

UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**Evaluación *in Vitro* de Actividad Antiproliferativa de Extractos
Proteicos de Tejido Estomacal de Tiburón en Células Hela.**

Tesis que para obtener el grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Presenta:

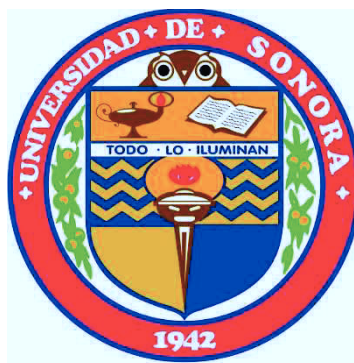
Q. B. Jesús Rafael Avila Barceló

Hermosillo, Sonora

Diciembre de 2009

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS) bajo la dirección de la Dra. María Guadalupe Burboa Zazueta con apoyo del proyecto CONACYT 83191.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biomoléculas del Departamento de Física de la Universidad de Sonora bajo la dirección de la Dra. María Guadalupe Burboa Zazueta con apoyo del proyecto SEP 2004-CO1-46749.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a dios y a mis padres por apoyarme siempre y que siempre me impulsan a seguir adelante desarrollándome personalmente y académicamente.

A la Dra. María Guadalupe Burboa Zazueta, al Dr. Miguel Ángel Valdés Covarrubias y al Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán por a verme permitido el trabajar a su lado y enseñarme nuevas cosas, por a verme brindado su amistad y por todo el apoyo que siempre me han dado.

A la Dra. Maria del Carmen Candia Plata por todo el enorme apoyo que siempre me ha dado y que siempre ha estado dispuesta a ayudar muchísimas gracias.

A la Wenona (Alma Delia Rascón Durán) por estar ami lado durante todo el desarrollo de mi trabajo, por ser una gran amiga una de las mejores, por todos y cada unos de sus consejos, regañarme y apoyarme siempre.

A Adriana Básaca, a Alejandra lopez y a Alejandra Kishi, por estar siempre a mi lado, por aconsejarme de ves en cuando y por todos los momentos que pasamos.

A la Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro por su cooperación en mi trabajo y el honor de a verla conocido.

Al Dr. Iloki, la Dra. Lewies y Ana Lillian Acosta Silva, de Rubio Pharma y Asociados, por a verme permitido trabajar en su laboratorio y brindarnos siempre la ayuda que necesitábamos, gracias a su apoyo se lograron avances en este trabajo.

A Dalia, Cecilia, Vanessa y Jorge por su amistad y apoyo muchas gracias por todo.

A todos y cada uno de las personas que en estos momentos no recuerdo pero que siempre estuvieron apoyándome y que de alguna manera directa o indirectamente han influido en mi.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMEN	v
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
General	3
Particulares	3
ANTECEDENTES	4
Cáncer	4
<u>Epidemiología del Cáncer</u>	5
Los Productos Naturales para el Tratamiento del Cáncer	7
Productos con Actividad Antiproliferativa de Tiburón	9
Ensayos de Proliferación Celular	9
MATERIALES Y MÉTODOS	12
Obtención del Extracto Crudo	12
Cromatografía de Filtración en Gel	12
Separación de Proteínas (Amicon Ultra-4)	13
Determinación de Proteína	13
Línea Celular	13
Evaluación de la Proliferación Celular por el Método del MTT	14
Prueba de Viabilidad con Azul de Tripan	16
Electroforesis en SDS-PAGE	16

Análisis Estadístico	16
RESULTADOS Y DISCUSIONES	17
Fracciones por Cromatografía de Filtración en Gel	17
Electroforesis de las Fracciones Obtenidas por Cromatografía de Filtración en Gel	17
Evaluación de la Actividad Antiproliferativa de las Fracciones en la Línea Celular HeLa	21
Efectos sobre la Viabilidad Celular	29
CONCLUSIONES	30
RECOMENDACIONES	31
BIBLIOGRAFÍA	32

LISTA DE TABLAS

Tablas	Página
I.- Pesos Moleculares de las Bandas Proteicas de las Fracciones 1 y 2 obtenidos por Electroforesis en SDS-PAGE	20

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1.- Gráfica de Mortalidad por Neoplasias hasta el Año 2007 a Nivel Nacional	6
2.- Células de la Línea Celular HeLa (ATCC)	15
3.- Separación Cromatográfica de Extracto Crudo de Tejido Estomacal De Tiburón mediante Filtración en Gel (Sephadex G-25)	18
4.- Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) de la Fracción 1 y 2	19
5.- Actividad Antiproliferativa de la Fracción 1 obtenida por Cromatografía de Filtración en gel	23
6.- Actividad Antiproliferativa de la Fracción 2	24
7.- Actividad Antiproliferativa de la Fracción 3	25
8.- Actividad Antiproliferativa de las Fracciones obtenidas por Filtración en Membrana de 30 kDa	28

RESUMEN

El cáncer es una de las enfermedades más importantes a nivel mundial y una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en niños y adultos. Por tal razón muchas de las investigaciones en este campo están enfocadas en la búsqueda de productos que sean una opción a los tratamientos existentes.

Los agentes anticancerígenos pueden derivarse del aislamiento de organismos que se encuentran en la naturaleza. Así, han sido aislados compuestos de estómago y cartílago de tiburón, los cuales exhiben actividad antiangiogénica y antitumoral (Rao y col., 1999; Higgins y col., 2000; Hao y col., 2003), por lo que en esta investigación se evaluó la actividad antiproliferativa de extractos proteicos de estómago de tiburón (*Mustelus henlei*). Se obtuvo un extracto crudo del estómago (isopropanol al 60 % y 1 % de ácido trifluoroacético) del cual se separaron 3 fracciones proteicas utilizando cromatografía de filtración en gel (Sephadex G-25). El efecto antiproliferativo de las fracciones proteicas sobre la línea celular HeLa fue evaluado utilizando el ensayo de MTT. La fracción con mayor efecto antiproliferativo se sometió a una separación de proteínas utilizando Amicon Ultra-4, obteniendo una fracción de proteínas > 30 kDa y otra de proteínas < 30 kDa,. Se evaluó el efecto antiproliferativo de estas nuevas fracciones con el ensayo antes mencionado.

En nuestro estudio se encontró que la fracción uno obtenida mediante cromatografía de filtración en gel, mostró un 41% de inhibición de la proliferación de la línea celular HeLa, la fracción 2 una inhibición del 36 %, y de 34 % para la fracción 3 ($p < 0.05$). Al ser la fracción 1 la que poseía mayor efecto inhibitorio del crecimiento celular, se sometió a la separación con Amicon Ultra-4. Después de ser tratadas las células HeLa con las fracciones obtenidas de la separación con Amicon, se observó que la fracción que contenía las proteínas < 30 kDa mostraban una inhibición de la

proliferación en un 14 %, mientras que para la fracción con proteínas > 30 kDa inhibieron en un 36 %. Se llevó a cabo una prueba de viabilidad celular utilizando esta última fracción y se encontró que aproximadamente el 98 % de las células se encontraban viables, por lo que probablemente el efecto inhibitorio de estas proteínas > 30 kDa lo lleva a cabo por mecanismos diferentes a la muerte celular, arretando o retardando el ciclo celular.

