



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS EXTRACTOS CRUDOS  
DE *Riftia pachyptila* EN CÉLULAS DE GLIOMA HUMANO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**Biología**

**P R E S E N T A:**

**ALEJANDRA YOSELIN GONZÁLEZ MUÑIZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. MÓNICA ADRIANA TORRES RAMOS  
2016**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Abreviaturas

<b>BSA</b>	Albumina de Suero Bovino
<b>DAPI</b>	4', 6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Sulfuro de hidrógeno
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-ilo)-2, 5-difeniltetrazol
<b><i>Pa</i></b>	Pared de <i>Riftia pachyptila</i>
<b>PBS</b>	Buffer de fosfato salino
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>TBS</b>	Buffer Tris salino
<b>TdT</b>	Desoxinucleotidil transferasa (enzima terminal)
<b>TEMED</b>	N, N, N', N'-tetrametil-etano-1, 2-diamina
<b><i>Tu</i></b>	Tubo de <i>Riftia pachyptila</i>
<b><i>Tr</i></b>	Trofosoma de <i>Riftia pachyptila</i>
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>SFB</b>	Suero bovino fetal

## Resumen.

En las últimas décadas se han aislado compuestos bioactivos de origen marino con potencial para el desarrollo farmacéutico y biotecnológico. Estos compuestos tienen una actividad biológica variada que incluye efectos anticancerígenos, citotóxicos, antibacterianos, antimicóticos, entre otros. Los organismos de donde han sido extraídos incluyen algas, hongos, bacterias y animales como tunicados, esponjas, corales, briozoarios, poliquetos y equinodermos, la mayoría de agua poco profunda. Los invertebrados marinos han desarrollado metabolitos secundarios como resultado de un mecanismo de defensa química o para sobrevivir en ambientes extremos, estos metabolitos frecuentemente tienen potencial farmacológico. *Riftia pachyptila* es un invertebrado marino que vive cerca de ventilas hidrotermales a 2,000 metros de profundidad, tolerando cambios drásticos de temperatura (4-300°C) y concentraciones bajas de nutrientes, por ello es considerado un buen candidato para aislar compuestos bioactivos de interés farmacológico. En este trabajo examinamos el efecto citotóxico y los posibles mecanismos moleculares involucrados en la señalización de la muerte celular inducida sobre células de glioma humano por los extractos crudos de *R. pachyptila*.

El organismo *R. pachyptila* fue separado en tres partes: trofosoma (*Tr*), pared (*Pa*) y tubo (*Tu*), cada una fue liofilizada y pulverizada. La obtención de los extractos crudos se llevó a cabo con la mezcla de disolventes diclorometano-metanol (1:1), con lo cual se hicieron los ensayos de citotoxicidad. Para la determinación del efecto citotóxico de los extractos se realizaron ensayos de reducción metabólica de MTT sobre tres líneas celulares: dos de glioma humano (U373 y U87) y una de fibroblastos (BJ1). El tratamiento duró 24 horas y las concentraciones utilizadas fueron 0.1, 1, 10, 50, 100 y 200 µg/mL. Sobre el extracto que presentó mayor citotoxicidad se determinó el posible mecanismo molecular involucrado en la muerte celular, a través de técnicas como TUNEL e inmunofluorescencia y western blot para la expresión de la proteína p53.

Los tres extractos fueron citotóxicos sobre las líneas celulares de glioma humano, el extracto proveniente de *Pa* presentó un mayor efecto. En cambio, el tratamiento en la línea celular de fibroblastos (BJ1) no presentó alteraciones en la viabilidad celular. Se encontró que las concentraciones de *Pa* en las líneas celulares de glioma presentan marca positiva al ensayo de TUNEL y un incremento en la expresión de la proteína p53.

En conclusión los extractos crudos de *R. pachyptila* producen muerte celular en células de glioma y no en una línea celular no cancerígena. Los resultados obtenidos sugieren que la muerte celular inducida es de tipo apoptosis probablemente dependiente de p53 citosólica. Lo cual pone de manifiesto la necesidad de identificar los compuestos del extracto *Pa* para su posible uso como potentes fármacos citotóxicos.

# Índice

Índice .....	4
1. Introducción.....	1
1.1. Compuestos bioactivos aislados de organismos marinos.....	1
1.1.1. Metabolitos.....	1
1.1.1.1. Metabolitos secundarios aislados de organismos marinos.....	1
1.1.2. Extractos crudos de organismos marinos con potencial bioactivo.....	2
1.1.3. Diferentes regiones de colecta.....	3
1.2. <i>Riftia pachyptila</i> .....	5
1.2.1. Hábitat: Ventilales hidrotermales.....	6
1.2.1.1. Condiciones físicas.....	7
1.2.1.2. Adaptaciones biológicas.....	7
1.2.2. Clasificación taxonómica.....	7
1.2.3. Composición anatómica.....	8
1.2.4. Simbiontes: gammaproteobacterias sulfuro-oxidantes.....	9
1.3. Cáncer.....	10
1.3.1. Incidencia de cáncer en el mundo y en México.....	11
1.3.2. Glioma.....	12
1.3.2.1. Astrocitoma.....	13
1.3.3. Proteína p53.....	13
1.3.3.1. Uso de líneas celulares humanas permite encontrar tratamientos.....	14
1.3.4. Tratamientos.....	15
1.4. Citotoxicidad.....	15
1.4.1. Muerte celular.....	16
1.4.1.1. Apoptosis.....	17
2. Justificación.....	20
3. Hipótesis.....	21
4. Objetivos.....	21
4.1. Objetivo general.....	21
4.2. Objetivos particulares.....	21
5. Métodos.....	22
5.1. Preparación de los extractos crudos de <i>Riftia pachyptila</i> .....	22
5.1.1. Colecta.....	22
5.1.2. Seccionar el organismo.....	22

5.1.3. Maceración y extracción.....	23
5.1.3.1. Cromatografías de capa fina de los extractos crudos. ....	23
5.2. Efecto citotóxico de los extractos crudos de <i>Riftia pachyptila</i> .....	24
5.2.1. Cultivo celular. ....	24
5.2.2. Estandarización del tratamiento con los extractos crudos. ....	25
5.2.3. Evaluación del efecto citotóxico: ensayo de reducción metabólica de MTT. ....	26
5.2.4. Ensayo de TUNEL. ....	26
5.2.5. Inmunofluorescencias.....	27
5.2.6. Análisis de proteínas por Western Blot. ....	28
5.3. Análisis estadístico. ....	29
6. Resultados.....	30
6.1. Análisis de los extractos crudos de <i>Riftia pachyptila</i> .....	30
6.1.1. Cromatografías de capa fina de los extractos crudos. ....	30
6.2. Efecto citotóxico de los extractos crudos de <i>Riftia pachyptila</i> .....	32
6.2.1. Determinación de las concentraciones en la línea celular U373. ....	32
6.2.2. Reducción metabólica de MTT en la línea celular U87. ....	33
6.2.3. Reducción metabólica de MTT en la línea celular BJ1.....	34
6.3. Posibles mecanismos moleculares implicados en la muerte celular inducida por el extracto <i>Pa</i> .....	35
6.3.1. Efecto del ensayo de TUNEL en la línea celular U373.....	35
6.3.2. Efecto del ensayo de TUNEL en la línea celular U87.....	36
6.4. Efecto del extracto <i>Pa</i> en la expresión de la proteína p53.....	37
6.4.1. Expresión de p53 en la línea celular U373.....	37
6.4.2. Expresión de p53 en la línea celular U87.....	38
7. Discusión. ....	39
8. Conclusiones.....	45
9. Literatura citada.....	46

## **1. Introducción.**

### **1.1. Compuestos bioactivos aislados de organismos marinos.**

De la gran diversidad biológica que albergan los océanos se han obtenido compuestos bioactivos importantes para el desarrollo farmacéutico. Los compuestos bioactivos son aquellas moléculas que tienen actividad biológica, causando algún efecto sobre los organismos (De Lara, 1992), se han aislado péptidos, proteínas o metabolitos con actividad citotóxica, anticancerígena, antitumoral, antiinflamatoria, antibacteriana, antimicótica, hemaglutinante, hemolisante, entre otras (Pomponi, 1999; Munro *et al.*, 1999; Haefner, 2003; Kumar y Zi-rong, 2004; Hernández y Hernández, 2005). Comúnmente la obtención de compuestos bioactivos, principalmente los metabolitos, se realiza en plantas pero en las últimas décadas el estudio de moléculas aisladas de organismos marinos ha cobrado mucho interés ya que presentan un gran potencial en farmacología y biotecnología (Maldonado, 1985; Pomponi, 1999; Munro *et al.*, 1999).

#### **1.1.1. Metabolitos.**

Un metabolito es un compuesto químico utilizado o producido durante el metabolismo, se clasifican en dos categorías: primarios y secundarios. Los metabolitos primarios son indispensables para el desarrollo fisiológico del organismo, por ello se encuentran en grandes cantidades (Petiard y Bariaud-Fontanel, 1987). En cambio, los metabolitos secundarios son aquellas moléculas sintetizadas por el organismo que no tienen una actividad definida en el metabolismo primario, desempeñan funciones complementarias (Dewick, 2009), se acumulan en pequeñas cantidades y se han propuesto como resultado de un proceso evolutivo el cual confiere mayor capacidad de sobrevivencia a la especie (Barakat *et al.*, 1977; Maldonado, 1985; Harborne, 1989).

##### **1.1.1.1. Metabolitos secundarios aislados de organismos marinos.**

Los metabolitos secundarios de origen marino son de interés porque algunos organismos los han desarrollado como un mecanismo de defensa química, cuando son sésiles o de lento movimiento, y otros son indispensables para sobrevivir en ambientes extremos, como los animales termófilos (Núñez, 2003; Ebada *et al.*, 2008). De organismos marinos se han

aislado y caracterizado esteroides, glicósidos, terpenos, fenilpropanoides, alcaloides, flavonoides, entre otros (Simmons *et al.*, 2005; Hernández y Hernández, 2005).

Algunos metabolitos secundarios han presentado efectos protectores y otros conducen a muerte celular por diferentes vías moleculares. Entre los diversos ejemplos podemos resaltar los siguientes: el carotenoide astaxantina, aislado del pigmento rojo de camarón, cangrejo y salmón, en modelos tóxicos con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) e hidroperóxidos DHA (DHA-OOH) sobre la línea celular de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) tiene un efecto protector inhibiendo de manera significativa la muerte celular por apoptosis, las anormalidades mitocondriales y la generación intracelular de especies reactivas de oxígeno (Ikeda *et al.*, 2008). También se evaluó sobre la línea celular de feocromocitoma de rata (PC12) tratadas previamente con la neurotoxina ión 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+) y se observó que induce un efecto protector antioxidante (Ye *et al.*, 2013). Asimismo, se comprobó que este compuesto atraviesa la barrera hematoencefálica (Liu y Osawa, 2009). La postaglandina aislada del cnidario gorgonia *Plexaura homomalla* es utilizada como antiinflamatorio no esteroide (Bhakuni y Rawat, 2005). Por otra parte, los compuestos peloruside A, mycalamide, pateamine y zampanolide aislados de las esponjas *Mycale hentscheli* y *Cacospongia mycofijiensis* causan muerte celular y se han propuesto como agentes anticancerígenos ya que estabilizan microtúbulos con un mecanismo molecular similar a paclitaxel (Taxol®), este último es un medicamento usado para el tratamiento de cáncer (Miller *et al.*, 2010; Ocker y Höpfner, 2012); halicondrina B obtenida de la esponja *Halichondria okadai* también presenta un efecto anticancerígeno, actúa inhibiendo la fase de crecimiento los microtúbulos secuestrando tubulina (Hirata y Uemura, 1986); trabectedina (Yondelis) aislado de la ascidia *Ecteinascidia turbinata* es un compuesto usado como fármaco para el tratamiento de sarcoma de tejidos blandos (Landolfi, 2011).

### **1.1.2. Extractos crudos de organismos marinos con potencial bioactivo.**

Un extracto se prepara poniendo en contacto el material con un disolvente o mezcla de disolventes. Los extractos crudos o totales se obtienen de la maceración con disolventes orgánicos, se caracterizan por presentar un conjunto de compuestos no definidos pero si diferenciados por la polaridad del disolvente utilizado. La eliminación de los disolventes empleados para la extracción de estos compuestos se hace a través de destilación a presión

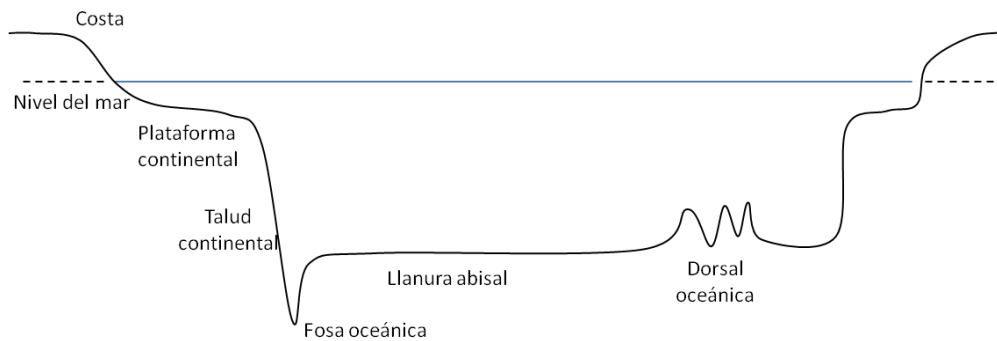


reducida con el uso de rotavapor. Como la polaridad de los disolventes define el tipo de compuestos que se aíslan encontramos que disolventes polares como agua, metanol, diclorometano separan principalmente saponinas, polihidroxiesteroides, aminoácidos, entre otros. Los disolventes no polares como *n*-hexano y acetato de etilo separan terpenos, esteroides, quinonas, polipropionados, alcaloides, péptidos, entre otros. Los disolventes se pueden utilizar solos o en mezclas, contemplando un punto de ebullición bajo (Ebada *et al.*, 2008).

Durante la purificación se emplean pruebas de actividad biológica para guiar el aislamiento, pero también observar el tipo de actividad biológica que presenta un extracto crudo permite conocer el efecto de los diferentes compuestos presentes y así contar con un punto de inicio para el aislamiento, la purificación e identificación (Ebada *et al.*, 2008; Landolfi, 2011). Por ejemplo, del pulpo *Paraoctopus limaculatus* fue preparado un extracto lipídico, con cloroformo y acetona que aíslan algunos ácidos grasos insaturados, observaron la actividad biológica del extracto sobre la línea celular de linfoma murino de células B (M12.C3.F6) encontrando que son anticancerígenos. Estos resultados produjeron un gran interés por determinar los compuestos responsables del efecto (Moreno-Felix *et al.*, 2013). Así ha sucedido con otros trabajos en los cuales se analiza la actividad biológica a partir de los extractos crudos.

### **1.1.3. Diferentes regiones de colecta.**

En los océanos existen una amplia variedad de regiones en las cuales la diversidad de organismos está definida por factores tales como la profundidad, la luz o la distancia a la costa (Lara-Lara *et al.*, 2008). La plataforma continental está caracterizada por estar próxima a la costa, con profundidades inferiores a 200 metros, su amplitud a la costa puede oscilar entre escasos metros y algunos kilómetros. El fondo marino según Ramírez y Billet (2006), es aquella región de los océanos que se extiende por debajo de los 200 metros de profundidad aproximadamente, tiene mayor profundidad y amplitud, comprende desde el talud continental hasta las llanuras abisales y fosas marinas, incluye las dorsales oceánicas, cañones submarinos, surgencias frías y ventilas hidrotermales; sus principales características son la ausencia de luz, el aumento en la presión y temperatura, en algunos casos baja y en otros supera los 300°C, como sucede en las ventilas hidrotermales (Figura 1).



**Figura 1.** Regiones oceánicas. Plataforma continental cercana a la costa y de poca profundidad; el fondo marino incluye el talud continental, las fosas marinas, las llanuras, las dorsales oceánicas. (Llodra y Billet, 2006; basado de la imagen en web: relieve oceánico)

Los compuestos bioactivos de origen marino han sido aislados de diferentes organismos como arqueas, bacterias, hongos y animales como esponjas, poliquetos, equinodermos, hemicordados y cnidarios, han presentado diferente actividad biológica y se han colectado de diferentes regiones del océano (Tabla 1). La mayoría de los organismos utilizados para aislar compuestos se colectan en aguas poco profundas, menores a 250 m, en cambio, los organismos de profundidades mayores son pocos utilizados por ser menos accesibles y requerir equipo especializado para su colecta, sin embargo estos últimos han evidenciado compuestos de alta estabilidad e interesante actividad biológica (Pomponi, 1999).

En general, si se realiza una comparación de los organismos marinos estudiados con la gran diversidad biológica que albergan los océanos es evidente que existe un amplio campo de estudio (Irlanda *et al.*, 1993).

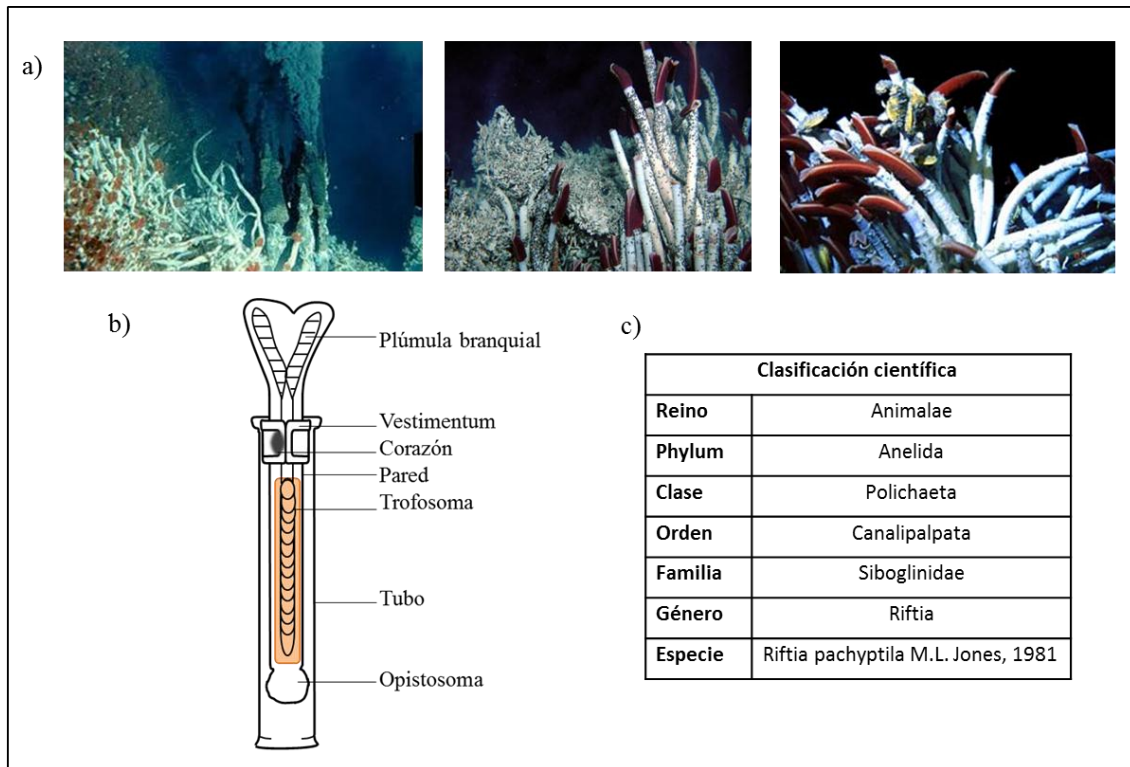
**Tabla 1.** Compuestos bioactivos aislados de organismos marino.

