáncer. En el interior de la campana de flujo laminar activada, se agregaron a un tubo de cultivo de 15 ml, 9 ml de medio de cultivo suplementado y 1 ml de células de la línea celular deseada, que se descongeló previamente a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó el cultivo a 130 rad durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 1 ml de medio suplementado y se agregó a una caja de cultivo celular con 9 ml de medio de cultivo suplementado. Se colocó el cultivo en una incubadora a 37° C con una atmosfera parcial de CO₂ al 5%. Se observaron las células diariamente en un microscopio invertido EVOS Fluid Cell Imaging Station (Life technologies), con un objetivo de 10x y 20x. Un día después del cultivo, se realizó un lavado con 2 ml de PBS 1x, posteriormente se agregaron 10 ml de medio de cultivo suplementado. El medio de cultivo, se cambió de acuerdo a la confluencia presente de las células (2 a 3 veces por semana), una vez alcanzado el 80% de confluencia de la monocapa celular se procedió a separar las células de la caja. Cada línea celular se trabajó por separado (Oroz-Parra, 2016).

6.4 Ensayos de citotoxicidad

Para determinar la citotoxicidad de los extractos de actinobacterias, se realizaron cultivos con las líneas celulares de diferentes tipos de cáncer. El efecto antitumoral se midió por medio de un análisis colorimétrico, utilizando el reactivo CellTiter 96ÒAqueous One Solution Cell Proliferation Assay MTS (Promega, Madison, WI, EUA).

La reacción se basa en la conversión de la sal tetrazolium a formazan, un producto de color soluble, por acción de enzimas deshidrogenasas presentes en las células metabólicamente activas. La cantidad de formazán es directamente proporcional al número de células viables. El ensayo consistió en colocar una placa de cultivo de 96 pozos, se adicionaron 2.5×10^4 células ml^{-1} y se incubaron durante 24 horas a 37°C con 5% de CO_2 . Una vez concluida la incubación, se agregaron los extractos de actinobacterias en distintas concentraciones, como control positivo se utilizó etoposide (50 μg), para el control negativo se utilizó DMSO al 1%. Se incubó nuevamente durante 24 horas a 37°C con 5% de CO_2 . Una vez concurridas las 24 horas, se agregaron 20 μl del reactivo CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay MTS (Promega, Madison, WI, EUA) por pozo y se incubó de 1-4 horas bajo las mismas condiciones de cultivo (Fig. 7). Por último, se tomó lectura de la absorbancia a 490 nm en un lector de placas. Cada ensayo se realizó por triplicado.

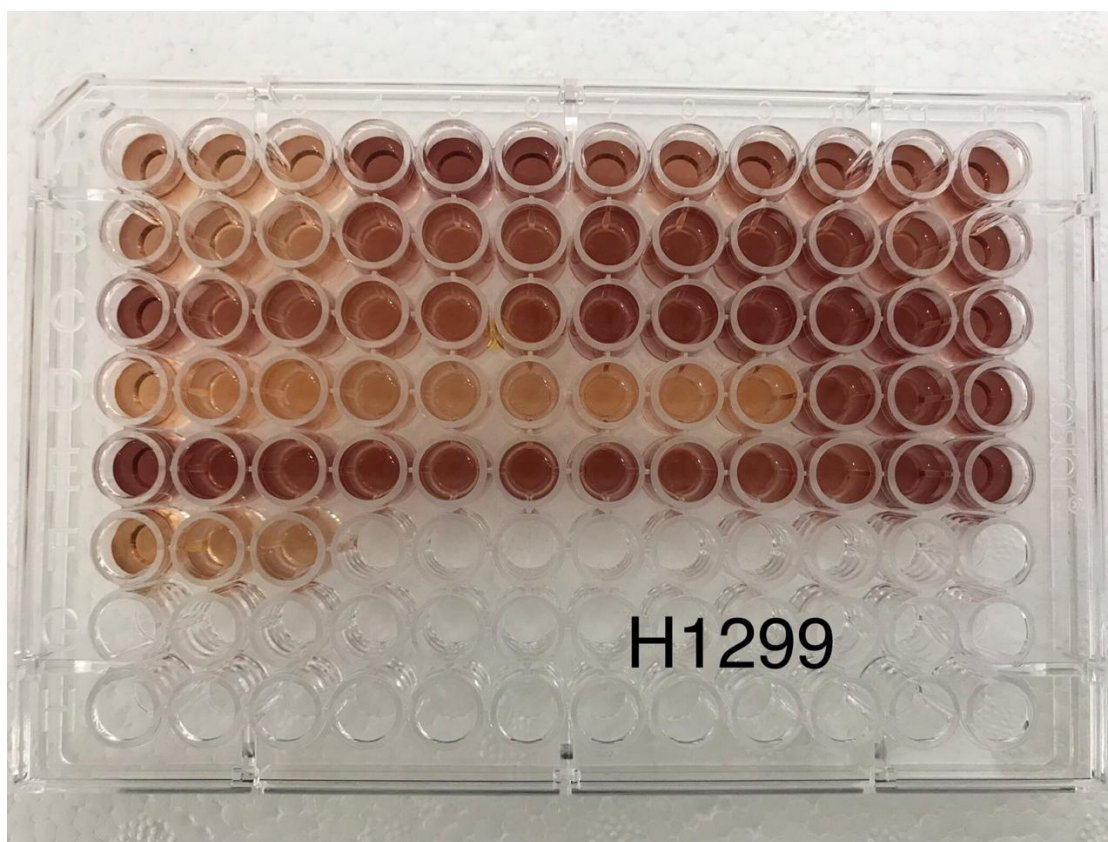


Figura 7. Ensayo de citotoxicidad de la línea celular de cáncer de pulmón H1299.

6.5 Análisis de citotoxicidad en células sanas

Se realizó un ensayo de citotoxicidad en células sanas (fibroblastos), con el fin de demostrar que los extractos crudos no son tóxicos para las células sanas y los metabolitos de las actinobacterias tienen potencial para generar fármacos específicos para células cancerosas. Los ensayos se realizaron con el procedimiento indicado en el apartado 6.4.

6.6 Análisis estadístico

Se utilizó la prueba estadística *t* Student para comparar las diferencias significativas con un intervalo de confianza del 95% entre el control negativo (DMSO al 1%) y los tratamientos utilizados en cada línea celular, utilizando el software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Los datos obtenidos están expresados como promedio \pm desviación estándar, valores de $p < 0.05$ fueron considerados con diferencias significativas. Cada estudio se realizó por duplicado.

VII- RESULTADOS

7.1 Extracción de metabolitos

Se logró realizar la extracción de las cepas CNY-484 y CNY-528, comenzando con el cultivo a 100mL (Fig. 8).

