



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS POR DOS

FILOTIPOS DEL ACTINOMICETO MARINO

Salinispora arenicola

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

DULCE GUADALUPE GUILLÉN MATUS

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MEXICO. AGOSTO DEL 2014.

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

MAESTRÍA EN OCEANOGRAFÍA COSTERA.

**PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS POR DOS
FILOTIPOS DEL ACTINOMICETO MARINO**

***Salinispora arenicola* .**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

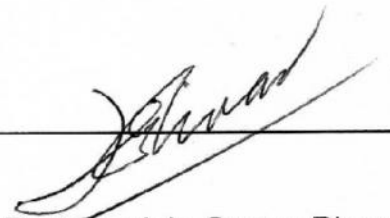
DULCE GUADALUPE GUILLÉN MATUS

Aprobada por:



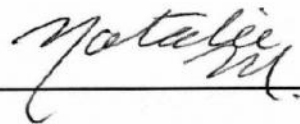
Dr. Irma E. Soria Mercado

Director de tesis



Dra. Graciela Guerra Rivas

Sinodal



MC. Natalie Millán Aguiñaga

Sinodal

“Nunca nos acercamos más a otro mundo que en el mar.”

Anne Stevenson

RESUMEN

Durante las últimas cinco décadas, el aislamiento y elucidación de productos naturales provenientes de microorganismos marinos ha sido un área de investigación fructífera. En particular el grupo de las actinobacterias, el cual ha dado origen a más de la mitad de los compuestos hasta ahora descubiertos. El género *Salinispora* es uno de los grupos más prolíficos, dando origen a metabolitos secundarios con características estructurales nuevas; y con utilidad farmacológica. Sin embargo, en el proceso de elucidación es común encontrarse redescubriendo compuestos conocidos o análogos menos bioactivos de los mismos (Jensen & Fenical, 1996; Mincer *et al.*, 2005; Williams, 2009; Olano *et al.*, 2009¹; Yang *et al.*, 2013). Con el fin de evitar este problema, se utilizó una nueva técnica conocida como "*Molecular networking*" (Watrous *et al.*, 2012). En la cual, se analiza la similitud entre los patrones de fragmentación de los compuestos a partir de espectros de masas de alta resolución (MS/MS) de extractos crudos. El resultado es una red de iones representados con nodos que se encuentran conectados entre sí por líneas de diferente grosor indicando su similitud, esto permite una identificación de manera visual de compuestos análogos, y o estructuralmente relacionados, de manera mucho más sencilla (Watrous *et al.*, 2012). Además, con el objetivo de entender las adaptaciones que las bacterias marinas han desarrollado al evolucionar en ambientes complejos. Se observó la diferencia en la producción de metabolitos secundarios en dos filotipos, A y B, de *Salinispora arenicola* aislados de sedimentos provenientes del Golfo de California, cultivadas bajo dos condiciones de pH. Los espectros de masas-masas se

analizaron mediante "*molecular networking*" (redes moleculares), observando la presencia de compuestos antibióticos y citotóxicos tales como Rifampicina S y W, Arenimicina A, Saliniketal A y Estaurosporina. Asimismo, familias moleculares específicas para diferentes filotipos y condiciones de pH. Por otro lado, la mayoría de los núcleos en la red no presentaron relación con compuestos conocidos, lo que sugiere características químicas nuevas, los cuales se encuentran en el proceso de elucidación.

AGRADECIMIENTOS.

- ❖ A Dios, por darme la oportunidad de llegar hasta donde estoy ahora y por siempre socorrerme durante el camino.
- ❖ A mi familia, por su amor incondicional. A mi papá, por enseñarme a soñar y por ser un gran padre hasta el último momento. A mi mamá, por su apoyo y esfuerzo, gracias por no rendirte nunca. Y a mis hermanos, por ser siempre el mejor ejemplo a seguir, por los buenos y malos momentos que hemos vivido y los que vendrán.
- ❖ A mis sinodales por su paciencia y ayuda (sobre todo paciencia), durante el desarrollo de este trabajo. A mi directora, porque no solo ha sabido ser un guía en lo académico sino una gran amiga. A la Dra. Graciela, por sus palabras de apoyo siempre que las necesité.
- ❖ A Natalie y Kate, por permitirme trabajar y aprender de ellas. Por brindarme su amistad, sin ustedes esta tesis nunca hubiera sido posible.
- ❖ A mis compañeros de laboratorio y al Jensen lab, por llenar mis días de sonrisas. Y a todos los que de alguna u otra manera estuvieron conmigo durante esta aventura y ayudaron a darle feliz término.

ÍNDICE

	Página
Índice.....	i
Lista de tablas.....	iii
Lista de figuras	iii
1. Introducción	1
2. Antecedentes	5
2.1. Redes Moleculares.....	6
2.2. . Género <i>Salinispora</i>	9
2.2.1. <i>Salinispora arenicola</i>	10
2.3. Productos Naturales.....	11
2.4. Diversidad genética del metabolismo secundario.....	12
2.4.1. Policétidos.....	14
2.4.2. Péptidos no ribosomales.....	14
2.4.3. Mezcla de Policetidos tipo I y péptidos no ribosomales.	15
2.4.4. Indolocarbazoles.....	15
3. Hipótesis.....	16
4. Objetivos.....	16

4.1.	Objetivos Particulares.....	16
5.	Materiales y Métodos.....	18
5.1.	Activación y Cultivo de Cepas.....	18
5.2.	Preparación de Medios de cultivo.....	19
5.3.	Extracción de Compuestos.....	20
5.4.	Redes Moleculares (<i>Molecular Networking</i>).....	21
5.5.	Bioensayos de citotoxicidad.....	23
5.6.	Fraccionamiento.....	23
6.	Resultados y Discusiones.....	24
6.1.	Fraccionamiento	26
6.2.	Redes moleculares (<i>Molecular networking</i>).....	29
6.3.	Bioensayos de Citotoxicidad.....	41
7.	Conclusiones.....	46
8.	8. Referencias.....	48

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I Cepas de <i>Salinispora arenicola</i> tipo A y B utilizadas en los experimentos.....	19
II Concentración inhibitoria mínima (MIC) de los extractos crudos contra la bacteria patógena <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la metilicina (MRSA).....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pagina
1 Representación esquemática de cómo se generan las redes moleculares (A). Visualización del estándar Rifamicina S y sus posibles análogos en el programa Cystoscape (B).....	8
2 Cultivo de <i>Salinispora arenicola</i> . Se observan las colonias en estado de esporulación, así como la cepa albina AMS22B.....	11
3 Fraccionamiento del extracto crudo de la cepa AMS300 cultivada a un pH de 5.5.....	25
4 Fraccionamiento del extracto crudo de AMS300 cultivado a un pH de 5.5. Para esta separación no se utilizó columna abierta.	26

5	Fraccionamiento del extracto crudo de la cepa AMS22 por columna abierta flash utilizando sílica fase reversa C8.	28
6	Red molecular, donde se comparan los iones por peso molecular.....	30
7	Red molecular comparando los filotipos A y B y las condiciones de fermentación en las que se cultivaron.....	31
8	Familia molecular asociada al compuesto Desferroxiamina E.	33
9	Red Molecular sin estándares. Se comparan los iones producidos por cada cepa, quitando todos los iones presentes en el medio de cultivo.....	34
10	. Familias moleculares específicas para las cepas CNH964, AMS22 y AMS22B.....	35
11	Familia molecular de <i>S. arenicola</i> B (CNH964), en donde se observa un ión producido por AMS22B (filotipo A).....	33
12	Red Molecular comparando las cepas de <i>S. arenicola</i> albina AMS22B (nodos verdes) con la original (nodos naranjas) y la cepa de filotipo B CNH964 (nodos azules).....	38
13	Total de conjuntos de genes del metabolismo secundario que presentan las cepas de <i>Salinispora arenicola</i> utilizadas en las redes moleculares.	39

14	Número de conjuntos de genes específicos para la producción de las diferentes familias de compuestos que produce <i>Salinispora arenicola</i> .	39
15	Concentración inhibitoria media obtenida para cada uno de los extractos crudos de las cepas de <i>S. arenicola</i> .	42
16	Amplificación y pcr del gen SalA, para la producción de Salinosporamida A.	43

1. INTRODUCCIÓN

Los actinomicetos son los organismos procariontes más importantes, económica y biotecnológicamente hablando. Son responsables por la producción de alrededor de la mitad de los compuestos bioactivos descubiertos (Berdy, 2005; Lam, 2006), mayormente antibióticos, agentes antitumorales, inmunosupresores y enzimas.

Debido a los resultados tan fructíferos en este campo de investigación, en los últimos cincuenta años se han hecho esfuerzos para el aislamiento de nuevos grupos de actinomicetos; así como para la identificación y elucidación de los metabolitos secundarios que producen.

Sin embargo, aun cuando la diversidad en el ambiente terrestre es extraordinaria, la existente en los ambientes marinos es mucho mayor (Donia y Hamann, 2003; Lam, 2006). La vida se originó en el océano y más del 70 % de nuestro planeta está cubierto por el vital líquido. Algunos ecosistemas marinos, tales como las planicies del fondo marino y los arrecifes de coral, se estima son más diversos que las selvas tropicales.(Haefner 2003; Donia y Hamann 2003).

Las condiciones a las que las actinobacterias marinas han tenido que adaptarse durante su evolución son tan extremas como altas presiones (máximo 1100 atmósferas), condiciones anaeróbicas y temperaturas menores a 0 °C en el sedimento marino. Así como altas condiciones de pH, tan ácido como 2.8 y temperaturas mayores a 100 °C en las chimeneas hidrotermales (Lam, 2006). Por lo tanto, es de esperarse que las bacterias marinas presenten diferentes

características a las existentes en los ecosistemas terrestres. Estas diferencias, se ven reflejadas en la diversidad genética y metabólica, que aunque poco estudiada, presentan los microorganismos marinos (Manivasagan *et al.*, 2013). Lo que por supuesto, ha derivado en el descubrimiento de nuevos metabolitos bioactivos.

Uno de los grupos más provechosos en la producción de metabolitos secundarios es el género *Salinispora*, descrito en el 2005 por Maldonado y colaboradores, incluye tres especies genéticamente muy relacionadas: *S. tropica*, *S. arenicola* (Maldonado *et al.*, 2005) y *S. pacifica* (Ahmed *et al.*, 2013). Las cuales, son las primeras especies de bacterias estrictamente marinas descritas. Con un requerimiento mínimo de 5 mM del ión sodio para su crecimiento (Tsueng y Lam, 2008)

Dentro de los metabolitos producidos por este género se encuentran: compuestos de la familia del rifampicina y la estaurosporina que es un inhibidor de la proteína quinasa, así como el nuevo compuesto bicíclico salinicetal que comparte algunas características biosintéticas con la rifampicina. Arenicolida A y el péptido cíclico ciclomarina A, arenimicina y arenamida A (Jensen *et al.*, 2007).

También el compuesto salinosporamida A, un potente inhibidor del proteasoma, el cual se encuentra en fase I de ensayos clínicos como agente anticáncer, el cual se creía que era específico para *S. tropica*, pero investigaciones recientes han demostrado que también es producido por *S. pacifica* y *S. arenicola* (Eustáquio *et al.*, 2011; Goo *et al.*, 2013).

En la búsqueda de metabolitos con características químicas novedosas, muchas veces se llega a la elucidación de compuestos descritos previamente o análogos de los mismos, con menor bioactividad. Lo que significa una pérdida económica así como de tiempo y esfuerzo.

Dentro de las técnicas utilizadas para evitar estos contratiempos se encuentran: la utilización de un cromatógrafo de alta resolución acoplado a un detector de masas (HPLC-MS). También se utiliza la resonancia magnético nuclear (HPLC-NMR), para observar si existen grupos funcionales interesantes en la molécula, tales como ácidos carboxílicos, alcoholes, aminas, entre otros. En otras ocasiones se utilizan detectores de absorción en UV acoplados a cromatografía líquida; solo por enlistar algunos (Yang et al., 2013).

Sin embargo, este tipo de técnicas no son del todo eficientes y la posibilidad de encontrarse con compuestos ya descritos durante las últimas fases del proceso de elucidación sigue siendo alta. Con el objetivo de erradicar este tipo de inconveniencias se desarrolló una técnica denominada "*Molecular Networking*" o redes moleculares (Watrous et al., 2012; Yang et al., 2013), debido a que forma redes de iones moleculares que permiten visualizar la química de los compuestos producidos por los organismos estudiados. Esta técnica se basa en el análisis de la similitud entre los patrones de fragmentación de los compuestos a partir de espectros de masas de alta resolución (MS/MS) de extractos crudos. El resultado es una red de iones representados con nodos que se encuentran conectados entre sí por líneas de diferente grosor indicando su similitud (fig. 1), esto permite una identificación de manera visual de compuestos análogos, y o estructuralmente

relacionados, de manera mucho más sencilla, lo que da la oportunidad de identificar y descartar moléculas conocidas de manera temprana en el proceso de elucidación favoreciendo el aprovechamiento de tiempo, esfuerzo y costos. (Watrous *et al.*, 2012).

Debido a que se han observado diferentes que cepas de la misma especie pueden dar origen a metabolitos secundarios con estructuras y actividades completamente diferentes; y que, algunas taxonómicamente diferentes producen compuestos idénticos (Larsen *et al.*, 2005; Jensen *et al.*, 2007) se compararon dos filotipos de la especie *S. arenicola* (a y b), los cuales se cultivaron bajo las mismas condiciones de fermentación. Con el fin de continuar en la búsqueda de compuestos con características estructurales nuevas, así como para conocer más a fondo la ecología de la bacteria marina *Salinispora arenicola*.