Compuesto			Organismo				Actividad biológica	Autor	Profundidad (aproximada)
Nombre designado	Tipo de compuesto	Molécula	Reino	Phylum	Clase	Especie			
Estatinas	Éster ciclico	Metabolito	Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	<i>Penicillium citrinum</i>	Disminuir el colesterol	Hoffman <i>et al.</i> , 1978	0 a 10 m
						<i>Aspergillus terreus</i>			
Cephalostatín	Dimero esteroideal	Metabolito secundario	Animalia	Hemicordata	Graptolithoidea	<i>Cephalodiscus gilchristi</i>	Induce apoptosis en líneas celulares humanas	Pettit <i>et al.</i> , 1998	
-	Peróxidos cíclicos	Metabolito	Animalia	Porifera	Homoschleromorpha	<i>Plakortis angulospiculatus</i>	Citotóxica y antimicótica	Gunasekera <i>et al.</i> , 1990	
ATX II	-	Toxina	Animalia	Cnidaria	Anthozoa	<i>Anemonia sulcata</i>	Activa los canales de sodio de membranas neurales	Castillo <i>et al.</i> , 1996	
-	Saponinas	Glucósidos esteroides o de triterpenoides	Animalia	Cnidaria	Anthozoa	<i>Phymanthus crucifer</i>	Hemaglutinante en sangre humana	Fariñas y Liñero (1997, 2001)	
			Animalia	Equinodermata	Holothuroidea	<i>Ludwigothuria mexicana</i> <i>Ludwigothuria grisea</i> <i>Isostichopus badionotus</i>	Hemolisante y antibacteriana		
-	Bromofenoles	Compuesto orgánico	Animalia	Anelida	Polychaeta	<i>Lanice conchilega</i>	Antimicrobianas	Goerke y Weber, 1991	
Antistina	Antagonista de la histamina	Fármaco	Animalia	Anelida	Polychaeta	<i>Eurythoe complanata</i>	Provocan la contracción en el ileón de cobayos	Saadecani <i>et al.</i> , 1993	
Nereistoxina	Antagonista del receptor de la acetilcolina	Fármaco	Animalia	Anelida	Polychaeta	<i>Lumbriconereis heteropoda</i>	Actúa sobre el sistema nervioso de insectos, materia prima para la fabricación insecticidas	Narahashi, 1973	
Discodermolida	Policétido	Metabolito secundario	Animalia	Porifero	Demospongiae	<i>Haliclona viridis</i>	Despolariza el potencial de acción de membrana y libera neurotransmisores en nervios	Gunasekera <i>et al.</i> , 1990; Ter Haar <i>et al.</i> , 1996	
HvTX	-	Toxina	Animalia	Porifera	Demospongiae	<i>Discodermia dissoluta</i>	Anticancerígena	Sevcik <i>et al.</i> , 1986; Jaffe <i>et al.</i> , 1993	
Prostaglandinas	Ácidos grasos	Metabolito secundario	Animalia	Cnidario	Anthozoa	<i>Plexaura homomalla</i>	Anti inflamatorios	Robley y Bengt, 1972	
Halicondrina	Macrólidos de poliéter	Fármaco	Animalia	Porifera	Demospongiae	<i>Lissodendoryx sp.</i>	Antitumoral	Battershill <i>et al.</i> , 1998	
-	Lectinas	Proteínas	Animalia	Porifera	Demospongiae	<i>Aplysina fistularis</i>	Hemaglutinante ante los eritrocitos de cobayo	Miaron y Fresno, 2000	
Aequorin; Proteína verde fluorescente (GFP)	-	Fotoproteínas	Animalia	Cnidaria	Hydrozoa	<i>Aequorea victoria</i>	Indicador bioluminiscente de calcio; emite fluorescencia verde del espectro visible	Shimomura y Johnson, 1961	
Manoalide	Sesterterpeno	Metabolito secundario	Animalia	Porifera	Demospongiae	<i>Luffariella variabilis</i>	Inhibidor de fosfolipasa A2	Wheeler <i>et al.</i> , 1987	
Vent <sup>TM</sup> DNA polymerase	-	Enzima	Archaea	Euryarchaeota	Thermococci	<i>Thermococcus litoralis</i>	Polymerase chain reaction enzymes	Perler <i>et al.</i> , 1992	

## 1.2. *Riftia pachyptila*.

*Riftia pachyptila* es un invertebrado endémico de las ventilas hidrotermales (Jones, 1981), un poliqueto gigante sésil que en etapa adulta llega a medir hasta 2 m (Figura 2), carece de un sistema digestivo y vive en una estrecha relación simbiótica con bacterias quimioautótrofas (Cavanaugh *et al.*, 1981; Felbeck, 1981; Jones, 1981; Minic y Hervé, 2004). Depende de la producción primaria de las bacterias simbiotas para sobrevivir (Distel *et al.*, 1988; Nelson y Fisher, 1995; McMullin *et al.*, 2003). Su hemoglobina es transportadora de oxígeno y sulfuro (Arp y Childress, 1983; Fisher *et al.*, 1988; Minic y Hervé, 2004). Sus larvas tienen una vida útil metabólica de 38 días en promedio, colonizan sitios de ventilación separadas no mayores a 100 km (Gaill, 1993; Lutz *et al.*, 1994; Marsh

*et al.*, 2001). Vive en colonias, tiene una gran biomasa (Lutz y Kennish, 1993) y su crecimiento es muy rápido aunque su periodo de vida es corto (Lutz *et al.*, 1994; Shank *et al.*, 1998; Guirguis y Childress, 2006).



**Figura 2.** *Riftia pachyptila*, a) colonias cercanas a las ventilas hidrotermales, b) composición anatómica, y c) clasificación científica. (Tomado de Gaill, 1993; Minic y Hervé, 2004; McMullin *et al.*, 2003)

### 1.2.1. Hábitat: Ventilas hidrotermales.

Las ventilas hidrotermales son centros de expansión activos a lo largo de las dorsales oceánicas, se pueden encontrar en cuencas aisladas cercanas a zonas de subducción y en algunas montañas submarinas activas. Las ventilas hidrotermales se descubrieron en 1977 en la dorsal de las Galápagos a 2,500 m de profundidad, causaron un gran asombro porque dentro de un radio de 15 m de la ventila hidrotermal se encontró una notable comunidad de grandes y abundantes organismos bentónicos (Lonsdale, 1977). Encontrar vida en estas condiciones extremas de presión (hasta de 300 atm), cambios drásticos de temperatura (de 4 a 350°C) y toxicidad química significó un gran descubrimiento (Tunnicliffe, 1991; Blum y Fridovich, 1984).

### **1.2.1.1. Condiciones físicas.**

En las dorsales oceánicas el agua fría de 2 a 4°C del fondo marino penetra a través de las fisuras de la corteza aumentando su temperatura al pasar cerca de la roca caliente que proviene de la cámara magmática. Durante este proceso el fluido sufre cambios químicos, pierde oxígeno y magnesio, se carga de otros metales (hierro, manganeso, zinc, cobre, entre otros) y de grandes cantidades de compuestos de azufre reducido como sulfuros y sulfuro de hidrogeno (H<sub>2</sub>S). Al aumentar la temperatura este fluido súper caliente (350°C) es expulsado hacia la superficie del fondo marino y al mezclarse con el agua fría y rica en oxígeno los metales disueltos precipitan formando las densas fumarolas negras (Figura 2a) características de las ventilas hidrotermales (MacDonald, 1990; Tunnicliffe *et al.*, 1998; Zierenberg, 2000; Minic y Hervé, 2004; Ramírez y Billet, 2006).

### **1.2.1.2. Adaptaciones biológicas.**

Se sabe que la biodiversidad en las ventilas hidrotermales es baja, pero la biomasa es alta (Lutz y Kennish, 1993; Ramírez y Billet, 2006). Habitan enormes almejas y mejillones, gusanos tubícolas gigantes, cangrejos, peces, microorganismos, entre otros (MacDonald *et al.*, 1990). Las adaptaciones biológicas de estos organismos son principalmente el metabolismo modificado y un gran tamaño. El metabolismo se ha condicionado a relaciones simbióticas con bacterias, para utilizar los elementos del ambiente tóxico y obtener moléculas orgánicas para el organismo. La alta tasa de crecimiento puede estar relacionada con el nitrógeno o el H<sub>2</sub>S del medio (Lutz *et al.*, 1994), este último es tóxico para muchos organismos pero también se conoce que en pequeñas dosis incrementa la velocidad de crecimiento (Nicholls, 1975; Dooley *et al.*, 2012).

### **1.2.2. Clasificación taxonómica.**

*Riftia pachyptila* fue clasificada inicialmente dentro del phylum Pogonophora, caracterizados por ser gusanos de tubo que carecen de un sistema digestivo y se basan en simbiosis con bacterias quimioautotróficas o metanotróficas (Burgh, 1989; Nelson y Fisher, 1995). Tiempo después los pogonóforos fueron incluidos dentro de los Siboglinidae. La familia Siboglinidae consta de tres grupos uno de ellos son los vestimentíferos, gusanos de tubo gigante, que incluye a *R. pachyptila*. Los vestimentíferos son los más abundantes en

las regiones de ventilación (McMullin *et al.*, 2003) y habitan dos de los ambientes más extremos de la tierra, las ventilas hidrotermales y las surgencias frías.

De esta manera *Riftia pachyptila* está colocada dentro de la familia Siboglinidae, en la clase Polichaeta, bajo el phylum Annelida, Figura 2c (Kojima *et al.*, 1997; McHugh, 1997, 2000; Bartolomaeus, 1999; Fauchald y Rouse, 1997).

### **1.2.3. Composición anatómica.**

El cuerpo de este organismo es cilíndrico y presenta regiones corporales claramente reconocidas (Figura 2b): plúmula branquial, vestimentum, opistosoma, tubo, pared, y trofosoma (Gaill, 1993; Minic y Hervé, 2004).

La plúmula branquial es el único tejido del organismo que está en contacto directo con el agua, es altamente vascularizado por eso presenta un color rojo, a través de sus vasos sanguíneos circulan compuestos químicos que llegan al trofosoma, permite un intercambio eficaz de metabolitos y productos de desecho entre el ambiente y el animal (Fisher *et al.*, 1988; Zal *et al.*, 1996). El vestimetum es un músculo que da posición al organismo en su tubo, incluye una bomba como corazón que favorece la circulación sanguínea en todo el cuerpo (Gaill, 1993). El opistosoma es la parte final del trofosoma se postula sirve para anclar la base del gusano al tubo.

El tubo es la estructura que resguarda al gusano, tiene forma cilíndrica, se compone de quitina y proteínas, funciona como un exoesqueleto para la protección contra depredadores y como una barrera contra las constantes fluctuaciones fisicoquímicas del medio ambiente (Tunnicliffe, 1991; Gaill *et al.*, 1992; Gaill, 1993; Shillito *et al.*, 1995; Gaill *et al.*, 1997; Ravaux *et al.*, 1998). Crece aproximadamente 85 cm por año, midiendo 2 m de longitud en la etapa adulta (Lutz *et al.*, 1994). El contenido de quitina y proteína en el tubo maduro es el mismo. Sin embargo, en la región recién secretada varía, hay menos quitina en el centro y aumenta simétricamente hacia las extremidades, y el porcentaje general de proteínas disminuye de la región apical a la basal (Gaill y Hunt, 1986; Shillito *et al.*, 1999; Ravaux *et al.*, 2000).

La pared del cuerpo es la epidermis del gusano, no tiene contacto alguno con el medio exterior, cubre el trofosoma y secreta el tubo (Gaill *et al.*, 1997; Ravaux *et al.*, 2000). Se ha reportado que la pared y el tubo comparten algunos componentes (Gaill y Hunt, 1986; Ravaux *et al.*, 2000).

El trofosoma es un tejido en forma de saco largo que se encuentra en el interior de la pared del cuerpo, ocupa la mayor parte del celoma o cavidad corporal desde el vestimentum hasta el opistosoma (Cavanaugh *et al.*, 1981; Jones, 1981; Gaill, 1993; Powel y Somero, 1986), envuelve el tejido reproductor (Bosch y Grassé, 1984), constituye alrededor del 16% del peso húmedo de un gusano adulto (Childress *et al.*, 1984) y es ricamente vascularizado (Powel y Somero, 1986). Este tejido cuenta con células especializadas, bacteriocitos, que resguardan bacterias simbiotas (Cavanaugh *et al.*, 1981; Felbeck, 1981; Bright y Giere, 2005), las cuales ocupan entre un 15 a 35% del volumen del trofosoma (Powel y Somero, 1986). Por este tejido se da continuidad al transporte de los compuestos absorbidos por la plúmula branquial y son utilizados por las bacterias para sintetizar materia orgánica. Este tejido se diferencia en lóbulos, tubos interconectados de diámetro similar pero de longitud variable. El aumento en número y longitud de los lóbulos produce el crecimiento del trofosoma. Cada lóbulo exhibe un vaso sanguíneo situado en el centro axial cubierto por un mioepitelio, seguido por una gran área de bacteriocitos unidos periféricamente por un peritoneo, además de una red de vasos sanguíneos periféricos (Felbeck, 1981; Bosch y Grassé, 1984; Powel y Somero, 1986; Hand, 1987; Burgh, 1989; Nelson y Fisher, 1995; McMullin *et al.*, 2003; Bright y Sorgo, 2003; Minic y Hervé, 2004; Pflugfelder *et al.*, 2009).

#### **1.2.4. Simbiotas: gammaproteobacterias sulfuro-oxidantes.**

Este invertebrado marino carece de un sistema digestivo por tanto para metabolizar los nutrientes presenta una estrecha relación simbiótica con las gammaproteobacterias sulfuro-oxidantes tioautotrofas, específicas para esta especie (Felbeck, 1981; Cavanaugh, 1983; Stahl *et al.*, 1984; Nelson *et al.*, 1984; Bosch y Grassé, 1984; Hand, 1987; Distel *et al.*, 1988; Nelson y Fisher, 1995; Arndt *et al.*, 2001; McMullin *et al.*, 2003; Stewart y Cavanaugh, 2005). La idea de una relación simbiótica fue propuesta por Lonsald en 1977, pero en 1981 Felbeck y Cavanaugh con sus respectivos grupos de trabajo mostraron por primera vez evidencia de una simbiosis bacteriana quimioautotrofica con un invertebrado marino. Estas bacterias son quimioautótrofas es decir extraen energía de la oxidación de compuestos inorgánicos reducidos como H<sub>2</sub>S absorbido del medio. La energía generada utiliza oxígeno como aceptor terminal de electrones, que son utilizados para la síntesis de ATP (adenosin trifosfato, por sus siglas en inglés) y así mantener el ciclo Calvin-Benson

para la fijación de CO<sub>2</sub> y la producción de metabolitos de carbono orgánico. Los productos sirven para mantener a ambos organismos (Lonsdale, 1977; Corliss, 1979; Cavanaugh *et al.*, 1981; Felbeck, 1981, 1985; Fisher *et al.*, 1988, 1989; Wilmot y Vetter, 1990; Fisher, 1990, 1996; Childress *et al.*, 1991; Childress y Fisher, 1992; Scott *et al.*, 1994; Nelson y Fisher, 1995; Bright *et al.*, 2000; Zierenberg, 2000; Minic y Hervé, 2004; Stewart y Cavanaugh, 2005).

*Riftia pachyptila* y la bacteria han desarrollado un metabolismo para la asimilación de CO<sub>2</sub> y nitrato del medio ambiente. El CO<sub>2</sub> absorbido puede ser transferido a las bacterias para ser metabolizado o puede llegar en forma de malato por carboxilación inmediata en la plúmula (Felbeck *et al.*, 1981; Cavanaugh *et al.*, 1981; Felbeck, 1985; Robinson *et al.*, 1998; Felbeck y Jarchow, 1998). A través del nitrato o amoníaco (NH<sub>3</sub>) absorbido se genera nitrógeno para ambos organismos mediante una serie de reacciones reguladas por los mismos (Bender, 1985; Hentschel y Felbeck, 1993; Girguis *et al.*, 2000).

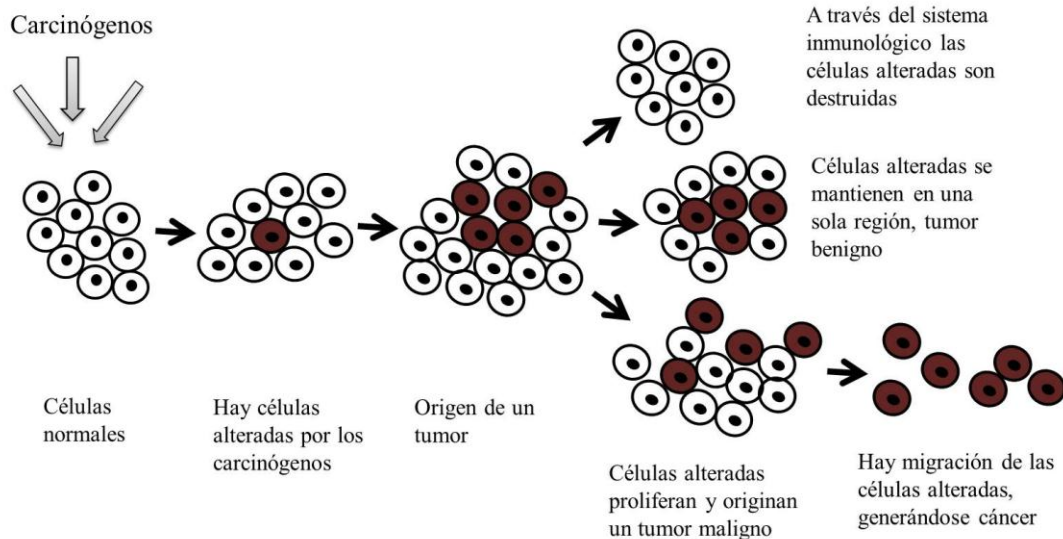
Esta organización complementaria de *R. pachyptila* se encuentra presente en otras vías metabólicas (Fisher, 1996; Arndt *et al.*, 2001; Minic y Hervé, 2004) y puede ser la base de su adaptación a las ventilas hidrotermales. También se piensa que los compuestos de este organismo deben contar con modificaciones que les permitan tolerar el ambiente, de esta manera esperamos encontrar compuestos interesantes con potencial farmacológico probando su efecto en células cancerosas.

