

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud

Obtención de B-Ficoeritrina Obtenida de la Microalga Roja *Rhodospirillum rubrum* y Evaluación *in vitro* de su Efecto en la proliferación de Células de Cáncer Cervicouterino (HeLa)

Tesis que para Obtener el Grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Presenta:

Q.B. Alma Delia Rascón Durán

Hermosillo, Sonora

Julio 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

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de **Alma Delia Rascón Durán**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.

Dr. Miguel Ángel Valdés Covarrubias
Director Académico

Dra. María Guadalupe Burboa Zazueta
Secretario

Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro
Vocal

Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán
Suplente

AGRADECIMIENTOS

Siempre en primer lugar a mis padres, Alma Delia y Roberto, quienes siempre están a mi lado, apoyando e impulsando mi desarrollo académico y personal.

Al Dr. Miguel Valdés, Dra. María Burboa y al Dr. Luis Gutiérrez, por darme el honor de trabajar con ellos y hacer de ellos de mis amigos. Por abrirme las puertas para la elaboración de este trabajo, con el que crecí a nivel académico y personal.

A Rafael (el rafa), por ser un gran amigo de años y un gran apoyo durante la realización de mi tesis.

A Marco, quien siempre me inspiró a seguir adelante.

A Adriana Básaca por la valiosa aportación de información que me proporcionó para llevar a cabo mi trabajo de tesis. A Alejandra L., Arelí y Arturo, gracias por los momentos de relaxo.

A mi querido amigo Abelardo, que siempre estuvo pendiente sobre mis avances y quien me dio palabras de ánimos.

A la Dr. Irasema Vargas, por su cooperación en mi trabajo y valiosas aportaciones en este escrito.

Al Dr. Iloki y la Dra. Lewies, de Rubio Pharma y Asociados, por haberme abierto las puertas de sus instalaciones, y que con su apoyo se lograron importantes avances en mi trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca y los fondos otorgados para la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mis papás y hermanos.

A Marco, fue por nosotros.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
OBJETIVOS	x
General	x
Particulares	x
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Cáncer	3
Cáncer y su Estadística	6
Productos Naturales como Antiproliferativos	7
Productos Naturales de Origen Marino	7
Ficobiliproteínas	9
Estructura de las Ficobiliproteínas	9
Aplicaciones de las Ficobiliproteínas en la Industria y en la Medicina	11
<i>Rhodorus marinus</i> y Ficobiliproteínas	14
Purificación de Ficoeritrina	16
Cromatografía	16
Ensayos de Proliferación Celular	17
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Cultivo de <i>Rhodorus marinus</i>	20
Obtención de Biomasa de <i>Rhodorus marinus</i>	23

	Página
Precipitación de Proteínas de <i>R. marinus</i>	24
Cromatografía de Filtración en Gel	25
Cromatografía de Intercambio Iónico	25
Cromatografía Líquida de Alta Resolución	26
Determinación de Pureza de Ficoeritrina	26
Determinación de Proteína	27
Cultivo Celular	28
Ensayos de Proliferación Celular	28
Análisis Estadístico	30
RESULTADOS Y DISCUSIONES	31
Obtención de Biomasa de la Microalga <i>Rhodospirillum rubrum</i>	31
Purificación de B-Ficoeritrina	32
Ensayos de Proliferación Celular	37
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	53
BIBLIOGRAFÍA	54

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla I. Características físicas generales de las principales ficobiliproteínas.	12
Tabla II. Soluciones madre de Nutrientes mayores, metales traza y vitaminas requeridas para la preparación de medio Erschreiber.	21
Tabla III. Preparación del medio de cultivo Erschreiber.	22

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Proceso Neoplásico	4
Figura 2. Ficobiliproteínas	10
Figura 3. <i>Rhodospirillum rubrum</i>	15
Figura 4. Barrido espectral después de cromatografía en G-25	33
Figura 5. Gráficas de barridos espectrales de B-Ficoeritrina purificada	35
Figura 6. Gráficas de barrido espectral del producto de G-25 y HPLC	36
Figura 7. Ensayo Preliminar con B-Ficoeritrina	38
Figura 8. Estructura del Cis-Platino y su mecanismo de acción	40
Figura 9. Curva de proliferación con Cis-Platino	41
Figura 10. Ensayo de Proliferación de HeLa con B-ficoeritrina	43
Figura 11. Curva de concentración proteica	45
Figura 12. Ensayo celular con PBS Liofilizado.	47
Figura 13. Sales de PBS y B-Ficoeritrina liofilizada con PBS	48
Figura 13. Ensayo de Proliferación de HeLa con B-Ficoeritrina dializada.	50

LISTA DE ABREVIATURAS

FB	Ficobiliproteínas
OMS	Organización Mundial de la Salud
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
r.p.m.	Revoluciones por minuto
ATCC	American Type Culture Collection
DMEM	Medio Eagle Modificado de Dubelcco
B-FE	B-ficoeritrina
Cis-Pt	Cis-Platino

OBJETIVOS

General

Obtención y evaluación del efecto *in vitro* de la B-Ficoeritrina obtenida de la microalga roja *Rhodosorus marinus* en la proliferación de células de cáncer cervicouterino (HeLa).

Particulares

- Obtener B-Ficoeritrina de *Rhodosorus marinus*.
- Realizar ensayos de proliferación en células HeLa suplementadas con B-Ficoeritrina en presencia y ausencia de sales de buffer de fosfatos.

RESUMEN

El cáncer de cérvix es una de las principales causas de muerte en mujeres mayores de 25 años. Anualmente, se informan 500,000 nuevos casos, así como 250,000 muertes a nivel mundial por este padecimiento. En cuanto a su tratamiento, casi la mitad de los agentes anticancerígenos de uso clínico son derivados de productos naturales. A la fecha continúa la búsqueda de compuestos naturales alternativos más efectivos para este padecimiento. Entre las moléculas con uso potencial como inhibidoras de la proliferación de células cancerosas se encuentran las ficobiliproteínas (FB), que son un grupo de proteínas que funcionan como pigmentos principales accesorios de la fotosíntesis de las algas rojas y cianobacterias. Diversas investigaciones recientes han estudiado el potencial anticancerígeno de estos compuestos naturales. Específicamente, las FB de *Pseudoanabaena* demostraron inhibir la proliferación en líneas de células de carcinoma cervicouterino (HeLa, CaLo), presentando una mortalidad celular del 43.5% y 88.8% respectivamente. Para estas mismas células, otra ficobiliproteína obtenida de *Spirulina máxima* demostró tener actividad citotóxica *in vitro*, con una mortalidad del 80% en células HeLa. *Rhodospirillum rubrum* es una microalga roja cosmopolita, fuente de ficoeritrina y la cual puede ser cultivada en el laboratorio y sobre la cual se han realizado algunos estudios sobre fotosíntesis y obtención de ficoeritrina, sin embargo, no se han realizado estudios acerca de las propiedades potenciales de sus FB. Esta microalga marina es cultivada en el laboratorio de Biomoléculas de la Universidad de Sonora, debido al interés biotecnológico de su proteína fluorescente. De ella se extrae y purifica ficoeritrina, por lo que representó un organismo idóneo para estudiar sus posibles efectos antiproliferativos sobre células cancerosas. Una vez purificada la ficoeritrina, se realizaron ensayos

celulares con la línea celular HeLa. Después de realizar una curva de crecimiento celular utilizando diferentes concentraciones de ficoeritrina, se decidió trabajar con 10, 5 y 2.5 mg/mL de ficoeritrina en PBS liofilizada. Se encontró un efecto negativo significativo ($p < 0.05$) en la proliferación celular entre las células con ficoeritrina y los controles (células con medio de cultivo, PBS y Cis-Platino). Después se llevó a cabo un ensayo de Bradford, encontrando que en la solución de 10 mg/mL de ficoeritrina, solo 0.07 mg correspondían a proteína. Fue por esto que se dializó la ficoeritrina y se realizaron nuevamente ensayos de proliferación celular, con las mismas condiciones que los anteriores, pero utilizando concentraciones de 0.3125 a 5 mg/mL de ficoeritrina dializada, en las cuales no se encontró un efecto significativo ($p > 0.05$) sobre el crecimiento de las células. En nuestro estudio no encontramos un efecto significativo de la ficoeritrina, obtenida de *Rhodospirillum rubrum*, sobre el crecimiento de la línea celular HeLa después de ser dializada y con las concentraciones utilizadas.

INTRODUCCIÓN

El Cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracteriza por un crecimiento celular descontrolado y una propagación de células anormales a diferentes órganos, lo que, de no ser controlado, lleva a la muerte (American Cancer Society).

Durante el año 2006, alrededor de 800 mujeres murieron cada día en todo el mundo por cáncer cérvico uterino, y cada día 12 de esas muertes ocurrieron en nuestro país (OMS, e-salud.gob.mx, IMSS).

Al ser el cáncer un problema serio de salud pública a nivel mundial, se requiere de encontrar opciones terapéuticas y abatir el costo de los tratamientos contra esta enfermedad, los cuales muchas veces son agresivos y algunos tienen poca efectividad (Vargas y col., 2006).

Los productos naturales han contribuido en gran medida al tratamiento contra el cáncer. Alrededor de la mitad de los agentes anticancerígenos de uso clínico son derivados de esta clase de productos (Cragg, G., 2005; da Rocha y col., 2001).

Las ficobiliproteínas (FB) son un grupo de proteínas que funcionan como pigmentos principales accesorios de las algas rojas y cianobacterias; dentro de este grupo se encuentran la ficoeritrina, la ficocianina y la aloficocianina. Éstas son utilizadas en la industria alimentaria como colorantes, así también en la industria de cosméticos y, por sus características fluorescentes, se utilizan también en inmunodiagnóstico (Liu y col., 2005; Bermejo y col., 2002). Son varios los estudios acerca de las propiedades de esta clase de proteínas.

Vargas y col., en el 2006, realizaron una extracción de FB a partir de *Pseudoanabaena* y estudiaron el efecto *in vitro* de este extracto en dos líneas de células de carcinoma cervicouterino, HeLa y CaLo, y encontraron una mortalidad celular del 43.5% y 88.8% respectivamente, en la dosis más alta empleada, y en ella había: 0.24 mg/mL de ficoeritrina, 0.161 mg/mL de ficocianina y 0.106 mg/mL. Por otra parte, García y col., en el mismo año, estudiaron la actividad citotóxica *in vitro* de las ficobiliproteínas derivadas de *Spirulina maxima*, utilizando células de la línea HeLa para ese propósito, y encontraron que concentraciones de ficocianina de 6.5×10^{-3} mg/mL produjeron una mortalidad celular del 80% en esta línea celular.

Rhodospirillum rubrum es una microalga sobre la cual se han descrito algunos estudios sobre fotosíntesis y producción de ficoeritrina (Molina y col., 2007), pero no se han realizado estudios acerca de las propiedades antiproliferativas de sus ficobiliproteínas. Esta microalga es cultivada en el laboratorio de Biomoléculas de la Universidad de Sonora debido a su interés biotecnológico como fuente de proteínas fluorescentes y de la cual se extrae y purifica ficoeritrina, por lo que representó una excelente oportunidad para estudiar sus posibles efectos antiproliferativos sobre células cancerígenas. Es por esto que en el presente trabajo se estudió el efecto de la ficoeritrina, obtenida de *R. rubrum*, en la proliferación de células de cáncer de cérvix de la línea HeLa, teniendo también como antecedente los estudios recientes antes mencionados.

ANTECEDENTES

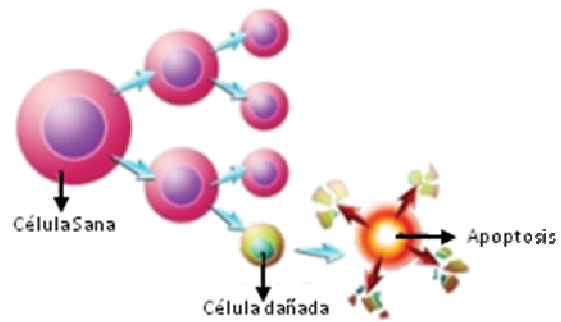
Cáncer

Se le llama Cáncer a un grupo de aproximadamente 100 enfermedades, que se caracterizan por una proliferación y propagación celular incontrolada. Las células cancerígenas poseen dos propiedades: ellas y su progenie se reproducen desafiando a las restricciones normales e invaden y colonizan territorios normalmente reservados para otras células. Cuando la proliferación celular se encuentra fuera de control, dará lugar a un tumor, o neoplasma, el cual es una masa creciente de células anormales, pero siempre y cuando estas células neoplásicas se mantengan contenidas en una sola masa se dice que el tumor es benigno y puede ser removido quirúrgicamente (Figura 1). Pero, si estas células comienzan a invadir tejidos cercanos, se dice que es un tumor maligno. Entre más se diseminen estas células anormales a otros tejidos, es decir, que haya metástasis, el cáncer será más difícil de erradicar (American Cancer Society, National Cancer Institute, Organización Mundial de la Salud; Alberts, B., 1994).