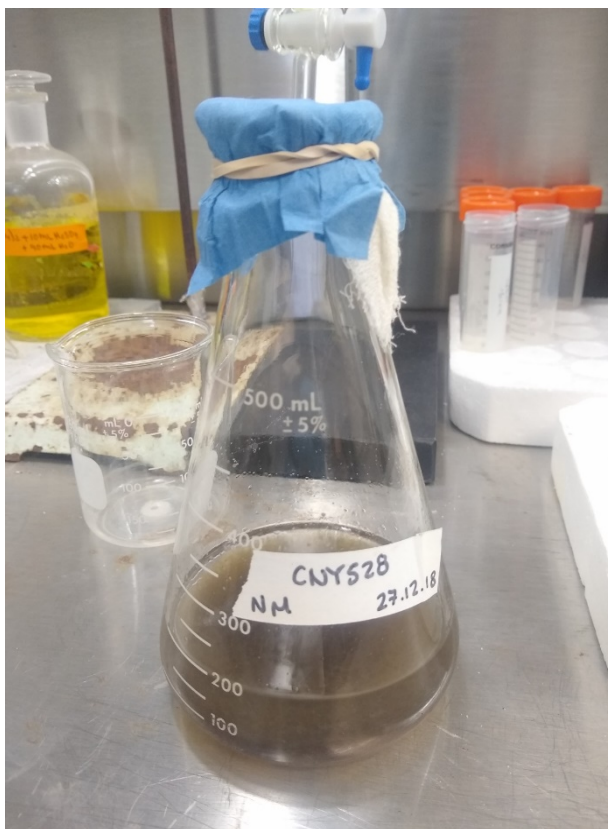


Figura 8. Cultivo de actinobacteria Cepa CNY-528, medio A1.

Posteriormente se añadieron 100mL del reactivo de acetato de etilo (Fig. 9).



Figura 9. Extracción con acetato de etilo de la cepa CNY-528.

Se realizó la separación de la fase acuosa y la fase orgánica en un embudo de separación, desechando la fase acuosa (Fig. 10), se vertió la fase orgánica en un matraz para su posterior rotaevaporación (Fig. 11).

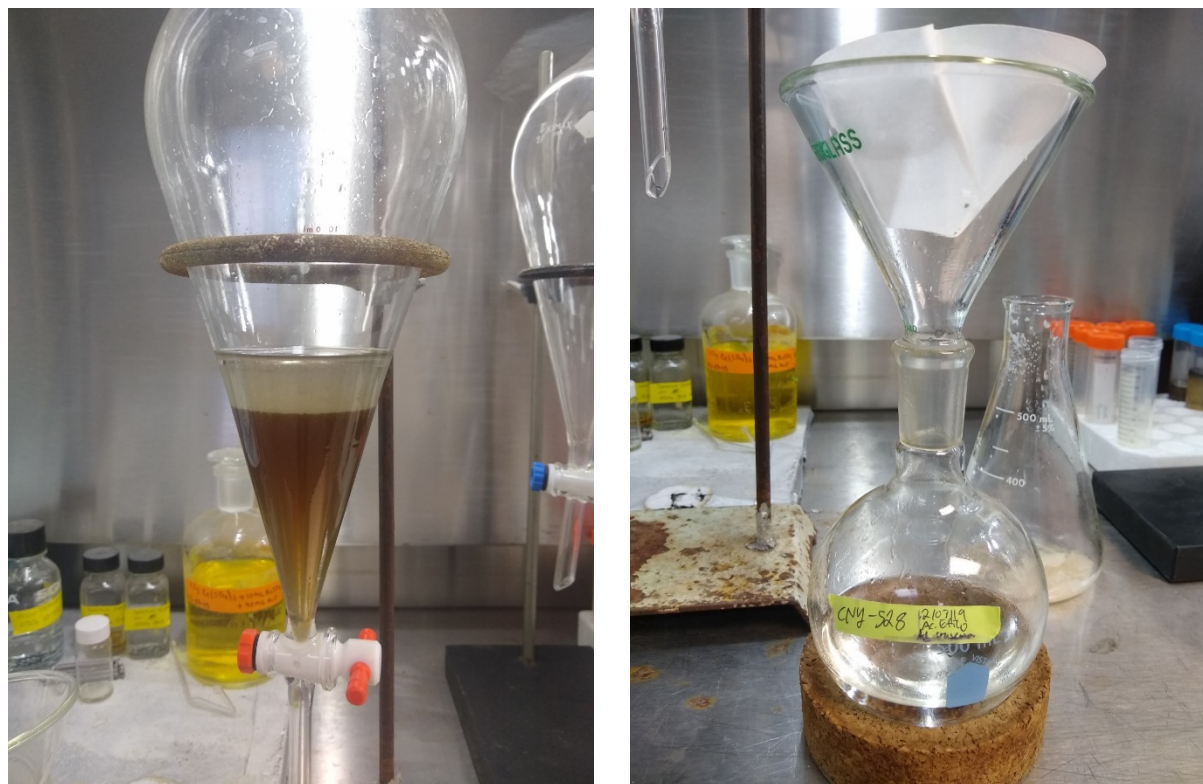


Figura 10. Fase acuosa y fase orgánica en embudo de decantación y matraz con fase orgánica.