### **1.3. Cáncer.**

En todo organismo multicelular existe un control en la proliferación y la muerte de las células que lo componen. Cuando este control es alterado se producen patologías como el cáncer, caracterizado por el aumento en la proliferación celular ocasionado por alteraciones en los mecanismos moleculares que controlan el ciclo celular (Jordán, 2003). Cuando esta proliferación descontrolada se encuentra confinada a una región específica de un tejido se conoce como tumor benigno, pero se convierte en un tumor maligno o cáncer cuando han adquirido la capacidad de invadir el tejido circundante o distribuirse a través del torrente sanguíneo y formar tumores secundarios en otras partes del cuerpo, a esto se le conoce como metástasis (Figura 3). De este modo, no todos los tumores son cancerosos. El término



cáncer es utilizado de manera general para referirse a patologías que involucran proliferación descontrolada (Cooper y Hausman, sexta edición).



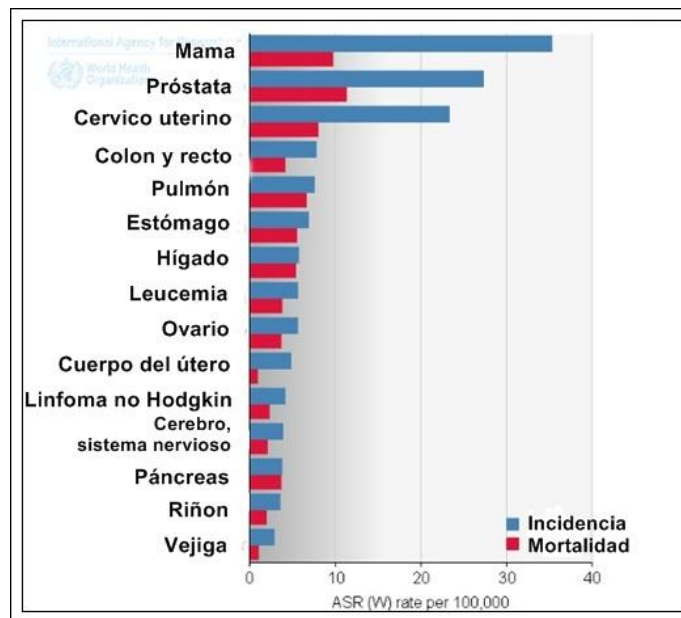
**Figura 3.** Células cancerosas. (Tomado y modificado de imagen en web)

Esta patología es causada por factores externos e internos, entre los externos o carcinógenos se encuentra la exposición a la radiación, a sustancias químicas, a derivados del petróleo o infecciones por virus. Entre los internos o promotores tumorales encontramos las mutaciones genéticas heredadas, hormonas y deficiencias inmunológicas (Reyes y Lema, 2007; INFOCANCER, México, 2015; Cancer National Institute, USA; American Cancer Society, 2016; World Health Organization).

### 1.3.1. Incidencia de cáncer en el mundo y en México.

El cáncer se puede producir en cualquiera de los diferentes tipos de células del cuerpo, por lo tanto hay más de cien tipos distintos de cáncer que pueden diferir en su comportamiento y respuesta a tratamientos. Los tipos de cáncer generalmente llevan el nombre del tejido, órgano o tipo celular donde se forman (INFOCANCER, México 2015; Cancer National Institute, USA 2016). La Organización Mundial de la Salud ha dado a conocer que el cáncer es una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo. En el 2012 hubo unos 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes. En México se presentan 148 mil nuevos caso y 78.7 mil muertes (Globocan, INFOCANCER, 2012). En particular el cáncer en el sistema nervioso central está entre 5 a 10 casos por 100,000 habitantes (Figura

4) y alrededor de 3 de 10 de los tumores encefálicos son gliomas (Reyes y Lema, 2007; Rodrigues *et al.*, 2011). La grafica hace evidente que no hay una adecuada distinción en los tumores encefálicos porque más de la mitad de los casos reportados son defunciones, en contraste con el cáncer de mamá que los casos detectados son bastantes y sus muertes se encuentran cerca solo de un 25%, lo que indica que existe un mejor control sobre este tipo de cáncer.



**Figura 4.** Tipos de cáncer en México, estimación de incidencia y mortalidad. Incluye ambos sexos. Tomado de Globocan 2012 (International Agency for Research on Cancer, IARC).

### 1.3.2. Glioma.

En 1884 por vez primera se diagnosticó y trató quirúrgicamente un glioma por A. Hughes Bennett y Rickmann J. Godlee (Reyes y Lema, 2007). Un glioma es un tipo de tumor que se produce en el cerebro o médula espinal, rara vez se extienden a órganos distantes. Este término se utiliza de manera general para un grupo de tumores que se originan a partir de las células gliales (Lois *et al.*, 2007; World Health Organization, 2015; American Cancer Society, 2016). El paciente afecto de glioma maligno no sobrevive más de un año y medio a dos, salvo algunas excepciones. (Reyes y Lema, 2007). Los astrocitomas son los más comunes entre los gliomas, con una incidencia de 80 a 85% (American Cancer Society, 2016).

### **1.3.2.1. Astrocitoma.**

Los astrocitomas están formados por astrocitos en proliferación descontrolada. Se clasifican en cuatro grados: I, II, III o IV (Kleihues y Cavane, 2000; Louis *et al.*, 2007; Bai *et al.*, 2011). En el grado I las células tienden a crecer lentamente y no infiltran, es decir, no crecen en los tejidos cercanos por lo que a menudo tienen un buen pronóstico tienen una baja frecuencia y ocurren con mayor incidencia en niños. Los de grado intermedio, crecen a un ritmo moderado, y se les denomina astrocitomas anaplásicos. Los de grado IV tienden a crecer rápidamente y se diseminan hasta el tejido cerebral normal circundante, son conocidos como glioblastomas o glioblastoma multiforme, se consideran malignos, son los más frecuentes y presentan en adultos (Reyes y Lema, 2007; American Cancer Society, 2016).

Las células cancerosas difieren de las células normales por presentar proliferación descontrolada, pérdida de la capacidad de diferenciación, aumento de invasividad, pérdida en la capacidad de morir y una disminución de la sensibilidad a las drogas citotóxicas (Cooper y Hausman, sexta edición). Se sugiere que las mutaciones son un mecanismo que altera a las células porque induce inestabilidad genómica, afectando genes que codifican componentes de control en el ciclo celular como p53.

### **1.3. Proteína p53.**

La proteína p53 es codificada por el gen supresor de tumores p53 (Jordán, 2003), actúa como un factor transcripción nuclear, presenta tres dominios: N-terminal, que activa la transcripción; central hidrofóbico, con regiones conservadas que al mutar alteran la capacidad de unión al DNA y su actividad como factor transcripcional; y, C-terminal, que participa en la oligomerización y unión específica al DNA (Peralta-Zaragoza *et al.*, 1997).

Es esencial para inducir una respuesta en la célula ante el daño al DNA, deteniendo el ciclo celular. Activa genes implicados en la regulación del ciclo celular y la muerte celular por apoptosis (Green y Kroemer, 2009), es considerado el guardián del genoma porque vigila la correcta reparación de las alteraciones genéticas (Jordán, 2003). Su síntesis en condiciones normales es regulada por la proteína MDM2 que induce su ubiquitinación y destrucción por el proteasoma. Cuando las células se exponen a agentes que dañan el DNA incrementan los niveles de p53 lo cual induce que las células detengan el ciclo celular al final de la fase G1 y se reparen los daños en el DNA antes de continuar con su replicación

en la fase S. Así, p53 puede reprimir la expresión de genes que participan en los procesos de replicación y transcripción del DNA, o puede activar genes reguladores negativos para interrumpir el ciclo celular o inducir muerte celular por apoptosis. Cuando el daño no puede ser reparado la célula entra en senescencia o muerte celular por apoptosis (Peralta-Zaragosa *et al.*, 1997; Jordán, 2003).

Cuando hay daño en el DNA p53 favorece la transcripción de proteínas como PUMA, NOXA o Bax, los dos primeros controlan el secuestro de p53 citosólico por la proteína Bcl-xL (Miyashita y Reed, 1995; Jordán, 2003; Yu *et al.*, 2003; Ito *et al.*, 2005), Bax se transloca a la mitocondria e induce la permeabilización de la membrana externa mitocondrial promoviendo la liberación de cyto C y de IAF (Factor inductor de apoptosis, por sus siglas en inglés), Figura 4 (Miyashita *et al.*, 1994; Sedlak *et al.*, 1995; Wolter *et al.*, 1997; Rosse *et al.*, 1998). Se ha dado a conocer que p53 cuenta con actividad citosólica que es capaz de inducir apoptosis de manera independiente de la transcripción (Chipuk *et al.*, 2003; Green y Kroemer, 2009).

Si p53 se encuentra mutado o pierde la capacidad de inducir muerte celular puede contribuir a inestabilidad genómica y a la sobrevivencia de células dañadas debido a que no interrumpe el ciclo celular, permitiendo la proliferación descontrolada dando paso a tumores (Jordán, 2003).

### 1.3.1.2. Uso de líneas celulares humanas permite encontrar tratamientos.

El uso de líneas celulares humanas permite encontrar tratamientos con el uso de compuestos bioactivos que desencadenen mecanismos de muerte celular. La línea celular de glioma humano U373 es un tipo de astrocitoma de grado III, presenta una mutación en el codón 273 del gen p53 (Ullrich *et al.*, 1992; Van Meir *et al.*, 1994), y la línea celular de glioma humano U87 es un astrocitoma de grado IV que presenta p53 silvestre, Tabla 2. (Van Meir *et al.*, 1994)

**Tabla 2.** Líneas celulares de glioma humano.

	<b>U373</b>	<b>U87</b>
<b>Organismo</b>	<i>Homo sapiens</i> , humano	<i>Homo sapiens</i> , humano
<b>Tejido</b>	Cerebro	Cerebro
<b>Morfología</b>	Epitelial (pleomorphic/astrocytoid)	Epitelial
<b>Enfermedad</b>	Glioblastoma; Astrocitoma grado III	Glioblastoma; Astrocitoma grado IV
<b>Edad</b>	61 años	44 años

<b>Género</b>	Masculino	Masculino
<b>Etnia</b>	Caucásico	Caucásico

### 1.3.2. Tratamientos.

Se sabe que la mayoría de diferentes tipos de cáncer presentan mutaciones en el gen p53 (Hollstein *et al.*, 1991; Greenblatt *et al.*, 1994). Aun así cada tipo de cáncer se comporta de manera diferente, crecen a velocidades distintas y responden a distintos tratamientos, por ello se requiere un tratamiento específico. Entre más se disemina un cáncer más difícil es erradicarlo. Se ha llegado a la aceptación general de indicar como tratamiento la politerapia donde la cirugía se usa como base, con resecciones lo más amplias posibles, añadiendo radiación, quimioterapia, terapia hormonal, terapia inmune y/o terapia dirigida, aplicando fármacos que interfieren específicamente con el crecimiento de células cancerosas. El tratamiento se elige según el tipo, el estadio del cáncer y el estado del paciente (Reyes y Lema, 2007; Bai *et al.*, 2011; INFOCANCER, México 2015; American Cancer Society, 2016).

**Tabla 3.** Tratamientos utilizados contra el cáncer. (Cancer National Institute, USA 2016)

<b>Tratamiento</b>	<b>Descripción</b>
Cirugía	Procedimiento en el que un doctor, cirujano, extirpa el tumor del cuerpo.
Radioterapia	Usa altas dosis de radiación para destruir células cancerosas y reducir tumores.
Quimioterapia	Usa fármacos para eliminar células cancerosas.
Terapia hormonal	Hace más lento o detiene el crecimiento del cáncer que usa hormonas para crecer.
Terapia inmunológica	Ayuda al sistema inmunitario a combatir el cáncer.
Terapia dirigida	Actúa sobre los cambios que promueven el crecimiento, la división y diseminación de las células cancerosas.

Actualmente los tratamientos no eliminan por completo el cáncer. Principalmente porque es difícil detectar un cáncer, porque los síntomas suelen ser malinterpretados y cuando por fin son detectados presentan un grado de desarrollo avanzado. Para los gliomas las cirugías no son utilizadas comúnmente para remover el tejido afectado lo cual hace más difícil controlar el crecimiento del tumor. De esta manera es de vital importancia seguir buscando compuestos con la capacidad de inducir muerte celular en células cancerosas.

### 1.4. Citotoxicidad.

La citotoxicidad es una forma de producir daño celular por ciertas moléculas al ser tóxicas. Un compuesto citotóxico es aquel que altera las funciones celulares básicas induciendo un daño que causa muerte celular (Repetto, 2002; Arencibia et al., 2009). El efecto citotóxico es una actividad biológica que permite analizar si un compuesto es tóxico, se utiliza para el análisis de extractos crudos y para guiar la purificación de compuestos. Los compuestos citotóxicos son utilizados en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos contra cáncer. Estos compuestos citotóxicos principalmente activan o inhiben proteínas de las vías de señalización que regulan el ciclo celular e inducen muerte celular, como p53.

#### 1.4.1. Muerte celular

En el tratamiento del cáncer se busca que los agentes terapéuticos provoquen la activación de los procesos de muerte celular de manera exclusiva en las células alteradas. Actualmente se han descrito diferentes mecanismos de muerte celular entre los que se encuentran autofagia, necrosis y apoptosis (Tabla 4).

**Tabla 4.** Tipos de muerte celular.

<b>Autofagia</b>	<b>Necrosis</b>	<b>Apoptosis</b>
Respuesta fisiológica a la privación de nutrientes y condiciones de estrés en el medio	Aparece como consecuencia de un daño traumático o por la exposición a toxinas	Las células se autodestruyen, como un mecanismo de eliminación de células no deseadas, dañadas o desconocidas
	Presenta una pérdida aguda de la regulación	Protege ante posibles enfermedades
Estimula citocinas e inhibe caspasas	Presenta fragmentación del DNA al azar, una condensación progresiva de la cromatina y una morfología celular característica	Hay condensación de la cromatina y fragmentación del DNA a gran escala y de manera ordenada
Exhibe degradación del aparato de Golgi, de ribosomas y del retículo endoplásmico. Forma vacuolas: autofagosomas que se fusiona con un lisosomas y forman autofagolisosomas	Conlleva a un proceso osmótico desmesurado y finaliza con la lisis de la membrana celular, liberando el contenido intracelular	La membrana celular se mantiene intacta por lo cual no hay liberación del contenido celular
Recicla los componentes celulares y degrada proteínas	Conduce a células vecinas a muerte	Células eliminadas por fagocitos
	Atrae a células inflamatorias	No hay reacción inflamatoria
	Forma cicatriz fibrosa que deforma el tejido u órgano afectado	No se forman cicatrices
Bursch <i>et al.</i> , 2000; Ocker y Höpfner, 2012	Jordán, 2003; Sánchez-Torres y Vargas, 2003	Alfaro <i>et al.</i> , 2000; Jordán, 2003; Sánchez-Torres y Vargas, 2003; Hong <i>et al.</i> , 2004; Kumar <i>et al.</i> , 2005

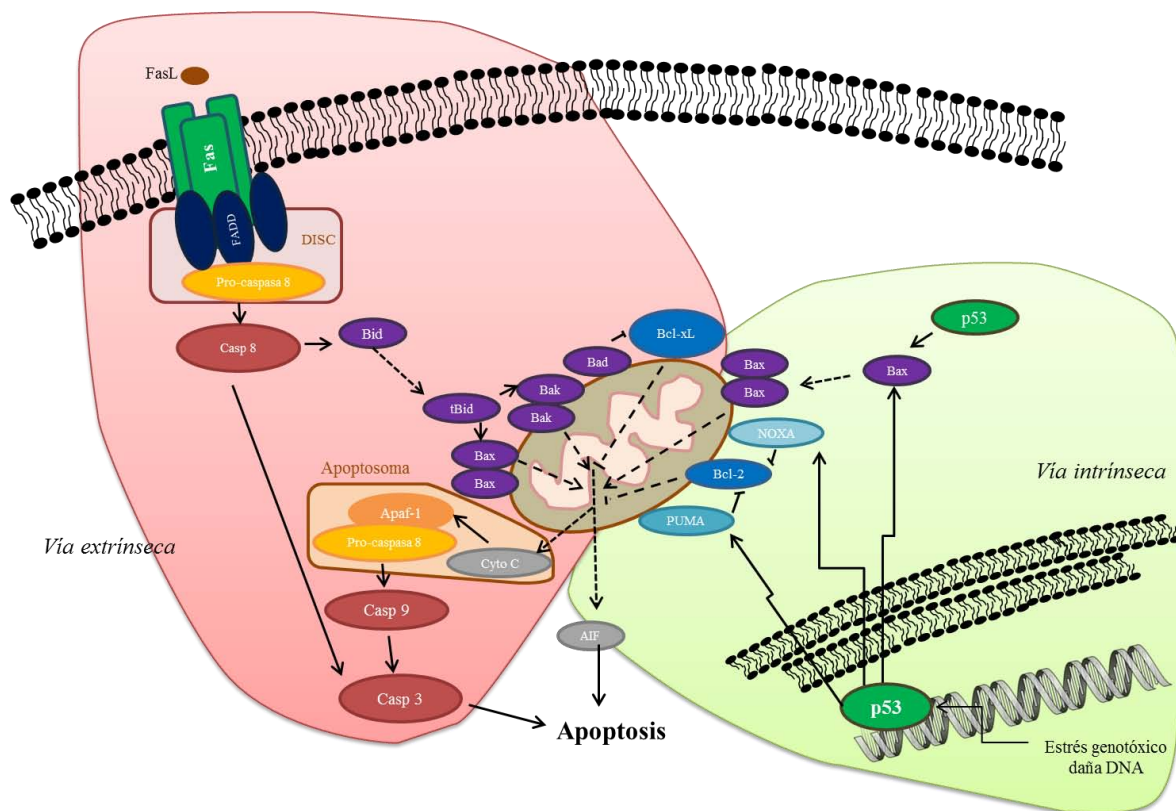
Estimular la muerte celular tipo apoptosis es relevante porque no afecta células cercanas y no induce una reacción inflamatoria. Además, se puede activar con un mecanismo dependiente de p53 citosólico y no sólo nuclear, esto es muy importante porque la mayoría de los diferentes tipos de cáncer presentan mutación en este gen y otros desactivan la vía de p53 mediante la elevación de sus inhibidores (Green y Kroemer, 2009; Ocker y Höpfner, 2012).

#### **1.4.1. Apoptosis.**

La apoptosis es un tipo de muerte celular, se caracteriza por cambios morfológicos como la deformación celular producida por la alteración en la conformación de elementos del citoesqueleto o por diferencias en la composición de la membrana celular, presenta un aumento y activación de la síntesis de determinadas proteínas necesarias en las rutas metabólicas de los procesos de muerte celular, condensación y fragmentación de la cromatina por acción de endonucleasas. Consta de tres fases: 1) activación, la célula recibe el estímulo que conduce a muerte, puede ser inducido por la pérdida de una actividad supresora, falta de factores de crecimiento, disminución de los contactos con las células que la rodean, por la unión de un ligando a un receptor como Fas y TNF o por la recepción de señales conflictivas; 2) ejecución, después de recibir la señal de muerte se pierde el contacto con células vecinas, el citoplasma se contrae provocando una disminución del tamaño celular, se da permeabilidad en las membranas de la mitocondria, la cromatina se condensa, se forman los cuerpos apoptóticos (vesículas), se presentan cambios bioquímicos dentro de la célula que conducen a la degradación de proteínas a través de proteasas como las caspasas; y 3) eliminación, las células que están muriendo por apoptosis son rápida y eficientemente removidas por fagocitos, que identifican la fosfatidilserina expuesta por la membrana externa por la pérdida de simetría de la membrana celular (Alfaro *et al.*, 2000; Jordán, 2003; Sánchez-Torres y Vargas, 2003; Kumar *et al.*, 2005).