Esencialmente el cáncer es una enfermedad genética, ya que todas las células cancerosas contienen alguna alteración en la expresión genética, entre las que se encuentran:

- translocaciones e inversiones cromosomales
- delección o amplificación de genes

División Celular Normal



División Celular Cancerígena

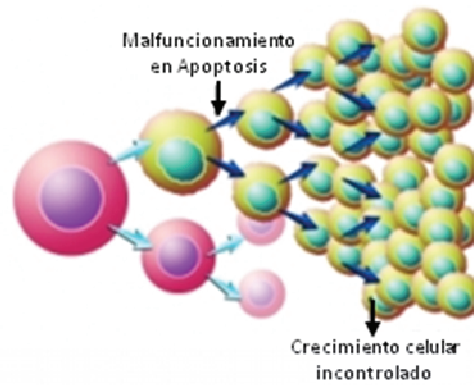


Figura 1. Proceso Neoplásico

- duplicación o pérdidas de cromosomas completos
- mutaciones puntuales

alteraciones que pueden presentarse por diversos factores, como son: externos (tabaco, químicos, radiaciones, organismos infecciosos) e internos (mutaciones hereditarias, hormonas, condición inmunológica y mutaciones que ocurren por el metabolismo). Las células normales, al llegar a ser adultas completamente diferenciadas, pierden la capacidad de dividirse. Pero, debido a la interacción con estos factores, la célula recupera la capacidad para proliferar, y es cuando se dice que la célula ha sufrido una transformación maligna (Holland, 2003; American Cancer Society).

Los diferentes tipos de cáncer se clasifican de acuerdo al tejido y al tipo celular del que surgen:

- Carcinomas: provienen de células epiteliales
- Sarcomas: provienen de células musculares o tejido conectivo
- Leucemias: provienen de células hemopoyéticas y del sistema nervioso

y también toman el nombre del órgano donde se originó como por ejemplo: cáncer de cérvix, leucemia linfocítica, entre otros muchos ejemplos (American Cancer Society; Alberts, 1994).

Muchos cánceres pueden ser prevenidos al evitar la exposición con factores de riesgo, como los antes mencionados y además, una proporción significativa de casos pueden ser curados, principalmente si son detectados a tiempo, mediante radioterapia, cirugía o quimioterapia (OMS).

Cáncer y su Estadística

El INEGI, en sus estadísticas con motivo del Día Nacional contra el Cáncer, reportó que el 12.9% de las defunciones generales (ambos sexos) ocurridas durante el 2006 fueron debido a tumores malignos, siendo la tercera causa de mortalidad en México, con 63,888 muertes en ese año (INEGI).

En el 2007, se estimó que aparecerían 12 millones de nuevos casos de cáncer alrededor del mundo y 7.6 millones de muertes (20,000 diarias) ocasionadas por el mismo padecimiento. Para el 2050, se estiman en 27 millones los nuevos casos y 17.5 millones de muertes por esta enfermedad. (American Cancer Society, OMS).

Durante 2006, alrededor de 800 mujeres murieron cada día en todo el mundo por cáncer cérvico uterino, y cada día 12 de esas muertas ocurrieron en nuestro país. Según la OMS, en 2002 la tasa de mortalidad en México era del 24%, y esta cifra se redujo a 12% en 2005. Aún cuando la tasa de mortalidad en la última década ha ido en descenso, este padecimiento persiste como un problema de salud pública, esto probablemente porque a pesar de que sea totalmente prevenible, a través del Papanicolau, permanece como una de las principales causas de muerte por cáncer (OMS, e-salud.gob.mx, IMSS).

Productos Naturales como Antiproliferativos

Se llama producto natural a aquel compuesto que se encuentra en la naturaleza o que es producido por ella. Entre ellos, se encuentran compuestos como: carbohidratos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, aminoácidos, terpenos, entre otros. Muchos agentes farmacéuticos, alrededor del 60%, son productos naturales provenientes de fuentes naturales como plantas, animales, organismos marinos así como de microorganismos. Estos productos han contribuido en gran medida al tratamiento contra el cáncer. Alrededor de la mitad de los agentes anticancerígenos de uso clínico son derivados de esta clase de productos. (Cragg, G., 2005; da Rocha y col., 2001)

Productos Naturales de Origen Marino

Alrededor del 70% de la superficie terrestre se encuentra cubierta por océanos, en los cuales habita una enorme diversidad de plantas y animales, la cual se estima en alrededor de 2 millones de especies. Los compuestos de origen marino son diversos en estructura, desde péptidos lineales hasta complejos macrocíclicos, azúcares, terpenoides entre otros. Muchos de estos compuestos han sido producidos por las especies marinas como mecanismos de defensa, al encontrarse en un ambiente densamente poblado y estar en competencia con otras especies, al igual que para protegerse de depredadores. Al ser liberados al agua, estos compuestos requieren ser muy potentes para que, al ser diluidos, no pierdan su efectividad. Además, la variedad de condiciones ambientales que se encuentran en los océanos como son:

temperatura, que van desde las temperaturas congelantes hasta los 350°C, presiones desde 1 atmósfera hasta las 1000 en las zonas abismales, así como regiones donde se tiene acceso a la luz solar y zonas en las que no lo hay, son factores que han contribuido a la diversidad de estos productos naturales (Haefner, B., 2003; Kumar y col., 2004; Jimeno y col., 2004; Simmons y col., 2005; Rawat y col., 2006; Adrian, T., 2007; Banerjee y col., 2008).

En la actualidad, tanto el desarrollo en las tecnologías para la acuicultura como el estudio de las profundidades marinas han contribuido al creciente interés en explorar el océano como una fuente potencial de nuevos anticancerígenos, debido a la enorme biodiversidad presente en el mundo marino (Schwartzmann y col., 2003; Adrian, T. 2007).

Es muy amplia la gama de compuestos activos que han sido aislados de animales y plantas marinas (alrededor de 14,000), de los cuales un gran número de péptidos han exhibido actividad biológica potente y varios de estos compuestos han mostrado actividad anticancerígena prometedora (Haefner, B., 2003; Kumar y col., 2004; Jimeno y col., 2004; Simmons y col., 2005; Rawat y col., 2006; Adrian, T., 2007; Banerjee y col., 2008;).

Algunos ejemplos de compuestos aislados de fuentes marinas son: Aplidina, con actividad inhibitoria del crecimiento y antiangiogénica (Adrian, T., 2007); Didemnina, primer péptido obtenido de fuente marina en ser utilizado en terapias contra cáncer (Rawat y col., 2006). Martínez y col. estudiaron extractos de tejidos de ascidias sobre varias líneas tumorales: SKBR3 (mama), H-116 (colorrectal), A-549 (pulmón) y PSN-1 (páncreas), mostrando un efecto antiproliferativo significativo.

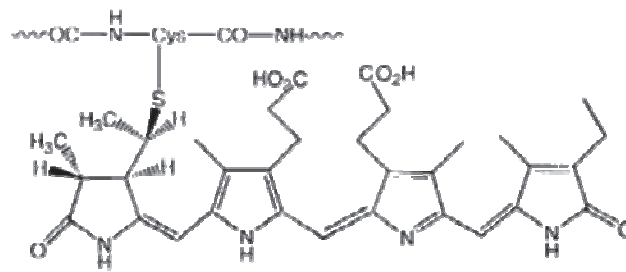
También las algas son una fuente potencial de diversos compuestos bioactivos, como son compuestos antioxidantes y antiproliferativos.

Ficobiliproteínas

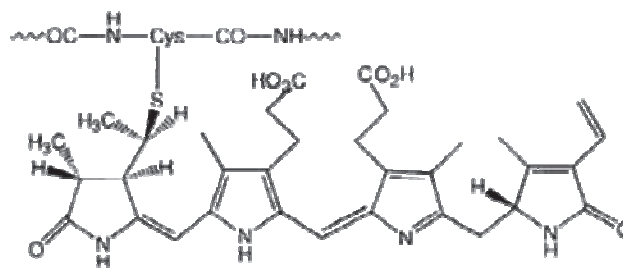
Las FB son un grupo de cromoproteínas hidrosolubles, sintetizadas en los ficobilisomas, que funcionan como pigmentos principales accesorios de las algas rojas, cianobacterias (algas azul-verdosas) y criptomónadas, recolectando luz solar y transfiriendo energía durante el proceso fotosintético. Las FB se clasifican en 4 grupos principales: ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina y ficoeritrocianina. Estas proteínas tienen la característica de absorber en un rango de 200 nm del espectro visible, lo que las hace más efectivas que la clorofila α en el proceso de absorción de luz (Samsonoff y col., 2001; Viskari y Colyer, 2003; Isailovic y col., 2004; Isailovic y col., 2006).

Estructura de las Ficobiliproteínas

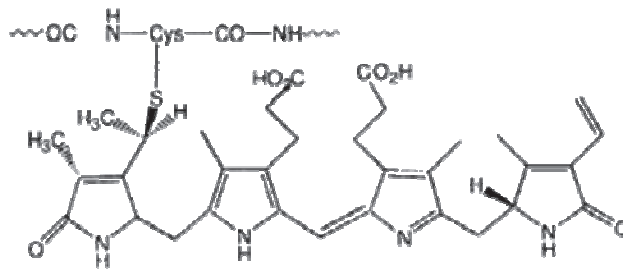
Su estructura consta de un complejo formado por proteínas y un grupo cromóforo. Estos cromóforos, llamados ficobilinas por su similitud estructural a los pigmentos biliares, están formados por un grupo prostético tetrapirrólico lineal el cual se une covalentemente a residuos de cisteínas específicas de la proteína, mediante enlaces tioéter, como se muestra en la figura 2 (Jiang y col., 2001; Ma y col., 2002; Viskari y Colyer, 2003; Isailovic y col., 2004; Soni y col., 2006). Las ficobilinas se clasifican en: ficoeritrobilina, ficocianobilina, ficoviobilina y ficourobilina. Las ficobiliproteínas toman su nombre de acuerdo al número y especies de ficobilinas que contenga en su estructura. La interacción entre las ficobilinas y las cadenas peptídicas es lo que brinda a cada



Ficocianobilina unida a péptido



Ficoeritrobilina unida a péptido



Ficourobilina unida a péptido

Figura 2. Ficobiliproteínas. (Viskari y Colyer, 2002).

ficobiliproteína su absorción y fluorescencia característica (Jiang y col., 2001; Viskari y Colyer, 2002; Isailovic y col., 2004).

Esta unión entre las cadenas peptídicas y las ficobilinas (que pueden ser una o varias ficobilinas unidas a los péptidos) se denominan como subunidades α (alfa), β (beta) y γ (gama), ésta última presente solo en ficoeritrina. Estas subunidades se encuentran en forma de monómeros α/β , para después formar trímeros $(\alpha/\beta)_3$ (ficocianina y aloficocianina) o hexámeros $(\alpha/\beta)_6$ (ficoeritrina), donde en el caso de la Ficoeritrina, la unidad γ se encuentra en el centro del hexámero, $(\alpha/\beta)_6\gamma$ (Jiang y col., 2001; Ma y col., 2002; Viskari y Colyer, 2002; Isailovic y col., 2004; Zhao y col., 2006). En la tabla I se muestran los pesos moleculares así como las longitudes de onda de absorción y de emisión de cada una de las ficobiliproteínas.

Aplicaciones de las Ficobiliproteínas en la Industria y en la Medicina

Estas proteínas han mostrado una colorida, estable y alta fluorescencia, por lo que han sido ampliamente utilizadas conjugadas con anticuerpos (inmunoensayos así como en marcaje celular), en microscopía de fluorescencia y tienen posible uso como fotosensibilizador en la terapia fotodinámica de tumores (Ma y col., 2002; Isailovic y col., 2004; Soni y col., 2006). Son utilizadas también en la industria alimentaria como colorantes, así también la industria de cosméticos (Bermejo y col., 2002; Viskari y Colyer, 2003; Liu y col., 2005).

Son varios los estudios acerca de las propiedades de esta clase de proteínas, tal es el caso de Piñero y col. en el 2001. Ellos realizaron la purificación de ficocianina de la alga planctónica *Spirulina platensis*. Durante el

Tabla I. Características físicas generales de las principales ficobiliproteínas (Kronick, 1986; Viskari y Colyer, 2003; Isailovic y col., 2004).