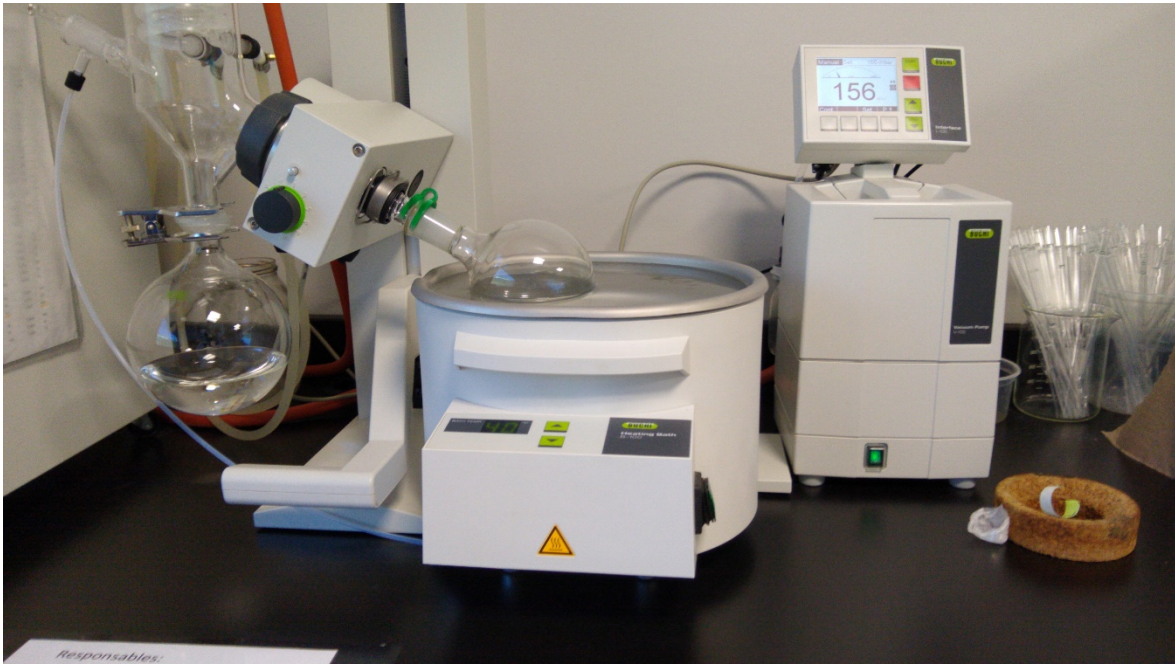
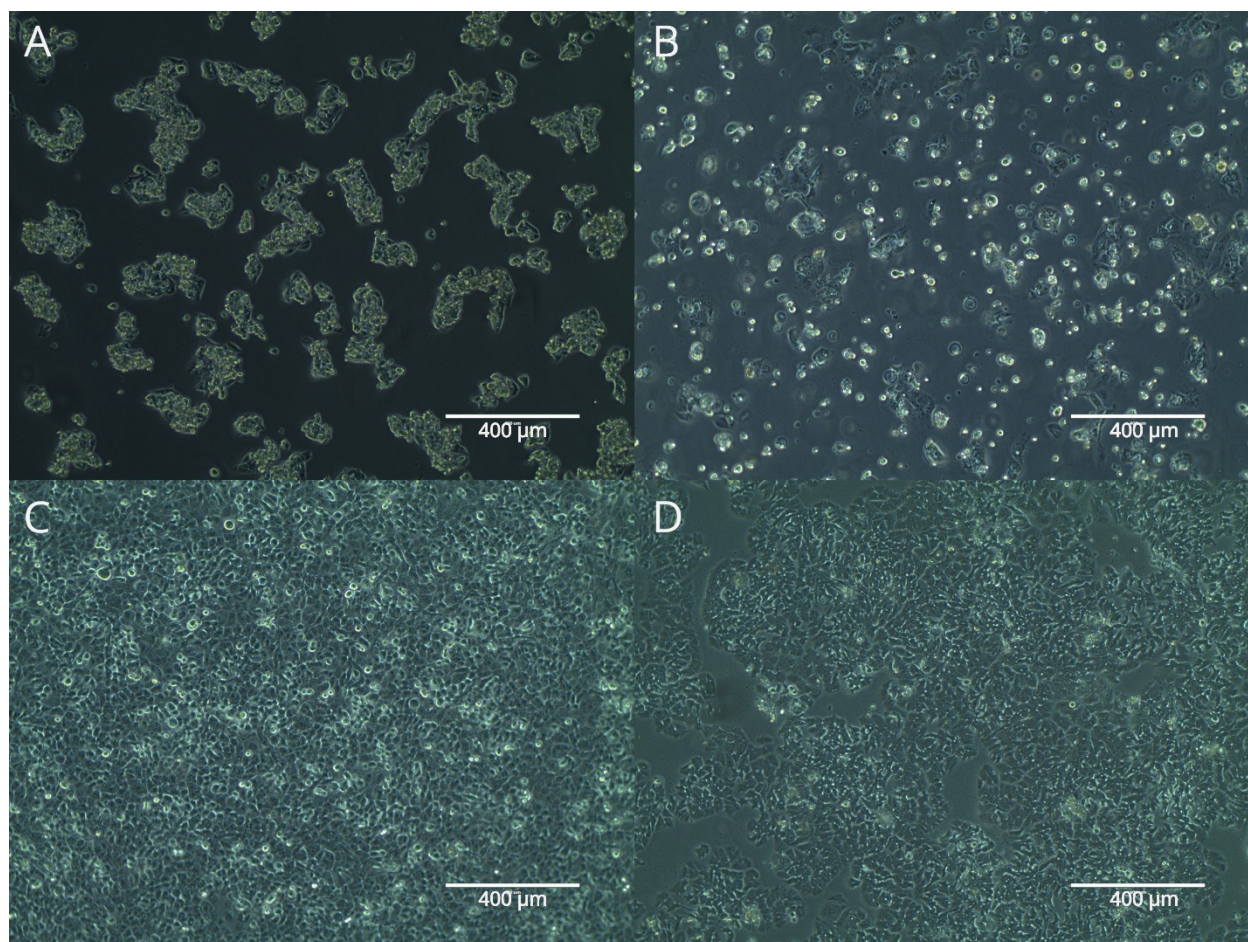


Figura 11. Proceso de rotaevaporación de la cepa CNY-528 para obtener el extracto.

7.2 Cultivo de líneas celulares de cáncer

El cultivo de las líneas celulares se realizó de acuerdo a la descripción del apartado 6.3.2 Se cultivaron una línea celular de cáncer de hígado; HepG2 (carcinoma), una línea celular de cáncer de colon; CaCo2 (adenocarcinoma), dos líneas de cáncer de pulmón; H1299 (carcinoma, NSCLC), H1437 (adenocarcinoma, NSCLC), una línea celular de cáncer cervicouterino; HeLa (adenocarcinoma), una línea celular de cáncer de mama; MCF7 (adenocarcinoma) y una línea celular de fibroblastos; L929. Los cultivos se mantuvieron hasta lograr la confluencia necesaria para realizar los ensayos citotóxicos, así como para criopreservar. En la Figura 11, se muestran las fotografías de las siete líneas celulares.