Este mecanismo de muerte celular puede ser desencadenado por dos vías: extrínseca e intrínseca (Figura 5). La vía extrínseca es activada por señales extracelulares con la unión del ligando al receptor Fas (CD95) o TNF (factor de necrosis tumoral, por sus siglas en inglés) de la membrana plasmática, esta unión provoca en el citosol la formación del complejo DISC (complejo de señalización que induce muerte, por sus siglas en inglés) permitiendo la unión de caspasa 8 que puede activar las caspasas efectoras de muerte 3, 6 y

7, o bien, caspasa 8 puede activar a Bid que induce la liberación de citocromo C (cyto C) de la mitocondria que se une con Apaf-1 (factor activador de proteasas apoptóticas 1, por sus siglas en inglés) para formar el complejo conocido como apoptosoma y así activar caspasa 9 y 3. La vía intrínseca es activada por estrés biológico que provoca la transcripción de PUMA, NOXA y Bax, mediada por p53, hay translocación en dímeros de miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2, Bax y Bak, a la mitocondria modificando el potencial de membrana liberando cyto C al citosol. PUMA y NOXA inhiben a los miembros antiapoptóticos, Bcl-xL y Bcl-2 (Sedlak *et al.*, 1995; Jordán, 2003; Sánchez-Torres y Vargas, 2003; Kumar *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2010; Ocker y Höpfner, 2012). Cyto C se une a Apaf-1 y forma el apoptosoma, en presencia de ATP, que recluta y activa caspasa 9 y después caspasas 3, 6 y 7. Las caspasas son una familia de proteasas que hidrolizan sustratos selectivos, algunas son de señalización y otras son efectoras de muerte (Wolter *et al.*, 1997; Rosse *et al.*, 1998; Jordán, 2003; Sánchez-Torres y Vargas, 2003; Ocker y Höpfner, 2012).



**Figura 5.** Apoptosis. Vías extrínseca e intrínseca. (Modificado de (Sedlak *et al.*, 1995; Wolter *et al.*, 1997; Jordán, 2003; Sánchez-Torres y Vargas, 2003; Kumar *et al.*, 2005; Ocker y Höpfner, 2012).



El conocimiento del mecanismo de señalización intracelular, después de la activación de receptores o por daño en el DNA hasta la fase ejecutora, permite establecer nuevas dianas farmacológicas. Y en el caso del cáncer buscar blancos que activen muerte celular a pesar de los diferentes oncogenes como p53 (Jordán, 2003; Sánchez-Torres y Vargas, 2003).

## **2. Justificación.**

Los compuestos bioactivos aislados de organismos marinos presentan un gran potencial para el tratamiento de enfermedades humanas. Los invertebrados marinos se han presentado como candidatos interesantes para aislar metabolitos secundarios porque al ser organismos sésiles, de lento movimiento o tolerantes a ambientes extremos han desarrollado mecanismos para sobrevivir (Ebada *et al.*, 2008). Por ejemplo, del invertebrado *Alvinella pompejana*, poliqueto de ventilas hidrotermales, se obtuvo un homólogo estable de la superóxido dismutasa humana (SOD) útil para el estudio de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA, por sus siglas en inglés). Se sabe que hay diferencias entre los poliquetos de diversas regiones del océano y que presentan compuestos diferentes. En general, el estudio de poliquetos para el aislamiento de compuestos bioactivos es reducido y el número de trabajos con organismos de grandes profundidades es aún menor.

Aunque los estudios publicados sobre *Riftia pachyptila* están enfocados principalmente en su fisiología y metabolismo, en comprender como sobrevive al ambiente extremo, la relación simbiótica con las bacterias, su crecimiento y desarrollo. Por lo tanto, resulta de interés conocer el tipo de compuestos presentes adaptados a las condiciones de temperatura y presión, y sus posibles efectos sobre células humanas. Hasta el momento no existen reportes que analicen los compuestos presentes en este organismo como posibles fármacos. Sin embargo, *Riftia pachyptila* se presenta como un buen candidato para aislar compuestos interesantes con potencial farmacológico contra cáncer.

### **3. Hipótesis.**

Los extractos crudos de *Riftia pachyptila* son citotóxicos en diferentes líneas celulares de glioma humano.

### **4. Objetivos.**

#### **4.1. Objetivo general.**

Determinar el efecto inducido por los extractos crudos de *Riftia pachyptila* en células humanas e identificar el mecanismo de acción.

#### **4.2. Objetivos particulares.**

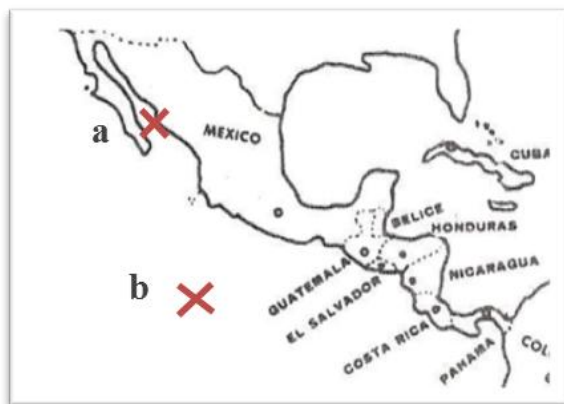
- Obtener extractos crudos de *Riftia pachyptila* para caracterizarlos.
- Definir las concentraciones de extracto crudo con mayor efecto citotóxico en una línea celular de glioma humano.
- Determinar el efecto citotóxico de cada extracto crudo en las concentraciones estandarizadas sobre distintas líneas celulares humanas.
- Dilucidar los posibles mecanismos moleculares involucrados en la muerte celular del extracto crudo de mayor efecto citotóxico.

## 5. Métodos.

### 5.1. Preparación de los extractos crudos de *Riftia pachyptila*.

#### 5.1.1. Colecta.

Los organismos de la especie *Riftia pachyptila* fueron colectados por la M. en C. Fanny Reisman Moussan, en el crucero de la Dorsal del Pacífico Oriental (EPR) en noviembre del 2008 con el sumergible *Alvin* condicionado para soportar elevadas presiones y cambios fluctuantes de temperatura. Los puntos de colecta fueron dos: 1) la Cuenca de Guaymas (latitud 27°0.4' Norte, longitud 111°24.5' Oeste) y 2) la Dorsal del Pacífico Oriental, Tica (latitud 9°50.5' Norte, longitud 104°17.5' Oeste), Figura 6; la profundidad de colecta oscila entre los 2,000 y 2,500 metros. En el laboratorio se mantuvieron congelados a -20°C hasta el inicio de este trabajo.



**Figura 6.** Coordenadas de las áreas de colecta. a) Cuenca de Guaymas: latitud 27°0.4' norte, longitud 111°24.5' oeste; b) Dorsal del Pacífico Oriental, Tica: latitud 9°50.5' norte, longitud 104°17.5' oeste.

#### 5.1.2. Seccionar el organismo.

Sobre una cama de hielo cada uno de los tres organismos de *Riftia pachyptila* fue seccionado en tres: trofosoma (*Tr*), pared (*Pa*) y tubo (*Tu*). Primero se realizó un corte a lo largo de *Tu* para retirar a *Pa* alojada en este. A *Pa* se le realizó un raspado con una navaja para separar las bacterias simbiotas alojadas en el *Tr* (Figura 7). Las plúmulas fueron descartadas.



**Figura 7.** Seccionar a *Riftia pachyptila*. a) El organismo se mantuvo sobre una cama de hielo; b) organismo completo, únicamente es visible el tubo que protege al organismo; c) corte lateral en el tubo para retirar el cuerpo del organismo; d) pared del cuerpo y tubo (*Tu*); e) raspado del cuerpo para retirar a las bacterias; y, f) en la caja petri derecha se observa el cuerpo ya raspado, *Pa*, y en la izquierda se observa lo que se raspó, *Tr*.

### 5.1.3. Maceración y extracción.

Antes de la maceración las tres secciones *Tr*, *Pa* y *Tu* de cada organismo se liofilizaron en Freeze Dry System, durante 24 horas; enseguida cada muestra se pulverizó en un mortero de porcelana. Cada uno de los liofilizados se almacenó en un frasco de vidrio con tapa y para iniciar con la extracción se les agregó una mezcla de diclorometano-metanol (1:1). Se dejó macerar durante 48 horas en oscuridad y a temperatura ambiente en promedio entre cada ciclo antes de extraer en rotavapor al vacío hasta sequedad, controlando los puntos de ebullición de ambos solventes, por 7 u 8 ciclos para obtener un extracto crudo de cada una de las secciones (*Tr*, *Pa* y *Tu*).

#### 5.1.3.1. Cromatografías de capa fina de los extractos crudos.

La fase estacionaria fue la placa cromatográfica de sílica gel (marca Macherey-Nagel SIL G/UV), utilizada con las siguientes medidas: 3 cm de ancho por 5 cm de largo, marcada a un centímetro del extremo que se sumerge en la fase móvil, en esta marca se colocaron las muestras de los extractos crudos (1: *Tr*; 2: *Pa*; 3: *Tu*) con 0.5 cm de distancia entre cada

uno. La fase móvil fueron los siguientes solventes: a) diclorometano, b) acetona-diclorometano (1:1), c) acetona-diclorometano (4:1), d) diclorometano-acetato de etilo (7:3), e) diclorometano-acetona (4:1), f) diclorometano-metanol (4:1), g) diclorometano-metanol (7:3) y h) diclorometano-metanol (9:1).

Se adicionó la fase móvil a la cámara cilíndrica cubierta para permitir su evaporación en el interior, mientras se colocaron aproximadamente 5µL de las muestras de los extractos crudos sobre la placa y enseguida se sumergió con el extremo de las muestras en el fondo de la cámara. Una vez que la fase móvil alcanzó la distancia deseada, 0.5cm antes del tope de la placa, se retiró la placa de la cámara y se dejó evaporar el exceso de solvente para continuar con el proceso de detección de los compuestos bajo la lámpara de luz ultravioleta a 254 y 360 nm. Para ello se dispersó en la placa ácido sulfúrico como reactivo oxidante y se dejó calentar durante unos segundos.

## **5.2. Efecto citotóxico de los extractos crudos de *Riftia pachyptila*.**

### **5.2.1. Cultivo celular.**

Se usaron tres líneas celulares humanas: dos de glioma (U373 y U87) y una de fibroblastos de piel (BJ1), proporcionadas por la M. en C. Cristina Trejo Solís (Laboratorio de Neuroinmunología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía), el Dr. Adolfo López Órnelas (Instituto de Fisiología Celular, UNAM) y el Dr. Iván Velasco Velázquez (Instituto de Fisiología Celular, UNAM), respectivamente. Las líneas celulares U373 y BJ1 se mantuvieron con medio DMEM con alta concentración de glucosa (Sigma, *Life Science*), y la línea U87 con DMEM/F12 (Gibco, *Life Technologies Corporation*), ambos medios fueron suplementados con 10% de suero bovino fetal (SBF) y 1% de mezcla de antibióticos (penicilina, estroptomina, anfotericina). Las células U373 y los fibroblastos se sembraron en frascos de 75 cm<sup>2</sup> (Santa Cruz *Biotechnology, Inc.*) y las U87 en frascos de 25 cm<sup>2</sup> (Santa Cruz *Biotechnology, Inc.*), todas se mantuvieron a 37°C con una humedad relativa del 98% y 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez que las cajas se encontraban en un rango del 90-95% de confluencia celular se desprendieron con tripsina a 0.5 % (EDTA 0.5M, tripsina 0.5g, en Hanks sin calcio y sin magnesio) durante 5 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo se adicionó medio para neutralizar la tripsina, después se centrifugaron la línea celular U373 y fibroblastos a 2,000 rpm durante 5 minutos, y la línea celular U87 a 1,200 rpm durante 4

minutos. Posteriormente fue retirado el sobrenadante, el botón se resuspendió en 2mL de medio y se contaron las células en la cámara de Neubauer, para después sembrar la cantidad requerida en cada uno de los experimentos.

El número de células sembradas dependió del experimento a realizar, es decir por el tipo de placa utilizada (Tabla 5). La cantidad de células utilizadas previamente estandarizada para contar con una monocapa al realizar el tratamiento. Para el ensayo TUNEL y las inmunofluorescencias las células se sembraron en cubreobjetos de 10 o 12mm (*Marienfeld, Germany*), previamente tratados para facilitar la adherencia celular. El tratamiento consistió en colocar los cubreobjetos en tubos con roca durante 20 minutos en agitación en cada una de las siguientes soluciones, de manera progresiva, ácido acético-etanol (3:7), etanol en las concentraciones 80%, 96%, 100%, antes de colocar cada una de las disoluciones se retiró la anterior. Finalmente permanecieron en etanol absoluto hasta su uso.

**Tabla 5.** Número de células sembradas por tipo de experimento. ND, no determinado.

	# células			Tipo de placa (# de pozos)
	U373	U87	Fibroblastos	
Citotoxicidad celular	20,000	15,000	15,000	96
TUNEL e Inmunofluorescencia	50,000	50,000	ND	24 con cubreobjetos
Western Blot	180,000	150,000	ND	6

### 5.2.2. Estandarización del tratamiento con los extractos crudos.

Se compararon diferentes concentraciones de los extractos crudos (0.1, 1, 10, 50, 100 y 200 µg/mL) sobre la línea celular de glioma humano U373 a través de un ensayo de reducción metabólica de MTT, a partir de los resultados, se determinó que las concentraciones 50, 100 y 200 µg/mL se utilizarían para el resto de los experimentos en las diferentes líneas celulares.

Cada uno de los extractos se solubilizó con dimetilsulfóxido (DMSO) al 0.2%. Las diferentes concentraciones fueron preparadas a partir del stock 200 µg/mL, que se agitó en vórtex y se sonizó por 20 minutos para una mejor dilución. La preparación del tratamiento, a partir del liofilizado, siempre se realizó el mismo día del experimento. Se consideró un control que únicamente recibió cambio de medio y otro con DMSO 0.2%. El tratamiento

duró 24 horas, tiempo estimado por una estandarización previa en el cual se observó un efecto mayor. Los diferentes ensayos se realizaron al menos tres veces por triplicado.

### **5.2.3. Evaluación del efecto citotóxico: ensayo de reducción metabólica de MTT.**

Para determinar el efecto citotóxico de los extractos se realizó el ensayo de reducción metabólica del bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-ilo)-2, 5-difeniltetrazol (MTT) de color amarillo, cuya reducción está realizada por deshidrogenasas en un compuesto de color azul, formazán, el cual se precipita formando cristales insolubles en agua pero solubles en DMSO. Este método colorimétrico y cuantitativo determina la citotoxicidad celular inferida a partir de la cantidad de células vivas en relación a la cantidad de formazán producido (Mosmann, 1983; Fotakis y Timbrell, 2006; Ebada *et al.*, 2008).

Se utilizaron los tres extractos sobre las células de glioma y para los fibroblastos solo se utilizó el extracto *Pa*. Transcurrido el tratamiento se lavó con PBS 1X (NaCl 8g; KCl 0.2g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44g; KH<sub>2</sub>PO 0.24g; pH 7.4) y se adicionaron 100 µL de MTT por pozo (MTT 0.5mg/mL, en Hanks sin calcio y sin magnesio), incubando una hora a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub> y una humedad relativa del 98%, en obscuridad. Transcurrido el tiempo se hicieron lavados con PBS 1X, después se disolvieron los cristales de formazán en 200µL de DMSO. La lectura fue a una longitud de onda de 550nm en un lector de placas ELISA (Dynatech, MR590).

A partir de ensayo se utilizó el extracto *Pa* sobre las líneas celulares de humanas con las concentraciones de extracto con mayor efecto citotóxico.

### **5.2.4. Ensayo de TUNEL.**

El ensayo de TUNEL (dUTP transferasa media el marcaje de los extremos libres, por sus siglas en inglés) tiene su fundamento en la detección de la rotura del DNA internucleosomal (Mundle y Raza, 1995; Goping *et al.*, 1999; Hong *et al.*, 2004). Cuando hay daño celular existe fragmentación del DNA produciéndose extremos 3'-OH libres, estos son detectados por el enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) que incorpora nucleótidos marcados con la fluoresceína dUTP (dioxigenina) (Alfaro *et al.*, 2000; Jordán, 2003; Sánchez-Torres y Vargas, 2003).

Al terminar el tratamiento se fijaron las células con paraformaldehído al 4% en PBS una hora a temperatura ambiente, después se lavaron con PBS 1X, enseguida se incubaron



2 minutos a 4°C en una disolución permeabilizante (0.1% Tritón X-100 en 0.1% citrato de sodio), después se lavaron con PBS 1X. Se preparó la mezcla de reacción TUNEL del Kit de Detección *in situ* de muerte celular, AP (Roche): disolución de marcaje y disolución enzimática (9:1). Se incubaron una hora con la mezcla TUNEL en una atmósfera humidificada en la oscuridad. Por último, se lavaron con PBS 1X y los cubre objetos se colocaron con disolución de montaje complementado con DAPI (Vectashield, *Vector Laboratories, Inc.*) sobre portaobjetos y se guardaron en oscuridad a 4°C. Las observaciones se realizaron con el microscopio de inmunofluorescencia Leica DMLS, en una longitud de onda en los intervalos de 450-500nm (azul) y 515-565nm (verde). Las imágenes fueron representativas de cada tratamiento.

#### **5.2.5. Inmunofluorescencias.**

Para la identificación de la expresión de las posibles proteínas involucradas en el efecto citotóxico del extracto *Pa* realizamos inmunofluorescencias utilizando el anticuerpo contra p53 humana, DO1 (Santa Cruz *Biotechnology*), que reconoce un epítipo en el extremo N-terminal de la proteína p53 humana (Sánchez-Torres y Vargas, 2003).

Al terminar el tratamiento se lavó con PBS 1X, enseguida se fijaron las células con paraformaldehído al 4% durante veinte minutos a -20°C, transcurrido este tiempo se lavaron con PBS 1X. Para permeabilizar se utilizó metanol 10 minutos a -20°C, después se lavaron con PBS 1X frío. Se bloquearon con albumina al 2% (BSA) una hora a temperatura ambiente. Se incubaron con el anticuerpo primario, anti p53 DO-1 en BSA 2% (1:100), 24 horas en el refrigerador a 4°C. Se realizaron lavados con PBS 1X y se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 anti-mouse en PBS 1X (1:100) una hora a temperatura ambiente. Por último, se lavaron con PBS 1X con agitación leve. Los cubreobjetos fueron colocados en portaobjetos con solución de montaje complementado con DAPI (Vectashield, *Vector Laboratories, Inc.*). Las observaciones se realizaron con el microscopio de inmunofluorescencia Leica DMLS, en una longitud de onda en los intervalos de 450-500nm (azul) y 515-565nm (verde). Las imágenes fueron representativas de cada tratamiento.