2. ANTECEDENTES

Desde el descubrimiento de la actinomicina, se han encontrado compuestos bioactivos, agentes antitumorales y enzimas comercialmente interesantes producidos por actinobacterias. Aproximadamente dos tercios de los antibióticos naturales se han aislado a partir de estos microorganismos (Manivasagan *et al.*, 2013).

Entre las actinobacterias, el grupo *Streptomyces* es considerado uno de los más importantes económicamente, ya que son fuente del 50 al 55% del total de los antibióticos conocidos (Manivasagan *et al.*, 2013). Convirtiendo a este género en el principal productor de antibióticos explotado por la industria médica. Además también producen compuestos antitumorales como las antraciclinas (aclarubicina, daunomicina y doxorubicina) péptidos (bleomicina y actinomicina D), ácidos aureólicos (mitramicina), enedinas (neocarzinostatina), antimetabolitos (pentostatina) carzinofilinas y mitomicinas, entre otros (Olano *et al.*, 2009¹; Olano *et al.*, 2009²; Newman y Cragg, 2007). Sin embargo, la búsqueda de nuevos medicamentos aún es prioridad, debido a la rapidez con la que crece la resistencia a la quimioterapia. Así mismo, la alta toxicidad asociada con las terapias actuales y los efectos secundarios que conllevan aumentan la demanda por compuestos nuevos que sean efectivos contra el cáncer con efectos secundarios menores (Olano *et al.*, 2009¹).

2.1. Redes Moleculares.

Algunas de las técnicas que se utilizan en la identificación de compuestos como método de cribado son: cromatografía líquida de alta resolución acoplada con detectores de masas (HPLC-MS), resonancia magnético nuclear (HPLC-NMR, HPLC-NMR-MS), extracción de fase sólida (HPLC-SPE-NMR), entre otras pruebas de bioactividad (Johansen *et al.*, 2011; Mansson *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2013). Todas estas técnicas se basan en el hecho de que compuestos con estructuras similares comparten características físicas, tales como perfiles de absorción en UV-visible, tiempos de retención en cromatografía, desplazamientos en resonancia magnético nuclear; además de otras propiedades biológicas. (Yang *et al.*, 2013).

En principio, los patrones de fragmentación a partir de espectros de masas de alta resolución son características definitivas de una molécula y por lo tanto pueden ser utilizados de manera efectiva como un método de discriminación. De ahí la implementación de las redes moleculares, en donde se organizan los espectros en base a las similitudes en la fragmentación iónica, permitiendo que la identificación de análogos y compuestos relacionados sea más sencilla con una exploración visual de diferentes moléculas provenientes de varias fuentes biológicas de manera simultánea (Watrous *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013). Primeramente, se obtienen los espectros de masas de alta resolución de los extractos. Después se genera la red utilizando valores de coseno, los cuales indican la semejanza en el patrón de fragmentación.

Los espectros de masas se convierten en vectores de manera computacional. Cada par de vectores se compara mediante el cálculo del producto punto, el cual por definición incluye el coseno del ángulo entre dos vectores. Aquí referido como el valor de similitud entre los patrones de fragmentación. El valor de coseno asignado a cada par de vectores varía en un rango de 0 a 1, donde uno representa el 100% de semejanza. Para reducir la complejidad en las redes resultantes, los espectros idénticos se combinan entre sí. La comparación se realiza entre pares cuyos patrones de fragmentación contienen al menos seis iones que concuerdan. Los valores de coseno menores a 0.5 se descartan, y para que dos nodos estén conectados en la red se requiere que la semejanza se dé en dos direcciones (Watrous *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013).

Para la visualización de las redes se utiliza el software Cytoscape 2.8.3 18, el cual es comúnmente utilizado para observar las interacciones de proteínas, rutas bioquímicas, redes de población e incluso, para observar los viajes aéreos (Smoot *et al.*, 2011; Watrous *et al.*, 2012).

Los nodos representan los iones padres unidos por líneas cuyo grosor equivale al valor de semejanza entre ellos. Las redes, entonces, son el resultado de una representación visual del parecido químico de un conjunto de compuestos dado. El hecho de que productos naturales parecidos compartan patrones de fragmentación similares, hace que las familias moleculares se agrupen juntas dentro de la red. Una familia molecular se define como el conjunto de moléculas que se relacionan entre sí en la red molecular (Nguyen *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013)

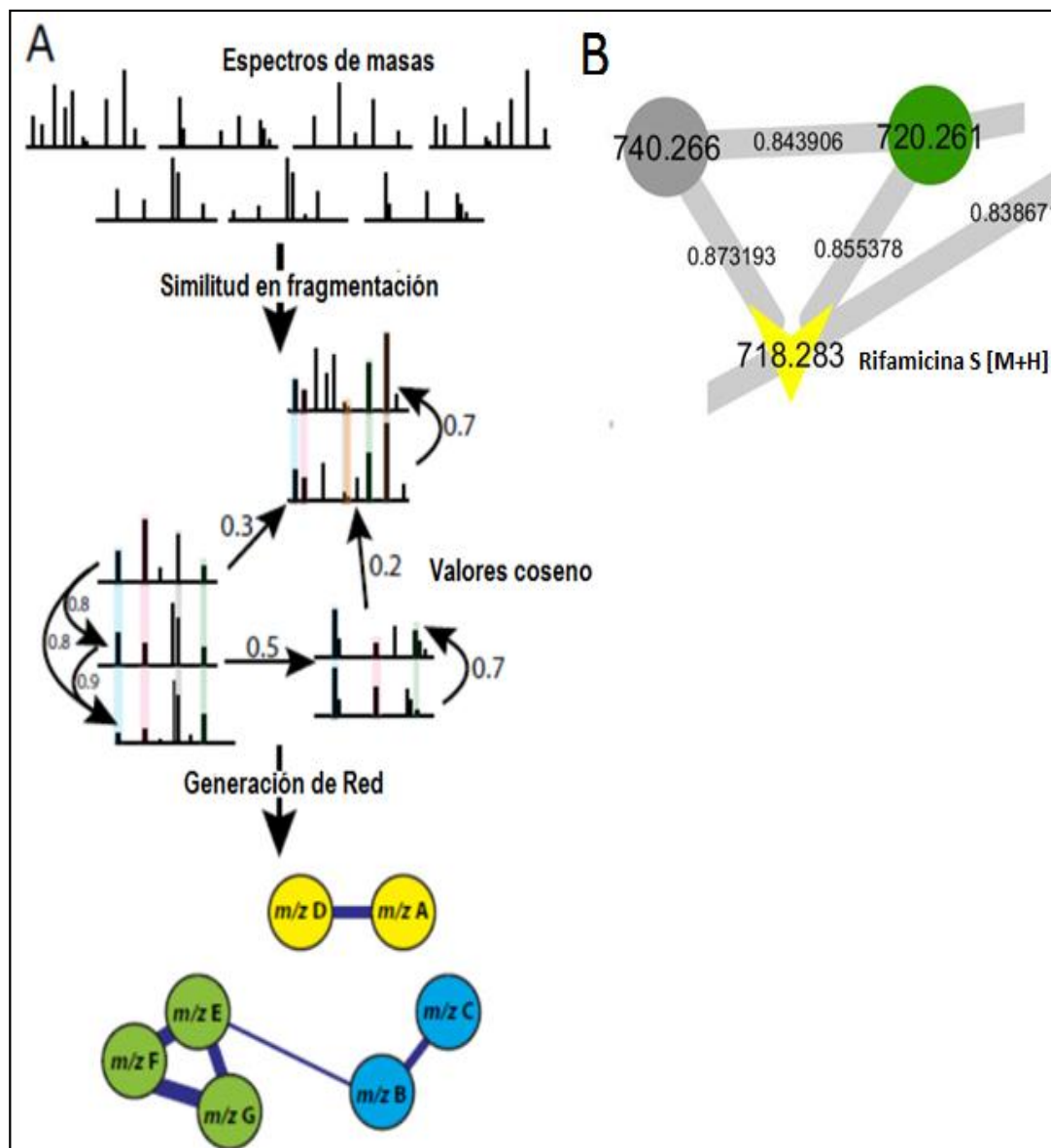


Figura 1. Representación esquemática de cómo se generan las redes moleculares (A). Visualización del estándar Rifamicina S y sus posibles análogos en el programa Cystoscape (B).

2.2. Género *Salinispora*

El género *Salinispora* es el primer género de actinomicetos, reportado como marino obligado, el cual tiene un requerimiento estricto de agua de mar para sobrevivir y proliferarse (Jensen *et al.*, 1991; Mincer *et al.*, 2002). El nombre *Salinispora* proviene del latín *salinus*, salina y del griego *spora*, espora; el cual hace referencia a organismos formadores de esporas y de hábitat marino (Maldonado *et al.*, 2005 y Mincer *et al.*, 2005).

Recientemente, se ha demostrado que las especies de *Salinispora* son capaces de crecer con una concentración mínima de sodio de 5mM Na⁺, siempre y cuando se dé el ambiente osmótico adecuado, también ha sido demostrado que las células se lisan en un medio con una débil fuerza osmótica, lo que sugiere un alto nivel de adaptación al medio marino. (Tsueng y Lam, 2008; Tsueng y Lam, 2010).

Hasta la fecha, solamente tres especies de *Salinispora* han sido descritas, *Salinispora arenicola*, *Salinispora tropica* y *Salinispora pacifica* (Maldonado *et al.* 2005; Ahmed *et al.* 2013). Aunque las tres especies comparten más del 99% de identidad en sus secuencias del 16S rRNA, se distinguen en especies diferentes puesto que su relación ADN-ADN es menor al 60%. No obstante, pueden ser diferenciadas por amplificación del 16S rRNA. Basándose en la posición característica de los nucleótidos. En las secuencias se han descrito cinco filotipos para *S. arenicola*, quince para *S. pacifica* y solamente uno para *S. tropica* (Maldonado *et al.* 2005; Ahmed *et al.* 2013; Freel *et al.* 2012).

Las primeras colonias aparecen después de tres a seis semanas, dependiendo del medio de crecimiento y se reconocen por su falta de hifas aéreas y su pigmentación, la cual es de un naranja brillante, aunque se han observado casos en los que las colonias pierden su coloración representativa, tornándose rosadas y hasta color crema. Manteniendo siempre el color oscuro o negro de sus esporas. Las cuales son sésiles y se transmiten individualmente o en pequeños grupos conocidos como esporóforos (Magarvey *et al.*, 2004 y Maldonado *et al.*, 2005).

Las especies de *Salinispora* tienen una distribución tropical y subtropical en los sedimentos marinos. Han sido aisladas de diferentes partes del mundo, incluyendo: el Mar Caribe, Mar rojo, El océano Atlántico tropical de las Bahamas, el océano Pacífico tropical de Guam y del Golfo de California. Siendo *S. arenicola* la que presenta una distribución más diversa, aislada recientemente en las costas templadas de la Bahía de Tosa en Japón. En comparación con *S. tropica*, la cual parece ser endémica de las Bahamas. (Mincer *et al.*, 2002; Feling *et al.*, 2003; Jensen y Mafnas, 2006; Freel *et al.* 2012; Goo *et al.* 2013).

2.2.1. *Salinispora arenicola*.

El nombre de *S. arenicola* (Del latín *arena*, arena; *incola*, habitante) se debe a que fue aislada del sedimento marino. Las cepas tienen un requerimiento de un 25 a 50 % de agua de mar o un medio rico en sales, y una temperatura 20 a 28 °C para un crecimiento óptimo. Asimismo, los cultivos pueden ser enriquecidos

con Arbutina, L-prolina, D-salicina, L-threonina y L- triosina como única fuente de energía y carbono para el crecimiento (Maldonado *et al.*, 2005).



Figura 2. Cultivo de *Salinispora arenicola*. Se observan las colonias en estado de esporulación (superior derecha), así como la cepa albina AMS22-B (inferior derecha).

2.3. Productos naturales

La exploración de los actinomicetos marinos como una fuente de metabolitos secundarios nuevos aun se encuentra en sus primeras etapas. Sin embargo, un gran número de compuestos se ha aislado en los últimos años. Uno de los grupos más interesantes, es el género *Salinispora*, el cual, como se mencionó antes, es fuente de productos naturales novedosos.

Salinispora tropica, productor de Salinosporamida A y sus análogos B y C, también ha dado origen a diversos metabolitos sin precedentes tales como los macrólidos clorados, esporolidas A y B (Blunt *et al.*, 2007; Dineshkumar *et al.*, 2013).

Salinispora pacífica, además de producir análogos de salinosporamida, a partir de sus cepas se han aislado compuestos como los glicosidos Cianosporacidas A y B,; También Salinipironas y pacificanonas (Oh *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2008).

Por su parte *S. arenicola* produce compuestos de la familia del rifampicina y la estaurosporina que es un inhibidor de la proteína quinasa, así como el nuevo compuesto bicíclico salinicetal A. También produce compuestos de la familia de la arenicolida, ciclomarina, arenimicina y arenamida (Maldonado *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2007).

2.4. Diversidad genética del Metabolismo secundario

Dentro de las diferencias genéticas que las especies de *Salinispora* presentan, se encuentra la producción de metabolitos secundarios. Aun cuando las especies están altamente relacionadas genéticamente, la presencia de rutas metabólicas específicas para cada especie sugiere que el metabolismo secundario es una característica muy importante, taxonómicamente hablando, para este grupo (Jensen, 2010).

Los genes que son más susceptibles a la transferencia horizontal son aquellos asociados con funciones no esenciales o de adaptación. Incluyendo los involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundarios (Ginolhac *et al.*, 2005). De ahí la importancia del ambiente en la diversidad genética de los microorganismos.