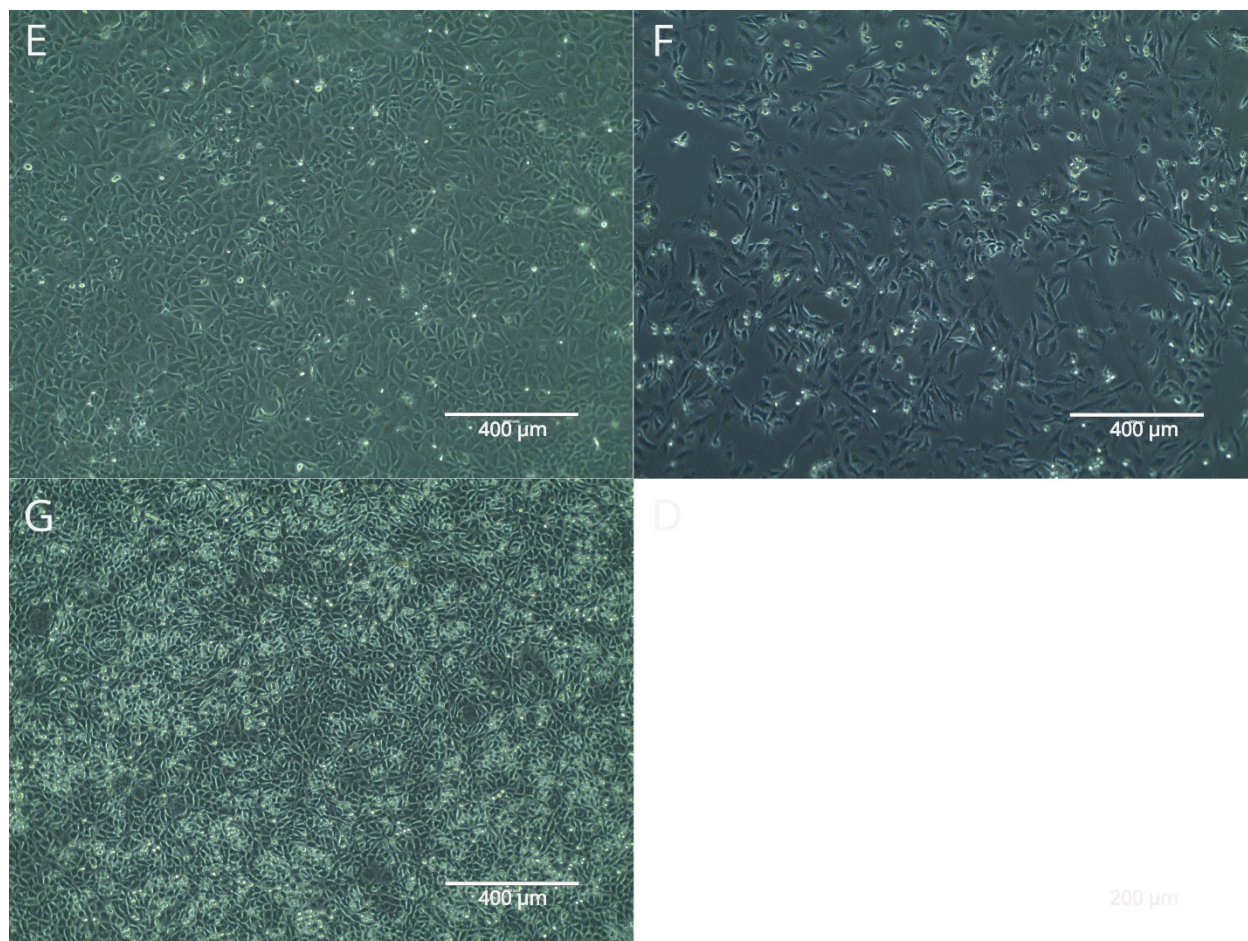


Figura 12. Fotografías del cultivo de células cancerígenas y fibroblastos. **A)** línea celular HepG2 (hígado) **B)** línea celular CaCo2 (colon) **C)** línea celular H1299 (pulmón) **D)** línea celular H1437 (pulmón) **E)** línea celular MCF7 (mama) **F)** línea celular HeLa (cervicouterino) **G)** línea celular L929 (fibroblastos). Todas las fotografías se tomaron en un microscopio invertido (EVOS) con un objetivo de 10x.

7.3 Ensayos de citotoxicidad en líneas celulares de cáncer y fibroblastos con los extractos CNY-484 y CNY-528.

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron como se indica en el apartado 4. El resultado muestra, que ambos extractos disminuyen de manera significativa la supervivencia celular en las líneas celulares Caco-2, HepG2, H1299, H1437, MCF7 y HeLa como se puede observar en las figuras 13, 14 y 15.

Línea celular Caco-2 (Cáncer de colon)

La primera prueba de actividad biológica se llevó a cabo contra la línea celular cancerígena Caco-2 (colon); el extracto CNY-484 redujo en un $65 \pm 18\%$ el porcentaje de supervivencia celular, mientras que el CNY-528 lo hizo en un $67 \pm 5\%$, al igual que nuestro control positivo, etoposide ($67 \pm 4\%$) (Fig. 13).

Línea celular Hep G2 (Cáncer de hígado)

Para la línea celular de cáncer de hígado (Hep G2) el extracto CNY-484 presentó una reducción del $72 \pm 9\%$ de la supervivencia celular; el extracto CNY-528 redujo en un $79 \pm 3\%$ la supervivencia celular, ambos resultados muy por encima del porcentaje de reducción de la supervivencia que presentó el control positivo el cual fue de $57 \pm 6\%$ (Fig. 13).

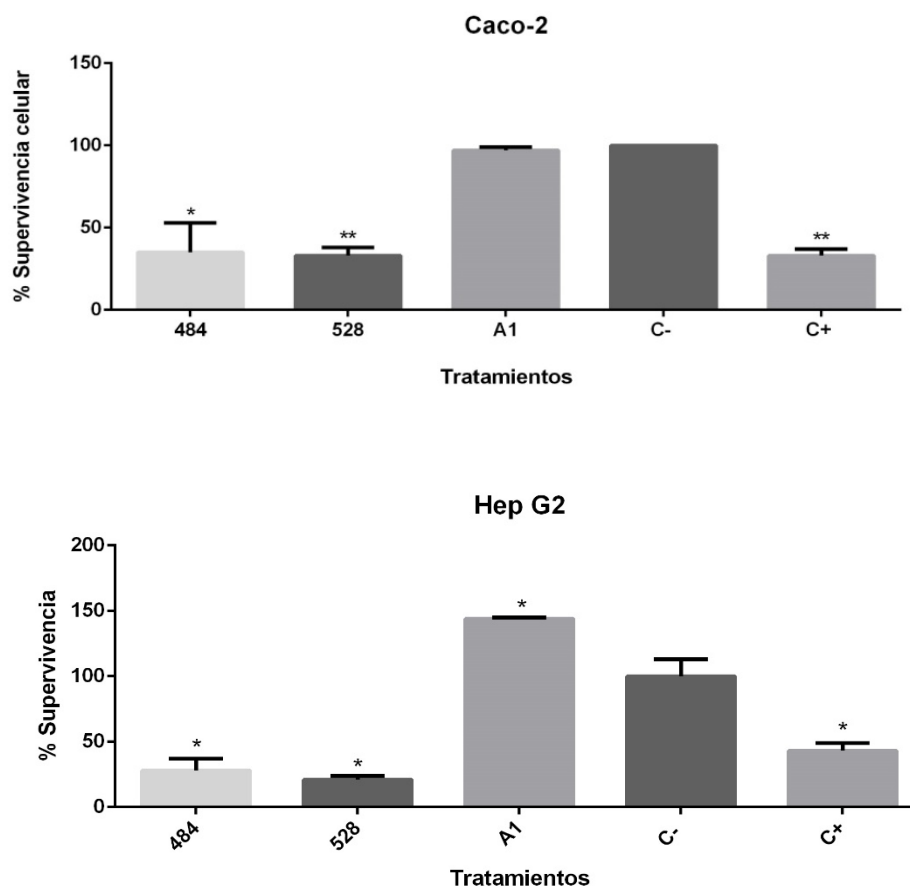


Figura 13. Efecto citotóxico de CNY-484 y CNY-528 en Caco-2 (cáncer de colon) y Hep G2 (cáncer de hígado). Se agregaron $48.5 \mu\text{g}$, $51 \mu\text{g}$ y $43 \mu\text{g}$ de CNY-484, CNY-528 y A1, respectivamente. Después de 24 hrs se agrega el reactivo MTS y se mide la absorbancia a 490 nm . Los resultados fueron normalizados con el C- (DMSO 1%), Como control positivo (C+) se utilizó etoposide ($50 \mu\text{g}$). t de Student $*p < 0.05$ y $**p < 0.01$.

Línea celular H1299 (Cáncer de pulmón)

Como se puede observar en la Figura 14, el extracto CNY-484 disminuyó en un $86 \pm 0\%$ la supervivencia celular, siendo superado por el extracto CNY-528 el cual presentó una disminución del $93 \pm 7\%$ contra esta línea celular. Ambos extractos presentaron valores de disminución de la supervivencia celular muy por encima que el etoposide (nuestro control positivo) el cual disminuyó únicamente el $61 \pm 3\%$ de supervivencia celular.