### 5.2.6. Análisis de proteínas por Western Blot.

Se realizaron corridas electroforéticas discontinuas para separar partículas cargadas en un campo eléctrico, con geles de poliacrilamida (acrilamida/bis acrilamida 10%-2%), en presencia del detergente dodecil sulfato de sodio (SDS) para desnaturalizar y separar proteínas de acuerdo a su masa molar (De la Fuente *et al.*, 2007).

Finalizado el tiempo de tratamiento se lavaron las células con PBS 1X, se lisaron las muestras con 150 $\mu$ L de Buffer de lisis (BB3X: Tris Cl 50mM pH 6.8; SDS 2%; glicerol 10%; azul de bromofenol 1%; agua destilada;  $\beta$ -mercaptoetanol) y con un “cell scraper” se despegaron las células. Las muestras se hirvieron durante 20 minutos.

Los geles se prepararon al 10%: gel separador (Tris-HCl 1.5M pH 8.8; H<sub>2</sub>O; SDS 10%; acrilamida/bisacrilamida 30%; persulfato de amonio (APS) 10%; TEMED); y gel concentrador (Tris-HCl 1M pH 6.8; H<sub>2</sub>O; SDS 10%; acrilamida/bisacrilamida 30%; persulfato de amonio, APS 10%; TEMED). Las muestras corrieron a un voltaje constante de 130 en presencia de amortiguador de corrida (5X: Tris base 15.1g; glicina 94g; SDS 0.1%), empleando el sistema Mini Protean 3 Cell de Bio-Rad. Después de la separación electroforética las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-C Extra, *Amersham Biosciences, UK*) con amortiguador de transferencia (10X: Tris base 58g; glicina 29g; SDS 3.7g) a un amperaje constante de 200mA, durante dos horas en frío. El equipo utilizado fue de Bio-Rad. Luego se realizó una tinción reversible con solución rojo de Ponceau (Rojo de Ponceau 0.5g; ácido acético 1%; NaOH 200 $\mu$ M; acetonitrilo 20%) para comprobar la eficiencia de la transferencia. Posteriormente, las membranas se lavaron con TBS 1X (TBS 10X: Tris base 80g; NaCl 2g; KCl 30g) para eliminar el colorante.

Después las membranas se incubaron con solución de bloqueo (leche en polvo descremada 5% en TBS 1X) durante una hora a temperatura ambiente en agitación. Para la inmunodetección se utilizó el anticuerpo p53 DO1 (Santa Cruz *Biotechnology*) a una concentración 1:500 y se incubó toda la noche a 4°C con agitación suave. Después, se realizaron lavados de 10 minutos con TBS 1X en agitación. Se colocó el anticuerpo secundario anti-mouse a una concentración de 1:4,000 (Santa Cruz *Biotechnology*) una hora a temperatura ambiente con agitación suave, al concluir este tiempo se lavó con TBS 1X. Los anticuerpos fueron diluidos en leche descremada en polvo al 2.5% en TBS 1X. La

detección se realizó empleando el kit de bioluminiscencia InmunoCruz-Santa Cruz *Biotechnology* y SuperSignal® *West Femto-Thermo Scientific*.

Para la estimación del peso molecular de las proteínas se empleó un marcador de peso molecular (Thermo Scientific) y como control de carga se utilizó  $\beta$ -actina (Sigma). La intensidad de las señales obtenidas se determinó por densitometría empleando el programa *Image J 1.47v* (National Institutes of Health, USA).

### **5.3. Análisis estadístico.**

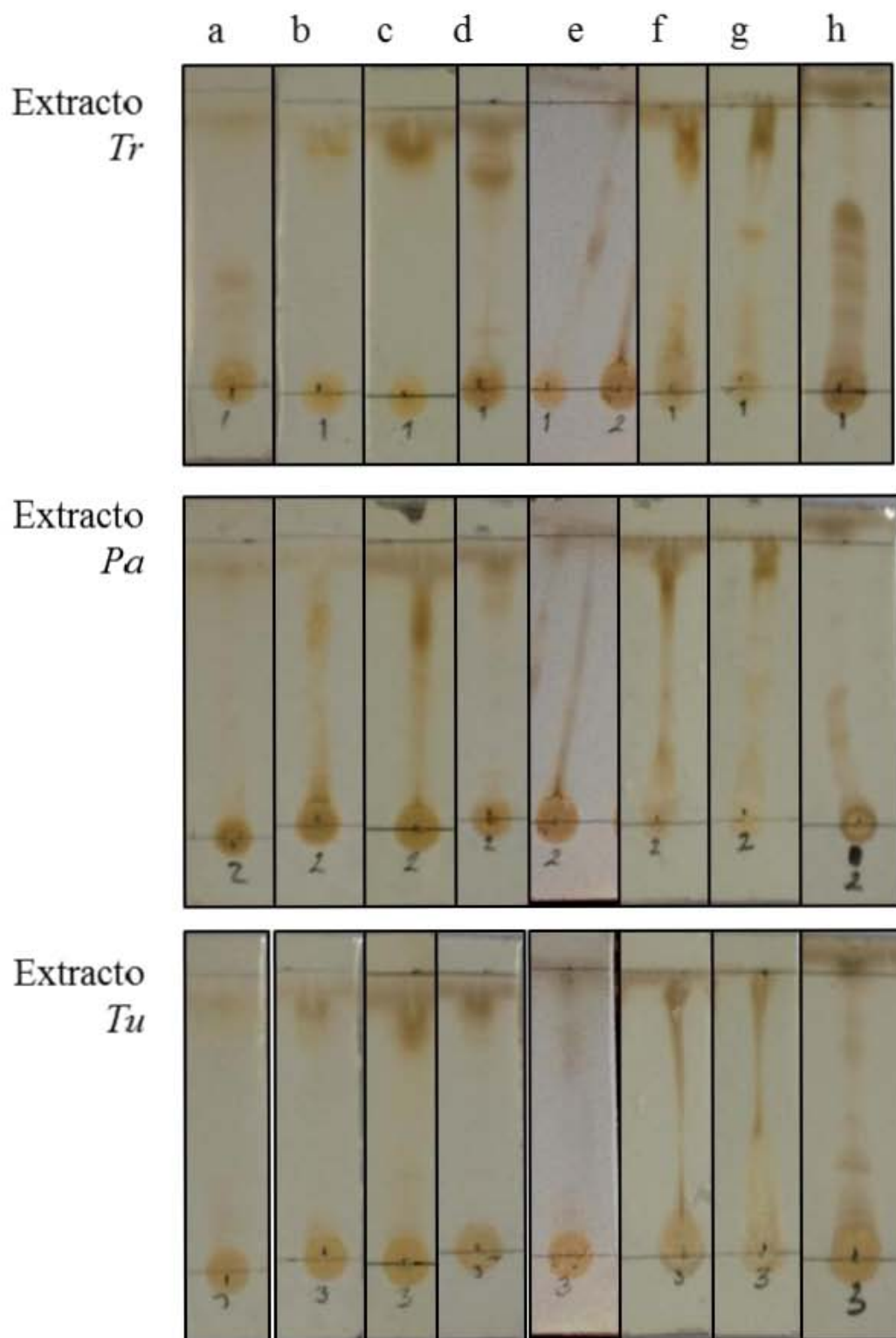
Los resultados obtenidos se expresan normalizados de la media de tres experimentos independientes por triplicado,  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ) se determinaron por medio de análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, seguido del test de comparación múltiple Tukey. El correspondiente análisis estadístico se realizó mediante el uso del programa Prism 6 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

## **6. Resultados.**

### **6.1. Análisis de los extractos crudos de *Riftia pachyptila*.**

#### **6.1.1. Cromatografías de capa fina de los extractos crudos.**

En las cromatografías de capa fina se observó cómo los diferentes disolventes separan las moléculas presentes en los extractos crudos de *R. pachyptila*. Se compararon los tres extractos y se encontró que presentan diferentes moléculas. La mezcla diclorometano-metanol (h) separa más elementos de los tres extractos crudos, esta mezcla de disolventes podría ser utilizada al realizar la purificación, aunque se requiere probar más disolventes para determinar el más apropiado para la purificación en futuros experimentos (Figura 8).

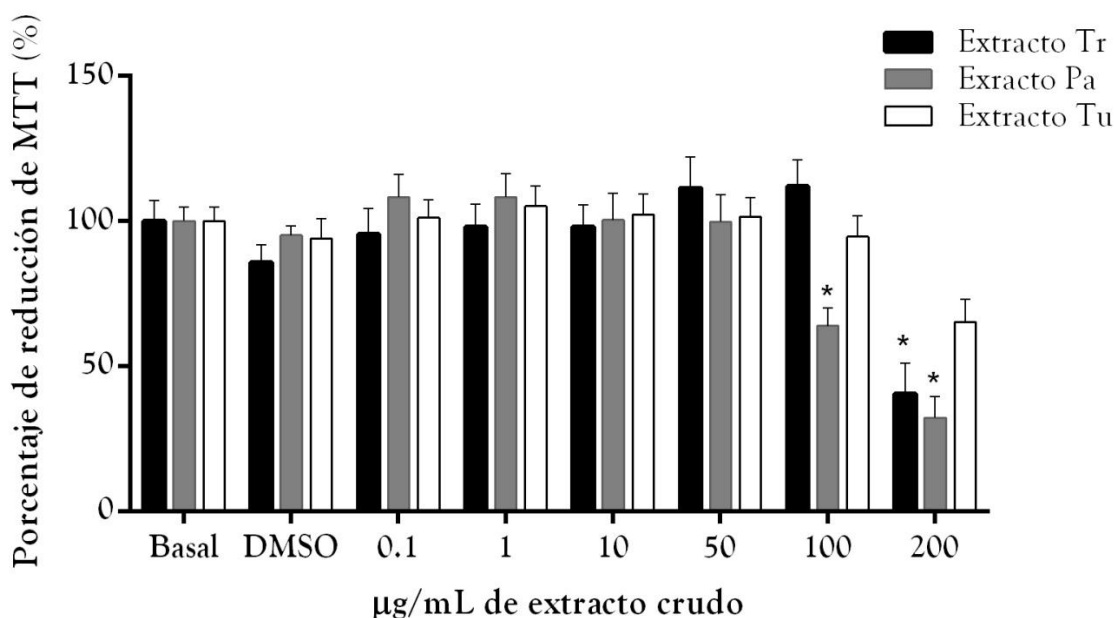


**Figura 8.** Cromatografías de capa fina de extractos crudos. Fases móviles: a) diclorometano, b) acetona-diclorometano (1:1), c) acetona-diclorometano (4:1), d) diclorometano-acetato de etilo (7:3), e) diclorometano-acetona (4:1), f) diclorometano-metanol (4:1), g) diclorometano-metanol (7:3) y h) diclorometano-metanol (9:1); 1 es Trofosoma (*Tr*), 2 es Pared (*Pa*) y 3 es Tubo (*Tu*).

## 6.2. Efecto citotóxico de los extractos crudos de *Riftia pachyptila*.

### 6.2.1. Determinación de las concentraciones en la línea celular U373.

Con la curva concentración-respuesta se observó que 100 y 200  $\mu\text{g/mL}$  de los tres extractos crudos de *R. pachyptila* utilizados sobre la línea celular de glioma humano U373 tienen un efecto citotóxico inferido por una disminución en la producción de formazán. El extracto *Tr* presenta un efecto citotóxico en la concentración 200  $\mu\text{g/mL}$  del 60%. El extracto *Pa* es citotóxico en las concentraciones 100 y 200  $\mu\text{g/mL}$ , con una reducción aproximada del 35 y 70%, respectivamente. Por último, el extracto *Tu* también presenta un efecto en las concentraciones 100 y 200  $\mu\text{g/mL}$ , con una reducción del 10 y 35%, respectivamente (Figura 9). De esta manera se seleccionaron las concentraciones 50, 100 y 200  $\mu\text{g/mL}$  para continuar con los siguientes experimentos.

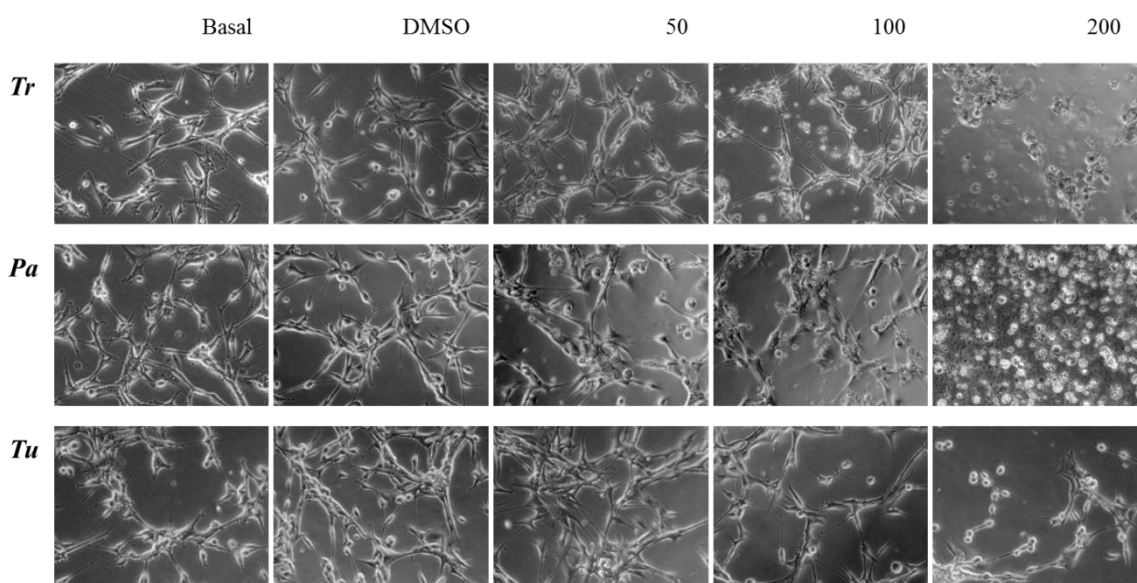


**Figura 9.** Efecto citotóxico inducido por los extractos crudos de *R. pachyptila* en la línea celular U373. Concentraciones utilizadas para la estandarización del tratamiento. Se realizó una ANOVA, donde se considera que la diferencia es estadísticamente significativa cuando  $P < 0.05$  (\* respecto al control).

### 6.2.2. Reducción metabólica de MTT en la línea celular U87.

Las concentraciones seleccionadas de los extractos crudos sobre la línea celular de glioma humano U87 a través del ensayo de reducción metabólica de MTT reveló que la concentración 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del extracto *Pa* presenta una disminución del 35% aproximadamente de muerte celular. Previo al ensayo se observó el efecto citotóxico inducido por los tres extractos de *R. pachyptila* a través de cambios en la morfología celular (Figura 10). El control basal, el tratamiento con DMSO y la concentración 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de los tres extractos crudos no presentan evidencia de muerte celular significativa. Las concentraciones 100 y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  evidencian un efecto dependiente de la concentración. Es evidente como el extracto *Pa* produce un mayor efecto citotóxico.

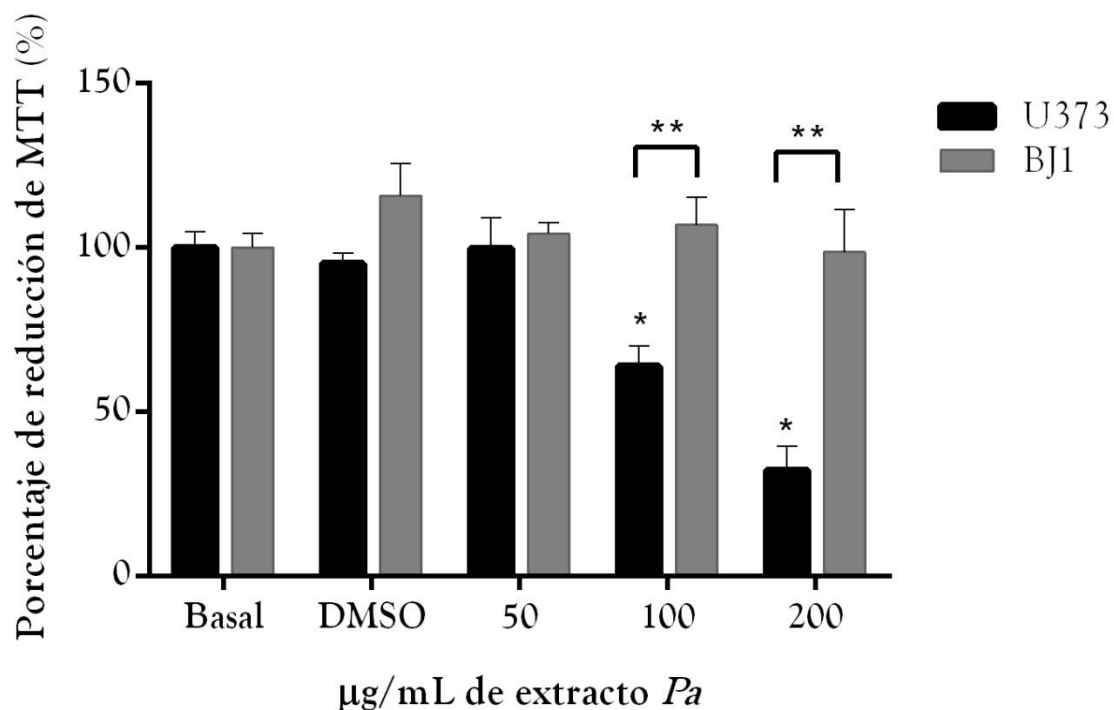
En los experimentos subsecuentes se utilizó al extracto *Pa* debido a que fue el que presentó un mayor efecto citotóxico sobre ambas líneas celulares de glioma humano.



**Figura 10.** Fotografías representativas del efecto citotóxico inducido por los extractos crudos de *R. pachyptila* en la línea celular U87 antes de realizar el ensayo de MTT. Tomadas con el objetivo 10X.

### 6.2.3. Reducción metabólica de MTT en la línea celular BJ1.

El ensayo de reducción metabólica de MTT evidencia que el extracto crudo *Pa* no induce muerte sobre la línea celular de fibroblastos BJ1. La producción de formazán no difiere entre los tratamientos (Figura 11). Estos resultados son representativos de lo observado al microscopio antes de realizar el ensayo.