En conclusión en este trabajo se obtuvo una fracción con efecto antiproliferativo hacia la línea celular HeLa. Esta Fracción ayudará de manera importante en el desarrollo de futuras investigaciones encaminadas a conocer el mecanismo por el cual ejerce el efecto inhibitorio de las células, caracterizar bioquímica de las proteínas responsables de dicha actividad, así como evaluar el uso de éstas en ensayos con otras líneas celulares.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es un desorden celular que se forma cuando una célula somática experimenta algún cambio genético que le permite proliferar en situaciones en las que normalmente no ocurriría su multiplicación continua; casi todos los tipos de cáncer presentan una desprogramación y descontrol del mecanismo de proliferación celular, así como una supresión del o los mecanismos normales que conducen a la muerte celular, además de ser capaces de evadir los mecanismos de defensa del huésped (Lugo, 2003). Así mismo, las células hijas heredan su carácter maligno y las propiedades invasoras sobre tejidos y órganos (Abbas, 1998).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que en el 2005 se registraron 7.6 millones de defunciones debido al cáncer; además, más del 70 % de todas las muertes por cáncer se produjeron en los países de ingresos bajos y medios. También, los tumores malignos ocuparon el tercer lugar en la lista de las principales causas de defunción en el país, en el 2007, lo que representó el 12.9 % del total de defunciones registradas en el año (INEGI, 2008).

Desafortunadamente, los medicamentos y las terapias que se utilizan no son totalmente efectivas, y además, los tratamientos que matan células cancerosas generalmente son tóxicos para las células normales. De esta manera, la biotecnología marina ha provisto de una gran variedad de productos anticancerígenos como la citarabina que es un análogo sintético de nucleósidos proveniente de esponjas (Cragg y Newman, 1999; Schwartzmann, 2000), así como depsipéptidos cíclicos, alcaloides, tetrahidroisoquinolinas (ecteinascidina), entre otros compuestos provenientes de una gran gama de organismos marinos como los tiburones (Rinehart, 2000; Bai y col., 1990; Poncet, 1999; Delalogue, 2001; Pettit, 1982; Wender y col., 1999; Rocha y col., 2001; Jimeno, 2002; Haefner y Burkhard, 2003; Schwartzmann y col., 2001; Mayer y Gustafson, 2003;).

A la fecha existen escasos estudios de compuestos con actividad biológica obtenidos de tiburón. Entre ellos, la escualamina es un aminosterol aislado a partir del estómago de tiburón *Squalus acanthias*, compuesto que exhibe actividad antiangiogénica y antitumoral (Rao y col., 1999; Higgins y col., 2000; Hao y col., 2003). Además, recientemente se han identificado proteínas de bajo peso molecular (10 kDa) con propiedades antiangiogénicas (Rabbani y col., 2008; Hao y col., 2003). Por lo que el objetivo central de nuestro trabajo fue evaluar la actividad antiproliferativa de extractos proteicos de tejido estomacal de tiburón proveniente del Mar de Cortés, sobre la línea celular HeLa proveniente de tumor de cáncer cérvico-uterino.

OBJETIVOS

General

Evaluar actividad antiproliferativa de extractos proteicos de tejido estomacal de tiburón en células HeLa.

Particulares

- Obtener extractos proteicos de tejido estomacal de tiburón
- Evaluar actividad antiproliferativa de fracciones proteicas obtenidas mediante cromatografía de filtración en gel
- Determinar pesos moleculares de proteínas con actividad antiproliferativa mediante electroforesis en gel de poliacrilamida

ANTECEDENTES

Cáncer

La proliferación celular es un proceso altamente controlado, permitiendo que las células se multipliquen, aumentando su contenido de moléculas y organelos, duplicando sus cromosomas, para posteriormente dividirse en dos células genéticamente iguales. Generalmente, las células se dividen con una periodicidad óptima para el correcto mantenimiento y funcionamiento del organismo. (Alberts, 1996) Pero en ocasiones, este proceso ordenado de división de células se descontrola y células nuevas se siguen formando cuando el cuerpo no las necesita. Cuando esto sucede, las células viejas no mueren cuando deberían morir, y pueden formar una masa de tejido, llamada tumor (National Cancer Institute).

El ciclo celular normal posee una gran diversidad de puntos de control, que permite que éste ocurra de manera adecuada. Estos puntos de control sirven de freno durante el ciclo, asegurando que una fase no se inicie antes de que la anterior haya finalizado y permiten, además, el manejo del ciclo a través de señales externas. Todo esto indica que existe un control fino y preciso del metabolismo celular. De acuerdo a este marco de referencia, el cáncer es una enfermedad genética, ya que todas las células cancerosas contienen alguna alteración en la expresión genética; se ha observado que en casi todos los tipos de cáncer se presenta una desprogramación y descontrol del mecanismo de proliferación celular, así como una supresión del o los mecanismos normales que conducen a la muerte celular (Lugo, 2003).

El cáncer es un conjunto de enfermedades ya que existen 100 tipos diferentes de cáncer y se clasifica de acuerdo al tejido y según el tipo celular a partir del cual se origina. Los cánceres procedentes de células epiteliales se denominan carcinomas;

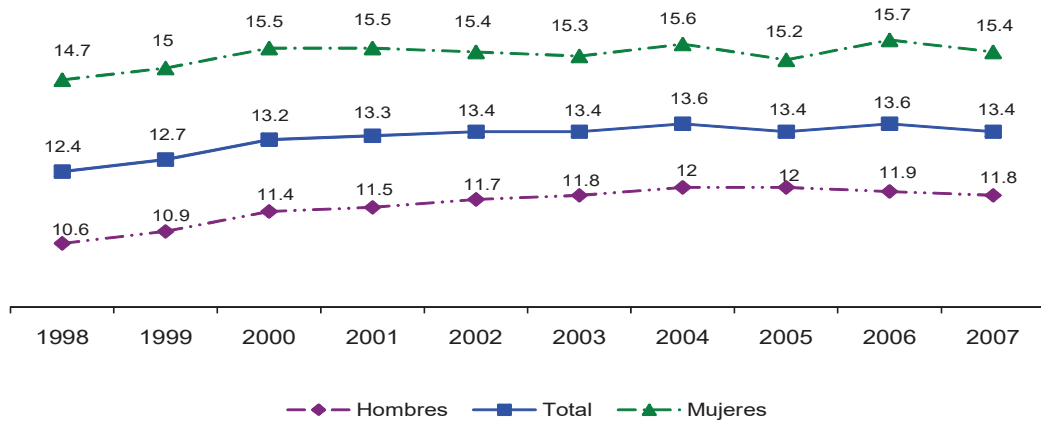
los que proceden de tejido conjuntivo o de células musculares se denominan sarcomas. Mientras que los que no encajan en ninguna de estas dos se encuentran las diversas formas de leucemia (Alberts, 1996).

Epidemiología del Cáncer

A nivel mundial, el cáncer es la principal causa de mortalidad, se le atribuyen 7.9 millones de defunciones ocurridas en el año 2007 (OMS), representó la tercera causa de muerte entre las mujeres con 35,303 defunciones (15.4%), mientras que en los hombres fue la cuarta con 33,509 muertes (11.8%) (INEGI, 2008); además, más del 70 % de todas las muertes por cáncer se producen en los países de ingresos bajos y medios, donde los recursos disponibles para la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad son limitados o inexistentes, La OMS estima que alrededor de 84 millones de personas morirán a causa de esta enfermedad entre 2005 y 2015.

En México, durante 2007 se registraron 514,420 defunciones, 55.4% fueron hombres y 44.6% de mujeres; de estas muertes, los tumores malignos ocuparon el tercer lugar entre las principales causas de muerte del país con 68,815 casos (13.4%). Los tres principales tipos de cáncer que causaron defunciones en las mujeres fueron el de mama (13.8%), cuello del útero (12.1%) e hígado (7.6%) (INEGI, 2008).

Porcentaje de defunciones por tumores malignos por sexo según año de ocurrencia, 1998-2007



Nota: El porcentaje está en relación con el total de defunciones registradas en cada año, en general y por sexo.
 Fuente: INEGI. Estadísticas Vitales, 1998-2007. Bases de datos.