Las investigaciones del metabolismo secundario que se basan en la diversidad genética tienen la capacidad de proveer información que ayude a estimar el potencial de diferentes cepas u organismos para producir clases particulares de productos naturales (Jensen, 2010).

Muchos actinomicetos aislados del fondo marino contienen policetido sintetasa (PKS) y policetido sintetasa no ribosomal (NRPS) en sus rutas metabólicas, las cuales son las características distintivas en la producción de metabolitos secundarios (Manivasagan *et al.*, 2013). Las policetido-sintetasas y peptido-no ribosomal- sintetasas, son proteínas multifuncionales que utilizan una estrategia similar para la formación de dos tipos diferentes de productos naturales (Olano *et al.*, 2009¹).

Dentro de los compuestos más importantes para la industria biomédica se encuentran los antitumorales. *Salinispora sp.*, produce metabolitos pertenecientes a las familias de policetidos, peptidos no ribosomales, indolocarbazoles y sus mezclas, compuestos que presentan este tipo de actividad biológica.

Encontrar las rutas metabólicas específicas para la biosíntesis de compuestos entre las bacterias permite conocer la forma en que los genes del

metabolismo son intercambiados y ayudará a comprender como han evolucionado para crear la diversidad química existente y predecir la variedad de compuestos que se producen (Freel *et al.*, 2011)

2.4.1 Policetidos

Los policétidos son una familia de productos naturales los cuales se producen por una reacción descarboxilativa tipo Claisen, mediante la condensación de los precursores del grupo acil-CoA. Esta reacción es catalizada por la policétido sintetasa (PKSs). Existen tres tipos de policétidos; el tipo I son enzimas multifuncionales organizadas en módulos. Los tipo II, son complejos multienzimales que cumplen una función única. Los Tipo III, enzimas condensantes (Olano *et al.*, 2009¹).

Muchos compuestos pertenecientes a esta familia ha sido aislados de actinomicetos marinos, tales como las arenicolidas y salinicetal A y B, producidos por *S. arenicola* (Olano *et al.*, 2009¹; Williams *et al.*, 2007).

2.4.2. Peptidos no ribosomales

Las sintetisas de los peptidos no ribosomales (NRPS) siguen el mismo principio que las policetido sintetisas, utilizando lineas de anhídridos de aminoacyl-AMP y formando cadenas a partir de ellos, según del dominio NRPS, por ejemplo, metil-transferasas, reductasas u oxidasas, etc. Generalmente estos

péptidos contienen características estructurales únicas tales como heterociclos o deoxiazúcares (Olano *et al.*, 2009¹). Dentro de los productos naturales que pertenecen a este grupo y son producidos por *Salinispora arenicola*, se encuentran los ciclohexadepsipetidos, arenamidas A y B (Asolkar *et al.*, 2009).

2.4.3 Mezcla de Policetidos tipo I y péptidos no ribosomales.

La combinación de las sintetasas responsables de los policetidos tipo I y péptido no ribosomales, dan como resultado compuestos derivados de aminoácidos y ácidos carboxílicos de cadena corta. Uno de los compuestos más conocidos de esta familia es salinosporamida A, aislado por primera vez de *S. tropica* (Olano *et al.*, 2009¹; Eustáquio *et al.*, 2009).

2.4.4. Indolocarbazoles

La mayoría de los compuestos de esta familia contienen un núcleo característico (indolo[2,3- α]pyrolo[3,4-c]carbazol) derivado de dos unidades de triptofano y enlazados con azúcares derivados de la glucosa y metionina. Estos compuestos antitumorales tienen diferentes mecanismos de acción incluyendo daño al ADN celular o inhibiendo la proteína quinasa. La estaurosporina, es uno de los indolocarbazoles mejor conocidos, aislado de *Streptomyces sp.* (Olano *et al.*, 2009¹; Link *et al.*, 1995).

3. HIPÓTESIS

Las cepas de *Salinispora arenicola* provenientes de los sedimentos del Golfo de California son fuente de productos naturales con actividad anticáncer y con características estructurales nuevas, debido a la diversidad que sus filotipos presentan en la producción de metabolitos secundarios.

4. OBJETIVO GENERAL

Observar la diferencia en la producción de los metabolitos secundarios producidos por los filotipos A y B del actinomiceto marino *Salinispora arenicola* aislado de sedimentos del Golfo de California. Identificando aquellos compuestos con características estructurales posiblemente nuevas.

4.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Utilizar redes moleculares para comparar la producción de los metabolitos secundarios producidos por *Salinispora arenicola* tipo A y B.
- Asociar las diferencias en la producción de compuestos con la diversidad genética de los filotipos A y B.

- Identificar los compuestos con características estructurales posiblemente nuevas descartando los productos naturales conocidos y sus posibles análogos mediante las redes moleculares a partir de los extractos crudos.
- Determinar la actividad anticáncer y antibiótica de los extractos crudos de las cepas pertenecientes a los filotipos A y B de *Salinispora arencola*.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Activación y Cultivo de Cepas.

Para la realización de este trabajo se utilizaron, en total, nueve cepas del actinomiceto marino *Salinispora arenicola* aisladas de sedimento proveniente del Golfo de California. Las cepas, pertenecientes a las colecciones de actinobacterias del laboratorio de Química Marina de la Facultad de Ciencias Marinas y del Centro de Microbiología Marina y Biomedicina del Instituto de Oceanografía de SCRIPPS, fueron identificadas previamente como filotipo *A* y *B* mediante el 16 S (tabla I).

En las dos colecciones, las cepas se encontraban criopreservadas a -75° C en una solución de glicerol-medio de cultivo a una proporción 5 a 1, con glicerol al 50%. Para su activación se agregó 1mL de criopreservado en 25 mL de medio A1 (75%) en matraces erlenmeyer de 125 mL. Los cultivos se mantuvieron en agitación constante a 210 rpm. Después de 5 a 7 días se escalaron a matraces erlenmeyer de 500mL con 100 mL de medio de cultivo, agregando de 1 mL a 5 mL dependiendo de la densidad del cultivo, conservando las cepas a este volumen durante todo el experimento.

Para el cultivo en gran escala se agregaron de 10 a 20 mL del cultivo stock a cada litro de medio A1(75%), dependiendo la densidad del cultivo. Para la realización de los bioensayos y el análisis de redes, se tomaron de 1 a 5 mL del stock y se agregaron a 100 mL de medio A1 (75%) y medio A1M1 (75%).

Tabla I. Cepas de *Salinispora arenciola* tipo A y B utilizadas en los experimentos.

Cepa	Filotipo	Colección
AMS300	Tipo A	Química Marina- FCM
AMS22	“	“
AMS22B	“	“
CNH962	“	CMBB- SCRIPPS
CNH963	“	“
CNH941	Tipo B	“
CNH964	“	“
CNP193	“	“
CNP105	“	“

5.2. Preparación de Medios de cultivo.

La composición particular de los medios de cultivo utilizados es la siguiente:

Medio A1. 10 gramos de Almidón, 4 gramos de extracto de levadura y 2 gramos de peptona por litro de agua de mar (75%).

Medio A1 sólido. 10 gramos de Almidón, 4 gramos de extracto de levadura, 2 gramos de peptona y 14 gramos de agar por litro de agua de mar (75%).

Medio A1M1. 5 gramos de Almidón, 2 gramos de extracto de levadura y 2 gramos de peptona por litro de agua de mar (75%).

Para el cultivo a gran escala, se utilizó medio A1 enriquecido con sulfato férrico tetrahidratado férrico ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) a una concentración de 8g/L; adicionando 5 mL por litro de cultivo.

Después de preparados los medios, se utilizó HCl y NaOH 1 N para adecuar el pH del medio a 5.5 y 8.5. Posteriormente se esterilizaron a 15 libras de presión a 121° C durante 45 minutos.

5.3. Extracción de Compuestos.

El método de extracción orgánica de compuestos varió dependiendo de la utilización posterior que se le daría al extracto. Para los bioensayos y las redes moleculares se realizó una extracción Líquido-Líquido con acetato de etilo. Agregando 100 mL de solvente por cada 100 mL de cultivo y dejándolo en agitación durante 30 minutos a 210 rpm para luego, separar las fases orgánica y acuosa en un embudo de separación, repitiendo la operación tres veces para cada cultivo.

Por otro lado, la extracción realizada para el fraccionamiento fue a partir de cultivos a gran escala, agregando 20 gramos de resina Amberlita XAD7PH, previamente activada y esterilizada, por litro de cultivo y poniéndolo en agitación

durante toda la noche. La resina se recuperó mediante un proceso de filtrado con tela de gasa, agregando posteriormente un litro de acetona por 100 gramos de amberlita y dejándolo en agitación durante 30 minutos. Esta mezcla se filtró nuevamente, esta vez con papel filtro, agregando el mismo volumen de acetona a la resina y agitándolo de nuevo durante 30 minutos. El proceso se repitió tres veces o hasta que el solvente y la amberlita dejaran de presentar color. Una vez obtenido todo el extracto se procedió a concentrarlo mediante destilación a presión reducida con un rotaevaporador, obteniendo un extracto acuoso. El extracto acuoso se volvió a extraer esta vez utilizando acetato de etilo, agregando 100 mL de solvente por 100 mL del extracto y siguiendo el mismo procedimiento utilizado para la extracción líquido-líquido.

Ambos extractos fueron llevados hasta sequedad mediante un rotaevaporador, pesados y almacenados a -20°C , hasta su utilización.

5.4. Redes Moleculares (*Molecular Networking*).

Los extractos, previamente filtrados por una luz de malla de $0.2\ \mu\text{m}$ y disueltos en metanol grado HPLC para obtener una concentración de 1mg/mL , se analizaron mediante un espectrómetro de masas de alta resolución Q-TOF (cuadrupolo-tiempo de vuelo). En una columna de fase reversa C18, se inyectaron $2\ \mu\text{g}$ bajo las siguientes condiciones de elución: 1–5 min: 10% Acetonitrilo (0.1% TFA) en H_2O (0.1% TFA), 5–26 min: 10–100% Acetonitrilo (0.1 % TFA), 26–30 min: 100 % Acetonitrilo (0.1 % TFA). La Energía de colisión para el Q-TOF se fijó a 20 eV,

descartando los primeros 5 minutos del flujo. El rango de masas fue de 100-1700 m/z. Los datos de LC-DAD (Cromatografía líquida con un detector de arreglo de diodos) se analizaron con ChemStation (Agilent), y los datos de masas con MassHunter (Agilent).

Una vez con los datos de masas, se utilizó el programa en línea (GnPS) para la formación de las redes moleculares y el programa Cytoscape 2.8.3 18 para su visualización y análisis posterior.

La base de estándares que se utilizó para la identificación de compuestos fue la biblioteca de compuestos del Dr. Fenical, Moore y Jensen del Centro de Biotecnología marina y Biomedicina de SCRIPPS, UCSD.

También se utilizaron resultados obtenidos previamente del programa antiSMASH (antibiotics and Secondary Metabolite Analysis SHell) en el cual se analizan los genes involucrados en el metabolismo secundario, para predecir el tipo de moléculas que produce un determinado organismo. Se utilizó la información de las cepas que tienen su genoma completo descrito, *Salinispora arenicola* filotipo A CNH962 y filotipo B CNH963; CNP193, CNP105, CNH941 Y CNH964. Con la finalidad de asociar los compuestos encontrados en las redes a la diversidad genética de las bacterias y hacer una mejor comparación entre los filotipos.

5.5. Bioensayos de citotoxicidad.

Los extractos crudos se probaron contra células de cáncer de colon HCT116 y la bacteria patógena *Staphylococcus aureus* resistente a la Meticilina (MRSA), en el Centro de Microbiología Marina y Biomedicina del Instituto de Oceanografía de SCRIPPS. Las muestras se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO) para obtener una concentración de 10 mg/mL, utilizando también DMSO como control negativo. Como control positivo o testigo se utilizó Etopósido para los ensayos de HCT116 y Vancomicina (1mg/mL) como testigo del ensayo MRSA.

5.6. Fraccionamiento.

El fraccionamiento de los extractos crudos se realizó mediante cromatografía líquida flash, en una columna abierta fase reversa C8. Se utilizaron 50 mL de solvente orgánico, con las siguientes mezclas como fase móvil : Agua 100%; Agua-Metanol 3:1, Agua-Metanol 2:1, Agua-Metanol 1:1; Agua-Metanol 1:2, Agua-Metanol 1:3; Metanol 100%, Metanol-Acetato de Etilo 3:1, Metanol-Acetato de Etilo 1:1, Metanol-Acetato de Etilo 1:3; Acetato de Etilo 100% y Diclorometano 100%. Obteniendo así, un total de 12 fracciones. Cada fracción se siguió purificando de manera particular mediante cromatografía de capa fina y HPLC utilizando siempre solventes de polaridad intermedia y alta.

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Durante el tiempo de cultivo el extracto CNP105 pH 8.5 se contaminó, por lo que no hay resultados ni en las redes ni en los bioensayos sobre el extracto. Sin embargo, debido a que es una de las cepas que se tiene su genoma completo, si pudo ser utilizado en las comparaciones de diversidad genética del metabolismo secundario.

6.1. FRACCIONAMIENTO.

Los extractos crudos que se fraccionaron fueron cultivados en medio A1 y se ajustó el pH a 5.5. Obteniendo un total de 130 mg para la cepa AMS300 a partir de 3 litros de cultivo y 110 mg para la cepa AMS22 a partir de litros de cultivo.