Línea celular H1437 (Cáncer de pulmón)

El extracto CNY-484, disminuyó en un $84 \pm 7\%$ la supervivencia celular; el extracto CNY-528 presentó una disminución del $85 \pm 1\%$ de la supervivencia celular, ambos extractos presentaron valores de reducción de la supervivencia celular mayores al etoposide, el cual disminuyó solo el $20 \pm 3\%$ de la supervivencia celular. (Fig. 14)

El medio A1, presentó una supervivencia celular del $123 \pm 2\%$ por lo que puede haber compuestos en el medio que estimulen el crecimiento celular.

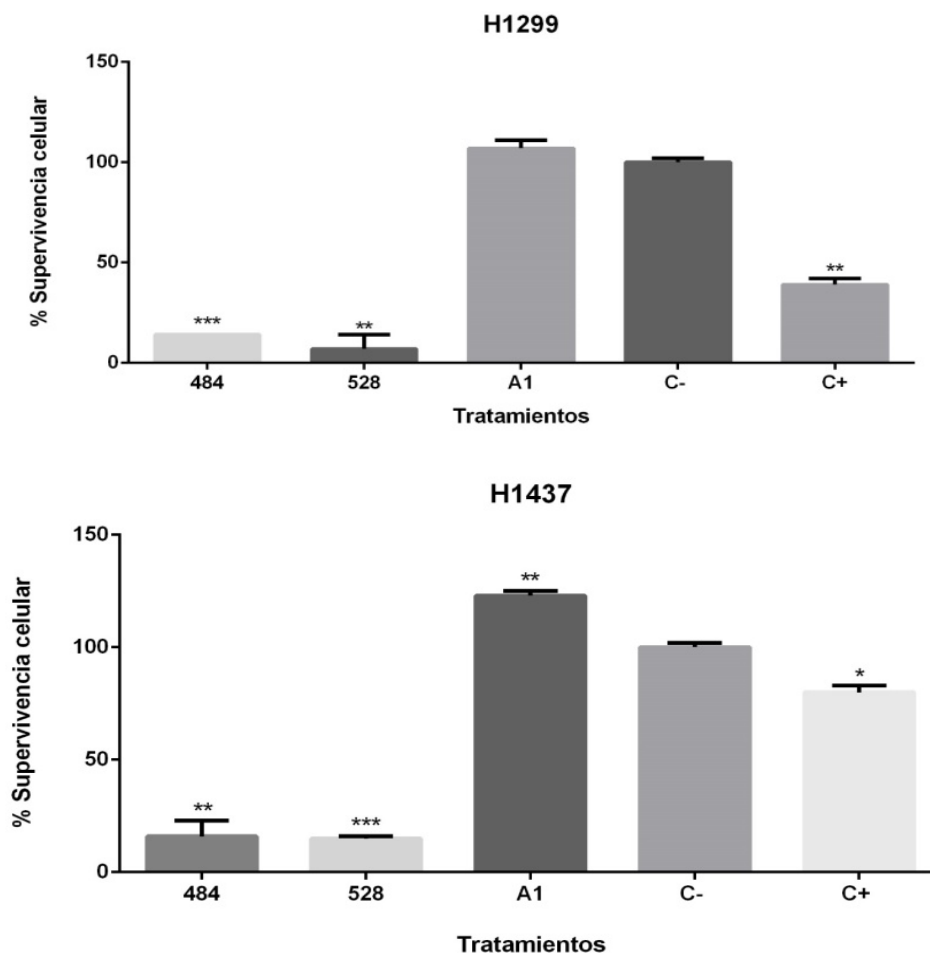


Figura 14. Efecto citotóxico de CNY-484 y CNY-528 en H1299 y H1437 (cáncer de pulmón). Se agregaron 48.5 μg , 51 μg y 43 μg de CNY-484, CNY-528 y A1, respectivamente. Después de 24 hrs se agrega el reactivo MTS y se mide la absorbancia a 490 nm. Los resultados fueron normalizados con el C- (DMSO 1%), Como control positivo (C+) se utilizó estoposide (50 μg). t de Student * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Línea celular HeLa (Cáncer cervicouterino)

Ambos extractos (CNY-484 & CNY-528), como se puede observar en la figura 15, presentaron una disminución de la supervivencia celular de un $91 \pm 11\%$ y $91 \pm 7\%$ (respectivamente), siendo estos mucho mayor al $80 \pm 1\%$ que disminuyó el control positivo (Figura 15).

Línea celular MCF7 (Cáncer de mama)

El extracto CNY-484 disminuyó un $82 \pm 19\%$ la supervivencia celular, mientras que el extracto CNY-528 tuvo una disminución del $90 \pm 2\%$, representando valores mucho mayores comparados con el etoposide el cual únicamente disminuyó el $12 \pm 5\%$; el medio A1 tuvo una supervivencia celular del $116 \pm 3\%$ con respecto al C- (Figura 15).

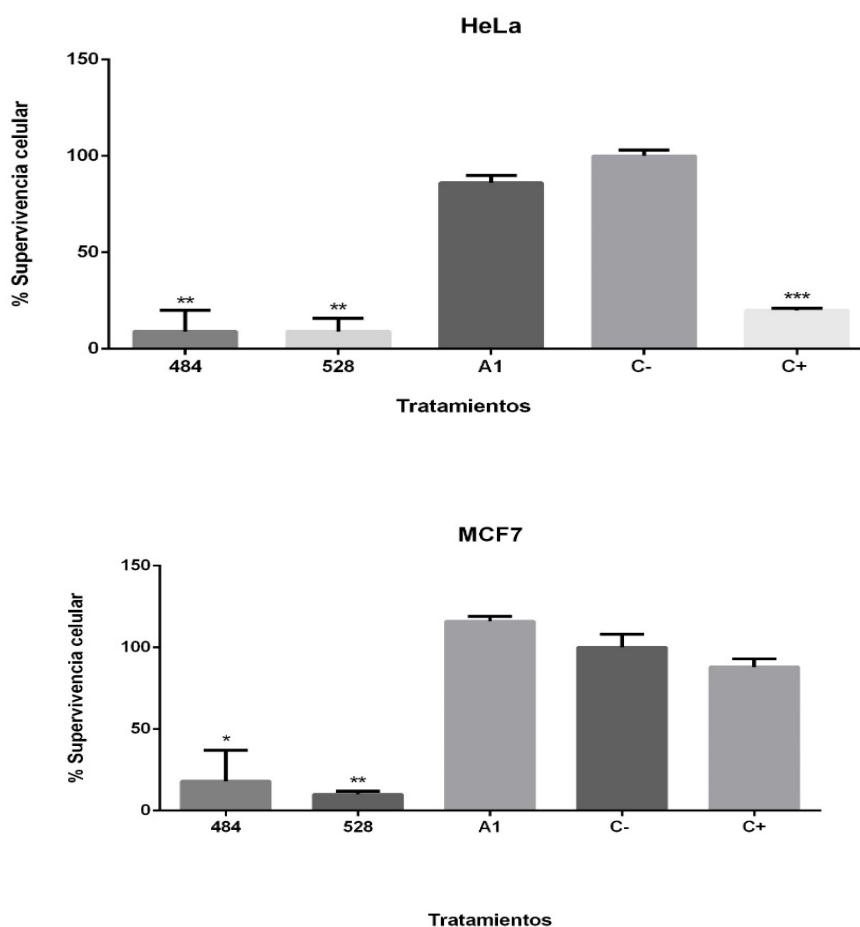


Figura 15. Efecto citotóxico de CNY-484 y CNY-528 en HeLa (cáncer cervicouterino) y MCF7 (cáncer de mama). Se agregaron $48.5 \mu\text{g}$, $51 \mu\text{g}$ y $43 \mu\text{g}$ de CNY-484, CNY-528 y A1, respectivamente. Después de 24 hrs se agrega el reactivo MTS y se mide la absorbancia a 490 nm . Los resultados fueron normalizados con el C- (DMSO 1%), Como control positivo (C+) se utilizó etoposide ($50 \mu\text{g}$). t de Student * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Línea celular L929 (Fibroblastos)