Figura 1. Gráfica de mortalidad por neoplasias hasta el año 2007 a nivel nacional. Se muestran los casos de mortalidad en mujeres y hombres así como la mortalidad total, se observa que las defunciones por tumores malignos tienden a incrementarse, siendo las mujeres las que presentan los porcentajes más altos (INEGI 2008)

Los Productos Naturales para el Tratamiento del Cáncer

El cáncer es una enfermedad agresiva y mortal si no se detecta en sus etapas tempranas y se ataca con un tratamiento adecuado, ya que estas células son difíciles de erradicar. Desafortunadamente, los medicamentos y las terapias que se utilizan no son completamente efectivas, y además de su alto costo económico, producen diversos efectos secundarios que desgastan al paciente tanto física como emocionalmente. También, los tratamientos que matan células cancerosas generalmente son tóxicos para las células normales. En su mayoría, los métodos actuales aprovechan diferencias relativamente sutiles existentes entre las células normales y las neoplásicas como lo son su velocidad de proliferación, su metabolismo y la sensibilidad a la radiación. Por estas razones, se realizan investigaciones para la búsqueda de compuestos de origen natural que inhiban la proliferación de las células cancerosas (Amador y *col.*, 2003; Donia y Hamann, 2003).

En la naturaleza abunda un rico potencial de recursos terapéuticos que puede brindar un beneficio como tratamientos hacia enfermedades que afectan al humano; se ha demostrado que estos agentes tienen una gama de formas diferentes así como funciones o utilidades (Banerjee y *col.*, 2007; Pettit, 2009). Así, muchos de estos productos farmacéuticos han sido aislados a partir de productos naturales como plantas, animales, organismos marinos, y microorganismos, ejemplos de éstos que son usados como agentes anticancerígenos son: paclitaxel, derivado de plantas, bleomicina y doxorubicina provenientes de microorganismos; dolastina 10 son de origen marino (Farnsworth y *col.*, 1985; Cragg y *col.*, 1997; Rocha y *col.*, 2001; Viuda y *col.*, 2008).

Aunque los compuestos marinos están insuficientemente representados en la farmacología actual, se prevee que el medio ambiente acuático se convertirá en una valiosa fuente de nuevos compuestos en el futuro. El ecosistema marino representa el 95% de la biosfera, y todos excepto uno de los 33 phyla animales están representados

en los ambientes acuáticos. La mayoría de invertebrados marinos contienen un sistema inmunológico primitivo y producen sustancias químicas tóxicas como una forma de defensa. Muchos de estos productos actúan como reguladores de las funciones biológicas específicas. Algunos de ellos tienen actividad farmacológica debido a su interacción específica con receptores y enzimas. Debido a que estas sustancias se diluyen inmediatamente por los grandes volúmenes de agua de mar, tienen que ser muy potentes, y también tienen que mantener una solubilidad relativamente baja (Amador y col., 2003).

La biotecnología marina ha provisto de una inmensa variedad de productos anticancerígenos provenientes de una gran gama de organismos marinos, como medusas, tiburones, corales, esponjas, microalgas, moluscos; muchos de los productos derivados de organismos marinos se utilizan en tratamientos para el cáncer, en fase preclínica, particularmente para ser usados en combinación con la quimioterapia. (Rocha y col., 2001; Jimeno, 2002; Haefner y Burkhard, 2003; Schwartzmann y col., 2001; Mayer y Gustafson, 2003). Las proteínas, como ya se mencionó anteriormente, también poseen actividad antiproliferativa, ya que se han encontrado péptidos de diferentes especies marinas con dicha propiedad; algunos ejemplos son péptidos lineales y depsipéptidos con actividades muy variadas, sobre moléculas blanco para llevar a cabo su actividad (tubulina, proteína quinasa C, etc) (Simmons y col., 2005).

Algunos compuestos aislados de tiburón han sido utilizados como anticancerígenos, específicamente como antiangiogénicos. El proceso de angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos y es fundamental para el crecimiento del tumor, por lo que se crean tratamientos basados en la inhibición de la formación de nueva vascularización (Schiller y Bittner, 1999; Rabbani y col., 2008).

Productos con Actividad Antiproliferativa de Tiburón

Los tiburones han mostrado tener compuestos que presentan propiedades biológicas como: antimicrobianas, antifúngicas, antiproliferativas, entre otras (Akhter y col., 1999; Ken y col., 1997; Moor y col., 1993). La escualamina es un aminosterol que es aislado a partir del estómago de tiburón *Squalus acanthias*, y es un compuesto que exhibe significativa actividad contra bacterias gram negativas y positivas (Chen y col., 2006; Moore y col., 1993; Rao y col., 2000; Higgins y col., 2000; Hao y col., 2003).

El cartílago de tiburón es una fuente natural de compuestos con actividad antiangiogénica y que pudieran ser usados en el tratamiento de cáncer, psoriasis, osteoartritis, etc. Resultados previos sugieren que el cartílago de tiburón contiene agentes anti-inflamatorios, inmunoestimuladores y también puede sanar heridas (Bargahi y Rabbani, 2008). Recientemente se han identificado que proteínas de bajo peso molecular (10 kDa) son las responsables de la propiedad antiangiogénica (Rabbani y col., 2008; Hao y col., 2003).

Ensayos de Proliferación Celular

La detección de la viabilidad y proliferación celular es crucial en muchos campos de la biología, por ejemplo, en toxicología, en la farmacología, así como en ecotoxicología para la evaluación de los efectos tóxicos provocados por sustancias químicas, drogas, así como para el estudio de nuevos compuestos con uso potencial como medicamentos, respectivamente. La necesidad de una prueba confiable, fácil de manejar y rápida, ha llevado al desarrollo de varios ensayos que ahora se utilizan habitualmente, y que están disponibles para detectar los efectos citotóxicos de los sistemas celulares *in vitro*.

Un ensayo utilizado es el lactato deshidrogenasa (LDH). Se trata de un ensayo colorimétrico basado en la detección de actividad de la LDH, que se libera desde el citoplasma de las células dañadas o lisadas. Así, la evaluación de la citotoxicidad se basa en la integridad de la membrana plasmática. Es una técnica no destructiva, ya que la medición se puede realizar utilizando el medio de cultivo. En este ensayo, esta involucrada una sal de tetrazolio, INT (2-[4-iodofenil]-3-[4-nitrofenil]-5-cloruro feniltetrazolium), involucrada en la reacción colorimétrica. Lateralmente a la oxidación del lactato a piruvato, INT se transforma a formazán que puede ser detectada espectrofotométricamente. Otra posibilidad es medir directamente la formación de NADH por absorción. Dado que la LDH es una enzima relativamente estable, el medio de cultivo también puede ser almacenado antes de realizar la medición (Bopp y Lettieri, 2008).

Otro ensayo es el Azul de Alamar (AB), el cual mide la actividad metabólica celular. El ensayo de AB se basa en la conversión de la resazurina (tinte azul no fluorescente), que es convertida por las enzimas mitocondriales y otras a la resorufin (rosa fluorescente). Resorufin puede ser detectado por espectrofotometría o fluorometría. Dado que ambos, la resazurina sustrato oxidado y el resorufin producto reducido, son solubles en agua, se pueden difundir libremente a lo largo de gradientes de concentración. Además, AB no muestra los efectos citotóxicos y las células a probar no son destruidas, lo que permite realizar varios ensayos o mediciones cinéticas en el mismo conjunto de células (O'Brien y col., 2000).

CFDA-AM (5-carboxifluoresceína diacetato acetoximetil éster) es otro fluorogéno que se utiliza para estudios de citotoxicidad. El CFDA-AM es un sustrato no tóxico de la esterasa, que puede ser convertido por las esterases no específicas de las células vivas a carboxifluoresceína (CF). La conversión a CF por las células indica la integridad de la membrana plasmática, ya que sólo una membrana integra puede mantener intacto el ambiente citoplasmático que se necesita para apoyar la actividad de la esterasa (Bopp y Lettieri, 2008).