	Ficoeritrina	Ficocianina	Aloficocianina
Estructura	$(\alpha/\beta)_6\gamma$	$(\alpha/\beta)_3$	$(\alpha/\beta)_3$
Peso molecular	≈ 240 kDa	≈ 72 kDa	≈ 110 kDa
Absorción λ_{\max} (nm)	540–570	610–620	650–655
Fluorescencia λ_{\max} (nm)	≈ 575	≈ 643	≈ 660

proceso de purificación obtuvieron 4 fracciones, a las cuales se les evaluó su actividad antioxidante, encontrando que esta actividad se incrementa proporcionalmente a la concentración de ficocianina presente en las fracciones.

Dos años después, trabajando con ficocianina de esta misma alga y con la línea tumoral murina BC-8, Pardhasari y colaboradores encontraron que la ficocianina incrementaba los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) y a su vez los niveles de expresión de Bcl-2, que son proteínas que disminuyen la producción de ROS, se vieron disminuidos, provocando muerte celular por apoptosis.

Los efectos antiproliferativos de la alga roja *Gelidium amansii* fueron estudiados en el 2004, por Cheng y colaboradores, utilizando para ello diferentes extractos de la misma: extracto en PBS (Solución amortiguadora de fosfatos), extracto en metanol y un extracto del agar. Utilizaron las líneas celulares Hepa-1 (hepatoma murino), HL-60 (leucemia humana) y la línea normal NIH-3T3 (fibroblasto embrionario murino), encontrando que los extractos utilizados tenían un efecto antiproliferativo significativo en la línea Hepa-1 y en NIH-3T3, es decir, presentaba citotoxicidad hacia las células normales. En el caso de la línea HL-60 no se obtuvo un efecto en la proliferación.

Athukorala y col., en el 2006, estudiaron la alga marrón *Ecklonia cava*, realizando ensayos de proliferación con el extracto original, una fracción de polisacárido crudo y una segunda fracción pero de compuestos fenólicos. Encontraron que estas 3 mezclas tenían un efecto antiproliferativo significativo en las líneas celulares CT-26 (cáncer de colón murino), THP-1 y U-937 (ambas líneas de leucemia humana), B-16 (melanoma murino), pero no mostraron un efecto citotóxico significativo al utilizar una línea normal como control (línea celular V-79-4, proveniente de fibroblastos pulmonares de hámster). Lins y colaboradores, en el 2008, estudiaron las propiedades de polisacáridos

sulfatados de la alga roja *Champia feldmannii*, encontrando un efecto antitumoral *in vivo* contra el tumor de Sarcoma 180. En el 2009, Shih y colaboradores estudiaron las propiedades anti-inflamatorias y anti-hiperalgésicas de la C-ficocianina de *Spirulina platensis*, encontrando que disminuye la hiperalgesia, aparentemente, según su hipótesis, a través de la disminución de la producción de óxido nítrico y PGE₂ (Prostaglandina E₂).

***Rhodorus marinus* y Ficobiliproteínas**

Rhodorus marinus es una microalga roja, cosmopolita, unicelular, que mide entre 4.5 y 11.5 µm de diámetro (Wilson y col., 2002). En la figura 3 se muestra una fotografía de la misma. Se han descrito algunos estudios sobre fotosíntesis y producción de ficoeritrina (Molina y col., 2007) de esta microalga, así como un estudio de extractos insolubles en etanol de varias algas, donde encontraron que *R. marinus* posee cierta actividad antialérgica (Fujitani y col., 2001), pero de la cual no se han realizado estudios acerca de las propiedades de sus ficobiliproteínas.

Para poder estudiar las características de una proteína, así como sus propiedades, es necesario, como primer paso, su purificación.

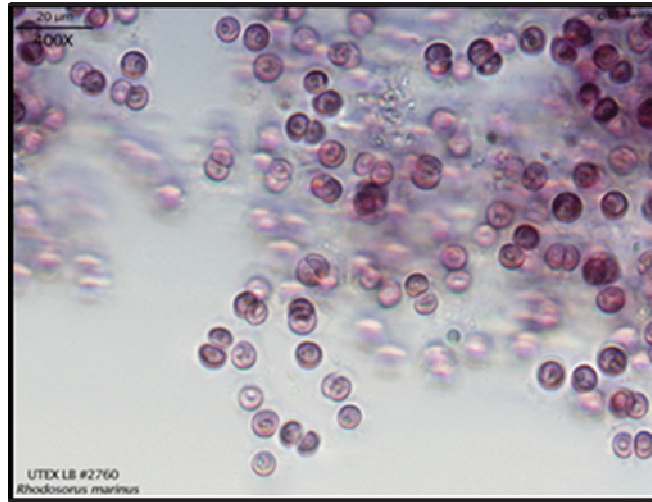


Figura 3. *Rhodospirillum rubrum* (The Culture Collection of Algae, UTEX)

Purificación de Ficoeritrina

La microalga *R. marinus* puede ser cultivada en el laboratorio utilizando agua proveniente del mar, previamente filtrada y esterilizada mediante un proceso químico con hipoclorito de sodio al 10% y tiosulfato de sodio. Después de este proceso, se adiciona al agua ya esterilizada, medio de cultivo Erdschreiber, el cual contiene nutrientes mayores (fosfatos y nitratos) así como metales trazas (Enríquez, 2006; Básaca, 2006).

Ya que se obtiene suficiente biomasa, se procede a obtener la proteína, mediante precipitaciones con sulfato de amonio para después realizar diferentes pasos cromatográficos para la purificación de la ficoeritrina.

Cromatografía

Los métodos cromatográficos se basan en la velocidad de desplazamiento diferencial de las moléculas que conforman una mezcla al ser arrastrados por una fase móvil, la cual puede ser líquida o gaseosa, a través de una fase estacionario, misma que puede ser líquida o sólida, como se muestra en la figura 6 (Valcárcel, 1988).

Esta separación de compuestos va a depender de varias características de cada molécula: solubilidad, adsorción, volatilidad, tamaño, carga, reactividad química o bioquímica, entre otras. Es muy poco probable que dos moléculas distintas presenten las mismas propiedades físico-químicas ante un sistema cromatográfico dado, es en esto en lo que se fundamenta la separación cromatográfica (Valcarcel, 1988).

Son varios procesos diferentes de cromatografía los que existen. Básaca, durante su tesis de doctorado en el laboratorio de Biomoléculas del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS), empleó 3 procesos de cromatografías para la obtención y purificación de Ficoeritrina:

- Cromatografía de filtración en gel: realiza separaciones en base al tamaño molecular de las partículas en la mezcla.
- Cromatografía de Intercambio Iónico: las proteínas se separan en base a su carga neta.
- Cromatografía Líquida de alta resolución: se basa en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

mismos procesos que serán utilizados para la purificación de esta proteína para el presente trabajo.

Ensayos de Proliferación Celular

La proliferación celular, así como la caracterización de agentes que promuevan o retarden la misma, es sumamente importante en el estudio de nuevos compuestos con uso potencial como medicamento. Algunos de los métodos más utilizados para la evaluación de la proliferación celular son: 5-Bromodeoxiuridina, Timidina Tritiada, citometría de flujo (éster de carboxifluoresceina diacetato succinimidil) y el ensayo de MTT.

La 5-Bromodeoxiuridina (BrdU) es un análogo halogenado de la timidina que se integra permanentemente en el ADN de las células en división durante la síntesis de ADN en la fase S del ciclo celular. El BrdU puede ser detectado inmunocitoquímicamente *in vivo e in vitro*, permitiendo la identificación de las células que se encontraban dividiendo durante el período de exposición al BrdU. El BrdU revela detalles de la morfología nuclear celular, sin embargo no es un marcador confiable del número de divisiones por las que ha pasado la célula (Stewart y Azam, 1999).

La Timidina tritiada (^3H -Timidina) ha sido ampliamente utilizado para ensayos de proliferación de bacterias y células. Es un compuesto radioactivo utilizado a menudo en el estudio y localización de ADN. La timidina es una base soluble, la cual es específica para el ADN. Se incorpora en la estructura macromolecular del ADN durante la síntesis y replicación de los cromosomas. Es un método sensible, directo y cuantitativo, pero presenta muchas dificultades al manejarlo debido a su naturaleza radioactiva (Stewart y Azam, 1999).

El éster de carboxifluoresceína diacetato succinimidil (CFDA-SE) es un reactivo muy efectivo para el estudio y seguimiento del progreso de división de las células en proliferación. Atraviesa pasivamente la membrana celular y se une covalentemente a los grupos amino libres de las macromoléculas intracelulares. Esterasas endógenas citoplasmáticas remueven los grupos carboxil, convirtiendo al CFDA-SE no fluorescente a CFSE fluorescente. Durante la división celular, el CFSE se distribuye uniformemente entre las células hijas. Cada división celular reduce la intensidad de la fluorescencia de las células hijas por la mitad en el análisis por citometría de flujo. (Lyons y col., 1994; Lyons, B., 2000; Wang y col., 2005).

El método de MTT es utilizado en la determinación cuantitativa de la activación y proliferación celular. Consiste en la reducción de sales de

tetrazolium dada por la proliferación celular. Esta sal es reducida por las células metabólicamente activas, en las mitocondrias, en parte por acción de las enzimas deshidrogenasas, para generar equivalentes reductores como NADH y NADPH. El púrpura formazán intracelular resultante de esta reducción puede ser solubilizado y cuantificado por método espectrofotométrico en un lector de microplacas. Este método tiene la ventaja de ser de bajo costo, rápido y no hay manejo de material radioactivo (Mossman, T., 1983; Bounous y col., 1992).

Éste último método fue el elegido para la evaluación del efecto de la B-ficoeritrina en la línea celular HeLa, por sus características antes mencionadas y se contaba con lector de microplacas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de *Rhodosorus marinus*

La cepa de la microalga roja *Rhodosorus marinus* fue adquirida a través de la colección de algas de la Universidad de Texas (UTEX, Austin, Texas). El medio Erschreiber fue el utilizado para el cultivo de *Rhodosorus marinus*, medio recomendado por el proveedor, y con modificaciones realizadas por Básaca (tesis en proceso, 2009). En la tabla II se muestran los compuestos y sus concentraciones para la preparación de soluciones madre requeridas para la preparación de medio de cultivo Erschreiber, y en la tabla III se indican los volúmenes necesarios de cada una de ellas. La microalga se cultiva inicialmente en tubos de ensaye de 10 mL, hasta finalmente la obtención de la biomasa de los garrafones (12 L), se requieren de dos a tres semanas para obtener alrededor de 5 g por 12 litros. El cultivo se va realizando mediante escalonamientos: se parte del crecimiento en tubo de ensaye, lo cual dura aproximadamente 3 semanas, para después pasar su contenido a un volumen mayor, de 100 mL. Transcurridas 2 semanas, las microalgas que han crecido en el matraz son vertidas a un garrafón, conteniendo 12 L de medio de cultivo, en el que tardan aproximadamente 3 semanas en crecer para dar un aproximado de 5 gramos de biomasa liofilizada, siempre y cuando las microalgas se encuentren en fase exponencial. Todos estos pasos de cultivo se realizan a 25 °C, a temperatura ambiente. Cuando las microalgas se encuentran en el garrafón, se hace uso de bombas de aire y de aireadores para la oxigenación del agua. Es necesaria la esterilización del agua de mar previa a la

Tabla II. Soluciones madre de Nutrientes mayores, metales traza y vitaminas requeridas para la preparación de medio Erschreiber (UTEX; Básaca, G., 2006)

Constituyentes	Fórmula	Concentración
Nutrientes mayores		gr/ 10 mL de agua destilada
Nitrato de sodio	NaNO ₃	0.2
Fosfato de sodio monobásico	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.03
Solución de metales traza		mg/1000 mL de agua destilada
Cloruro férrico	FeCl ₃ ·6H ₂ O	97
Cloruro manganoso	MnCl ₂ ·4H ₂ O	41
Cloruro de zinc	ZnCl ₂	5
Cloruro de cobalto	CoCl ₂ ·6H ₂ O	2
Molibdato de Sodio	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	4
Solución de vitaminas		mg/100 mL de agua destilada
Tiamina	C ₁₂ H ₁₇ N ₄ OS	20
Biotina	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ OS	1
Cianocobalamina (B12)	C ₆₃ H ₈₆ CoN ₁₄ P	10

Tabla III. Preparación del medio de cultivo Erschreiber

Solución madre	Volumen por litro de medio Erschreiber
Nitrato de sodio	10 mL
Fosfato de sodio monobásico	10 mL
Metales traza	12 mL
Vitaminas	1 mL

realización de los cultivos, así como de las soluciones utilizadas. Al realizar el cultivo de la cepa en los tubos de 10 mL y en los matraces de 100 mL, el agua de mar puede ser esterilizada en autoclave, ya que es un volumen pequeño.