Los extractos de la cepa AMS300 se fraccionaron por dos diferentes formas. 85 mg de los 130, se fraccionaron mediante columna abierta de fase reversa C8, flash. Se obtuvieron 12 fracciones, las cuales se llevaron a resonancia magnético nuclear de protones para su monitoreo y las más interesantes se fraccionaron de nuevo mediante cromatografía de placa fina (TLC) y con HPLC, la mezcla de los solventes de la fase móvil se muestran en la figura 3. Después de la purificación se llevaron de nuevo a ^1H -RMN, sin embargo en su mayoría las señales presentadas antes del fraccionamiento se perdieron después del siguiente paso de purificación. Esto podría deberse tanto a una desnaturalización de los compuestos, a la manera en que se realizó la separación, o más probablemente, a que la cantidad de los extractos era tan pequeña que sus señales se pierden. Aun

así una de las fracciones más interesantes es la fracción 32, que se obtuvo de la columna abierta con una polaridad de H₂O:MeOH::3:1. Esta fracción presenta aparentemente solo 2 señales que se observan una bajo luz UV de onda corta y la otra en onda larga, pero su polaridad es muy parecida y no pueden ser separadas por placa preparativa y la cantidad de extracto es muy poca para llevarse a HPLC. Se espera obtener más extracto crudo para seguir purificando la fracción 32.

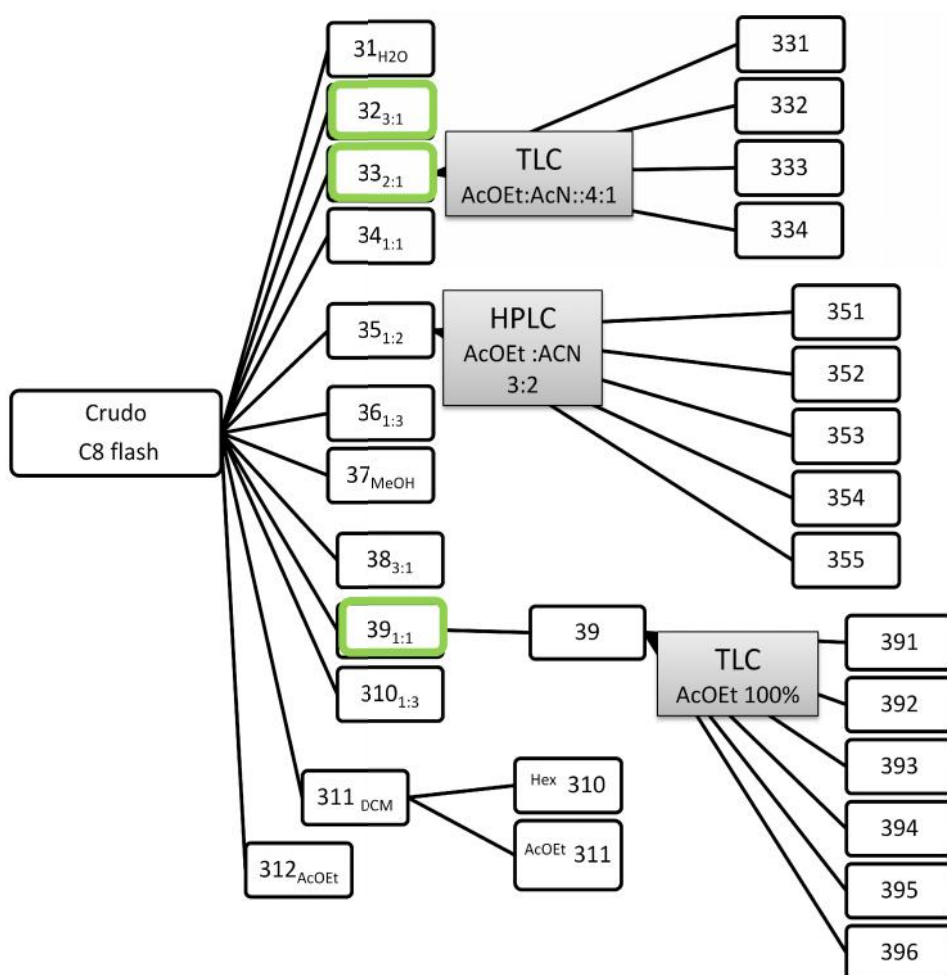


Figura 3. Fraccionamiento del extracto crudo de la cepa AMS300 cultivada a un pH de 5.5. Las fracciones que presentaron señales interesantes en ¹H-RMN se resaltan con verde.

Otra parte del extracto crudo AMS300 (45 mg), se fraccionó por gradiente utilizando acetato de etilo y una mezcla de metanol-agua 4:1 (figura 4). La fracción de metanol-agua se separó mediante HPLC, utilizando como fase móvil la misma mezcla, obteniendo seis fracciones de las cuales solamente una presentó señales en ^1H -RMN.

La fracción obtenida mediante acetato de etilo se separó por placa preparativa de capa fina utilizando una mezcla de acetonitrilo-metanol en una proporción de 9:1. Obteniendo 4 fracciones de las cuales ninguna presentó señales fuera del rango de 1 ppm, que pertenece a los protones asociados a metilos, en resonancia.

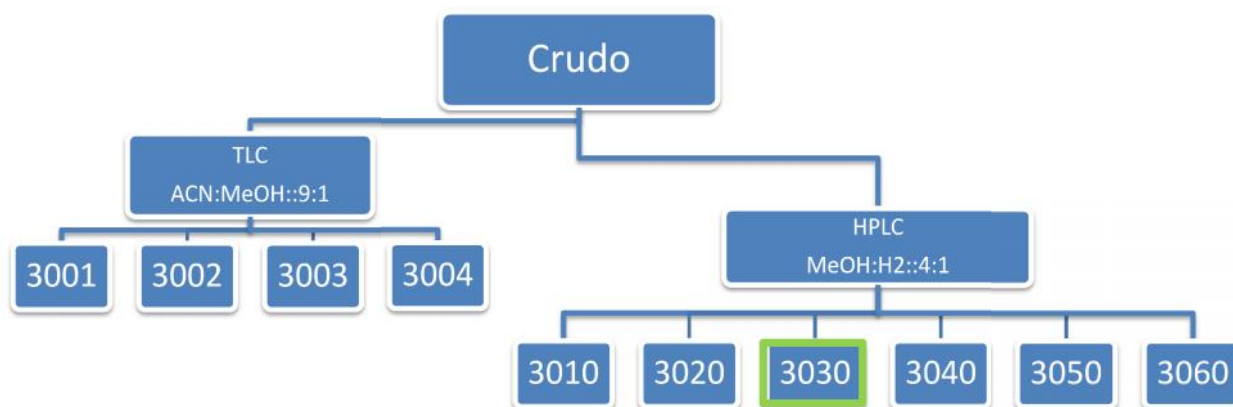


Figura 4. Fraccionamiento del extracto crudo de AMS300 cultivado a un pH de 5.5. Para esta separación no se utilizó columna abierta. Las fracciones que presentaron señales interesantes en ^1H -RMN se resaltan con verde.

La cepa AMS22 se separó mediante columna abierta fase reversa C8 flash al igual que la AMS300 y utilizando el mismo gradiente (figura 5). Se obtuvieron 11 fracciones las cuales se llevaron a resonancia magnético nuclear y de igual manera se continuó purificando aquellas con señales interesantes. Sin embargo, después de la purificación solamente en una fracción, la 22.32, se volvió a observar señales de protones.

Otra fracción interesante es la 22.9, desgraciadamente, la cantidad de muestra que se tiene es muy poca y las señales en resonancia magnética de protones se pierde entre el ruido de la línea base, por lo tanto es necesario cultivar y obtener más extracto para continuar con las separaciones y los bioensayos correspondientes.

A excepción de la fracción 22.9, todas las que presentaron señales de protones interesantes son fracciones muy polares, que se obtuvieron con mezclas de agua-metanol. Aun cuando no se logró una purificación adecuada para continuar con la elucidación de las fracciones se obtuvo información que servirá para el futuro fraccionamiento y purificación de los extractos crudos de las cepas AMS22 y AMS300.

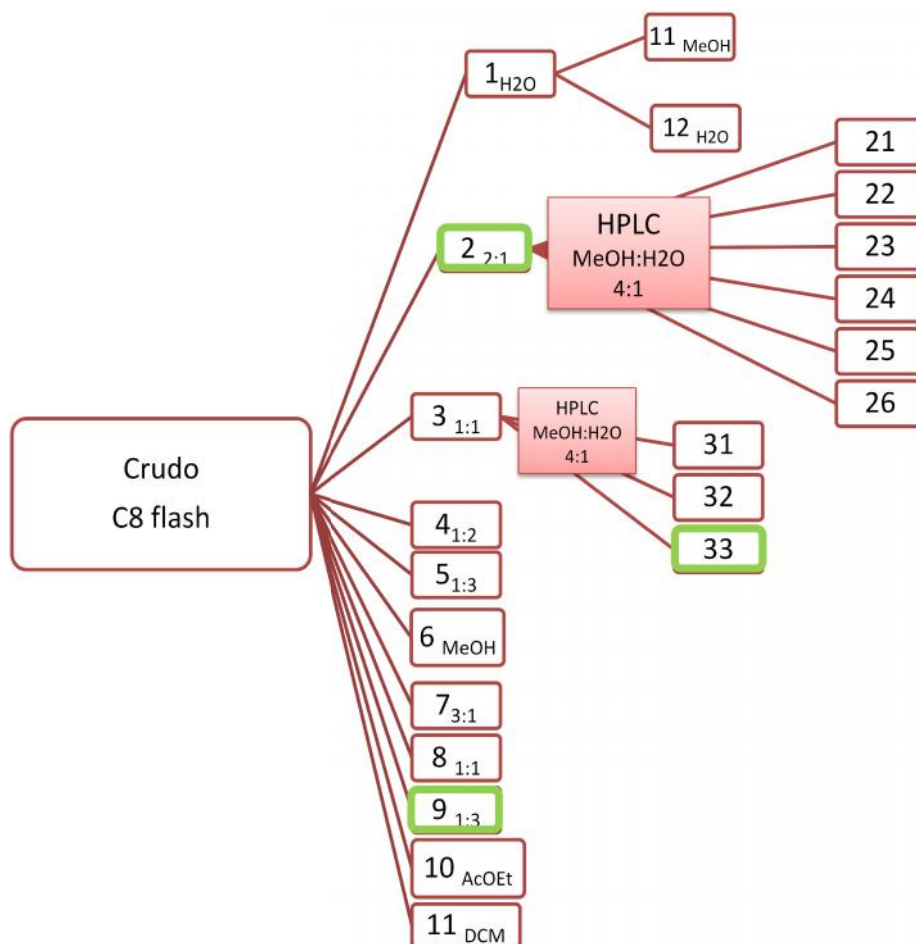


Figura 5. Fraccionamiento del extracto crudo de la cepa AMS22 por columna abierta flash utilizando sílica fase reversa C8. La cepa se cultivó a un pH de 5.5. Las fracciones que presentaron señales interesantes en ^1H -RMN se resaltan con verde.

6.2. REDES MOLECULARES (*Molecular netwoking*).

Para la primera red se utilizaron 17 extractos en total, contando los blancos de medio de cultivo. Los datos de los espectros de masas de las muestras CNH962 (pH 8.5) y CNH963 (pH 5.5) no pudieron ser utilizados por el programa, se intentó correrlos nuevamente en el instrumento sin obtener ningún cambio.

Los iones que las cepas produjeron tienen pesos moleculares de entre 105 m/e hasta 1002 m/e (figura 6), pero la mayoría con pesos alrededor de los 500 m/e.

Dentro de las familias moleculares o conjuntos de iones que llaman más la atención son las asociadas al filotipo B cultivado a un pH de 5.5, el cual está representado con nodos de color azul. Estas familias a su vez, están asociadas con los estándares Desferroxiamina E y Arenimicna B, sugiriendo la producción de compuestos análogos por este grupo filogenético. Las demás cepas cultivadas en pH 5.5 y 8.5 no forman conjuntos de iones separados de la red principal sin la interferencia del medio de cultivo (figura 7). En todas las familias moleculares separadas de la red principal se observa presencia de iones del medio de cultivo, lo que hace un tanto difícil asegurar que los compuestos asociados sean metabolitos secundarios con características nuevas.