Uno de los métodos más utilizados para evaluar citotoxicidad o ensayos de proliferación celular es el ensayo de MTT ([3-4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium), que es un ensayo colorimétrico cuantitativo. En este ensayo, la sal de tetrazolio MTT (de color amarillo) es reducida por las células vivas a cristales de formazán (color púrpura), que debe ser disuelto utilizando un solvente como el isopropanol. Se suponía que la sal de tetrazolio se reduce en los procesos mitocondriales durante la cadena respiratoria, pero más tarde se demostró, que las fracciones citoplasmáticas y microsomales también están implicados en la formación de formazán. El ensayo de MTT es una prueba sensible que muestra linealidad en un amplio rango de concentraciones celulares (Mosmann, 1983).

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del Extracto Crudo

El tejido estomacal se obtuvo de una especie de tiburón presuntamente *Mustelus henlei* proveniente del Mar de Cortés (INAPESCA, 2009). Primeramente 20 g se limpiaron y se lavaron con solución reguladora de fosfatos (PBS) antes de congelarse a -80 °C. Posteriormente, se homogenizó con 5 volúmenes de acetonitrilo al 60% y 1% en ácido trifluoroacético (vol/vol), y una mezcla de inhibidor de proteasas (CALBIOCHEM), según especificaciones (1mL/20 g de tejido); después se centrifugó a 13000 rpm a 4 °C, para remover los restos celulares insolubles. El sobrenadante se liofilizó y, posteriormente, se resuspendió en 50 mL de solución reguladora (50mM Tris-HCl pH 6.2, 25mM NaCl); a esta solución se le llamó extracto crudo de tejido estomacal de tiburón, y se congeló a -20 °C hasta realizar la cromatografía.

Cromatografía de Filtración en Gel

Se realizó cromatografía de filtración en gel del extracto crudo en una columna de Sephadex G-25 (45 cm x 1.5 cm) pre-equilibrada con la solución reguladora (50mM Tris-HCl pH 6.2, 25mM NaCl), a un flujo constante de 1 mL/min, utilizando el mismo buffer como fase móvil. Las absorbancias de las fracciones eluidas fueron monitoreadas a 280 nm para detectar las fracciones que contenían proteínas; las fracciones con proteínas fueron liofilizadas, para posteriormente resuspenderlas en PBS y congelarlas a -20 °C hasta probar su actividad mediante ensayos celulares, utilizando la línea celular HeLa (Moore y col., 1993; Rabbani-Chadegani y col., 2008)

Separación de Proteínas (Amicon Ultra-4)

Se realizó una separación de proteínas utilizando amicon (dispositivo de filtración por centrifugación, Amicon Ultra-4, Millipore), cuyo tamaño de exclusión es de 30 kDa; la fracción liofilizada obtenida de la cromatografía de filtración en gel que resultó con mayor actividad, se resuspendió en PBS (15 mg/mL) y se agregaron 4 mL de esta solución a un amicon, centrifugándose a 6000 x g por 30 min, las fracciones fueron liofilizadas y congeladas a -20 °C hasta probar su actividad utilizando la línea celular HeLa (Moore y col., 1993; Rabbani-Chadegani y col., 2008)

Determinación de Proteína

Para la determinación de proteína se utilizó el método de Bradford. Éste se basa en la formación de un complejo entre las proteínas y el colorante Azul Brillante G, lo que provoca un cambio en la absorbancia del colorante, de 465 a 595 (Sigma). Se prepararon diluciones de un estándar de proteínas (albúmina sérica de bovino) con PBS, a las concentraciones de 2, 1, 0.5, 0.25 y 0.125 mg/mL; mientras que las fracciones se prepararon a las concentraciones de 1 y 0.5 mg/mL. se deja incubar de 5 a 45 min (el complejo colorante-proteína es estable hasta por 60 min), transcurrido este tiempo de incubación se lee la densidad óptica (D. O.) a 595 nm; se grafica la D. O._{595nm} de la proteína estándar, y se calcula la concentración de proteína de las fracciones.

Línea Celular

Para la realización del presente trabajo, se utilizó la línea celular HeLa (figura 3) proveniente de adenocarcinoma de cérvix obtenidas en American Type Culture

Collection (ATCC No. CCL-2). Los cultivos se mantuvieron en el medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), suplementado al 10 % con suero fetal bovino, inactivado previamente mediante calentamiento. La línea celular fue incubada a una temperatura de 37 °C, a una atmósfera de 5 % de CO₂ y una humedad relativa entre 80 y 90 % en una incubadora Isotherm (VWR, USA).

Evaluación de la Proliferación Celular por el Método del MTT

La sal de tetrazolium se ha utilizado para desarrollar un ensayo colorimétrico cuantitativo para la proliferación y supervivencia de células de mamíferos. Este método se basa en la reducción del MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] a formazan, ocasionado solamente por células metabólicamente activas; la señal generada depende del grado de activación de las mismas (Mossman, 1983). Los cristales de formazan resultantes se solubilizan con isopropanol ácido y la absorbancia de la solución colorida generada se lee a 570 nm – 655 nm en un lector de microplacas.

ATCC Number: **CCL-2**
Designation: **HeLa**

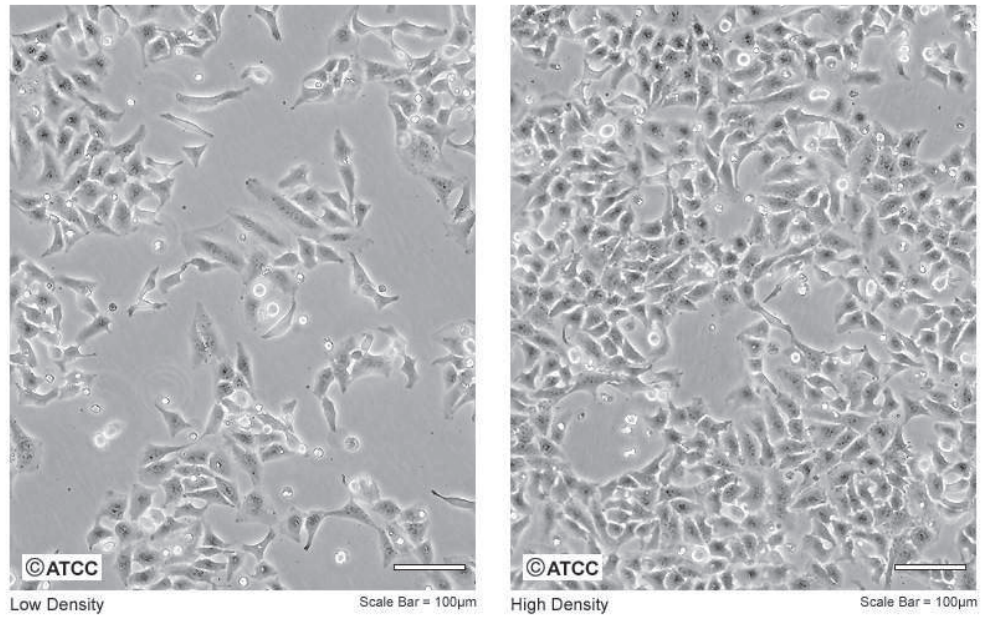


Figura 2. Células de la línea celular HeLa (ATCC).

Prueba de Viabilidad con Azul de Tripán

Se realizó ensayo de proliferación celular, incubándose por 48 h. Las células son despegadas usando tripsina al 0.25% e incubadas por 10 min, centrifugando a 500 x g por 10 min y, posteriormente, se resuspendieron en PBS, realizando una dilución 1:10 con una solución de azul de tripan para cuantificar las células viables a través de microscopio y determinar el porcentaje de viabilidad (Glinka y col., 2006).