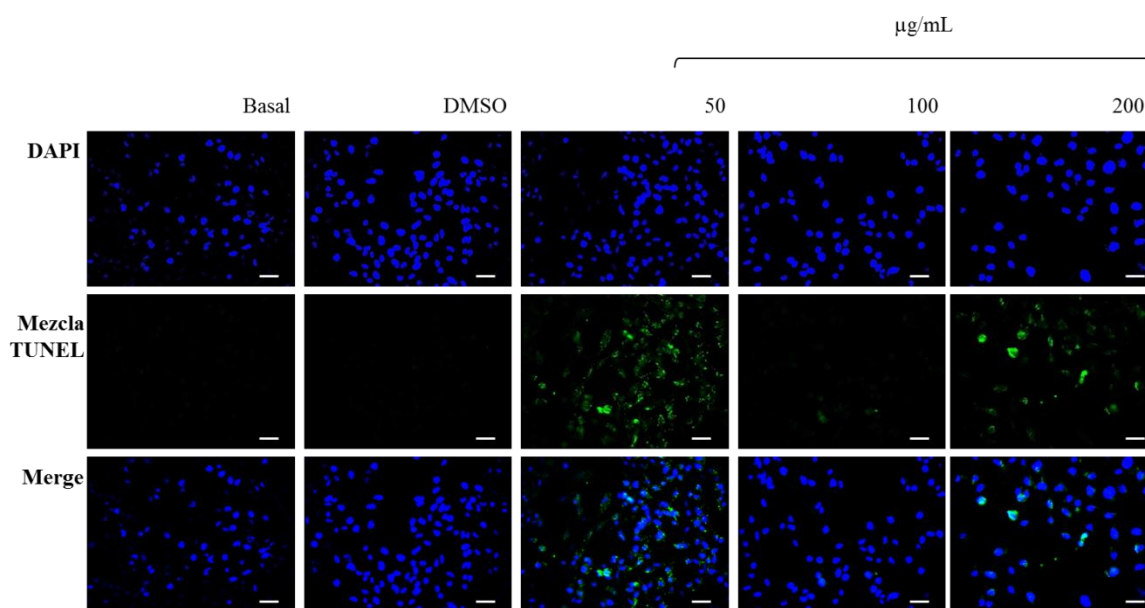
**Figura 11.** Comparación del efecto del extracto *Pa* en células sanas y de glioma. No hay un efecto citotóxico inducido por el extracto *Pa* en la línea celular BJ1 y en la línea de glioma U373 hay un efecto citotóxico (datos tomados de la Figura 8). Este resultado corresponde a lo observado antes de realizar el ensayo. Se realizó una ANOVA, donde se considera que la diferencia es estadísticamente significativa cuando  $P < 0.05$  (\* respecto al control; \*\*entre tratamientos).



### 6.3. Posibles mecanismos moleculares implicados en la muerte celular inducida por el extracto *Pa*.

#### 6.3.1. Efecto del ensayo de TUNEL en la línea celular U373.

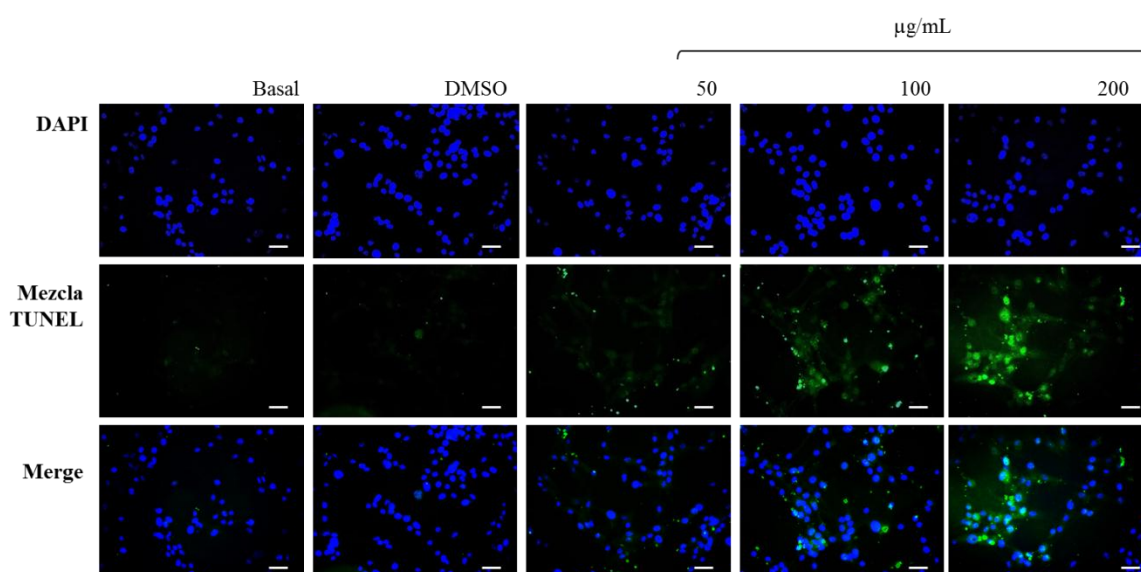
Los tratamientos con el extracto crudo *Pa* en las células de glioma humano U373 dieron marca positiva al ensayo de TUNEL. La marca positiva sugiere una muerte celular que pudiera ser de tipo apoptosis o necrosis. La marca positiva al ensayo de TUNEL se observa con la fluorescencia verde en el núcleo de las células, que co-localiza con la marca azul de DAPI. El control basal y el tratamiento con DMSO no presentan marca positiva al ensayo. Las concentraciones 50 y 200  $\mu\text{g/mL}$  presentan marca positiva con una intensidad mayor a la observada en el tratamiento 100  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 12).



**Figura 12.** TUNEL positivo por los tratamientos con el extracto *Pa* en la línea celular U373 sugiere una muerte celular. Marca azul: núcleos, marca verde: TUNEL positivo. Fotos representativas tomadas en campos con más células adheridas a la placa. La barra blanca representa 20  $\mu\text{m}$ .

### 6.3.2. Efecto del ensayo de TUNEL en la línea celular U87.

Los tratamientos con el extracto crudo *Pa* en la línea celular de glioma humano U87 presenta marca positiva al ensayo de TUNEL, a través de este ensayo se sugiere una muerte celular tipo apoptosis o necrosis inducida por los tratamientos con el extracto *Pa*. La marca positiva se observa en verde dentro del núcleo que co-localiza con los núcleos en azul, marcados con DAPI. El control basal y el vehículo DMSO no presentan marca positiva al ensayo (Figura 13).

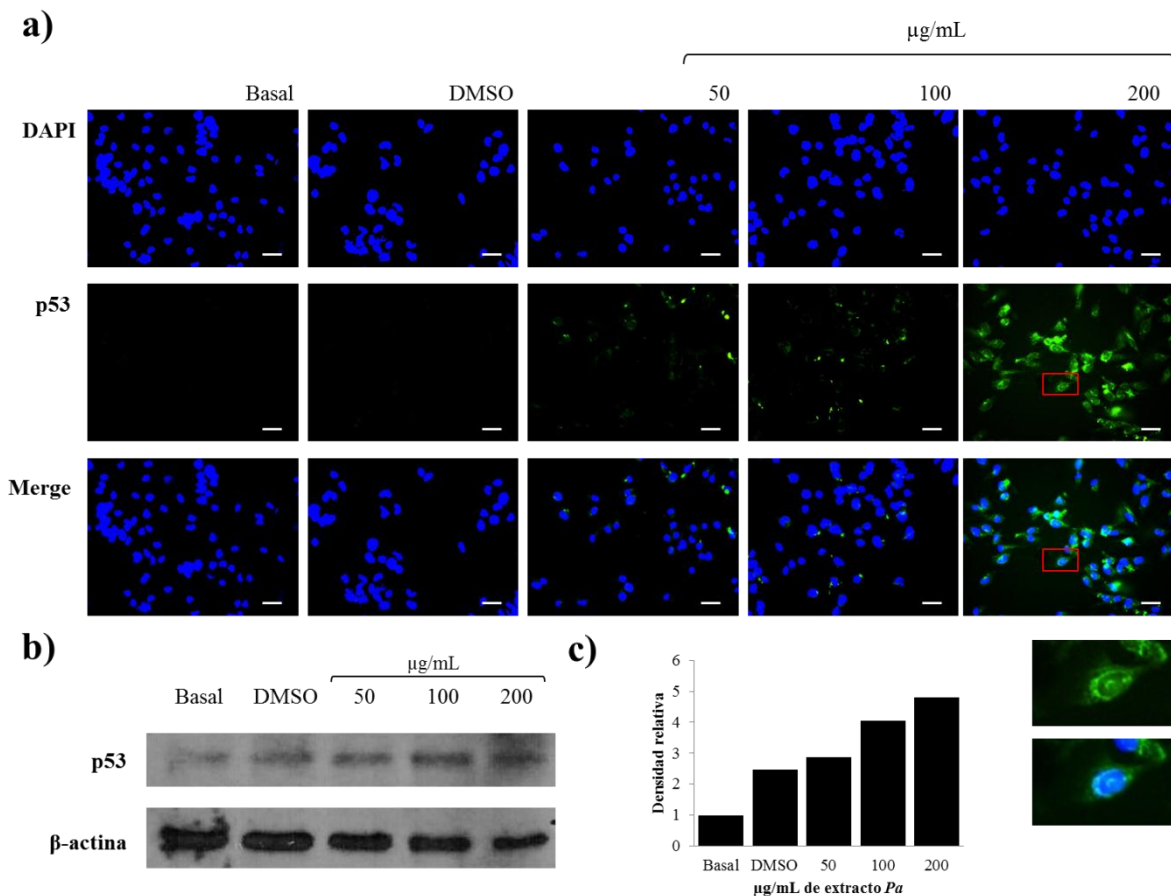


**Figura 13.** TUNEL positivo por el extracto *Pa* en la línea celular U87 sugiere muerte celular. Marca azul: núcleos, marca verde: TUNEL positivo. Fotos representativas tomadas en campos con más células adheridas a la placa. La barra blanca representa 20  $\mu\text{m}$ .

## 6.4. Efecto del extracto *Pa* en la expresión de la proteína p53.

### 6.4.1. Expresión de p53 en la línea celular U373.

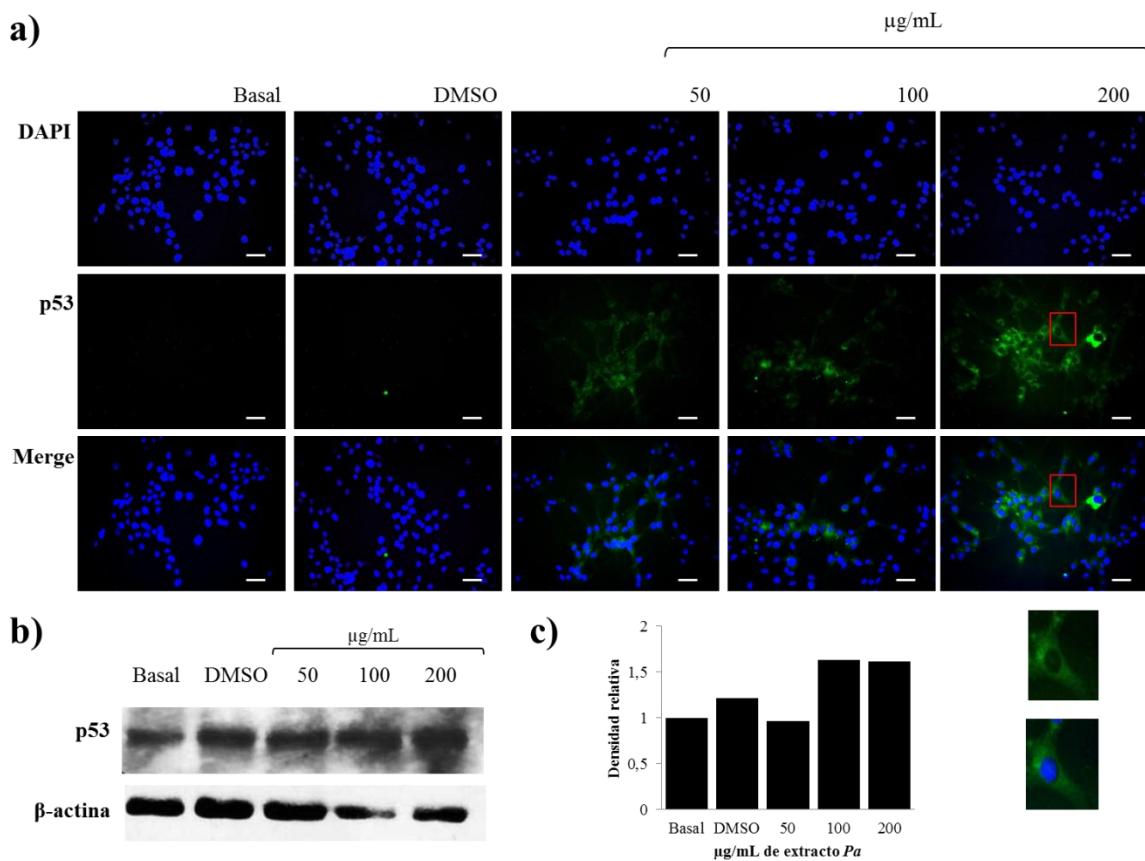
Los tratamientos con el extracto crudo *Pa* reflejan un incremento en la expresión de la proteína p53 en la línea celular de glioma humano U373. En la inmunofluorescencia (Figura 14a) se observa la expresión de la proteína p53 inducida por el extracto *Pa*, la marca se observa en color verde principalmente en el citosol (Figura 14d). El control basal y el tratamiento DMSO no tienen expresión de esta proteína, pero si hay células presentes evidenciadas por sus núcleos en azul (DAPI). El análisis de Western blot (Figura 14b) evidencia un incremento en la concentración de la proteína p53 inducido por el extracto *Pa*. En la densitometría (Figura 14c) se observa con mayor claridad dicho incremento.



**Figura 14.** Expresión de la proteína p53 por el tratamiento con el extracto *Pa* en la línea celular U373. Incremento de la proteína p53. a) Inmunofluorescencias señalan la expresión de la proteína con el tratamiento, en la amplificación se observa como la marca es citosólica; marca azul: núcleos, marca verde: p53. Fotos representativas tomadas en campos con más células adheridas a la placa. La barra blanca representa 20 µm. b) western blot refleja el incremento en la concentración de la proteína, contrastado con el control de carga β-actina; c) la densitometría evidencia el incremento de la proteína reflejado por el western blot.

### 6.4.2. Expresión de p53 en la línea celular U87.

Los tratamientos con el extracto crudo *Pa* inducen la expresión de la proteína p53 citoplásmica en la línea celular de glioma humano U87. En las inmunofluorescencias (Figura 15a y d) se observa la expresión de la proteína p53 con marca color verde en el citoplasma inducida por el extracto *Pa*. Además, el control basal y el tratamiento con DMSO no muestran expresión. La presencia de células se evidencia por la marca de núcleos en azul (DAPI). Con el análisis por western blot (Figura 15b) se remarca como los tratamientos con el extracto crudo incrementan la concentración de la proteína p53, este incremento es más claro en la densitometría (Figura 15c).



**Figura 15.** Expresión de p53 por el tratamiento con el extracto *Pa* en la línea celular U87. Incremento de la proteína p53. a) Las inmunofluorescencias presentan la expresión de la p53 con el tratamiento, en la amplificación se observa que la marca es citosólica; marca azul: núcleos, marca verde: p53. Fotos representativas tomadas en campos con más células adheridas a la placa. La barra blanca representa 20 µm. b) El western blot indica un incremento en la concentración de la proteína, β-actina utilizado como control de carga. c) la densitometría presenta el incremento en la concentración de p53 reflejado en el western blot.

## **7. Discusión.**

### **7.1. Obtención de compuestos bioactivos.**

#### **7.1.1. Manejo adecuado del organismo paso esencial en el aislamiento.**

Un aislamiento eficaz de compuestos de origen marino parte de un manejo adecuado del organismo durante la colecta, considerando las características físicas y químicas de la molécula que se busca aislar (Ebada *et al.*, 2008). En el caso de los invertebrados de ventilas hidrotermales el método de colecta debe contemplar las características fisicoquímicas del ambiente porque es de difícil acceso, considerar el tipo de compuestos a aislar, proteínas y metabolitos, para evitar se desnaturalicen por el cambio de presión y temperatura (Pomponi, 1999). También es importante el número de organismos colectados porque de eso dependerá la cantidad de material con que se dispondrá para purificar compuestos. Considerando estas dificultades de colecta se realizaron cultivos de *R. pachyptila*, sin embargo, muestran baja actividad y capacidad de respuesta en comparación con los organismos en su medio natural, mueren a las pocas horas y solo los ejemplares que lograron sobrevivir estuvieron a una presión mínima de 100 atm (Childress *et al.*, 1984; Childress y Fisher, 1992). También, deben ser identificados taxonómicamente y considerar las relaciones simbióticas establecidas, antes de iniciar la selección de la o las regiones del cuerpo que se trabajaran (Bucar *et al.*, 2013).

#### **7.1.1. Las bacterias simbiotes del organismo marino.**

Como se mencionó anteriormente los organismos marinos presentar simbiosis con bacterias y es común que se encuentren resguardadas en regiones especializadas dentro del macroorganismo. Conocer la región que ocupan estas bacterias es importante para separarlas y evitar obtener resultados equívocos, en donde el compuesto de interés sea producido por la bacteria y no por el macroorganismo.

En diferentes reportes el compuesto aislado provenía del simbiote. De la esponja *Petrosia sp.* se aislaron metabolitos pichiafuranos, que tiempo después se demostró eran producto de la levadura *Pichia membranifaciens*; con la esponja *Dysidea herbácea* se creyó obtener el difenil éter bromado, pero Unson y colaboradores demostraron era producido por la cianobacteria simbiote *Oscillatoria spongelliae*; con otra esponja *Hyatella sp.* se obtuvo el péptido antibacilo que tiempo después se encontró es sintetizado por la bacteria *Vibrio*

*sp.*; y, con la ascidia *Stomozoa murrayi* que se creyó obtener el 6-bromoindol-3-carbaldehído que en realidad es producto de su bacteria simbiote *Acinetobacter sp.*

Comúnmente el método utilizado para retirar a los organismos simbiotes consta en realizar raspados sobre las regiones donde se encuentran alojadas las bacterias. *Riftia pachyptila* aloja a las bacterias simbiotes en el trofosoma, por ello en esta región se realizó el raspado. Discriminar los compuestos producidos por las bacterias nos permite analizar sus efectos potenciales, como ocurrió con la bacteria *Thermococcus litoralis* de ventilas hidrotermales se le clonó la DNA polimerasa y fue termoestable, con una actividad exonucleasa 3'-5' que aumento la fidelidad de la polimerización (Perler *et al.*, 1992).

### **7.1.2. Aislamiento de compuestos.**

#### **7.1.2.1. El liofilizado de material a extraer.**

Las extracciones pueden iniciar inmediatamente después de la colecta o después de liofilizar la muestra. Liofilizar es un proceso de deshidratación en vacío, en el cual se retira el agua por sublimación, es decir, el agua es congelada y al suministrar calor pasa a un estado gaseoso sin pasar por una fase líquida. Cuando se extrae sin liofilizar el agua de mar presente en el organismo al mezclarse con los solventes orgánicos puede provocar alteraciones químicas de los compuestos por las enzimas liberadas durante la extracción. Por lo tanto, liofilizar las muestras antes de la extracción es lo más recomendado (Thoms *et al.*, 2006; Ebada *et al.*, 2008).

Las muestras de *R. pachyptila* fueron liofilizadas y pulverizadas para iniciar la maceración con disolventes orgánicos y obtener el extracto crudo.

#### **7.1.2.2. Extracción con disolventes orgánicos.**

Los disolventes tienen diferente polaridad, su elección dependerá del tipo de compuesto que se busca obtener. Los disolventes polares son los más utilizados porque son fáciles de manejar y son económicos (Ebada *et al.*, 2008). Para obtener los extractos crudos de *R. pachyptila* se utilizó la mezcla diclorometano-metanol que aísla compuestos polares como saponinas, alcaloides, entre otros. Las cromatografías de capa fina reflejan que los extractos crudos no comparten compuestos similares, por lo tanto su efecto podría ser diferente.