La línea celular de fibroblastos (L929), presentó una disminución de la supervivencia celular del $75 \pm 40\%$ con el extracto CNY-484, mientras que con el extracto CNY-528 la disminución fue de $80 \pm 23\%$. El control positivo disminuyó en un $59 \pm 0\%$ la supervivencia celular como se puede ver en la figura 16.

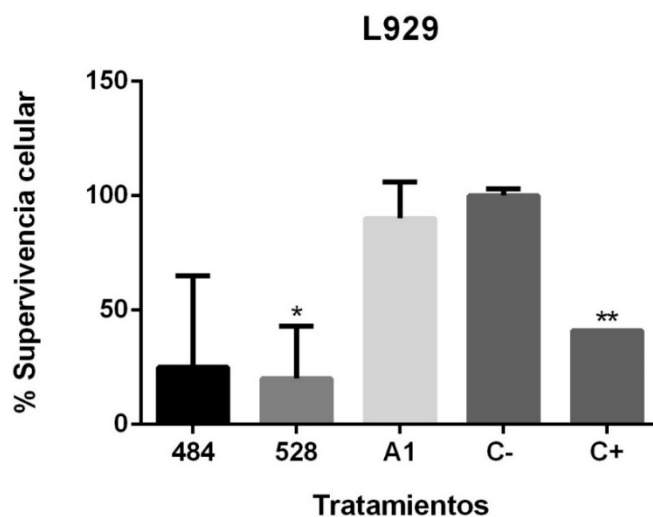


Figura 16. Efecto citotóxico de CNY-484 y CNY-528 en L929 (fibroblastos). Se agregaron 48.5 μg , 51 μg y 43 μg de CNY-484, CNY-528 y A1, respectivamente. Después de 24 hrs se agrega el reactivo MTS y se mide la absorbancia a 490 nm. Los resultados fueron normalizados con el C- (DMSO 1%), Como control positivo (C+) se utilizó estoposide (50 μg). t de Student * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

VIII- DISCUSIONES

Ser *et al.*, (2015) aislaron la cepa MUSC 137, perteneciente a la especie *Streptomyces pluripotens*, de sedimento colectado en suelo de manglar en Tanjung Lumpur, Malasia, realizando la extracción con acetato de etilo. Probaron el extracto crudo, a diferentes concentraciones (25, 50, 100, 200 y 400 μg), contra líneas celulares de cáncer de colon y mama. Los resultados de la línea celular Caco-2 de cáncer de colon fueron de 50% de supervivencia celular a una concentración de 400 μg , mientras que a la concentración utilizada en nuestro estudio (50 μg), obtuvieron una reducción del 35% de la viabilidad celular, lo cual representa un menor porcentaje de reducción de la supervivencia celular a lo obtenido en nuestro trabajo, ya que con el extracto CNY-484 se redujo en $65 \pm 18\%$ y con CNY-528 $67 \pm 5\%$ la supervivencia celular (Fig. 13). Para la línea celular MCF7 de cáncer de mama, Ser *et al.*, (2015) obtuvieron una reducción de la supervivencia celular de 50% a una concentración de 50 μg y 70% con 400 μg . Ambos resultados son menores a lo obtenido con los extractos CNY-484 y CNY-528 con los cuales se redujo en un $82 \pm 19\%$ y $90 \pm 2\%$ respectivamente, la supervivencia celular en la misma línea de cáncer de mama MCF7 (Fig. 15). Estas diferencias pueden explicarse en parte por el hecho de que el organismo de estudio de Ser *et al.*, (2015), *Streptomyces pluripotens* si bien, al igual que nuestros organismos de estudio, pertenece al orden Actinomycetales, es de un género diferente; además se realizó la colecta de sedimento en un manglar a una profundidad de 20 cm, mientras que nuestros organismos fueron colectados del medio marino a profundidades mayores a los 2 metros; por lo cual podemos inferir que el género *Actinoalloteichus* produce metabolitos secundarios con mayor potencial anticancerígeno.

Torres-Beltrán, (2009) reporta que 12 extractos de actinobacterias aisladas de Bahía de los Ángeles mostraron actividad contra la línea celular de cáncer de mama MCF-7 con una disminución de la supervivencia celular de hasta un 80%; estos resultados concuerdan con lo obtenido para nuestro extracto CNY-484 ($82 \pm 19\%$) y son menores que lo obtenido en el extracto CNY-528 ($91 \pm 7\%$); además, 6 extractos mostraron actividad contra la línea celular de cáncer cervicouterino HeLa con una supervivencia celular de hasta un 75.3%, lo cual es mucho menor a lo encontrado en nuestros extractos (CNY-484 = $91 \pm 11\%$) y (CNY-528 $91 \pm 7\%$).

Las tres cepas descritas por Torres-Beltrán, (2009), si bien fueron extraídas con acetato de etilo, al igual que nuestras cepas, presentaron valores iguales o menores en los ensayos anticancerígenos, lo cual se debe al hecho que las tres cepas pertenecen a otros géneros (S-355 – *Micromonospora*, S-361 – *Salinispora* y S-365 – *Salinispora*) lo cual refuerza la teoría que el género *Actinoalloteichus* presenta metabolitos secundarios con un alto potencial anticancerígeno. Abdelfattah et al., (2016) reportaron una supervivencia celular del 40% en la línea celular de cáncer de mama (MDA-MB-231) utilizando el extracto crudo de una cepa de actinomicetos del mar Rojo, a una concentración de 50µg, utilizando acetato de etilo como solvente; lo cual es menor a lo obtenido en nuestro resultado con el extracto CNY-484 en la línea celular de cáncer de mama MCF7 el cual fue de $10 \pm 2\%$ de supervivencia celular. Estas diferencias se pueden deber a la presencia de compuestos con alto potencial citotóxico en nuestros extractos crudos. Los extractos presentaron una disminución de la viabilidad celular de un $75 \pm 40\%$ (CNY-484) y $80 \pm 23\%$ en la línea celular L929 de fibroblastos, lo cual difiere con los resultados esperados y demuestra que ambos extractos no son específicos para células de cáncer, por lo que es necesario desarrollar terapias dirigidas con nanopartículas para llegar al sitio afectado sin dañar a células sanas.

IX- CONCLUSIONES

Se logró determinar el efecto citotóxico de los dos extractos de actinobacterias marinas (CNY-484 y CNY-528) en las diferentes líneas celulares de cáncer.