Electroforesis en SDS-PAGE

Para la determinación del peso molecular de las proteínas, se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida al 16.5 % (SDS-PAGE) con tricina, utilizando condiciones desnaturalizantes y reductoras (4 % de SDS y 2 % de 2-mercaptoetanol). La electroforesis se llevó a cabo en un sistema MiniProtean III (BioRad) (Laemmil, 1970; Schagger y Von Jagow, 1987), también se utilizaron marcadores peso molecular de amplio rango que van desde 6.5 kDa a 200 kDa (Sigma), para calcular los pesos moleculares de las proteínas de las fracciones.

Análisis Estadístico

Se realizó análisis de varianza ANOVA utilizando las pruebas de comparación múltiple de Tukey-Kramer y Duncan, para lo cual se utilizó el paquete estadístico NCSS97 (NCSS, Kaysville, UT, USA); esto para observar la significancia de la actividad que mostraron las fracciones, así como para evaluar la concentración a la cual se tiene mayor actividad, a través de la comparación del efecto del extracto proteico sobre la proliferación normal de las células, y también, diferencias entre tratamientos (diferentes concentraciones a tratar: 500 , 250 y 125 µg/mL; mientras que para las fracciones de amicon fueron de 1000, 500, 250, 125 µg/mL)(Hernández, 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Fracciones por Cromatografía de Filtración en Gel

A partir del extracto crudo de tejido estomacal de tiburón, se realizó la cromatografía en columna por filtración en gel (Sephadex G-25) obteniéndose 3 fracciones las cuales fueron separadas de acuerdo a sus absorbancias como se muestra en la figura 3. Estas fracciones fueron congeladas para después liofilizarlas y realizar los ensayos celulares.

Electroforesis de las Fracciones Obtenidas por Cromatografía de Filtración en Gel

Se realizó la separación de proteínas del extracto crudo utilizando la cromatografía de filtración en gel y, posteriormente, se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida al 16.5 % en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) para conocer el patrón de proteínas. La figura 4 muestra el perfil electroforético de las proteínas de la fracción 1 y 2, que consistió en 14 bandas proteicas para ambas fracciones, resultando en una mezcla heterogénea de proteínas de diferentes pesos moleculares, que se encuentran en un rango de 81 a 17 kDa para la fracción 1 y 99 a 17 kDa para la fracción 2 (Tabla 1). Al igual que a la fracción 1 y 2, también con la fracción 3 se intentó obtener un patrón electroforético para conocer los pesos de las proteínas que la constituían, pero no se pudo obtener, ya que daba un patrón muy difuso de sus bandas haciendo imposible el cálculo de sus masas dada la baja concentración de proteínas en esta fracción.

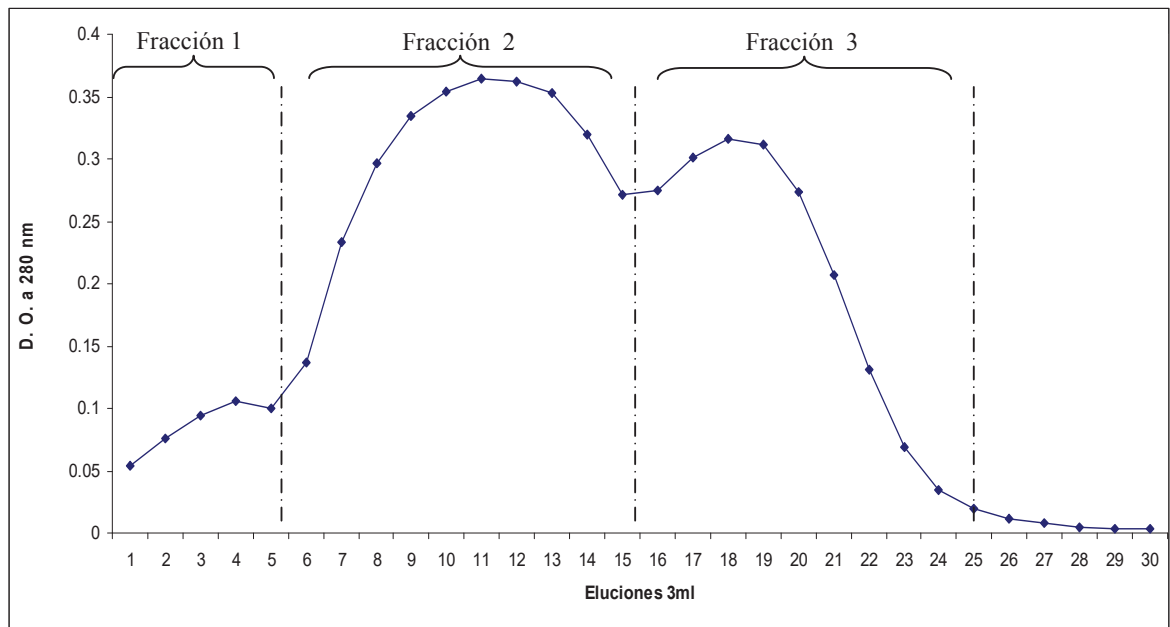


Figura 3. Separación cromatografica de extracto crudo de tejido estomacal de tiburón mediante filtración en gel (sephadex G-25). Se muestran las fracciones que conforman los 3 pools obtenidos (fracción 1, 2 y 3 respectivamente).

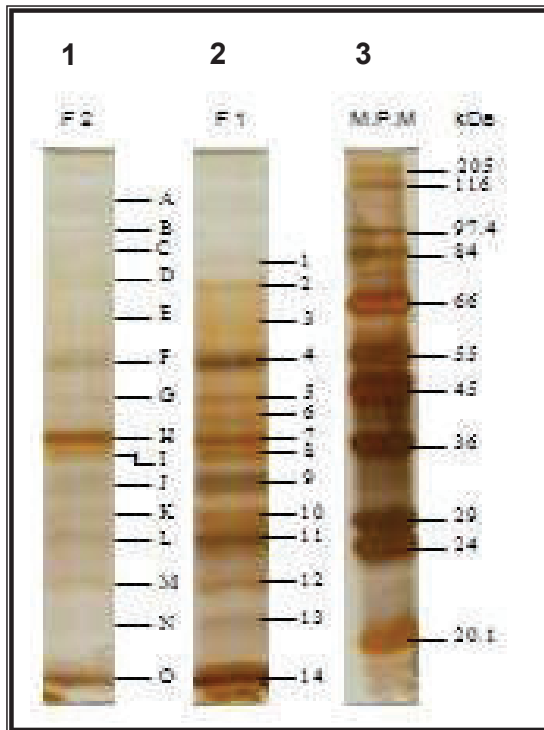


Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de la fracción 1 y 2. En el carril 1 se muestra el perfil electroforético de la fracción 2, mientras que en el carril 2 se observa el patrón de la fracción 1 y en el carril 3 los marcadores de peso molecular.

Tabla I.- Pesos moleculares de las bandas proteicas de las fracciones 1 y 2 separadas mediante electroforesis de tricina SDS-PAGE.

Fracción 1		Fracción 2	
Banda	P. M.	Banda	P. M.
1	81.16	A	99.13
2	73.25	B	85.62
3	63.8	C	75.57
4	54.82	D	64.37
5	44.3	E	53.9
6	41.9	F	44.3
7	37.3	G	37.3
8	34.24	H	34.24
9	32.44	I	32.2
10	29.46	J	29.46
11	26.51	K	26.5
12	22.92	L	22.74
13	20.72	M	20.51
14	17.5	N	17.36

A cada banda proteica de las 2 fracciones identificadas en la figura 4 se le asignó un número arábigo para la fracción 1 y para la fracción 2 una letra.