Al obtener los extractos crudos hay dos opciones, una es observar la actividad biológica y la otra es iniciar la purificación de compuestos. Para la purificación e identificación estructural se debe contar con suficiente material biológico. La cantidad de extracto crudo obtenido nos condujo a observar primero si los extractos de *R. pachyptila* presentan un efecto citotóxico en células humanas antes de iniciar la purificación.

## **7.2. Actividad biológica de metabolitos marinos.**

Existe una gran variedad de pruebas de actividad biológica, que son representativas, rápidas, económicas y utilizan pequeñas cantidades de material biológico. Entre ellas encontramos el ensayo de reducción metabólica de MTT que permite observar si los compuestos presentan un efecto citotóxico.

Conocer el tipo de actividad biológica del extracto crudo permite dirigir la purificación de compuestos, observando si actúan de manera individual o en asociación con otros. Las interacciones pueden ser aditivas donde el efecto es igual a la suma de sus efectos individuales, sinérgicas cuando el efecto es mayor que la suma de sus efectos individuales o antagonistas donde el efecto conduce a una pérdida de actividad. En ensayos clínicos se ha observado que los compuestos incrementan su eficacia al combinarse con otros, como ocurre con paclitaxel, carboplatino y mapatumumab aumentan la citotoxicidad en células tumorales; o temozolomida con talidomida o cisplatino más radiación incrementan el tiempo de vida de pacientes con glioblastoma (Speirs *et al.*, 2011). Se conoce que la combinación de agentes quimioterapéuticos para la regulación de p53, TRAIL-R2 y Bak puede proporcionar un efecto sinérgico sobre la muerte de células cancerosas.

### **7.2.1. Efecto citotóxico de los extractos de *Riftia pachyptila*.**

Se sabe que *Riftia pachyptila* sobrevive en un ambiente extremo cerca de ventilas hidrotermales lo que hace que produzca compuestos orgánicos diferentes a los encontrados en la superficie terrestre. También que presenta un crecimiento rápido similar a la proliferación celular en cáncer lo que sugiere que debe tener mecanismos moleculares que modulen la proliferación. Estos mecanismos pueden involucrar moléculas derivadas del metabolismo secundario del organismo y tener efectos de interés farmacológico.

A través del ensayo de reducción metabólica de MTT se buscó descifrar el efecto de compuestos presentes en este organismo sobre las células humanas. En general, los diferentes extractos de *R. pachyptila* presentan una disminución en la producción de formazán metabolizado en las concentraciones 100 y 200 µg/mL, lo que sugiere muerte celular. El efecto de los tres extractos (*Tr*, *Pa* y *Tu*) sobre la línea U373, coincidió en la producción de formazán y la morfología observada que muestra muerte celular. Sin embargo, sobre la línea U87 con base en la morfología celular los resultados del ensayo de MTT no representan la cantidad de células muertas generadas por los tres extractos. Estos datos podrían sugerir que los extractos de *R. pachyptila* tienen blancos moleculares que intervienen en la metabolización del MTT en la línea U87. Ya que se conoce que el MTT es metabolizado por enzimas deshidrogenasas que se encuentran asociadas con la actividad de enzimas de la cadena respiratoria (Slater *et al.*, 1963; Schanenstein y Hoffer-Bergthaler, 1972) y que es dependiente de la actividad enzimática mitocondrial y extramitocondrial con la participación de deshidrogenasas citoplasmáticas (Huet *et al.*, 1992; Weyermann *et al.*, 2005). Resulta entonces de interés el estudio a futuro del efecto que los extractos de *R. pachyptila* tienen sobre las deshidrogenasas en células de cáncer.

Las diferencias en los resultados del ensayo de reducción metabólica de MTT entre ambas líneas celulares de glioma puede ser producto de las diferencias entre ambos tipos celulares, el mecanismo de captación de las moléculas presentes en los extractos o por la sensibilidad a los compuestos. Fotakis y Timbrell (2006) compararon diferentes métodos de citotoxicidad en dos líneas celulares de cáncer hepático (HTC y HepG2) y observaron que los resultados obtenidos por el ensayo de MTT son dependientes del tipo celular, producto de la sensibilidad al tratamiento. Otros trabajos han reportado diferencias del efecto producido en líneas celulares cancerígenas con el ensayo de reducción metabólica de MTT (Plumb *et al.*, 1989; Huet *et al.*, 1992; Weyermann *et al.*, 2005). Además se conoce que la línea celular U87 con tratamientos complementarios no incrementa su sensibilidad ante ciertos fármacos (Gomez-Manzano *et al.*, 1996; Badie *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2010).

Resultó de mucho interés que los datos obtenidos sobre el efecto citotóxico del extracto *Pa* en la línea celular no cancerígena, fibroblastos BJ1, no provocó muerte celular. En cambio este extracto fue el que presentó un mayor efecto citotóxico en las líneas celulares de glioma humano. El hecho de tener la posibilidad de encontrar un compuesto



que cause muerte de células cancerígenas y no altere a células sanas lo perfila como un buen fármaco con posiblemente menos efectos secundarios que la quimioterapia actual.

Por otro lado, el DMSO usado como disolvente no afectó a las células humanas en la concentración utilizada y no modificó el efecto citotóxico inducido por los extractos de *R. pachyptila*.

### **7.2.2. Mecanismos moleculares involucrados en la muerte celular inducida por *Riftia pachyptila*.**

Encontramos que *Pa* presenta un efecto citotóxico significativo sobre las líneas celulares de glioma humano, el siguiente paso era determinar los posibles mecanismos moleculares implicados en la muerte celular. Iniciamos con el ensayo TUNEL que nos proporciona información de una muerte celular por daño al DNA. Considerando que este ensayo puede detectar apoptosis y necrosis contemplamos la morfología celular en particular la integridad de la membrana que difiere entre ambos tipos de muerte celular (Gavrieli *et al.*, 1992; Kressel y Groscurth, 1994; Jordán, 2003).

La apoptosis es el tipo de muerte celular de interés por ser a nuestro parecer menos dañina por no comprometer a células cercanas al tumor. La activación de la apoptosis es mediada por p53 y alteraciones en la expresión de p53 impiden la regulación del ciclo celular y la activación de muerte celular después del daño al DNA (Ullrich *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1994; Agarwal, 1995; Levine, 1997; Vousden, 2009). Se sabe que la mayoría de los tipos de cáncer presentan alteraciones en p53 (Nigro *et al.*, 1989; Hollstein *et al.*, 1991; Newcomb *et al.*, 1993; Greenblatt *et al.*, 1994; Bold *et al.*, 1997; Louis *et al.*, 2007; Green y Kroemer, 2009), también que estas modificaciones en un tumor de bajo grado no desencadenan la formación de uno de mayor grado (Reyes y Lema, 2007; Deppert, 2007).

Como aún se desconoce que origina o produce un cáncer, estos se combaten hasta que son identificados. Se han buscado alternativas para la activación de p53 u otros mecanismos independientes. Sin embargo, algunos tratamientos independientes de p53 que activan muerte celular a través de receptores de muerte (TNF y Fas) en estudios clínicos presentaron efectos tóxicos colaterales: TNF provocó una respuesta inflamatoria sistémica grave y FasL apoptosis hepática (Jordán, 2003; Xia *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2005).

### **7.2.2.1. Activación de la proteína p53.**

Las líneas celulares de glioma humano se seleccionaron por el estado del gen p53. La línea U87 expresa p53 silvestre, mientras que U373 expresa la forma mutante. Independientemente de las diferencias presentes entre las líneas celulares de glioma humano los extractos de *R. pachyptila* incrementaron la expresión de la proteína p53 citosólica, vía independiente de la actividad nuclear. Esta proteína p53 puede desencadenar una respuesta a través de la mitocondria (Green y Kroemer, 2009). Esto se determina utilizando anticuerpos que analicen la activación de *bax*, *bak*, *bad*, *c-myc*, y la inhibición *bcl-2* y *bcl-x<sub>L</sub>* (Miyashita *et al.*, 1994; Speirs *et al.*, 2011). Por lo tanto, el efecto de los extractos crudos sobre las líneas celulares humanas es independiente del tipo celular, de la naturaleza de p53 y de otros genes implicados en el ciclo celular y la apoptosis (Gotz y Montenarh, 1995; Badie *et al.*, 1999).

## 8. Conclusiones.

- Se obtuvieron exitosamente tres extractos crudos de *Riftia pachyptila*.
- Los tres extractos inducen un efecto citotóxico sobre las líneas celulares de glioma humano.
- Se estandarizaron las concentraciones de mayor efecto citotóxico producidos por los extractos crudos de *R. pachyptila*.
- Se encontró el extracto crudo de *R. pachyptila* que presentó un mayor efecto citotóxico en las líneas celulares de glioma humano.
- El extracto *Pa* mantuvo la viabilidad celular sin modificaciones en la línea celular de fibroblastos BJ1.
- El análisis de los resultados obtenidos del extracto crudo *Pa* sugiere que el mecanismo de muerte celular involucrado es de tipo apoptosis.
- Existe un incremento en la concentración de p53 citoplasmática.

En síntesis, se concluye que los datos experimentales obtenidos en este proyecto sugieren que los extractos crudos de *R. pachyptila* presentan un efecto citotóxico sobre las líneas de glioma humano U373 y U87 a través de un posible mecanismo de muerte tipo apoptosis. Este estudio pone de manifiesto la necesidad de identificar los compuestos de *R. pachyptila* para su posible uso como posibles fármacos citotóxicos con perspectivas para su uso en quimioterapias contra cáncer.

## 9. Literatura citada.

- Agarwal, M. L., Agarwal, A., Taylor, W. R. y Stark, G. R. (1995). p53 controls both the G<sub>2</sub>/M and the G<sub>1</sub> cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(18), 8493-8497.
- Alfaro, M. E., García, C. C. y Dueñas, G. A. (2000). Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. *Rev. Inst. Nat. Cancerol. Méx* 46(4), 275-280.
- Arencibia, A. D. F., Rosario, F. L. A. y Curveco, S. D. L. (2009). Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. Sertox, retel
- Arndt, C., Gaill, F. y Felbeck, H. (2001). Anaerobic sulfur metabolism in thiotrophic symbioses. *J. Exp. Biol.* 204, 741-750.
- Arp, A. J. y Childress, J. J. (1983). Sulfide binding by the blood of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*. *Science* 219, 295-297.
- Badie, B., Sing, G. C., Klaver, J., Herweijer, H. y Boothman, D. (1999). Combined radiation and p53 gene therapy of malignant glioma cells. *Cancer Gene Therapy* 6(2), 155-162.
- Bai, R., Staedtke, V. y Riggins, G. J. (2011). Molecular targeting of glioblastoma: drug discovery and therapies. *Trends in Molecular Medicine* 17(6), 301-312.
- Bartolomaeus, T. (1999). Structure, function and development of segmental organs in Annelida. *Hydrobiologia* 402, 21-37.
- Barakat, T., Jackson A. H. y Abdullah M. I. (1977). Further studies of Erythrina alkaloids. *Lloydia* 40, 471.
- Bender, D. A., Morse, R. D., Neal, J. N. y Wolf, D. D. (1985). Delayed inoculation and starter nitrogen for enhancing early growth and nitrogen status of *Lespedeza cuneata*. *Plant and Soil* 84, 311-321.
- Bhakuni, D. S. y Rawat, D. S. (2005). Bioactive Marine Natural Products. *Spring Street* ISBN 1-4020-3472-5
- Blum, J. y Fridovich, I. (1984). Enzymatic defenses against oxygen toxicity in the hydrothermal vent animals *Riftia pachyptila* and *Calypptogena magnifica*. *Arch. Biochem. Biophys.* 228(2), 617-620.
- Bold, R. J., Termuhlen, P. M. y McConkey, D. J. (1997). Apoptosis, cancer and cancer therapy. *Surgical Oncology* 6(3), 133-142.
- Bosch, C. y Grassé, P. P. (1984). Cycle partiel des bactéries chimioautotrophes symbiotiques et leurs rapport avec les bactériocytes chez *Riftia pachyptila* Jones (Pogonophora Vestimentifère). I. Le trophosome et les bactériocytes. *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris* 9:371-376.
- Bright, M., Keckeis, H. y Fisher, C. R. (2000). An autoradiographic examination of carbon fixation, transfer and utilization in the *Riftia pachyptila* symbiosis. *Mar. Biol.* 136, 621-632.
- Bright, M. y Sorgo, A. (2003). Ultrastructural reinvestigation of the trophosome in adults of *Riftia pachyptila* (Annelida, Siboglinidae). *Invertebr. Biol.* 122(4), 347-368.
- Bright, M. y Giere, O. (2005). Microbial symbiosis in Annelida. *Symbiosis* 38:1-45.
- Bucar, F., Wube, A. y Schmid, M. (2013). Natural product isolation - how to gel from biological material to pure compounds. *Nat. Prod. Rep.* DOI: 10.1039/c3np20106f
- Bursch, W. Hohegger, K., Torok, et al. (2000). Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. *J. Cell Sci.* 13, 1189-1198.
- Burgh, M. E., Juniper, S. K. y Singla, C. L. (1989). Bacterial symbiosis in Northeast Pacific Vestimentifera: a TEM study. *Marine Biology* 101, 97-105.
- Cavanaugh, C. M., Gardiner, S. L., Jones, M. L., Jannasch, H. W. y Waterbury, J. B. (1981). Procaryotic cells in the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila* Jones: Possible chemoautotrophic symbionts. *Science* 213(4505), 340-342.
- Cavanaugh, C. M. (1983). Symbiotic chemoautotrophic bacteria in marine invertebrates from sulphide-rich habitats. *Nature, Lond.* 302, 58-61.
- Childress, J. J., Arp, A. J. y Fisher Jr., C. R. (1984). Metabolic and blood characteristics of the hydrothermal vent tube-worm *Riftia pachyptila*. *Mar. Biol.* 83, 109-124.
- Childress, J. J., Fisher, C. R., Favuzzi, J. A., Kochevar, R. E., Sanders, N. K. y Alayse, A. M. (1991). Sulfide-driven autotrophic balance in the bacterial symbiont-containing hydrothermal vent tubeworm, *Riftia pachyptila* Jones. *Biol. Bull.* 180, 135-153.
- Childress, J. J. y Fisher, C. R. (1992). The biology of hydrothermal vent animals: physiology, biochemistry and autotrophic symbiosis. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 30, 337-441.
- Chipuk J. E., Maurer U., Green D. R. y Schuler M. (2003). Pharmacologic activation of p53 elicits Bax-dependent apoptosis in the absence of transcription. *Cancer Cell* 4, 371-381.
- Cooper, G. M. y Hausman, R. E. () La célula. Sexta edición.

- Corliss, J. B., Dymond, J., Gordon, L. I., Edmond, J. M., Herzen, R. P. von, Ballard, R. D., Green, K., Williams, D., Bainbridge, A., Crane, K. y Andel, T. H. van (1979). Submarine thermal springs on the Galapagos Rift. *Science* 203(4385), 1073-1083.
- De Lara, G. (1992). Toxic properties of some marine algae. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* 43, 81-85.
- De la Fuente, G. A., Rodríguez, L. J. y Fonseca, C. E. (2007). Análisis de proteínas mediante electroforesis e inmunotransferencia (*Western blot*). *Piel* 22(5), 252-258.
- Deppert, W. (2007). Mutant p53: from guardian to fallen angel? *Oncogene* 26, 2142-2144.
- Dewick, P. M. (2009). Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach, 3<sup>rd</sup> Edition, ISBN: 9780470741689
- Distel, D. L., Lane, D. J., Olsen, G. J., Giovannoni, S. J., Pace B., Pace, N.R., Stahl, D. A. y Felbeck, H. (1988). Sulfur-oxidizing bacterial endosymbionts: analysis of phylogeny, specificity by 16S ribosomal RNA sequences. *J. Bacteriol.* 170(6), 2506-2510.
- Dooley, F. D., Nair, S. P. y Ward, P. D. (2013). Increased growth and germination success in plants following hydrogen sulfide administration. *PLoS One* 8(4), DOI:10.1371/journal.pone.0062048
- Ebada, S. S., Edrada, R. A., Lin, W. y Proksch, P. (2008). Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. *Nature Protocols* 3(12), 1820-1831.
- Fauchald, K. y Rouse, G. W. (1997). Polychaete systematics: past and present. *Zool. Scr.* 26, 71-138.
- Felbeck, H. (1981). Chemoautotrophic potential of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila* Jones (Vestimentifera). *Science* 213(4505), 336-338.
- Felbeck, H. (1985). CO<sub>2</sub> fixation in the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila* (Jones). *Physiol. Zool.* 58(3), 272-281.
- Felbeck, H. y Jarchow, J. (1998). Carbon release from purified chemoautotrophic bacterial symbionts of the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*. *Physiol. Zool.* 71(3), 294-302.
- Fisher, C. R., Childress, J. J. y Sanders, N. K. (1988). The role of vestimentiferan hemoglobin in providing an environment suitable for chemoautotrophic sulfide-oxidizing endosymbionts. *Symbiosis* 5, 229-246.
- Fisher, C. R., Childress, J. J. y Minnich, E. (1989). Autotrophic carbon fixation by the chemoautotrophic symbionts of *Riftia pachyptila*. *Biol. Bull.* 177(3), 372-385.
- Fisher, C. R., Kennicutt II, M. C. y Brooks, J. M. (1990). Stable carbon isotopic evidence for carbon limitation in hydrothermal vent vestimentiferans. *Science* 247(4946), 1094-1096.
- Fisher, C. R. (1996). Chemoautotrophic and methanotrophic symbioses in marine invertebrates. *Rev. Aquat. Sci.* 2, 399-436.
- Fotakis, G. y Timbrell, J. (2006). In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters* 160, 171-177.
- Gaill, F. y Hunt, S. (1986). Tubes of deep sea hydrothermal vent worms *Riftia pachyptila* (Vestimentifera) and *Alvinella pompejana* (Annelida). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 34, 267-274.
- Gaill, F., Voss-Foucart, M-F, Gerday, C., Compère, P. y Goffinet, G. (1992). Chitin and protein contents in the tubes of vestimentiferans from hydrothermal vents. In: Brine C.J., Sandford P.A., Zizakis J.P. (eds) *Advances in chitin and chitosan. Elsevier Applied Science*, London and New-York, 232-236.
- Gaill, F. (1993). Aspects of life development at deep-sea hydrothermal vents. *Fedn. Am. Soc. Exp. Biol. J.* 7, 558-565.
- Gaill, F., Shillito, B., Ménard, F., Goffinet, G. y Childress, J. J. (1997). Rate and process of tube production by the deep-sea hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 148, 135-143.
- Gavrieli, Y., Sheerman, Y. y Ben-Sasson S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119, 490-501.
- Girguis, P. R., Lee, R. W., Desaulniers, N., Childress, J. J., Pospesel, M., Felbeck, H. y Zal, F. (2000). Fate of nitrate acquired by the tubeworm *Riftia pachyptila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(7), 2783-2790.
- Gomez-Manzano, C, Fueyo, J, Kyritsis, AP, et al. (1996). Adenovirus-mediated transfer of the p53 gene produces rapid and generalized death of human glioma cells via apoptosis. *Cancer Res.* 56, 694-699.
- Gotz, C. y Montenarh, M. (1995). p53: DNA damage, DNA repair, and apoptosis. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 127, 65-95.
- Green, D. R. y Kroemer, G. (2009). Cytoplasmic functions of the tumor suppressor p53. *Nature* 458(7242), 1127. DOI: 10.1038/nature07986
- Greenblatt, M. S., Bennett, W. P., Hollstein, M. y Harris, C. C. (1994). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 54, 4855-4878.