- Para la línea celular de cáncer de colon Caco-2, el extracto CNY-484 logró una disminución de la supervivencia celular en un $65 \pm 18\%$; mientras que el extracto CNY-528 disminuyó un $67 \pm 5\%$ la viabilidad celular.
- La línea celular de cáncer de hígado, HepG2, presentó una disminución de la supervivencia celular al exponerse a los extractos CNY-484 en un $72 \pm 9\%$ y CNY-528 en un $79 \pm 3\%$.
- El extracto CNY-484 disminuyó un $86 \pm 0\%$ la supervivencia celular, mientras que el extracto CNY-528 obtuvo una citotoxicidad de $93 \pm 7\%$ para la línea celular de cáncer pulmón H1299.
- En la línea celular de cáncer de pulmón, H1437, los extractos disminuyeron la viabilidad celular en un $84 \pm 7\%$ con CNY-484 y $85 \pm 1\%$ con el extracto CNY-528.
- Los extractos CNY-484 y CNY-528 lograron el mayor efecto de citotoxicidad en la línea celular de cáncer cervicouterino (HeLa), al disminuir en un $91 \pm 11\%$ y $91 \pm 7\%$ la viabilidad celular, respectivamente.
- La línea celular de cáncer de mama (MCF7) presentó una disminución de la supervivencia celular al exponerse al extracto CNY-484 de un $82 \pm 19\%$, mientras que CNY-528 $90 \pm 2\%$.

Se determinó el efecto citotóxico de los extractos crudos con células de fibroblastos humanos (L929), presentando una disminución del $75 \pm 40\%$ de la supervivencia celular al exponerlo a CNY-484 y $80 \pm 23\%$ al añadir el extracto CNY-528.

Con base a los resultados obtenidos en la presente investigación, se puede concluir que dentro de los extractos de actinomicetos marinos del género *Actinoalloteichus* existen compuestos capaces de disminuir la supervivencia celular en líneas celulares de cáncer, hasta en un 93% , por lo tanto pueden ser un buen candidato farmacológico.

X- REFERENCIAS

- Abdelfattah, M. S., Elmallah, M. I. Y., Hawas, U. W., El-Kassema, L. T. A., & Eid, M. A. G. (2016). *Isolation and characterization of marine-derived actinomycetes with cytotoxic activity from the Red Sea coast*. Asian Pacific journal of tropical biomedicine, 6(8), 651-657. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.06.004>.
- Adrian, T. E. & Collin, P. (2018). *The Anti-Cancer Effects of Frondoside A*. Marine Drugs, 16(2), 64. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/md16020064>.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2008). *Biología molecular de la célula*. (5ta. Edición). Barcelona-España; Ediciones Omega, S.A.
- Asolkar, R.N., Freel, K.C., Jensen, P.R., Fenical, W., Kondratyuk, T.P., Park, E.J. & Pezzuto, J.M. (2009). *Arenamides A-C, cytotoxic NF- κ B inhibitors from the marine actinomycete Salinispora arenicola*. J Nat Prod. 2009;72:396–402.
- Aviña-Melgoza, L.G. (2012). *Aislamiento de compuestos bioactivos extraídos de actinobacteria marina Salinispora pacífica filotipo estándar*. (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, México.
- Becerril-Espinosa, A., Guerra-Rivas, G., Ayala-Sánchez, N. & Soria-Mercado, I.E. (2012). *Antitumor activity of Actinobacteria isolated in marine sediment from Todos Santos Bay, Baja California, Mexico*. Revista de biología marina y oceanografía, 47(2), 317-325. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572012000200013>
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. (2001) *Production of plant secondary metabolites: a historical perspective*. Plant Sci 161:839–851. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00490-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3).
- Buchanan, G.O., Williams, P.G., Feling, R.H., Kauffman, C.A., Jensen, P.R. & Fenical, W. (2005). *Sporolides A and B: structurally unprecedented halogenated macrolides from the marine actinomycete Salinispora tropica*. Org Lett. 2005;7:2731–2734.

Castro-Ochoa, F. Y. (2014). *Actinobacterias raras: evaluación del potencial anticancerígeno y antibacteriano de metabolitos secundarios*. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, México.

Chen GG, Lai PBS (Eds) (2009). *Apoptosis in carcinogenesis and chemotherapy: apoptosis in Cancer*. Springer Science. Business Media B.V. DOI 10.1007/978-1-4020-9597-9.

Cho, J.Y., Kwon, H.C., Williams, P.G., Kauffman, C.A., Jensen, P.R. & Fenical, W. (2006) *Actinofuranones A and B, polyketides from a marine-derived bacterium related to the genus Streptomyces (actinomycetales)* J Nat Prod. 2006;69:425–428.

Cruz-López, H. (2015). *Aislamiento de actinomicetos presentes en sedimentos marinos de Loreto, Baja California Sur y su evaluación como posible fuente de moléculas antimicrobianas*. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, México.

Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons.

Dhanasekaran, D. & Jiang, Y. (2016). *Actinobacteria: Basics and Biotechnological Applications*. Eds.; InTech: Rijeka, Croatia, 2016.

Evangelista-Martínez, Z., Quiñones-Aguilar, E.E. y Rincón-Enríquez, G. (2017). *Potencial biotecnológico de las actinobacterias aisladas de suelos de México como Fuente natural de moléculas bioactivas: compuestos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas*. Revista Temas de Ciencia y Tecnología. Disponible en: http://www.utm.mx/edi_antteriores/temas63/T63_E011-2017.pdf

Fernández-Pérez, M., Hernández-Balmaseda, I. & Regueira-Betancourt, S. (2015). *Bioactivos marinos en el tratamiento del cáncer*. Revista Electrónica Dr. Zoilo E. Marinello Vidaurreta, 40(7). Disponible en: <http://revzoilomarinello.sld.cu/index.php/zmv/article/view/46>

Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2000). *The hallmarks of cancer*. Cell. 2000; 100:57–70. 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.

Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2011) *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell 144(5):646–674

Hernández, L.M., Blanco, J.A., Baz, J.P., Puentes, J.L., Millán, F.R., Vázquez, F.E., Fernández-Chimeno, R.I. & Grávalos, D.G. (2000). *4'-N-methyl-5'-hydroxystaurosporine and 5'-hydroxystaurosporine, new indolocarbazole alkaloids from a marine Micromonospora sp. strain.* J Antibiot. 2000;53:895–902.

Hug, J., Bader, C.D., Remskar, M., Cirnski, K., Müller, R. (2018). *Concepts and methods to access novel antibiotics from actinomycetes.* Antibiotics (Basel), 7. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/antibiotics7020044>.

Hughes, C.C., MacMillan, J.B., Gaudencio, S.P., Jensen, P.R. & Fenical, W. (2009). *The ammosamides: structures of cell cycle modulators from a marine-derived Streptomyces species.* Angew Chem Int Ed Engl. 2009;48:725–727.

Instituto Nacional del Cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/>

Itoh, T., Kinoshita, M., Aoki, S. & Kobayashi, M. (2003). *Komodoquinone A, a novel neuritogenic anthracycline, from marine Streptomyces sp. KS3.* J Nat Prod. 2003;66:1373–1377.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H. (2009). *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death.* Cell Death Differ, 16 (1), 3-11.