Evaluación de la Actividad Antiproliferativa de Fracciones en la Línea Celular HeLa

Para evaluar la actividad antiproliferativa de las fracciones obtenidas por cromatografía de filtración en gel se preparó una suspensión celular de 200,000 células/mL. A las mismas, se les añadieron los extractos a probar a las concentraciones de: control de cisplatino 25mM, 0 (control positivo), 125, 250 y 500 $\mu\text{g/mL}$. Como cultivo control, se utilizaron células en presencia de la máxima concentración de solvente requerida para disolver los extractos (PBS), y cultivos incubados únicamente con medio D10F (DMEM suplementado al 10% con suero fetal bovino). El efecto antiproliferativo se evaluó a las 48 horas posteriores a la incubación con los extractos utilizando el método de MTT para la medición de la proliferación celular.

Se utilizó la prueba de Tukey-Kramer para observar la diferencia entre las concentraciones de las fracciones a comparar, así los grupos fueron etiquetados con una letra, aquellos con letras iguales no muestran diferencias.

En la Figura 5 se observa el efecto antiproliferativo de la fracción 1 sobre la línea celular ya mencionada, teniendo un efecto antiproliferativo significativo ($P < 0.05$) a las concentraciones estudiadas, en comparación con los controles negativos (Medio y PBS); el mayor efecto fue a la concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ observado gráficamente; sin embargo, estadísticamente, utilizando la prueba de Tukey-Kramer no se muestra diferencias significativas en el efecto sobre la proliferación entre las concentraciones a 500 $\mu\text{g/mL}$ y 250 $\mu\text{g/mL}$, y entre 250 $\mu\text{g/mL}$ y 125 $\mu\text{g/mL}$, pero sí se observan diferencias entre las concentraciones de 500 $\mu\text{g/mL}$ y 125 $\mu\text{g/mL}$, siendo la de 500 $\mu\text{g/mL}$ la que exhibió mayor actividad.

El efecto antiproliferativo de la fracción 2 se observa en la Figura 6, con una significancia de $P < 0.05$; con respecto a los dos grupos controles, el efecto observado fue similar al de la fracción 1. En la misma gráfica se observa que la concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ fue la que mostró mayor efecto en comparación con las

demás concentraciones estudiadas; estos datos fueron corroborados por la prueba de Tukey-Kramer en la que se muestran diferencias estadísticamente significativas entre el efecto sobre la proliferación utilizando las concentraciones a 500 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$ y 125 $\mu\text{g/mL}$.

La fracción 3 (Figura 7) mostró un efecto antiproliferativo significativo en comparación a los controles negativos ($P < 0.05$); sin embargo, la prueba de Tukey-Kramer no mostró diferencia alguna entre las diferentes concentraciones utilizadas, por lo que el efecto de la fracción 3 es igual en todas las concentraciones.

Comparando el efecto de las fracciones a la misma concentración se observó un efecto estadísticamente significativo con respecto a los controles negativos ($P < 0.05$). Sin embargo, la fracción 1 y 2 no muestran diferencias significativas a la concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$, mientras que entre la fracción 1 y 3 sí muestran diferencias a esta concentración, presentando la fracción 1 mayor actividad con respecto a la fracción 3; sin embargo no se observó una diferencia comparando la fracciones 2 y 3. Estos resultados tuvieron un comportamiento similar para la concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$, mientras que, en la concentración de 125 $\mu\text{g/mL}$, no hubo diferencias significativas observadas por Tukey-Kramer entre las 3 fracciones.

Las diferentes fracciones evaluadas tuvieron actividad antiproliferativa en diferentes porcentajes a las concentraciones estudiadas, observándose que la mayor actividad antiproliferativa para las tres fracciones estudiadas fue a la concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$, obteniendo un 41 % de inhibición de la proliferación celular de la línea HeLa para la fracción 1, 36 % para la fracción 2 y 34 % para la fracción 3, gráficamente observados. Estos datos mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) comparando con los grupos controles de Medio y PBS, sin embargo, la prueba de Tukey-Kramer no mostró diferencias significativas en la actividad de las fracciones 1 y 2 a las concentraciones de 500 y 250 $\mu\text{g/mL}$. Ésto puede deberse a que en ambas fracciones se encuentran proteínas responsables de esta actividad, ya que como se observa en el patrón electroforético son muchas las proteínas que se comparten, siendo tal vez alguna de ellas la responsable de dicho efecto.

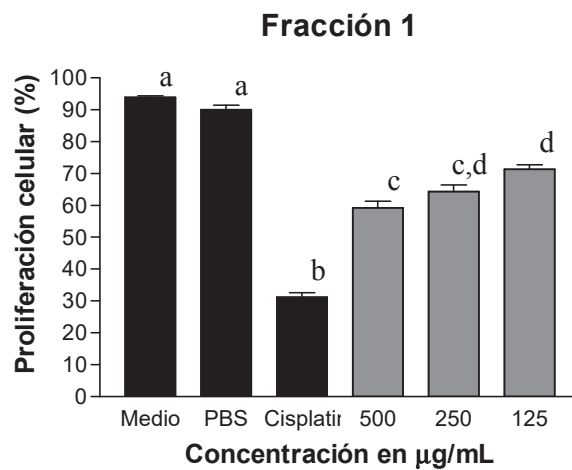


Figura 5. Actividad antiproliferativa de la fracción 1 obtenida por cromatografía de filtración en gel G-25. La proliferación celular se evaluó a las 48 h posteriores a la adición de la fracción. En la gráfica se muestran los porcentajes de proliferación para cada una de las concentraciones que se utilizaron para realizar los ensayos. Las letras diferentes representan una diferencia significativa ($P < 0.05$).

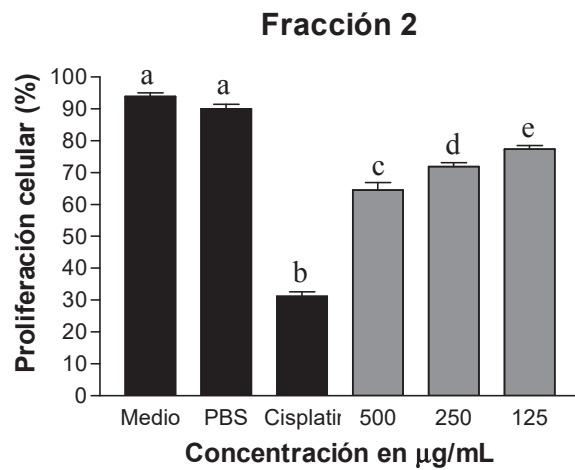


Figura 6. Actividad antiproliferativa de la fracción 2.

La proliferación celular se evaluó a las 48 h posteriores a la adición de la fracción. En la gráfica se muestran los porcentajes de proliferación para cada una de las concentraciones que se utilizaron para realizar los ensayos. Las letras diferentes representan una diferencia significativa ($P < 0.05$).

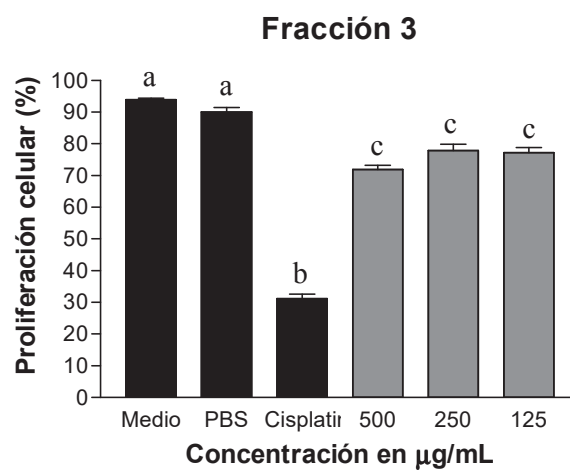


Figura 7. Actividad antiproliferativa de la fracción 3.

La proliferación celular se evaluó a las 48 h posteriores a la adición de la fracción. En la gráfica se muestran los porcentajes de proliferación para cada una de las concentraciones que se utilizaron para realizar los ensayos. Las letras diferentes representan una diferencia significativa ($P < 0.05$).