- Haefner, B. (2003). Drugs from the deep. *Drug Discov. Today*. 8, 536-544.
- Hand, S. C. (1987). Trophosome ultrastructure and the characterization of isolated bacteriocytes from invertebrate-sulfur bacteria symbioses. *Biol. Bull.* 173, 260-276.
- Harborne, J. B. (1989). Recent advances in chemical ecology. *Nat. Prod. Rep.* 6, 85-108.
- Hentschel, U. y Felbeck, H. (1993). Nitrate respiration in the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*. *Nature* 366, 338-340.
- Hernández, L. M. V. y Hernández, L. M. M. (2005). Bioactivos marinos en Venezuela: una revisión. *Saber, Venezuela* 17(2), 188-194.
- Hirata Y. y Uemura D. (1986) *Pure Appl. Chem.* 58, 701.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. y Harris, C.C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* 253(5015), 49-53.
- Huet, O., Petit, J. M., Ratinaud, M. H. y Julien, R. (1992). NADH-Dependent Dehydrogenase Activity Estimation by Flow Cytometric Analysis of 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *Cytometry* 13, 532-539.
- Ikeda, D. D., Duan, Y., Matsuki, M., Kunitomo, H., Hutter, H., Hedgecock, E. M., y Iino, Y. (2008). CASY-1, an ortholog of calsynenins/alcadeins, is essential for learning in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 5260-5265.
- Jones, M. L. (1981). *Riftia pachyptila* Jones: Observations on the vestimentiferan worm from the Galápagos Rift. *Science*, N.Y. 213, 333-336.
- Jordán, J. (2003). Apoptosis: muerte celular programada. *OFFARM* 22(6), 100-106.
- Kojima, S. (1998) Paraphyletic status of Polychaeta suggested by phylogenetic analysis based on the amino acid sequences of elongation factor-1 $\alpha$ . *Mol. Phylog. Evol.* 9, 255-261.
- Kressl, M. y Groscurth, P. (1994). Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA. *Cell. Tissue Res.* 278(3), 549-556.
- Kumar, R. y Zi-rong, X. (2004). Biomedical compounds from marine organisms. *Mar. Drugs.* 2, 123-146.
- Kumar, R., Herbert, P. E. y Warrens, A. N. (2005). An introduction to death receptors in apoptosis. *International Journal of Surgery* 3, 268-277.
- Lara-Lara, J. R., Arreola, L. J. A., Calderón, A. L. E., Camacho, I. V. F., de la Lanza, E. G., Escofet, G. A., Espejel, C. M. I., Guzmán, A. M., Ladah, L. B., López, H. M., Meling, L. E. A., Moreno, C. B. P., Reyes, B. H., Ríos, J. E. y Zertuche, G. A. (2008). Los ecosistemas costeros, insulares y epicontinentales, en *Capital natural de México*, vol. I: *Conocimiento actual de la biodiversidad*. CONABIO, México, 109-134.
- Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., Scheithauer, B. W. y Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO Classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 114, 97-109.
- Lonsdale, P. (1977). Clustering of suspension-feeding macrobenthos near abyssal hydrothermal vents at oceanic spreading centers. *Deep Sea Res.* 24, 857-863.
- Llodra, E. R. y Billett, D. S. M. (2006). La exploración de la biodiversidad marina. Desafíos científicos y tecnológicos. 3. Ecosistemas de las profundidades marinas: reservorio privilegiado de la biodiversidad y desafíos tecnológicos. Duarte C. M. (ed.) ISBN: 978-84-96515-26-0
- Lutz, R. A. y Kennish, M. J. (1993). Ecology of deep-sea hydrothermal vent communities: a review. *Rev. Geophys.* 31, 211-242.
- Lutz, R. A., Shank T. M., Fornari D. J., Haymon R. M., Lilley M. D., Damm K. L. von y Desbruyères D. (1994). Rapid growth at deep-sea vents. *Nature* 371, 663-664.
- MacDonald, I. R., Boland, G. S., Baker, J. S., Brooks, J. M., Kennicutt, M. C. I. I. y Bidigare, R. R. (1989). Gulf of Mexico hydrocarbon seep communities. II. Spatial distribution of seep organisms and hydrocarbons at Bush Hill. *Mar. Biol.* 101, 235-247.
- Maldonado, R. (1985). Los productos en las plantas. Vol. I. Coahuila: *Centro de Investigación en Química Aplicada*.
- Marsh, A. G., Mullineaux, L. S., Young, C. M. y Manahan, D. T. (2001). Larval dispersal potential of the tubeworm *Riftia pachyptila* at deep-sea hydrothermal vents. *Nature* 411, 77-80.
- McHugh, D. (1997). Molecular evidence that echiurans and pogonophorans are derived annelids. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94, 8006-8009.
- McHugh, D. (2000). Molecular phylogeny of the Annelida. *Can. J. Zool.* 78, 1873-1884.
- McMullin, E. R., Hourdez, S., Schaeffer, S. W. y Fisher, C. R. (2003). Phylogeny and biogeography of deep sea vestimentiferan tubeworms and their bacterial symbionts. *Symbiosis* 34, 1-41.

- Miller, J. H., Singh, A. J. y Northcote, P. T. (2010). Microtubule-Stabilizing drugs from marine sponges: focus on peloruside A and zampanolide. *Mar. Drugs* 8, 1059-1079.
- Minic, Z. y Hervé, G. (2004). Biochemical and enzymological aspects of the symbiosis between the deep-sea tubeworm *Riftia pachyptila* and its bacterial endosymbiont. *Eur. J. Biochem.* 271, 3093-3102.
- Miyashita, T, Krajewski, S, Krajewska, M, *et al.* (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene* 9, 1799-1809.
- Miyashita, T. y Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-299.
- Moreno-Félix, C., Wilson-Sánchez, G., Cruz-Ramírez, S., Velázquez-Contreras, C., Plascencia-Jatomea, M., Acosta, A., Machi-Lara, L., Aldana-Madrid, M., Ezquerro-Brauer, J., Rocha-Alonzo, F. y Burgos-Hernández, A. (2013). Bioactive lipidic extracts from octopus (*Paraoctopus limaculatus*): antimutagenicity and antiproliferative studies. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* ID 273582
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol Methods* 27, 6555-6563.
- Munro, M., Blunt, J., Dumdei, E., Hickford, S., Lill, R., Li, S., Battershill, C. y Duckworth, A. (1999). The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *J. of Biotech.* 70, 15-25.
- Nelson, D. C., Waterbury, J.B. y Jannasch, H. W. (1984). DNA base composition and genome size of the prokaryote symbiont in *Riftia pachyptila* (Pogonophora). *FEBS Lett.* 24, 267-271.
- Nelson, D. C. y Fisher, C. R. (1995). Chemoautotrophic and methanotrophic endosymbiotic bacteria at deep-sea vents and seeps. In *Microbiology of deep-sea hydrothermal vents* (Karl, D.M. ed). *CRC, Boca Raton, FL*, 125-167.
- Newcomb, E. W., Madonia, W. J., Pisharody, S., Lang, F. F., Koslow, M., y Miller, D. C. (1993). A correlative study of p53 protein alteration and *p53* gene mutation in glioblastoma multiforme. *Brain Pathol.* 3, 229-235.
- Nigro, J. M., Baker, S. J., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., Hostetter, R., Cleary, K., Bigner, S. H., Davidson, N., Baylin, S., Devilee, P., Glover, T., Collins, F. S., Weston, A., Modali, R., Harris, C. C. y Vogelstein, B. (1989). Mutations in the *p53* gene occur in diverse human tumour types. *Nature* (Lond.) 342, 705-708.
- Ocker, M. y Höpfner M. (2012). Apoptosis-Modulating drugs for improved cancer therapy. *Eur. Surg. Res.* 48, 111-120.
- Peralta-Zaragoza, O., Bahena-Román, M., Díaz-Benítez, C. E. y Madrid-Marina, V. (1997). Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud Pública de México* 39(5), 451-462.
- Perler, F.B., Comb, D. G., Jack, W. E., Moran, L. S., Qiang, B., Kucera, R. B., Benner, J., Slatko, B. E., Nwankwo, D. O., Hempstead, S. K., Carlow, C. K. S. y Jannasch, H. (1992). Intervening sequences in an Archaea DNA polymerase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5577-5581.
- Pflugfelder, B., Craig, C. S. y Bright, M. (2009). Dynamics of cell proliferation and apoptosis reflect different life strategies in hydrothermal vent and cold seep vestimentiferan tubeworms. *Cell Tissue Res.* 337, 149-165.
- Plumb, J. A., Milroy, R. y Kaye, S. B. (1989). Effects of the pH dependence of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Res.* 49, 4435-4440.
- Pomponi, S. A. (1999). The potential for the marine biotechnology industry. In B. Cicin-Sain, B., R.W. Knecht & N. Foster (Eds.), *Trends and Future Challenges for U. S. National Ocean and Coastal Policy: Proceedings*, 101-104.
- Powel, M. A. y Somero, G. N. (1986). Adaptations to sulfide by hydrothermal vent animals: sites and mechanisms of detoxification and metabolism. *Biol. Bull.* 171, 274-290.
- Ravaux, J., Gay, L., Voss-Foucart, M. F. y Gaill, F. (1998). Tube growth process in the deep-sea hydrothermal vent tube-worm *Riftia pachyptila*: synthesis and degradation of chitin. *Cah. Biol. Mar.* 39, 99-107.
- Ravaux, J., Chamoy, L. y Shillito, B. (2000). Synthesis and maturation processes in the exoskeleton of the vent worm *Riftia pachyptila*. *Marine Biology* 136, 505-512.
- Repetto, M. (2002). Toxicología Fundamental. Métodos alternativos, Toxicidad in vitro. Sevilla, España: Ediciones Díaz de Santos, Enpses-Mercie Group .Tercera edición, 303-305.
- Reyes, O. F. y Lema, B. M. (2007). Gliomas del encéfalo Santiago de Compostela. Pág. 684. ISBN 9788497508131

- Robinson, J. J., Stein, J. L. y Cavanaugh, C. M. (1998). Cloning and sequencing of a form II ribulose-1, 5-biphosphate carboxylase/oxygenase from the bacterial symbiont of the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*. *J. Bacteriol.* 180(6), 1596-1599.
- Rodrigues, A. T., Souza, L. F. R., Kahn, A., Lobo, D., Feijó, D. L. G., Soletti, R., Borges, H. y Moura, N. V. (2011). Glioblastoma cells: A heterogeneous and fatal tumor interacting with the parenchyma. *Life Sciences* 89, 532-439.
- Rosse, A. J., Waymire, K. G., Moss, J. E., Parlow, A. F., Skinner, M. K., Russell, L. D. y MacGregor, G. R. (1998). Testicular degeneration in Bclw-deficient mice. *Nat. Genet.* 18(3): 251-256
- Sánchez-Torres, L. E. y Vargas, F. D. (2003). Apoptosis: el fenómeno y su determinación. *Téc. Pecu. Méx.* 41(1), 49-62.
- Schanenstein, E. y Hoffer-Bergthaler, E. (1972). Cytospectrometric determination of the succinodihydrogenase activity in isolated cells with MTT reagent. *Monatshefte für Chemie* 103, 1271-1275.
- Scott, K. M., Fisher, C. R., Vodenichar, J. S., Nix, E. R. y Minnich, E. (1994). Inorganic carbon and temperature requirements for autotrophic carbon fixation by the chemoautotrophic symbionts of the giant hydrothermal vent tube worm, *Riftia pachyptila*. *Physiol. Zool.* 67, 617-638.
- Sedlak, T. W., Oltvai, Z.N., Yang, E., Wang, K., Boise, L. H., Thompson, C. B. y Korsmeyer S. J. (1995). Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7834-7838.
- Shank, T. M., Fornari, D. J., Damm, K. L. von, Lilley, M. D., Haymon, R. M. y Lutz R. A. (1998). Temporal and spatial patterns of biological community development at nascent deep-sea hydrothermal vents (9°50'N, East Pacific Rise). *Deep Sea Res II* 45, 465-515.
- Shillito, B., Lechaire, J. P., Goffinet, G. y Gaill, F. (1995). Composition and morphogenesis of the tubes of vestimentiferan worms. *Spec. Publs. Geol. Soc. Lond* 87, 295-302.
- Shillito, B., Ravaux, J., Gaill, F., Delachambre, J., Thiébaud, E. y Childress J. J. (1999). Preliminary data on carbon production of deep-sea vent tubeworms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 183, 275-279.
- Slater, T. F., Sawyer, B. Strauli, U., et al. (1963). Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim Biophys Acta.* 8(77), 383-393.
- Smith, M. L., Chen, I., Zhan, Q., Bae, I., Chen, C., Gilmer, T. M., Kastan, M. B., O'Connor, P. M. y Fornace Jr., A. J. (1994). Interaction of the p53-regulated protein GAAD45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* 266(5189), 1376-1380.
- Speirs, C. K., Hwang, M., Kim, S., Li, W., Chang, S., Varki, V., Mitchell, L., Schleicher, S. & Lu, B. (2011). Harnessing the cell death pathway for targeted cancer treatment. *Am. J. Cancer Res.* 1(1), 43-61.
- Stahl, D. A., Lane, D. J., Olsen, G. J. y Pace, N. R. (1984). Analysis of hydrothermal vent-associated symbionts by ribosomal RNA sequences. *Science*, N.Y. 224, 409-411.
- Stewart, F. J. y Cavanaugh, C. M. (2005). Symbiosis of Thioautotrophic Bacteria with *Riftia pachyptila*. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 197-225.
- Thoms, C., Ebel, R. y Proksch, P. (2006). Activated chemical defense in Aplysina sponges revisited. *J. Chem. Ecol.* 32, 97-123.
- Tunnicliffe, V. (1991). The biology of hydrothermal vents: ecology and evolution. *Oceanogr. Mar. Biol. A. Rev.* 29, 319-407.
- Tunnicliffe, V., McArthur, A. G. y McHugh, D. (1998). A biogeographical perspective of the deep-sea hydrothermal vent fauna. *Adv. Mar. Biol.* 34, 353-442. ISBN 0-12-026134-0
- Ullrich, S. J., Mercer, W. E., Appella, E. (1992). Human wild-type p53 adopts a unique conformational and phosphorylation state in vivo during growth arrest of glioblastoma cells. *Oncogene* 7, 1635-1643.
- Van Mier, J. C. M., Vervuurt, A. y Schlangen, E. (1994). Boundary and size effects in uniaxial tensile tests: A numerical and experimental study, in *Fracture and Damage in Quasibrittle Structures* (eds. Z.P. Ba<sub>ant</sub>, Z. Bittnar, M. Jirasek and J. Mazars), E&FN Spon, London/ New York, 289-302.
- Vousden, K. H. (2009). Functions of p53 in metabolism and invasion. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 511-517.
- Wang, P., Henning, S. M. y Heber, D. (2010). Limitations of MTT and MTS-Based Assays for Measurement of Antiproliferative Activity of Green Tea Polyphenols. *PLoS ONE* 5(4), e10202. doi:10.1371/journal.pone.0010202
- Weyermann, J., Lochmann, D. y Zimmer, A. (2005). A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics* 288, 369-376.
- Wilmot Jr., D. B. y Vetter, R. D. (1990). The bacterial symbiont from the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila* is a sulfide specialist. *Mar. Biol.* 106, 273-283.



- Wolter, K. G., Hsu, Y., Smith, C. L., Nechushtan, A., Xi, X. y Youle, R. J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell Biol.* 139(5), 1281-1292.
- Xia, W., Li, J., Geng, M., Xin, X. y Ding, J. (2005). Potentiation of T cell function by a marine algae-derived sulfated polymannuronate: in vitro analysis of novel mechanisms. *J. Pharmacol. Sci.* 97, 107-115.
- Ye, Q., Zhang, X., Huang, B., Zhu, Y. y Chen, X. (2013). Astaxanthin suppresses MPP<sup>+</sup>-induced oxidative damage in PC12 cells through a Sp1/NR1 signaling pathway. *Marine Drugs* 11, 1019-1034.
- Yu, J., Wang, Z., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. y Zhang, L. (2003). PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(4), 1931-1936.
- Yuan, S., Yu, X., Topf, M., Ludtke, S. J., Wang, X. y Akey, C. W. (2010). Structure of an apoptosome-procaspase-9 card complex. *Structure* 18, 571-583.
- Zal, F., Lallier, F. H., Wall, J. S., Vinogradov, S. N. y Toulmond, A. (1996). The multi-hemoglobin system of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*. I. Reexamination of the number and masses of its constituents. *J. Biol. Chem.* 271(15), 8869-8874.
- Zierenberg, R. A., Adams, M. W. y Arp, A. J. (2000). Life in extreme environments: hydrothermal vents. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97(24), 12961-12962.

### **Páginas web:**

Organización Mundial de la Salud:

[www-dep.iarc.fr/WHOdb/WHOdb.htm](http://www-dep.iarc.fr/WHOdb/WHOdb.htm)

[www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/) (Cáncer, Nota descriptiva no. 247, febrero 2015)

INFOCANCER, México 2015

[www.infocancer.org.mx](http://www.infocancer.org.mx)

International Agency for Research on Cancer (IARC), 2016

<http://globocan.iarc.fr>

Cancer National Institute, USA 2016

<http://www.cancer.gov>

American Cancer Society, 2016

<http://www.cancer.org>

Relieve oceánico:

[http://3.bp.blogspot.com/\\_vR12591kexU/TM6QPc7KsyI/AAAAAAAAArU/HV\\_T6U9hcis/s1600/relieve\\_oceanico.jpg](http://3.bp.blogspot.com/_vR12591kexU/TM6QPc7KsyI/AAAAAAAAArU/HV_T6U9hcis/s1600/relieve_oceanico.jpg)

Células cancerosas:

[https://www.google.com.mx/search?q=hepatoma&rlz=1C9BKJA\\_enMX590MX591&hl=es-MX&prmd=ivn&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi\\_7O-Gn5rNAhVH2oMKHSEtAe4Q\\_AUIBygB&biw=1024&bih=653#hl=es-MX&tbn=isch&q=celulas+sanas+vs+celulas+cancerosas+&imgcr=i81StET8H-GDZM%3A](https://www.google.com.mx/search?q=hepatoma&rlz=1C9BKJA_enMX590MX591&hl=es-MX&prmd=ivn&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi_7O-Gn5rNAhVH2oMKHSEtAe4Q_AUIBygB&biw=1024&bih=653#hl=es-MX&tbn=isch&q=celulas+sanas+vs+celulas+cancerosas+&imgcr=i81StET8H-GDZM%3A)