Una vez que se requiera agua de mar estéril para los garrafones, se puede proceder a una esterilización química, utilizando hipoclorito de sodio al 5%, dejando que reposar el agua con el cloro por 24 horas. Transcurrido ese período de tiempo, es necesaria la inactivación del cloro, ésto se logra agregando tiosulfato de sodio (150 mg/l), la misma cantidad que se agregó de cloro, y dejar reposar por otras 24 horas (Enriquez, E., 2006; Básaca, G., 2006).

Obtención de Biomasa de *Rhodorus marinus*

Una vez logrado el crecimiento esperado de la microalga *Rhodorus marinus*, se procedió a la obtención de la biomasa, para lo cual se dejó reposar el cultivo alrededor de 2 horas hasta que la mayor parte de las células sedimentaron. Se eliminó por aspiración el sobrenadante, con la ayuda de una manguera limpia, para después centrifugar el sedimento obtenido, con el fin de eliminar toda el agua posible. Esta centrifugación se realizó a 3000 r.p.m. (Eppendorf™, modelo 5804R) durante 5 minutos. Se llevó a cabo un lavado de la biomasa con agua destilada, con el fin de eliminar las sales residuales provenientes del agua marina para cultivo, y se utilizaron las mismas características de centrifugación antes mencionadas. Una vez lavada la biomasa, se procedió a congelarla a -20°C para después liofilizarla, utilizando el sistema Freezone 6 Plus de Labconco™. Ya obtenida y liofilizada la biomasa, se continuó con el proceso de purificación (Enriquez, E., 2006; Básaca, G., 2006).

Precipitación de Proteínas de *R. marinus*

Para la realización de la precipitación de proteínas de *R. marinus*, se utilizaron aproximadamente 4 gramos de biomasa liofilizada. Esta biomasa fue resuspendida en buffer de fosfatos/NaCl (0.010 M de Na_2HPO_4 , 0.1 M NaCl, pH 7.0), previamente refrigerado. La muestra se colocó en un mortero y después se metió a un congelador hasta que estuviera a punto de hielo. Ocurrido esto, se procedió a moler la muestra, para después agregarla en un vaso de precipitados y sonicarla en frío durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo de sonicación, se realizó una centrifugación, a 5000 r.p.m., a 4°C, y por 10 minutos para después filtrar los sobrenadantes obtenidos a través de papel Whatman de poro 1 μM , o en filtros de fibra de vidrio, descartándose todo el precipitado (Rossano y col., 2003; Enriquez, E., 2006; Básaca, G., 2006).

Para la precipitación proteica, se hicieron dos saturaciones con Sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Sigma™) en dos pasos: una primera precipitación al 40% seguida de otra precipitación pero al 60%. En la primera precipitación (al 40%), se agregó el sulfato de amonio al sobrenadante filtrado, con agitación constante, a 4°C y se mantuvo bajo esas condiciones durante 3 horas. Se llevó a cabo una centrifugación de la muestra a 3000 r.p.m., a 4°C y por 10 minutos, descartando el precipitado. Al sobrenadante obtenido se le agregó nuevamente sulfato de amonio (precipitación al 60%), y se dejó en agitación por 12 horas, también a 4°C. Transcurridas las 12 horas, la muestra fue centrifugada en las mismas condiciones antes mencionadas. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 30 mL de buffer de fosfatos (Enriquez, E., 2006; Básaca, G., 2006).

Cromatografía de Filtración en Gel

Para la desalación de la muestra, se llevó a cabo una cromatografía de exclusión por tamaño, utilizándose para ello una columna de 30 cm por 3 cm, teniendo como matriz Sephadex G-25 (Sigma™), hidratada con solución reguladora $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.010 M y 0.1 M de NaCl (Sigma™) a pH 7, misma que fue empleada como fase móvil. La columna se conectó a un sistema de bomba peristáltica de flujo variable (VWR™), con flujo constante de 1 mL/min. Se realizaron recolecciones de 3 mL cada una. Una vez obtenidos las fracciones, se realizó una lectura de absorbancia a 280 nm (UV/VIS) a cada una de ellas. Las fracciones que mostraron absorbancia, se mezclaron para posteriormente realizar Cromatografía de Intercambio Iónico en Q-Sepharosa (HiPrep™ 16/10 Q XL, Supelco)

Cromatografía de Intercambio Iónico

Una vez mezcladas las fracciones que presentaron absorción a 280 nm, se llevó a cabo cromatografía de intercambio iónico a esta mezcla. La columna utilizada para ello fue de Q-Sepharosa, equilibrada con buffer de fosfatos ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.010 M y 0.1 M de NaCl a pH 7). Para la elución se emplearon las siguientes soluciones amortiguadoras: 10 mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.10 M de NaCl, 10 mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.25 M de NaCl y 10mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.5 M de NaCl. Para la obtención de la separación de las diferentes fracciones, se utilizaron 40 mL de cada uno de las soluciones amortiguadoras, de menor a mayor fuerza iónica. Se recolectaron fracciones de 1 mL, con flujo constante de

1 mL/min, y se analizaron por medio lecturas de absorbancia a 280, 545, 610 y 650 nm, absorbancias características de proteínas, ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina respectivamente.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Se llevó a cabo con una Columna Zorbax GF-250 (0.94 x 25 cm, Agilent™), la cual se pre-equilibró con un buffer de fosfato 0.01 M conteniendo 0.1M de NaCl y permaneció a 25 °C. La muestra fue filtrada con membrana de poro de 0.2 micras, previo a su inyección en un loop de 2 mL. La columna se eluyó con el mismo buffer, con un flujo de 0.5 mL/min y las fracciones se recolectaron a los 18 minutos posteriores a la inyección de la muestra, en volúmenes de 1 ml, es decir, cada 2 minutos. Se utilizó el sistema HPLC de Agilent serie 1100.

Determinación de Pureza de Ficoeritrina

Para conocer la pureza de la ficoeritrina obtenida, se realizaron lecturas de absorbancia a 545 y 280 nm de cada una de las fracciones obtenidas de HPLC. Mediante el cálculo:

$$A_{545}/A_{280} = \text{Pureza de Ficoeritrina}$$

se determinó el grado de pureza para cada fracción, donde la absorbancia a 545nm (A_{545}) representa la concentración de B-ficoeritrina, y la absorbancia a

280nm (A_{280}) indica la concentración total de proteínas en la solución (Bermejo y col., 2002; Liu y col., 2005). Las fracciones que resultaron con $A_{545}/A_{280} > 4$ se consideraron soluciones ricas en B-ficoeritrina (Bermejo y col., 2003).

Determinación de Proteína

La concentración proteica fue determinada utilizando el método de Bradford. El método 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 nm (Sigma™). Se utilizó el protocolo para placas de 96 de pozos, ya que requiere poca cantidad de muestra (5 μ L). El reactivo de Bradford fue llevado a temperatura ambiente antes de ser utilizado, con previa agitación suave. Se prepararon estándares de proteína, utilizando buffer de fosfatos y estándar de albúmina sérica bovina (o algún equivalente), entre el rango de 0.1 y 1.4 mg/mL (utilizar alrededor de 5 concentraciones). Se agregan 5 μ L de cada uno de los estándares de proteína en cada pozo por separado. En los pozos que fueron utilizados como blanco se agregaron 5 μ L de buffer en lugar del estándar. La muestra problema fue preparada con una concentración aproximada entre 0.1 y 1.4 mg/mL. Una vez preparadas las muestras, se agregaron 250 μ L del reactivo de Bradford a cada pozo con los estándares de proteína, muestra problema y blanco. Se hizo por triplicado cada uno de los pozos. Una vez agregado el reactivo de Bradford, se colocó la placa en un shaker por alrededor de 30 segundos para mezclar el contenido de los pozos. Las muestras se dejaron incubar a temperatura ambiente de 5 a 45 minutos (el complejo colorante-proteína es estable hasta por 60 minutos). Transcurrido el tiempo de incubación se leyó la absorbancia de los pozos en un lector de

microplaca a 592nm. Se graficó la absorbancia neta vs la concentración proteica. La concentración proteica de la muestra problema se determinó comparando su valor de A_{595} contra la curva estándar.

Cultivo Celular

Se utilizó la línea celular HeLa (CCL-2), la cual proviene de adenocarcinoma de cérvix, y que fue obtenida en American Type Culture Collection (ATCC). Las células se mantuvieron en botellas de cultivo de 25 cm² en Medio Eagle Modificado de Dubelcco (DMEM, Sigma™), mismo que se suplementó al 10% con suero fetal bovino (Gibco™), previamente inactivado mediante calentamiento, y con antibióticos: Penicilina (10,000 unidades/mL), Estreptomicina (10 mg/mL) y Gentamicina (50 mg/mL), todos de la marca Sigma™. Se incubaron con una atmósfera de CO₂ al 5%, a 37°C y con una humedad relativa del 90%.

Ensayos de Proliferación Celular

Para la obtención de las células, fueron despegadas de las botellas de cultivo utilizando Tripsina (Sigma™), se incubó por 5 minutos para después ser aspiradas de la botella y se colocaron en un tubo cónico de 50 mL, donde se les agregó 10 mL de medio DMEM, suplementado al 10% con suero fetal bovino, ésto para inactivar a la tripsina remanente. Se centrifugaron por 10 minutos, a

4°C y 3000 r.p.m., el botón celular se resuspendió con 5 mL de medio para posteriormente ser contadas en una cámara de Neubauer (Hematocitómetro) utilizando, para la observación de la viabilidad celular, el colorante supravital Azul de Tripano (Sigma™) en dilución 1:10. La viabilidad requerida para el ensayo celular es del 95%.

Una vez ajustada la concentración de la suspensión celular a 2×10^5 células/mL, se procedió a sembrarlas en placas de cultivo de 96 pozos planos (Corning). Las células fueron incubadas a 37°C, 5% humedad relativa del 90% durante 24 horas, esto para permitir su adherencia al fondo de cada uno de los pozos y así formar una monocapa celular. Transcurrido este período, fueron agregados cada uno de los controles, así como cada una de las concentraciones de B-ficoeritrina a probar. Es importante colocar pozos con controles sin células, es decir, solo con medio de cultivo y con los tratamientos a probar. Estos controles deben de tener las mismas cantidades de medio y tratamientos que los que tienen células, esto es para que, al analizar los datos, se resten las absorbancias que tienen los compuestos por si solos, y que ese dato no interfiere en la absorbancia provocada por el metabolismo celular.

Después de 48 horas posteriores a la colocación de los controles y de la B-ficoeritrina, se evaluó la proliferación celular utilizando el método de MTT (Mossman, 1983). La sal de MTT (Sigma™) fue disuelta previamente en una solución reguladora de fosfatos (PBS), quedando con una concentración final de 5 mg/mL. Se agregaron 15 µL a cada uno de los pozos después de las incubaciones anteriores. Después de transcurridas 4 horas, se adicionó isopropanol acídico (150 µL), para disolver los cristales de formazán, y se leyó la absorbancia a 570-655 nm. Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado (Cheng y col. 2007).

Análisis Estadístico

Se utilizó el paquete NCSS97 (NCSS, Kaysville, UT, USA) para el análisis estadístico. Los datos se presentan como media \pm SD. Los datos fueron transformados utilizando el arcoseno de la raíz cuadrada de cada uno de los datos, los cuales mostraban normalidad, por lo que se realizó prueba de ANOVA de una vía, donde se demostró una diferencia entre grupos. Para finalizar, se realizó prueba de Tukey-Kramer, para determinar las diferencias entre cada grupo experimental. La diferencia entre los grupos fue estadísticamente significativa cuando el valor de $P > 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Para realizar la evaluación del efecto de la ficoeritrina sobre la proliferación celular, se llevó a cabo el cultivo de la microalga roja *Rhodosorus marinus*, como fuente de la proteína antes mencionada, y el cultivo de la línea celular HeLa (CCL-2), proveniente de adenocarcinoma de cérvix.

Obtención de Biomasa de la Microalga *Rhodosorus marinus*

Para el cultivo de microalgas, a partir de la cepa crecida en matraces Erlenmeyer, se requirió alrededor de 3 semanas para obtener suficiente biomasa de cada uno de los garrafones. Para obtener 5 gramos de biomasa liofilizada se requirió las microalgas de dos garrafones. El cultivo de *Rhodosorus marinus* se realizó de manera continua.