Las fracciones obtenidas de cromatografía de filtración en gel que fueron evaluadas en su actividad antiproliferativa, arrojaron diferentes resultados de inhibición de la proliferación celular. Se utilizó la fracción 1 para realizar la separación con una membrana con límite de exclusión de 30 kDa, ya que tuvo una máxima actividad a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con un 41 % de inhibición de la proliferación celular. Estadísticamente se observó que la fracción 1 y 2 tuvieron un efecto similar, sin embargo, la separación por membrana se realizó previamente al análisis estadístico.

Las fracciones obtenidas mediante la separación por membrana fueron evaluadas en cuanto a su actividad como se mencionó anteriormente, teniendo ambas fracciones una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los controles ($P < 0.05$). La fracción de proteínas mayores a 30 kDa fue la que mostró actividad en la inhibición de la proliferación celular de 36 %, mientras que la fracción de proteínas menores a 30 kDa mostró una inhibición de 14 % (Figura 8).

La figura 8 muestra el efecto antiproliferativo de la fracción que contiene proteínas mayores a 30 kDa teniendo un efecto antiproliferativo significativo ($P < 0.05$) en comparación con los controles; el mayor efecto observado fue a la concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ observado gráficamente, sin embargo, la prueba de Tukey-Kramer no muestra diferencia estadísticamente significativa entre el efecto sobre la proliferación entre las concentraciones a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pero sí se observan diferencias entre la concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Así también la concentraciones de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ muestran una actividad similar, mientras que la concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ exhibe diferencias en el efecto con respecto a la de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$; por el contrario, entre las concentraciones de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no se aprecia una diferencia estadísticamente significativa.

La fracción con proteínas menores a 30 kDa no mostró diferencias significativas entre las concentraciones que se utilizaron para los ensayos, por lo cual el efecto fue el mismo para todas las concentraciones.

La fracción que contiene las proteínas mayores a 30 kDa muestra mayor actividad presenta alrededor de 10 proteínas diferentes observadas en el patrón electroforético. Según Rabbani y col. (2008) las proteínas responsables de actividad antiangiogénica presentan masas moleculares pequeñas (aproximadamente 10 kDa) en cartílago de tiburón, mientras que en estómago de tiburón no se ha reportado a la fecha algún efecto obtenido por proteínas de este tejido.

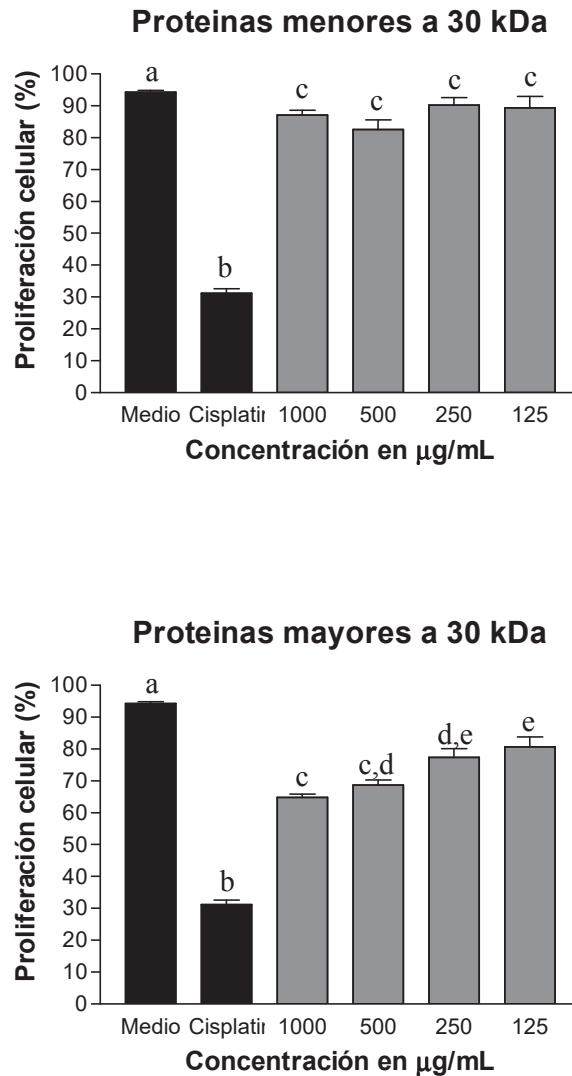


Figura 8. Actividad antiproliferativa de las fracciones obtenidas por filtración en membrana de 30 kDa. La proliferación celular se evaluó a las 48 h posteriores a la adición de las fracciones. En la gráfica se muestran los porcentajes de proliferación para cada una de las concentraciones utilizadas. En el panel superior se muestra la fracción de proteínas menores a 30 kDa. En la gráfica inferior se muestra fracción de proteínas mayores a 30 kDa, Las letras diferentes representan una diferencia significativa ($P < 0.05$)

Efecto Sobre la Viabilidad Celular

Este ensayo se realizó debido a que la inhibición de la proliferación no fue mayor del 50 %. De acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación se utilizó la fracción 1 obtenida por filtración en gel, a la concentración de 500 µg/mL para realizar las pruebas de viabilidad. Una vez incubadas las células HeLa por 48 h, se contaron las células con azul de tripan (colorante supra vital que tiñe células muertas), esta prueba mostró que las células eran viables aproximadamente en un 98 % con respecto a las células que fueron cultivadas solo con medio (control de crecimiento normal de la línea celular HeLa).

Este resultado se puede deber a que las proteínas de la fracción 1 no matan a las células, solo retrasan su crecimiento; posiblemente este efecto se deba a la acción sobre alguna de las fases de mitosis en la célula, ya que al cultivar en DMEM al 10 % con suero fetal bovino, estas células sin presencia de la fracción 1 su crecimiento siguió ligeramente retrasado. Estas células, en ausencia de la fracción 1, recuperan su crecimiento normal al ser cultivadas solo con medio, por lo que creemos que el efecto de la fracción 1 solo es retrasar su crecimiento, pero desconocemos el mecanismo de acción para lograr este efecto.

Muchos son los compuestos cuyo efecto es arrestar el ciclo celular, ya sea llevando a la célula a una fase hipomitogénica o en una hipermitogénica, actuando en alguna de las fases (Go, G1, G2, etc). Se sabe, que la célula una vez que se encuentra arrestada no se puede mantener indefinidamente en ese estado, por que en ultima instancia la célula morirá o saldrá de la mitosis sin dividirse pero bajo los efectos del estrés celular generado en el proceso (Blagosklonny, 2003; Blagosklonny, 2007).

CONCLUSIONES

- Las fracciones proteicas obtenidas en la cromatografía de filtración en gel mostraron un efecto antiproliferativo sobre la línea celular HeLa.
- El mayor efecto antiproliferativo se obtuvo con la fracción 1 sobre la línea celular HeLa a la concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$. con un 41 % de inhibición de la proliferación y la fracción 2 mostró una actividad a la misma concentración con un 36 % de proliferación, este efecto fue significativo ($P < 0.05$).
- La fracción de proteínas mayores a 30 kDa, obtenidas de la fracción 1 de filtración en gel, mostró actividad antiproliferativa, con un 36 % de inhibición de la proliferación celular, mientras que la fracción de proteínas menores a 30 kDa mostró una actividad de 17 % de inhibición.
- El efecto de las proteínas de la fracción 1 obtenida de filtración en gel, sobre la línea celular HeLa, fue solo retrasar su crecimiento, las células continuaron viables y fueron capaces de crecer y recuperar su velocidad de crecimiento al cultivarlas sin la fracción 1.