Kumar, N., Shikha, S., George, V.C., Suresh, P.K. & Kumar, R.A. (2012). *Anticancer and Anti-metastatic activities of Rheum emodi Rhizome Chloroform Extracts.* Asian Journal of Pharmaceutical Research. Vol. 5 Issue 3.

Kwon, H.C., Kauffman, C.A., Jensen, P.R. & Fenical, W. (2006). *Marinomycins A-D, antitumor-antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus "Marinispora".* J Am Chem Soc. 2006;128:1622–1632.

León, J., Aponte, J.J., Cuadra, D., Galindo, N., Jaramillo, L., Vallejo, M. & Marguet, E. (2016). *Actinomicetos aislados de Argopecten purpuratus productores de enzimas extracelulares y con actividad inhibitoria de patógenos marinos.* Revista de biología marina y oceanografía, 51(1), 69-80. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572016000100007>.

- Liu, R., Zhu, T., Li, D., Gu, J., Xia, W., Fang, Y., Liu, H., Zhu, W. & Gu, Q. (2007). *Two indolocarbazole alkaloids with apoptosis activity from a marine-derived actinomycete Z2039-2*. Arch Pharm Res. 2007;30:270–274.
- Martin, G.D., Tan, L.T., Jensen, P.R., Dimayuga, R.E., Fairchild, C.R., Raventos-Suarez, C. & Fenical, W. (2007). *Marmycins A and B, cytotoxic pentacyclic C-glycosides from a marine sediment-derived actinomycete related to the genus Streptomyces*. J Nat Prod. 2007;70:1406–1409.
- Maskey, R.P., Helmke, E., Fiebig, H.H. & Laatsch, H. (2002). *Parimycin: isolation and structure elucidation of a novel cytotoxic 2,3-dihydroquinizarin analogue of gamma-indomycinone from a marine streptomycete isolate*. J Antibiot. 2002;55:1031–1035.
- Mincer, T. J., Jensen, P. R., Kauffman, C. A., & Fenical, W. (2002). *Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycetes taxon in ocean sediments*. Appl. Environ. Microbiol., 68, 5005–5011.
- Naval, J., Marzo, I. & Anel, A. (2004). *Mecanismos celulares de muerte celular programada*. Hamatologica (Ed. Esp.), 89, 126-148.
- Nouioui, I., Ruckert, C., Willemsse, J., VanWezel, G.P., Klenk, H.P., Busche, T., Kalinowski, J., Bredholt, H. & Zotchev, S.B. (2017). *Actinoalloteichus fjordicus sp. nov. isolated from marine sponges: Phenotypic, chemotaxonomic and genomic characterisation*. Anton Leeuwenhoek 2017, 110, 1705–1717. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0920-9>.
- Olano, C., Méndez, C., & Salas, J. A. (2009). *Antitumor compounds from marine actinomycetes*. Marine drugs, 7(2), 210–248. Disponible en: doi:10.3390/md7020210.
- Organización Mundial de la Salud (2018). *Datos y cifras sobre el cáncer*. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- Oroz-Parra, I. (2016). *Caracterización biológica de conotoxinas capaces de modular la supervivencia celular de diferentes líneas celulares de cáncer*. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México.

Oroz-Parra, I., Navarro, M., Cervantes-Luevano, K. E., Álvarez-Delgado, C., Salvesen, G., Sanchez-Campos, L. N., & Licea-Navarro, A. F. (2016). *Apoptosis Activation in Human Lung Cancer Cell Lines by a Novel Synthetic Peptide Derived from Conus californicus Venom*. *Toxins*, 8(2), 38. Disponible en: <https://doi:10.3390/toxins8020038>

Pelaz-Guerra, G. (2014). *Aislamiento y estudio de la diversidad de las poblaciones de Actinobacterias presentes en muestras de compost*. (Trabajo de fin de grado). Universidad de Salamanca. Salamanca, España.

Romero-Espejo, L.J. (2017). *Mecanismos de muerte celular inducidos por el extracto metanólico de tallos de *Grias neuberthii* en varias líneas celulares de cáncer*. (Tesis de licenciatura). Universidad Técnica Particular de Loja. Loja, Ecuador.

Sánchez, C. (2013). *Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: fisiopatología del cáncer*. *Rev. Med. Clin Condes* 2013; 24(4) 553-563.

Sarmiento-Vizcaíno, A. (2014). *Producción de antitumorales y antibióticos en actinomicetos aislados de arrecifes coralinos del Cañón de Avilés y algas submareales del mar Cantábrico*. Tesis de Maestría. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10651/27852>.

Sarmiento-Vizcaíno, A. (2016). *Potencial farmacológico de actinobacterias aisladas en ambientes terrestres, marinos y atmosféricos del Cantábrico*. Tesis Doctoral. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10651/39315>.

Sharma, M. (2014). *Actinomycetes: source, identification, and their applications*. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 3(2):801–832.

Sivakumar, K., Sahu, M.K., Thangaradjou, T. & Kannan, L. (2007). *Research on marine actinobacteria in India*. *Ind J Microbiology* 47(3):186–96.

Schaffert, L., Albersmeier, A., Winkler, A., Kalinowski, J., Zotchev, S.B. & Ruckert, C. (2016). *Complete genome sequence of the actinomycete *Actinoalloteichus hymeniacidonis* type strain HPA 177T isolated from a marine sponge*. *Stand Genomic Sci* 11:91.

Ser, H. L., Ab Mutalib, N. S., Yin, W. F., Chan, K. G., Goh, B. H., & Lee, L. H. (2015). *Evaluation of Antioxidative and Cytotoxic Activities of *Streptomyces pluripotens* MUSC 137*

Isolated from Mangrove Soil in Malaysia. Frontiers in microbiology, 6, 1398. doi:10.3389/fmicb.2015.01398

Solanki, R., Khanna, M. & Lal, R. (2008). *Bioactive compounds from marine actinomycetes.* Indian journal of microbiology. 48. 410-31. Disponible en: 10.1007/s12088-008-0052-z.

Strasser, A., Cory, S. & Adams, J. M. (2011). *Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases.* EMBO J 2011:30, 3367-3683.

Subramani, R. & Aalbersberg, W. (2012). *Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites.* Microbiological Research 167(10), pp. 571–580. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.06.005>.

Sun, W. (2012). *Angiogenesis in metastatic colorectal cancer and the benefits of targeted therapy.* J Hematol Oncol, 5 2012, p. 63.

Tamura, T., Zhiheng, L., Yamei, Z. & Hatano, K. (2000). *Actinoalloteichus cyanogriseus gen. nov., sp. nov.* Int J Syst Evol Microbiol 50:1435–1440.

Takahashi, A., Ikeda, D., Nakamura, H., Naganawa, H., Kurasawa, S., Okami, Y., Takeuchi, T. & Iitaka, Y. (1989). *Altemicidin, a new acaricidal and antitumor substance. II. Structure determination.* J Antibiot. 1989;42:1562–1566.

Torres-Beltran, M. (2009). *Actinobacterias bioactivas del Golfo de California: Abundancia y aspectos ecológicos.* (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, México.