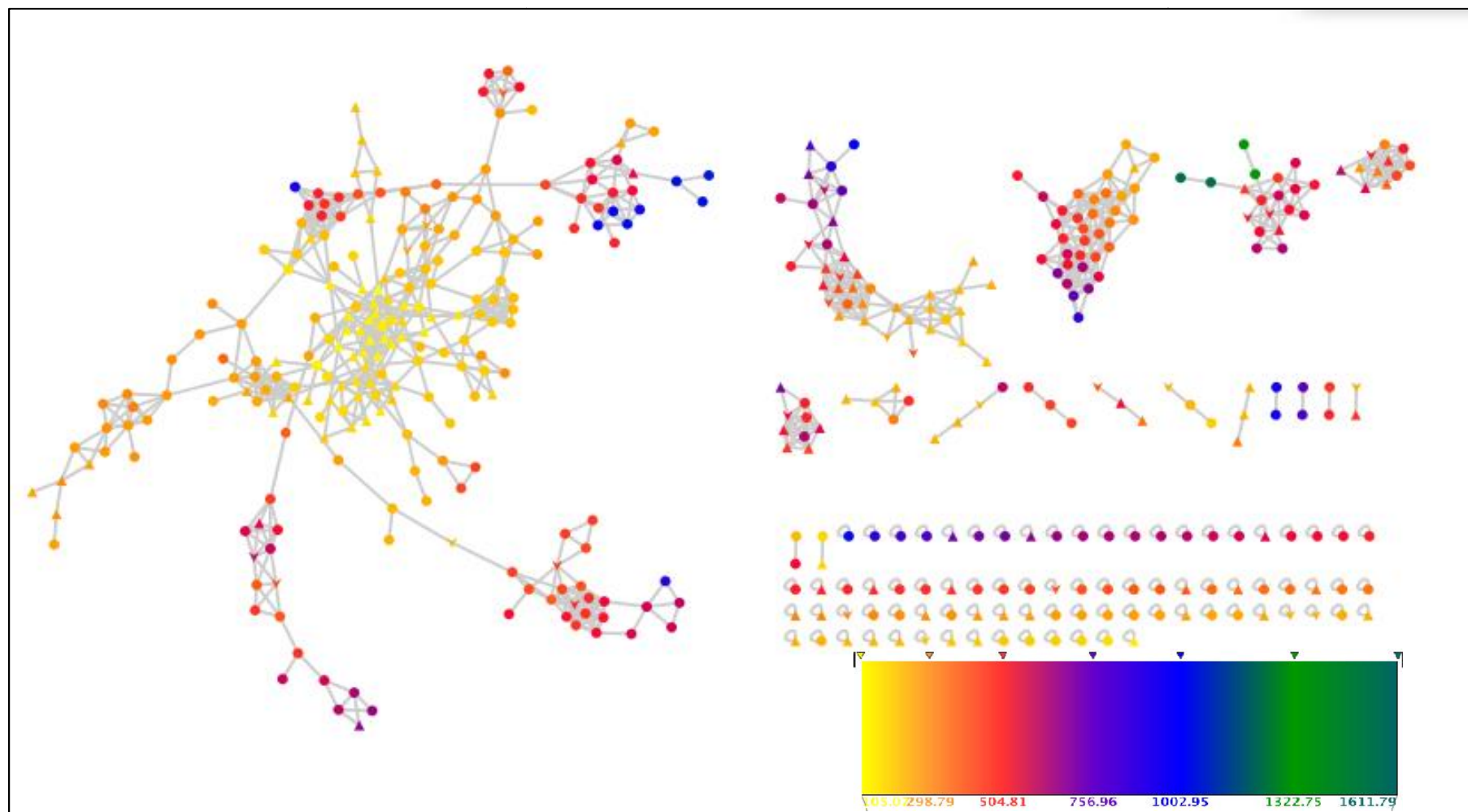


Figura 6. Red molecular, donde se comparan los iones por peso molecular. El peso molecular mínimo es de 105 m/e y el máximo de 1002m/e.

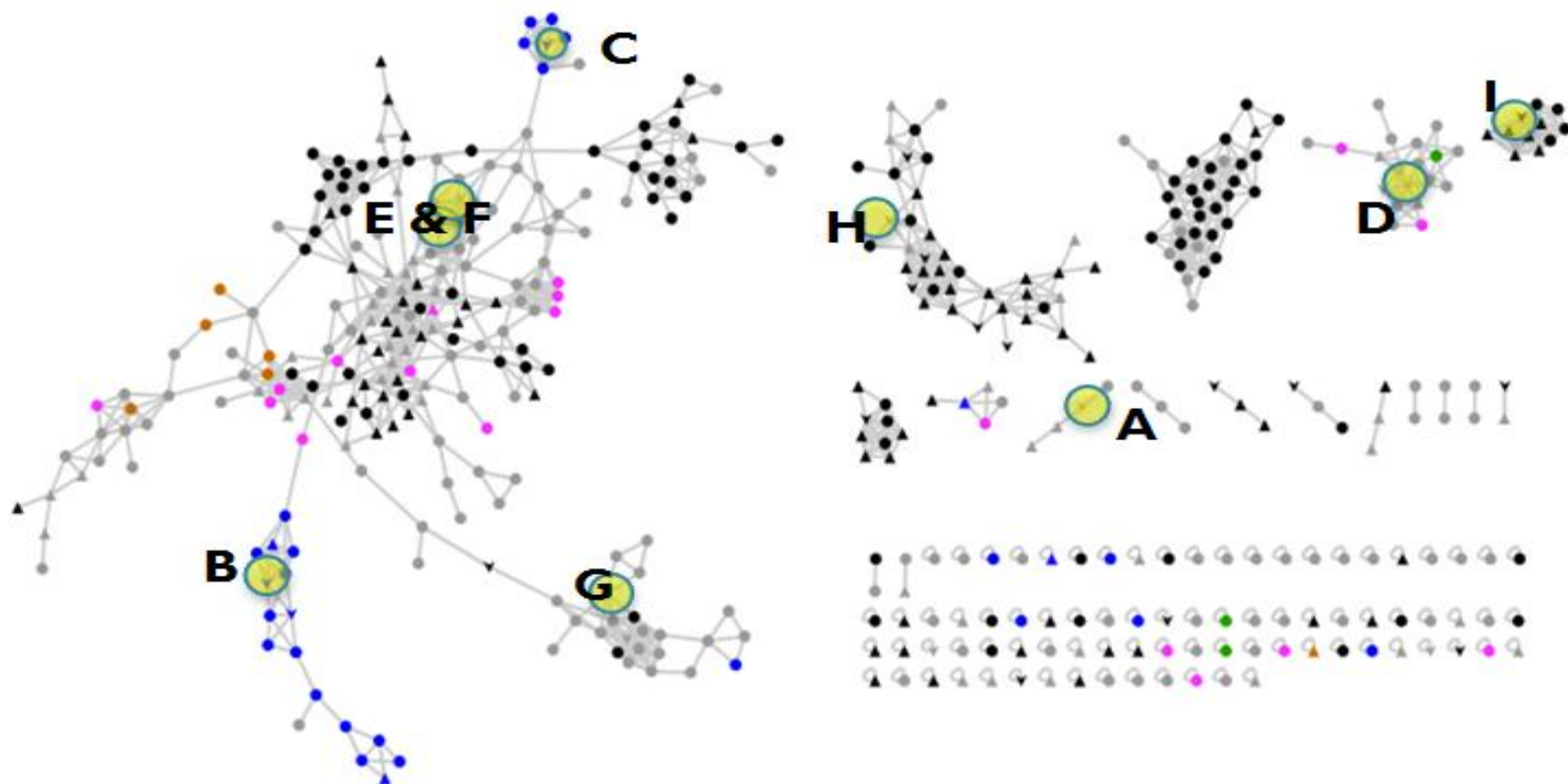


Figura 7. Red molecular comparando los filotipos A y B y las condiciones de fermentación en las que se cultivaron. Los nodos rosas representan todas las cepas de filotipo A cultivadas a un pH de 5.5. Azules, el filotipo B a un pH de 5.5. Los naranjas el filotipo A, a un pH de 8.5 y las verdes, el filotipo B a un pH de 8.5. Los nodos en color negro indican los iones que se observaron también en el medio de cultivo y los grises aquellos producidos por dos grupos o más. Las formas de los nodos representan la coincidencia con los estándares de las bibliotecas: $\blacktriangle$ =Massbank; $\blacktriangledown$ = CMBB, SCRIPPS; $\bigcirc$ =No estándar. Las coincidencias con los estándares son las siguientes: A: Salinicetal A, B: Arenimicina B, C: Desferroxiamina E, E: Estaurosporina, F: 7-OH Estaurosporina, G: Rifamicina W, H: Exumolida A, I: Piperacimicina A.

En las coincidencias con los estándares de la biblioteca del CMBB-SCRIPPS, se observa la presencia de los compuestos comúnmente reportados para *S. arenicola* tales como, Salinicetal A, Arenimicina B, Estaurospornia y 7-OH Estaurosporina y Rifamicina W. La Desferroxiamina E es un producto natural del género *Streptomyces*, pero que también se ha obtenido a partir de cultivos de *S. tropica* y *arenicola*. También el compuesto anticáncer Piperacimicina A; el cual fue aislado a partir de una cepa de *Streptomyces sp.* proveniente de la isla de Guam (Li et al., 2009). El compuesto Exumolida A, que es un compuesto fúngico, aislado por primera vez del hongo marino *Scytalidium sp.*, un hexadepsipéptido cíclico que presenta actividad antimicroalgal contra *Dunaliella sp.* de $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, en bioensayos de crecimiento en medio líquido (Jenkins et al., 1998) Cabe mencionar, que se encuentra en una familia molecular en la que todos los iones también se encuentran en el medio de cultivo, por lo que sería recomendable observar si existe reproducibilidad, comparando varias replicas de los extractos en la misma red. Sin embargo, la posibilidad de que las cepas produzcan el compuesto no es del todo improbable debido a que los hongos son uno de los mayores competidores en los sedimentos marinos y que las cepas de *Salinispora* se encuentran activas metabólicamente en el ambiente natural (Mincer et al., 2005). Esto aunado a la naturaleza química del compuesto, serían razones suficientes para seguir con la investigación de la producción de Exumolida A por *S. arenicola*

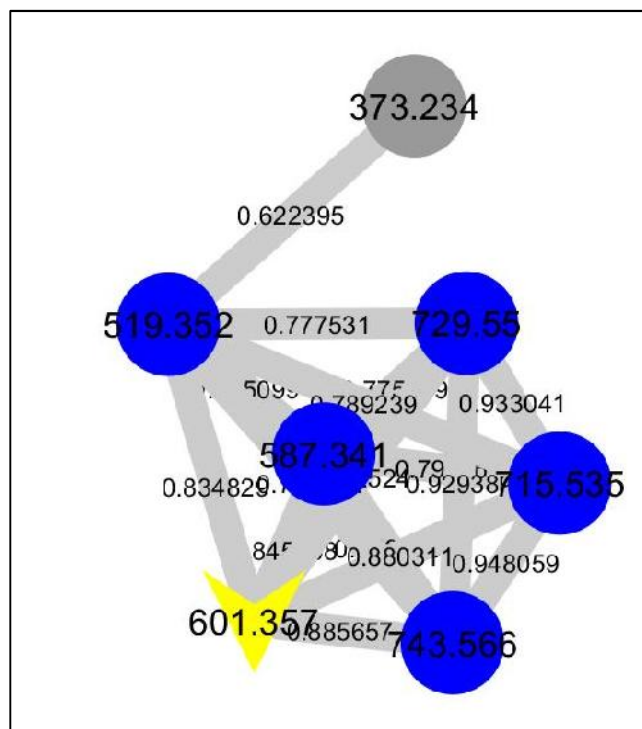


Figura 8. Familia molecular asociada al compuesto Desferroxiamina E, los nodos de color azul representan compuestos análogos producidos por el grupo perteneciente al filotipo B. El estándar está resaltado con amarillo.

En otra red, se compararon los iones producidos quitando todos aquellos encontrados también en el medio de cultivo. Gracias a esto se pudieron observar cuatro familias moleculares. Dos pertenecientes a las cepas CNH964 (*S. arenciola B*) y otras dos para las cepas AMS22 y AMS22-B (*S. arenciola A*) lo que sugiere producción de compuestos nuevos o por lo menos con características químicas diferentes ya que en las familias no se agrupa ningún ión producido por otras cepas. Para poder observar el comportamiento de estas cepas de manera más específica se volvieron a cultivar, cambiando la concentración de los nutrientes del

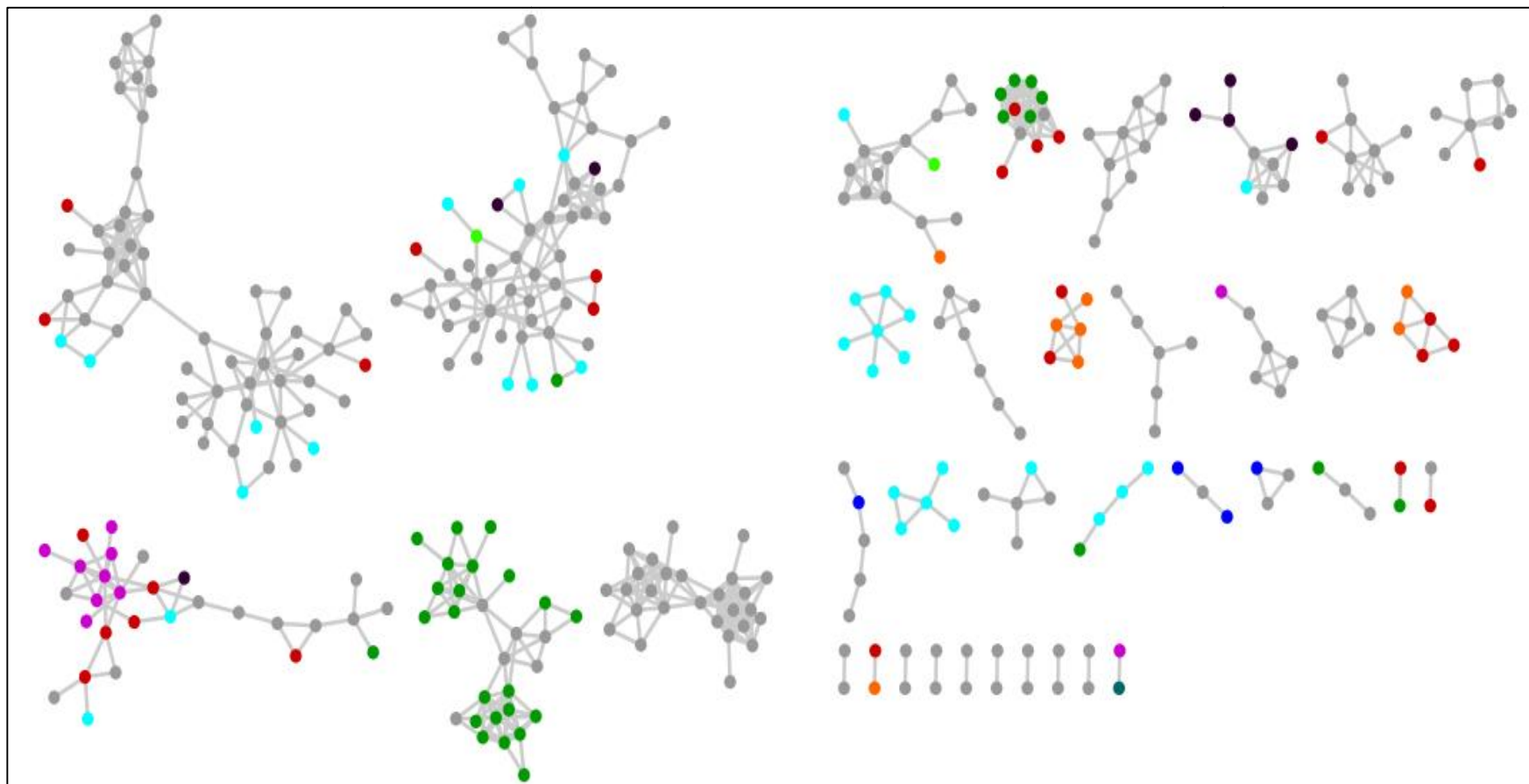


Figura 9. Red Molecular sin estándares. Se comparan los iones producidos por cada cepa, quitando todos los iones presentes en el medio de cultivo. Los nodos grises, son aquellos pertenecientes a dos o más cepas, los demás son los siguientes: ■ AMS300, ■ AMS22, ■ AMS22B, ■ CNH962, ■ CNH963, ■ CNH964, ■ CNH941, ■ CNP193, ■ CNP105.

medio de cultivo al 50%, en un intento de evitar las interferencias observadas en la red anterior.