Purificación de B-ficoeritrina

Una vez obtenido el extracto crudo (sonicación y filtración de la biomasa), se procedió a la realización de precipitaciones con sulfato de amonio al 40% y al 60%, ésto para la obtención de la mezcla de ficobiliproteínas (ficocianina, ficoeritrina y aloficocianina). Durante la primera precipitación (40%), se obtuvieron aproximadamente 150 mL de solución, mientras que en la segunda (60%) se obtuvieron 160 mL, en ambos el extracto poseía un color azul-violeta. Una vez obtenida esta última solución, se centrifugó, se descartó el sobrenadante, y la proteína obtenida se resuspendió en 30 mL de buffer de fosfatos.

En la cromatografía en Sephadex G-25, se hicieron recolecciones de 3 mL, desde el momento en que se colocó la muestra sobre la cama de Sephadex. Se realizaron lecturas de absorbancias a 280 nm para saber si existía la presencia de proteínas en cada una de las fracciones, encontrando que las proteínas aparecían a partir del volumen 11 de elución, es decir, se recolectaron 33 mL de volumen muerto (sin absorbancia en los 280 nm) después de colocada la muestra. Se obtuvieron un total de 20 fracciones con proteínas, con las cuales se realizó un pool y un barrido espectral, de 250 a 700 nm. En la figura 4 se observa la gráfica de este barrido. Se calculó la pureza de la ficoeritrina del pool y resultó ser de aproximadamente 1.24 en cada una de las purificaciones que se realizaron, lo que indica la presencia de proteínas contaminantes. Después de concluida la cromatografía en Sephadex G-25, se procedió a llevar a cabo cromatografía de intercambio iónico.

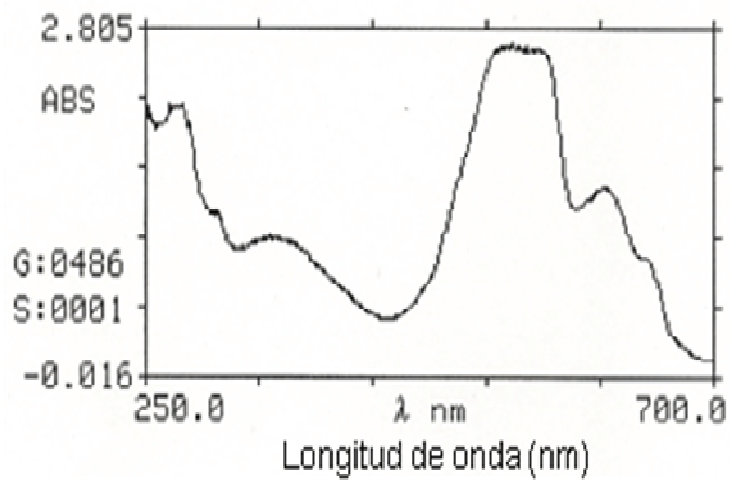


Figura 4. Barrido espectral después de cromatografía en G-25. En la gráfica se pueden observar varios picos de absorción: a 280 nm (proteínas en general), 545 y 565 nm (B-ficoeritrina), 610 nm (ficocianina), 650 nm (aloficocianina) y un hombro alrededor de 498 nm (B-ficoeritrina).

En la cromatografía de intercambio iónico (Q-Sepharosa), las recolecciones de las eluciones fueron de 1 mL. Al igual que en la cromatografía con G-25, se realizaron lecturas de absorbancia a 280 nm a cada fracción obtenida, encontrando que a partir de la fracción 20 existía la presencia de proteínas, coincidiendo con la presencia de una coloración azul en la misma fracción, color característico de la proteína ficocianina. Una vez obtenidas todas las fracciones con proteína, a cada una se le realizaron lecturas a 545, 610 y 650, siendo las absorbancias características de ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina respectivamente. Las fracciones que presentaban absorbancias muy elevadas de ficocianina y aloficocianina con respecto a ficoeritrina se dejaban a un lado, haciendo un pool de solamente aquellas fracciones donde la ficoeritrina era la proteína dominante.

En la cromatografía en columna Zorbax GF-250 (Agilent™) también se hicieron lecturas a diferentes longitudes de onda: 280, 545, 610 y 650 nm. Se determinó la pureza de la ficoeritrina en las fracciones obtenidas, utilizando la fórmula A_{540}/A_{280} , obteniendo pools de Ficoeritrina con 4.3, 4.6 y 5.4 de pureza, por lo que, según Bermejo y colaboradores, en el 2003, estas soluciones pueden considerarse como puras por ser ricas en B-ficoeritrina al tener un índice de pureza mayor a 4. Se realizó un barrido espectral (250-700nm) del pool de pureza de 5.4, mostrado en la figura 5, donde se pueden observar los picos máximos de absorbancia característicos de B-ficoeritrina, los cuales son a 545 y 565 nm aproximadamente, con un hombro a alrededor de los 498 nm. En esta misma figura se compara el espectro obtenido en nuestra purificación de B-ficoeritrina de *Rhodospirillum rubrum* y el espectro obtenido por Bermejo y colaboradores, en el 2002, para B-ficoeritrina obtenida de *Porphyridium cruentum*. En la figura 6 se comparan las gráficas de los barridos realizados al pool obtenido de la cromatografía con G-25 y del obtenido después de haber realizado el último paso de purificación (HPLC).

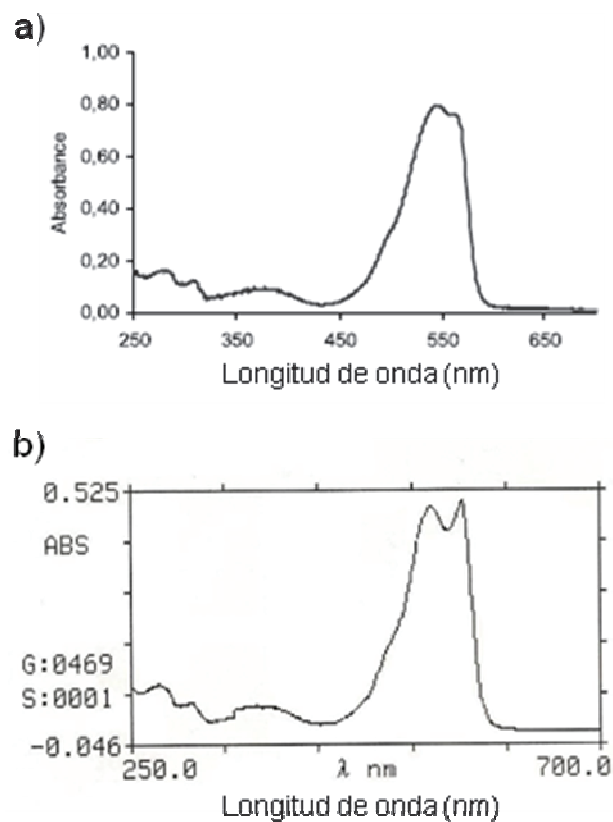


Figura 5. Gráficas de barridos espectrales de B-fucoeritrina purificada. En la figura a) se muestra el barrido espectral de B-fucoeritrina obtenida de *Porphyridium cruentum* por Bermejo y colaboradores en el 2002 y en la figura b) el barrido espectral para B-fucoeritrina obtenida de *Rhodospirillum rubrum* en nuestro laboratorio.

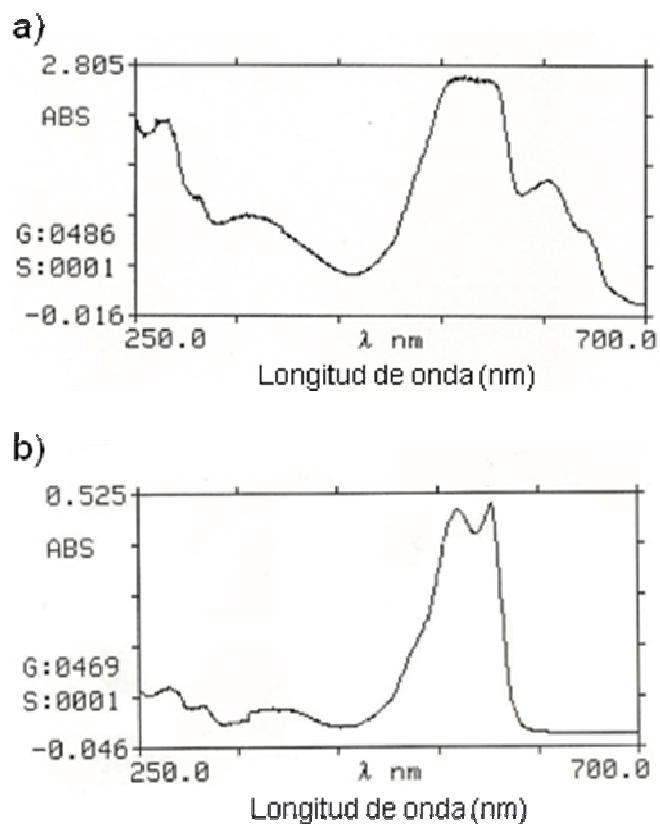


Figura 6. Gráficas de barrido espectral del producto de G-25 y HPLC. a) Gráfica del barrido espectral después de realizada la cromatografía en Sephadex G-25 (pureza de 1.24). b) Gráfica del barrido espectral después de la cromatografía por HPLC (pureza de 5.4).

Ensayos de Proliferación Celular

Primeramente se hizo un ensayo preliminar utilizando un rango amplio de concentración de ficoeritrina, para así conocer las concentraciones óptimas de la misma. Se decidió comenzar con dosis entre los 10 y 0.625 mg/mL, disuelta en PBS. La pureza de la B-ficoeritrina utilizada fue de 4.6. Cada pozo se hizo por triplicado y como grupo control hubo 3 pozos con células solo conteniendo medio de cultivo. Después de 48 horas de incubación, se utilizó el método de MTT para la medición de la proliferación celular, con el que se obtuvo una gráfica de cinco puntos como se muestra en la figura 7.

Como se puede apreciar en la gráfica mostrada en la figura 7, se observa un efecto dosis-respuesta, teniendo un efecto antiproliferativo significativo ($p < 0.05$) en las cinco concentraciones utilizadas, pero el cual fue mayor en las concentraciones de 10 y 5 mg/mL. En el caso de la concentración de 2.5 mg/mL gráficamente se ve un efecto mayor en comparación con las concentraciones de 0.625, 1.25 mg/mL. Es por eso que se tomó la decisión de utilizar las concentraciones de 10, 5 y 2.5 mg/mL para la realización de los ensayos posteriores.

Después de conocer las concentraciones de B-ficoeritrina con las que se iban a trabajar, se procedió a la realización de los ensayos de proliferación. Para ello se utilizaron 3 grupos controles: Células con medio de cultivo y PBS como controles normales de crecimiento celular y Cis-Platino (Sigma™), como control antiproliferativo.

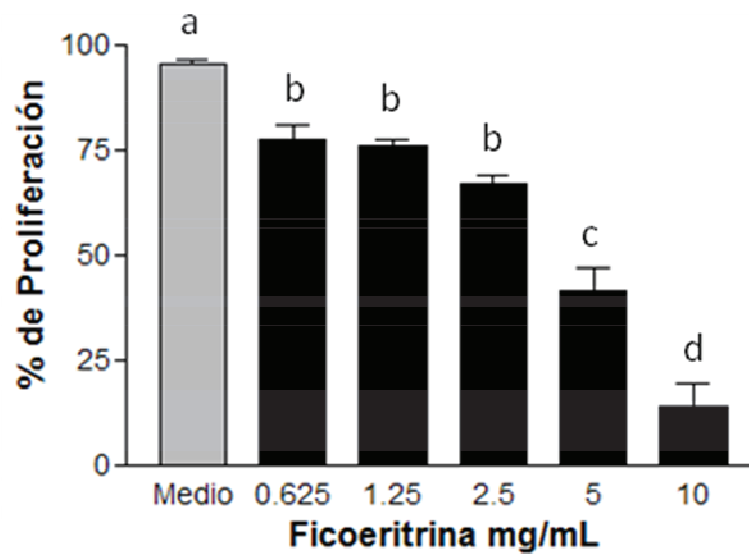


Figura 7. Ensayo Preliminar con B-ficoeritrina. En la gráfica se muestran los porcentajes de proliferación para cada uno de los tratamientos. Las células fueron incubadas por 48 horas con: 0.625, 1.25, 2.5, 5 y 10 mg/mL de B-ficoeritrina. Letras diferentes representan una diferencia significativa ($p < 0.05$).