RECOMENDACIONES

- La fracción de proteínas mayores a 30 kDa presenta alrededor de 10 bandas de proteínas, por lo que se recomienda realizar más experimentos de purificación conocer a la proteína responsable de la actividad.
- Realizar una tabla de purificación.
- Obtener extractos proteicos con solventes de diferente polaridad
- Realizar estudios sobre el mecanismo de acción para retardar la proliferación celular, como pudiera ser las interacciones entre las proteínas responsables de la actividad antiproliferativa y los posibles blancos.
- Realizar ensayos de actividad antibacteriana, antifúngica, etc.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A. K., Litchman A. H. y Pober, J. S. 1998. Cellular and Molecular Immunology, Fourth Edition. W.B Saunders Company. P. 384.
- Akhter S., Nath S. K., Tse C. M., Williams J., Zasloff M. y Donowitz M. 1999. Squalamine, a novel cationic steroid, specifically inhibits the brush-border Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE3. *Am J Physiol Cell Physiol*, 276:136-144.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Watson J. D. 1996. Biología Molecular de la Célula, Tercera Edición. Ediciones Omega S. A. P. 481 – 484, 1391 - 1411.
- Amador M. L., Jimeno J., Paz-Ares L., Cortes-Funes H. y Hidalgo M. 2003. Progress in the development and acquisition of anticancer agents from marine sources. *Ann Oncol*. 14:1607
- Bai R, Pettit GR y Hamel E. 1990. Dolastatin 10, a powerful cytostatic peptide derived from a marine animal. Inhibition of tubulin polymerization mediated through the vinca alkaloid binding domain. *Biochem Pharmacol*, 39: 1941–49.
- Bargahi A. y Rabbani-Chadegani A. 2008. Angiogenic inhibitor protein fractions derived from shark cartilage. *Bioscience Reports*. 28: 15-21
- Banerjee S., Wang Z., Mohammad M., Sarkar F. H. y Mohammad R. M. 2008. Efficacy of Selected natural products as therapeutic agents against cancer. *J. Nat. Prod.*, 71, 492–496
- Blagosklonny, 2003. Cell senescence and hypermitogenic arrest. *EMBO reports*, 4:4

- Blagosklonny, 2007. Mitotic arrest and cell fate: why and how mitotic inhibition of transcription drives mutually exclusive events. *Landes Bioscience*, 6:1, 70-74,
- Bopp S. K. y Lettieri T. 2008. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *BMC Pharmacology*. 10.1186/1471-2210-8-8
- Chen W., Shao X., Moellering R., Wennersten C. y Regen S. L. 2006. A bioconjugate approach toward squalamine mimics: insight into the mechanism of biological action. *Bioconjugate Chem*, 17:1582-1591
- Cragg G. M. y Newman D. J.;1999. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. *Cancer Invest*, 17: 153–63.
- Cragg G. M., Newman D. J., Snader K. M. 1997. Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.*, 1997, 60:52-60.
- Delalogue S., Yovine A. y Taamma A. 2001. Ecteinascidin-743: a marine derived compound in advanced, pretreated sarcoma patients - preliminary evidence of activity. *J Clin Oncol*. 19:1248-55.
- Donia M. y Hamann M. T. 2003. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *Lancet Infect Dis*. 3:338-348.
- Farnsworth N. R., Akerele O., Bingel A. S., Soejarto D. D. y Guo Z. 1985. Medicinal plants in therapy. *Bull World Health Organ*, 63:965-981.

Glinka E. M., Edelweiss E. F., Sapozhnikov A. M. y Deyev S. M. 2006. A new vector for controllable expression of an anti-HER2/neu mini-antibody-barnase fusion protein in HEK 293T cells. *Gene*. 366 97–103.

Hao D., Hammond L. A., Gail Eckhardt S., Patnaik A., Takimoto C. H., Schwartz G. H., Goetz A. D., Tolcher A. W., McCreery H. A., Mamun K., Williams J. I., Holroyd K. J. y Rowinsky E. K. 2003. A phase I and pharmacokinetic study of squalamine, an aminosterol angiogenesis inhibitor. *Clinical Cancer Research*. 9: 2465–2471.

Higgins R. D., Sanders R. J., Yan Y., Zasloff M. y Williams J. I. 2000. Squalamine improves retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.41:1507–1512)

INAPESCA, <http://www.inapesca.gob.mx>

Inegi, <http://www.inegi.gob.mx/lib/olap/general/MDXQueryDatos.asp?c=11144>

Inegi,

<http://www.inegi.gob.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2008/cancer08.doc>

Ken K., Edward B., Andrzej S., Steven R. y Donald A. 1997. Antimicrobial activities of squalamine mimics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1433–1438

Lugo, 2003. Constituyentes de los propóleos sonorenses y su actividad antiproliferativa contra líneas celulares transformadas. Centro de Alimentación y Desarrollo. Pag. 10-11.

Meletiadis J., Mouton J. W., Meis J. G. M., Bouman B. A., Donnelly J. P., Verweij P. y Network E. 2001. Colorimetric assay for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* species. *Journal of clinical microbiology*, 39: 3402–3408

- Moore K. S., Wehrl S., Roder H., Rogers M., Forrest J. N. y McCrimmon J. D. 1993. Squalamine: An aminosterol antibiotic from the shark (antibacterial/antifungal/steroid/spermidine/defense). *Biochemistry*, 90, 1354-1358.
- Mossman, 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65:55-63.
- National Cancer Institute. <http://www.cancer.gov/>
- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*, 267:5421-5426.
- Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int>
- Pettit, 1982. Isolation and structure of bryostatin-1. *J Am Chem Soc*, 104: 6846-48.
- Pettit, 2009. Mixed fermentation for natural product drug discovery. *Appl Microbiol Biotechnol*, 83:19-25
- Poncet 1999. The dolastatins, a family of promising antineoplastic agents. *Curr. Pharm. Des.*, 5: 139-62.
- Rabbani-Chadegani A., Abdossamadi S., Bargahi A. y Yousef-Masboogh M. 2008. Identification of low-molecular-weight protein (SCP1) from shark cartilage with anti-angiogenesis activity and sequence similarity to parvalbumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46:563-567

- Rao M. N., Shinnar A. E., Noecker L. A., Chao T. L., Feibush B., Snyder B., Sharkansky I., Sarkahian A., Zhang X., Jones S. R., Kinney W. A. y Zasloff M. 2000. Aminosterols from the Dogfish Shark *Squalus acanthias*. *J. Nat. Prod*, 63, 631-635
- Rinehart, 2000. Antitumor compounds from tunicates. *Med. Res. Rev.*, 20:1-27.
- Rocha A. B., Lopes R. M. y Schwartzmann G. 2001. Natural products in anticancer therapy. *Current Opinion in Pharmacology*, 1:364-369
- Schagger H. y Von Jagow G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, 166: 368-379.
- Schiller J. H. y Bittner G. 1999. Potentiation of platinum antitumor effects in human lung tumor xenografts by the angiogenesis inhibitor Squalamine: Effects on tumor neovascularization . *Clinical Cancer Research*, 5: 4287-4294
- Schwartzmann, 2000. Marine organisms and other novel natural sources of new cancer drugs. *Ann. Oncol.*, 11: 235-43.
- Schwartzmann G., da Rocha A. B., Berlinck R. G. y Jimeno J. 2001. Marine organisms as a source of new anticancer agents. *Lancet Oncol.*, 2: 221-25
- Secretaria de Salud, 2008. [Http://www.sinais.salud.gob.mx/mortalidad/](http://www.sinais.salud.gob.mx/mortalidad/)
- Simmons L., Andrianasolo E., McPhail K., Flatt P. y Gerwick W. H. 2005. Marine natural products as anticancer drugs Molecular Cancer Therapeutics, *Mol Cancer Ther*, 4:333-42.

Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernández-López J. y Pérez-Álvarez J.A. 2008.

Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of Food Science*, 73: 117-124

Wender P. A. Hinkle K. W. Koehler M. F. y Lippa B. 1999. The rational design of

potential chemotherapeutic agents: synthesis of bryostatin analogues. *Med. Res. Rev.*, 19: 388–407.