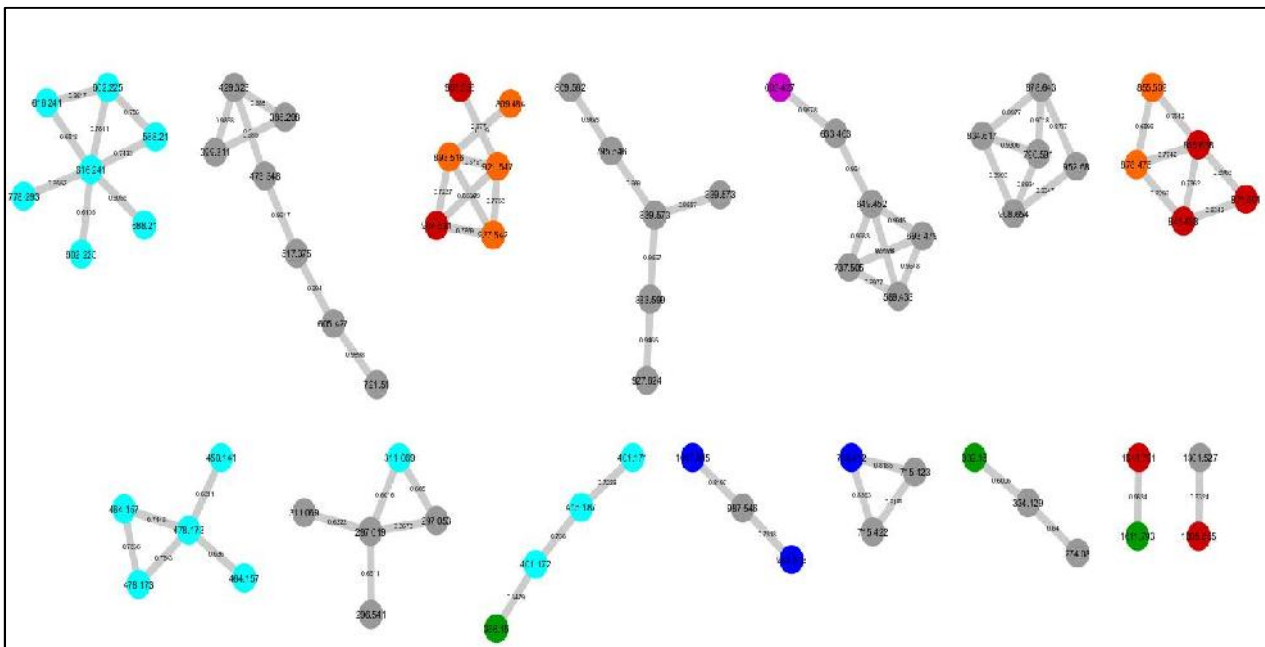


Figura 10. Familias moleculares específicas para las cepas CNH964 ■, AMS22 ■ y AMS22B ■.

Las familias moleculares de la cepa CNH964 están formadas por 7 y 5 nodos con pesos moleculares de 464 a 478 m/e y 588 a 778 m/e, respectivamente. Las pertenecientes a AMS22 y AMS22B tienen pesos alrededor de los 809 a 951 m/e, la primera, con 6 nodos y otra de 5 nodos con pesos de entre 841 a 878 m/e.

También hay una familia molecular interesante para su investigación futura, en donde se agrupan iones de las cepas CNH964 y AMS300, sin embargo, para el objetivo del estudio se prefirió no incluirla en la segunda red, y enfocarse en la

comparación de la cepa albina y su original (AMS22B y AMS22) con una de filotipo B (CNH964).

Jensen y colaboradores (2007), encontraron que en la secuencia genética del 16S rRNA, los filotipos A (CNH962, CNH963) y B (CNP105, CNP193 Y CNH964) pertenecientes al Golfo de California diferían de las demás cepas utilizadas en el estudio en la posición de un nucleótido, sin dejar de producir los metabolitos secundarios característicos de la especie. Esta aseveración nos lleva a esperar una mayor diversidad genética en las cepas del Golfo de California.

La segunda red también se comparó con la biblioteca de CMBB-SCRIPPS encontrando coincidencias con los estándares de Desferroxiamina E, Rifamicina S y W, Ciclomarina D, Salinicetal A Estaurosporina y Piperacimicina A. El peso molecular de los iones varía entre 220 m/e y 1400 m/e (fig. 12).

Por otro lado, es interesante como los nodos de la cepa albina AMS22B se agrupan de manera más cercana con la cepa CNH964, la cual es filotipo B, cuando lo que se esperaría sería un acomodo en el que coincidieran las dos cepas de filotipo A, como se observó en la primera red (fig. 10). Un ejemplo claro de este comportamiento se observa en una familia molecular bien definida perteneciente a la cepa CNH964, en la cual un ión producido por AMS22B de peso molecular 329 m/e tiene una semejanza del 0.648 con el ión de 518 m/e perteneciente al *S. arencola B* (figura 11). Si sumamos este comportamiento a la mutación que ya de por sí tiene la cepa al dejar de producir carotenos, pigmentos que le dan al género *Salinispora* su color naranja característico, favorecen la teoría de un cambio en la diversidad genética de la cepa AMS22B. Debido a esto, se planea continuar con

los estudios de los extractos de la cepa para observar si realmente produce compuestos nuevos, y si estos son interesantes para su posterior elucidación.

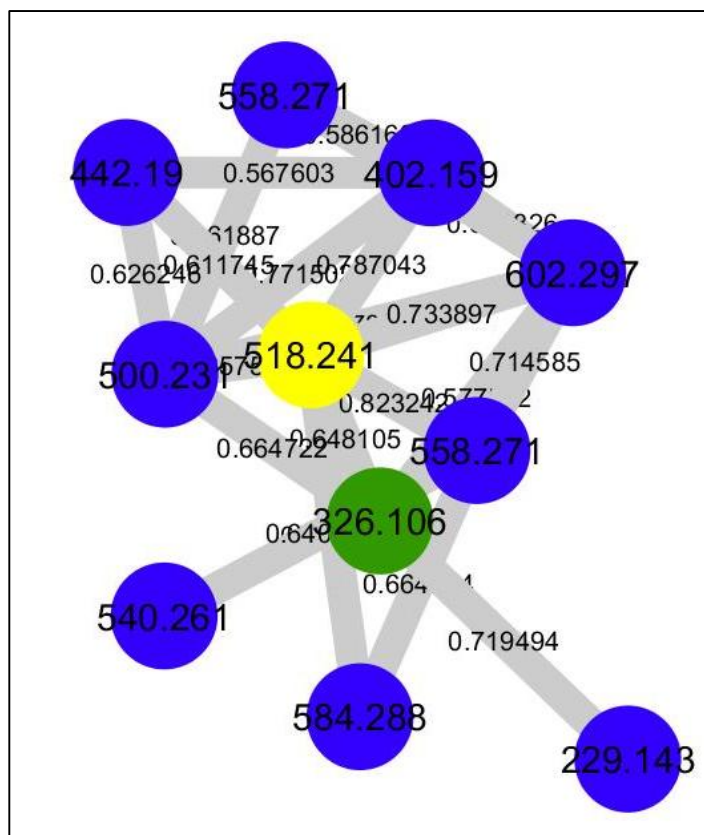


Figura 11. Familia molecular de *S. arenicola* B (CNH964), en donde se observa un ión producido por AMS22B (filotipo A), el cual tiene un valor de coseno de 0.648 con el ión de 518 m/e (amarillo).

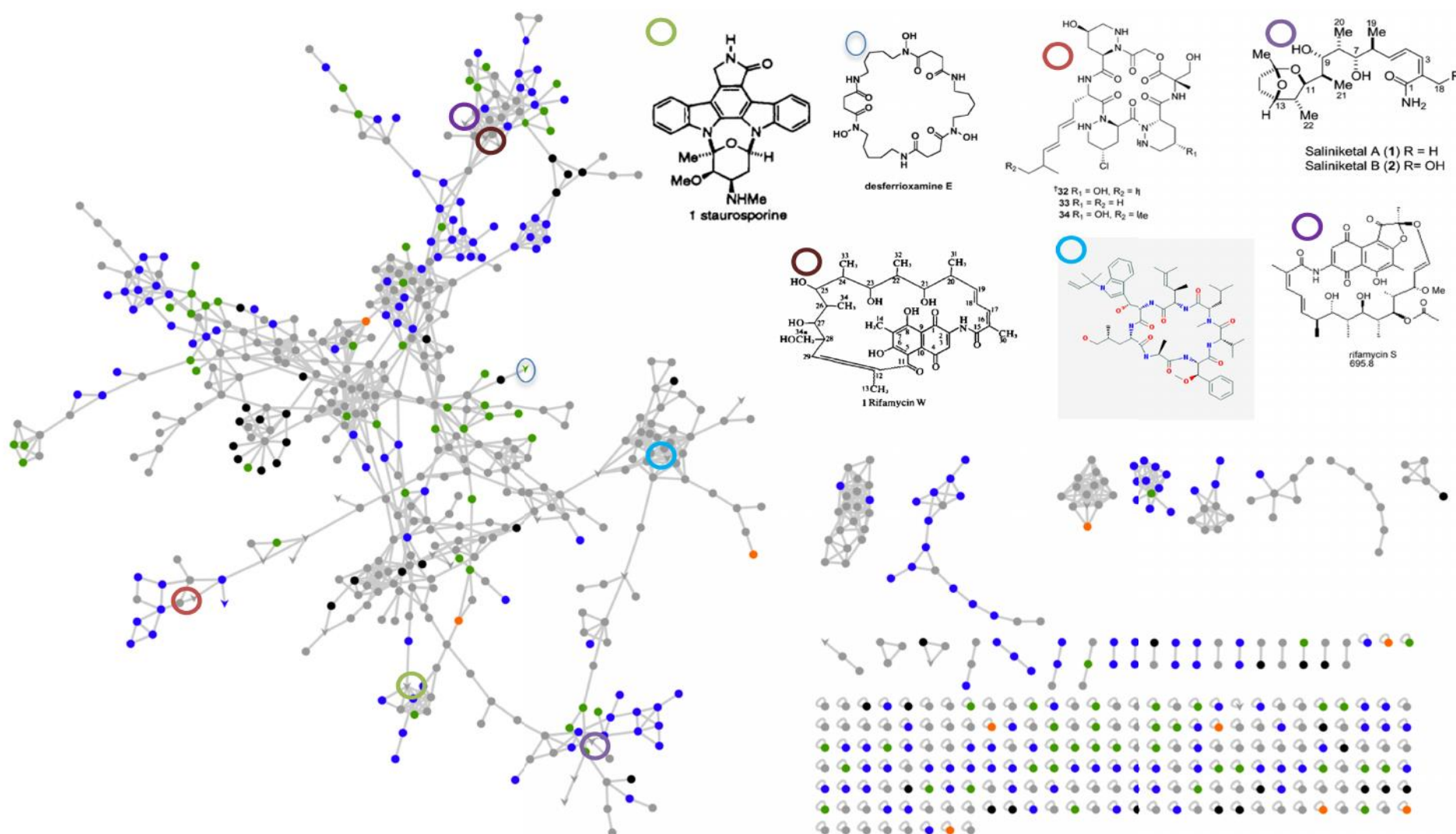


Figura 12. Red Molecular comparando las cepas de *S. arenicola alba* AMS22B (nodos verdes) con la original (nodos naranjas) y la cepa de filotipo B CNH964 (nodos azules). Los nodos color gris representan los iones producidos por dos o más grupos y los negros los encontrados en el medio de cultivo. También se muestran las estructuras de los iones que coincidieron con los estándares del CMBB, SCRIPPS y sus posiciones en la red.