El Cis-Platino (cis-Diclorodimamino Platino (II), figura 8), ha sido utilizado como un medicamento altamente efectivo en el tratamiento de algunos tipos de cáncer, como el testicular, de ovarios, cérvix, cuello y cabeza, y en otros tipos de males como tumores de testículos y de vejiga. Se intercala en las cadenas de ADN provocando así la inhibición de la transcripción, activación de vías apoptóticas, formación de especies reactivas de oxígeno, entre otras. Sin embargo, a pesar de su efectividad contra varios padecimientos, presenta efectos secundarios como ototoxicidad, daño neurológico y nefrológico siendo este último el más grave (Price y col., 2006; Cho y col., 2007). Sigma-Aldrich recomienda utilizar una concentración de Cis-Platino 25 μM para ensayos celulares, por lo que se decidió realizar una curva dosis-respuesta para encontrar la mejor concentración para las células con las que estaríamos trabajando (HeLa). Cada tratamiento se realizó por triplicado, tanto las células control (solo medio) como las células con tratamiento. Después de analizar los datos obtenidos del ensayo MTT, se obtuvo la gráfica mostrada en la figura 9, donde en efecto, la concentración de Cis-Platino 25 μM muestra ser un buen candidato como control para los ensayos posteriores.

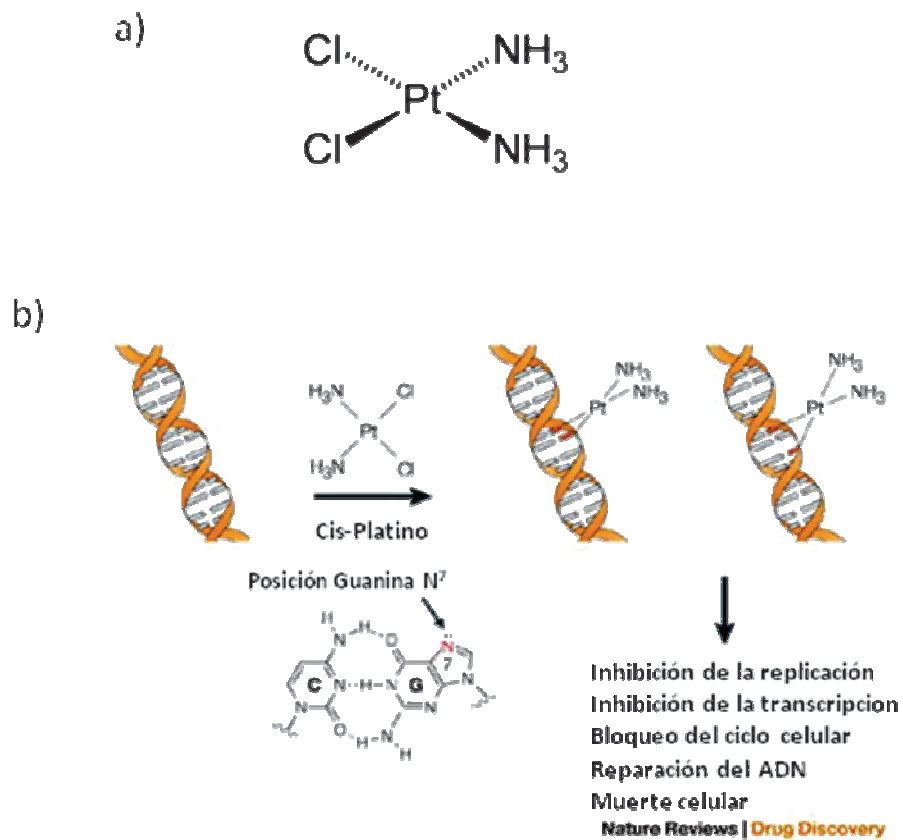


Figura 8. Estructura del Cis-Platino y su mecanismo de acción. Nature Reviews.

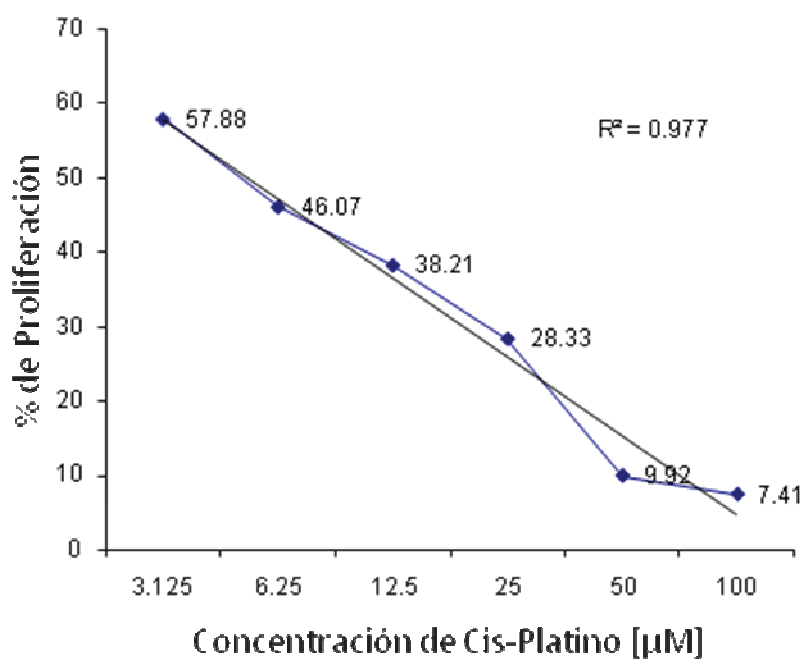


Figura 9. Curva de proliferación con Cis-Platino. En la gráfica se muestran los porcentajes de proliferación para cada uno de los tratamientos. Las células fueron incubadas por 48 horas con: 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 µM de Cis-Platino.

Una vez realizado el ensayo preliminar de proliferación con B-ficoeritrina y la curva de proliferación con Cis-platino, y que con estos ensayos se conocieran las mejores concentraciones de trabajo, se procedió a la realización de los ensayos de proliferación de B-ficoeritrina. De la misma manera que en el ensayo preliminar, se colocaron 10 mil células por pozo, se dejaron adherir al fondo de los pozos por 24 horas y se procedió a aplicar cada uno de los controles (células con medio, PBS y Cis-platino) y la B-ficoeritrina en cada una de las concentraciones a prueba. La incubación fue de 48 horas, a 37 °C, 5% CO₂ y 90% de humedad. Cada uno de los controles y tratamientos se realizaron por triplicado. A las 44 horas de incubación se agregó la sal de tetrazolium (MTT), se dejó incubar por otras 4 horas y se hizo la lectura en el lector de microplaca a 570 y 655 nm. Se realizaron un total de 10 ensayos. Obtenidas las absorbancias, se procedió a transformarlas en porcentajes de proliferación, obtenido la gráfica que se muestra en la figura 10.

La prueba de Tukey-Kramer, como se aprecia en la figura 10, mostró la existencia de 4 grupos diferentes entre sí, en la gráfica se representan con letras, donde los grupos con letras iguales no muestran diferencia entre ellos. Por lo tanto, de acuerdo a esto último:

- La proliferación celular no se ve afectada por el PBS utilizado para disolver al Cis-Platino y B-ficoeritrina.
- El Cis-Platino reduce significativamente ($p < 0.05$) la proliferación celular, con respecto a los dos grupos controles de proliferación normal (células con Medio y PBS).

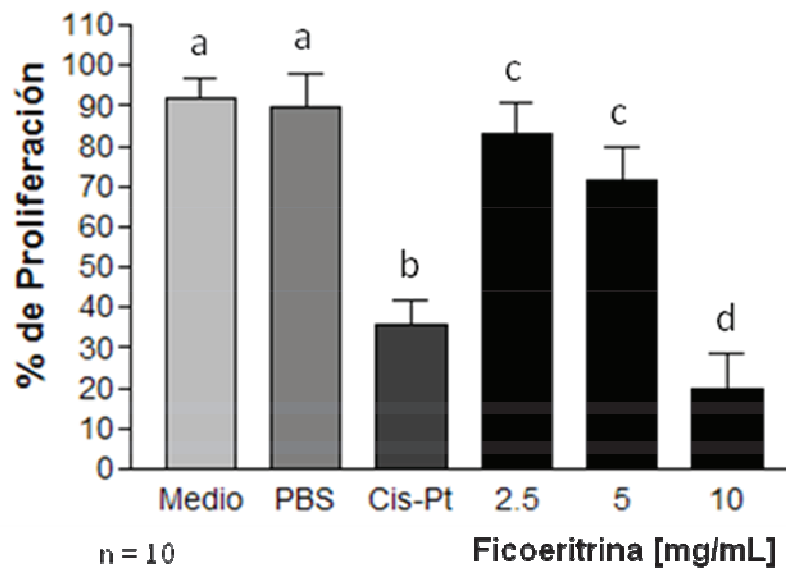


Figura 10. Ensayo de Proliferación de HeLa con B-ficoeritrina. En la gráfica se observan los 3 grupos controles, que son células con: Medio de cultivo, PBS (buffer de fosfatos) y Cis-Platino. Los últimos 3 grupos corresponden a las células con diferentes concentraciones de B-ficoeritrina: 2.5, 5 y 10 mg/mL. Letras diferentes representan una diferencia significativa ($p < 0.05$).

- Los tratamientos con 2.5 y 5 mg/mL de B-ficoeritrina tienen efecto antiproliferativo significativo ($p < 0.05$) con respecto a los dos grupos controles Medio y PBS, pero son similares entre si.
- El tratamiento con 10 mg/mL de B-ficoeritrina mostró un mayor efecto antiproliferativo ($p < 0.05$) con respecto a todos los demás grupos, incluso contra el grupo de Cis-Platino.

En los ensayos anteriores se utilizó B-ficoeritrina con una pureza de 4.3. Al pesarla para preparar las diluciones, se consideró que el total del polvo era solo proteína. Después de realizados los ensayos, nació la incertidumbre si realmente lo que era pesado de B-ficoeritrina para los ensayos era solo eso, proteína, por lo que se realizó un ensayo de Bradford , utilizando para la curva un estándar de Albúmina Sérica Bovina de 2 mg/mL, de donde se partió hacer diluciones seriadas de 1 a 0.0625 mg/mL, y para cuantificar B-ficoeritrina una solución de 10 mg/mL de liofilizado de la misma. En la figura 11 se muestra la curva obtenida para este ensayo. Utilizando la ecuación de la recta, se obtuvo que una concentración de proteína de 0.0719 mg/mL, es decir, de la solución problema (10 mg/mL), 9.9281 mg por mililitro de solución corresponde a sales de PBS y solo 0.0719 mg son de B-ficoeritrina. Por esto último, surgió otra duda: ¿esa concentración de sales de PBS serían las que ocasionaron la mortalidad celular en los ensayos de proliferación de la figura 10?

Para resolver esta duda, se liofilizó PBS para obtener las sales de la misma como se encontraban con la B-ficoeritrina, la cual poseía pureza de 4.6. Se realizaron dos ensayos de proliferación celular utilizando concentraciones de sales de PBS de 10, 5 y 2.5 mg/mL y bajo las mismas condiciones que todos los ensayos anteriormente realizados.

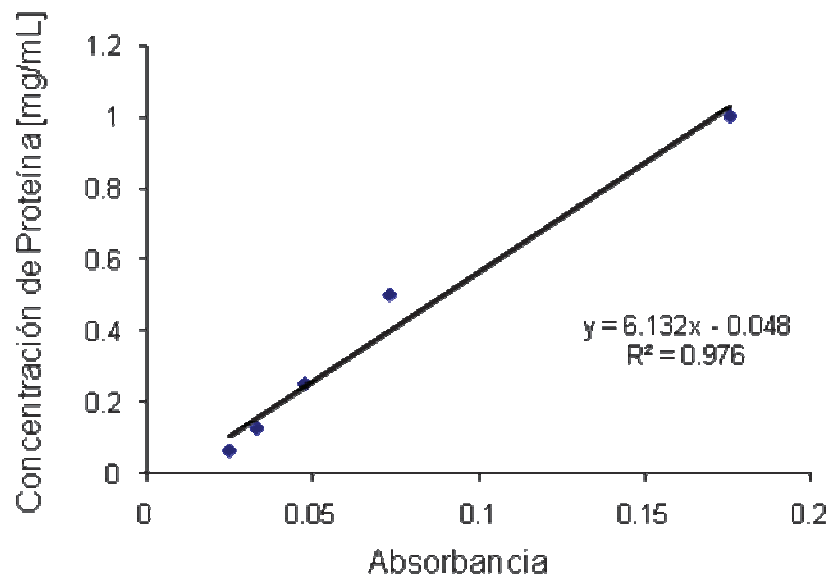


Figura 11. Curva de concentración proteica. Se utilizó el método de Bradford (Sigma™) y se utilizaron 5 concentraciones de albúmina sérica bovina para su elaboración: 1, 0.5, 0.25, 0.125 y 0.0625 mg/mL.

En la figura 12 se observan las proliferaciones obtenidas para cada una de los tratamientos. Como se puede apreciar, las tres concentraciones utilizadas (2.5, 5 y 10 mg/mL) tienen un efecto antiproliferativo significativo en las células, siendo mayor el efecto utilizando la concentración de 10 mg/mL.

Una vez obtenidos los resultados de los ensayos celulares (figura 11 y 12), se realizaron comparaciones entre los grupos de células a las que les adicionó las sales de PBS (PBS liofilizado) y los grupos a las que se les agregó la B-Ficoeritrina (previamente diluía en PBS y liofilizada), que a su vez, se encontraban también agrupados dependiendo de la concentración utilizada de cada tratamiento. Es decir, en una gráfica se encuentran, por ejemplo, una columna correspondiente al control de células con medio, otra para los datos de las células con B-Ficoeritrina (2.5 mg/mL) y una tercera columna para los datos obtenidos de las células con sales de PBS (2.5 mg/mL). La figura 13 muestra las gráficas obtenidas de estas comparaciones.

La prueba de Tukey-Kramer mostró diferencias significativas entre el control de células con medio de cultivo y los tratamientos en cada una de las concentraciones utilizadas. Pero en cuanto a la comparación entre el grupo de células con B-Ficoeritrina y el grupo de células con sales de PBS, en análisis mostró una $p < 0.05$ en las concentraciones de 2.5 y 10 mg/mL, no así en la concentración de 5 mg/mL. El efecto más notorio se observa en la gráfica 13c, es decir, al utilizar 10 mg/mL. Aún cuando la mortalidad con las sales de PBS ya es alta *per se*, y también aun siendo baja la concentración de proteína en el grupo tratado con B-Ficoeritrina (0.0719 mg de B-Ficoeritrina por mL), la mortalidad celular se ve notoriamente incrementada en presencia de las sales con la proteína en conjunto.

Es por esto que se tuvo la necesidad de realizar nuevos ensayos celulares con B-ficoeritrina, pero esta vez sometiéndola a un proceso de diálisis.

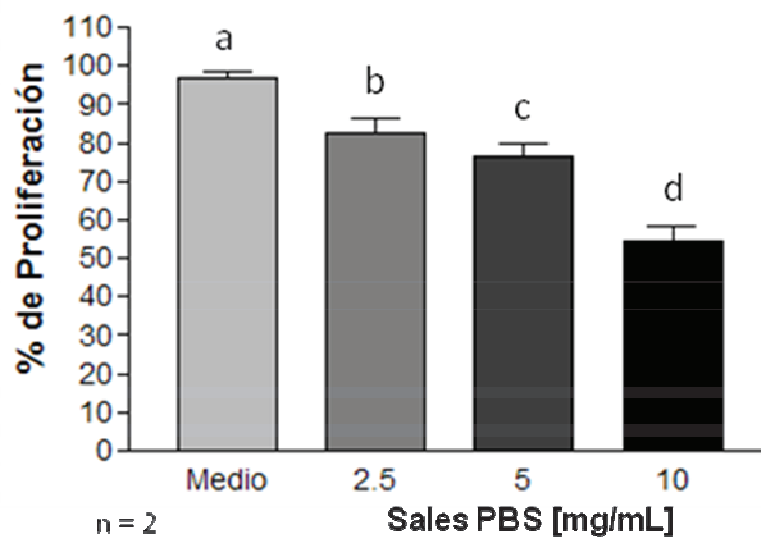


Figura 12. Ensayo celular con PBS Liofilizado. En la gráfica se observa en primer lugar el grupo control (células con medio de cultivo) y los últimos 3 grupos corresponden a las células con diferentes concentraciones de sales de PBS: 2.5, 5 y 10 mg/mL. Letras diferentes representan una diferencia significativa ($p < 0.05$).

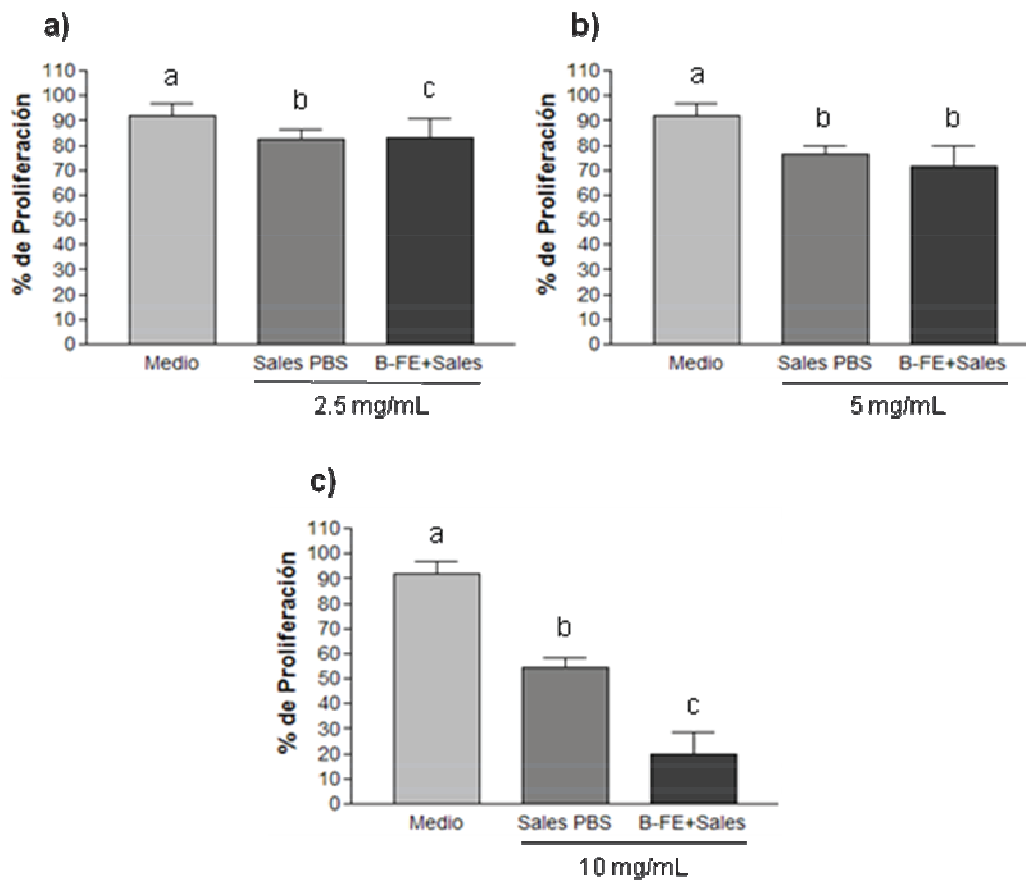


Figura 13. Sales de PBS y B-Ficoeritrina liofilizada con PBS. Se muestran las gráficas obtenidas para cada una de las concentraciones utilizadas: 2.5, 5 y 10 mg/mL del tratamiento. En cada una de estas gráficas se puede observar en primer lugar el grupo control (células + medio), en segunda lugar el grupo células con sales de PBS y en ultima posición el grupo celular con B-Ficoeritrina/sales (B-FE+Sales). Letras diferentes representan una $p < 0.05$.

Para la diálisis de la B-ficoeritrina, se utilizó una membrana porosa de 6 – 8 kD como punto de corte (Spectra/Por, Spectrum™). Una vez hidratada la membrana se procedió a agregar la B-ficoeritrina previamente disuelta en agua deionizada. Se cerró el extremo superior de la membrana y se puso en un vaso de precipitados con un litro de agua deionizada. Se colocó sobre una placa de agitación y todo el sistema se metió al refrigerador (4 °C), manteniendo agitación constante. Se mantuvo la B-ficoeritrina en diálisis durante 8 horas, haciendo cambio de agua del vaso cada 2 horas y media aproximadamente. Una vez finalizada la diálisis, se extrajo la B-ficoeritrina de la membrana, se congeló y se liofilizó para los estudios posteriores.

Para los siguientes ensayos celulares se usaron concentraciones de 5 a 0.3125 mg/mL de B-ficoeritrina dializada. Ésta fue disuelta en medio de cultivo, contrario a los primeros experimentos, donde se diluía con PBS. Se utilizaron las mismas condiciones de cultivo que en todos los demás ensayos celulares. En la figura 13 se muestran los resultados de estos ensayos con B-ficoeritrina dializada.

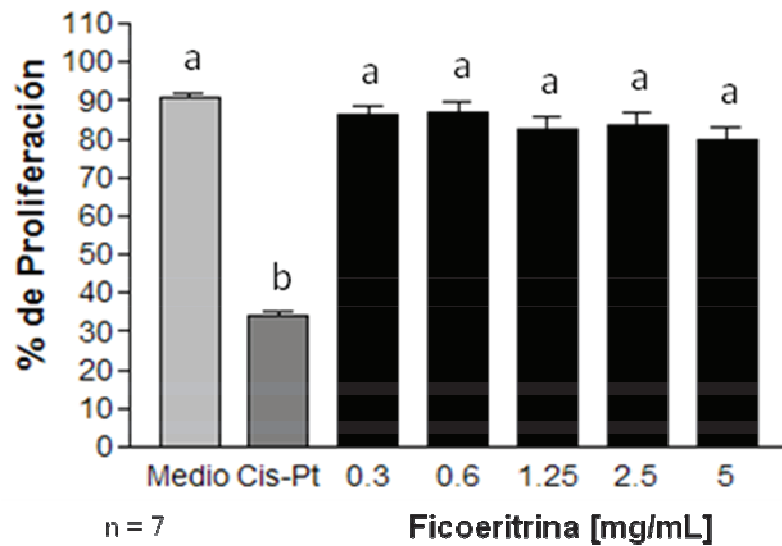


Figura 13. Ensayo de Proliferación de HeLa con B-ficoeritrina dializada. En la gráfica se observan 2 grupos controles, que son un grupo de células con Medio de cultivo y otro grupo con Cis-Platino. El grupo con PBS se omitió ya que la B-ficoeritrina se disolvió en Medio de cultivo. Los últimos 5 grupos corresponden a las células con diferentes concentraciones de B-ficoeritrina: 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5 y 5 mg/mL. Letras diferentes representan una diferencia significativa ($p < 0.05$).

La prueba de Tukey-Kramer arrojó que no existía diferencia significativa entre el grupo control de células con medio y las células tratadas con las diferentes concentraciones de B-ficoeritrina: 0.315, 0.625, 1.25, 2.5 y 5 mg/mL.

Vargas y col., en el 2006, trabajaron con líneas celulares HeLa y CaLo y con una mezcla de ficobiliproteínas extraídas de *Pseudoanabaena*, siendo ficoeritrina la proteína más abundante. Encontraron que en ambas líneas celulares se presentaba un alto porcentaje de mortalidad al ser tratadas con la mezcla de ficobiliproteínas. Realizaron una determinación de la concentración de cada una de las ficobiliproteínas de la mezcla mediante lecturas de absorbancia, y para el ensayo, la concentración más elevada utilizada fue de 0.24 mg/mL para C-Ficoeritrina, 0.161 mg/mL para C-Ficocianina y 0.106 para C-Aloficocianina. Éstas concentraciones provocaron una mortalidad del 43.5% para la línea celular HeLa y de 88.81% para la línea celular CaLo después de 24 horas de incubación. No realizaron ensayos individuales para cada una de las ficobiliproteínas, además que no indican si la muestra fue dializada después del proceso de purificación. También la fuente y el tipo de de ficoeritrina es distinta: la utilizada por ellos es del tipo C-ficoeritrina, mientras que la obtenida en nuestro trabajo es B-ficoeritrina. Además, pudiera existir un posible sinergismo entre las ficobiliproteínas del trabajo de Vargas.

En el mismo año, García y colaboradores investigaron la actividad citotóxica de las ficobiliproteínas de la cianobacteria *Spirulina máxima*. En su estudio también trabajaron con la línea celular HeLa y con las ficobiliproteínas en mezcla (C-Ficoeritrina, C-Ficocianina, C-Aloficocianina). Cada una de las proteínas fue cuantificada mediante lecturas de densidad óptica. Ellos basaron la concentración de sus tratamientos en la proteína C-Ficocianina, concentraciones que fueron de 0.013 a 4.06×10^{-4} mg/mL. Encontraron que al utilizar la mezcla de ficobiliproteínas que contenía 6.5×10^{-3} mg/mL de C-

Ficocianina, la mortalidad celular era del 80% incubando por 24 horas. De nuevo, no especifican si la muestra con las ficobiliproteínas pasó por un proceso de diálisis previo al ensayo.