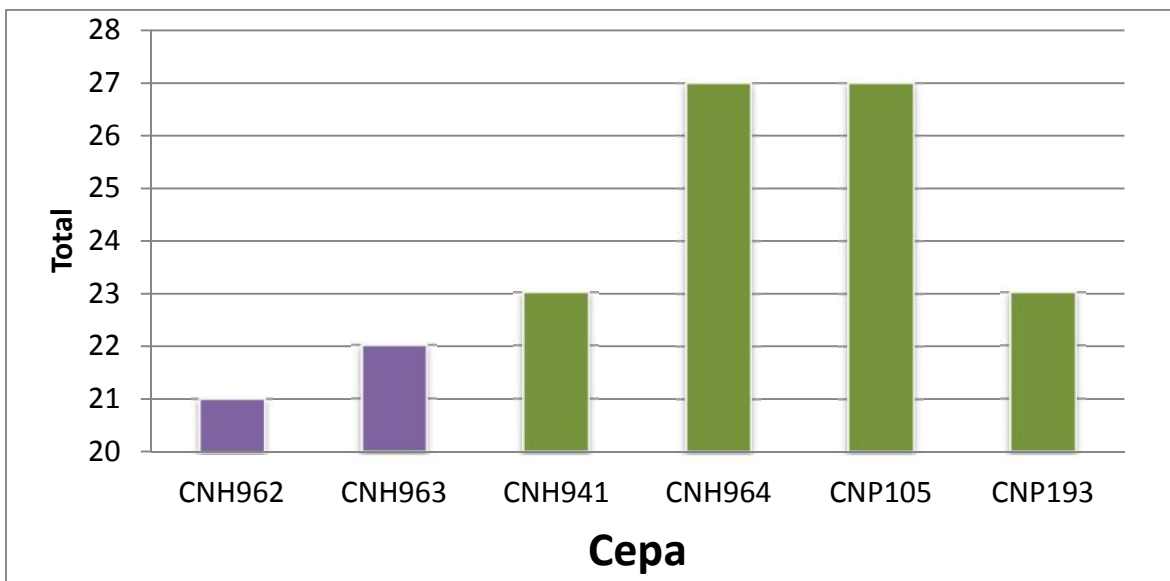


Figura 13. Total de conjuntos de genes del metabolismo secundario que presentan las cepas de *Salinispora arenicola* utilizadas en las redes moleculares. Las barras verdes indican el filotipo B y las moradas el filotipo A.

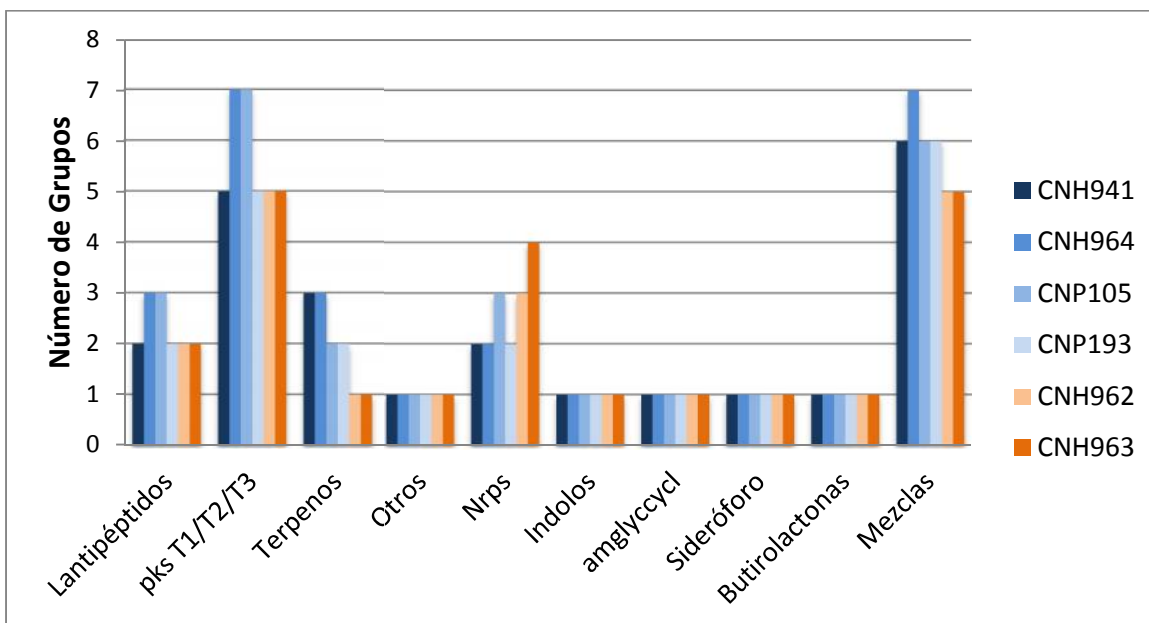


Figura 14. Número de conjuntos de genes específicos para la producción de las diferentes familias de compuestos que produce *Salinispora arenicola*. amglyccycl= aminoglicósidos / aminociclitoles.

En algunos casos en donde se ha comprobado su funcionamiento, los metabolitos secundarios pueden utilizarse como aleloquímicos, señaladores químicos, sideróforos, o en sinergia contra competidores (Berdy, 2005; Freel *et al.*, 2011). Además, ya que son susceptibles al intercambio genético horizontal, estas rutas metabólicas a veces complejas le dan a los microorganismos ciertas ventajas en el ambiente. Entonces, la cepa AMS22B, cultivada durante tanto tiempo en el laboratorio, sin interactuar con ningún otro microorganismo podría estar expresando características que las especies recién aisladas del ambiente marino no presentan, como respuesta al medio de cultivo o a las condiciones de crecimiento.

Al comparar, los genes que codifican para las diferentes familias de metabolitos secundarios de estas cepas, mediante resultados de AntiSMASH se observó que las arenciolas filotipo B presentan mayor número de conjunto de genes que las filotipo A (figura 13).

Los metabolitos secundarios que se observaron en las redes moleculares pertenecen a las familias de los policétidos (salinicetal A, Arenimicina B, Rifamicina S y W), péptidos no ribosomales (Desferroxiamina E, Ciclomarina D, y posiblemente Piperacimicina A) e indolocarbazoles (Estaurosporina).

En particular, para las familias de compuestos predichas por el análisis de antiSMASH, las cepas tipo B, presentan más grupos de genes en lantipéptidos, policétidos, terpenos y las mezclas, mientras que las cepas tipo A tienen más los conjuntos de genes de péptidos no ribosomales, Por lo que, en general, el filotipo

B tiene mayor diversidad genética que las A, y por lo tanto, tienen mayor potencial de producir productos naturales nuevos, posiblemente pertenecientes a las familias de compuestos de los que no se observaron miembros, terpenos, por ejemplo.

El hecho de que las especies de *Salinispora sp.* presenten producción de metabolitos específicos para cada especie (Jensen *et al.*, 2007), apoya la importancia del metabolismo secundario en la ecología química de los microorganismos, y por lo tanto, es de esperarse que también se encuentren diferencias asociadas a los filotipos de las especies, como lo observado en esta ocasión con *S. arenicola* A y B.

6. 3. Bioensayos de citotoxicidad.

Los extractos crudos se probaron contra células de cáncer de colon HCT116 y contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina.

Todos los extractos probados contra HCT116 presentaron concentraciones inhibitorias medias (IC_{50}) menores 12 $\mu\text{g/mL}$ a excepción de las cepas aMS300 y CNP105 cultivados a un pH de 8.5 y 5.5, respectivamente, que no tuvieron actividad significativa. Las más bioactivas fueron la cepas filotipo A, AMS22B (IC_{50} $0.3\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y CNH963 (IC_{50} $0.8\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y (fig. 15). La primera cultivada a un pH de 5.5, mientras que el extracto de CNH963 pertenece al cultivo de pH 8.5. La cepa con menor actividad en este bioensayo fue la CNH962 cultivada a pH 8.5,

también filotipo A, con 11.5 $\mu\text{g/mL}$. Dentro del grupo del filotipo B, la cepa con mayor bioactividad fue la CNP193 con 2.7 $\mu\text{g/mL}$.

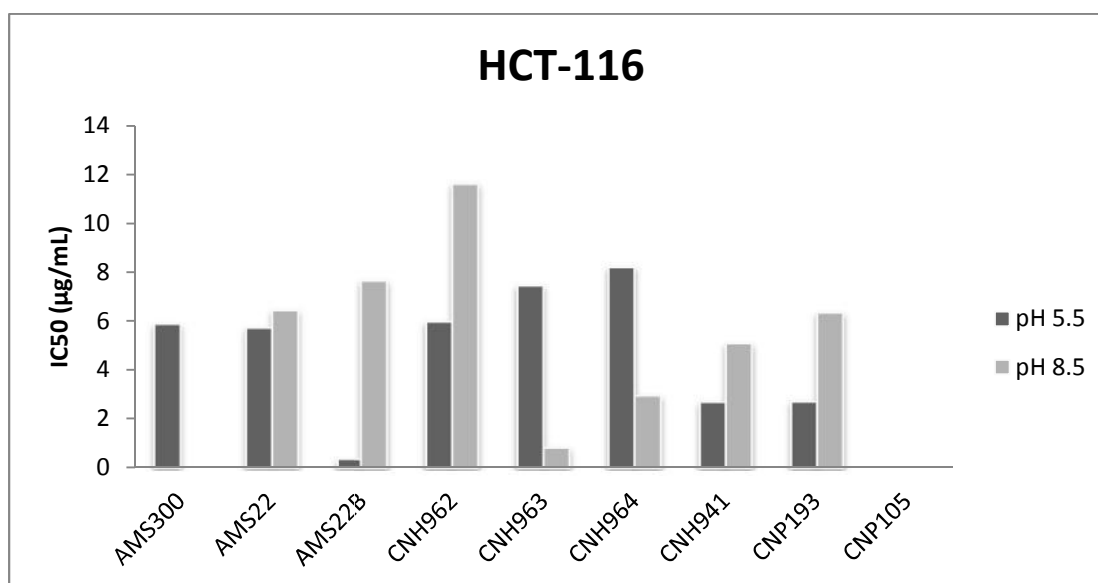


Figura 15. Concentración inhibitoria media obtenida para cada uno de los extractos crudos de las cepas de *S. arenicola*. Las barras oscuras representan el pH de 5.5 y las claras el de 8.5.

Se sabe que las cepas de *S. arenicola* B presentan el gen que codifica para la producción de Salinosporamida A y se ha reportado su presencia en cepas filotipo B de las costas de Japón (Goo, *et al.*, 2013). Para conocer si las arenicolas tipo A lo presentaban y asociar su presencia a la bioactividad encontrada contra cáncer de colon (HCT116). Y además, si se encontrara el gen, sería la primera vez para las cepas de *S. arenicola* A, se realizó una amplificación de gen SalA (fig. 16). En el cual, efectivamente solo las cepas tipo B presentaron el gen. La cepa

CNH963 tiene una señal que corre a una distancia parecida que la de SalA. Pero, a diferencia del gen de Salinosporamida A, la señal de la cepa es un poco más delgada y corre a una distancia ligeramente mayor, por lo que no se puede considerar como presencia del gen. Además, sabiendo que el *cluster* o conjunto de genes que da origen al compuesto es una mezcla entre péptidos no ribosomales y policétidos (nrps-pks) (Eustáquio *et al.*, 2009); al observar los resultados del programa AntiSMASH más de cerca, se observa que solamente las cepas filotipo B presentan este conjunto de genes.

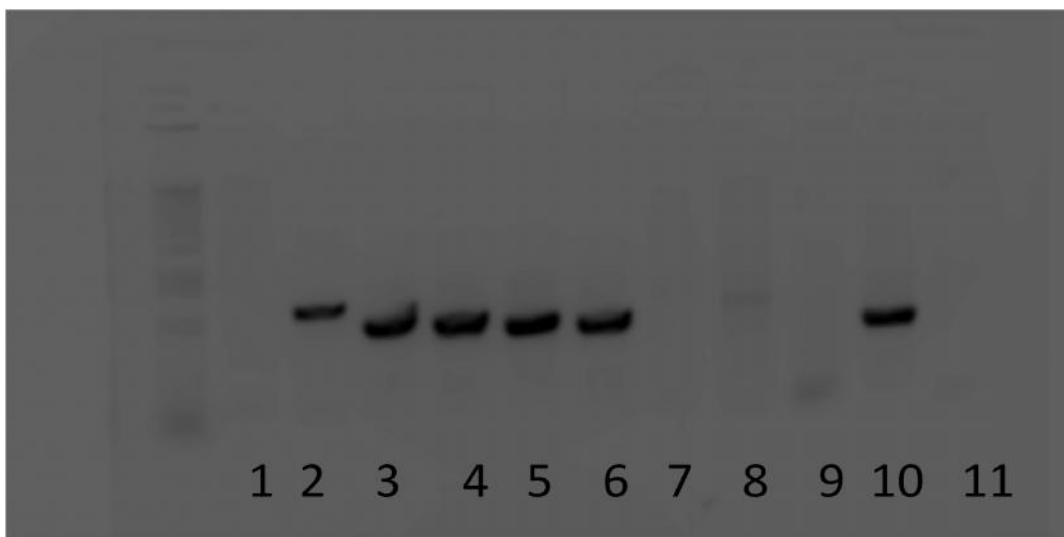


Figura 16. Amplificación y pcr del gen SalA, para la producción de Salinosporamida A.

Por otro lado, en las redes moleculares obtenidas (figuras. 7 y 12) y después de comparar con los estándares, no se observa la coincidencia con el compuesto Salinosporamida A, aun con iones en el rango de su peso molecular

(313 m/e) así que aun cuando las cepas tipo B pueden producir el compuesto, no se observó expresión del mismo durante este experimento. Las actividades observadas en los resultados contra cáncer de colon no pueden asociarse a su presencia, tampoco. Sobre todo, si se pone como ejemplo la cepa CNP105, la cual presenta el gen pero no obtuvo una actividad significativa en el bioensayo.