Las mortalidades celulares obtenidas en los estudios de Vargas y García, podrían ser atribuidas, en caso de no haber realizado diálisis, a las sales provenientes de los buffers utilizados durante la obtención de las proteínas, como observamos en los primeros ensayos antiproliferativos del presente estudio. Otro caso pudiera ser que existiese una acción sinérgica entre dos o incluso tres de las ficobiliproteínas.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Se logró la purificación e identificación de la ficoeritrina de *Rhodosorus marinus* a través de los valores de absorción obtenidos en el uv-visible, obteniendo purezas de 4.6 y 5.4, e identificándola como B-ficoeritrina por sus picos de absorción máxima.
- El Cis-Platino, utilizado principalmente para cáncer de ovario, testicular, cuello y cabeza, representó ser un buen medicamento control de proliferación negativa, ya que a la concentración recomendada por Sigma-Aldrich (25 μ M) mostró tener un alto efecto antiproliferativo en las células HeLa, provenientes de cáncer de cérvix.
- Utilizando B-ficoeritrina dializada de *Rhodosorus marinus* con pureza de 4.6 y 5.4, y en las concentraciones de: 0.315, 0.625, 1.25, 2.5 y 5 mg/mL, no se encontró un efecto antiproliferativo significativo ($p > 0.05$).
- Existe un efecto antiproliferativo sinérgico entre las sales de PBS y la B-Ficoeritrina sobre la línea celular HeLa.
- Se recomienda la realización de ensayos de proliferación celular a lo largo de los procesos de purificación, utilizando el conjunto de ficobiliproteínas de *Rhodosorus marinus* para saber si existe algún efecto sinérgico entre ellas en el crecimiento celular.
- Se recomienda la realización de la determinación de proteína en cada uno de los pasos del proceso de purificación.
- También se recomienda la realización de ensayos celulares utilizando otras concentraciones de ficoeritrina y otras líneas tumorales.

BIBLIOGRAFÍA

- Adrian, T. 2007. Novel marine-derived anti-cancer agents. *Curr. Pharm. Des.* 13(33): 3417-26.
- Alberts, B. 1994. *Molecular Biology of The Cell*. 3^o edición. Garland Publishing, Inc. Estados Unidos. 1255-1262.
- American Cancer Society. <http://www.cancer.org>
- Athukorala, Y., Kim, K., Jeon, Y. 2006. Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*. *Food and Chemical Toxicology*. 44: 1065-1074.
- Banerjee, S., Wang, Z., Mohammad, M., Sarkar, F., Mohammad, R. 2008. Efficacy of Selected Natural Products as Therapeutic Agents against Cancer. *J. Nat. Prod.*
- Básaca Loya Guadalupe Adriana. 2006. Comportamiento de la Agregación Célula-Exopolisacárido y Reología del Cultivo Celular de la Microalga Roja *Rhodorus marinus*. Tesis de Maestría. Maestría en Polímeros y Materiales. Universidad de Sonora.
- Básaca, G., Burboa, G., Valdez, M., Gámez, R., Goycoolea, F., Gutiérrez, L. 2008. Aggregation behavior and rheology of cultura broths of *Rhodorus marinus*. *Rev. Mex. Fis. S* 54(2): 119-126.
- Básaca Loya Guadalupe Adriana. Tesis en proceso. Caracterización Físico-Química de Ficoeritrina en Interfases. Tesis de Doctorado. Doctorado en Polímeros y Materiales. Universidad de Sonora.

- Bermejo, R., Álvarez, J., Ación, F., Molina, E. 2002. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. Journal of Biotechnology. 93: 73-85.
- Bermejo, R., Ación., F., Ibáñez, M., Fernández, J., Molina, E., Álvarez, J. 2003. Preparative purification of B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* by expanded-bed absorption chromatography. J. Chromatogr. B 790: 317-325.
- Bounous, D., Campagnoli, R., Brown, J. 1992. Comparison of MTT Colorimetric Assay and Tritiated Thymidine Uptake for Lymphocyte Proliferation Assay Using Chicken Splenocytes. Avian Dis. 36(4): 1022-1027.
- Chen, Y., Tu, C., Wu, H. 2004. Growth Inhibitory Effects of the Red Alga *Gelidium amansii* on Cultured Cells. Biol. Pharm. Bull. 27(2): 180-184.
- Cheng, W., Hsiang, C., Bau, D., Chen, J., Shen, W., Li, C., Lo, H., Wu, S., Chiang, S., Ho, T. 2007. Microarray analysis of vanillin-regulated gene expression profile in human hepatocarcinoma cells. Pharmacological Research. 56: 474-482.
- Cho, J., Manandhar, S., Lee, H., Park, H., Kwak, M. 2007. Role of the Nrf2-antioxidant system in cytotoxicity mediated by anticancer cisplatin: Implication to cancer cell resistance. Cancer Lett.
- Cragg, G., Kingston, D., Newman, D. 2005. Anticancer Agents from Natural Products, 1ª edición. Taylor & Francis group. Estados Unidos. p. 1, 2.
- da Rocha, A., Lopez, R., Schwartzmann, G. 2001. Natural products in anticancer therapy. Curr. Opin. Pharmacol. 1(4): 364-9.
- Enriquez Garcia Guevara Enrique Arturo. 2006. Purificación y caracterización de B-ficoeritrina Extraída de la Microalga Roja *Rhodosorus marinus*.

Tesis de Maestría. Maestría en Polímeros y Materiales. Universidad de Sonora.

Fujitani, N., Sakaki, S., Yamaguchi, Y., Takenaka, H. 2001. Inhibitory effects of microalgae on the activation of hyaluronidase. *Journal of Applied Phycology*. 13(6): 489 – 492.

García, R., Estrada, G., Olvera, R., Vega, M., Cruz, A., Ramón, E. 2006. Actividad citotóxica *in vitro* de las ficobiliproteínas derivadas de *Spirulina maxima* y sus efectos en la terapia fotodinámica. 2º Congreso Nacional de Química Médica.

Haefner, B. 2003. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discovery Today*. 8(12): 536-544.

Holland. 2003. *Cancer 6 Medicine*. 1º edición. BC Decker. España.

Instituto Mexicano del Seguro Social. <http://www.imss.gob.mx/>

Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI). <http://www.inegi.gob.mx>

Isailovic, D., Li, H., Yeung, E. 2004. Isolation and characterization of R-Phycoerythrin subunits and enzymatic digests. *Journal of Chromatography A*. 1051: 119-130.

Isailovic, D., Sultana, I., Phillips, G., Yeung, E. 2006. Formation of fluorescent proteins by the attachment of phycoerythrobilin to R-phycoerythrin alpha and beta apo-subunits. *Analytical Biochemistry*. 358: 38-50.

Jiang, T., Zhang, J., Chang, W., Liang, D. 2001. Crystal Structure of R-Phycocyanin and Possible Energy Transfer Pathways in the Phycobilisome. *Biophysical Journal*. 81(2): 1171-1179.

- Jimeno, J., Faircloth, G., Fernández, J., Scheuer, P., Rineheart, K. 2004. New Marine Derived Anticancer Therapeutics – A Journey from the Sea to Clinical Trials. 1: 14-29.
- Kumar, R., Zi-rong, X. 2004. Biomedical Compounds from Marine Organisms. Marine Drugs. 1: 14-19.
- Lins, K., Bezerra, D., Alves, A., Alencar, N., Lima, M., Torres, V., Farias, W., Pessoa, C., Moraes, M., Costa-Lotufo, L. 2008. Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Diaz-Pifferer). J. Appl. Toxicol. 29: 20-26.
- Liu, L., Chen, X., Zhang, X., Zhang, Y., Zhou, B. 2005. One-step chromatography method for efficient separation and purification of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata*. Journal of Biotechnology. 116: 91-100.
- Lyons B. 2000. Analysing cell divisions *in vivo* and *in vitro* using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. Journal of Immunological Methods 243: 147-154.
- Lyons B. y Parish C. 1994. Determination of lymphocyte divisions by flow cytometry. Journal of Immunological Methods 171: 131-137.
- Ma, S., Wang, G., Sun, H., Zeng, C. 2002. Characterization of the artificially covalent conjugate of B-phycoerythrin and R-phycoerythrin and the phycobilisome from *Porphyridium cruentum*. Plant Science. 164: 253-257.
- Martínez, G., Díaz, M., Ramos, A., Salvador, N., López, P., Larriba, E., Antón, J. 2007. Cytotoxicity of the Ascidian *Cystodytes dellechiaiei* against Tumor Cells and Study of the Involvement of Associated Microbiota in the Production of Cytotoxic Compounds. Mar. Drugs. 5, 52-70.

- Molina, L., Jonte, L., Mora, R., Ortega, J., Morales, E. 2007. Influencia de la salinidad sobre el crecimiento de la microalga *Rhodosorus marinus* (Rhodophyta) en cultivos discontinuos. Rev. Fav. Agron. 24(1): 249-253.
- Mossman T., 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. Journal of Immunological Methods. 65:55-63.
- National Cancer Intitute. www.cancer.gov
- Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int>
- Pardhasaradhi, B., Ali, A., Kumari, A., Reddanna, P., Khar, A. 2003. Phycocyanin-mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves down-regulation of Bcl-2 and generation of ROS. Mol Cancer Ther. 2:1165–1170.
- Piñero, J., Bermejo, P., Villar, A. 2001. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. IL Farmaco. 56: 497-500.
- Price, P., Yu, F., Kaldis, P., Aleem, E., Nowak, G., Safirstein, R., Megyesi, J. 2006. Dependence of Cisplatin-Induced Cell Death *In Vitro* and *In Vivo* on Cyclin-Dependent Kinase 2. J Am Soc Nephrol. 17(9): 2434–2442.
- Portal del Instituto Mexicano del Seguro Social. <http://www.imss.gob.mx>
- Programa e-Salud, gobierno Federal Mexicano. <http://www.e-salud.gob.mx>
- Rawat, D., Joshi, M., Joshi, P., Atheaya, H. 2006. Marine peptides and related compounds in clinical trial. Anticancer Agents Med. Chem. 6(1): 33-40.
- Rossano, R., Ungaro, N., D'Ambrosio, A., Liuzzi, G., Riccio, P. 2003. Extracting and Purifying R-phycoerythrin from Mediterranean red algae *Corralina elongata* Ellis & Solander. Journal of Biotechnology. 101: 289- 293

- Samsonoff, W., MacColl, R. 2001. Biliproteins and phycobilisomes from cyanobacteria and red algae at the extremes of habitat. *Arch Microbiol.* 176: 400-405.
- Schwartzmann, G., da Rocha, A., Mattei, J., Lopez, R. 2003. Marine-derived anticancer agents in clinical trials. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 12(8): 1367-83.
- Shih, C., Cheng, S., Wong, C., Kuo, Y., Chou, T. 2009. Antiinflammatory and Antihyperalgesic Activity of C-Phycocyanin. *Anesth Analg.* 108(4):1303-1310.
- Simmons, T., Andrianasolo, E., McPhail, K., Flatt, P., Gerwick, W. 2005. Marine natural products as anticancer drugs. *Mol. Can. Ther.* 4(2): 333-342.
- Soni, B., Kalavadia, B., Trivedi, U., Madamwar, D. 2006. Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata* – Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. *Process Biochemistry.* 41: 2017-2023.
- Stewart, G. and Azam, F. 1999. Bromodeoxyuridine as an alternative to ³H-thymidine for measuring bacterial productivity in aquatic samples. *Aquat Microb Ecol.* 19: 57-66.
- The Culture Collection of Algae, UTEX. <http://www.utex.org/>
- Valcárcel, M. 1988. *Técnicas Analíticas de Separación.* Editorial Reverté. España. p. 333-337.
- Vargas, A., Ramón, E., Vega, M., Cruz, A., Olvera, R. 2006. Efecto *in vitro* de las ficobiliproteínas en el tratamiento del Carcinoma Cervicouterino. *Rev. Del Centro de Inv.(Méx.).* Vol. 7. Núm. 25. Enero-Junio.

- Viskari, P. and Colyer, C. 2002. Separation and quantitation of phycobiliproteins using phytic acid in capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*. 972: 269-276.
- Viskari, P. and Colyer, C. 2003. Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples. *Analytical Biochemistry*. 319: 263-271
- Wilson, S., West, J., Pickett-Heaps, J., Yokoyama, A., Hara, Y. 2002. Chloroplast rotation and morphological plasticity of the unicellular alga *Rhodospirillum rubrum* (Rhodophyta, Stylonematales). *Phycological Research*. 50(3): 183-191.
- Zhao, F., Qin, S. 2006. Evolutionary Analysis of Phycobiliproteins: Implications of Their Structural and Functional Relationships. *J Mol Evol*. 63: 330-340.
- Wang X., Duan X., Liu L., Fang Y. y Tan Y. 2005. Carboxyfluorescein Diacetate Succinyl Ester Fluorescent Dye for Cell Labeling. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 37(6):379-385.