En el bioensayo contra *Staphylococcus aureus*, todas las cepas presentaron bioactividad, la concentración inhibitoria mínima (MIC) estuvo dentro de un rango de 1.953 µg/mL, o mayor, hasta 62.5 la menos bioactiva (tabla II). El resultado era de esperarse pues las cepas de *S. arenicola* producen el antibiótico Rifamicina y Arenimicina, con una bioactividad de 1.06 µg/mL, el segundo (Asolkar *et al.*, 2010) . No obstante, las variaciones en los valores de MIC pueden reflejar la presencia de otros compuestos con actividad antibiótica.

Debido a que las cepas producen antibióticos ya conocidos tales como la Rifamicinay Arenimicina y citotóxicos como el salinicetal A, piperacimicina A ; los resultados de bioactividad por sí solos no son suficiente argumento para esperar que las familias moleculares observadas en las redes sean compuestos bioactivos. Sin embargo es un buen indicio, ya que las cepas producen compuestos bioactivos y posiblemente los compuestos asociados a esas familias moleculares también presentarán bioactividad.

Tabla II. Concentración inhibitoria mínima (MIC) de los extractos crudos contra la bacteria patógena *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA).

NSA= Actividad no significativa.

Cepa (pH)	MIC (µg/mL)
AMS300 (5.5)	31.25-15.625
AMS300 (8.5)	31.25-15.625
AMS22 (5.5)	31.25-15.625
AMS22 (8.5)	15.625-7.813
AMS22B (5.5)	62.5-31.25
AMS22B (8.5)	62.5-31.25
CNH962 (5.5)	7.813-3.906
CNH962 (8.5)	7.813-3.906
CNH963 (5.5)	3.906-1.953
CNH963 (8.5)	<1.953
CNH964 (5.5)	<1.953
CNH964 (8.5)	<1.953
CNH941 (5.5)	<1.953
CNH941 (8.5)	7.813-3.906
CNP193 (5.5)	125-62.5
CNP193 (8.5)	7.813-3.906
CNP105 (5.5)	3.906-1.953
Blanco Medio cultivo (8.5)	NSA
Blanco Medio cultivo (5.5)	NSA

7. CONCLUSIONES.

- Del fraccionamiento realizado a los extractos crudos AMS300 y AMS22, se obtuvieron cinco fracciones que son interesantes para su posterior elucidación una vez obtenido más extracto crudo.
- El uso de las redes moleculares permite conocer de una manera sencilla la química de los metabolitos secundarios de los organismos, y disminuye el riesgo de encontrar compuestos conocidos en las últimas etapas de elucidación. Particularmente, en este trabajo, se logró observar diferencias importantes entre los filotipos de *S. arenicola* en la producción de metabolitos secundarios, derivado de su evolución genética, e identificar iones candidatos para el proceso de elucidación
- Así como las especies del género *Salinispora* producen compuestos específicos, también se observó un comportamiento parecido con los filotipos A y B de *S. arenicola*, en la producción de Desferroxiamina E y Arenimicina A, siendo solamente las cepas de filotipo B las que produjeron estos compuestos, a excepción de la cepa AMS22B, cuya producción de compuestos se asemeja más al filotipo B.
- Los extractos crudos de *S. arenicola* presentaron bioactividad contra la bacteria patógena *Staphylococcus aureus*, siendo las cepas más bioactivas la CNH963 y CNH941 y CNH964 con una concentración mínima inhibitoria

de 1.9 $\mu\text{g/mL}$ o menor. En el caso de los bioensayos contra cáncer de colon, la cepa más bioactiva fue la AMS22B con una IC_{50} de 0.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

- Los resultados obtenidos a partir de las redes moleculares y de las comparaciones de los genes del metabolismo secundario de los filotipos A y B de *S. arenicola*, sugieren una alta adaptación de la actinobacteria a su medio ambiente y reflejada en la diversidad genética que presenta y por lo tanto una fuente prometedora de metabolitos secundarios novedosos.

8. REFERENCIAS.

- Ahmed L., P. R. Jensen, K. C. Freel, R. Brown, A. L. Jones, B. Y. Kim, M. Goodfellow. 2013. *Salinispora pacifica* sp. nov., an actinomycete from marine sediments. *Antonie Van Leeuwenhoek*.103:1069-1078.
- Asolkar, R. N., K. C. Freel, P. R. Jensen, W. Fenical, T. P. Kondratyuk, E. J. Park, J. M. Pezzuto. 2009. Arenamides A-C cytotoxic NF-kB inhibitors from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *J. Nat. Prod.* 32:394-402.
- Asolkar R. N., T. N. Krkland, P. R. Jensen, W. Fenical. 2010. Arenimycin, an antibiotic effective against rifampin-and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *J. Antibiot.* 63:37-39.
- Berdy J. 2005. *Bioactive microbial metabolites* . *J. Antibiot.* 58: 1-26.
- Blunt J. W., B. R. Copp, W. P. Hu, M. H. G. Munro, P. T. Northcote, M. R. Prinsep. 2007. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 24:31-86.
- Dineshkumar K., V. Aparna, K. Z. Madhuri, W. Hopper. 2013. Biological Activity of Sporolides A and B from *Salinispora tropica*: *in silico* Target Prediction Using Ligand_Based Pharmacophore Mapping and *in vitro* activity Validation on HIV-1 Reverse Transcriptase. *Chem. Biol. Des.* 83(3):350-361.
- Donia M, M. T. Hamann. 2003. *Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents*. *Lancet. Infect. Dis.* 3:338-348.

- Eustáquio A. S., R. P. McGlinchey, Y. Liu, C. Hazzard, L. L. Beer, G. Florova, Mamoun M. Alhamadsheh, A. Lechner, A. J. Kale, Y. Kobayashi, K. A. Reynolds, B. S. Moore. 2009. Biosynthesis of the salinosporamide A polyketide synthase substrate chloroethylmalonyl-coenzyme A from S-adenosyl-L-methionine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106(30):12295-12300.
- Eustáquio, A. S., S. J. Nam, K. Penn, A. Lechner, M. C. Wilson, W. Fenical, P. R. Jensen, B. S. Moore. 2011 *The Discovery of Salinosporamide K from the Marine Bacterium "Salinispora pacifica" by Genome Mining Gives Insight into Pathway Evolution*. *Chem. Bio. Chem.*, 12:61-64.
- Feling R. H., Buchanan G. O., Mincer T. J., Kauffman C. A., Jensen P. R., Fenical W. 2003. Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinispora*. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42: 355-357.
- Freel, K. C., A. Edlund, P. R. Jensen. 2012. *Microdiversity and evidence for high dispersal rates in the marine actinomycete Salinispora pacifica*. *Environ. Microbiol.* 77:7261-7270.
- Freel K. C., S. J. Nam, W. Fenical, P. R. Jensen. 2011. Evolution of Secondary Metabolite Genes in Three Closely Related Marine Actinomycete Species. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(20):7261.
- Ginolhac A., C. Jarrin, P. Robe, G. Perriere, T. Vogel. 2005. Type I poliketide synthases may have evolved through horizontal gene transfer. *J. Mol. Evol.* 60:716-725.

- Goo K. S., M. Tsuda, D. Ulanova. 2013. *Salinispora arenicola* from temperate marine sediments: new intra-species variations and atypical distributions of secondary metabolic genes. *Antonie van Leeuwenhoek*. 105:207-19.
- Haefner B. 2003. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug. Discov. Today*. 8:536-544.
- Lam, K. S. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Opinion in Microbiology*, 9:245-251.
- Jenkins K. M., M. K. Renner, P. R. Jensen, W. Fenical. 1998. Exumolides A and B: Antimicrobial Cyclic Depsipeptides Produced by a Marine Fungus of the Genus *Scytalidium*. *Tetrahedron Letters* 39:2463-2466.
- Jensen P. R. 2010. Linking species concepts to natural product discovery in the post-genomic era. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37:219-224.
- Jensen P. R., C. Mafnas. 2006. Biogeography of the marine actinomycete *Salinispora*. *Environ. Microbiol.* 8(11):1881-1888.
- Jensen P.R., P. G Williams., D. C. Oh., L. Zigler, W. Fenical. 2007. Species-Specific Secondary Metabolite Production in Marine Actinomycetes of the Genus *Salinispora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(4): 1146-1152.
- Jensen. P. R., W. Fenical. 1996. Marine bacterial diversity as a resource for novel microbial products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 17: 346-351.
- Jensen P. R., R. Dwight , Fenical W. 1991. Distribution of actinomycetes in near-shore marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1102-1108.

- Johansen, K. T., S. G. Wubshet, N. T. Nyberg, J. W. Jaroszewski. 2011. From Retrospective Assessment to Prospective Decisions in Natural Product Isolation: HPLC-SPE-NMR Analysis of *Carthamus oxyacantha*. J. Nat. Prod. 74:2454-2461.
- Larsen T. O., J. Smedsgaard, K. F. Nielsen, M. E. Hansen, J. C. Frisvad. 2005. Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drugs discovery. Nat. Prod. Rep. 22:672-695.
- Li W., J. Gan, D. Ma. 2009. Total Synthesis of Piperazimycin A: A cytotoxic Cyclic Hexadepsipeptide. Angew. Chem. Int. Ed. 48:8891-8895.
- Link, J. T., S. Raghavan, S. J. Danishefsky. 1995. First Total Synthesis of Staurosporine and *ent*-Staurosporine. J. Am. Chem. Soc. 117:552-553.
- Magarvey N. A., Keller J. M., Bernan V., Dworkin M., Sherman D. V. 2004. Isolation and Characterization of Novel Marine-Derived Actinomycete Taxa Rich in Bioactive Metabolites. Appl. Environ. Microbiol. 70(12): 7520-7529
- Maldonado L . A., Fenical W., Jensen P. R., Kauffman C. A., Mincer T. J., Ward A. C., Bull A. T., Goodfellow M. 2005. *Salinispora arencola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 1759-1766.

- Manivasagan P. , J. Venkatesan, K. Sivakumar, S. K. Kim. 2013. Marine actinobacterial metabolites: current status and future perspectives. 168(6):311-332.
- Mansson, M., R. K. Phipps, L. Gram, M. H. G. Munro, T. O. Larsen, K. F. Nielsen, 2010. Explorative Solid-Phase Extraction (E-SPE) for Accelerated Microbial Natural Product Discovery, Dereplication, and Purification. J. Nat. Prod.73:1126-1132.
- Mincer T. J., P. R. Jensen, C. A. Kauffman, W. Fenical. 2002. Widespread and Persistent Populations of a Major New Marine Actinomycete Taxon in Ocean Sediments. Appl. Environ. Microbiol. 68 (10): 5005-5011.
- Mincer T. J., W. Fenical, P. R. Jensen. 2005. Culture-Dependent and Culture-Independent Diversity within the Obligate Marine Actinomycete Genus *Salinispora*. Appl. Environ. Microbiol.71(11): 7019-7028.
- Newman D. J., Cragg G. M. 2007. Natural Products as source of new drugs over the last 25 years. J. Nat. Prod. 70: 461-477.
- Nguyen, D. D., C. H. Wu, W. Moree, A. Lamsa, M. H. Medema, X. Zhao, R. G. Gavilan, M. Aparicio, L. Atencio, C. Jackson, J. Ballesteros, J. Sanchez, J. D. Watrous, V. V. Phelan, C. van de Wiele, R. D. Kersten, S. Mehnaz, R. De Mot, N. Bandeira, B. O. Palsson, K.. Pogliano, M. Gutiérrez, P. Dorrestein. MS/MS networking guided analysis of molecule and gene cluster families. 110(28):2611-2620.

- ¹Olano Carlos, C Méndez, J. A. Salas 2009. Antitumor compounds form marine actinomycetes. *Mar. Drugs* 7(2):210-248.
- ²Olano Carlos, C Méndez, J. A. Salas 2009. Antitumor compounds form actinomycetes: from gene clusters to new derivatives by combinatorial biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* 26:628-660.
- Smoot, M. E., K. Ono, J. Ruscheinski, P. L. Wang, T. Ideker. 2011. Cytoscape 2.8: New features for data integration and network visualization. *Bioinformatics* 27:431-432.
- Tsueng G., K. S. Lam. 2008. A low-sodium-salt formulation for the fermentation of salinosporamides by *Salinispora tropica* strain NPS21184. *Appl. Microbio. Biotechnol.* 78(5):821-826.
- Tsueng G., K. S. Lam. 2010. A preliminary investigation on the growth requirement for monovalent cations, divalent cations and medium ionic strength of marin actinomycete *Salinispora*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86:1525-1534.
- Watrous J., P. Roach, T. Alexandrov, B. S. Heath, J. Y. Yang, R. D. Kersten, M. Van der Voort, K. Pogliano, H. Gross, J. M. Raaijmakers, B. S. Moore, J. Laskin, N. Bandeira, P. C. Dorrestein. 2012. *Mass spectral molecular networking of living microbial colonies*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109(26):1743-1752.
- Williams, P. G. 2009. Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. *Trends in biotechnology.* 27:45-52.

Yang, J. Y., L. M. Sanchez, C. M. Rath, X. Liu, P. D. Boudreau, N. Bruns, E. Glukhov, A. Wodtke, R. de Felicio, A. Fenner, W. R. Wong, R. G. Linington, L. Zhang, H. M. Debonisi, W. H. Gerwick, P. C. Dorrestein. 2013. Molecular Networking as a Dereplication Strategy. *J. Nat. Prod.*, 76, 1686–1699. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*